AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**DESENVOLVIMENTO DE MATRIZES POLIMÉRICAS BIODEGRADÁVEIS À BASE DE
QUITOSANA E POSSÍVEIS BLENDS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA
DE FÁRMACOS**

Jorge Gabriel dos Santos Batista

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Materiais**

Orientador:

Prof. Dr. Ademar Benévolo Lugão

São Paulo

2015

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**DESENVOLVIMENTO DE MATRIZES POLIMÉRICAS BIODEGRADÁVEIS À BASE DE
QUITOSANA E POSSÍVEIS BLENDS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA
DE FÁRMACOS**

Jorge Gabriel dos Santos Batista

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Materiais**

Orientador:

Prof. Dr. Ademar Benévolo Lugão

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2015

Dedico esse trabalho

A Deus, a natureza e a todas as energias que regem o universo e tornam possível esse milagre que é estar vivo.

A Margarida e Williams, primeiramente pelo fato da minha existência como resultado da união de ambos, e também, pelo amor, carinho e o apoio.

A Maurício, Glaucia, Janaina e Jaqueline meus queridos irmãos.

A Laiza minha sobrinha favorita.

Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável de aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer.

Albert Einstein

Bem-aventurados os que têm fome e sede de justiça, por que eles serão fartos.

Mateus 5, versículo 6

Não adianta olhar para o céu com muita fé e pouca luta.

Gabriel “O Pensador”

Quem teme a morte, desconhece o sentido da vida.

J.G.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Ademar Benévolo Lugão, pela oportunidade, orientação e compreensão.

À CAPES, pela bolsa cedida.

Ao IPEN, pela oportunidade e infraestrutura para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao CQMA e colegas por todo apoio.

À Dr. Antônio Jedson Caldeira Brant, pelas ideias.

À Dr. José Roberto Rogero, pelas contribuições e ideias.

À Dra. Sizue Ota Rogero, pelas contribuições e apoio.

À Dra. Mônica Beatriz Mathor, pelo apoio e sugestões.

À Dra. Yasko Kodama, pelo apoio e disponibilidade de seu laboratório.

À Divisão de Ensino, pela atenção e paciência.

À equipe de microscopia eletrônica do CCTM.

Aos técnicos Pablo e Paulo, pela disponibilidade e energia.

Aos alunos de IC Gabriela, Bruna, Vinícius, Gabriela II e Débora.

À Dra. Maria José, pelo exemplo e pelas ideias.

Aos Drs. Gustavo Varca e Rodrigo Queiroz, pela parceria e amizade.

À Talita, Claudio, Tania e Lucas pelo apoio.

À Prof.^a Elide Mastena, pelo apoio.

À equipe da Biblioteca do IPEN, pela disponibilidade e boa vontade.

À Ana Carolina Moreira Fonseca, pelas contribuições, apoio, carinho e paciência.

Desenvolvimento de matrizes poliméricas biodegradáveis à base de quitosana e possíveis blends como sistemas de liberação controlada de fármacos

Jorge Gabriel dos Santos Batista

RESUMO

De acordo com o conceito de sistemas de liberação controlada, o presente estudo foi baseado na utilização de polímeros hidrofílicos biocompatíveis, formadores de hidrogéis, para o desenvolvimento de matrizes na forma de filmes finos. Os polímeros utilizados para a formação das matrizes foram a quitosana proveniente das cascas de camarão, o amido de milho modificado e a poli(N-vinil-2-pirrolidona) - PVP. As matrizes foram reticuladas utilizando glutaraldeído. O fármaco escolhido para testar a capacidade de liberação dos dispositivos foi o anti-inflamatório não esteroide (AINE) diclofenaco sódico. Para obtenção das matrizes com propriedades adequadas para essa finalidade, foram testadas misturas de quitosana-amido e quitosana-PVP. Após a triagem qualitativa, os dispositivos foram avaliados quanto à citotoxicidade, intumescimento máximo, fração gel, parâmetros cinéticos associados à absorção de vapor de água e à capacidade de liberação de diclofenaco sódico *“in vitro”*. As formulações de quitosana-PVP foram as que apresentaram melhores propriedades para a aplicação proposta nesse estudo, se destacando a formulação A3, com alto percentual de liberação, boas propriedades de manuseio, poucos componentes na formulação diminuindo o potencial alergênico e aprovação no teste de citotoxicidade em células de camundongo (NCTC) pelo método de incorporação do vermelho neutro.

Palavras-chave: Matrizes poliméricas, hidrogéis, quitosana, liberação controlada de fármacos, diclofenaco sódico.

Development of biodegradable polymeric matrices based on chitosan and possible blend as controlled release systems for drugs

Jorge Gabriel dos Santos Batista

ABSTRACT

According to the concept of drug delivery systems, this study has based on the use of biocompatible hydrophilic polymers hydrogels-forming for the development of matrices in the form of thin films. The polymers used for forming the matrices were chitosan from shrimp shells, modified maize starch and poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) – PVP. The matrices were cross-linked using glutaraldehyde. The drug chosen to test the ability of the devices release was the non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) sodium diclofenac. Mixtures between chitosan-starch and chitosan-PVP tested to obtain the matrices with suitable properties for this purpose. The devices after qualitative screening had evaluated for cytotoxicity, maximum swelling, gel fraction, kinetic parameters associated with absorbing water vapor and the release of diclofenac sodium able to *in vitro*. The formulations based on chitosan-PVP were the presents the best properties, in evidence formulation A3, with high percentage of delivery, good handing properties, few compounds/components reducing the allergenic potential and successful in vitro cell viability red uptake cytotoxicity assay, using cell culture mouse cells (NCTC).

Key words: Polymer matrices, hydrogels, chitosan, drug delivery systems, sodium diclofenac.

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE SIGLAS SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	14
LISTA DE UNIDADES DE MEDIDA	15
LISTA DE EQUAÇÕES	16
1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	20
3 REVISÃO DA LITERATURA E ESTADO DA ARTE	21
3.1 Polímeros aplicados à farmacotécnica	22
3.2 Hidrogéis	23
3.3 Quitosana	27
3.3.1 Reticulação da quitosana	28
3.3.2 Biodegradação enzimática da quitosana	31
3.4 Amido	31
3.5 Poli(N-vinil-2-pirrolidona) - PVP	33
3.6 Blendas ou misturas poliméricas	34
3.7 Hidrogéis e blendas de quitosana	35
3.7.1 Formas de liberação em hidrogéis de quitosana	37
3.8 Possíveis aplicações para os sistemas de liberação controlada a base de quitosana	38
3.9 Embasamento teórico da metodologia	40
3.9.1 Biomateriais e a citotoxicidade	40

3.9.2 Determinação dos parâmetros cinéticos associados à absorção de vapor de água.....	42
3.9.3 Espectrofotometria na região do UV-Visível	45
4 MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1 Fluxograma de trabalho.....	50
4.2 Materiais	51
4.3 Avaliação do grau de desacetilação das quitosanas A e B por espectroscopia na região do infravermelho (IV)	52
4.4 OBTENÇÃO DOS DISPOSITIVOS MATRICIAIS	54
4.4.1 Obtenção dos dispositivos matriciais a base de quitosana	54
4.4.2 Adição do glutaraldeído como agente de reticulação	55
4.4.3 Mistura (blenda) de quitosana-amido modificado	56
4.4.4 Mistura (blenda) quitosana-PVP	56
4.4.5 Adição de excipientes	56
4.4.6 Adição do fármaco diclofenaco sódico.....	56
4.5 Caracterização das amostras	57
4.5.1 Avaliação qualitativa das matrizes poliméricas	57
4.5.2 Teste de Citotoxicidade: método de incorporação do vermelho neutro	61
4.5.3 Teste de biodegradação das matrizes poliméricas de quitosana.....	63
4.5.4 Caracterização morfológica das amostras por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	63
4.5.5 Fração gel e intumescimento máximo	64
4.5.6 Determinação dos parâmetros cinéticos associados à absorção de vapor de água.....	66
4.5.7 Teste de Liberação <i>in vitro</i>	67
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	69

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	100
7 BIBLIOGRAFIA.....	102

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Composição das formulações e triagem qualitativa.	58
TABELA 2: Composição das formulações selecionadas para os ensaios de fração gel, intumescimento máximo, obtenção dos parâmetros cinéticos e do coeficiente de difusão associados a absorção de vapor de água e do perfil de liberação de diclofenaco sódico <i>in vitro</i>	64
TABELA 3: Grau médio de desacetilação $\overline{GD}$ das quitosanas A e B.	70
TABELA 4: Relação das amostras aprovadas na triagem e avaliadas quanto a citotoxicidade.	72
TABELA 5: Percentuais de massa degradada dos filmes obtidos pela quitosana A, em 15 dias de exposição em meio PBS com e sem suplemento de lisozima humana 0,1 mg mL ⁻¹	75
TABELA 6: Fração gel e índice de intumescimento das formulações a base de quitosana, extração em PBS pH 7,4 durante 72 horas, à temperatura 36 ± 2 °C sem e com lisozima	77
TABELA 7: Parâmetros obtidos para a cinética de absorção de vapor de água dos filmes sem fármaco (A1-A6).	85
TABELA 8: Parâmetros obtidos para a cinética de absorção de vapor de água dos filmes contendo o fármaco (A1 _{DS} -A6 _{DS}).	85
TABELA 9: Parâmetros obtidos para a cinética de liberação de diclofenaco sódico (DS) dos filmes A1-A6, em PBS, 0,05 M, pH: 7,4 a temperatura de 36 ± 1 °C.	97
TABELA 10: Parâmetros obtidos para a cinética de liberação de diclofenaco sódico (DS) dos filmes A1-A6, em PBS 0,05 M, pH: 7,4 com lisozima 10.000 U mL ⁻¹ , a temperatura de 36 ± 1 °C.	97

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Perfil de liberação controlada comparado a um perfil de sistema de dosagem convencional (Teorias do Envelhecimento. Acesso em: 13 jun. 2014). ..	18
FIGURA 2 - Estrutura química da quitosana.....	28
FIGURA 3 - Representação química da quitosana reticulada por: (a) glutaraldeído, (b) genipina e (c) ipocloridina (Mendes et al., 2011).....	30
FIGURA 4 - Estrutura química do amido (Yash, Acesso 01 jul. 2014).....	32
FIGURA 5 - Estrutura química do monômero do PVP (Hark Group. Acesso em: 30 jun. 2014)	33
FIGURA 6 - Representação do espectro eletromagnético (Khemis, Acesso em 28 dez. 2014).....	46
FIGURA 7 - Representação da transmitância de uma substância (Cleuber Carvalho. Acesso em: 18 jul. 2014).....	47
FIGURA 8 - Gráfico de transmitância e absorbância em função da concentração do analito	48
FIGURA 9 - Demonstração gráfica para a obtenção da constante de absortividade molar, ϵ . (a) Gráfico da absorbância em função do comprimento de onda em nm; (b) Curvas da absorbância em função da concentração do analito.....	49
FIGURA 10 - Fluxograma de trabalho para obtenção e caracterização das amostras avaliadas.....	50
FIGURA 11 - Espectro de absorção na região do IV da N-acetil-D-glucosamina. As linhas de base b6 e b9, em destaque, foram utilizadas para determinar a razão entre a intensidade das bandas em 1320 cm ⁻¹ e 1420 cm ⁻¹ (banda característica do grupo amina e banda de referência, respectivamente) usadas para comparar quitinas e quitosanas (Brugnerotto, 2001).....	53
FIGURA 12 - Síntese dos dispositivos: etapa de secagem	54
FIGURA 13 - Filme anidro de quitosana reticulado com glutaraldeído 100 mmol mL ⁻¹	55

FIGURA 14: Aparato desenvolvido para determinação dos valores dos parâmetros cinéticos e do coeficiente de difusão associados à absorção de vapor de água pelas matrizes poliméricas.	67
FIGURA 15 - Espectros de absorção na região do IV. (a) Quitosana A; (b) Quitosana B.....	69
FIGURA 16 - Gráfico de viabilidade celular (%) das amostras 1 a 4.	73
FIGURA 17 - Gráfico de viabilidade celular (%) das amostras 5 a 8.	73
FIGURA 18 - Gráfico de viabilidade celular (%) das amostras 9 a 12.	74
FIGURA 19 - Gráfico de viabilidade celular (%) das amostras 13 a 16	74
FIGURA 20 - Imagens de MEV das superfícies dos filmes de quitosana, com o aumento em 2000x. (a) Quitosana com diclofenaco sódico (Q _{DS}); (b) Q _{DS} com glutaraldeído 5 mmol mL ⁻¹ ; (c) Q _{DS} com glutaraldeído 100 mmol mL ⁻¹ ; (d) Q _{DS} com glutaraldeído 300 mmol mL ⁻¹	76
FIGURA 21 - Perfil cinético de difusão de vapor de água através de filmes a base de CS/PVP em UR. (%) 70%. (a) sem fármaco; (b) com fármaco	79
FIGURA 22 - Obtenção dos parâmetros cinéticos n e k dos filmes com fármaco. (a) Linearização das curvas de cinética de difusão; (b) Retas ajustadas aos primeiros 60% da massa de vapor de água absorvido por cada filme	81
FIGURA 23 - Obtenção dos parâmetros cinéticos n e k dos filmes com fármaco. (a) Linearização das curvas de cinética de difusão; (b) Retas ajustadas aos primeiros 60% da massa de vapor de água absorvido por cada filme	82
FIGURA 24 - Curvas para determinação do coeficiente de difusão com base na área dos filmes a base de CS/PVP sem fármaco. (a) Tempo total do ensaio; (b) Retas ajustadas aos primeiros 60% da massa de vapor de água absorvido por cada filme.....	83
FIGURA 25 - Curvas para determinação do coeficiente de difusão com base na área dos filmes a base de CS/PVP com fármaco. (a) Tempo total do ensaio; (b) Retas ajustadas aos primeiros 60% da massa de vapor de água absorvido por cada filme.....	84
FIGURA 26 - Curva de calibração do diclofenaco sódico em solução tampão PBS 0,05 M, pH: 7,4.....	88
FIGURA 27 - Perfil da cinética de liberação do diclofenaco sódico (DS) em PBS (a) Tempo total; (b) 180 minutos	89

FIGURA 28 - Perfil da cinética de liberação do DS em tampão fosfato e presença de lisozima(a) Tempo total; (b) 180 minutos	90
FIGURA 29 – Linearização do perfil de difusão de DS em sistemas matriciais a base de CS/PVP em PBS/lisozima para obtenção dos parâmetros n e k. (a) Linearização das curvas de cinética de difusão; (b) Retas ajustadas aos primeiros 60% da fração de DS liberado em 180 minutos.....	92
FIGURA 30 - Determinação do coeficiente de difusão do DS em PBS. (a) Tempo total -180 minutos; (b) retas ajustadas aos primeiros 60% da fração de DS liberado	93
FIGURA 31 - Linearização do perfil de difusão de DS em sistemas matriciais a base de CS/PVP em PBS/lisozima para obtenção dos parâmetros n e k. (a) Linearização das curvas de cinética de difusão; (b) Retas ajustadas aos primeiros 60% da fração de DS liberado em 180 minutos	94
FIGURA 32 - Coeficiente de difusão de liberação do DS em PBS/lisozima. (a) Tempo total -180 minutos; (b) retas ajustadas aos primeiros 60% da fração de DS liberado.	95

LISTA DE SIGLAS SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ASTM – American Society for Testing and Materials

DSC – Calorimetria Exploratória Diferencial

FTIR – Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

MEV – Microscópio Eletrônico de Varredura

UV – Ultravioleta

UR% - Umidade relativa em porcentagem

ISO - International Organization for Standardization

$\overline{GD}$ - Grau de médio de desacetilação da quitosana

PBS – Sigla em inglês para tampão fosfato salina

DDS – Sistema de liberação de fármacos (**D**rug **D**elivery **S**ystem)

DS – Diclofenaco sódico

QDS – Quitosana com diclofenaco sódico

LISTA DE UNIDADES DE MEDIDA

cm – centímetro

μm – micrometro

nm – nanômetro

L – litro

mL – mililitro

μL – microlitro

kg – quilograma

g – grama

mg – miligrama

μg – micrograma

% - porcentagem

°C – grau Celsius

rpm – rotação por minuto

kGy – quilo Gray

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	42
Equação 2	43
Equação 3	43
Equação 4	43
Equação 5	44
Equação 6	45
Equação 7	45
Equação 8	47
Equação 9	48
Equação 10	53
Equação 11	53
Equação 12	62
Equação 13	63
Equação 14	65
Equação 15	65

1 INTRODUÇÃO

No início da década de 1970, foram desenvolvidos os primeiros sistemas de entrega de fármacos formados com base em materiais poliméricos, frequentemente descritos como *Drug Delivery Systems* (DDS). A palavra polímero é oriunda do grego *poli* (muitos) e *mero* (unidade de repetição) e, portanto, é uma macromolécula formada por muitas dezenas a milhares de subunidades repetidas ligadas covalentemente. Uma única unidade de repetição é chamada de monômero. Dependendo do tipo de monômero, do número médio de unidades por cadeia, e do tipo de ligação covalente os polímeros podem ser divididos em três classes: borrachas, fibras e plásticos (Hoffman, 2008).

Os polímeros podem ser de origem natural ou sintética. Os polímeros naturais são as borrachas; os polissacarídeos, como a celulose, quitosana, amido e glicogênio; e as proteínas. Os polímeros sintéticos são produzidos quimicamente, em geral, por derivados do petróleo. É possível obter infinitas misturas poliméricas de maneira a originar diversos materiais, assim como modificar as propriedades físicas e químicas dos já existentes, fornecendo um imenso campo de pesquisa nas mais diversas áreas (Mc Crum et al. 1997).

Em geral, os sistemas poliméricos são divididos em duas categorias: dispositivos reservatórios e dispositivos matriciais. Na primeira, tem-se de um dispositivo no qual a formulação ou o fármaco é envolvido ou encapsulado em um polímero, como exemplo mais comum, a cápsula de gelatina formada por cadeias poliméricas de aminoácidos; na segunda, tem-se uma matriz ou rede polimérica na qual o fármaco é física ou quimicamente aprisionado. O tipo de aprisionamento depende das propriedades das substâncias que serão veiculadas e das características do(s) polímero(s) empregado(s) no desenvolvimento da matriz (Kumar, M.N., 2000).

Os sistemas de liberação de fármacos apresentam muitas vantagens quando comparados a outros de dosagem convencional, como por exemplo: maior eficácia terapêutica, liberação controlada ou prolongada do fármaco, diminuição da toxicidade, administração segura sem reações inflamatórias locais, menor número de doses, possível direcionamento a alvos específicos. Tanto substâncias hidrossolúveis

como lipossolúveis podem ser veiculadas não ocorrendo predomínio de decomposição do fármaco. No entanto, a instabilidade desses sistemas depende das propriedades físicas e químicas de cada um de seus componentes (Jacobs e Mason, 2009).

Dentre as desvantagens dos sistemas de liberação controlada, podemos citar maiores custos de produção, dor e rejeição no caso de implantes, maior tamanho na maioria dos dispositivos, impossibilidade de interrupção imediata da ação do fármaco, restrições de recursos materiais, tecnológicos e humanos e riscos de intoxicação por causa das altas concentrações do fármaco veiculado no sistema. Na FIG. 1 é mostrado o gráfico genérico de um perfil de liberação controlada comparado ao perfil de um sistema de dosagem convencional.

FIGURA 1 - Perfil de liberação controlada comparado a um perfil de sistema de dosagem convencional (Teorias do Envelhecimento. Acesso em: 13 jun. 2014).

Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) estão dentre os fármacos mais utilizados. Atualmente, há mais de 50 tipos de AINEs no mercado. Esses agentes proporcionam alívio sintomático da dor e edema em artropatia crônica, como na osteoartrite e na artrite reumatoide, e em afecções inflamatórias mais agudas, como nos traumas esportivos, fraturas, entorses e outras lesões das partes moles. Também proporcionam alívio de dor pós-operatória, dental, menstrual, cefaleias e enxaquecas

(Rang e Dale, 2001). A maioria desses casos exige tratamentos que podem durar dias, semanas ou até mesmo meses, o que torna viável o uso de DDS.

Sistemas de liberação prolongada são desenvolvidos para uma população normal, em que os estados patológicos e características metabólicas individuais não são considerados durante a sua concepção. Essa problemática tem sido um desafio para a medicina e as farmácias magistrais que utilizam esses tratamentos personalizados.

O presente estudo teve por finalidade o desenvolvimento de matrizes poliméricas a base de quitosana, visando a formulação de sistemas biodegradáveis de liberação controlada utilizando como fármaco piloto o AINE diclofenaco sódico, por ser uma substância acessível, com características e propriedades bem conhecidas, além de ser um fármaco bem tolerado e amplamente utilizado.

2 OBJETIVOS

Desenvolver matrizes poliméricas a base de quitosana e possíveis blends de quitosana/amido e quitosana/PVP como sistemas de liberação controlada de fármacos, utilizando como fármaco piloto o AINE diclofenaco sódico.

Avaliar a influência do uso de excipientes e agentes de reticulação que atendam às implicações desses sistemas matriciais.

Avaliar a citotoxicidade *in vitro* e obter os perfis de liberação das matrizes.

3 REVISÃO DA LITERATURA E ESTADO DA ARTE

Existe uma gama de compostos ativos com potencial utilização na terapêutica, mas poucos deles são bem-sucedidos clinicamente graças às complicações atribuídas a biodisponibilidade e a toxicidade (Argaw, 2005). O uso de novas substâncias implica em questões como: via de administração do novo fármaco ou molécula, fisiologia do órgão ou tecido afetado, além das inúmeras variáveis metabólicas de cada indivíduo.

Quando um fármaco é administrado sistemicamente, sua disponibilidade no organismo é geralmente baixa, ocorrendo rápida diminuição das concentrações plasmáticas necessitando de nova administração da substância para manter a concentração terapêutica, podendo levar o indivíduo à superdosagem ou diminuir a eficácia do tratamento, o que dependerá dos cuidados do paciente ou de seu cuidador ao administrar corretamente o medicamento, respeitando as orientações e os intervalos entre uma dose e outra. Os DDS se mostram como uma alternativa promissora para sanar essas dificuldades, uma vez que podem liberar gradativamente as moléculas do fármaco ou ainda direcioná-las à alvos e sítios específicos (Wang e Soltero, 2006).

Nos sistemas de liberação, o princípio ativo é incorporado a uma rede polimérica a fim de ser liberado de maneira controlada. O tempo de liberação do fármaco pode variar de algumas horas até meses dependendo da estrutura da matriz, do tipo de fármaco e da aplicação a que se destina. Com base na grande variedade de polímeros naturais e sintéticos, inúmeros estudos vêm sendo realizados com o intuito de desenvolver sistemas de entrega de fármacos. Entretanto, a utilização na terapêutica tem suas restrições, dentre as quais podemos citar a biocompatibilidade, a toxicidade do produto final, os custos de produção e a necessidade de remoção cirúrgica nos casos de sistemas não biodegradáveis (Jogani et al., 2008).

O desafio dos pesquisadores é compreender as propriedades físicas e químicas das formulações de DDS e controlar as condições de reação com o intuito de influenciar nas características do material melhorando suas propriedades mecânicas, térmicas, de permeabilidade do fármaco, resposta a estímulos ambientais,

funcionalização de superfície, biodegradabilidade e reconhecimento de sítios específicos (no caso de sistemas “inteligentes” de liberação controlada de fármacos) (Theresa e Allen, 2004).

3.1 Polímeros aplicados à farmacotécnica

Os polímeros estão entre os excipientes mais usados na farmacotécnica. Apresentam diversas funções e aplicações e se destacam na preparação de formulações de liberação controlada de fármacos. Sua escolha deve ser feita de forma cautelosa, para que não haja incompatibilidade entre o princípio ativo e os excipientes a serem empregados na formulação, bem como a viabilidade de sua utilização. Os polímeros podem ter suas propriedades alteradas utilizando métodos físicos e químicos ou misturando-se polímeros com propriedades diversificadas e em diferentes proporções, o que vai depender do mecanismo de liberação que se deseja obter (Pillai e Panchagnula, 2001; Peppas, N., 2002).

Um sistema polimérico de liberação de fármaco pode ser planejado e desenvolvido por vários métodos de processamento. Com base em modificações nas propriedades do polímero, um sistema de matriz pode ser elaborado visando condições específicas de liberação do fármaco. Materiais poliméricos de uso farmacêutico com pequena ou nenhuma toxicidade podem ser utilizados como membranas ou matrizes nas quais o ingrediente ativo é disperso ou dissolvido em sua estrutura. Polímeros também funcionam como veículos e podem ser adicionados aos ingredientes ativos. Esses carreadores podem ser usados para liberar uma grande variedade de fármacos em uma taxa controlada no trato gastrointestinal (Kumar, M. e Kumar, N., 2001).

Jacobs e Mason (2009) relataram que muitas classes de polímeros farmacêuticos têm sido usadas em sistemas de liberação controlada de fármacos em razão das suas diferentes permeabilidades. Os materiais mais comuns incluem hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), etilcelulose (EC), poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PVP) e ésteres poliacrílicos. Estes materiais podem ser usados tanto para formação de

matrizes poliméricas quanto para revestimento na liberação controlada de fármacos. A permeabilidade de um fármaco através de um material polimérico é um processo que envolve três etapas: dissolução, migração e difusão das moléculas do fármaco em função da sua solubilidade e do coeficiente de difusão do dispositivo. Quanto maior a cristalinidade de um polímero, maior é o grau de empacotamento das suas cadeias e, portanto, maior a tendência a resistir à difusão de um fármaco em relação a polímeros amorfos com a mesma estrutura química (Jacobs e Mason, 2009).

A liberação de medicamentos a partir de qualquer categoria de dispositivo polimérico tem sido tradicionalmente a difusão controlada. No entanto, a pesquisa atual tem por objetivo investigar os sistemas que envolvem os polímeros biodegradáveis. Estes dispositivos de liberação se degradam em compostos biologicamente aceitáveis, muitas vezes por meio de processos de hidrólise, onde subsequentemente podem liberar os fármacos veiculados. Este processo de erosão pode ocorrer em grandes quantidades (em que a matriz se degrada uniformemente) ou na superfície do dispositivo (em que as taxas de liberação estão relacionadas com a área de superfície) (Langer e Peppas, N. 2003).

3.2 Hidrogéis

Hidrogéis são sistemas poliméricos reticulados, naturais ou sintéticos, hidrofílicos, porosos, podendo ter um ou mais constituintes unidos por ligações covalentes ou forças eletrostáticas em redes tridimensionais altamente permeáveis a diferentes substâncias, permitindo a difusão de moléculas de tamanhos diferentes. Este fato está relacionado com o grau de intumescimento do hidrogel, adaptável de acordo com as condições desejáveis, em que a taxa de liberação do fármaco retido é determinada pela densidade de reticulação e porosidade da rede polimérica. Segundo Hoffman (2002), dependendo da composição química do gel, diferentes estímulos internos e externos (por exemplo, alterações no pH, aplicação de um campo magnético ou elétrico, variações de temperatura, radiação e ultrassom) podem ser usados para desencadear o efeito de intumescimento e liberação do fármaco (Hoffman, 2002).

Em comparação com outros biomateriais sintéticos, os hidrogéis se assemelham aos tecidos vivos em relação às suas propriedades físicas, tais como: alto teor de água, maciez, consistência e elasticidade; apresentam tendência mínima em adsorver proteínas por meio de fluidos do corpo, por possuírem baixa tensão interfacial. Apresentam-se como uma opção promissora no desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos para administração oral, nasal, bucal, retal, ocular, vaginal e vias parenterais (Gupta et al., 2002).

Existem na literatura diversos trabalhos utilizando polímeros hidrofílicos sintéticos para o desenvolvimento de sistemas inteligentes de liberação controlada. Apesar de apresentarem propriedades adequadas, muitos deles não são biodegradáveis, como por exemplo poli(N-isopropilacrilamida), o poli(2-hidroximetilmetacrilato), ou geram outros problemas como inflamação local. Essas características inviabilizam a utilização desses sistemas como um biomaterial (Qiu e Park, 2001; Sinivas, 2008).

As interações físicas ou químicas entre as cadeias poliméricas formam redes capazes de aprisionar grandes quantidades de água sem sofrer dissolução. As interações físicas, também denominadas forças secundárias, podem ser do tipo ligação de hidrogênio, ligação iônica ou interações hidrofóbicas e são reversíveis em sua maioria; já as ligações químicas covalentes são interações suficientemente fortes para reticular as cadeias formando assim as redes entrecruzadas ou “cross-links” (termo encontrado com frequência na literatura), consideradas irreversíveis em virtude da necessidade de grandes energias para romperem as ligações. Ambos os tipos de interações são capazes de permitir ou restringir o intumescimento do hidrogel. A compreensão desses fenômenos é importante tanto para cinética de biodegradação quanto para a cinética de liberação no caso de hidrogéis como DDS (Wichterle e Lim, 1960; Peppas et al., 2006).

O grau máximo de intumescimento de um gel ocorre quando as cadeias poliméricas interagem com as moléculas do solvente e se expandem até o estado de total solvatação. Conforme a expansão do material ocorre, a estrutura reticulada oferece resistência até que o sistema atinja o equilíbrio. É importante ressaltar que o equilíbrio entre os fenômenos de expansão e retração de uma determinada rede

polimérica depende do solvente e da temperatura. Assim, o grau de intumescimento é uma característica dos hidrogéis que deve ser considerada como parâmetro chave no seu uso e nas diversas aplicações, graças à sua influência no coeficiente de difusão do soluto, na molhabilidade da superfície e nas propriedades mecânicas do material (Peppas et al., 2000; Langer e Peppas, 2003).

As propriedades físicas e o grau de intumescimento dos hidrogéis dependem da massa molecular (MM) do polímero, da presença de cargas nas cadeias poliméricas, da densidade de reticulação (redes poliméricas ligadas covalentemente) e das interações físicas. Essas condições auxiliam na estimativa da quantidade relativa de ligações entre as cadeias poliméricas, ou seja, na densidade de reticulação. No caso de polímeros de alta massa molecular, geralmente ocorre múltiplas ligações entrecruzadas, o que leva a produção de um hidrogel mais consistente, enquanto polímeros de baixa massa molecular, exigem altas concentrações para formar géis em condições similares (Anseth et al., 1996).

A incorporação direta de um fármaco a uma matriz de hidrogel pode ser realizada de duas formas: as cadeias poliméricas são reticuladas na presença do fármaco, proteína ou macromolécula ou a substância pode ser adicionada depois da reticulação das cadeias, difundindo-se através dos poros do hidrogel. Ambas as técnicas são maneiras fáceis de veicular um fármaco a um hidrogel, no entanto, o método empregado na incorporação do fármaco pode alterar os perfis de liberação.

Os perfis típicos desse tipo de liberação encontrados na literatura apresentam uma grande liberação inicial, conhecida como *burst*. Isso ocorre nos primeiros instantes após a transferência do hidrogel em função do fármaco aderido à superfície do material, podendo liberar nesse evento de 60 a 80% do fármaco encapsulado na matriz. Entretanto, é possível regular essa liberação aumentando ou diminuindo o grau de reticulação entre as cadeias poliméricas da matriz (Kim et al., 1992; Jeong et al., 2000; Huang e Brazel, 2001).

Os métodos citados acima são utilizados para sistemas de curto tempo de liberação, ou seja, de dias a semanas. Nos casos que necessitam de maiores tempos e menores taxas de liberação, empregam-se as técnicas de micro e nano encapsulação, onde o fármaco ou macromolécula é previamente encapsulado em um

polímero de baixo grau de intumescimento e depois a micro ou nano cápsula é veiculada ao hidrogel. Galeska et al. (2005) testou a liberação da dexametasona em hidrogel de PVA comparando as duas técnicas; a prévia microencapsulação retardou a liberação do fármaco à uma taxa de 6% ao mês, sendo que na encapsulação direta liberou todo o fármaco em menos de duas semanas. O método de microencapsulação permite incorporar macromoléculas como as proteínas (Galeska et al., 2005; Ungaro et al., 2006).

Estudos utilizando quimioterápicos redutores do colesterol, anti-inflamatórios e imunossupressores demonstraram a capacidade de retardar a liberação dos mesmos em semanas a meses por meio de ligações covalentes entre os fármacos e os polímeros (Benoita et al., 2006; Chun et al., 2009).

Em virtude do alto teor de água nos hidrogéis, os mecanismos de liberação dos DDS podem ser muito diferentes entre sistemas compostos por polímeros hidrofílicos ou hidrofóbicos. Em modelos de liberação estudados anteriormente, os autores descrevem categorias que limitam e controlam as taxas de liberação, sendo elas divididas em: difusão, intumescimento e controle das propriedades químicas. Nas duas primeiras, o mecanismo para controle da liberação de fármacos é feito por dimensionamento da malha do hidrogel, o que possibilita o aumento da densidade de reticulação com agentes reticulantes, o que implica no aumento da toxicidade do produto final. Para a última, o mecanismo de controle é mais complexo, compreendendo interações entre a matriz do hidrogel, o fármaco e o meio em que o sistema será aplicado (Amsden, 1998; Siepmann e Peppas, 2012).

Existe uma gama de polímeros sintéticos que possuem características apropriadas para a produção de hidrogéis, dentre os quais pode-se citar: (polietilenoglicol – PEG, poli(N-vinil-2-pirrolidona) –PVP, polihidroxietilmetacrilato - PHEMA, ácido poliacrílico – PAA, e polimetilmetacrilato – PAAM). De acordo com o tipo de polímero e a proporção utilizada, é possível obter hidrogéis com diferentes propriedades mecânicas e respostas biológicas. Os polímeros naturais, tais como os polissacarídeos e as proteínas, podem ser usados no desenvolvimento de hidrogéis, pois ambos possuem propriedades intrínsecas desejáveis (biocompatibilidade, baixa toxicidade e susceptibilidade a degradação enzimática). Os polissacarídeos se

destacam por não terem as desvantagens das proteínas e peptídeos, como por exemplo, a imunogenicidade e o risco potencial de transmitir patógenos. A quitosana é um polímero natural que vem sendo amplamente estudada para aplicação na síntese de hidrogéis.

3.3 Quitosana

A quitosana é um polímero insolúvel em água e meio básico e solúvel em soluções ácidas. Esse polímero é obtido a partir da desacetilação da quitina, principal constituinte dos micélios dos fungos e do exoesqueleto de insetos e crustáceos, sendo o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose. Entre as diferentes espécies de crustáceos, o camarão e o caranguejo estão entre os mais utilizados para isolar a quitina (Shahidi et al., 1999). O processamento das conchas de crustáceos envolve a remoção de proteínas e posterior dissolução do carbonato de cálcio (Acosta et al., 1993). Quando é obtido a partir de fungos, a produção é associada a processos de fermentação com *Aspergillus niger*, *Mucor rouxii*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Streptomyces sp.* (Kumar, M., 2000).

A quitosana e seus produtos desacetilados são polissacarídeos que atraíram muita atenção nas áreas de biomedicina, farmacologia, biotecnologia e no setor agrícola. O termo quitosana geralmente refere-se a família de polímeros derivados da quitina, com grau de desacetilação acima de 60%, sendo esses polímeros compostos por cadeias de N-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina ligadas por meio de ligações $\beta \rightarrow (1-4)$ dispostas randomicamente. Na FIG. 2 está representada a fórmula estrutural da quitosana. A distribuição dos grupos amina ao longo da cadeia determinam muitas de suas propriedades (Muzzarelli, 1977; Kumar, et al., 2004).

FIGURA 2 - Estrutura química da quitosana.

A quitosana se distingue dos outros polissacarídeos em razão da presença do nitrogênio em sua estrutura molecular, que pode se protonar em condições ácidas (pK_a da amina é 6.3). Portanto, a quitosana é um polímero catiônico ou um polication capaz de formar complexos polieletrólíticos e sais solúveis em água, como por exemplo: acetato, ascorbato, citrato, formiato, glicolato, glioxalato, lactato, maleato e piruvato de quitosana (Bertha et al., 1998; Chen, et al., 2000).

Por causa da sua biocompatibilidade, comprovada por meio de implantes em tecidos vivos e verificada pela sua toxicidade em animais (DL_{50} : dose letal em ratos 16 g kg^{-1}), a quitosana vem sendo empregada em sistemas poliméricos de liberação de fármacos, tais como albumina, melatonina e prednisolona. Comprimidos revestidos com quitosana se comportam como géis em soluções de pH ácido e são adequados para liberação de fármacos hidrossolúveis. A lista de aplicações da quitosana é ainda mais extensa quando se inclui seus derivados, obtidos por meio de reações químicas nas quais são inseridos diferentes grupos funcionais às suas moléculas, conferindo a esse material diferentes propriedades e aplicações (Gamzazade et al., 1998).

3.3.1 Reticulação da quitosana

As interações físicas possuem a vantagem de formar géis sem a necessidade de usar agentes reticulantes, porém com algumas limitações, como por exemplo, difícil controle do tamanho dos poros da matriz do hidrogel, funcionalização química, degradação e dissolução. Com o uso de agentes reticulantes, polimerização

secundária, irradiação ou enzimas específicas é possível produzir hidrogéis de cadeias ligadas irreversivelmente (ligações químicas).

As propriedades dos hidrogéis reticulados dependem da densidade de reticulação, do grau de desacetilação da quitosana e da proporção molar entre o agente reticulante e o polímero. A maioria dos agentes químicos de reticulação são pequenas moléculas bifuncionais capazes de se ligar covalentemente com as aminas primárias da quitosana, formando ligações intra ou intermoleculares permanentes. As moléculas que vêm sendo utilizadas para essa finalidade incluem o glutaraldeído, o diglicidil éter, o di-isocianato, o diacrilato, dentre outros. No entanto, a maioria desses agentes possuem relativa toxicidade e biocompatibilidade não comprovada, o que restringe suas utilizações (Berger et al., 2004; Mi-Sook e Kim, 2007).

A genipina, substância natural derivada de plantas do gênero da *Gardenia* sp., vem sendo investigada por possuir ação como agente de reticulação biocompatível, eficiente na reticulação de polímeros que contenham grupos amino, com a vantagem de ser menos citotóxica que os outros agentes de reticulação. Estudos mostram que a genipina pode ser utilizada como agente de reticulação de materiais biológicos e biopolímeros, como o colágeno e a quitosana, por meio de ligações covalentes. No entanto, membranas de quitosana reticuladas com genipina possuem menor taxa de degradação do que membranas reticuladas com glutaraldeído. O uso de genipina mostrou retardar a liberação de fármacos em formulações reticuladas *in situ* (Bhattaraia et al., 2005). Apesar da genipina ter demonstrado boa biocompatibilidade, interações negativas com substâncias encapsuladas podem ocorrer no momento da formação do gel na presença do fármaco (Sung-Ching, 2004). Na FIG. 3 é mostrado alguns exemplos de reticulação química da quitosana.

FIGURA 3 - Representação química da quitosana reticulada por: (a) glutaraldeído, (b) genipina e (c) ipocloridina (Mendes et al., 2011).

Ao se empregarem aldeídos monofuncionais (formaldeído) ou bifuncionais (glioal e glutaraldeído) como agentes de entrecruzamento, a reticulação ocorre via adição nucleofílica da amina da quitosana à carbonila dos agentes. A reação de eliminação subsequente produz as correspondentes aldiminas ou bases de Schiff. O mesmo mecanismo reacional ocorre quando são empregadas cetonas bifuncionais (benzoquinona), em que as correspondentes cetiminas são geradas por meio desse processo. Na reticulação com formaldeído, observa-se uma particularidade no mecanismo de reticulação: após o ataque nucleofílico, forma-se um produto intermediário, a N-metilenoquitosana que, em seguida, reage com outro grupo amino da cadeia polimérica realizando a reticulação. Gupta et al. (2006) desenvolveram um sistema de liberação controlada para um contraceptivo não esteroide (ormeloxifeno) utilizando microesferas de quitosana reticuladas com glioal e glutaraldeído. Os procedimentos foram conduzidos em fase heterogênea e em meio ácido (pH 4,0) para o glioal e neutro (pH 7,0) para o glutaraldeído (Sung-Ching, 2004; Gupta et al., 2006; Singh et al., 2006).

3.3.2 Biodegradação enzimática da quitosana

A lisozima é uma enzima, descoberta pelo médico escocês Alexander Fleming em 1922. É encontrada no fluido lacrimal em teores acima de 1%, no muco dos mamíferos e produzida por bactérias e outros organismos. É capaz de digerir a parede celular de bactérias cujas estruturas contém carboidratos. A lisozima destrói o esqueleto glicosídico do peptidoglicano, causando lise e morte celular (Nelson e Cox, 2014).

A quitosana é metabolizada por certas enzimas humanas, especialmente a lisozima. A presença de grupos amino desacetilados permite maior reatividade da quitosana em relação à quitina. Algumas de suas propriedades biológicas, tais como, atividade antimicrobiana e cicatrizante, têm sido atribuídas aos fragmentos (oligossacarídeos) resultantes da degradação enzimática, sendo tais fragmentos totalmente absorvidos pelo organismo (Kumar, N. 2000; Berger et al., 2004).

3.4 Amido

O amido é um polissacarídeo, sintetizado pelos vegetais com a função de armazenar a energia obtida pela fotossíntese. A principal razão para a conversão fotossintética da glicose em amido é que esta forma de armazenamento é vantajosa para a planta, pois a molécula de amido é insolúvel em soluções aquosas, à temperatura ambiente, não alterando o balanço osmótico com açúcar armazenado em grandes quantidades. O grânulo de amido consiste de dois carboidratos principais: amilose e amilopectina. Ambos os polissacarídeos possuem alto peso molecular, formados primariamente por ligações alfa (1-4) na amilose, e na amilopectina as ramificações ocorrem mediante ligações alfa (1-6), como representado na FIG. 4 (Reis, 1997).

FIGURA 4 - Estrutura química do amido (Yash, Acesso 01 jul. 2014).

Muitas estruturas das plantas são capazes de sintetizar amido, como os caules, as folhas, os grãos e as raízes. Alguns vegetais, como os tubérculos, sintetizam amido em quantidade suficiente para extração comercial. O arroz, o trigo, a batata, o milho, a mandioca e o feijão estão entre os vegetais em que os grânulos de amido são comumente encontrados. A principal utilização do amido na alimentação é como fonte de glicose. Seu uso se estende à preparação de colas e gomas, na fabricação de papel e tecidos, também é usado na produção de álcool etílico, adoçantes e xaropes. Estudos com polímeros biodegradáveis a base de amido propõem grande potencial no campo biomédico, tais como, cimentos ósseos, andaimes em engenharia de tecidos e sistemas de liberação (Marques et al., 2002).

Para o desenvolvimento de DDS, o amido apresenta propriedades adequadas e importantes, tais como caráter hidrofílico, biocompatibilidade e biodegradabilidade. Além disso, este tipo de molécula pode ser modificada para alterar as suas características físicas e, portanto, melhorar a sua aplicabilidade. De acordo com resultados obtidos anteriormente, propriedades bioadesivas foram conferidas aos sistemas de microcápsulas onde o amido foi incorporado (Hovgaard e Brondsted, 1996).

Produtos obtidos por cadeias curtas e lineares de amido de batata preparados por pré-gelatinização vêm sendo utilizados na preparação de comprimidos de liberação controlada de teofilina. Compostos de amido reticulados foram desenvolvidos como excipiente para a formulação de liberação controlada de Contramid™. Além disso, uma combinação de cera microcristalina e derivados de amido também foram utilizados para formular sistemas de liberação imediata de Ibuprofeno™. Vários tipos de produtos à base de amido vêm sendo investigados para

formulações destinadas a outras vias de administração, como a entrega nasal e bucal de micropartículas biodegradáveis, microesferas polimerizadas de fécula de batata para via intravenosa e implante subcutâneo de amilose reticulada (Zhou, et al., 1998; Rodrigues e Emeje, 2012).

3.5 Poli(N-vinil-2-pirrolidona) - PVP

O poli(N-vinil-2-pirrolidona), conhecido como PVP, é um polímero sintético, biodegradável, solúvel em água, obtido por meio da polimerização radicalar de N-vinil-2-pirrolidona. Na FIG. 5 é mostrada a estrutura química do monômero do PVP. Em virtude das suas características, como biocompatibilidade, resistência, baixa toxicidade, baixa reatividade química e propriedades formadoras de filmes, o PVP se tornou um polímero de grande interesse nas áreas farmacêutica, cosmética e de alimentos. Na indústria farmacêutica, o principal uso desse polímero tem sido na formação de revestimentos de comprimidos, retardando e modulando a liberação do princípio ativo. Uma outra característica interessante do PVP é seu caráter anfótero ou anfifílico, uma vez que pode se dissolver em água e em alguns solventes orgânicos, tais como ácido fórmico, ácido acético, metanol, etanol, dentre outros (Brant, 2008).

FIGURA 5 - Estrutura química do monômero do PVP (Hark Group. Acesso em: 30 jun. 2014).

3.6 Blendas ou misturas poliméricas

Blenda é um termo adaptado do inglês (*blend* = mistura) que é utilizado para descrever misturas físicas de dois ou mais polímeros, sem que ocorra ligações químicas entre eles. A grande vantagem do processo de produção de blendas é a possibilidade de se obter um novo material polimérico sem realizar a síntese de um novo polímero ou copolímero (mistura química de um ou mais polímeros), o que reduz os longos períodos de pesquisa e o alto custo das sínteses químicas no desenvolvimento de novos materiais. Dessa maneira, o desenvolvimento de blendas poliméricas torna possível combinar uma variedade de polímeros em diversas proporções e obter materiais com vantagens que podem variar de acordo com as características físicas e químicas de cada polímero.

A maioria dos polímeros de origem natural são hidrofílicos em maior ou menor grau, desde que sua estrutura contenha grupamentos polares, tais como hidroxila, amina, entre outros. No entanto, somente alguns deles, como a amilopectina, são solúveis em água. As blendas de polissacarídeos e polímeros hidrofílicos naturais ou sintéticos vêm sendo estudadas para aplicações em engenharia de tecidos, como membranas para fins variados, plásticos biodegradáveis, biomateriais e hidrogéis (Christopher e Schilling, 2004).

Misturas com ágar são interessantes graças à sua capacidade de formar géis reversíveis simplesmente por arrefecimento das soluções aquosas quentes. Esta propriedade de formação de gel tornam as misturas de ágar com polissacarídeos biocompatíveis ou polímeros sintéticos muito atraentes em virtude do o incremento nas propriedades de geleificação e capacidade de retenção de água da mistura polimérica resultante. Toda via, o ágar também sofre reticulação na presença de glutaraldeído, podendo alterar tanto as propriedades mecânicas como a permeabilidade e difusividade do material, além de favorecer o crescimento de microrganismos cujo o ágar serve de substrato. (Laurienzo, 2010).

O polietilenoglicol (PEG-400) pode ser adicionado no intuito de melhorar a capacidade de absorção e retenção de água dos filmes, assim como suas propriedades mecânicas. As características do PEG, tais como sua capacidade em

atuar como agente dispersante e emulsionante, contribuem com a distribuição dos componentes da formulação no sistema.

3.7 Hidrogéis e blendas de quitosana

No caso de hidrogéis preparados por associação física das cadeias, as interações precisam ser fortes o suficiente para formar pontes de junção semipermanentes entre as cadeias moleculares, nas quais a rede polimérica formada deve permitir o acesso e o armazenamento de água. Nos hidrogéis formados por interações iônicas, os grupos amina protonados (cátions) da quitosana se ligam a pequenas moléculas carregadas negativamente (ânions) formando complexos, por exemplo, citrato, fosfato, etc. ou a ânions metálicos, por exemplo, platina (II) e molibdênio (VI). A diferença entre elas é que a interação com íons metálicos forma ligações covalentes coordenadas com o polímero mais fortes que as interações eletrostáticas. O rendimento desses complexos iônicos depende do tamanho, da densidade de cargas das moléculas aniônicas, do grau de desacetilação, do tamanho das cadeias, da concentração de quitosana, das constantes de ionização das moléculas e do meio onde será aplicado (Shu e Zhu, 2002; Nadège e Boucard, 2005; Shen et al., 2008).

A formação de complexos polieletrólitos ocorre mediante interações eletrostáticas com a quitosana e moléculas de alta massa molecular, por exemplo, polissacarídeos, proteínas e polímeros sintéticos. Essas interações são mais fortes que as ligações de hidrogênio, as interações hidrofóbicas e interações de Van der Waals. Alguns exemplos de polieletrólitos aniônicos solúveis em água utilizados na formação de complexos com a quitosana são: DNA (ácido desoxirribonucleico), polissacarídeos aniônicos (ex.: alginato), glicosaminoglicanos (ex.: sulfato de condroitina, ácido hialurônico e heparina), carboximetilcelulose, pectina, sulfato de dextrana, xantana, proteínas (ex.: gelatina, albumina, queratina e colágeno) e polímeros sintéticos aniônicos (ácido poli acrílico). A estabilidade desses compostos

depende da densidade das cargas, do solvente, do potencial de ionização, pH e temperatura (Gupta et al. 2002).

Por meio de ligações hidrofóbicas é possível preparar hidrogéis termo reversíveis a base de quitosana. Esse tipo de formulação pode variar de estado (sólido-líquido) de acordo com a temperatura do ambiente ou meio em que se encontra. As interações hidrofóbicas entre as cadeias permitem a formação de um gel semirrígido, em que o material passa por uma transição hidrofílica-hidrofóbica ao atingir a menor temperatura crítica de solução. Essa propriedade possibilita veicular fármacos, peptídeos, proteínas e células, e, ao injetar rapidamente essa solução no corpo, ocorre formação do gel *in situ*, com a vantagem de não precisar de cirurgias invasivas e com a possibilidade de liberar controladamente essas moléculas sem efeitos negativos significantes. Uma outra vantagem seria a possibilidade de injetar a solução em tecidos e locais de formas irregulares sem a necessidade de desenvolver plataformas de formato customizado. Um exemplo de hidrogel termo reversível é a mistura de quitosana com glicerol fosfato de sódio (GP), em que o GP aumenta o número de interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio entre as cadeias de quitosana com o aumento da temperatura. A mistura forma gel em temperaturas superiores a 37 °C e permanece líquida em temperaturas inferiores a essa. De modo semelhante, os copolímeros quitosana-polietilenoglicol (quitosana-PEG) e quitosana-poli-N-isopropilacrilamida (quitosana-PNiPAM) são bons candidatos para formação de gel *in situ* (Philippova et al., 2001; Schatz, 2003).

No estudo realizado por Brant (2008), foi demonstrado por diversos métodos a miscibilidade entre os polímeros quitosana e PVP na formação de blendas. A forte interação entre ambos diminui a solubilidade da mistura em água, mesmo em baixas quantidades de quitosana. Vaghani e Patel (2011) relataram o comportamento de misturas de quitosana-PVP na formação de hidrogéis sensíveis às mudanças de pH e sua influência na liberação do antibiótico claritromicina (Brant, 2008; Vaghani e Patel, 2011).

3.7.1 Formas de liberação em hidrogéis de quitosana

O desempenho de um hidrogel como sistema de liberação controlada depende de suas propriedades físico-químicas e das propriedades da substância que será veiculada. Os hidrogéis de quitosana podem ser preparados por diversos processos, cada qual com suas vantagens e desvantagens. Os métodos de preparo são genericamente divididos em três abordagens diferentes, como mencionado a seguir. (Joerg e Tessmar, 2007; Langer, 2008; Lin e Anseth, 2008).

O primeiro método compreende na formação do gel em meio saturado com o fármaco ou substância a ser veiculada. Dependendo da porosidade do hidrogel, do tamanho do fármaco e da interação entre eles, o fármaco irá difundir para o interior do gel. Quando colocado *in vivo*, as moléculas irão difundir do gel para tecidos vizinhos. Esse método de preparo é ideal para incorporar moléculas pequenas, uma vez que as moléculas grandes, como peptídeos e proteínas, são incapazes de difundir através dos pequenos poros do hidrogel (Kim, 1992; Sokker et al., 2008).

No caso de grandes moléculas e bioligantes, o método ideal é o de aprisionamento, em que as moléculas são adicionadas ao hidrogel ainda em solução e o agente de reticulação ou de complexação é adicionado posteriormente. Vale ressaltar que a utilização desse método deve considerar a possível interação entre a molécula veiculada e o agente reticulante ou complexante, podendo resultar na inativação na substância. Nesse método, assim como no método por difusão, comumente ocorre o *burst* no início da liberação, podendo esse evento ser positivo ou não, dependendo do perfil cinético que se deseja obter. Uma outra desvantagem desse evento é a possibilidade de intoxicação, principalmente se a substância ou fármaco em questão for de baixo índice terapêutico (Lin e Metters, 2006).

O terceiro método, a ancoragem, pode limitar a exposição dos tecidos às moléculas ancoradas. Nesse caso, o fármaco está quimicamente ligado ao polímero e o controle de sua liberação depende da atividade das enzimas em romperem essas ligações, liberando as moléculas ancoradas na rede do hidrogel (Hoare e Kohane, 2008).

A veiculação secundária, em que as moléculas com cargas iguais às dos constituintes poliméricos ou oposta hidrofilicidade, impede o preparo do hidrogel

utilizando os métodos anteriormente citados. Nesse caso, o fármaco ou molécula a ser veiculada é previamente encapsulado, formando complexos do tipo micro géis, micropartículas, lipossomas ou micelas, para posterior incorporação no hidrogel (Obara et al., 2005; Daoud-Mahammed et al., 2007).

A liberação das substâncias por meio de sistemas poliméricos pode ocorrer de três maneiras distintas: pela difusão, em que o processo ocorre pela migração das moléculas veiculadas através da matriz polimérica; por estimulação químico-ambiental, na qual alterações de pH e temperatura em condições pré-determinadas promovem o aumento dos poros da matriz polimérica proporcionando a difusão das moléculas aprisionadas; e por estimulação enzimo-específica, na qual a liberação depende tanto de fatores ambientais quanto da presença de enzimas ou citocromos enzimáticos capazes de degradar o hidrogel ou romper as ligações entre o polímero e o fármaco. Os dois últimos tipos de liberação podem ter como alvo sítios e tecidos específicos (Lutolf e Hubbell, 2005; Petersen, 2011).

3.8 Possíveis aplicações para os sistemas de liberação controlada a base de quitosana

- Cura de ferimentos e liberação de fatores de crescimento

Com base em estudos *n vivo*, Park e colaboradores (2009) demonstraram que a quitosana, em particular a quitosana contendo bFGF (fator de crescimento básico de fibroblastos), são bons candidatos para o tratamento de feridas crônicas, graças a atividade da quitosana em inibir a ação de enzimas proteolíticas, como a elastase, no ambiente da ferida o que potencializa a atividade do bFGF, acelerando o processo de cicatrização (Park et al., 2009).

- Uso transdérmico

Pesquisadores demonstraram que membranas para uso transdérmico a base de quitosana podem ser utilizadas para veicular fármacos, como os anti-hipertensivos nifedipino e o cloridrato de propranolol, controlando a permeabilidade

das membranas por diferentes concentrações de glutaraldeído (agente reticulante) (Rao e Panduranga, 1993, 1995).

- Uso subcutâneo

Por causa da baixa imunogenicidade e baixo potencial inflamatório a quitosana vem sendo investigada como material para implantes subcutâneo. A vantagem de se usar a quitosana para esse tipo de dispositivo é a variedade de interações físicas e químicas possíveis, o que aumenta o número de moléculas diferentes que podem ser veiculadas (Khor e Lim, 2003).

- Terapia do câncer

Matrizes de hidrogéis a base de quitosana vêm sendo estudadas para veicular e controlar a exposição de radioisótopos. Pesquisadores desenvolveram um hidrogel de quitosana reticulado com glutaraldeído carregado com o ^{131}I -norcolesterol (^{131}I -NC) e testaram em modelo tumoral de mama induzido por xenoenxerto em ratos. O hidrogel mostrou redução na taxa de progressão do tumor e reduziu em 69% a recorrência do tumor e propagação por metástase. É importante ressaltar que houve pequena distribuição sistêmica após o implante do hidrogel (Azab et al., 2007).

3.9 Embasamento teórico da metodologia

3.9.1 Biomateriais e a citotoxicidade

Os biomateriais podem ser de origem natural ou sintética, destinados a interagir total ou parcialmente com sistemas biológicos com o intuito de aumentar, avaliar, substituir ou tratar qualquer tecido, órgão ou função do corpo (Temenoff e Mikos, 2008).

Na área de ciências dos materiais, um termo complementar e essencial é a biocompatibilidade, que pode ser definida como a capacidade de um material realizar uma resposta apropriada numa aplicação específica, com o mínimo de reações alérgicas, inflamatórias ou tóxicas quando em contato com os tecidos vivos ou fluídos orgânicos. Um biomaterial deve ser compatível a uma aplicação específica, na qual especificações de biocompatibilidade devem incluir as condições de utilização e avaliação (Temenoff e Mikos, 2008)

Desenvolvido pela Organização Internacional de Padronização (ISO – International Organization for Standardization), o conjunto de normas conhecido como ISO 10993 aborda a segurança dos dispositivos médicos por meio da identificação de vários tipos de testes de biocompatibilidade. A parte 12 da norma refere-se à preparação das amostras e dos materiais de referência. O padrão requer que as amostras sejam tratadas de forma a evitar a contaminação dos tecidos do organismo e descreve os tipos de amostras que podem passar pelos ensaios, as condições de extração e quais materiais de referência podem ser utilizados como padrão (ISO 10993, 1992).

A norma mencionada recomenda testar os dispositivos médicos em sua forma e condição de produto final. Se o componente final não estiver acabado ou disponível, a avaliação dos subcomponentes representativos do dispositivo é aceitável em alguns casos. Os dispositivos são feitos de polímeros, metais, cerâmicas ou combinação desses materiais. De acordo com a norma, os fluídos utilizados e as condições para a extração devem ser apropriados ao dispositivo e a sua utilização final. Portanto, é

necessário que esse meio represente os ambientes em que o produto final vai ser utilizado.

A extração dos componentes do material a ser testado deve ser realizada a temperaturas que são suficientemente elevadas para maximizar a quantidade de substâncias extraíveis. No entanto, as condições de extração não devem causar deformação ou degradação do material de teste ou de controle. A quantidade de material de teste utilizado no processo de extração é normalmente expressa como uma razão entre a área superficial, o volume ou a massa de amostra pelo volume do agente extrator.

Vários métodos para avaliar a citotoxicidade dos biomateriais foram padronizados utilizando culturas celulares. O cultivo de células *in vitro* representa uma ferramenta valiosa para conhecer os mecanismos nos quais os biomateriais podem produzir reações adversas em nível celular. A técnica consiste em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando suas alterações por diferentes mecanismos, dentre os quais pode-se mencionar a incorporação de corantes ou a inibição de colônias celulares (Rogerio et al., 2003).

Os estudos de citotoxicidade baseiam-se na análise de parâmetros relacionados às funções celulares basais que são comuns a todas as células do organismo, tais como, obter alimento, produzir energia, sintetizar substâncias (como as proteínas), coordenar todas as funções e se reproduzir. As alterações nessas funções geralmente afetam funções específicas. A avaliação da citotoxicidade pode ser feita com base em ensaios qualitativos, que consistem na avaliação da morfologia, e os quantitativos, que se caracterizam pela utilização de metodologias para investigação dos parâmetros celulares como morte celular, inibição do crescimento, proliferação celular ou formação de colônias. Estes testes são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis para a execução do estudo de biocompatibilidade *in vitro* (Palma et al., 2008).

Em quase todos os testes de biocompatibilidade, materiais de referência são usados como controles experimentais, chamados de controles negativos ou positivos preparados no mesmo extrato das amostras candidatas. Uma série de

materiais têm sido utilizada nesses testes, sendo os mais comuns o polietileno de alta densidade (PEAD) como controle negativo e a borracha natural (Látex) como controle positivo (ISO 10993-5, 1992).

O desenvolvimento de programas de avaliação deve ser realizado a fim de confirmar a segurança dos materiais e dispositivos, garantindo que os reagentes utilizados no processo de fabricação não irão comprometer a biocompatibilidade do dispositivo final (Rogerio et al., 2003).

3.9.2 Determinação dos parâmetros cinéticos associados à absorção de vapor de água

A determinação dos parâmetros cinéticos associados a absorção de vapores de água é de grande importância na compreensão dos fenômenos de difusão e intumescimento que envolvem a liberação de uma molécula incorporada em uma matriz polimérica hidrofílica (Metz, 2003; Bortolin et al., 2012).

Vários materiais poliméricos podem ser usados como membranas seletivas ou de barreira para o transporte de vapor de água. Dependendo da aplicação, uma alta ou baixa seletividade ou permeabilidade ao vapor de água é preferida. Em misturas de gases reais, o vapor de água pode intumescer a membrana antes dos demais componentes em consequência do menor peso molecular da água, fato este explicado pela Lei de Graham, representada pela Equação 1, onde T é a temperatura do sistema e M é a massa molar do gás em questão. Tal relação demonstra que a velocidade média das moléculas do gás é diretamente proporcional à raiz quadrada da temperatura e inversamente proporcional a raiz quadrada da massa molar do gás (Atkins e Jones, 2006). Portanto, a obtenção das propriedades intrínsecas do dispositivo torna-se possível utilizando uma atmosfera saturada de vapor de água

$$Velocidade\ média\ das\ moléculas\ de\ um\ gás = \sqrt{\frac{T}{M}} \quad (1)$$

Um dos principais métodos para estudar a difusividade e solubilidade do sistema vapor-polímero é determinar as taxas de sorção ou desorção do penetrante, usualmente dado gravimetria, podendo a volumetria e outras técnicas serem usadas. O fluxo em estado estacionário da variação da quantidade de matéria dentro do meio de difusão em uma única direção (x) é proporcional ao gradiente de concentração, expresso por:

$$J = -D \frac{dM}{dx} \quad (2)$$

A equação 2 é conhecida como 1ª Lei de Fick, onde J é o fluxo, dM/dx é o gradiente de concentração independente do tempo e D é o coeficiente de difusão. O sinal negativo indica que o sentido da difusão é oposto ao aumento da concentração da espécie em estudo. Materiais que seguem essa lei apresentam o chamado comportamento “Fickiano”. Entretanto, em muitas situações práticas, os processos de difusão ocorrem em estado não estacionário e estes materiais apresentam comportamento “não Fickiano” ou anômalo. Neste caso, o fluxo de difusão e o gradiente de concentração em algum ponto particular do meio difundido varia com o tempo, resultando em um acúmulo ou esgotamento das espécies difusoras. Logo, a derivada parcial da Equação 2 dá origem a equação que caracteriza o estado não estacionário, representada pela Equação 3:

$$\frac{\partial M}{\partial t} = \frac{\partial \left\{ D \left(\frac{\partial M}{\partial x} \right) \right\}}{\partial x} \quad (3)$$

Se o coeficiente de difusão for independente da composição, a Equação 3 se simplifica para:

$$\frac{\partial M}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 M}{\partial x^2} \right) \quad (4)$$

Soluções para a Equação 4 (concentração em termos tanto da posição quanto do tempo) são possíveis se as condições de contorno fisicamente significativas forem especificadas, sendo estas encontradas na literatura. (Crank, 1975; Korsmeyer et al., 1983).

Os parâmetros da cinética de absorção de vapores de água (expoente difusional n , e constante de difusão k) podem ser calculados utilizando a Equação 5.

$$\frac{M_t}{M_{eq}} = kt^n \quad (5)$$

onde, t é o tempo; k é a constante de difusão e depende do tipo do material e do meio de difusão; n é o expoente difusional, que fornece informação sobre o tipo de mecanismo de transporte que impulsiona a liberação/absorção de um dado soluto; M_t e M_{eq} são as massas da membrana em um determinado tempo t de absorção e no estado de equilíbrio, respectivamente. Mediante os valores encontrados para n , é possível determinar a qual mecanismo cinético de absorção cada membrana obedece: se $n = 0,5$, o sistema segue a difusão denominada Transporte Caso I ou Fickiana normal; para valores $0,5 < n < 1,0$ a difusão é anômala; se $n = 1,0$, a cinética do sistema é chamada transporte Caso II ou não-Fickiana; e se $n > 1$, a cinética do sistema é denominada Super Transporte Caso II. (Crank, 1975; Korsmeyer et al., 1983; Ritger e Peppas, 1987; Callister, 1991).

Para o cálculo dos parâmetros cinéticos, é feito o ajuste linear dos perfis de difusão dos dispositivos aplicando a função logarítmica no tempo (t) e na fração de massa de vapor de água absorvido (M_t / M_{eq}), em que o coeficiente angular da curva representa n e o coeficiente linear é igual a $\ln k$ (Korsmeyer et al., 1983).

A geometria do dispositivo final influencia diretamente no fenômeno de difusão. No caso de filmes finos (estrutura planar cuja espessura é inferior a 0,3 mm), o processo de difusão pode ser considerado do tipo Fickiano para os primeiros 60% do evento, pois, até esse estágio, o aumento do percentual de massa de soluto liberada/absorvida pelo dispositivo é praticamente linear em função do tempo. O coeficiente de difusão, D , pode ser calculado utilizando a Equação 6, onde D é

coeficiente angular da reta ajustada, α , dado pela Equação 7. O cálculo de coeficiente de difusão para esses sistemas deve levar em conta o processo de relaxação com apropriada cautela na interpretação dos resultados (Ritger e Peppas, 1987).

$$\frac{M_t}{M_{eq}} = \left(\frac{4}{\sqrt{\pi}} \right) \left(\frac{\sqrt{Dt}}{A} \right) \quad (6)$$

$$D = \frac{\pi}{16} \alpha^2 \quad (7)$$

3.9.3 Espectrofotometria na região do UV-Visível

A técnica de espectrofotometria de absorção está baseada no aumento da energia em função do aumento da frequência da radiação incidida, de acordo com a lei $E = h\nu$, na região que vai do ultravioleta ao infravermelho do espectro eletromagnético, representado na FIG. 7. Quando as moléculas absorvem energia na forma de fótons, seus elétrons ficam excitados movimentando-se para um orbital de maior energia (transições eletrônicas), sendo essa transição quantizada, ou seja, só ocorre quando a energia fornecida pela radiação é igual à energia de transição entre os dois orbitais.

FIGURA 6 - Representação do espectro eletromagnético (Khemis, Acesso em 28 dez. 2014).

O espectrofotômetro é um aparelho que emite um feixe de luz monocromática através de uma solução e mede a quantidade de luz que foi absorvida por ela. Por meio desse sistema, é possível construir uma curva de calibração com base no sinal emitido em função da concentração do analito.

A cor das substâncias se deve a absorção (transmitância) de certos comprimentos de onda da luz branca que incide sobre elas, deixando transmitir aos nossos olhos apenas aqueles comprimentos de onda não absorvidos, sendo a concentração de uma substância colorida dissolvida em um líquido incolor proporcional a intensidade da coloração da solução, como representado na FIG. 7. O conjunto de átomos de uma molécula responsável pela sua cor é chamada de cromóforo ou grupo cromóforo. Para diminuir os erros de medida, é feita a leitura do branco da amostra, que consiste em todos os seus componentes menos o analito em questão. Com isso, qualquer outro componente da amostra que possa ter alguma absorbância é descontado no branco.

FIGURA 7 - Representação da transmitância de uma substância (Cleuber Carvalho. Acesso em: 18 jul. 2014).

Após incidir um feixe de luz com intensidade I_0 por uma amostra, ele terá uma nova intensidade I , pois uma parte foi absorvida. Essa intensidade transmitida é detectada pelo espectrofotômetro e está relacionada com a intensidade da radiação incidente (I_0), da concentração do analito, do diâmetro do tubo (caminho ótico), do comprimento de onda incidente (λ) e da natureza da amostra. A radiação incidida deve ser a mesma nas diferentes amostras, por isso, mede-se a razão I/I_0 , chamada de transmitância (T) e varia de 0 a 1. A relação experimental entre a transmitância e a concentração tem a forma de uma exponencial inversa, ou seja, a transmitância diminui com o aumento da concentração. Para se ter o gráfico de uma reta (FIG. 8), basta aplicar a função logarítmica ao inverso da transmitância, como demonstrado na Equação 8 (Pimentel e Neto, 1996).

$$T = \frac{I}{I_0} \rightarrow \frac{1}{T} = \frac{I_0}{I} \rightarrow \log\left(\frac{1}{T}\right) = A \quad (8)$$

FIGURA 8 - Gráfico de transmitância e absorbância em função da concentração do analito.

A grandeza A é denominada absorbância e é diretamente proporcional à concentração do analito e do caminho óptico. Essa relação linear é definida pela Equação 9 (Harris, 2005):

$$A = \epsilon Cl \quad (9)$$

onde A é a absorbância no comprimento de onda de máxima absorção da substância analisada, $\lambda_{\text{máx.}}$, ϵ é o grau de absorção molar ou coeficiente de extinção molar, C a concentração do analito e l o comprimento do caminho da luz em centímetros. Essa é a lei de Lambert-Beer, na qual a constante de proporcionalidade ϵ pode ser determinada construindo-se um gráfico da absorbância em função do comprimento de onda (A vs λ), mantendo-se constante as outras variáveis (C , l , tipo de amostra), denominado espectro de absorção ou gráfico de varredura da amostra, demonstrado na FIG. 9(a). O comprimento de onda de maior absorbância fornece a melhor sensibilidade, ou seja, é o que melhor distinguir entre duas concentrações muito próximas e o que dá o melhor sinal para amostras diluídas, como demonstrado na FIG. 9(b).

FIGURA 9 - Demonstração gráfica para a obtenção da constante de absorvidade molar, ϵ . (a) Gráfico da absorbância em função do comprimento de onda em nm; (b) Curvas da absorbância em função da concentração do analito.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Fluxograma de trabalho

FIGURA 10 - Fluxograma de trabalho para obtenção e caracterização das amostras avaliadas.

4.2 Materiais

Lista dos principais reagentes:

- Quitosana GD $\geq 85\%$, proveniente da casca de camarão – Polymar[®]
- Quitosana de peso molecular médio e GD 75-85% – Sigma-Aldrich[®]
- PVP K-90 – Êxodos[®]
- Amido Modificado – Corn[®]
- Lisozima humana recombinante – Sigma-Aldrich[®]
- Ácido acético glacial PA – Synth[®]
- Ácido clorídrico PA 37% – VETEC[®] Química Fina Ltda.
- Brometo de Potássio PA – Synth[®]
- Diclofenaco sódico – Sigma-Aldrich[®]
- Glutaraldeído 25% – Sigma-Aldrich[®]
- Hidróxido de sódio PA – VETEC[®] Química Fina Ltda.

4.3 Avaliação do grau de desacetilação das quitosanas A e B por espectroscopia na região do infravermelho (IV)

Existem muitos métodos de caracterização dos grupos amino da quitosana e seus derivados, entre os quais a espectroscopia de infravermelho foi escolhido em virtude das vantagens que têm: análise relativamente rápida quando comparada a outras técnicas e disponibilidade do equipamento em muitos laboratórios.

Para realização do ensaio de espectroscopia IV, foram preparadas pastilhas das quitosanas A e B dispersas em brometo de potássio (KBr), na proporção de 2 mg de quitosana/100 mg de KBr. Os espectros de transmitância (%) versus número de onda (cm^{-1}) foram obtidos pelo espectrômetro FT-IR da marca Thermo Scientific, modelo Nicolet 6700, na faixa de leitura de 400 – 4000 cm^{-1} .

Os valores obtidos para o grau médio de desacetilação, $\overline{GD}$, foram comparados aos valores emitidos nos laudos. Esse procedimento serviu de controle inicial das quitosanas, visando garantir a reprodutibilidade dos experimentos, bem como estabelecer as concentrações de agente reticulante glutaraldeído com base na proporção de monômeros desacetilados. As duas quitosanas utilizadas nas sínteses foram denominadas A e B aleatoriamente e não serão mencionadas no texto suas marcas comerciais registradas, para não gerar nenhum tipo de constrangimento.

Diferentes razões entre bandas de absorção no infravermelho da quitina, quitosana e seus monômeros precursores têm sido propostas na literatura. O espectro de absorção do monômero da quitosana, N-acetil-D-glucosamina é representado na FIG. 11. O $\overline{GD}$ foi determinado pela razão da intensidade das bandas características e de referência, respectivamente em 1320 cm^{-1} , específica para N-acetil-glucosamina (amida) e em 1420 cm^{-1} , usada como banda de referência para comparar quitina e quitosana. (Brugnerotto, 2001).

FIGURA 11 - Espectro de absorção na região do IV da N-acetil-D-glucosamina. As linhas de base b6 e b9, em destaque, foram utilizadas para determinar a razão entre a intensidade das bandas em 1320 cm⁻¹ e 1420 cm⁻¹ (banda característica do grupo amina e banda de referência, respectivamente) usadas para comparar quitinas e quitosanas (Brugnerotto, 2001).

De acordo com Brugnerotto (2001), o grau de acetilação $\overline{GA}$, pode ser determinado pela Equação 10, ao passo que o $\overline{GD}$ foi determinado utilizando a Equação 11.

$$\frac{A_{1320}}{A_{1420}} = 0,3822 + 0,03133 \overline{GA} (\%) \quad (10)$$

$$\overline{GD} (\%) = 100 \% - \overline{GA} (\%) \quad (11)$$

4.4 OBTENÇÃO DOS DISPOSITIVOS MATRICIAIS

4.4.1 Obtenção dos dispositivos matriciais a base de quitosana

A primeira etapa iniciou-se com o preparo da solução aquosa de ácido acético a $0,6 \text{ mol L}^{-1}$, utilizada como solvente das quitosanas A e B. As quitosanas foram previamente secas em estufa a vácuo, a $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas para retirada da umidade dos pós. Em seguida, a quitosana seca foi peneirada em tamiz 60 mesh para garantir uniformidade do pó e facilitar a dissolução. Foram preparadas soluções a 1%, nas quais as quitosanas foram solubilizadas em béquer adicionando vagarosamente o pó de quitosana ao solvente, sob agitação magnética para evitar formação de grumos. Após essa etapa, o béquer foi coberto com filme de PVC e o sistema foi mantido sob agitação constante por 24 horas, à temperatura ambiente, para garantir a completa dissolução do biopolímero.

As soluções poliméricas resultantes foram filtradas em duas telas finas de náilon (poros $\pm 1 \text{ }\mu\text{m}$) sobrepostas e, em seguida, filtradas novamente em filtro de papel de porosidade $0,3 \text{ }\mu\text{m}$ em sistema de filtração à vácuo. Após a filtração, foram vertidos 10 mL de solução em placas de Petri de $\varnothing 10 \text{ cm}$ e, em seguida, levadas à estufa a $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$, até que atingissem massa constante, como demonstrado na FIG. 12. Depois de retiradas da estufa, as amostras foram acondicionadas em dessecador.

FIGURA 12 - Síntese dos dispositivos: etapa de secagem.

4.4.2 Adição do glutaraldeído como agente de reticulação

Foram preparadas soluções de quitosana com as seguintes concentrações de glutaraldeído: 0,5; 2,5; 5,0; 100,0 e 300 mmol mL⁻¹. Após a etapa de filtração das soluções de quitosana descrita no item anterior, o glutaraldeído foi adicionado por gotejamento lento sob agitação constante, com auxílio do agitador magnético, utilizando a bureta para o controle do fluxo lento, sob resfriamento, utilizando banho de gelo a 4 ± 2 °C, uma vez que a baixa temperatura diminui a velocidade de reticulação. Posteriormente, as soluções foram vertidas em placas de Petri e secas em estufa à 50 °C. Na FIG. 13 é mostrado um filme de quitosana reticulado com glutaraldeído, após a etapa de secagem.

FIGURA 13 - Filme anidro de quitosana reticulado com glutaraldeído 100 mmol mL⁻¹.

4.4.3 Mistura (blenda) de quitosana-amido modificado

O amido modificado foi solubilizado em água de osmose reversa a 2% (p/p), sob aquecimento brando a aproximadamente 45 °C. Após, a solução de amido foi vertida nas soluções de quitosana, preparadas com ou sem adição de diclofenaco sódico ou glutaraldeído, nas proporções representadas na TAB. 1.

4.4.4 Mistura (blenda) quitosana-PVP

As misturas de quitosana e PVP obtidas seguiram a mesma metodologia descrita no item 4.4.3. O PVP foi previamente solubilizado em água osmose a 4% (p/p) sob agitação constante por 24 horas a temperatura ambiente, nas proporções representadas na TAB. 1.

4.4.5 Adição de excipientes

Na tentativa de melhorar as propriedades mecânicas das matrizes poliméricas, dentre as formulações testadas, algumas receberam a adição de polietilenoglicol (PEG 400) a 1% (p/v), de ágar a 0,5% (p/v) ou de ambos, como representado na TAB. 1. O PEG e o ágar foram adicionados às soluções de quitosanas previamente preparadas, sob agitação constante a temperatura ambiente e aquecimento brando aproximadamente 50°C, respectivamente.

4.4.6 Adição do fármaco diclofenaco sódico

Foi adicionado 1 mL de solução aquosa de diclofenaco sódico 1mg mL⁻¹ nas formulações descritas na TAB. 1, por gotejamento lento utilizando uma bureta para o controle do fluxo, sob agitação constante a temperatura ambiente.

4.5 Caracterização das amostras

4.5.1 Avaliação qualitativa das matrizes poliméricas

Nessa etapa foi feita uma avaliação qualitativa das matrizes que deram continuidade aos ensaios de caracterização de acordo com os atributos descritos a seguir:

- Reprovação após o preparo (-): amostras que não apresentaram distribuição homogênea de seus componentes após a etapa de secagem;
- Aprovação após o preparo (+): amostra que apresentaram distribuição homogênea de seus componentes após a etapa de secagem;
- Aprovação durante o processo de remoção das placas de Petri (++) : amostras que apresentaram boa resistência mecânica ao serem removidas das placas de Petri;
- Aprovação na manipulação e preparação de amostras para as demais caracterizações (+++) : amostras que resistiram as condições de preparo necessárias para as caracterizações, tais como, secagem e corte dos corpos de prova.

Na TAB. 1 são mostrados os resultados obtidos para 72 formulações avaliadas.

TABELA 1 - Composição das formulações e triagem qualitativa.

Nº Formulação	Quitosanas		Amido modificado 2%	PVP 4%	PEG 400	Ágar	Glutaraldeído (mmol mL ⁻¹)	Avaliação Qualitativa
	A	B						
1	2%	-	-	-	-	-	-	++
2	2%	-	-	-	-	-	0,5	++
3	2%	-	-	-	-	-	2,5	++
4	2%	-	-	-	-	-	5,0	++
5	2%	-	-	-	-	-	100,0	+++
6	2%	-	-	-	-	-	300,0	+++
7	-	2%	-	-	-	-	-	+
8	-	2%	-	-	-	-	0,5	+
9	-	2%	-	-	-	-	2,5	++
10	-	2%	-	-	-	-	5,0	++
11	-	2%	-	-	-	-	100,0	++
12	-	2%	-	-	-	-	300,0	++
13	2%	-	-	-	1%	-	-	+++
14	2%	-	-	-	-	0,5%	-	++
15	2%	-	-	-	1%	0,5%	-	++
16	2%	-	-	-	1%	-	100,0	+++
17	2%	-	-	-	-	0,5%	100,0	+++
18	2%	-	-	-	1%	0,5%	100,0	+++
19	-	2%	-	-	1%	-	-	++
20	-	2%	-	-	-	0,5%	-	+
21	-	2%	-	-	1%	0,5%	-	++
22	-	2%	-	-	1%	-	100,0	+++
23	-	2%	-	-	-	0,5%	100,0	++
24	-	2%	-	-	1%	0,5%	100,0	+++

Triagem das formulações: Avaliação física qualitativa (continuação)								
Nº Formulação	Quitosanas 2%		Amido modificado 2%	PVP 4%	PEG 400	Ágar	[Glutaraldeído] mmol mL ⁻¹	Avaliação Qualitativa
	A	B						
25	70	-	30	-	-	-	-	++
26	50	-	50	-	-	-	-	+
27	30	-	70	-	-	-	-	(-)
28	70	-	30	-	-	-	100,0	++
29	50	-	50	-	-	-	100,0	++
30	30	-	70	-	-	-	100,0	++
31	-	70	30	-	-	-	-	++
32	-	50	50	-	-	-	-	+
33	-	30	70	-	-	-	-	(-)
34	-	70	30	-	-	-	100,0	++
35	-	50	50	-	-	-	100,0	+
36	-	30	70	-	-	-	100,0	+
37	70	-	30	-	1%	-	-	++
38	50	-	50	-	-	0,5%	-	(-)
39	30	-	70	-	1%	0,5%	-	+
40	70	-	30	-	1%	-	100,0	++
41	50	-	50	-	-	0,5%	100,0	+
42	30	-	70	-	1%	0,5%	100,0	++
43	-	70	30	-	1%	-	-	++
44	-	50	50	-	-	0,5%	-	(-)
45	-	30	70	-	1%	0,5%	-	+
46	-	70	30	-	1%	-	100,0	++
47	-	50	50	-	-	0,5%	100,0	+
48	-	30	70	-	1%	0,5%	100,0	++

Triagem das formulações: Avaliação física qualitativa (continuação)								
Nº Formulação	Quitosanas 2%		Amido modificado 2%	PVP 4%	PEG 400	Ágar	[Glutaraldeído] mmol mL ⁻¹	Avaliação Qualitativa
	A	B						
49	70	-	-	30	-	-	-	+++
50	50	-	-	50	-	-	-	+++
51	30	-	-	70	-	-	-	+++
52	70	-	-	30	-	-	100,0	+++
53	50	-	-	50	-	-	100,0	+++
54	30	-	-	70	-	-	100,0	+++
55	70	-	-	30	-	-	300,0	+++
56	50	-	-	50	-	-	300,0	+++
57	30	-	-	70	-	-	300,0	+++
58	70	-	-	30	1%	-	100,0	+++
59	50	-	-	50	1%	-	100,0	+++
60	30	-	-	70	1%	-	100,0	+++
61	70	-	-	30	-	0,5%	100,0	+++
62	50	-	-	50	-	0,5%	100,0	+++
63	30	-	-	70	-	0,5%	100,0	+++
64	70	-	-	30	1%	0,5%	100,0	+++
65	50	-	-	50	1%	0,5%	100,0	+++
66	30	-	-	70	1%	0,5%	100,0	+++
67	-	70	-	30	1%	0,5%	-	++
68	-	50	-	50	1%	0,5%	-	+++
69	-	30	-	70	1%	0,5%	-	++
70	-	70	-	30	1%	0,5%	100,0	+++
71	-	50	-	50	1%	0,5%	100,0	+++
72	-	30	-	70	1%	0,5%	100,0	++

4.5.2 Teste de Citotoxicidade: método de incorporação do vermelho neutro

O objetivo principal do teste de citotoxicidade foi avaliar quantitativamente a citotoxicidade de 16 formulações aprovadas na avaliação qualitativa. O ensaio de citotoxicidade foi realizado com a utilização da linhagem celular NCTC Clone 929, células de tecido conectivo de camundongo, adquiridas no banco de células do Instituto Adolf Lutz, localizado em São Paulo, SP – Brasil.

Foram utilizados como controle negativo de citotoxicidade o polietileno de alta densidade (PEAD) e como controle positivo o látex.

As 16 amostras aprovadas na triagem qualitativa e os controles foram embalados a vácuo, esterilizados por radiação gama na dose de 25 kGy e somente desembalados no momento em que se iniciou o ensaio para garantir a esterilidade do material e evitar um falso positivo, graças a presença de microrganismos e outros contaminantes citotóxicos presentes no ambiente. Para a obtenção do extrato fluido, as amostras ficaram em contato com o meio de cultura MEM (meio mínimo de Eagle, da Sigma Co. São Paulo, Brasil), em estufa a 37 °C durante 24 horas.

As células foram mantidas em meio MEM contendo 10% de soro fetal bovino e aminoácidos não essenciais a 1% (MEM-FCS) numa incubadora umidificada com 5% de CO₂ a 37 °C. Foi utilizada a técnica de contagem celular em câmara de Neubauer para obtenção da concentração celular do meio de cultura, em que o meio de cultura foi centrifugado a 1100 rpm por 5 minutos. Após centrifugação o *pellet* de células foi colocado no meio de cultura e o número de células foi avaliado utilizando o microscópio óptico. As células foram separadas por tripsina a 0,2% e 0,2 mL da suspensão, aproximadamente $2,5 \cdot 10^5$ células/mL, foram posteriormente semeadas em microplacas com 96 poços de fundo plano e, em seguida, incubadas em estufa durante 24 horas a temperatura de 37 °C, com controle de umidade e pressão de CO₂.

Após este período, o meio de cultura foi descartado e substituído com 0,2 mL de extrato das amostras em triplicata diluídas em série (100; 50; 25; 12,5 e 6,25%). O controle de cultura celular foi substituído com MEM-FCS. De ambos os controles foram feitos os extratos em triplicata seguindo o mesmo método de diluição seriada realizado na preparação das amostras. A placa foi incubada novamente durante 24 horas nas mesmas condições descritas. Após o período de incubação, o meio e os

extratos foram descartados e substituídos por 0,2 mL de solução de vermelho neutro 50 mg mL⁻¹ diluído a 1:100 em meio MEM-FCS. Após incubação a 37 °C durante 3 horas, o meio do corante foi descartado e a microplaca foi lavada duas vezes com tampão de fosfato-salina (PBS), seguida de outra lavagem com solução de CaCl₂ em formaldeído (1% de CaCl₂ em 0,5% de formaldeído). A ruptura das células para a liberação do vermelho neutro foi feita por adição de 0,2 mL de solução de extração contendo etanol a 50% em ácido acético a 1%. A placa foi agitada por 10 minutos e a leitura das densidades ópticas (DO) foi realizada num espectrofotômetro, modelo Organon Teknika Reader 530 versão 1.24, em 540 nm. Com os valores obtidos, calculou-se a média da porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle de células (100%). Esses valores em função da concentração do extrato originaram as curvas de viabilidade celular, em que o índice de citotoxicidade (IC 50%) foi encontrado, ou seja, a concentração do extrato que induz a 50% de lise ou morte celular e, conseqüentemente, a inibição de incorporação do vermelho neutro (Ciapetti, 1996; ISO-10993, 1992).

Os cálculos para obtenção dos valores de viabilidade celular seguiram o seguinte procedimento:

- Cálculo da média das quadruplicatas das medidas de densidade óptica de cada diluição, do branco e do controle celular;
- Subtração da média do branco das médias do controle e das diluições ($Abs_{corr} = Abs_{analito} - Abs_{branco}$);
- Cálculo da viabilidade celular médio obtido por meio da Equação 12, onde VC = viabilidade celular; DOD = média da densidade óptica da diluição e DOC = média da densidade óptica dos controles.

$$VC = \frac{DOD}{DOC} \cdot 100 \quad (12)$$

4.5.3 Teste de biodegradação das matrizes poliméricas de quitosana

As amostras provenientes da quitosana A foram preparadas em triplicata conforme descrito no item 4.4.1. Foi avaliada a influência do agente reticulante na biodegradação *in vitro* das matrizes, utilizando glutaraldeído nas concentrações de 100 e 300 mmol mL⁻¹. Uma amostra sem adição de agente reticulante foi preparada como controle. Os filmes anidros foram cortados em formato retangular de área aproximadamente 2 cm² e pesados em balança analítica. Após a pesagem, as amostras foram imersas em tampão fosfato salina 0,05 M, pH 7,4 (PBS), com e sem suplemento de lisozima humana na concentração de 0,1 mg mL⁻¹, em agitador tipo *shaker* (80 rpm a 36 ± 1 °C). A biodegradação foi avaliada mediante a perda de massa em função do tempo, utilizando a Equação 13 para cálculo do percentual de biodegradação, onde D (%) é o percentual de massa degradada, M_i é a massa inicial do dispositivo seco e M_d é a massa degradada, calculada após a secagem da amostra resultante. O tempo total do teste de biodegradação foi de 15 dias.

$$D(\%) = \left(\frac{M_i - M_d}{M_i} \right) 100 \quad (13)$$

4.5.4 Caracterização morfológica das amostras por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas a fim de avaliar as características morfológicas das membranas fornecendo dados como: porosidade, rugosidade e distribuição do fármaco nas formulações em função da concentração de glutaraldeído. Para tanto, as amostras provenientes da quitosana A foram preparadas conforme descrito nos item 4.4.1; 4.4.2 e 4.4.6, reticuladas com glutaraldeído nas concentrações 5, 100 e 300 mmol mL⁻¹. Uma amostra sem adição de glutaraldeído foi preparada como controle. As amostras foram liofilizadas em ciclos de 36 horas com posterior dispersão de ouro coloidal sobre a amostra liofilizada para a obtenção das imagens.

As análises morfológicas foram feitas em microscópio eletrônico de varredura (MEV), da marca Philips, modelo XR-30e, localizado no Laboratório de Microscopia do Centro de Ciências e Tecnologia de Materiais (CCTM) do IPEN/CNEN-SP.

4.5.5 Fração gel e intumescimento máximo

Para os ensaios de fração gel e intumescimento máximo foram selecionadas as formulações apresentadas na TAB. 2. Todas as amostras foram reticuladas com glutaraldeído 100 mmol L⁻¹.

TABELA 2- Composição das formulações selecionadas para os ensaios de fração gel, intumescimento máximo, obtenção dos parâmetros cinéticos e do coeficiente de difusão associados a absorção de vapor de água e do perfil de liberação de diclofenaco sódico *in vitro*.

Amostra	Quitosana 2%	PVP 4%	Ágar	PEG
A 1	30	70	-	-
A 2	50	50	-	-
A 3	70	30	-	-
A 4	50	50	0,5%	-
A 5	50	50	-	1,0%
A 6	50	50	0,5%	1,0%

A fração gel é um ensaio utilizado para determinar o grau de reticulação de polímeros, o qual está diretamente associado à insolubilidade e às propriedades mecânicas do material. Geralmente, os testes de fração gel em hidrogéis são obtidos por métodos vigorosos, como extração da fração solúvel utilizando extrator tipo Soxhlet ou autoclave. No entanto, a avaliação da fração gel nesse estudo foi feita na seguinte condição: as amostras, em triplicatas, de aproximadamente 50 mg, ficaram imersas em 5 mL de PBS, em recipiente fechado, sob agitação constante em *shaker* com

rotação de 80 rpm, a temperatura de $36,0 \pm 1$ °C. Após 72 horas, as membranas foram secas em estufa até obtenção da massa constante e os resultados de fração gel foram quantificados utilizando a Equação 14, onde F_G é a fração gel, M_i é a massa inicial da amostra e M_f é massa final.

$$F_G (\%) = \left(\frac{M_i}{M_f} \right) 100 \quad (14)$$

O grau de intumescimento pode ser descrito como a quantidade de solvente absorvida pelo hidrogel e esta propriedade está relacionada à estrutura da rede formada, ou seja, à densidade de reticulação do polímero, que por sua vez influencia na cinética de liberação de fármacos em sistemas matriciais.

A capacidade de intumescimento máximo das matrizes foram avaliadas como descrito: as amostras foram secas em estufa a vácuo, à temperatura de 50 °C, até atingirem massa constante. Após a secagem, cada amostra foi imersa em triplicata em béqueres contendo PBS, pH 7,4. A massa das amostras foi mensurada em intervalos regulares, até atingir valor constante. O grau de intumescimento foi calculado utilizando a Equação 15, onde $I(\%)$ é o grau de intumescimento em porcentagem, M_f é a massa final do hidrogel intumescido e M_i é a massa inicial do hidrogel seco.

$$I(\%) = \left(\frac{M_f - M_i}{M_i} \right) 100 \quad (15)$$

4.5.6 Determinação dos parâmetros cinéticos associados à absorção de vapor de água

As formulações utilizadas para a obtenção dos parâmetros cinéticos e do coeficiente de difusão associados à absorção de vapor de água estão descritas na TAB. 2, preparadas conforme descrito nos itens da seção 4.4, exceto o item 4.4.3. Esses parâmetros foram determinados para as amostras com e sem diclofenaco sódico. Os corpos de prova foram cortados em retângulos, suas dimensões mensuradas com auxílio de um paquímetro digital e mantidos em estufa à temperatura aproximada de 35 °C, até o momento do ensaio.

Uma balança analítica, acoplada a um sistema vedado com umidade relativa (UR %) média de $70 \pm 3\%$ foi utilizada para determinar a taxa de absorção de vapor de água através das amostras. O sistema foi acondicionado em uma estufa a temperatura média de 36 ± 1 °C, devidamente calibrada e nivelada. A UR% e a temperatura foram monitoradas com o auxílio de um termohigrômetro. A massa de água absorvida pela membrana (M_t) em função do tempo foi medida até a obtenção de uma massa constante (M_{eq}). No intuito de atingir maior acurácia e precisão dos resultados, uma micro câmera foi instalada para acompanhar a variação de massa em tempo real, como mostrado na FIG. 14.

No presente trabalho foram consideradas as seguintes condições: a massa de vapor de água na superfície foi mantida constante; as moléculas do vapor difundido nas amostras estavam uniformemente distribuídas; a superfície foi considerada como o ponto inicial da difusão ($x = 0$), aumentando com a distância para o interior do dispositivo.

Os parâmetros da cinética de absorção de vapores de água (expoente difusional n , e constante de difusão k) foram calculados utilizando o modelo matemático descrito na seção 3.9.2.

FIGURA 14 - Aparato desenvolvido para determinação dos valores dos parâmetros cinéticos e do coeficiente de difusão associados à absorção de vapor de água pelas matrizes poliméricas.

4.5.7 Teste de Liberação *in vitro*

Para as mesmas formulações mostradas na TAB. 2, foram realizados testes de liberação do diclofenaco sódico em PBS, pH 7,4, com e sem suplemento de lisozima humana 0,1 mg mL⁻¹.

A primeira etapa do teste foi a obtenção da curva de calibração do princípio ativo dissolvido no PBS utilizando concentrações conhecidas. Para o preparo da solução, o fármaco foi pesado em balança de precisão analítica e solubilizado com auxílio de agitador tipo vortex. Em seguida a solução resultante foi filtrada em filtro de papel e por meio dessa foi realizada uma diluição seriada partindo de uma concentração de 1 mg mL⁻¹ de diclofenaco sódico. Alíquotas de 200 µL de cada diluição foram retiradas e pipetadas em microplaca, as quais as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro, modelo Espectra MAX-I3, com comprimento de onda na faixa de 275 nm, determinado utilizando a função *scan* do equipamento (varredura), sendo esse o comprimento de onda de maior absorbância. Os valores de absorbância obtidos para cada diluição foram utilizados para montar a curva de calibração.

Na segunda etapa, foi realizado o teste liberação do fármaco em que as matrizes poliméricas foram imersas em meio PBS com e sem lisozima. O método adotado foi o teste de difusão simples *in vitro*, no qual as amostras em triplicatas de aproximadamente 30 mg ficaram imersas em 5 mL de PBS, em recipiente fechado, para evitar perdas por evaporação, sob agitação constante em *shaker* com rotação de 80 rpm à temperatura de 36 ± 2 °C. Alíquotas de 200 µL foram coletadas em intervalos de tempo conhecidos e lidas em espectrofotômetro nas mesmas condições descritas acima para obtenção da curva padrão; para cada alíquota coletada foi feita a reposição do meio imediatamente. A partir da segunda alíquota, todos os valores foram ajustados utilizando o fator de correção de diluição. O tempo total do ensaio foi de 48 horas. Os valores de absorbância foram correlacionados com os valores obtidos na curva de calibração do diclofenaco sódico para a obtenção das concentrações de fármaco liberado em função do tempo. Com isso, foi possível determinar os perfis cinéticos de liberação das amostras avaliadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os espectros de absorção das quitosanas A e B são mostrados na FIG. 15, nos quais as linhas vermelha e azul representam as linhas de base referentes as bandas de absorção em 1420 cm^{-1} e 1320 cm^{-1} , respectivamente (Brugnerotto et al., 2001).

FIGURA 15 - Espectros de absorção na região do IV. (a) Quitosana A; (b) Quitosana B.

A comparação entre as informações contidas nos laudos emitidos pelos fornecedores e os resultados obtidos para as amostras analisadas é são mostradas na TAB. 3.

TABELA 3 - Grau médio de desacetilação, $\overline{GD}$, das quitosanas A e B.

Quitosana	$\overline{GD}$	
	Fornecedor	Infravermelho IV
A	75-85	80 ± 5
B	≥ 85	75 ± 6

Com base nos valores obtidos para o grau de desacetilação, a quitosana A apresentou $\overline{GD}$ na média de variação estabelecida pelo fornecedor; já a quitosana B apresentou $\overline{GD}$ abaixo do valor estabelecido no laudo. Com base nesses resultados, é válido ressaltar a necessidade caracterizar a matéria-prima no intuito de garantir a reprodutibilidade dos resultados, uma vez que as propriedades da quitosana estão diretamente relacionadas à quantidade de grupos amina disponíveis para as interações.

O polímero natural utilizado foi o polissacarídeo quitosana, sendo este escolhido por possuir propriedades interessantes para aplicações em sistemas de liberação controlada, como biocompatibilidade e biodegradabilidade, descritas na literatura (Uragami e Tokura, 2006). O amido modificado, outro polissacarídeo, foi utilizado para aumentar a capacidade de erosão dos filmes a base de quitosana. O polímero sintético PVP, foi empregado para melhorar as propriedades mecânicas dos filmes finos e modular a liberação do fármaco.

Para a reticulação e formação das matrizes, foi empregado o agente reticulante glutaraldeído em baixas concentrações, mediante a alta toxicidade de aldeídos bifuncionais. Além do agente reticulante glutaraldeído, foi utilizado o polietilenoglicol (PEG-400) e ágar no intuito de melhorar as propriedades dos filmes.

Durante o processo de obtenção e triagem dos filmes, os aspectos físicos foram avaliados qualitativamente. Dentre as 72 formulações testadas, 29 receberam aprovação em todos os quesitos avaliados, conforme apresentado na TAB. 1.

As matrizes obtidas com base na quitosana A foram as que apresentaram melhores propriedades, desde o preparo da solução para a confecção dos dispositivos, com aspecto límpido e translucido após a filtração, à boa homogeneidade dos componentes após a secagem. As amostras obtidas sem adição de glutaraldeído ou em concentrações inferiores a 5 mmol mL^{-1} , apresentaram-se frágeis e quebradiças, sendo reprovadas na triagem. Nas concentrações de 100 e 300 mmol mL^{-1} de glutaraldeído, as amostras apresentaram boas propriedades mecânicas. O PEG-400 melhorou a maleabilidade e a elasticidade das matrizes em que foi adicionado. A adição do ágar tornou-as mais rígidas e com boa resistência mecânica nas formulações que foram reticuladas, porém as matrizes sem adição de glutaraldeído se apresentaram quebradiças durante a manipulação. Com a adição de PEG e ágar nas formulações, foram obtidas amostras mais resistentes durante a manipulação, porém, houve uma diminuição da sua maleabilidade.

As matrizes obtidas com a quitosana B foram reprovadas e não foi dado continuidade aos ensaios com as amostras obtidas por meio dessa matéria-prima, em consequência da presença de contaminantes não solúveis visíveis a olho nu, tanto no momento do preparo da solução, quanto após a obtenção das matrizes, mesmo após as etapas de filtração. Para obter um maior grau de pureza, seria necessário utilizar métodos de purificação. Entretanto, tais processos não faziam parte da proposta deste estudo.

As blendas de quitosana-amido modificado foram reprovadas por apresentarem distribuição não homogênea dos componentes, observada pelo aparecimento de grumos e precipitados durante a secagem, além de rigidez excessiva e fragilidade durante a manipulação das amostras. Quando adicionado PEG, as misturas apresentaram melhores propriedades mecânicas durante a manipulação, porém, os problemas com a distribuição dos componentes permaneceram. As blendas quitosana-PVP apresentaram as melhores características dentre as formulações testadas.

Das 29 formulações aprovadas na avaliação qualitativa, 16 formulações de interesse, representadas na TAB. 4, foram testadas quanto à citotoxicidade. A formulação 1 foi uma exceção, pois não foi aprovada durante a manipulação; sua escolha deve-se ao fato de conter somente a quitosana como componente.

TABELA 4 - Relação das amostras aprovadas na triagem e avaliadas quanto a citotoxicidade.

Nº Formulação	Quitosana A	PVP 4%	PEG 400	Ágar	Glutaraldeído mmol.mL ⁻¹	Avaliação Qualitativa	Área da amostra (cm ²)	Volume do substrato (mL)
1	2%	-	-	-	-	++	6,48	12,96
2	2%	-	-	-	100	+++	4,32	8,64
3	2%	-	1%	-	100	+++	4	8
4	2%	-	-	-	300	+++	4,4	8,8
5	2%	-	1%	-	100	+++	4	8
6	2%	-	-	0,50%	100	+++	4	8
7	2%	-	1%	0,50%	100	+++	4	8
8	2%	-	1%	0,5%	300	+++	4	8
9	2%	70/30	-	-	300	+++	5,28	10,56
10	2%	50/50	-	-	300	+++	3,5	7
11	2%	30/70	-	-	300	+++	3,36	6,72
12	2%	50/50	1%	0,5%	-	+++	4,2	8,4
13	2%	50/50	1%	-	100	+++	2,75	5,5
14	2%	50/50	-	0,50%	100	+++	4,5	9
15	2%	50/50	1%	0,5%	100	+++	3,75	7,5
16	2%	50/50	1%	0,5%	300	+++	2,73	5,46

Nas FIG. 16 a 19 estão representados os gráficos viabilidade celular das amostras apresentadas na TAB. 4. Cada figura representa uma placa com 4 amostras e os controles positivos e negativos de cada uma.

FIGURA 16 - Gráfico de viabilidade celular (%) das amostras 1 a 4.

FIGURA 17 - Gráfico de viabilidade celular (%) das amostras 5 a 8.

FIGURA 18 - Gráfico de viabilidade celular (%) das amostras 9 a 12.

FIGURA 19 - Gráfico de viabilidade celular (%) das amostras 13 a 16.

Com base nos dados obtidos no teste de citotoxicidade, das 16 formulações testadas, verificou-se que 3 delas apresentaram citotoxicidade (8, 11 e 16). A citotoxicidade dessas formulações está relacionada à maior concentração de glutaraldeído (300 mmol.mL^{-1}) utilizado para reticulação, o qual o excesso provavelmente não reagiu completamente com os grupamentos amino da quitosana, ocorrendo liberação desses resíduos não ligados aos polissacarídeos durante o ensaio.

Os extratos das amostras 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 12, 14 e 15 apresentaram viabilidade celular $\geq 100\%$ em todas as concentrações do extrato. A amostra 4, em particular, apresentou viabilidade celular positiva com média de $73,4 \pm 4,4\%$. De acordo com a ISO 10993 (1992), o teste de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro ensaio que deve ser realizado para avaliar a biocompatibilidade de um material candidato a aplicações biomédicas como os sistemas de liberação controlada de fármacos.

No ensaio de biodegradação, os filmes pela quitosana A, sem e com adição de glutaraldeído nas concentrações de 100 e 300 mmol mL^{-1} , foram testados em relação a perda de massa. Os filmes ficaram imersos durante 15 dias em PBS com e sem suplemento de lisozima. Na TAB. 5 são representados os percentuais de degradação em relação as concentrações de agente reticulante e a influência do meio dos respectivos meios.

TABELA 5 - Percentuais de massa degradada dos filmes obtidos pela quitosana A, em 15 dias de exposição em meio PBS com e sem suplemento de lisozima humana $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$.

Glutaraldeído mmol mL^{-1}	Degradação %		
	PBS	PBS-Lisozima	Diferença
0	11,03	15,25	4,22
100	9,67	13,27	3,60
300	6,89	11,51	4,62

Com base no cálculo da perda de massa, foi possível observar a influência da concentração de glutaraldeído em relação a fração solúvel. No filme sem adição de

agente reticulante, a fração solúvel foi de 11%, enquanto nos filmes reticulados com glutaraldeído nas concentrações de 100 e 300 mmol mL⁻¹ a fração solúvel foi de 9,7 e 6,9%, respectivamente. Pelos resultados obtidos verificou-se que a degradabilidade da matriz foi inversamente ao aumento na concentração do agente reticulante. O grupo de amostras que ficaram expostas ao meio PBS contendo lisozima seguiram a tendência, no entanto, ocorreu um incremento na faixa de 3,6 a 4,6% do total de massa degradada comparado aos filmes que ficaram imersos em meio PBS sem a enzima.

Foi possível verificar as características das superfícies das amostras contendo somente quitosana variando-se a concentração de glutaraldeído, tais como porosidade, rugosidade e irregularidades em cada amostra por imagens obtidas por MEV, representadas na FIG. 20.

FIGURA 20 - Imagens de MEV das superfícies dos filmes de quitosana, com o aumento em 2000x. (a) Quitosana com diclofenaco sódico (Q_{DS}); (b) Q_{DS} com glutaraldeído 5 mmol mL⁻¹; (c) Q_{DS} com glutaraldeído 100 mmol mL⁻¹; (d) Q_{DS} com glutaraldeído 300 mmol mL⁻¹.

Observou-se que na ausência de glutaraldeído não houve formação dos poros, levando a uma estrutura mais densa (FIG. 20a). O aumento na concentração

de glutaraldeído promoveu o aumento da porosidade das matrizes (FIG. 20b e 20c). Os poros formaram uma espécie de arcabouço, em que é possível visualizar a presença de cristais de diclofenaco sódico. Entretanto, na concentração de glutaraldeído 300 mmol mL⁻¹ houve a formação de uma estrutura rugosa, com poros disformes e paredes espessas e densas (FIG. 20d).

Na TAB. 6 são mostrados os valores para o grau de intumescimento e fração gel das amostras A1 a A6 em PBS e A1L e A6L em PBS contendo lisozima, cujas formulações foram apresentadas na TAB. 2.

TABELA 6 - Fração gel e índice de intumescimento das formulações a base de quitosana, extração em PBS pH 7,4 durante 72 horas, à temperatura 36 ± 2 °C sem e com lisozima.

Formulações	Fração gel (%)	Valor do grau de
		Intumescimento em equilíbrio (%)
A1	78	490
A2	74	243
A3	94	240
A4	81	310
A5	64	269
A6	48	295
A1L	88	533
A2L	81	246
A3L	93	243
A4L	80	456
A5L	65	563
A6L	63	289

A amostra A3 foi a que apresentou menor intumescimento e o maior valor de fração gel tanto em PBS, quanto em PBS suplementado com lisozima, amostra A3L.

Os parâmetros associados à cinética de absorção de vapor de água são importantes no entendimento dos mecanismos de difusão associados ao dispositivo

em análise. O estudo desses parâmetros ajuda a compreender a influência das proporções poliméricas, da adição de excipientes e do princípio ativo em uma determinada formulação. As amostras apresentadas na TAB. 2 foram consideradas filmes finos por causa de suas espessuras inferiores a 0,3 mm. As curvas mostradas na FIG. 21 representam o perfil da cinética de absorção de vapor de água das amostras apresentadas na TAB. 2, sem e com a adição de diclofenaco sódico em suas formulações, denominadas A1 a A6 e A1_{DS} a A6_{DS}, cujos perfis são apresentados nas FIG. 21(a) e 21(b), respectivamente.

FIGURA 21 - Perfil cinético de difusão de vapor de água através de filmes a base de CS/PVP em UR (%) 70%. (a) sem fármaco; (b) com fármaco.

O ajuste linear dos perfis cinéticos de absorção de vapor de água pelos filmes foi feito aplicando a função logarítmica nos dados experimentais, e estão representadas nas FIG. 22(a) e 23(a) para as matrizes sem o com diclofenaco sódico, respectivamente. Em ambos os casos, as curvas foram ajustadas aos primeiros 60% do total de massa de vapor absorvido, excluindo os primeiros 15% do evento, correspondente ao estágio inicial, em que o sistema encontrava-se em desequilíbrio. As curvas e suas respectivas barras de erro são mostradas nas FIG. 22(b) e 23(b).

FIGURA 22 - Obtenção dos parâmetros cinéticos n e k dos filmes sem fármaco. (a) Linearização das curvas de cinética de difusão; (b) Retas ajustadas aos primeiros 60% da massa de vapor de água absorvido por cada filme.

FIGURA 23 - Obtenção dos parâmetros cinéticos n e k dos filmes com fármaco. (a) Linearização das curvas de cinética de difusão; (b) Retas ajustadas aos primeiros 60% da massa de vapor de água absorvido por cada filme.

O coeficiente de difusão D das matrizes foi calculado utilizando as Equações 6 e 7, descritas na seção 2.9.2, em que as curvas de $(M_t - M_0)/M_{eq}$ versus $\sqrt{t}/A$, são apresentadas nas FIG. 24(a) e 25(a). As retas e suas respectivas barras de erro são mostradas nas FIG. 24(b) e 25(b).

FIGURA 24 - Curvas para determinação do coeficiente de difusão com base na área dos filmes a base de CS/PVP sem fármaco. (a) Tempo total do ensaio; (b) Retas ajustadas aos primeiros 60% da massa de vapor de água absorvido por cada filme.

FIGURA 25 - Curvas para determinação do coeficiente de difusão com base na área dos filmes a base de CS/PVP com fármaco. (a) Tempo total do ensaio; (b) Retas ajustadas aos primeiros 60% da massa de vapor de água absorvido por cada filme.

Os valores de n , k , e D , e seus respectivos coeficientes de correlação para cada amostra, bem como o percentual de massa de vapor de água absorvido das mesmas, sem e com fármaco, são mostrados nas TAB. 7 e 8, respectivamente.

TABELA 7 - Parâmetros obtidos para a cinética de absorção de vapor de água dos filmes sem fármaco (A1-A6).

Amostra	n	$k (10^{-4} \text{ s}^{-n})$	$R^2_{(n,k)}$	$D (10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1})$	$R^2_{(D)}$	% vapor de água absorvido ($\overline{UR}=70\%$, $\overline{T}=36,5 \text{ }^\circ\text{C}$)
A 1	0,77	1,49	0,9978	0,08	0,9891	11,0
A 2	0,85	9,95	0,9825	2,06	0,9970	21,1
A 3	0,92	8,07	0,9965	3,15	0,9958	24,1
A 4	0,82	6,45	0,9914	1,50	0,9951	22,2
A 5	0,74	12,3	0,9885	1,57	0,9974	26,7
A 6	0,84	3,13	0,9971	0,31	0,9964	19,3

TABELA 8 - Parâmetros obtidos para a cinética de absorção de vapor de água dos filmes contendo o fármaco (A1_{DS}-A6_{DS}).

Amostra	n	$k (10^{-4} \text{ s}^{-n})$	$R^2_{(n,k)}$	$D (10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1})$	$R^2_{(D)}$	% vapor de água absorvido ($\overline{UR}=70\%$, $\overline{T}=36,5 \text{ }^\circ\text{C}$)
A 1 _{DS}	0,61	2,60	0,9967	1,39	0,9995	36,4
A 2 _{DS}	0,73	1,73	0,9902	3,40	0,9987	34,5
A 3 _{DS}	0,64	1,10	0,9943	0,17	0,9884	13,1
A 4 _{DS}	0,82	0,97	0,9847	1,61	0,9980	31,7
A 5 _{DS}	0,50	5,95	0,9944	1,04	0,9946	40,7
A 6 _{DS}	0,77	0,28	0,9922	0,14	0,9993	16,8

O método empregado para obtenção dos dados mostrou-se eficaz, apresentando correlação linear dos resultados, mediante os valores de R^2 . No entanto, outras variáveis, tais como tamanho de poro e de partícula, tipo de interação entre o fármaco ou molécula e a matriz, e a solubilidade de ambos no meio a ser aplicado devem ser consideradas em um estudo mais aprofundado.

De acordo com os valores obtidos para o expoente difusional n para as formulações nas quais variou-se somente a proporção de quitosana e PVP (A1, A2 e A3), o mecanismo de difusão de vapores de água foi do tipo anômalo ($0,5 < n < 1,0$). O mesmo comportamento foi observado para as amostras A1_{DS}, A2_{DS} e A3_{DS}, porém houve um decréscimo nos valores de n . Foi observada uma diminuição nos valores de k com a adição do diclofenaco sódico à estrutura do filme.

Essas variações refletiram diretamente nos valores obtidos para o coeficiente de difusão de vapores de água (D). Percebeu-se que nos filmes sem DS a variação nos valores de D é diretamente proporcional ao aumento na proporção de quitosana. Entretanto, o mesmo comportamento não foi observado para a difusão de vapores nos filmes contendo DS em suas formulações. Houve acréscimo nos valores de D das amostras A1_{DS} e A2_{DS}, ao contrário da amostra A3. A presença do fármaco influenciou nos valores percentuais de vapor de água absorvido pelos filmes, conforme mostrado nas TAB. 7 e 8.

Nas formulações contendo ágar e PEG-400 (A4, A5 e A6), também foram observadas alterações consideráveis nos valores de n e k para as amostras sem e com o fármaco quando comparadas aos seus respectivos controles (A2). Nos filmes sem o diclofenaco sódico o mecanismo de difusão foi do tipo anômalo para ambos, não havendo variações significativas nos valores de n encontrados para as amostras A4 e A6, enquanto para a amostra A5 observou-se um decréscimo desse valor. Houve um decréscimo nos valores de D das amostras contendo os excipientes quando comparados ao valor da amostra controle. Com relação ao percentual de vapor de água absorvido, houve um acréscimo no valor para as amostras A4 e A5 em virtude do potencial hidrofílico do ágar e do PEG, mesmo com a diminuição no valor de D . Porém, o decréscimo observado para amostra A6, na qual continha os dois

excipientes, poderia ser justificado pelo aumento na densidade do filme, dificultando o transporte das moléculas de vapor de água.

Para as amostras contendo o fármaco, ocorreu um acréscimo nos valores de n das amostras A4_{DS} e A6_{DS}, quando comparados ao valor da amostra controle A2, sendo o mecanismo de difusão do vapor do tipo anômalo para ambas; foi observada uma diminuição desse valor para a amostra A5_{DS}, em que o seu mecanismo foi do tipo Fickiano, como mostrado na TAB. 8. Diante dos valores encontrados para k e D , as amostras com o DS seguiram a mesma tendência das amostras sem o fármaco.

Com relação ao percentual de vapor de água absorvido, houve acréscimo nos valores encontrados nos filmes contendo o fármaco, comparados aos das amostras sem o fármaco, exceto para o par A6 e A6_{DS}. Esse incremento pode estar relacionado ao potencial osmótico do diclofenaco sódico. Para a amostra A6, o decréscimo observado para a A6_{DS} poderia estar relacionado ao aumento da sua densidade, contendo além dos dois excipientes, o diclofenaco sódico em sua formulação.

A curva de calibração de diclofenaco sódico em tampão fosfato pH 7,4, está representada na FIG. 26. As medidas foram feitas em espectrofotômetro UV, no comprimento de onda de 275 nm. O gráfico foi construído tomando-se por base as absorbâncias em função das concentrações conhecidas de diclofenaco sódico. A curva de calibração do diclofenaco apresentou boa linearidade.

FIGURA 26 - Curva de calibração do diclofenaco sódico em solução tampão PBS 0,05 M, pH: 7,4.

As curvas de liberação de diclofenaco sódico das amostras testadas em meio tamponado sem e com lisozima (A1_{DS}-A6_{DS} e A1_{LDS}-A6_{LDS}) são apresentadas nas FIG. 27(a) e 28(a), respectivamente. Para o tratamento dos dados, foi considerado somente as primeiras três horas do evento, no qual a liberação se mostrou crescente para todas as amostras até que o sistema atingisse o equilíbrio, como representado nas FIG. 27(b) e 28(b).

a

b

FIGURA 27 - Perfil da cinética de liberação do diclofenaco sódico (DS) em PBS (a) Tempo total; (b) 180 minutos.

FIGURA 28 - Perfil da cinética de liberação do DS em tampão fosfato e presença de lisozima(a) Tempo total; (b) 180 minutos.

O mesmo tratamento feito para determinar os parâmetros cinéticos dos filmes quanto a difusão de vapor de água foi utilizado para determinar os parâmetros cinéticos de difusão do DS em tampão fosfato através do sistema quitosana/PVP.

As curvas apresentadas nas FIG. 29 e 30 são referentes a determinação dos parâmetros cinéticos de liberação e do coeficiente de difusão em PBS, assim como as curvas apresentadas nas FIG. 31 e 32 são referentes ao meio contendo lisozima.

FIGURA 29 - Linearização do perfil de difusão de DS em sistemas matriciais a base de CS/PVP em PBS/lisozima para obtenção dos parâmetros n e k . (a) Linearização das curvas

de cinética de difusão; (b) Retas ajustadas aos primeiros 60% da fração de DS liberado em 180 minutos.

a

b

FIGURA 30 – Determinação do coeficiente de difusão do DS em PBS. (a) Tempo total -180 minutos; (b) retas ajustadas aos primeiros 60% da fração de DS liberado.

FIGURA 31 - Linearização do perfil de difusão de DS em sistemas matriciais a base de CS/PVP em PBS/lisozima para obtenção dos parâmetros n e k . (a) Linearização das curvas

de cinética de difusão; (b) Retas ajustadas aos primeiros 60% da fração de DS liberado em 180 minutos.

a

b

FIGURA 32 - Coeficiente de difusão de liberação do DS em PBS/lisozima. (a) Tempo total - 180 minutos; (b) retas ajustadas aos primeiros 60% da fração de DS liberado.

Os valores de n , k , e D , e seus respectivos coeficientes de correlação para cada amostra, bem como o percentual de massa de DS liberado em PBS, sem e com lisozima, são mostrados nas TAB. 9 e 10, respectivamente.

TABELA 9 - Parâmetros obtidos para a cinética de liberação de diclofenaco sódico (DS) dos filmes A1-A6, em PBS, 0,05 M, pH: 7,4, à temperatura de 36 ± 1 °C.

Amostra	n	k (10^{-2} s^{-n})	$R^2_{(n,k)}$	D ($10^{-3} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)	$R^2_{(D)}$	% Total de DS liberado
A1	0,52	9,20	0,9086	1,16	0,9013	74,4
A2	0,86	2,01	0,9010	3,39	0,9148	81,2
A3	0,50	10,55	0,9645	1,07	0,9603	90,4
A4	1,01	0,97	0,9296	3,73	0,9318	51,5
A5	0,40	16,25	0,9991	1,02	0,9985	92,4
A6	0,92	1,41	0,9928	1,92	0,9874	65,3

TABELA 10 - Parâmetros obtidos para a cinética de liberação de diclofenaco sódico (DS) dos filmes A1-A6, em PBS 0,05 M, pH: 7,4 com lisozima 0,1 mg mL⁻¹, à temperatura de 36 ± 1 °C.

Amostra	n	k (10^{-2} s^{-n})	$R^2_{(n,k)}$	D ($10^{-3} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)	$R^2_{(D)}$	% Total de DS liberado
A1L	0,90	2,07	0,9009	2,70	0,8628	89,4
A2L	0,46	0,14	0,8680	1,85	0,8336	81,3
A3L	0,17	0,46	0,8844	0,12	0,8662	96,8
A4L	0,59	5,04	0,8353	0,53	0,9111	83,7
A5L	1,09	0,06	0,9973	1,87	0,9933	70,4
A6L	0,68	2,99	0,9929	0,74	0,9599	76,6

Os perfis obtidos no teste de liberação *in vitro* para os dispositivos na forma de filmes finos mostraram que o sistema atingiu o equilíbrio nas primeiras 3 horas do ensaio, independente da presença de lisozima, como mostrado pelos perfis de liberação nas FIG. 27 e 28.

A composição das formulações influenciou no percentual total de diclofenaco sódico liberado. Nas formulações que não continham ágar e PEG (A1_{DS}, A2_{DS} e A3_{DS}), foi observado o aumento no percentual total de DS liberado conforme o aumento na proporção de quitosana em relação ao PVP (A3_{DS} > A2_{DS} > A1_{DS}), chegando aproximadamente 90% na amostra A3_{DS}. Na presença de lisozima ocorreu um aumento significativo do percentual de DS liberado, 15% e 6% para as amostras A1_{LDS} e A3_{LDS}, respectivamente. Não foi observado aumento significativo para amostra A2_{LDS}.

Nas amostras que continham ágar e PEG (A4_{DS}, A5_{DS} e A6_{DS}), observou-se o decréscimo de aproximadamente 30% no percentual total de DS liberado na amostra que continha ágar (A4_{DS}) e 15% na amostra com ágar e PEG, comparado com a amostra controle (A2_{DS}). Já na amostra em que somente o PEG foi adicionado (A5_{DS}), observou-se incremento de 11% no total de fármaco liberado. No caso em que a liberação foi realizada em PBS com suplemento de lisozima (A4_{LDS}, A5_{LDS} e A6_{LDS}) observou-se uma inversão desse quadro. Na amostra com ágar (A4_{LDS}) ocorreu um aumento de 2%, comparado com amostra controle (A2_{LDS}). Nas formulações contendo PEG (A5_{LDS}) e ágar e PEG (A6_{LDS}), observou-se um decréscimo de 11% e 5%, respectivamente.

Com base nos parâmetros associados à cinética de liberação de diclofenaco sódico, observou-se diferentes comportamentos com relação ao mecanismo de difusão determinado pelo parâmetro *n*. As amostras A1_{DS} e A3_{DS} apresentaram difusão do tipo Fickiana; A2_{DS} e A6_{DS} a difusão foi do tipo anômala; A4_{DS} não Fickiana e a A5_{DS} apresentou um valor próximo ao do mecanismo de difusão Fickiana. Na presença de lisozima, os filmes apresentaram diferentes mecanismos de difusão quando comparados à liberação realizada em PBS sem a enzima. As amostras A1_{LDS}, A4_{LDS} e A6_{LDS} apresentaram difusão anômala; A5_{LDS} Super transporte (Caso-

II) e A2L_{DS} e A3L_{DS} tiveram comportamento semelhante ao da amostra A5_{DS} descrito anteriormente.

O parâmetro k , que está relacionado com a estrutura do material, não apresentou correlação com outros parâmetros e foram observadas diferenças nos seus valores em relação a presença de lisozima, o que provavelmente está relacionado aos desvios da linearidade.

O coeficiente de difusão D está relacionado com a taxa de DS liberado, ou seja, com a velocidade na qual a liberação ocorre, que neste caso foi avaliada em relação a área dos dispositivos, tendo em vista que a espessura é desconsiderada quando se trata de filmes finos. Foram obtidos diferentes valores de D em relação ao meio em que a liberação foi realizada (PBS sem e com lisozima). No caso de sistemas de liberação controlada, as formulações A3_{DS} e A5_{DS} apresentaram-se como boas candidatas para futuros estudos *in vivo*, por causa dos baixos valores de D e alto percentual total de DS liberado ($\geq 90\%$) em PBS sem lisozima. No caso em que a liberação ocorreu em meio suplementado com a enzima, os dispositivos que se mostraram melhores candidatos foram as amostras A2L_{DS}, A3L_{DS} e A4L_{DS}, onde os valores de D encontrados foram baixos e os percentuais totais de DS liberado foram de aproximadamente 81, 96 e 83%, respectivamente.

As amostras imersas em PBS suplementado com lisozima (A1L_{DS}-A6L_{DS}) durante o teste de liberação não apresentaram perda de massa significativa quando comparadas às amostras imersas em PBS sem a enzima (A1_{DS} a A6_{DS}). No entanto, houve aumento do percentual de diclofenaco sódico liberado na presença de lisozima, em que o tempo total de exposição em ambos os meios foi de 48 horas.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Pelos resultados obtidos no presente estudo verificou-se a influência da composição na estrutura, nos parâmetros cinéticos e nos perfis de liberação das matrizes a base de quitosana.

A determinação do $\overline{GD}$ é de grande importância na reticulação da quitosana, pois é o grupo amino disponível que possibilita as ligações entre as cadeias do biopolímero e das moléculas de agente reticulante.

No teste de biodegradação *in vitro*, houve um incremento no percentual de massa degradada das matrizes que permaneceram em meio suplementado com lisozima, o que corrobora com a biodegradabilidade das matrizes poliméricas. No entanto a toxicidade dos fragmentos degradados deve ser levada em consideração de acordo com aplicação final do dispositivo.

No teste de citotoxicidade realizado, 13 das 16 formulações obtiveram aprovação, ou seja, não causam prejuízos em potencial às células de mamíferos no teste *in vitro*, uma vez que as formulações aprovadas no teste apresentaram viabilidade celular acima de 100%. Com base nesses resultados, os estudos podem evoluir para ensaios *in vivo*.

Com base nas imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura, avaliou-se que a concentração de glutaraldeído influencia na estrutura das amostras.

A amostra A3 foi a que apresentou menor intumescimento e, conseqüentemente, o maior valor de fração gel tanto em PBS, quanto em PBS suplementado com lisozima (A3L). Essas características são interessantes, uma vez que sistemas de liberação controlada de fármacos devem permanecer sem alterações significativas em seu volume de forma a evitar desconforto, lesões, toxicidade e aumento da pressão no caso de implantes.

A modelagem matemática utilizada forneceu informações importantes a respeito do mecanismo de difusão de vapor de água e da estrutura das matrizes poliméricas, por meio dos parâmetros cinéticos n e k e do coeficiente de difusão, D , determinados utilizando dispositivos planares.

Considerando os resultados de liberação de diclofenaco sódico, as blendas de quitosana-PVP desenvolvidas no presente estudo apresentaram características interessantes para aplicações em sistemas de liberação controlada de fármacos. Dentre as formulações estudadas, a amostra A3DS foi a que apresentou o melhor perfil de liberação de diclofenaco sódico por causa do baixo valor de D e do alto percentual de DS liberado, tanto em PBS como em PBS suplementado com lisozima.

As formulações a base de quitosana desenvolvidas e testadas no presente trabalho apresentaram potencial aplicação como sistemas de liberação controlada de fármacos, o que permite testes futuros quanto ao uso final, como por exemplo: uso tópico, oral, ginecológico e implantes, desde que sejam feitos os ajustes necessários, como estudos quanto à forma, tamanho, tipo de interação entre os componentes, quantidade e a natureza do fármaco empregado.

7 BIBLIOGRAFIA

ACOSTA, N.; JIMÉNEZ, C.; BORAU, V.; HERAS, A. Extraction and characterization of chitin from crustaceans. **Biomass and Bioenergy**, v. 5, n. 2, p. 145-153, 1993.

AMSDEN, B. Solute Diffusion within Hydrogels. Mechanisms and Models. **Macromolecules**, v. 31, p. 8382-8395, 1998.

ARGAW, K. P. P. Recent advances in small molecule drug delivery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, n. 4, p. 347–351, 2005.

ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de Química Questionando a Vida Moderna e o Meio Ambiente**. Bookman, p. 235-267, 2006.

AZAB, A. K.; KLEINSTERN, J.; DOVINER, V.; ORKIN, B.; SREBNIK, M.; NISSAN, A.; RUBINSTEIN, A. Prevention of tumor recurrence and distant metastasis formation in a breast cancer mouse model by biodegradable implant of 131I-norcholesterol. **Journal of Controlled Release**, v. 13, p. 116-122, 2007.

BENOITA, D.S.C.R.; COLLINS, S. D.; ANSETH, K. S. Synthesis and characterization of a fluvastatin-releasing hydrogel delivery system to modulate hMSC differentiation and function for bone regeneration. **Biomaterials**, v. 27, p. 6102–6110. 2006.

BERGER, J. M.; MAYER, J.; FELT, O. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 35-52, 2004.

BERGER, J. M. R.; MAYER, J.; FELT, O. N. P.; GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 19-34, 2004.

BERTHA, G.; DAUTZENBERGB, H.; PETER, M. G. Physico-chemical characterization of chitosans varying in degree of acetylation. **Carbohydrate Polymers**, v. 36, p. 205-216, 1998.

BHATTARAIA, N.; RAMAY, H. R.; GUNN, J.; MATSEN, F. A., ZHANG, M. PEG-grafted chitosan as an injectable thermosensitive hydrogel for sustained protein release. **Journal of Controlled Release**, v. 103, p. 609-624, 2005.

BORTOLIN, A.; AOUADA, F. A.; LONGO, E.; MATTOSO, L. H. Investigação do Processo de Absorção de Água de Hidrogéis de Polissacarídeo: Efeito da Carga Iônica, Presença de Sais, Concentrações de Monômero e Polissacarídeo. **Polímeros**, v. 22, n. 4, p. 311-317, 2012.

BRANT, Antônio J. C. ***Preparação e caracterização de hidrogéis a partir de misturas de soluções de quitosana e poli(N-vinil-2-pirrolidona)***. 2008. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP, São Paulo. 170 p. Disponível em: <<http://teses.usp.br>> Acesso em: 13 janeiro 2013.

BRUGNEROTTO, J.; LIZARDI, J.; GOYCOOLEA, F.M.; ARGUÈELLES-MONAL, W.; DESBRIÈRES, J.; RINAUDO, M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**, v. 42, n. 8, p. 3569-3580, 2001.

CALLISTER, W. D. **Materials science and engineering: an introduction**. John Wiley & Sons, p. 242-243, 1991.

CHEN, S.; WU, Y.; MI, F.; LIN, Y.; YU, L.; SUNG, H. A novel pH-sensitive hydrogel composed of N,O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 96, p. 285-300, 2004.

CHRISTOPHER H.; SCHILLING, P. T. Preliminary studies on converting agricultural waste into biodegradable plastics, part I: corn distillers' dry grain. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 12, n. 4, p. 257-264, 2004.

CHUN, C.; LEE, S.; KIM, S.; YANG, H.; SOO-CHANG, S. Thermosensitive poly (organophosphazene)-paclitaxel conjugate gels. **Biomaterials**, v. 30, p. 2349-2360, 2009.

CIAPETTI, G. G. D. Application of a combination of neutral red and starch black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. **Biomaterials**, v. 17, n. 13, p. 1259-1264, 1996.

CLEUBER CARVALHO. Análise Química II. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAA2G0AB/analise-quimica-ii?part=10>> Acesso em: 18 julho 2014.

CRANCK, J. **The Mathematics of Diffusion**. Oxford: Oxford University Press, p. 1-68, 1975.

DAOUD-MAHAMMED, S. J. L.; GROSSIORD, T. B.; BERGUA, T.; AMIEL, C.; COUVREUR, P.; GREF, R. Self-assembling cyclodextrin based hydrogels for the sustained delivery of hydrophobic drugs. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 86A, p. 736-748, 2008.

GALESKA, I.; KIM, T. K.; PATIL, S. D.; BHARDWAJ, U.; CHATTTOPADHYAY, D.; PAPADIMITRAKOPOULOS, F.; BURGESS, D. J. Controlled release of dexamethasone from PLGA microspheres embedded within polyacid-containing PVA hydrogels. **The AAPS Journal**, v. 7, n. 1, p. 231-240, 2005.

GAMZAZADE, A.; NASIBOV, S.; ROGOZHIN, S. Study of lipoprotein sorption by same sulfoderivatives of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 34, n. 4, p. 381-384, 1998.

GUPTA, A.; DWIVEDY, A.; KESHRI, G.; SHARMA, R.; BALAPURE, A. K.; SINGH, M. M.; RAY, A. S. Rapid synthesis of 4-benzylidene and 4-[bis-(4-methoxyphenyl)-methylene-2-substituted phenyl-benzopyrans as potential selective estrogen receptor modulators (SERMs) using McMurry coupling reaction. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 23, p.6006-6012, 2006.

GUPTA, P.; VERMANI, K.; GARG, S. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. **Drug Discovery Today**, v. 7, n.10, p.569-579, 2002.

HARK GROUP. Polyvinylpyrrolidone (PVP) for pharmaceutical applications. Disponível em: <<http://www.harke.com/en/products/synthetic-polymers/polyvinylpyrrolidone-pvp-for-pharmaceutical-applications.html>>. Acesso em: 30 junho 2014.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. LTC, p. 82-92, 2005.

HOARE, T. R.; KOHANE, D. S. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. **Polymer**, v. 49, p. 1993-2007, 2008.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, p. 3-12, 2002.

HOFFMAN, A. S. The origins and evolution of “controlled” drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v.132, p. 153-163, 2008.

HOVGAARD, L.; BRONDSTED, H. Current Applications of Polysaccharides in colon targeting. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 13, p. 185-223, 1996.

HUANG, X.; BRAZEL, C. S. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 73, p. 121–136, 2001.

IKINCI, G.; SENEL, S.; AKINCIBAY, H.; KAS, S.; ERCIS, S.; WILSON, C. H. Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 235, p. 121-127, 2002.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Biological Evaluation of Medical Devices**. Part 5: Tests for Cytotoxicity: in vitro methods. 1992. (ISO 11933-5).

JACOBS, I.C.; MASON, N. S. Polymer delivery systems concepts in Polymeric delivery systems: properties and applications. **American Chemical Society**, v. 520, p. 1-17, 2009.

JEONG, B.; BAE, Y. H.; KIM, S. W. Drug release from biodegradable injectable thermosensitive hydrogel of PEG–PLGA–PEG triblock copolymers. **Journal of Controlled Release**, v. 63, p. 155–163, 2000.

JOERG, K.; TESSMAR, A. M. Matrices and scaffolds for protein delivery in tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 274–291, 2007.

JOGANI, V.; JINTURKAR, K., T. V.; MISRA, A. A. Recent Patents Review on Intranasal Administration for CNS Drug Delivery. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, p. 25-40, 2008.

KHEMIS. Espectro Eletromagnético. Disponível em:
<https://pt.wikipedia.org/wiki/Espectro_eletromagn%C3%A9tico#/media/File:Espectro_Eletromagn%C3%A9tico.png, 01/2015>. Acesso em: 28 dezembro 2014.

KHOR, E.; LIM, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**, v. 24, p. 2339–2349, 2003.

KIM, S. W.; BAE, Y. H.; OKANO, T. Hydrogels: swelling, drug loading, and release. **Pharmaceutical Research**, v. 9, p. 283-290, 1992.

KORSMEYER, R. W.; GURNY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; PEPPAS, N. A. Mechanisms of solute release from porous. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 15, p. 25-35, 1983.

KUMAR, M. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, p. 1-27, 2000.

KUMAR, M. N. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.3, n. 2, p. 234-258, 2000.

KUMAR, M. N.; MUZZARELLI, R. A.; MUZZARELLI, C.; SASHIWA, H.; DOMB, A. J. Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. **Chemical Reviews**, v. 104, p. 6017–6084, 2004.

KUMAR, M.; KUMAR, N. Polymeric controlled drug delivery systems: perspectives issues and opportunities. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 27, n. 1, p. 1-30, 2001.

LANGER, D. S. Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering. **Pediatric Research**, v. 63, p. 487-491, 2008.

LANGER, R.; PEPPAS, N. Advances in biomaterials, drug delivery, and bionanotechnology. **American Institute of Chemical Engineers Journal**, v. 49, n. 12, p. 2990-3006, 2003.

LAURIENZO, P. Marine Polysaccharides in Pharmaceutical Applications: An Overview. **Marine Drugs**, v. 8, p. 2435-2465, 2010.

LIN, C. C.; METTERS, A. T. Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1379–1408, 2008.

LIN, C. C.; ANSETH, A. K. PEG Hydrogels for the Controlled Release of Biomolecules in Regenerative Medicine. **Pharmaceutical Research**, v. 26, p. 631-643, 2008.

LUTOLF, M. P.; HUBBELL, J. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. **Nature Biotechnology**, v. 23, p. 47-55, 2005.

MARQUES, A.; REIS, R.; HUNT, J. The biocompatibility of novel starch-based polymers and composites: in vitro studies. **Biomaterials**, v. 23, p. 1471–1478, 2002.

MCCRUM, N. G.; BUCKLEY, C. P.; BUCKNALL, C. B. **Principles of polymer engineering**. Oxford University Press. p. 1. ISBN 0-19-856526-7, 1997.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F. GIORDANO R. L. C. Aplicação da quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

METZ, Sybrandus J. **Water vapor and gas transport through polymeric membranes**. 2003. Tese (Doutorado) - Universiteit Twente, Netherlands. 133 p. Disponível em: < <http://doc.utwente.nl/40766/>> Acesso em: 01 julho 2013.

MI-SOOK, K; CHOI, Y.J.; NOH, I.; TAE, G. Synthesis and characterization of in situ chitosan-based hydrogel via grafting of carboxyethyl acrylate. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 83A, p. 674-682, 2007.

MUZZARELLI, R. A. A. **Chitin**. Oxford: Pergamon Press, 1977.

MUZZARELLI, R. A. A. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, p. 167-182, 2009.

NADÈGE BOUCARD, C. V. New aspects of the formation of physical hydrogels of chitosan in a hydroalcoholic medium. **Biomacromolecules**, v.6, p. 3227-3237, 2005.

NELSON, D.; COX, M. **Lehninger: Princípios de bioquímica**. São Paulo: Saraiva, p. 220-223, 2014.

OBARA, K.; ISHIHARA, M.; OZEKI, Y. T. I.; HAYASHI, T.; NAKAMURA, S.; MAEHARA, T. Controlled release of paclitaxel from photocrosslinked chitosan hydrogels and its subsequent effect on subcutaneous tumor growth in mice. **Journal of Controlled Release**, v. 110, p. 79- 89, 2005.

PALMA, M. B. S.; CORAT, E. J.; SOARES, C. P. **Avaliação da citotocidade in vitro de superfícies recobertas por nanotubos de carbono de parede múltipla**. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, Jul. 2008.

PARK, C. J.; CLARK, S. G.; JAMISON, R. D.; JOHNSON, A. J. Accelerated wound closure of pressure ulcers in aged mice by chitosan scaffolds with and without bFGF. **Acta Biomaterialia**, v. 5, p. 1926–1936, 2009.

PEPPAS, N. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 27-46, 2002.

PEPPAS, N.; BURES, P.; LEOBANDUNG, W.; ICHIKAWA, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 27-46, 2000.

PEPPAS, N. A.; HILT, J. Z.; KHADEMHOSEINI, A.; LANGER, R. Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular Principles to Bionanotechnology. **Advanced Materials**, v.18, n.11 p. 1345–1360, 2006.

PETERSEN, Latricha K. **Combinatorial design and development of biomaterials for use as drug delivery devices and immune adjuvants**. 2011.Tese (Doutorado) - Iowa State University, Iowa. 320 p. Disponível em: <<http://lib.dr.iastate.edu/etd/11988/>> Acesso em: 30 junho 2013.

PHILIPPOVA, O. E.; VOLKOV, E. V.; SITNKOVA, N. L.; KHOKHLOV A.R.; DESBRIERES, J.; RINAUDO, M. Two types of hydrophobic aggregates in aqueous solutions of chitosan and its hydrophobic derivative. **Biomacromolecules**, v. 2; n.2, p. 483-490, 2001.

PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. Polymers in drug delivery, **Current Opinion in Chemical Biology**. v. 5, p. 447-451, 2001.

QIU, Y.; PARK, K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 53, p. 321-339, 2001.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v. 19, p. 268-277, 1996.

RANG, H.; DALE, M. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 318-333, 2001.

RAO, D. T.; PANDURANGA, A. K. Release of nifedipine through crosslinked chitosan membranes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 96, p. 33-39, 1993.

RAO, D. T.; PANDURANGA, A. K. Development and in vitro evaluation of chitosan-based transdermal drug delivery systems for the controlled delivery of propranolol hydrochloride. **Biomaterials**, v. 16, p. 145-148, 1995.

REIS, R. M. Processing and in-vitro degradation of starch/EVOH thermoplastic blends. **Polymer International**, v. 43, p. 347-53, 1997.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. **Journal of Controlled Release**, v. 5, n. 1, p. 23-36, 1987.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**, v. 5, n. 1, p. 37-42, 1987.

RODRIGUES, A.; EMEJE, M. Recent applications of starch derivatives in nanodrug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 987- 994, 2012.

ROGERO, S. O.; LUGÃO A. B; IKEDA, T, I.; CRUZ, A, S. Teste *in vitro* de citotocidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**. v. 6, p. 317-320, 2003.

SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J.; JEON, Y. Food applications of chitin and chitosans. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 37, 1999.

SHEN, E.-C.; WANG, C.; FU, E.; CHIANG, C.-Y.; CHEN, T.-T.; NIEH, S. Tetracycline release from tripolyphosphate-chitosan cross-linked sponge a preliminary in vitro study. **Journal of periodontal research**, v. 43, p. 642-648, 2008.

SHU, X.; ZHU, K. Controlled drug release properties of ionically cross-linked chitosan beads: the influence of anion structure. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 233, p. 217-225, 2002.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropylmethylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 163-174, 2012.