

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**INFLUÊNCIA DO TIPO DE ESTRATÉGIA DE REFORÇO DAS
PROPRIEDADES MECÂNICAS NAS CARACTERÍSTICAS DE MEMBRANAS
DE QUITOSANA E ALGINATO PROJETADAS PARA O RECOBRIMENTO
DE LESÕES DE PELE**

Cecilia Zorzi Bueno

Autora

Prof. Dra. Ângela Maria Moraes

Orientadora

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

Campinas – São Paulo

Maio de 2010

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

B862i Bueno, Cecilia Zorzi
Influência do tipo de estratégia de reforço das propriedades mecânicas nas características de membranas de quitosana e alginato projetadas para o recobrimento de lesões de pele / Cecilia Zorzi Bueno. -- Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadora: Ângela Maria Moraes.
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

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

Título em Inglês: Influence of mechanical reinforcement strategies on the characteristics of chitosan and alginate membranes designed to be used as wound dressings

Palavras-chave em Inglês: Chitosan, Alginates, Membranes (Technology), Wounds and injuries, biomaterials

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

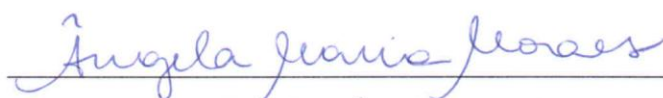
Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Sílvia Helena Prado Bettini, Theo Guenter Kieckbusch

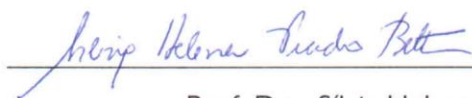
Data da defesa: 07/05/2010

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Cecilia Zorzi Bueno e aprovada em 07 de Maio de 2010 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dra. Ângela Maria Moraes



Prof. Dra. Sílvia Helena Prado Bettini



Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch

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



Profa. Dra. Ângela Maria Moraes

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Ângela Maria Moraes, pela orientação e atenção disponibilizada em todas as etapas do mestrado.

À Dra. Ana Paula Rodrigues, cuja tese de doutorado inspirou este trabalho.

Aos membros da banca, Dra. Sílvia Helena Prado Bettini e Dr. Theo Guenter Kieckbusch pelas sugestões ao trabalho.

Aos meus pais, Maria Inês e Gilberto e à minha irmã Lucia pelo incentivo e pelo apoio.

A todos os colegas de laboratório, principalmente aos que acompanharam o desenvolvimento deste trabalho, Ana Kelly, Christiane, Márcia, Priscila, Walter, Alan, Iara, Igor, Nemailla, e especialmente à Itiara pela grande ajuda.

Aos amigos Tássia, Carlos e Raphael, pela companhia desde os tempos de graduação.

Aos professores Dr. Everson Alves Miranda e Dra. Sônia Maria Alves Bueno, pelo uso das dependências de seus laboratórios.

À professora Dra. Elisabete Maria Saraiva Sanchez, pela realização dos ensaios mecânicos.

À professora Dra. Aline Carvalho da Costa, pelo auxílio com as análises estatísticas.

Aos funcionários da FEQ que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, em especial à Kelly e à Rosa.

À empresa Acecil Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda, pela esterilização das membranas.

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado e à FAPESP e ao FAEPEX/Unicamp, pelo custeio de parte do trabalho.

***“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais volta ao seu tamanho original”***

Albert Einstein

RESUMO

A quitosana e o alginato são polissacarídeos atóxicos e biocompatíveis, além de apresentarem propriedades cicatrizantes. Tais características fazem com que esses compostos sejam muito apropriados para a confecção de curativos para o tratamento de lesões de pele. O foco do presente trabalho foi melhorar as propriedades de membranas de quitosana-alginato, preparadas pela produção controlada de agregados poliméricos. Inicialmente, fez-se um aumento de escala do processo com o objetivo de acelerar a produção das membranas. Nesta etapa foi analisada a influência das condições de operação sobre as propriedades do produto final. Em uma segunda etapa, testou-se a reticulação covalente das membranas com glutaraldeído. Na terceira etapa, foram avaliadas diferentes condições de reticulação iônica com CaCl_2 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, na tentativa de encontrar as concentrações de reticulantes ótimas, que resultassem em membranas com melhores propriedades mecânicas. Foi realizada também a inclusão dos surfatantes biocompatíveis Tween 80, Span 80 e Pluronic F68 na formulação do material, para tentar melhorar a distribuição das cadeias poliméricas e, conseqüentemente, as propriedades mecânicas. O aumento de escala levou a membranas com resistência à tração de 10,97MPa, alongamento na ruptura de 2,80%, absorção de água em 24 h de 5,67g/g e perda de massa em água após 1 semana de 6,84%. A reticulação com glutaraldeído não resultou em membranas satisfatórias, sendo estas muito quebradiças e de coloração amarelo escura. Quanto ao estudo de diferentes condições de reticulação iônica, as membranas referentes às concentrações de CaCl_2 a 0,05M e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,05M, foram as que apresentaram propriedades mais adequadas, sendo sua resistência à tração de 19,43MPa, alongamento na ruptura de 3,17%, absorção de água de 5,28g/g e perda de massa em água de 4,56%. As membranas preparadas na presença de Tween 80 ou Pluronic F68 apresentaram aspecto bastante poroso e seção transversal lamelar, enquanto que o Span 80 não resultou em membranas de aspecto e maleabilidade satisfatórios. Observou-se para as membranas preparadas na presença de Tween 80 e Pluronic F68 resistência à tração de 1,54MPa e 0,98MPa, porcentagem de alongamento na ruptura de 2,06% e 1,96%, capacidade de absorção de água de 13,67g/g e 13,83g/g e perda de massa de 31,38% e 30,47%, respectivamente. As propriedades mecânicas destas membranas, inferiores às esperadas, permitiram verificar que a adição de surfatantes foi benéfica apenas do ponto de vista da distribuição polimérica do sistema. Porém, membranas porosas puderam ser obtidas por meio de um método de baixo custo e inédito na literatura, com potencial de aplicação extensível a outras áreas além da de curativos.

Palavras-chave: *quitosana; alginato; membranas; terapia de lesões; curativos.*

ABSTRACT

Chitosan and alginate are non-toxic and biocompatible polysaccharides, which have healing properties. Such characteristics make these compounds very appropriate for the production of wound dressings. The focus of this work was to improve the properties of chitosan-alginate membranes prepared by the controlled production of polymeric aggregates. Initially, the process was scaled-up, aiming at accelerating membranes production. The influence of operational conditions on the final product properties was analysed. In a second step, the membranes were covalently crosslinked with glutaraldehyde. In a third step, different ionic crosslinking conditions with CaCl_2 and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ were evaluated to find the optimal concentrations of crosslinking solutions, which might lead to more resistant membranes. Another used approach was the inclusion of the biocompatible surfactants, Tween 80, Span 80 and Pluronic F68, in the formulation of the membranes, with the purpose of improving the polymeric chains distribution in the system, which could, consequently, improve the mechanical properties of the membranes. The process scale-up led to membranes with tensile strength of 10.97MPa, elongation at break of 2.80%, water uptake after 24h of 5.67g/g and mass loss in water after 1 week of 6.84%. Crosslinking with glutaraldehyde resulted in very fragile and yellow dark membranes, which were not considered satisfactory. Membranes crosslinked with 0.05M CaCl_2 and 0.05M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ presented better properties than the ones produced in the other conditions, having tensile strength of 19.43MPa, elongation at break of 3.17%, water uptake of 5.28g/g and mass loss in water of 4.56%. The membranes prepared with Tween 80 or Pluronic F68 had a very porous aspect and a lamellar cross-section, while membranes prepared with Span 80 were not considered satisfactory regarding its aspect and malleability. The properties of the membranes prepared with Tween 80 and Pluronic F68 were tensile strength of 1.54MPa and 0.98MPa, elongation at break of 2.06% and 1.96%, water uptake of 13.67g/g and 13.83g/g and mass loss in water of 31.38% and 30.47%, respectively. The mechanical properties of these membranes were inferior to expected, leading to the conclusion that the use of surfactants improved only the polymeric distribution of the system. Despite that, porous membranes were obtained by a low cost and inedit method, having potential applications as wound dressings, as well as in other areas.

Keywords: *chitosan; alginate; membranes; wound healing; wound dressings.*

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
1.1. Objetivos	4
2. REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1. Biopolímeros	6
2.1.1. Quitosana	8
2.1.2. Alginato	12
2.1.3. Complexo de polieletrólitos de quitosana e alginato	15
2.2. A pele humana: estrutura e tipos de lesões	20
2.3. Avanços no desenvolvimento de novos curativos para o tratamento de lesões de pele	21
2.4. Desenvolvimento de curativos à base de quitosana e alginato com reforço nas propriedades mecânicas	23
2.4.1. Adição de agentes reticulantes	26
2.4.1.1. Reticulação iônica	26
2.4.1.2. Reticulação covalente	27
2.4.2. Adição de surfatantes	28
2.4.2.1. Span 80	28
2.4.2.2. Tween 80	29
2.4.2.3. Pluronic F68	30
2.5. Análise conclusiva da literatura consultada	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1. Materiais	33
3.2. Métodos	33
3.2.1. Preparo das membranas visando à ampliação da escala produtiva	34
3.2.2. Estudo de reticulação com glutaraldeído	36
3.2.3. Estudo com diferentes agentes reticulantes iônicos	37
3.2.4. Preparo das membranas na presença de surfatantes	38

3.2.5. Caracterização das membranas	39
3.2.5.1. Aspecto	39
3.2.5.2. Morfologia da superfície e da secção transversal	39
3.2.5.3. Espessura	39
3.2.5.4. Propriedades mecânicas	40
3.2.5.5. Capacidade de absorção de água e de soluções aquosas	41
3.2.5.6. Perda de massa em água e em soluções aquosas.....	41
3.2.5.7. Análise elementar	42
3.2.6. Análise estatística	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1. Comportamento observado no estudo do escalonamento do processo de produção das membranas	44
4.2. Características das membranas reticuladas covalentemente com glutaraldeído	47
4.3. Membranas de quitosana-alginato obtidas através de diferentes condições de reticulação iônica	51
4.3.1. <i>Ensaio preliminar para a verificação da precipitação de CaSO₄</i>	51
4.3.2. <i>Aspecto das membranas e dos agregados poliméricos</i>	53
4.3.3. <i>Análises de microscopia eletrônica de varredura</i>	55
4.3.4. <i>Análise elementar das membranas por EDS</i>	58
4.3.5. <i>Espessura e comportamento das membranas em água</i>	58
4.3.5.1. <i>Espessura das membranas</i>	59
4.3.5.2. <i>Comportamento das membranas em água</i>	62
4.3.6. <i>Propriedades mecânicas das membranas</i>	66
4.3.7. <i>Análise comparativa global dos efeitos sobre as propriedades das membranas avaliadas pelo uso do planejamento experimental</i>	72
4.4. Membranas obtidas na presença dos surfatantes Span 80, Tween 80 e Pluronic F68	73
4.4.1. <i>Aspecto dos agregados poliméricos e das membranas</i>	73
4.4.2. <i>Análises das interações entre os surfatantes e os polissacarídeos quitosana e alginato</i>	75
4.4.3. <i>Caracterização das membranas obtidas na presença de Tween 80 e Pluronic F68</i>	80

4.4.3.1. Características morfológicas.....	80
4.4.3.2. Propriedades mecânicas	82
4.4.3.3. Comportamento das membranas em soluções fisiológicas.....	83
4.4.3.4. Considerações sobre as membranas obtidas na presença de surfatantes	86
4.4.4. Membranas lamelares porosas reticuladas na melhor condição verificada para membranas lamelares	89
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	91
5.1. Conclusões	91
5.2. Sugestões para trabalhos futuros.....	92
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

I. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas ocorreram grandes avanços na compreensão do processo de cicatrização e também foram desenvolvidas novas tecnologias em curativos. No entanto, ainda há muito que ser pesquisado nesse campo. É de conhecimento dos profissionais da saúde e dos pesquisadores da área de curativos que os recursos mais modernos e eficientes são, em sua maioria, importados, possuem alto custo e suas tecnologias são patenteadas por empresas multinacionais. Desta forma, existe a necessidade não só de aperfeiçoar tais recursos, como de torná-los acessíveis a maior número de pessoas. Isso poderia ser alcançado através do desenvolvimento de tecnologias mais simples e baratas, de grande eficiência, que se aproveitem de matérias-primas encontradas em regiões menos desenvolvidas social e economicamente (Mandelbaum *et al.*, 2003 a).

A literatura mostra a crescente busca pelo curativo ideal para o tratamento de variados tipos de feridas. As tendências mostram a diminuição do uso da gaze tradicional e a expansão de novos tipos de materiais com melhores propriedades e maior número de funções. O curativo ideal deve modelar-se à região ferida e ser capaz de manter o seu microambiente úmido, permitindo a drenagem de exsudato e o transporte de ar e vapor d'água. Outros requerimentos incluem caráter atraumático, não-toxicidade, elevado nível de conforto, manutenção simples e número mínimo de trocas necessárias. Espera-se também que os curativos modernos tenham efeito cicatrizante, por esta razão, muitos deles contêm substâncias biologicamente ativas ou são constituídos de materiais com atividade biológica, como proteoglicanos, proteínas e polissacarídeos (Yudanov e Reshetov, 2006; Paul e Sharma, 2004).

Os polissacarídeos, em particular, possuem diversas propriedades intrínsecas como biocompatibilidade e biodegradabilidade, são renováveis, podem, dependendo do tipo, formar filmes, géis, cápsulas, partículas e fibras, além de agirem como espessantes (Rinaudo, 2008). Neste grupo, estão inseridos a quitosana e o alginato que, além de todas estas características, possuem propriedades cicatrizantes e grande disponibilidade comercial, o que os faz materiais ideais para a confecção de curativos adequados às várias fases de cicatrização (Kucharska *et al.*, 2008; Reddy *et al.*, 2008).

A quitosana é um derivado da quitina que, por sua vez, é o componente principal da carapaça dos crustáceos, sendo muito abundante na natureza. Sua fórmula estrutural

consiste de um copolímero de N-acetil glicosamina (β -(1-4)2-acetamido-2-desoxi-D-glicose) e D-glicosamina (2-amino-2-desoxi-D-glicose). Este composto estimula a função dos macrófagos e a proliferação celular, além de ser bactericida, fungicida e hemostático, pode ser empregado na obtenção de filmes e membranas (combinados ou não com outras substâncias), além de formar géis em soluções ácidas. (Paul e Sharma, 2004; Hein *et al.*, 2008; Kumar, 2000).

O alginato, por sua vez, é um polissacarídeo encontrado em algas marinhas marrons, consistindo de um copolímero linear de (1,4) β -D-manuronato e α -L-guluronato (Sæther *et al.*, 2008). Este polímero é bioadesivo e possui alta capacidade de absorção de água, podendo ser utilizado na forma de géis, esponjas e fibras. Sua propriedade de formar géis de alta viscosidade é útil na produção de curativos, mantendo o ambiente da ferida úmido e levando à rápida granulação e reepitelização do tecido, além de não causar dor ao paciente quando o curativo que o contém é removido (Yudanov e Reshetov, 2006; Paul e Sharma, 2004; George e Abraham, 2006).

Através da associação dos grupamentos carboxila negativamente carregados do alginato ($-\text{COO}^-$) com os grupamentos amino positivamente carregados da quitosana ($-\text{NH}_3^+$), é possível obter um complexo de polieletrólitos (PEC), cujas propriedades podem ser melhores em relação às dos polissacarídeos isolados, observando-se, por exemplo, maior estabilidade a variações de pH e maior eficiência na liberação controlada de princípios ativos. O PEC de quitosana-alginato pode ser utilizado na produção de membranas para coberturas de feridas, como arcabouços ou *scaffolds* para a regeneração de tecidos, microcápsulas para a liberação controlada de medicamentos e mesmo em processos de separação por pervaporação (Li *et al.*, 2009; Reddy *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2001).

A adição de uma solução de quitosana a uma solução de alginato sob condições controladas de vazão, agitação e temperatura pode levar à formação de agregados poliméricos. Tais agregados consistem de cadeias de quitosana e alginato interagindo eletrostaticamente, e mesmo se entrelaçando umas às outras, sendo o tamanho do agregado limitado pela extensão das interações estabelecidas entre os polímeros, pelas condições de preparo da mistura, assim como pelo tamanho das cadeias. Em um estudo anterior realizado pelo grupo de pesquisa, Rodrigues *et al.* (2008) obtiveram membranas

de quitosana-alginato reticuladas com íons cálcio através da produção controlada de agregados poliméricos. As membranas produzidas mostraram-se consistentes, com resistência à tração de cerca de 28MPa, alongamento na ruptura de cerca de 8%, alta capacidade de absorção de água (cerca de 19gH₂O/g membrana seca) e alta capacidade de drenagem de água, de cerca de 13kg/m²dia. Essas duas últimas propriedades fazem com que tais membranas sejam adequadas para aplicação na terapia de lesões com grande quantidade de exsudato, podendo absorver e drenar o líquido produzido pelo ferimento. Contudo, levando-se em consideração o conjunto de resultados obtidos pelo grupo de pesquisa (Rodrigues *et al.* 2008; Dallon *et al.*, 2007; Rodrigues e Moraes, 2006; Rodrigues *et al.*, 2006; Ceron *et al.*, 2006; Dallon, 2005; Marreco *et al.*, 2004) nota-se que as membranas compostas somente de quitosana são melhores do ponto de vista da capacidade de alongamento quando distendidas (em torno de 14%) e da resistência à tração (em torno de 44MPa) e são, portanto, mais adequadas para o uso como curativos em regiões de apreciável esforço mecânico. É de interesse, portanto, a melhoria da resistência mecânica e da capacidade de alongamento das membranas de quitosana-alginato, sendo este justamente o foco do presente trabalho.

A melhoria das propriedades mecânicas poderia ser supostamente obtida, por exemplo, pelo aumento da proporção de quitosana na etapa de produção da membrana. No entanto, em um dos trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa (Veiga, 2009), o qual consistiu de um estudo de substituição do alginato pela xantana em membranas com quitosana, verificou-se que o aumento da razão quitosana/xantana não conduziu aos resultados esperados. As evidências encontradas foram valores menores de resistência à tração e capacidade de absorção de água nas membranas com maiores proporções de quitosana. Desta forma, levando em consideração estes resultados, optou-se por não realizar este tipo de estudo no presente trabalho.

Uma alternativa que se mostra viável para melhorar a dispersão dos polímeros na mistura, dando origem a membranas mais homogêneas, e conseqüentemente com melhores propriedades mecânicas é o uso de surfatantes biocompatíveis, como os ésteres de sorbitan Tween 80 e Span 80 e o poloxamer Pluronic F68. Outra alternativa para o reforço das propriedades mecânicas do material seria o uso de agentes reticulantes alternativos aos íons cálcio (que atuam na ligação iônica de grupamentos carboxila do alginato que não se complexaram com grupamentos amino da quitosana). Um reticulante

que apresenta potencial para a reticulação iônica dos grupamentos amino da quitosana não envolvidos em ligações com moléculas de alginato, além de apresentar biocompatibilidade adequada, é o íon sulfato (Karakeçili *et al.*, 2007). Podem-se empregar os íons sulfato de forma isolada, ou ainda pode-se efetuar a reticulação com sulfato em conjunto com íons cálcio. Outro agente reticulante seria o glutaraldeído, que ligaria de forma covalente os grupamentos amino da quitosana não ligados às carboxilas do alginato (Monteiro e Airoldi, 1999), assim como os grupos hidroxila presentes tanto na quitosana como no alginato (Berger *et al.*, 2004; Svang-Ariyaskul *et al.*, 2006).

Na literatura, há relatos sobre os efeitos causados pelo uso de agentes reticulantes, como glutaraldeído, íons cálcio e íons sulfato, além de outros, nas características de membranas e também de micropartículas de quitosana associada ou não a alginato. Entretanto, não foram localizados estudos sistemáticos ou comparativos da influência do uso destes compostos em membranas de quitosana e alginato associados. Da mesma forma, não foram localizados relatos a respeito do uso de surfatantes em membranas de quitosana-alginato. Este trabalho irá, portanto, focar estas diversas alternativas de reforço das propriedades mecânicas, comparando-as e verificando qual a mais adequada.

Neste trabalho enfoca-se também a análise em caráter preliminar do aumento de escala do processo, com o objetivo de analisar as influências das condições de produção das membranas sobre as suas propriedades finais.

1.1. Objetivos

O projeto em questão, que tem por objetivo geral contribuir para os trabalhos realizados no ramo de obtenção de membranas com potencial para utilização na regeneração de tecidos, enfocando principalmente a melhoria de suas propriedades mecânicas, tem os seguintes objetivos específicos:

- Estudo do aumento de escala do processo de produção das membranas de quitosana-alginato, analisando-se a influência de condições de processo, como volume de reação, vazão de adição e velocidade de agitação, nas propriedades das membranas;
- Análise da influência do tipo de agente reticulante (íons cálcio e sulfato isolados e em

conjunto e glutaraldeído) nas características das amostras;

- Análise da influência da adição dos surfatantes Tween 80, Span 80 e Pluronic F68 na homogeneidade e nas características mecânicas das membranas;
- Comparação das características das membranas obtidas às de membranas preparadas por outros procedimentos já estabelecidos no grupo de pesquisa.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Tendo em vista a temática do presente trabalho, os assuntos abordados nesta revisão de literatura visam proporcionar uma visão geral a respeito dos biopolímeros empregados principalmente na área médica, como o alginato e a quitosana. As estruturas químicas, propriedades e aplicações da quitosana e do alginato são discutidas em detalhes, assim como a formação, aplicação e propriedades do complexo de polieletrólitos que se obtém pela mistura destes dois compostos. Como a finalidade das membranas de quitosana-alginato produzidas neste trabalho é o tratamento de lesões de pele, outros temas abordados nesta revisão de literatura são: a estrutura da pele humana, os tipos de lesões existentes, o processo de cicatrização, os tipos atuais de coberturas para feridas e as principais características requeridas de um curativo. Para finalizar, são abordados temas mais específicos como o uso de surfatantes, reticulantes iônicos e covalentes, além de outros possíveis métodos de reforço mecânico das membranas de quitosana-alginato.

2.1. Biopolímeros

Polímeros naturais, ou biopolímeros, podem ser definidos como quaisquer polímeros produzidos por organismos vivos. Estes materiais apresentam uma grande diversidade de aplicações no campo da engenharia de tecidos, na medicina regenerativa e em dispositivos médicos. Exemplos de sistemas constituídos de biopolímeros são: implantes ortopédicos, válvulas cardíacas, marcapassos, bioeletrodos, biossensores, lentes de contato, sistemas de liberação controlada de medicamentos e curativos para pele (Ratner *et al.*, 1996, Jagur-Grodzinski, 2006).

A principal vantagem dos biopolímeros é a sua biocompatibilidade, ou seja, a adequada aceitação pelo organismo. Outra vantagem é a sua metabolização por enzimas. Problemas como respostas inflamatórias, frequentemente provocados por polímeros sintéticos, podem ser suprimidos quando do uso de tais materiais. Contudo, por sua composição ser muito mais complexa do que a dos polímeros sintéticos, a sua manipulação é frequentemente mais complicada (Ratner *et al.*, 1996).

As três grandes classes de biopolímeros são: polissacarídeos, ácidos nucleicos e proteínas. Os polissacarídeos, em particular, possuem diversos papéis em organismos vivos e na natureza como um todo, sendo elementos-chave em processos biológicos.

Dentro deste grupo, os amino-polissacarídeos como a quitosana são muito interessantes com respeito às suas funções biológicas e são, portanto, os mais estudados (Il'ina e Varlamov, 2005). Outros polissacarídeos muito usados atualmente são o ácido hialurônico e o alginato (Rinaudo, 2008). Na Tabela 2.1 são listadas as fontes usuais de alguns polissacarídeos de uso comercial mais intenso.

Tabela 2.1: Fontes usuais de alguns polissacarídeos (adaptada de da Cunha *et al.*, 2009).

Polissacarídeo	Fonte
Alginato	algas marrons
Agar	algas vermelhas
Carragena	algas vermelhas
Goma Arábica	exsudato da planta <i>Acacia spp</i>
Goma Tragacanto	exsudato da planta <i>Astragalus spp</i>
Goma Guar	sementes de <i>Cyamopsis tetragonolobus</i>
Goma de Alfarroba	sementes de <i>Ceratonia siliqua</i>
Goma de Tamarindo	sementes de <i>Tilletia indica</i>
Pectinas	maçãs e laranjas
Amido	milho, trigo, batatas
Inulina	chicória, alcachofra de Jerusalém
Ácido Hialurônico	humor vítreo de bovinos, cristas de galináceos
Heparina	pulmão de bovinos e intestinos de porcos
Quitina	carapaças de crustáceos
Quitosana	carapaças de crustáceos
Glicanas	fungos das espécies <i>Pleurotus ostreatus</i> e <i>Agaricus blazei</i>
Xantana	bactérias da espécie <i>Xanthomonas spp</i>
Dextrana	bactérias da espécie <i>Leuconostoc spp</i>
Gelana	bactérias da espécie <i>Sphingomonas elodea</i>

2.1.1. Quitosana

A quitosana é derivada da quitina, o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza depois da celulose. É encontrada no exoesqueleto de crustáceos e insetos, nos micélios de fungos e também em moluscos. Sua biocompatibilidade e diversas outras características fazem deste biopolímero um dos mais investigados nos mais diversos campos da ciência (Hein *et al.*, 2008).

Quimicamente, a quitosana é um copolímero de N-acetil glicosamina (β -(1-4)-acetamido-2-desoxi-D-glicose) e D-glicosamina (2-amino-2-desoxi-D-glicose) (Hein *et al.*, 2008). Sua estrutura é muito semelhante à da celulose e está representada na Figura 2.1.

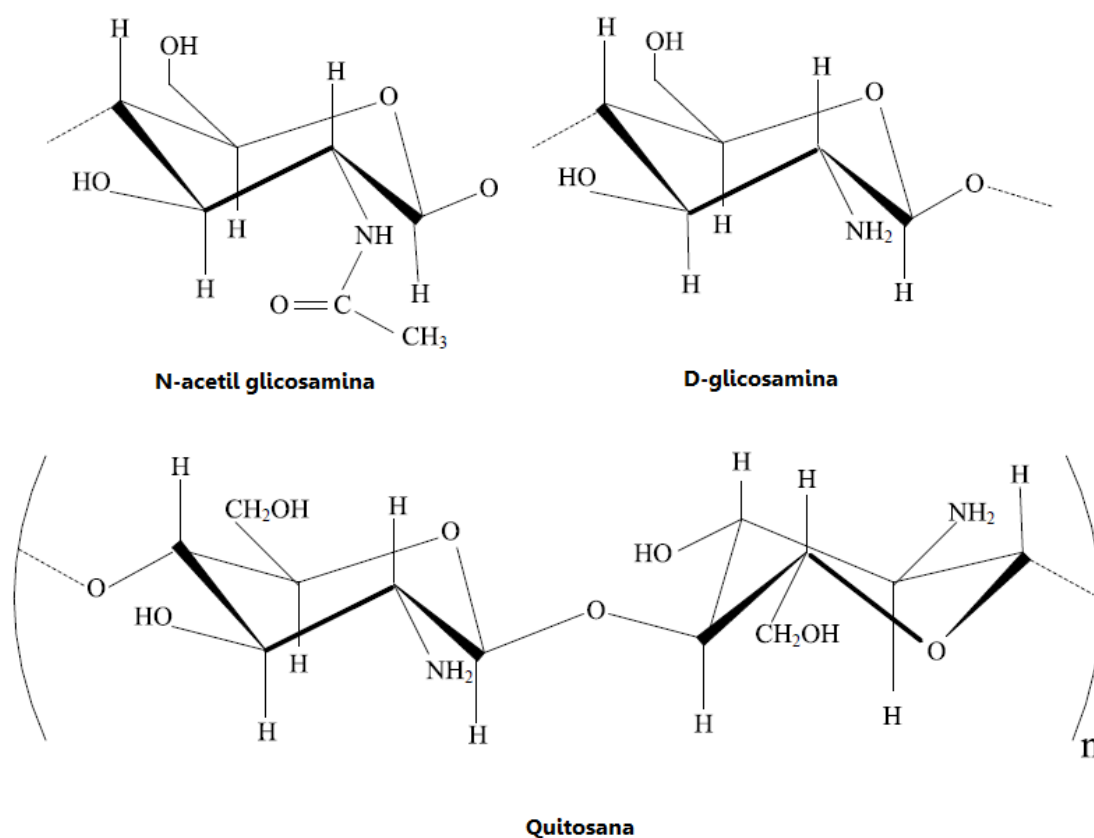


Figura 2.1: Estrutura da quitosana, com suas respectivas unidades estruturais (adaptada de Sacchetin, 2009).

Comercialmente, a quitina é obtida a partir de carapaças de caranguejos e camarões, nas quais representa 70% dos compostos orgânicos totais, estando associada a proteínas, pigmentos e carbonato de cálcio. Considerada como resíduo da indústria da

pesca, sua produção anual é comparável à de celulose (Kumar, 2000; George e Abraham, 2006; Rinaudo, 2008). Em 1990, a produção mundial de quitina e quitosana foi estimada em 10000 toneladas e já se aproximava de 30000 toneladas em 2004, correspondente ao processamento de aproximadamente 1.440.000 toneladas de rejeitos ricos em quitina gerados naquele ano, em nível mundial, pela indústria pesqueira (Campana-Filho *et al.*, 2007).

Para a obtenção da quitosana, a quitina é separada de outros componentes das carapaças por um processo químico que envolve etapas de desmineralização e desproteíntização com soluções diluídas de HCl e NaOH, seguidas de descoloração com KMnO_4 e ácido oxálico. A quitina obtida, o biopolímero contendo grupos acetil (NHCOCH_3), é desacetilada com solução concentrada de NaOH, obtendo-se, então, a quitosana (Azevedo *et al.*, 2007). A fração de meros, a sequência e o comprimento de cadeia da quitosana variam de acordo com a origem, lote e grau de desacetilação da quitina (Hein *et al.*, 2008). Geralmente, o grau de desacetilação da quitosana comercial varia de 70 a 95%, e sua massa molar encontra-se na faixa de 10^4 a 10^6 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Canella e Garcia, 2001; Malafaya *et al.*, 2007).

A quitosana é sensível ao pH devido às grandes quantidades de grupos amino em sua cadeia. Em pH ácido, ocorre sua solubilização devido à protonação dos grupos amino e à consequente repulsão das cadeias poliméricas (George e Abraham, 2006). Sua solubilização em alguns ácidos orgânicos permite a obtenção de filmes e membranas (combinada ou não com outras substâncias), possibilitando também a formação de géis em soluções ácidas (Kumar, 2000). Destaca-se que a quitosana é um dos poucos polissacarídeos de origem natural que apresenta múltiplas cargas positivas em suas moléculas, sendo mais comum na natureza a ocorrência de poli-ânions.

Dos diversos estudos publicados na literatura, percebe-se que este biopolímero é um excelente candidato para aplicação na cicatrização de feridas de pele. Dentre suas diversas características, destacam-se sua capacidade de ser absorvido pelo organismo e suas atividades fungicida, antibacteriana e antitumoral, sendo esta última devido à propriedade de ativar macrófagos. Por ser também um material hemostático, a quitosana ajuda no processo de coagulação natural. A sua degradação produz N-acetil- β -D-glicosamina, que estimula a proliferação de fibroblastos e ajuda na deposição ordenada do

colágeno, além de estimular o aumento da síntese de ácido hialurônico na região da ferida. Desta forma, a quitosana promove uma cicatrização mais rápida e previne a formação de cicatrizes, podendo ser usada em feridas abertas. Os curativos à base de quitosana podem ser manufacturados de várias formas, incluindo fibras, filmes, esponjas e géis (Hein *et al.*, 2008; Rodrigues, 2008, Paul e Sharma, 2004; Suzuki e Mizushima, 1997; Yudanova e Reshetov, 2006; Malafaya *et al.*, 2007).

A quitosana possui diversas aplicações em várias áreas da ciência, como pode ser visto na Tabela 2.2, na qual a área biomédica é a mais importante. Uma das suas aplicações, e talvez a mais popular, é como componente em produtos emagrecedores e redutores de colesterol. Tal aplicação é possível devido a sua natureza catiônica, que dificulta a absorção de lipídeos pelo intestino, como indicam diversos estudos (George e Abraham, 2006).

Tabela 2.2: Principais áreas de aplicação da quitosana (adaptada de Azevedo *et al.*, 2007 e George e Abraham, 2006).

Área	Aplicações
Agricultura	mecanismos defensivos e adubo para plantas
Tratamento de água	floculante para clarificação, remoção de íons metálicos e redução de odores
Indústria alimentícia	fibras dietéticas, redutor de colesterol, conservante para molhos, fungicida e bactericida, recobrimento de frutas, aditivo
Indústria de cosméticos	esfoliante para a pele, tratamento de acne, hidratante capilar, creme dental
Biofarmacêutica	imunológico, antitumoral, hemostático e anticoagulante, liberação controlada de drogas em animais e humanos, encapsulamento de materiais
Biomédica	suturas cirúrgicas, implantes dentários, reconstituição óssea, lentes de contato, produtos emagrecedores

A degradação da quitosana ocorre naturalmente no organismo pela ação da enzima lisozima. Desta forma, este polissacarídeo é muito utilizado na liberação controlada de fármacos (George e Abraham, 2006). Além disso, suas atividades antiácida e anti-úlceras previnem irritações no estômago causadas por medicamentos. Recentemente, hidrogéis de quitosana sensíveis ao pH têm sido avaliados para a liberação controlada de drogas em regiões específicas do trato gastrointestinal (Kumar, 2000).

Por prover uma matriz tridimensional para o crescimento celular, a quitosana também tem sido muito estudada na engenharia de tecidos para fabricação de matrizes porosas ou arcabouços (*scaffolds*) biodegradáveis tridimensionais. Estes *scaffolds* devem ser bioabsorvidos e o espaço inicialmente ocupado por eles deve ser totalmente substituído por tecido regenerado. A quitosana apresenta-se mais vantajosa do que vários polímeros, como a policaprolactona, por exemplo, por formar uma estrutura porosa composta por fibras que se degradam a uma velocidade adequada para a regeneração de tecidos biológicos (Jagur-Grodzinski, 2006; Paul e Sharma, 2004).

Em combinação com outros materiais (ex: materiais inorgânicos, proteínas, glicosaminoglicanos e outros polímeros naturais), a quitosana tem seu uso ampliado na área biomédica. Os compostos de cálcio são os materiais inorgânicos mais estudados em conjunto com este polissacarídeo. Como exemplo desta categoria, tem-se o fosfato de cálcio e o carbonato de cálcio, os quais podem ser incorporados ao material para promover aumento da sua resistência mecânica em implantes ortopédicos. Já as proteínas mais estudadas em conjunto com a quitosana são o colágeno e a gelatina, promovendo melhorias nas propriedades dos *scaffolds* utilizados na engenharia de tecidos para reparos de pele, ossos, cartilagem e nervos. Alguns glicosaminoglicanos utilizados em conjunto com a quitosana são a heparina, o sulfato de condroitina e o hialuronato. A heparina, por exemplo, aumenta a hemocompatibilidade do material (Hein *et al.*, 2008). Quanto aos polímeros naturais, tem-se a combinação da quitosana com alginato, pectina, carragena e xantana, os quais formam materiais atraentes para diversas aplicações em conjunto com a quitosana, sendo o alginato o biopolímero mais estudado (Hein *et al.*, 2008, Veiga, 2009).

2.1.2. Alginato

Alginato é o termo usado normalmente para se referir ao ânion do ácido algínico, mas também pode se referir aos seus sais ou ao próprio ácido (McHugh, 2003). Este biopolímero é encontrado na natureza, sendo as algas marinhas marrons sua fonte principal. O alginato também é encontrado na forma de sais de cátions como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} e Na^+ (Sæther *et al.*, 2008; George e Abraham, 2006). Além disso, o alginato pode ser produzido como um polímero exocelular de bactérias como *Azotobacter vinelandii* e várias espécies de *Pseudomonas* (Maurstad *et al.*, 2008). O alginato comercial é obtido principalmente de algas das espécies *Laminaria hyperborean*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis pyrifera*, nas quais representa até 40% do peso seco (George e Abraham, 2006).

Quimicamente, o alginato é um copolímero linear formado por blocos de grupos (1,4) β -D-manuronato (M) e α -L-guluronato (G) (George e Abraham, 2006; Sæther *et al.*, 2008). As quantidades relativas dos grupos ácidos contidos na cadeia e seu arranjo sequencial variam muito, dependendo da sua origem. Os grupos urônicos são distribuídos ao longo da cadeia polimérica em um padrão, no qual blocos homopoliméricos de grupos G (blocos G), blocos homopoliméricos de grupos M (blocos M) e blocos com sequência alternada de unidades M e G (blocos MG) podem coexistir, como indicado na Figura 2.2 (Sæther *et al.*, 2008). A composição e extensão das sequências de meros e a massa molar determinam as propriedades físicas do alginato (George e Abraham, 2006).

Para extrair o alginato, as algas marinhas são moídas e agitadas em uma solução de pH básico aquecida, usualmente com carbonato de sódio. O processo de extração consiste em converter os sais insolúveis em água (alginato de cálcio e magnésio) em alginato de sódio, o qual é solúvel em água. O alginato de sódio é então diluído e os resíduos das algas são removidos por filtração. O biopolímero pode então ser recuperado da solução através da adição de um sal de cálcio. Isso faz com que haja formação de alginato de cálcio insolúvel. Um ácido é então adicionado para convertê-lo a ácido algínico, o qual é separado facilmente da mistura. O ácido algínico passa então por um processo de filtração para retirada de parte do líquido presente. Adiciona-se então carbonato de sódio até convertê-lo a alginato de sódio. A pasta de alginato de sódio resultante pode ser extrudada em grãos que são então secos e moídos (McHugh, 2003).

O alginato é usado como espessante na indústria têxtil e de alimentos em molhos, xaropes, coberturas, maioneses e iogurtes. Também é usado como estabilizante, reduzindo a formação de cristais de gelo e a taxa de derretimento em sorvetes. Além disso, filmes de alginato de cálcio têm sido usados na preservação de peixes congelados. Na indústria farmacêutica, este composto tem sido usado na liberação controlada de medicamentos e outros produtos químicos devido a sua sensibilidade ao pH. Recentemente, microesferas de alginato recobertas com quitosana, que melhora suas propriedades mecânicas, têm sido testadas na liberação controlada de vários fármacos (McHugh, 2003).

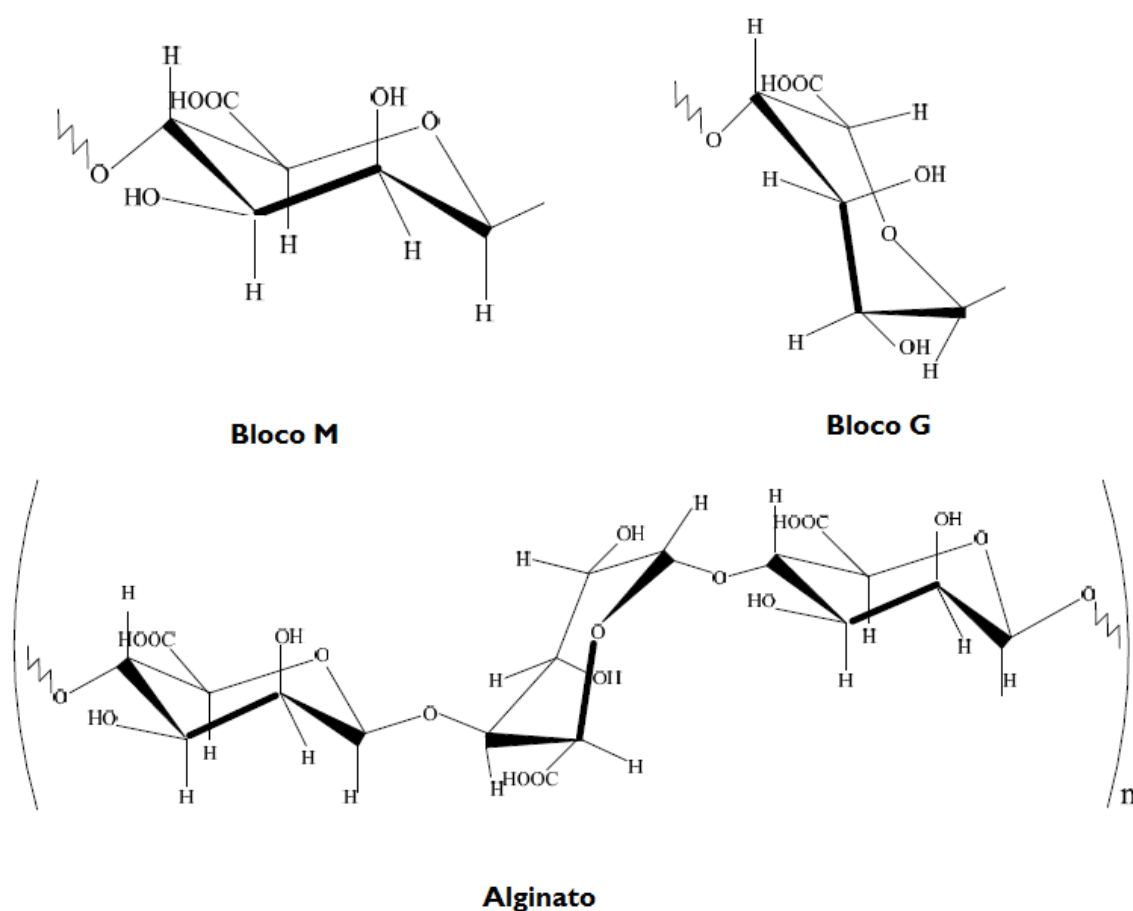


Figura 2.2: Estrutura química do alginato (adaptada de Sacchetin, 2009).

O alginato apresenta alta biocompatibilidade, resistência química, permissividade, alta absorção de água e bioadesividade (George e Abraham, 2006). Sua propriedade mais importante é a capacidade de formar géis estáveis à temperatura ambiente pela reação com cátions divalentes como Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , sendo mais comumente empregado o cálcio. A interação dos cátions com o polímero resulta em uma

rede tridimensional de fibras de alginato unidas entre si por ligações iônicas com os íons cálcio, como pode ser visto na Figura 2.3. Esta interação resulta em propriedades gelificantes que auxiliam na remoção dos curativos preparados a partir deste composto e promovem redução significativa da dor através do bloqueio dos terminais nervosos (Paul e Sharma, 2004; George e Abraham, 2006; Abreu *et al.*, 2008). Quando usado em curativos, o alginato também é capaz de manter o microambiente fisiológico adequado, promovendo a formação de tecido de granulação e facilitando o alcance da hemostase (Ma *et al.*, 2007). Além disso, esse polissacarídeo pode ser absorvido por fluidos corporais, devido a sua solubilidade quando na forma de sal de sódio (McHugh, 2003).

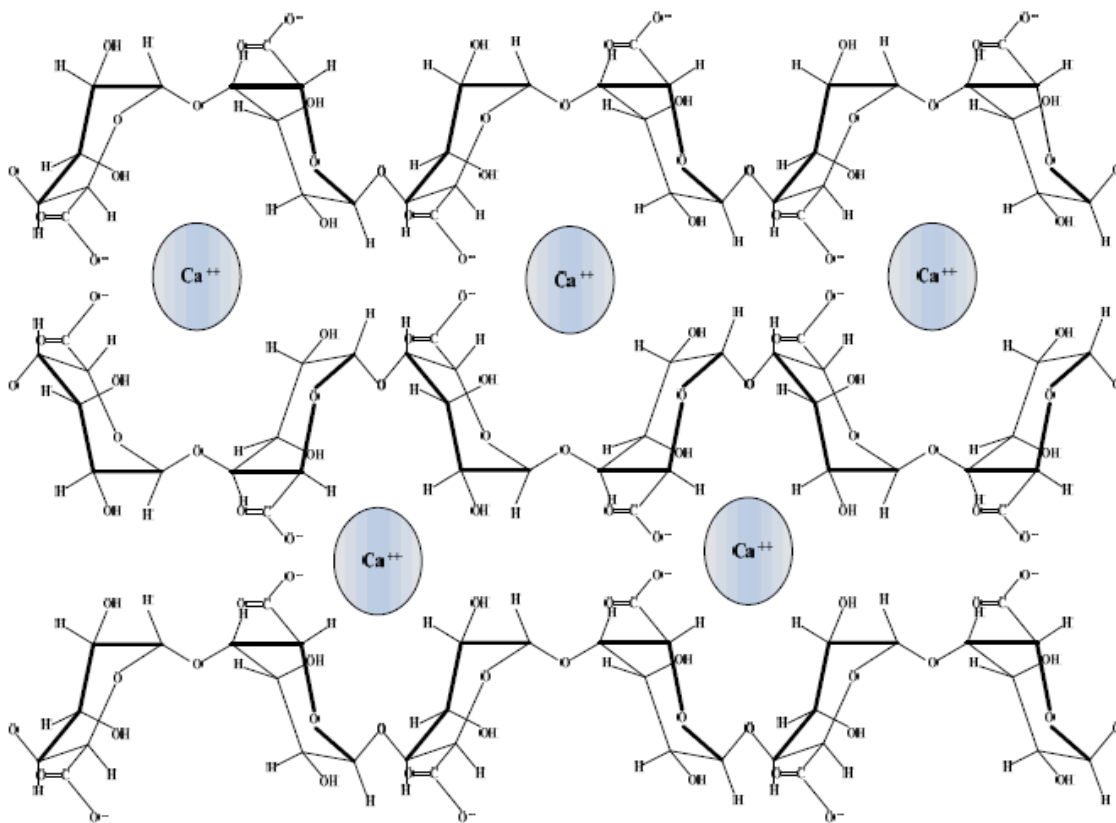


Figura 2.3: Formação da rede de gel de alginato de cálcio (Sacchetin, 2009).

Por possuir grupos carboxílicos ($-\text{COO}^-$), o alginato apresenta carga líquida negativa quando em solução, sendo capaz de interagir eletrostaticamente com a quitosana, que possui grupamentos positivamente carregados ($-\text{NH}_3^+$), formando um complexo de polieletrólitos (PEC). Desde os anos 90, a aplicação deste complexo tem sido muito estudada na engenharia de tecidos na forma de *scaffolds*, membranas, fibras, órgãos artificiais e microcápsulas para liberação de drogas ou de genes (Li *et al.*, 2009; Hein *et al.*,

2008, Sæther *et al.*, 2008, Rodrigues, 2008), de forma que este assunto será mais detalhadamente discutido a seguir.

2.1.3. Complexo de polieletrólitos de quitosana e alginato

Polieletrólitos são macromoléculas que possuem um número considerável de grupos funcionais carregados, ou que podem se tornar carregados em condições apropriadas de pH. As moléculas podem se apresentar nas formas de policações ou poliânions, sendo sua carga elétrica dependente da natureza dos seus grupos funcionais (Simsek-Ege *et al.*, 2003).

Os PECs, ou complexos de polieletrólitos são formados pela mistura de duas soluções de polieletrólitos de cargas opostas. O grau de interação entre as macromoléculas depende do pH do meio, da força iônica, da temperatura e das concentrações das soluções (Maurstad *et al.*, 2008). A formação de tais complexos envolve não somente as interações eletrostáticas, como também ligações dipolo-dipolo, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (Il'ina e Varlamov, 2005).

Como comentado nos itens 2.1.1 e 2.1.2, a quitosana e o alginato são polieletrólitos de cargas opostas, sendo que a quitosana pode apresentar carga líquida positiva e o alginato, carga líquida negativa quando em solução. O PEC de quitosana-alginato possui menor tendência ao intumescimento em relação ao alginato e maior resistência à solubilização em baixos valores de pH, quando comparado à quitosana (Li *et al.*, 2009; Hein *et al.*, 2008, Sæther *et al.*, 2008, Rodrigues, 2008).

O comportamento do PEC de quitosana-alginato varia de acordo com o pH, como mostrado na Figura 2.4. Em pH muito alto, a interação entre o alginato e a quitosana é desfavorecida, assim como em pH muito baixo visto que, nestas condições, ocorre preponderância de ionização do alginato e da quitosana isolados, respectivamente. Para promover a formação de um PEC estável, Cárdenas *et al.* (2003) propõem o ajuste do pH para 5,28, em um valor intermediário aos valores de pKa da quitosana (6,3 a 7,0) (Karakeçili *et al.*, 2007) e do alginato (3,38 para os grupos M e 3,65 para os grupos G) (Simsek-Ege *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2009; Sæther *et al.*, 2008), garantindo que a quitosana esteja potencialmente protonada e o alginato, desprotonado.

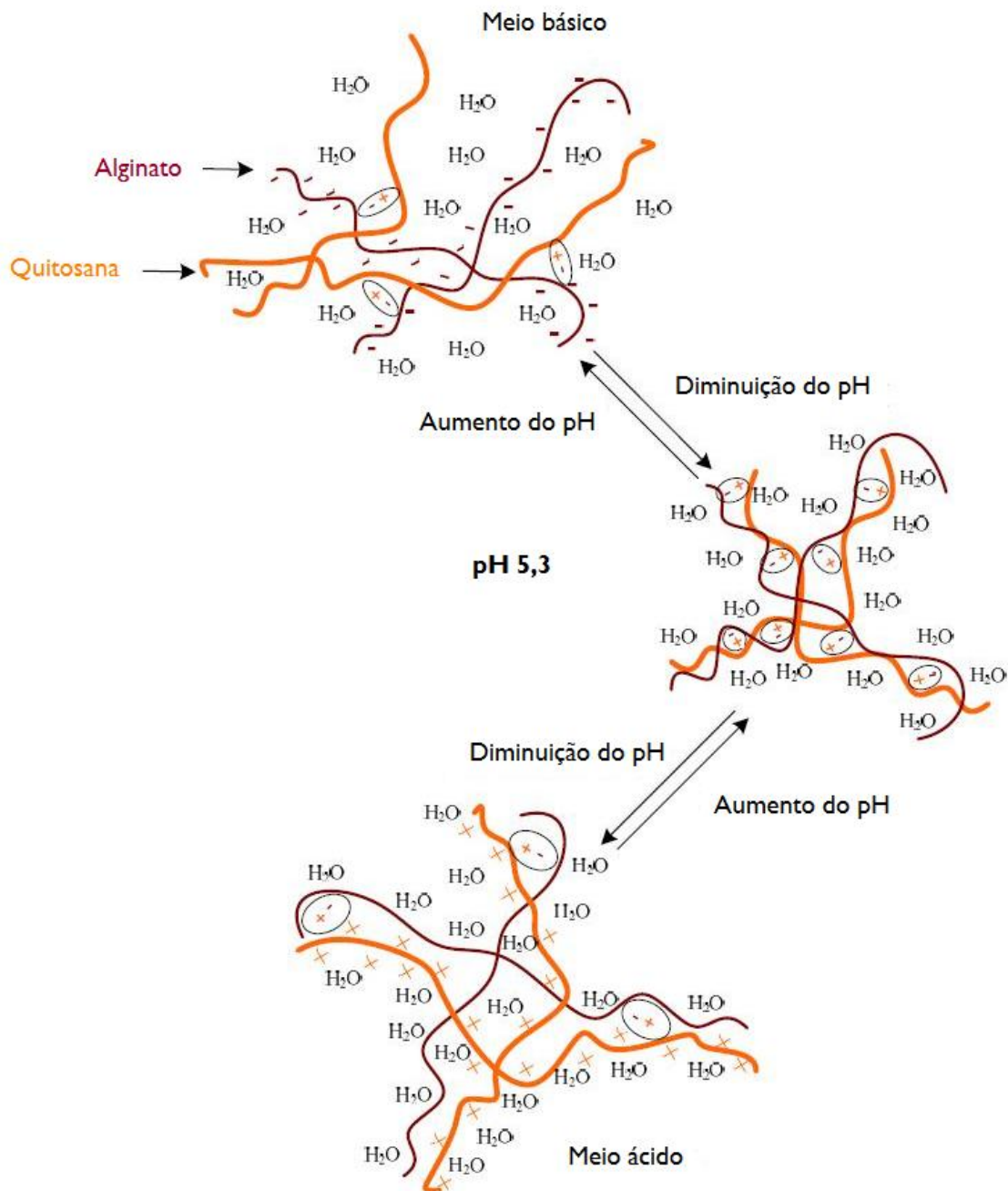


Figura 2.4: Efeito do pH na estrutura e comportamento de inchamento do complexo de polieletrólitos formado por quitosana e alginato. Os círculos representam as interações iônicas entre as cargas negativas (-) do alginato e as cargas positivas da quitosana (+) (Rodrigues, 2008).

Existem muitos trabalhos na literatura que abordam a obtenção de PECs de quitosana-alginato. No trabalho realizado por Sæther *et al.* (2008), as propriedades de partículas resultantes da coacervação de quitosana-alginato, na forma de PEC, foram

avaliadas em função do seu modo de preparo (velocidade de agitação, diâmetro do agitador). Verificou-se, por análise de transmitância no UV e espalhamento dinâmico de luz, uma diminuição do tamanho da partícula quando se usaram maiores velocidades e diâmetro do agitador. A razão entre a quitosana e alginato também foi variada e verificou-se que partículas menores foram obtidas quando se usou uma das soluções poliméricas em excesso. Quando foram usados polímeros de menores massas molares também foram obtidas partículas menores. A estabilidade do complexo foi investigada por incubação a uma temperatura de 37°C por até oito horas e estocagem por um mês a 4°C. Verificou-se que o complexo formado é estável nas condições testadas. Também se observou que a elevação do pH para 7 levou a um aumento significativo do tamanho dos agregados poliméricos.

No estudo de Li *et al.* (2009), as características e a biodegradação de PECs de quitosana-alginato, preparados pela liofilização do precipitado resultante da mistura dos polímeros, foram investigadas. A caracterização do material por análises de raio-X, FTIR e DSC confirmou que os grupos amino parcialmente protonados da quitosana reagiram com os grupos carboxila do alginato, formando o PEC. Depois de incubado em solução de lisozima, o PEC mostrou grande capacidade de adsorção da enzima e baixa taxa de degradação, devido à forte interação eletrostática entre a quitosana e o alginato, o que dificultou o ataque enzimático à quitosana livre.

O PEC de quitosana-alginato pode ser empregado para a confecção de membranas, as quais possuem aplicações na terapia de lesões, mostrando-se flexíveis, finas, transparentes e mais eficientes do que os curativos convencionais (Paul e Sharma, 2004). Outra aplicação destas membranas pode ocorrer em processos de separação por pervaporação de azeótropos formados entre a água e compostos orgânicos, por exemplo (Reddy *et al.*, 2008).

Uma das técnicas de preparação de membranas contendo simultaneamente quitosana e alginato foi proposta por Yan *et al.* (2000) e adaptada por Wang *et al.* (2001, 2002), consistindo na produção controlada de agregados das matérias-primas e em sua moldagem e secagem após reticulação iônica em solução aquosa de cloreto de cálcio. A mistura das soluções de quitosana e alginato, sob condições pré-estabelecidas de concentração dos polímeros, taxa de agitação, taxa de adição da solução de quitosana na

solução de alginato, dentre outras, leva à formação de uma suspensão composta por fibras finas. Após seca, esta mistura produz membranas homogêneas (Wang *et al.*, 2001).

Para se obter agregados poliméricos adequados para a preparação de filmes homogêneos, a taxa de reação entre os dois polímeros deve ser suficientemente lenta, prevenindo a formação de membranas interfásicas e permitindo, assim, que a reação seja completa. A adição de um solvente orgânico de baixa polaridade (como a acetona) à solução de quitosana faz com que este polímero assuma uma conformação menos estendida, o que auxilia no controle da taxa de reação entre os dois polieletrólitos, obtendo-se uma suspensão mais homogênea (Yan *et al.*, 2000).

Fundamentando-se nos trabalhos de Yan *et al.* (2000) e Wang *et al.* (2001,2002), Rodrigues *et al.* (2008) desenvolveram uma metodologia escalonável para a obtenção de membranas de quitosana-alginato. Foram avaliados os efeitos dos parâmetros taxa de agitação e vazão de adição da solução de quitosana à solução de alginato nas características mecânicas das membranas. Os resultados obtidos nesse trabalho foram membranas com capacidade de absorção de água de 19g/g, capacidade de drenagem de água de 13kg/m².dia, resistência à tração de 28MPa e porcentagem de alongamento de 8%, capazes de atuarem eficientemente como barreira protetora contra a entrada de bactérias e não tóxicas a diferentes tipos de células animais. Com relação aos ensaios *in vivo*, as membranas de quitosana-alginato apresentaram resultados satisfatórios, confirmando seu bom potencial de uso como curativos.

A literatura mostra outras tendências na confecção de membranas de quitosana-alginato. Shi *et al.* (2008) relatam a produção de membranas em duas camadas. Para o preparo de tais membranas foi utilizada uma lâmina de vidro esterilizada, a qual foi imersa em uma solução de quitosana a 0,05% (w/v) e enxaguada em seguida com água ultrapura. Após esta etapa, a lâmina foi imersa em uma solução de alginato a 0,05% (w/v), enxaguada novamente com água ultrapura e seca à temperatura ambiente. Avaliou-se a adesão e ativação de células endoteliais sobre esta membrana, verificando-se que a mesma é compatível com este tipo de célula, sendo capaz de mantê-la viável. Estes autores não mencionaram se foi utilizado algum tipo de base para a neutralização da quitosana, a qual pode ser solubilizada em água, se não for feita a devida correção do pH.

Maurstad *et al.* (2008) produziram membranas com múltiplas camadas de alginato

como poliânion e quitosana ou poli-L-lisina (PLL) como polication. O processo de produção destas membranas, similar ao procedimento de Shi *et al.* (2008) anteriormente mencionado, consistiu em imersões alternadas de uma lâmina de vidro em soluções do polication e do poliânion. Entre as imersões, a lâmina era enxaguada em uma solução salina de mesma força iônica que as soluções poliméricas, evitando desta forma que as membranas fossem expostas a choques osmóticos. O pH foi mantido em 5,5 durante o procedimento para o sistema quitosana-alginato e 7,4 para o sistema PLL-alginato. Os autores verificaram que as membranas com PLL são mais espessas do que as membranas com quitosana, indicando um maior grau de interpenetração no sistema quitosana-alginato. Essa diferença entre os sistemas pode ser explicada por dois modos de reação, sendo a reação PLL-alginato limitada pela difusão e a reação entre quitosana-alginato limitada pela cinética. Desta forma, o sistema PLL-alginato não permite o rearranjo das cadeias poliméricas após um primeiro contato, enquanto no sistema quitosana-alginato, este rearranjo é possível.

Curativos à base de quitosana-alginato na forma de esponjas, feitas a partir de uma suspensão aquosa de microfibras de quitosana e alginato, com adição de glicerol foram obtidos por Kucharska *et al.* (2008). A mistura foi homogeneizada e liofilizada, resultando em esponjas. Foram avaliadas a capacidade de absorção, propriedades mecânicas, citotoxicidade e propriedades hemostáticas. Tais membranas apresentaram capacidade de absorção de água de 17 vezes sua massa seca inicial, alongamento na ruptura de cerca de 10%, citocompatibilidade e propriedade de ativar a coagulação sanguínea.

Verifica-se, portanto, que o PEC de quitosana-alginato é biocompatível, estável e apresenta degradação relativamente lenta no organismo. Este complexo pode ser processado de diversas formas, existindo uma tendência de confecção de membranas com uma a várias camadas ou na forma de esponjas, para aplicação no tratamento de lesões de pele de difícil cicatrização, as quais apresentam um grande desafio da atualidade.

Visto que os curativos para lesões de pele devem atender a demandas específicas para esta aplicação, uma discussão mais detalhada a respeito da pele e dos tipos de lesões existentes será feita a seguir.

2.2. A pele humana: estrutura e tipos de lesões

Considerada o maior órgão do corpo humano, a pele possui funções variadas, como promover proteção ao organismo, regular a temperatura do corpo, prevenir a desidratação, além de dar suporte a vasos sanguíneos e nervos. Sua estrutura é composta por três camadas denominadas epiderme, derme e hipoderme (Rodrigues *et al.*, 2008).

A epiderme, ou camada externa, é composta em sua maioria por células mortas e também contém queratina, o que torna esta camada impermeável, protegendo o corpo do ambiente. A derme, por sua vez, contém células vivas, vasos sanguíneos e nervos. Já a hipoderme é composta por células adiposas, responsáveis pela absorção de choques e pelo isolamento térmico. As células da superfície estão sempre sendo substituídas por células da derme e, quando a pele está ferida, seu reparo é considerado meramente uma aceleração desse processo natural (Paul e Sharma, 2004).

As lesões de pele são classificadas em feridas sem perda de tecido (como as decorrentes de cirurgias), e feridas com perda de tecido (queimaduras, abrasões e úlceras resultantes de traumas ou de doenças crônicas). As feridas também são classificadas pelas camadas envolvidas: feridas superficiais atingem a derme, feridas profundas superficiais atingem o tecido subcutâneo (hipoderme), e feridas profundas totais atingem os músculos e as suas estruturas adjacentes (Paul e Sharma, 2004; Mandelbaum *et al.*, 2003 a; Borges *et al.*, 2007).

O processo de cicatrização dos tecidos envolve uma complexa interação entre as células, as moléculas da matriz extracelular e os mediadores solúveis. A complexidade deste processo pode ser resumida em quatro etapas, as quais coincidem com a seqüência temporal normal da cicatrização: homeostase, inflamação, proliferação e remodelagem (Öztürk *et al.*, 2006).

O atraso na cicatrização é normalmente uma consequência do comprometimento da fisiologia da ferida e ocorre tipicamente em casos de trombozes, edemas, diabetes ou pressão local prolongada. Diferentemente de outros tipos de lesão, nos quais há pouca perda de tecido, como as incisões cirúrgicas, as lesões crônicas são difíceis de cicatrizar e envolvem perda de tecido progressiva, sendo o processo de cicatrização natural insuficiente. A cura destas lesões representa, portanto, um dos maiores desafios para os profissionais da saúde e pesquisadores da área de curativos (Paul e Sharma, 2004).

Embora os dados brasileiros sejam pouco precisos, estima-se que quase 3% da população seja portadora de lesões crônicas, estatística que se eleva para 10% no caso de diabéticos. Este fato exige maior conhecimento e preparo dos profissionais da área da saúde. Além disso, faz-se necessário um maior investimento em pesquisas, com o objetivo de criar recursos e tecnologias mais eficientes e acessíveis à população brasileira (Mandelbaum *et al.*, 2003 b).

2.3. Avanços no desenvolvimento de novos curativos para o tratamento de lesões de pele

Os produtos para tratamentos de feridas podem ser reunidos em dois grandes grupos: agentes tópicos e curativos. Agentes tópicos são aqueles aplicados diretamente sobre o leito da ferida ou destinados à limpeza ou proteção da área em seu redor. Curativo, também chamado por alguns autores de cobertura, é o dispositivo que cobre uma ferida, com o objetivo de favorecer o processo de cicatrização e protegê-la contra agressões externas, mantendo-a úmida e preservando a integridade de sua região periférica. Normalmente os curativos são divididos em primários, quando usados em contato direto com o tecido lesado, e secundários, quando colocados sobre o curativo primário (Mandelbaum *et al.*, 2003 a).

Os curativos tradicionais baseados em tecidos comuns como a gaze têm muitas desvantagens. Uma delas é a forte aderência à ferida, levando à oclusão da mesma e ao acúmulo de fluido sob o curativo, o que favorece a proliferação de patógenos. Muitas vezes, estes curativos são utilizados em conjunto com géis para não ressecar a ferida e aliviar a dor inerente à troca. Antibióticos e outros medicamentos podem ser impregnados no tecido para promover uma ação terapêutica e evitar o crescimento de microorganismos (Yudanova e Reshetov, 2006).

Atualmente estão sendo desenvolvidos curativos que diferem significativamente dos tradicionais tanto em concepção como em propriedades. Biopolímeros da categoria dos polissacarídeos e proteínas são muito utilizados no desenvolvimento destes novos curativos, pois possuem alta biocompatibilidade, biodegradabilidade e frequentemente, atividade fisiológica. Encontram-se neste grupo a quitosana, o alginato, a celulose e seus derivados (metilcelulose, carboximetilcelulose), o colágeno, o hialuronato, a gelatina, a

carragena, a pectina, a xantana, a fucoidina, a goma arábica e a goma tragacanto (Yudanova e Reshetov, 2006).

Os curativos em forma de filme são interessantes, pois são caracterizados por alta plasticidade, que garante boa modelagem à superfície da ferida. O filme pode ser transparente, o que torna a visualização e o monitoramento da ferida possíveis sem sua remoção (Yudanova e Reshetov, 2006).

Recentemente, as blendas predominam entre as novas coberturas para feridas e podem ser obtidas na forma de géis, filmes, placas e pós, dentre outros, através da combinações de polímeros. A vantagem de tais sistemas é a possibilidade de variar a sua composição e estrutura em limites amplos, controlando as propriedades da matriz polimérica e o nível de atividade biológica (Yudanova e Reshetov, 2006).

Muitos dos curativos modernos são compostos por um sistema de múltiplas camadas, combinando polímeros de diferentes naturezas e estruturas. A camada que entra em contato com a ferida deve ser de um material que promova a drenagem de exsudato, o qual é retido na camada seguinte, com propriedade absorvente (Yudanova e Reshetov, 2006).

No presente trabalho, há o foco no tratamento de feridas que liberam uma quantidade significativa de exsudato e necessitam, portanto, de cuidados especiais referentes ao controle de umidade, de modo a evitar a maceração da pele. Nesta condição, a pele está mais suscetível a danos físicos e mais sensível a substâncias irritantes. Portanto, deve ser usado um produto que mantenha um ambiente úmido adequado, drenando o excesso de fluido liberado e ao mesmo tempo, impedindo a desidratação. Alguns curativos contêm fibras absorventes ou espumas que, rapidamente, retiram o fluido da superfície da ferida. O fluido então pode entrar em contato com agentes formadores de gel presentes no curativo, os quais podem ser derivados de amido ou polímeros superabsorventes, como a poliacrilamida e o poliacrilato de sódio. Algumas vezes, como no caso dos curativos de alginato, a camada absorvente e a formadora de gel são a mesma (Thomas, 2008; Marconato e Franchetti, 2002).

De acordo com Thomas (2008) e Yudanova e Reshetov (2006), a cobertura ideal para uma ferida deve ter as características descritas na Tabela 2.3. Contudo, deve-se salientar que, apesar dos inúmeros tipos de coberturas para feridas existentes, não

existem curativos universais adequados a todos os tipos de lesões. Isso é natural, pois, durante o tratamento de uma ferida, deve-se levar em conta o tipo da mesma e a fase de cicatrização em que esta se encontra (Yudanova e Reshetov, 2006).

Tabela 2.3: Requerimentos para um curativo ideal (Thomas, 2008; Yudanova e Reshetov, 2006).

Requerimentos primários	Requerimentos secundários
Ser livre de substâncias tóxicas e irritantes	Possuir atividade antimicrobiana
Não liberar partículas ou fibras não biodegradáveis na ferida	Ser transparente para possibilitar o monitoramento da cicatrização
Formar uma barreira efetiva contra a entrada de microorganismos	Possuir habilidade de remover ou inativar enzimas proteolíticas em feridas crônicas
Ser resistente à água e facilmente removível	Possuir atividade hemostática
Não incomodar o paciente	Exibir atividade de desbridamento
Não necessitar de trocas frequentes	Ser capaz de combater o mau odor
Manter a hidratação da pele e funcionar efetivamente sob compressão	
Proteger a pele do exsudato e excesso de umidade	
Não provocar dor quando aplicado ou removido	
Manter a ferida a temperatura e pH ótimos	
Modelar-se à região ferida	

2.4. Desenvolvimento de curativos à base de quitosana e alginato com reforço nas propriedades mecânicas

Os trabalhos desenvolvidos anteriormente pelo grupo de pesquisa (Rodrigues *et al.* 2008; Dallan *et al.*, 2007; Rodrigues e Moraes, 2006; Rodrigues *et al.*, 2006; Ceron *et al.*, 2006; Dallan, 2005; Marreco *et al.*, 2004) levaram à conclusão de que membranas

constituídas somente de quitosana são mais adequadas do ponto de vista das propriedades mecânicas quando comparadas às membranas constituídas de quitosana e alginato e reticuladas com íons cálcio. Entretanto, a absorção de fluidos corpóreos e a capacidade de drenagem são menores nas membranas compostas somente de quitosana. Na Tabela 2.4 encontram-se listadas algumas das propriedades das membranas constituídas somente de quitosana (empregando-se 95 ml de solução de quitosana a 2% em ácido acético a 1% como solução de partida) e de quitosana-alginato (empregando-se 45 ml de solução de quitosana a 1% em ácido acético a 2%, 45 ml de acetona e 90 ml de solução de alginato a 0,5% em água). As propriedades mostradas nesta tabela são a espessura e seu aumento após hidratação, a capacidade de absorção de água e de soro fetal bovino (SFB), assim como a perda de massa nestas mesmas soluções, a capacidade de drenagem de água e as propriedades de resistência à tração e alongamento na ruptura. Destaca-se que a comparação direta das propriedades deve, no entanto, ser feita com cautela, visto que as massas de polissacarídeos empregadas diferem grandemente.

Tabela 2.4: Comparação entre algumas propriedades de membranas compostas somente de quitosana e membranas de quitosana-alginato (adaptada de Rodrigues, 2008).

Ensaio	Membrana de Quitosana	Membrana de quitosana-alginato 1:1
Espessura da amostra seca (μm)	152,0	78,0
Aumento de espessura após hidratação (%)	32,9	711,5
Capacidade de absorção de água (g/g)	1,0	19,0
Capacidade de absorção de soro fetal bovino (%)	2,0	5,0
Perda de massa em água (%)	4,0	21,0
Perda de massa em soro fetal bovino (%)	3,0	3,0
Drenagem de água ($\text{g}/\text{m}^2\cdot\text{dia}$)	10,0	13,6
Resistência à tração (MPa)	44,0	28,0
Alongamento na ruptura (%)	14,0	8,0

Uma alternativa para o reforço mecânico das membranas de quitosana-alginato é a adição de agentes reticulantes iônicos adicionais ou a inclusão de agentes reticulantes

covalentes, que poderiam promover interações em maior número ou mais intensas entre as cadeias poliméricas da membrana.

Outra alternativa é o uso de surfatantes para se obter uma melhor dispersão dos agregados poliméricos, os quais formariam membranas mais homogêneas e, hipoteticamente, com melhores propriedades mecânicas. A reticulação seria, em consequência, indiretamente facilitada pelos surfatantes, uma vez que os agentes reticulantes também teriam maior facilidade de dispersão no meio reacional. Alguns surfatantes considerados seguros por sua biocompatibilidade são o Span 80, o Tween 80 e o Pluronic F68.

O uso de agentes plastificantes nas membranas poliméricas é também uma alternativa para aumentar a adequação mecânica das mesmas. Os plastificantes agem através da redução das forças intermoleculares, suavizando a rigidez da estrutura e aumentando a mobilidade das cadeias poliméricas. Desta forma, estes compostos aumentam o alongamento na ruptura e reduzem a resistência à tração das membranas. Os agentes plastificantes mais utilizados são glicerol, sorbitol, eritrol, ácido láctico e polietilenoglicol (Veiga, 2009). Em um estudo realizado pelo grupo de pesquisa, Rodrigues (2008) e Pereira *et al.* (2008) avaliaram a incorporação de glicerol em membranas de quitosana e alginato. Verificou-se uma influência negativa do plastificante sobre as propriedades mecânicas e a capacidade de absorção de água em comparação às membranas obtidas por Rodrigues *et al.* (2008), na ausência de glicerol. Aparentemente, o plastificante foi removido da estrutura da membrana durante a etapa de reticulação secundária com íons cálcio por solubilização, não havendo incorporação efetiva do mesmo.

A reticulação térmica, aplicada em substituição à reticulação iônica, foi empregada por Bernabé *et al.* (2005), que reticularam membranas de quitosana e pectina, expondo-as à temperatura de 120°C em atmosfera de nitrogênio. Este tratamento converte as ligações iônicas formadas entre os grupamentos amino da quitosana e carboxila da pectina em ligações amídicas. Entretanto, os autores notaram que o uso deste método não melhorou as propriedades mecânicas das membranas obtidas. Um estudo de reticulação térmica em membranas de quitosana e alginato realizado pelo grupo de pesquisa (Carrasque e Moraes, 2009) também concluiu que este tratamento não tem influência

positiva sobre as propriedades de resistência à tração e alongamento na ruptura.

A incorporação de nanofibras de quitina a membranas de quitosana mostrou-se um método de melhorar as propriedades mecânicas de acordo com o trabalho de Shelma *et al.* (2008), no qual obtiveram-se valores de resistência à tração de até 59,5MPa e alongamento na ruptura de até 7,05%. Nota-se que a resistência à tração destas membranas é superior à de membranas compostas somente por quitosana produzidas por Rodrigues (2008), que obteve o valor de 44MPa. Já os valores de alongamento na ruptura são semelhantes entre os dois tipos de membrana. Não foi encontrado nenhum estudo na literatura a respeito do uso desta abordagem de incorporação de nanofibras de quitina em membranas de quitosana-alginato, o que se mostra uma alternativa interessante para estudos futuros dentro do grupo de pesquisa.

As abordagens que foram testadas no presente trabalho, e que são mais detalhadamente enfocadas a seguir, são a reticulação iônica, a reticulação covalente e a melhora da dispersão dos polissacarídeos pelo uso de tensoativos.

2.4.1. Adição de agentes reticulantes

2.4.1.1. Reticulação iônica

Como explicado no item 2.1.3, as cadeias do alginato, em pH adequado para a formação de PEC com quitosana, apresentam grupamentos negativamente carregados ($-\text{COO}^-$). Assim, se sais de cátions multivalentes, como Ca^{2+} , entrarem em contato com o PEC, haverá atração eletrostática entre as cadeias poliméricas do alginato cujas carboxilas não interagiram com a quitosana (Jay e Saltzman, 2009).

Os íons cálcio (Ca^{2+}) são os mais usados como agentes reticulantes, pois resultam em um produto clinicamente seguro e com propriedades funcionais. Nos trabalhos de Kucharska *et al.* (2008) e Notara *et al.* (2008) observou-se que estes íons, além de reticular os filmes polissacarídicos, possuem capacidade de ativar plaquetas e acelerar o processo de cicatrização.

Sr^{2+} , Ba^{2+} e Zn^{2+} também apresentam capacidade de reticular o alginato. O Zn^{2+} age menos especificamente do que outros íons, formando ligações entre os blocos G

(GG), entre os blocos M (MM) e entre os blocos M e G (MG); Ca^{2+} e Sr^{2+} formam ligações predominantemente GG e Ba^{2+} não faz ligações MM e GG. Apesar da aparente melhor capacidade reticulante do zinco, este íon não é muito estudado devido à maior biocompatibilidade do cálcio (Jay e Saltzman, 2009).

Com relação à quitosana, que possui terminais amino positivamente carregados ($-\text{NH}_3^+$), ânions ou moléculas aniônicas são responsáveis pela sua reticulação. Similarmente ao que ocorre com o alginato, os íons multivalentes formam pontes entre as cadeias poliméricas, através da atração eletrostática com os terminais amino da quitosana. Um ânion de utilização comum para este fim é o sulfato, que pode ser proveniente do ácido sulfúrico, ou de sais como o sulfato de amônio (Karakeçili *et al.*, 2007).

2.4.1.2. Reticulação covalente

Tanto a quitosana como o alginato podem ser covalentemente reticulados por dialdeídos, como o glutaraldeído, ou 1,5-pentanodial ($\text{OHC}-(\text{CH}_2)_3-\text{COH}$). A reação deste reticulante com a quitosana é bem documentada. Os grupos aldeído formam ligações duplo-etilênicas com os grupos amino da quitosana via reação de Schiff (Berger *et al.*, 2004; Monteiro e Airoldi, 1999; Beppu *et al.*, 2007). O glutaraldeído também reage com os grupos hidroxila presentes nos dois polissacarídeos (Berger *et al.*, 2004; Svang-Ariyaskul *et al.*, 2006). Em um estudo de Yeom e Lee (1998), análises de infra-vermelho realizadas em membranas de alginato reticuladas covalentemente com glutaraldeído evidenciaram a formação de ligações éter e o surgimento de anéis acetal.

O uso deste agente bifuncional pode bloquear os grupos amino e tornar a quitosana mais inerte e resistente a meios ácidos, alterando também sua absorção de água, permeabilidade e propriedades mecânicas (Beppu *et al.*, 2007). Com relação ao alginato, o glutaraldeído pode reduzir a solubilidade e melhorar o desempenho em processos de separação por pervaporação (Yeom e Lee, 1998).

Apesar de tóxico, o glutaraldeído pode ser empregado na produção de membranas para tratamento de lesões de pele, desde que o excesso não-reagido deste composto esteja presente em quantidades insignificantes. Wittaya-Areekul e Prahsarn (2006) produziram curativos de quitosana contendo polipropilenoglicol, amido de milho ou dextrana na forma de membranas, reticulados com uma pequena quantidade de

glutaraldeído. A membrana não foi lavada após o tratamento. A quantidade residual de glutaraldeído foi analisada por CG-MS após a dissolução da membrana, não se detectando o composto livre. De acordo com Scherr (2007), testes *in vivo* de membranas de quitosana tratadas com glutaraldeído mostraram que o material não apresenta citotoxicidade.

2.4.2. Adição de surfatantes

Sistemas contendo surfatantes e polímeros solúveis em água possuem uma ampla gama de aplicações. Os surfatantes podem ser empregados para alcançar diferentes objetivos: estabilidade coloidal, emulsificação, floculação, estruturação, suspensão, controle da reologia, mas em alguns casos busca-se um efeito sinérgico. A combinação entre polímeros e surfatantes é encontrada em produtos diversos como cosméticos, tintas, detergentes, alimentos, formulações farmacêuticas e de pesticidas (Holmberg *et al.*, 2002). No caso de aplicação na pele, surfatantes não-iônicos, como Span 80, Tween 80 e Pluronic F68, são considerados mais adequados do que os surfatantes iônicos, por serem menos prejudiciais à pele em formulações cosméticas (Rhein *et al.*, 2007).

2.4.2.1. Span 80

Os ésteres de sorbitan são surfatantes não-iônicos importantes. Entre os mais utilizados estão os da série Span (ésteres de sorbitan acilados) e os da série Tween (derivados do polioxietileno-sorbitol) (Lu *et al.*, 2000). O Span 80, ou monooleato de sorbitan 80, tem massa molar de 428,6g/mol (Sigma-Aldrich, 2009 a). Sua estrutura química encontra-se ilustrada na Figura 2.5.

Este surfatante apresenta-se na forma de um líquido marrom claro e viscoso (Sigma-Aldrich, 2009 a) e é conhecido por sua aplicação como componente de cremes, loções cosméticas e emulsificantes de alimentos. Sua síntese se dá pela reação de sorbitol com ácidos graxos (principalmente ácido oléico) a uma temperatura elevada (Kato *et al.*, 2008).

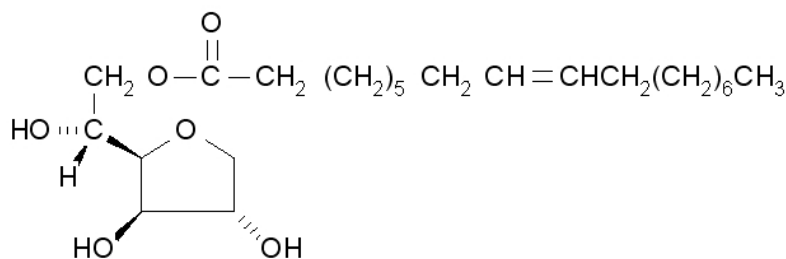


Figura 2.5: Estrutura química do Span 80 (Sigma-Aldrich, 2009 a).

Existem muitos trabalhos na literatura que citam o uso do Span 80 em associação com polissacarídeos, principalmente em processos de fabricação de microcápsulas poliméricas. Ribeiro *et al.* (1999) utilizaram uma blenda de Span 80 e Tween 80 como dispersante na fabricação de microcápsulas de quitosana-alginato contendo óleo de soja e um marcador lipofílico. Liu e Deng (2002) também usaram Span 80 e Tween 80 para melhorar a encapsulação de DNA em microesferas de poli(DL-ácido láctico-polietilenoglicol) utilizadas para a liberação controlada de genes. Em dois trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa, Rodrigues (2004) e Sacchetin (2009) produziram micropartículas de alginato e de quitosana-alginato, respectivamente, para aplicação na imunização de peixes do tipo Tilápia do Nilo por via oral. Em ambos os trabalhos foi avaliado o uso de Span 80 como agente emulsificante, verificando-se um bom desempenho do mesmo, que contribuiu para aumentar a esfericidade das partículas.

2.4.2.2. Tween 80

Os tensoativos da classe Tween representam uma família de surfatantes não-iônicos derivados do polioxietileno-sorbitol. Na estrutura química desta família, o número de grupos polioxietileno é sempre constante (20), variando a composição da cadeia de hidrocarbonetos (Preté, 2000).

Na Figura 2.6, tem-se a estrutura química do Tween 80, ou polisorbato 80, o qual é derivado do ácido oléico, possuindo massa molar de 1310g/mol (Sigma-Aldrich, 2009 b).

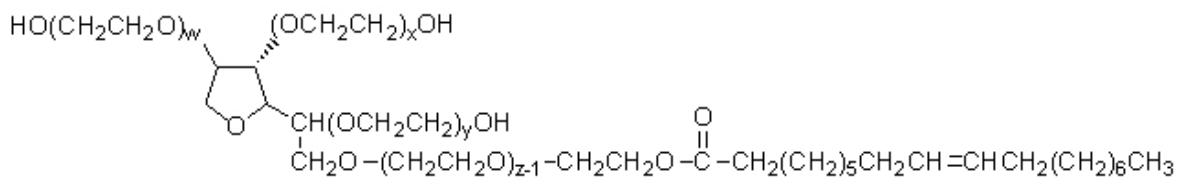


Figura 2.6: Estrutura química do Tween 80, para o qual $x+y+w+z=20$ (Sigma-Aldrich, 2009 b).

Os surfatantes da série Tween apresentam emprego muito variado, sendo utilizados como coadjuvantes em preparações medicamentosas antitumorais e como estabilizantes de preparações injetáveis contendo, por exemplo, insulina. Observa-se também a aplicação dos tensoativos desta classe na indústria alimentícia, como aditivos, e em cosméticos, no preparo de emulsões para aplicação tópica (Preté, 2000).

O Tween 80 apresenta-se na forma de um líquido de cor castanha, viscoso e inodoro, o qual se solubiliza facilmente em água e etanol (Labsynth, 2009). Assim como o Span 80, também é utilizado na produção de partículas poliméricas. Morello *et al.* (2007) testou sete tipos de surfatantes e selecionou Tween 80 por sua hidrofilicidade e habilidade de produzir uma dispersão estável de partículas de PMMA-Fe₂O₃.

2.4.2.3. Pluronic F68

Os tensoativos da classe dos Pluronic ou Poloxamers são copolímeros de polioxietileno e polioxipropileno. Sua estrutura química consiste em um bloco central de polioxipropileno, o qual é relativamente hidrofóbico, cercado dos dois lados por blocos de polioxietileno, o qual é relativamente hidrofílico. A estrutura química geral dos Pluronic é mostrada na Figura 2.7 (Sigma-Aldrich, 2009 c; Karmarkar *et al.*, 2008).

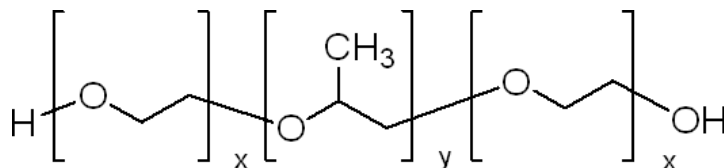


Figura 2.7: Estrutura química dos Pluronic (Sigma-Aldrich, 2009 c).

Devido à variação dos índices x e y mostrados na Figura 2.7, existem vários tipos de Pluronic, os quais se apresentam em diferentes formas físicas. A designação dos Pluronic é feita do seguinte modo: F para flocos, P para pasta e L para líquido (Karmarkar *et al.*, 2008). Particularmente, o Pluronic F68 apresenta-se na forma de um pó branco, sem cheiro ou sabor. Seus índices x e y correspondem a 80 e 27, respectivamente (Karmarkar *et al.*, 2008), e sua massa molar é em média 8350g/mol (Sigma-Aldrich, 2009 c).

Os Pluronic são muito usados na indústria farmacêutica devido a sua termorreversibilidade e ampla compatibilidade com diversas formulações medicamentosas. Estas características fazem destes surfatantes ótimos veículos para liberação controlada de medicamentos. Este surfatante é aprovado pela FDA para uso na composição de produtos de higienização da pele e, segundo um estudo realizado com mais de 1000 pacientes que apresentavam lesões dérmicas, a aplicação de Pluronic F68 sobre as feridas não causou reações adversas, prevenindo a ocorrência de infecções (Rodeheaver *et al.*, 1980). Ainda, de acordo com Karmarkar *et al.* (2008), vários artigos citam o uso dos Pluronic em formulações de géis, emulsões água-óleo e óleo-água, nanopartículas e blendas poliméricas sólidas. Particularmente, o Pluronic F68 é um aditivo comum em meios de cultura de células em larga escala, funcionando como um agente protetor contra o cisalhamento (Galesi, 2007). Um estudo interessante feito com Pluronic F68 foi o de Park *et al.* (2009), que desenvolveram um hidrogel injetável de quitosana-Pluronic como carreador de células para regeneração de cartilagem.

2.5. Análise conclusiva da literatura consultada

Tendo em vista os tópicos abordados nesta revisão bibliográfica, verifica-se a importância do desenvolvimento de novos tipos de coberturas de lesões de pele, cuja matéria-prima seja de fácil acesso. Membranas de quitosana-alginato apresentam potencial aplicação no tratamento de lesões com alta produção de exsudato, sendo necessário, porém, melhorar suas propriedades mecânicas de modo que estas possam ser empregadas em regiões do corpo humano que requeiram esforço mecânico considerável.

O uso de agentes reticulantes para o reforço da estrutura de membranas e partículas de quitosana-alginato se faz presente na literatura. Porém, nenhum estudo comparativo entre a reticulação iônica e covalente foi localizado. Da mesma forma, não

foram localizados trabalhos referentes à dupla-reticulação de membranas com íons cálcio e sulfato. O emprego de surfatantes para melhorar a dispersão polimérica também se constitui em um estudo inédito e apresenta potencial para formar membranas com melhor aspecto e propriedades mecânicas. Assim, neste trabalho, essas diferentes estratégias de reforço mecânico foram testadas nas membranas de quitosana-alginato, produzidas de acordo com o método desenvolvido por Rodrigues *et al.* (2008).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Para a obtenção das membranas de quitosana-alginato, os principais reagentes utilizados foram quitosana com grau de desacetilação mínimo de 85% e alginato de sódio de baixa viscosidade, ambos da Sigma Chemical Co. De acordo com o fornecedor, o grau de desacetilação médio da quitosana é de 98% não havendo dados a respeito da massa molar do polímero. Já o alginato apresenta massa molar entre 12000 e 80000 g/mol. A proporção entre os blocos M e G seria de aproximadamente 1,78 (Panikkar e Brasch, 1996).

Outros reagentes utilizados foram ácido acético glacial, acetona e Tween 80 da Synth, cloreto de cálcio dihidratado, sulfato de amônio e hidróxido de sódio da Merck, Span 80 da Fluka, Pluronic F68 da Sigma Chemical Co. e glutaraldeído (solução aquosa a 25%) da Nuclear.

Os equipamentos para a produção das membranas foram um reator de aço inoxidável encamisado com diâmetro interno de 10cm e altura de 20cm, uma bomba de infusão ST 670 T da Samtronic acoplada a uma seringa de vidro BD 50 da Artiglass de 50ml de capacidade, uma estufa com circulação de ar 410D da Nova Ética, uma plataforma giratória com diâmetro de 25cm da Autoart, um banho ultratermostático Q-214 M2, um agitador mecânico Q-251 D com hélice do tipo pás inclinadas de raio de 2,1cm e uma bomba de vácuo Q-355B2 da Quimis.

3.2. Métodos

Para o preparo das membranas de quitosana-alginato utilizou-se como base o método proposto por Rodrigues (2008), sumarizado em Rodrigues *et al.* (2008). Este método é fundamentado na formação de agregados poliméricos através da lenta adição de uma solução de quitosana a uma solução de alginato, sob agitação. Este método sofreu algumas modificações neste trabalho, na tentativa de aumentar a escala do processo, facilitar a produção e melhorar o aspecto e as propriedades mecânicas das membranas.

3.2.1. Preparo das membranas visando à ampliação da escala produtiva

O procedimento de partida foi descrito em detalhes por Rodrigues (2008), que utilizava, para a obtenção das membranas, um reator de vidro Pyrex encamisado de 5cm de diâmetro interno e 7cm de altura. A primeira modificação feita com relação a este protocolo foi um aumento de escala do processo, utilizando-se um reator de aço inoxidável encamisado com diâmetro interno de 10cm e altura de 20cm. Esta alteração permitiu a obtenção de duas membranas por batelada, sendo os volumes das soluções utilizados por Rodrigues *et al.* (2008), que eram de 90ml para as soluções de quitosana e alginato a 0,5%, simplesmente duplicados. O sistema utilizado neste trabalho para a produção das membranas encontra-se na Figura 3.1.



Figura 3.1: Sistema utilizado na preparação da mistura polimérica formadora das membranas

Inicialmente, foram preparadas as seguintes soluções: alginato a 0,5% (m/v) em água milli-Q, quitosana a 1% (m/v) em solução aquosa de ácido acético a 2% (v/v), NaOH a 1M e CaCl_2 a 2% (m/v). Estas soluções foram armazenadas em geladeira por cerca de 24 horas antes do uso.

Para a obtenção das membranas, colocou-se uma alíquota de 180ml da solução

de alginato no reator. A seguir, em separado, misturou-se uma alíquota de 90ml da solução de quitosana a 90ml acetona. Esta mistura foi colocada na seringa de vidro e adicionada lentamente à solução de alginato com auxílio da bomba de infusão, a uma vazão de 80ml/h, duplicando-se, assim, a vazão de adição utilizada por Rodrigues *et al.* (2008), que era de 40ml/h. Foram também testadas as vazões de 120 e 160ml/h, com o objetivo de verificar a viabilidade de acelerar o processo de produção. Durante o gotejamento, o sistema foi mantido sob agitação constante de 100 a 500rpm e temperatura de 25°C. Ao término do gotejamento, aumentou-se a taxa de agitação para 1000rpm e a mistura foi agitada por mais 10 minutos. A seguir, adicionou-se 16,8ml de NaOH a 1 M, visando ajustar o pH para o valor de 5,28 (pH no qual a quitosana apresenta-se protonada e o alginato, desprotonado), mantendo-se a agitação do sistema em 1000rpm por mais 10 minutos. Por fim, 3,6ml de CaCl₂ a 2% (m/v) foram adicionados ao sistema, o qual permaneceu sob agitação por mais 10 minutos, para que ocorresse a complexação das carboxilas remanescentes com os íons Ca²⁺.

Após a etapa de reação, a mistura polimérica obtida foi colocada em um kitassato e desaerada em bomba de vácuo por 90 minutos. Em seguida, a mistura foi dividida igualmente em termos mássicos em duas placas de Petri de poliestireno de 15cm de diâmetro e levada à estufa com circulação de ar a 37°C por 20 horas. Devido ao fluxo de ar desigual dentro da estufa, nas primeiras duas horas de secagem as placas foram giradas em sentido horário de 30 em 30 minutos em um ângulo de 90° para favorecer a obtenção de membranas homogêneas.

Ao término da secagem, cada membrana foi imersa em 150ml de CaCl₂ a 2% por uma hora para reticular as cadeias de alginato que ainda se encontravam livres. Para a retirada do CaCl₂ em excesso foram feitas mais duas imersões de uma hora em 200ml de água deionizada. A secagem final foi realizada em temperatura ambiente por 24 horas, sendo as bordas das membranas presas para evitar encolhimento excessivo.

Ao final deste processo, as membranas obtidas foram esterilizadas com óxido de etileno a 30% (Oxyfume-30) na empresa Acecil Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda (Campinas, SP) sob as seguintes condições: vácuo de 400mmHg, tempo de exposição das amostras ao gás de 8 horas, pressão de 0,5kgf/cm², umidade entre 40 e 50%, temperatura de 40°C e aeração de três trocas com nitrogênio. Antes de sua

utilização, as amostras esterilizadas foram armazenadas por um período mínimo de 72 horas, para garantir a saída dos gases residuais da esterilização, conforme recomendação da empresa. Previamente à esterilização, as amostras foram colocadas em embalagens apropriadas constituídas por uma face plástica e outra de papel, fornecidas pela própria empresa de esterilização, sendo tais embalagens seladas a quente.

Alternativamente, testou-se a produção das membranas de quitosana-alginato utilizando uma taxa de agitação única de 500rpm ao longo do processo, ao invés de se empregar a taxa de agitação de 1000rpm após o término do gotejamento, de forma a minimizar a ruptura das fibras e agregados formados.

Em uma terceira etapa, avaliou-se também a substituição do agitador de três pás inclinadas por um de âncora perfurada, ambos ilustrados na Figura 3.2, o qual permitia a obtenção de um vórtice maior na mistura, e poderia, desta forma, levar a membranas mais homogêneas.

Finalmente, avaliou-se a viabilidade do uso de uma plataforma giratória automática na etapa de secagem da mistura a 37°C. Esta plataforma evitou que as membranas tivessem que ser giradas manualmente nas duas primeiras horas de secagem, permitindo, em adição, a mudança de posicionamento com frequência muito superior à da condição anterior.

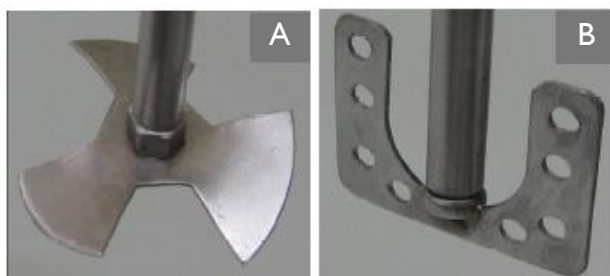


Figura 3.2: Agitadores utilizados neste trabalho: (A) três pás inclinadas, (B) âncora perfurada.

3.2.2. Estudo de reticulação com glutaraldeído

A reticulação covalente com glutaraldeído consistiu na imersão de membranas não reticuladas ionicamente (preparadas, portanto, na ausência de CaCl_2 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) em 150ml de solução de glutaraldeído com concentração mássica variando de 0,5 a 2,0% (m/v)

por períodos de 30 minutos à temperatura ambiente. Após a reticulação, as membranas foram lavadas por quatro vezes em 150ml de água, sendo os tempos de imersão de 30 minutos, para remoção do excesso de glutaraldeído. As membranas resultantes foram comparadas entre si, e também com membranas reticuladas através de outros métodos.

3.2.3. Estudo com diferentes agentes reticulantes iônicos

Esta etapa do trabalho consistiu na reticulação de membranas de quitosana-alginato com os agentes CaCl_2 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sozinhos ou em conjunto. Para reticular as membranas, 3,6ml de solução salina com concentração variando de 0,05 a 0,36M foram adicionados ao sistema na etapa de reação. Após a secagem, as membranas foram imersas em 150ml da mesma solução que havia sido adicionada. No caso da dupla reticulação, 3,6ml de cada solução foram adicionados em sequência ao sistema reacional. A adição sempre era feita na seguinte ordem: primeiro a solução contendo SO_4^{2-} seguida da solução contendo Ca^{2+} . Esta ordem foi estabelecida devido ao maior poder reticulante observado para o Ca^{2+} , o qual provocava o aumento da viscosidade da mistura após 10 minutos de agitação. Desta forma, permitiu-se que os íons SO_4^{2-} tivessem contato suficiente com a mistura polimérica. Após a secagem, as membranas foram imersas em dois banhos de 1 hora cada, primeiro em solução de CaCl_2 seguido por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, nas mesmas concentrações em que haviam sido adicionados ao sistema. Esta ordem, inversa à de adição das soluções ao sistema, evitou uma possível solubilização das membranas em solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, de baixo poder de reticulação.

A faixa de concentração testada foi estabelecida com base em experimentos anteriores de Rodrigues *et al.* (2008), que utilizaram a concentração de 0,18M de CaCl_2 para a reticulação das membranas de quitosana-alginato. Optou-se por abordar concentrações menores e maiores do que essa para ambos os agentes de reticulação, de maneira que a mesma se encontrasse em posição intermediária.

Os efeitos das diferentes concentrações salinas foram comparados através de um planejamento experimental em estrela, como mostrado na Tabela 3.1, de forma a verificar quais condições melhorariam as características das membranas. Os valores nulos na matriz de planejamento, apesar de significarem a ausência de uma das variáveis, podem estar presentes, desde que as análises sejam feitas com os dados codificados. Desta forma, a

variável original nula não tem implicações no tratamento estatístico.

Tabela 3.1: Planejamento experimental em estrela empregado para avaliação de diferentes condições de reticulação iônica.

Experimento	CaCl ₂		(NH ₄) ₂ SO ₄	
	Nível	Concentração (mol/l)	Nível	Concentração (mol/l)
1	-1	0,05	-1	0,05
2	1	0,31	-1	0,05
3	-1	0,05	1	0,31
4	1	0,31	1	0,31
5	0	0,18	0	0,18
6	0	0,18	0	0,18
7	0	0,18	0	0,18
8	-1,41	0,00	0	0,18
9	1,41	0,36	0	0,18
10	0	0,18	-1,41	0,00
11	0	0,18	1,41	0,36

3.2.4. Preparo das membranas na presença de surfatantes

Na tentativa de melhorar a homogeneidade e, conseqüentemente, as propriedades mecânicas das membranas de quitosana-alginato, tornando as fibras poliméricas mais bem distribuídas, Tween 80, Span 80 e Pluronic F68 foram adicionados à mistura reacional na proporção de 0,5%.

Para o preparo das membranas com Span 80 ou Tween 80, 1,8ml destes surfatantes foram adicionados a 180ml de solução de alginato a 0,5%, previamente à adição desta ao reator. As outras etapas seguiram de acordo com o item 3.2.1, empregando-se vazão de 160 ml/h, taxa de agitação inicial de 500 rpm seguida por 1000 rpm e impelidor de três pás inclinadas. As membranas foram secas em estufa com auxílio da plataforma giratória.

Já para o preparo das membranas com Pluronic F68, que se apresenta na forma

de pó, 1,8g do surfatante foram misturados a 180ml de solução de alginato a 0,5%, previamente a sua adição ao reator. As outras etapas do procedimento seguiram normalmente como para as membranas com Span 80 ou Tween 80.

A condição de reticulação das membranas com surfatantes foi a mesma que havia sido utilizada por Rodrigues *et al.* (2008), CaCl_2 a 0,18M.

3.2.5. Caracterização das membranas

As membranas obtidas foram caracterizadas de acordo com os procedimentos descritos a seguir, com base no trabalho de Rodrigues *et al.* (2008).

3.2.5.1. Aspecto

As membranas foram inspecionadas quanto ao aspecto a olho nu e fotografadas com câmera digital.

3.2.5.2. Morfologia da superfície e da secção transversal

A morfologia das membranas foi avaliada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) em microscópio modelo LEO 440, Leica.

As membranas foram previamente cortadas em corpos de prova de 2 cm x 1 cm, com auxílio de um molde de vidro, e deixadas em dessecador por 24 horas. Após este período, as amostras foram fixadas em um suporte adequado e metalizadas (mini Sputter coater, SC 7620) através da deposição de uma fina camada de ouro (espessura de 92 Angstroms) em suas superfícies.

Para a obtenção das imagens da secção transversal, as amostras foram fraturadas em nitrogênio líquido antes de sua metalização.

3.2.5.3. Espessura

As espessuras das membranas em equilíbrio com a umidade ambiente foram medidas com micrômetro Digimess através de quatro medições de 90 em 90°, ao longo

da extensão da membrana.

Para a medida da espessura das membranas úmidas, estas foram deixadas em banho de água Milli-Q a 37°C por um período de 24 horas, tempo necessário para atingir um valor de espessura aproximadamente constante.

3.2.5.4. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas das membranas foram determinadas com base em adaptações no método ASTM D882 realizadas por Rodrigues *et al.* (2008), utilizando uma Máquina Universal de Ensaio Tinius Olsen, modelo H5K-5, localizada na Faculdade de Engenharia Mecânica da UNICAMP.

As membranas foram previamente cortadas em corpos de prova de dimensões 8 cm x 1 cm, os quais foram fixados nos mordentes da Máquina Universal de Ensaio e alongados a uma taxa de deformação constante de 10 mm/min, utilizando-se uma célula de carga de 200 N e uma distância entre garras de 45 mm. O local onde os ensaios foram realizados, apesar de dispor de condicionamento de ar, não dispunha de sistema de controle da umidade ambiente.

Destaca-se que não foi localizada na literatura consultada uma norma de padronização das condições que devem ser utilizadas nos ensaios mecânicos de curativos. Muitos autores relatam o uso de diferentes tamanhos de amostras, taxas de deformação, células de carga e distâncias entre garras. Contudo, um ensaio realizado em um texturômetro TA.XT2 (Stable Microsystems SMD), utilizando-se amostras de dimensões 8 cm x 2,54 cm, taxa de deformação de 1 mm/min, célula de carga de 50N e distância entre garras de 50 mm, forneceu resultados de resistência à tração e alongamento na ruptura (para amostras de mesma formulação) semelhantes aos valores obtidos em um ensaio realizado de acordo com as condições utilizadas por Rodrigues *et al.* (2008) e também empregadas na realização do presente trabalho.

Os ensaios foram realizados com 10 corpos de prova para cada tipo de membrana, visto que ocorrem muitas rupturas prematuras no material em decorrência de eventuais problemas de dispersão pouco homogênea dos agregados poliméricos nas amostras e da retenção de bolhas durante o processamento.

3.2.5.5. Capacidade de absorção de água e de soluções aquosas

A capacidade de absorção das membranas foi determinada em água, solução salina 0,9%, fluido corpóreo simulado (FCS) e soro fetal bovino (SFB) da Nutricell Nutrientes Celulares Ltda.

As membranas foram previamente cortadas em corpos de prova de dimensões 6 cm x 1 cm, sendo os ensaios realizados em triplicata. Cada corpo de prova foi pesado em balança analítica, para determinação de sua massa inicial, e posteriormente hidratado com 10ml das referidas soluções por 24 horas em estufa a 37°C. Após este período, o excesso de solvente foi removido com papel de filtro e as amostras foram novamente pesadas para determinação de sua massa úmida.

A capacidade de absorção de água e soluções aquosas foi determinada segundo a Equação 1:

$$C_w = \frac{(M_u - M_i)}{M_i} \quad \text{(Equação 1)}$$

onde M_i refere-se à massa inicial da amostra em equilíbrio com o ambiente e M_u refere-se à massa da amostra úmida.

O fluido corpóreo simulado foi preparado em solução tampão TRIS-HCl, sendo o pH final da solução ajustado para 7,4, de acordo com o método proposto por Kokubo *et al.* (1990). A composição do fluido corpóreo simulado (FCS), assim como a do plasma humano, para fins comparativos, encontram-se listadas na Tabela 3.2.

3.2.5.6. Perda de massa em água e em soluções aquosas

A perda de massa foi avaliada em água, solução salina 0,9%, fluido corpóreo simulado (FCS) e soro fetal bovino (SFB).

Para a realização destes ensaios, as membranas foram cortadas em corpos de prova de dimensões 6 cm x 1 cm, sendo os ensaios realizados em triplicata. Primeiramente, os corpos de prova foram pesados em balança analítica para determinação da sua massa seca inicial. Os corpos de prova foram então imersos em 10ml das referidas soluções por um período de uma semana a 37°C. Após este período, as amostras foram retiradas e secas em estufa a 37°C até atingirem massa seca constante (por 24 horas, no

caso das membranas sem surfatantes, ou por 72 horas, no caso das membranas com surfatantes, devido a sua maior capacidade de absorção de fluidos e consequente dificuldade de secagem).

A perda de massa foi determinada através da Equação 2:

$$M_p = \frac{(M_i - M_f)}{M_i} \times 100 \quad \text{(Equação 2)}$$

onde M_i refere-se à massa seca inicial e M_f refere-se à massa seca final após o período de incubação nas soluções.

Tabela 3.2: Composição iônica do fluido corpóreo simulado e do plasma humano (Kokubo *et al.*, 1990).

Íon	Concentração (mM)	
	FCS	Plasma humano
Na ⁺	142,0	142,0
K ⁺	5,0	5,0
Mg ²⁺	1,5	1,5
Ca ²⁺	2,5	2,5
Cl ⁻	148,8	103,0
HCO ₃ ⁻	4,2	27,0
HPO ₄ ²⁻	1,0	1,0
SO ₄ ²⁻	0,5	0,5

3.2.5.7. Análise elementar

Análises de EDS (espectrometria por dispersão de energia) foram realizadas para detectar a presença de reticulantes nas amostras. As membranas foram previamente cortadas em corpos de prova de 2 cm x 1 cm, com auxílio de um molde de vidro, e deixadas em dessecador por 24 horas. Após este período, as amostras foram fixadas em um suporte adequado e sua composição foi analisada no microscópio modelo LEO 440, Leica.

3.2.6. Análise estatística

O software *Statistica 7*[®] foi utilizado para analisar os resultados numéricos referentes às propriedades das membranas, empregando-se o teste de comparação de médias de Tukey com nível de significância de 5%. A análise do planejamento experimental também foi realizada com auxílio deste software.

Todos os resultados são expressos como a média das medidas experimentais, calculadas com, no mínimo, três amostras independentes. Cada valor médio é acompanhado de seu respectivo erro padrão, o que é indicado para realizar comparações entre médias de diferentes populações (Paes, 2008).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados referentes às membranas de quitosana-alginato obtidas com aumento de escala do processo, entre outras modificações feitas nos parâmetros de processamento utilizados anteriormente por Rodrigues *et al.* (2008). Também serão mostrados os resultados referentes às membranas reticuladas covalentemente com glutaraldeído e ionicamente com íons cálcio e sulfato. Por fim, serão apresentados os resultados referentes ao uso de surfatantes sobre o aspecto e propriedades das membranas.

4.1. Comportamento observado no estudo do escalonamento do processo de produção das membranas

Nos ensaios de escalonamento do processo de produção de membranas de quitosana-alginato, procurou-se verificar se a utilização de um reator de maior capacidade, além do uso de vazão e taxa de agitação inicial maiores causariam modificações significativas nas propriedades das membranas produzidas em relação às obtidas por Rodrigues *et al.* (2008). Por envolver a mistura de soluções viscosas e a formação de agregados, tanto aspectos de transferência de massa e de quantidade de movimento quanto potenciais questões cinéticas devem ser considerados.

Inicialmente, percebeu-se que o uso de uma agitação inicial de 100rpm não levou a uma mistura adequada entre os polímeros, sendo que estes aderiam às pás do agitador. Portanto, a agitação inicial de 500rpm foi utilizada nos ensaios subsequentes.

Nas condições de agitação inicial de 500rpm e vazão de adição de 80ml/h, as membranas obtidas mostraram-se homogêneas. No estudo de aumento de vazão, as membranas resultantes mostraram-se com aspecto similar à obtida a 80ml/h. A Figura 4.1 mostra as membranas de quitosana-alginato obtidas com as vazões de 80, 120 e 160ml/h.

Com o intuito de verificar possíveis diferenças nas propriedades das membranas produzidas a diferentes vazões, foram avaliadas a espessura, a absorção e perda de massa em água, a resistência à tração e o alongamento na ruptura. A Tabela 4.1 mostra os valores encontrados para estas membranas com seus respectivos erros padrão.



Figura 4.1: Membranas obtidas com aumento de escala: (A) 80ml/h, (B) 120ml/h, (C) 160ml/h.

Tabela 4.1: Propriedades das membranas de quitosana-alginato obtidas com aumento de escala.

Propriedade	Vazão de preparação (ml/h)			
	40*	80	120	160
Espessura seca (μm)	$78,00 \pm 17,76^{(a)}$	$77,50 \pm 8,45^{(a)}$	$68,13 \pm 4,62^{(a)}$	$100,83 \pm 17,67^{(a)}$
Espessura úmida (μm)	$633,00 \pm 21,68^{(b)}$	$204,38 \pm 19,03^{(c)}$	$220,00 \pm 16,64^{(c)}$	$215,00 \pm 13,53^{(c)}$
Absorção de água (g/g)	$19,20 \pm 0,61^{(d)}$	$8,97 \pm 1,00^{(e)}$	$6,78 \pm 1,97^{(e)}$	$5,67 \pm 0,53^{(e)}$
Perda de massa (%)	**	$7,01 \pm 1,39^{(f)}$	$6,74 \pm 0,55^{(f)}$	$6,84 \pm 0,69^{(f)}$
Resistência à tração (MPa)	$27,7 \pm 2,87^{(g)}$	$9,52 \pm 1,81^{(h)}$	$5,91 \pm 1,14^{(h)}$	$10,97 \pm 1,97^{(h)}$
Alongamento na ruptura (%)	$8,42 \pm 2,82^{(i)}$	$3,28 \pm 0,29^{(j,k)}$	$3,85 \pm 0,18^{(l)}$	$2,80 \pm 0,20^{(k)}$

Mesma letra na mesma linha indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

*Valores obtidos por Rodrigues *et al.* (2008), utilizando taxa de agitação inicial de 100 rpm e volume de reação de 180 ml (metade do utilizado neste trabalho).

**O valor de perda de massa não pôde ser comparado entre os diferentes trabalhos, uma vez que a perda de massa foi medida por Rodrigues *et al.* (2008) após imersão em água por 43 dias a 4°C.

Os resultados para as diferentes vazões foram comparados entre si através do teste de Tukey. Notou-se que para as vazões utilizadas neste trabalho não houve diferença significativa entre os valores médios, com exceção do alongamento na ruptura. A membrana obtida a 160ml/h, apesar de apresentar um menor valor de alongamento na ruptura, foi considerada como a mais adequada, uma vez que pode ser produzida em um tempo menor, além de apresentar um valor discretamente maior de resistência à tração.

Quando os dados obtidos neste trabalho, para a condição de 160ml/h, são comparados aos de Rodrigues *et al.* (2008), que utilizaram uma vazão de 40ml/h e taxa de agitação inicial de 100rpm, notam-se diferenças significativas em todas as propriedades, com exceção da espessura das amostras secas, de cerca de 78 μm . Com relação às

propriedades das membranas produzidas a 160 ml/h, a espessura das amostras úmidas obtidas por Rodrigues *et al.* (2008) foi cerca de três vezes maior, a absorção de água foi 3,4 vezes maior, a resistência à tração foi 2,52 vezes maior e o alongamento na ruptura foi 3 vezes maior. As perdas de massa não puderam ser comparadas entre estes trabalhos pois os métodos de medida utilizados por cada um foram diferentes. Rodrigues *et al.* (2008) avaliaram a perda de massa por um período de 43 dias a 4°C, condições que foram alteradas para 1 semana a 37°C, de maneira a aproximar-se da realidade de aplicação dos curativos.

Percebe-se, portanto, que o aumento de escala levou a membranas com propriedades não tão adequadas quanto as obtidas por Rodrigues *et al.* (2008). Uma das prováveis razões para essa diferença é que o aumento da velocidade de agitação inicial, apesar de ter promovido uma mistura melhor entre os polímeros, pode ter provocado a redução do tamanho dos agregados poliméricos e mesmo a quebra das cadeias, diminuindo, conseqüentemente, a resistência mecânica. Acredita-se também que, como a formação dos agregados deve ocorrer a uma velocidade lenta, o aumento de vazão pode ter impedido uma melhor interação entre os polímeros e sua interpenetração, o que fortaleceria a estrutura da membrana resultante.

Assim, tentou-se contornar este problema através de outras modificações no processo, na tentativa de produzir mais membranas por batelada e com melhores propriedades físicas. Uma dessas modificações foi a utilização de uma velocidade de agitação única de 500rpm ao longo do processo, ou seja, sem aumentar para 1000rpm ao término da etapa de gotejamento da solução de quitosana, na tentativa de evitar a quebra dos agregados poliméricos. No entanto, as membranas produzidas a 500rpm não foram satisfatórias, apresentando-se como um material não homogêneo como pode ser visto na Figura 4.2. O aspecto final da membrana obtida indica a necessidade do uso de uma velocidade de agitação maior do que 500rpm ao final do gotejamento para se obter uma melhor distribuição das fibras poliméricas, mesmo que essa velocidade possa se apresentar como um fator favorável à quebra ou diminuição do tamanho dos agregados. Assim, optou-se por manter a agitação de 1000rpm após o término do gotejamento, assim como já havia sido utilizado por Rodrigues *et al.* (2008).



Figura 4.2: Membrana obtida a 500rpm.

A tentativa de substituir o agitador de três pás inclinadas por um de âncora perfurada, o qual permitiria a obtenção de um vórtice maior na mistura, resultou em uma maior incorporação de ar, levando à formação indesejada de espuma. Além disso, houve perda de material provocado pelo espirramento da suspensão, causado pelo novo elemento de agitação. Assim, decidiu-se manter o uso do agitador de hélice de três pás inclinadas durante este estudo.

Com relação à utilização da plataforma giratória na etapa de secagem, seu uso mostrou-se vantajoso, visto que simplificou o processo de produção e levou a membranas mais homogêneas.

Desta forma, nos ensaios subsequentes, além da inclusão da plataforma giratória na etapa de secagem, mantiveram-se as condições de processo que se mostraram mais adequadas neste trabalho (vazão de adição de 160ml/h e taxa de agitação inicial de 500rpm) e procurou-se, através de alternativas de reforço mecânico, como a reticulação iônica e covalente e a inclusão de surfatantes, melhorar as características das membranas de quitosana-alginato obtidas com o escalonamento do processo.

4.2. Características das membranas reticuladas covalentemente com glutaraldeído

A reticulação covalente foi realizada através da imersão de membranas de quitosana-alginato não reticuladas ionicamente em soluções de glutaraldeído de concentrações que variaram de 0,5 a 2,0% (m/v) por um período de 30 minutos. Na Figura 4.3 é mostrado o aspecto visual das membranas reticuladas com glutaraldeído, processo este que não se mostrou satisfatório.

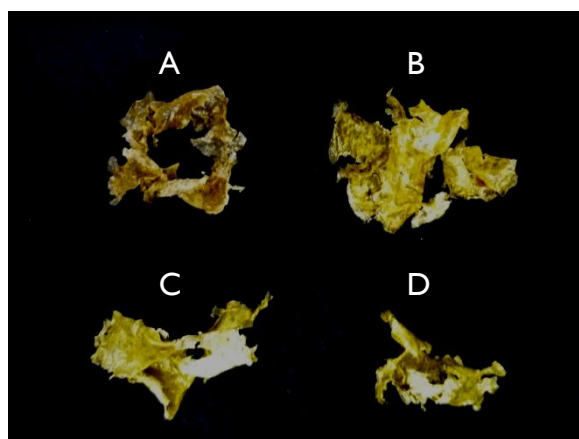


Figura 4.3: Membranas reticuladas com glutaraldeído (A: 0,5%; B: 1,0%, C: 1,5%, D: 2,0%).

Na Figura 4.3, nota-se que as membranas obtidas em qualquer uma das concentrações testadas tornaram-se amareladas e muito quebradiças após o contato com a solução reticuladora. Além disso, as membranas não mantiveram sua forma original depois da secagem.

O aumento da fragilidade das membranas não era esperado, pois vários autores mencionam o uso de glutaraldeído para a reticulação de membranas tanto de quitosana como de alginato (Kanti *et al.*, 2004; Yeom e Lee, 1998; Svang-Ariyaskul *et al.*, 2006; Monteiro e Airoidi, 1999; Beppu *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010; Orrego e Valencia, 2009).

Knaul *et al.* (1999) produziram fibras de quitosana reticuladas com dialdeídos, como o glutaraldeído. A reação procedeu a 25,8°C por um período de 1 hora. Com o aumento da concentração de glutaraldeído, que variou de $1,46 \cdot 10^{-4}$ a $2,2 \cdot 10^{-1}$ mol/l, observou-se um aumento do módulo de Young e uma diminuição da região plástica do gráfico tensão versus deformação, indicando um aumento da fragilidade do material. Quando a concentração de glutaraldeído ultrapassou 0,05mol/l (aproximadamente 0,5%v/v), as fibras se tornaram ainda mais quebradiças, iniciando-se uma diminuição do módulo de Young. Este fato sugere que o dialdeído pode degradar a estrutura molecular a altas concentrações. Assim, teria-se um limite da concentração de solução de glutaraldeído que pode ser utilizada no processo de reticulação.

Em contraste com o trabalho de Knaul *et al.* (1999), mencionado anteriormente, alguns trabalhos citam o uso de concentrações maiores de glutaraldeído, além do uso de diferentes temperaturas, solventes e a inclusão de catalisadores. Yeom e Lee (1998)

relatam a produção de membranas de alginato, reticuladas através de imersão em solução de glutaraldeído (0 a 20% vol) e HCl (0,05% vol) em acetona por 48h a 40°C. A acetona foi utilizada por ser um não-solvente do alginato e o HCl funcionaria como catalisador. Após este procedimento, as membranas foram lavadas em metanol. Os autores encontraram que a concentrações de glutaraldeído abaixo de 5%, a reticulação era insuficiente.

Em outro trabalho, de Svang-Ariyaskul *et al.* (2006), foram produzidas membranas compostas por quitosana e PVA, que foram reticuladas através de imersão em uma solução consistindo de glutaraldeído a 1,5%, ácido sulfúrico a 0,5% e acetona a 48% em água deionizada por 25 minutos. As membranas resultantes tiveram um bom desempenho no processo de separação por pervaporação.

Levando-se em consideração os trabalhos da literatura mencionados, percebe-se que a reticulação da quitosana e do alginato com glutaraldeído não segue um padrão específico, podendo-se utilizar diversas concentrações e condições de processo, como tempo e temperatura. No caso do presente trabalho, todas as concentrações testadas, apesar de estarem em conformidade com alguns dados da literatura, levaram a membranas altamente frágeis e de aspecto inadequado.

Com relação ao aspecto amarelado do material obtido, comportamento semelhante foi relatado por Ngah e Fatinathan (2008), que produziram partículas de quitosana reticuladas com glutaraldeído para remoção de cobre de águas residuais. A reticulação foi realizada através da imersão das partículas em soluções de 0,025 a 0,05 M por 24 horas à temperatura ambiente. Observou-se uma variação de cor do gel polimérico, de branco a vermelho-tijolo, de acordo com o grau de reticulação. Após a secagem das partículas, a matriz polimérica tornou-se mais escura e o espectro de cores observado foi de amarelo a vermelho-tijolo escuro. Espectros de FTIR mostraram a formação de ligações imina e duplo-etilênicas, cujas frequências de pico aumentaram com a intensidade de reticulação. Assim, a variação de cores pode ser atribuída à reação química entre polímeros e reticulante.

Para compreender melhor o efeito do glutaraldeído na estrutura das membranas de quitosana-alginato, na Figura 4.4 são mostradas as imagens típicas obtidas por microscopia eletrônica de varredura.

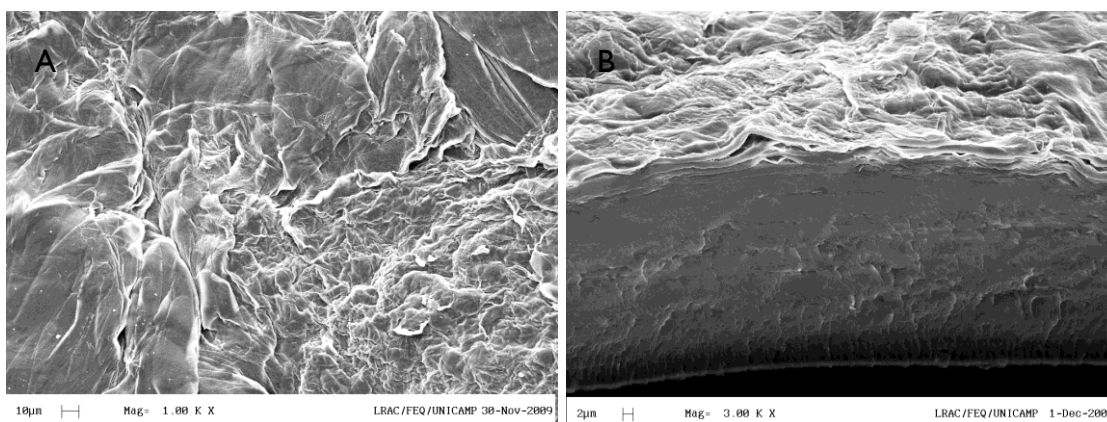


Figura 4.4: Morfologia de uma membrana reticulada com glutaraldeído a 0,5% (A: superfície, B: secção transversal).

Através da análise da Figura 4.4, percebe-se que as membranas reticuladas com glutaraldeído apresentaram uma superfície muito rugosa. As imagens indicam que o efeito do reticulante foi ocasionar quebras na superfície e o consequente desprendimento de camadas. As imagens da secção transversal não mostraram a presença de lamelas internas, como observado para as membranas reticuladas com cálcio produzidas por Rodrigues *et al.* (2008).

Em comparação a estes resultados, Beppu *et al.* (2007) reticularam membranas de quitosana através da imersão das mesmas em solução de glutaraldeído a 0,25% (w/w) por 14 h a 25°C. Após este procedimento, as membranas foram lavadas exaustivamente com água Milli-Q. Os autores verificaram, através de análises de raio X, que o aumento da intensidade de reticulação reduzia a cristalinidade das membranas. Para explicar esse comportamento, os pesquisadores propuseram que quando uma membrana seca, com arranjo das cadeias poliméricas previamente definido, é exposta a uma solução de glutaraldeído, sua estrutura se torna menos organizada, devido à reação química com o reticulante.

No caso dos resultados obtidos neste trabalho, verificou-se que apenas a superfície das membranas se tornou desorganizada, havendo o desprendimento de camadas, enquanto o interior da estrutura permaneceu intacto. Isso indica que provavelmente a reticulação ocorreu de forma rápida e intensa, dificultando a difusão do glutaraldeído através da membrana, o que poderia explicar a grande fragilidade do material obtido. A ocorrência de reticulação apenas na superfície também pode explicar o

encolhimento das membranas. Provavelmente, a reação com glutaraldeído causou um aumento da densidade da superfície das membranas, desorganizando a estrutura polimérica previamente estabelecida.

Foram feitas tentativas de caracterização das membranas por FTIR, como forma de identificar a ocorrência da reticulação através da formação de ligações imina e éster. No entanto, as membranas eram demasiadamente quebradiças, e sua prensagem pelo equipamento de FTIR causava ruptura do material, impossibilitando, assim, a análise. Além disso, a deformação da membrana após a reticulação não permitiu a obtenção de corpos de prova com tamanhos adequados à análise.

Os resultados obtidos através da reticulação covalente com glutaraldeído mostraram a necessidade de estudo de alternativas menos agressivas às estruturas poliméricas, que poderiam ser a reticulação iônica com CaCl_2 e/ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

4.3. Membranas de quitosana-alginato obtidas através de diferentes condições de reticulação iônica

Os ensaios do planejamento experimental em estrela, apresentado na Tabela 3.1, foram realizados com o intuito de verificar qual a condição de reticulação iônica que melhoraria as características das membranas de quitosana-alginato. Entretanto, alguns ensaios preliminares foram realizados com o intuito de verificar a ocorrência de precipitação de CaSO_4 no sistema. Os resultados destes ensaios, assim como os resultados referentes ao aspecto, morfologia, espessura, absorção e perda de massa em água e propriedades mecânicas das membranas obtidas através do planejamento fatorial são apresentados nos próximos itens.

4.3.1. Ensaios preliminares para a verificação da precipitação de CaSO_4

A adição dos reticulantes CaCl_2 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pode causar precipitação de CaSO_4 , um sal insolúvel em água. De acordo com Calmanovici *et al.* (1993), a solubilidade deste sal em água a 20°C é 0,014M (equivalente a 0,24g/100ml). Como as membranas são preparadas a uma temperatura próxima a esta (25°C), a quantidade de CaSO_4 solubilizada nessa condição seria insuficiente para promover de forma efetiva a reticulação dos grupos

ionizáveis da quitosana e do alginato que não interagiram entre si. Como o uso de CaSO_4 mostrou-se pouco viável, verificou-se a possibilidade de realizar a dupla reticulação através da adição de duas soluções salinas diferentes, uma de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e outra de CaCl_2 . Calculou-se que a adição ao sistema reacional de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e CaCl_2 na quantidade máxima referente ao planejamento experimental (3,6 ml de soluções a 0,36 M) forma uma massa equivalente de CaSO_4 inferior a 0,24g/100ml. Desta forma, não haveria precipitação do sal. Para verificar esta hipótese, foram realizados alguns ensaios preliminares.

Os ensaios foram conduzidos sem a presença de quitosana e alginato, utilizando-se quantidades de água, acetona, ácido acético e NaOH nas mesmas proporções em que seriam utilizadas no reator. Foram feitas soluções a 0,5M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 0,5M de CaCl_2 , as quais foram adicionadas ao sistema em volumes iguais. A concentração de 0,5 M é superior ao valor máximo com que se desejava trabalhar (0,36 M) para assegurar que o sal não seria precipitado mesmo em concentrações maiores. Foram feitas três diferentes simulações, levando em conta a ordem de adição das soluções salinas. Na primeira, efetuou-se a adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ seguida da adição de CaCl_2 . Na segunda, adicionou-se o CaCl_2 e, em seguida, o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Na terceira, misturaram-se fora do sistema as soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e CaCl_2 e esta mistura foi imediatamente adicionada ao sistema. Após a realização desses testes, um pequeno volume de cada mistura obtida (cerca de 10 ml) foi centrifugado a 10000 rpm por 20 minutos para verificar se não teria havido precipitação do CaSO_4 . Os dois primeiros ensaios resultaram em soluções límpidas, enquanto que no terceiro foi possível verificar uma pequena quantidade de sal precipitado. Os resultados destas simulações permitem concluir que se os íons cálcio e sulfato forem adicionados, de forma isolada, diretamente no sistema reacional, os mesmos permanecerão solúveis. No entanto, se forem misturados antes da adição ao sistema, ocorre precipitação do CaSO_4 , provavelmente devido à presença de compostos orgânicos como a acetona e ácido acético e ao pH de operação (pH 5,28).

Verificou-se, portanto, que a dupla reticulação dos coacervados de quitosana-alginato seria viável através da adição dos dois tipos de soluções salinas em sequência, uma contendo íons cálcio (Ca^{2+}) e outra contendo íons sulfato (SO_4^{2-}). Observou-se também que não importa a ordem de adição dos sais, contanto que ambos não sejam adicionados ao mesmo tempo, o que se mostrou promissor para a continuidade deste trabalho.

4.3.2. Aspecto das membranas e dos agregados poliméricos

Na Figura 4.5 são apresentados os aspectos visuais dos diferentes tipos de membrana obtidos através do planejamento experimental.

Como pode ser visto na Figura 4.5, membranas homogêneas foram obtidas para concentrações de Ca^{2+} menores do que 0,31M. Concentrações maiores ou iguais a este valor levaram à formação de membranas com falhas na estrutura, além de serem extremamente rígidas. A variação da concentração de SO_4^{2-} não teve efeito significativo sobre o aspecto das membranas.

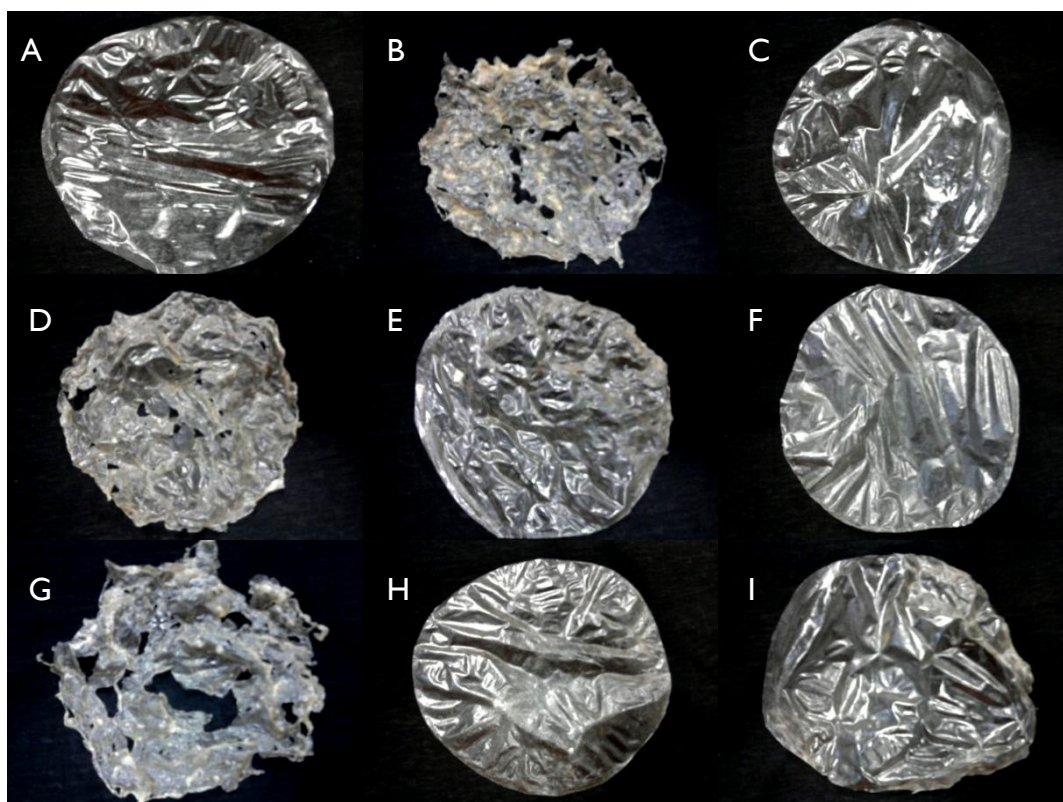


Figura 4.5: Membranas obtidas através do planejamento experimental (A: 0,05M CaCl_2 e 0,05M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; B: 0,31M CaCl_2 e 0,05M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; C: 0,05M CaCl_2 e 0,31M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; D: 0,31M CaCl_2 e 0,31M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; E: 0,18M CaCl_2 e 0,18M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; F: 0,18M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; G: 0,36M CaCl_2 e 0,18M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; H: 0,18M CaCl_2 ; I: 0,18M CaCl_2 e 0,36M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

Na Figura 4.6 são apresentados os aspectos dos agregados poliméricos obtidos com diferentes quantidades de cálcio, antes da secagem do material em estufa.

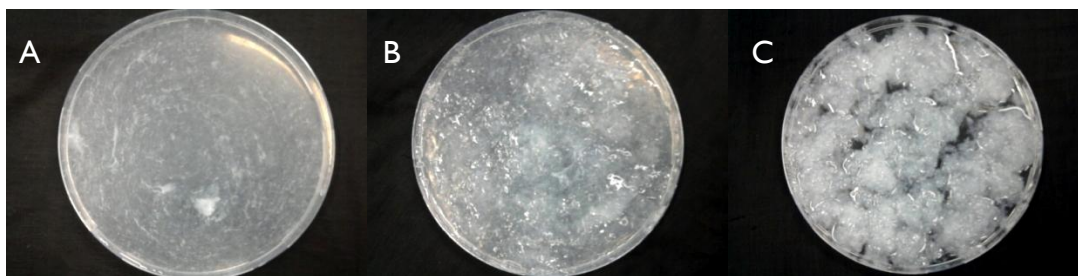


Figura 4.6: Agregados poliméricos (A: sem CaCl_2 ; B: com 0,18M CaCl_2 ; C: com 0,36M CaCl_2).

De acordo com Muzzarelli (1973), quando íons cálcio são adicionados em quantidades crescentes a uma solução de alginato, a viscosidade da solução aumenta até que o excesso de cálcio ocasiona a precipitação, resultando na diminuição da viscosidade. Em concordância com estes dados, George e Abraham (2006) afirmam que altos teores de cálcio levam à precipitação ou gelificação, resultantes da associação permanente entre as cadeias de alginato. Assim, os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com a literatura.

Ainda com relação aos resultados mostrados na Figura 4.6, no trabalho de da Silva (2009) foi verificado que a máxima proporção entre reticulante e polímero que pode ser utilizada na produção de filmes de quitosana-alginato é de 0,07g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /g alginato no primeiro estágio de reticulação. Neste caso, o primeiro estágio refere-se à etapa da adição de solução reticuladora à mistura polimérica. Acima desta concentração, a solução filmogênica tornava-se de difícil manuseio, ocorrendo gelificação excessiva. No caso deste trabalho, acima de 0,18g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /g alginato (0,31M), verificou-se a ocorrência de excesso de gelificação. No entanto, é importante ressaltar que as condições operacionais utilizadas por da Silva (2009) eram taxa de agitação de 14000rpm e temperatura de 77°C, diferentes das condições empregadas neste trabalho, que foram de 500 a 1000rpm e 25°C. Além disso, as proporções entre quitosana e alginato estudadas pela autora não foram as mesmas deste trabalho, sendo de no máximo, 0,35g de quitosana por grama de polímeros totais. No presente trabalho, a proporção mássica utilizada foi de 50%.

Nota-se, portanto, que a faixa de concentrações de 0,05 a 0,36M é ampla, possibilitando visualizar os efeitos do excesso de reticulação com íons cálcio, que, neste caso, não levou à formação de membranas satisfatórias.

4.3.3. Análises de microscopia eletrônica de varredura

Os efeitos da reticulação sobre a morfologia das membranas foram analisados por microscopia eletrônica de varredura. As amostras escolhidas para estas análises foram as que apresentaram aspecto satisfatório, produzidas nas condições relativas aos pontos I, 8, 10, 11 e central do planejamento em estrela indicado na Tabela 3.1. As imagens são mostradas na Figura 4.7.

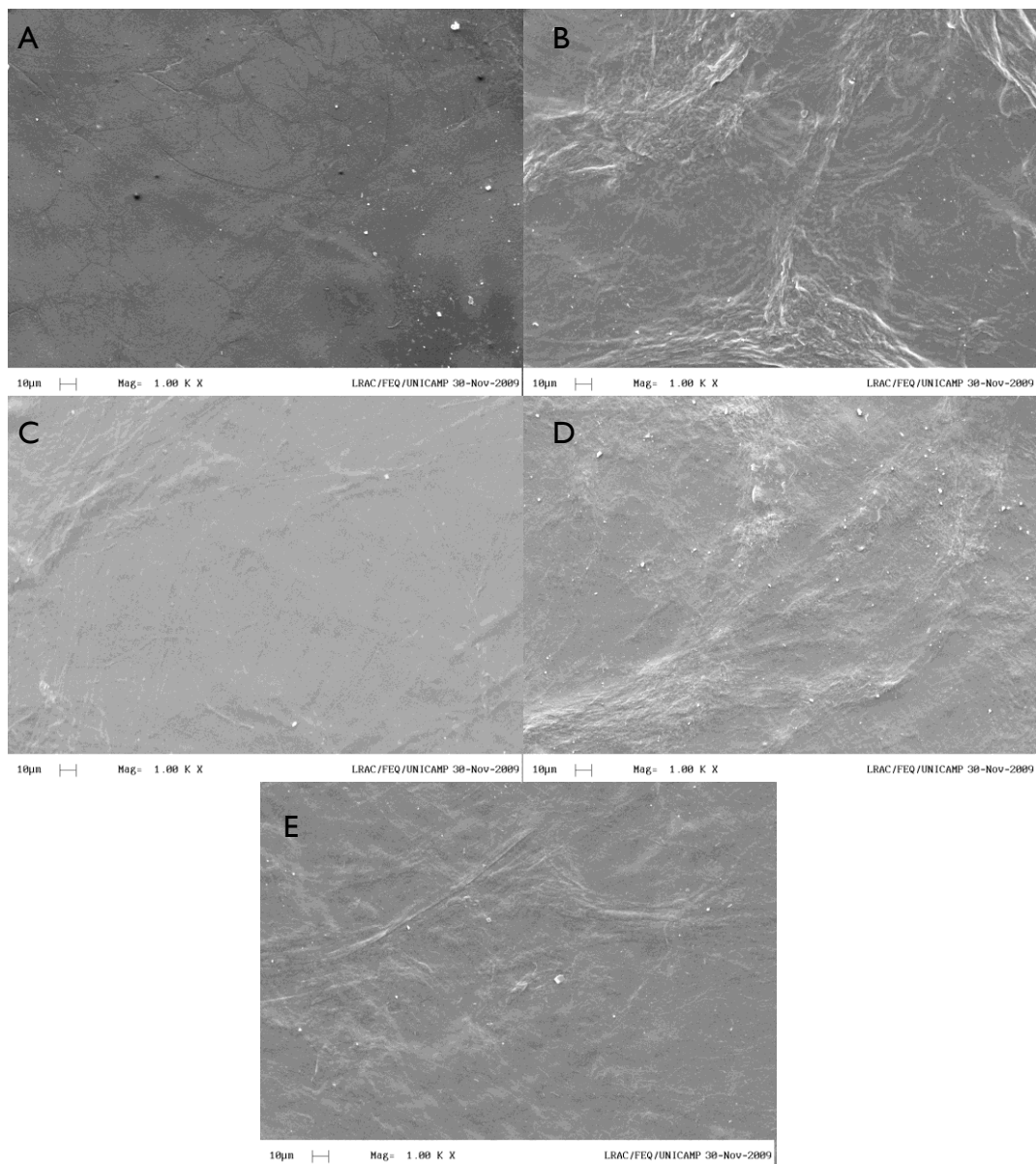


Figura 4.7: Morfologia das superfícies das membranas (A: 0,18M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; B: 0,18M CaCl_2 ; C: 0,05M CaCl_2 e 0,05M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; D: 0,18M CaCl_2 e 0,18M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; E: 0,18M CaCl_2 e 0,36M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

Através da comparação entre as imagens mostradas na Figura 4.7, observa-se grande diferença entre as rugosidades das superfícies das membranas. A membrana mostrada na Figura 4.7 A, reticulada apenas com 0,18M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, possui uma superfície lisa. Já a membrana mostrada na Figura 4.7 B, reticulada com 0,18M de CaCl_2 se mostrou muito mais rugosa, indicando que os íons cálcio modificaram a superfície da membrana. A membrana duplamente reticulada com 0,05M de ambos os reticulantes (Figura 4.7 C) mostrou uma superfície praticamente lisa, com algumas poucas rugosidades. Já a membrana reticulada com 0,18M de CaCl_2 e 0,18M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Figura 4.7 D) possui muitas pequenas ondulações, porém, estas são aparentemente mais suaves do que na membrana reticulada apenas com 0,18M de CaCl_2 (Figura 4.7 B). Quando a quantidade de sulfato é aumentada para 0,36M (Figura 4.7 E), nota-se uma redução ainda maior no número de ondulações da superfície. Desta forma, observou-se que o cálcio parece ter uma tendência de aumentar a rugosidade, enquanto os íons sulfato parecem agir no sentido de diminuí-la.

Karakeçili *et al.* (2007) também produziram membranas de quitosana reticuladas com íons sulfato. O procedimento de reticulação consistiu de imersão em solução de ácido sulfúrico a 0,02M em acetona a 50% (v/v) por 1 hora a temperatura ambiente. Análises de microscopia de força atômica (AFM) indicaram que os íons sulfato tiveram forte influência sobre a topografia da superfície, tornando-a a mais homogênea e relativamente plana. Os autores explicam que as rugosidades nas membranas não reticuladas poderiam ser terminações de fibras de quitosana desniveladas. Após a reticulação, teria ocorrido a formação de feixes de fibras, aplanando a superfície. Também foi observado que mudanças na nanotopografia poderiam afetar a molhabilidade da superfície, assim como alterar os sítios reacionais.

Na Figura 4.8 são mostradas as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura das seções transversais das membranas.

A análise das imagens das seções transversais das membranas permitiu observar diferenças entre as espessuras de acordo com o tipo de reticulação realizado. Aparentemente, todas as membranas apresentaram estrutura lamelar, o que pareceu mais evidente para as membranas reticuladas com maiores quantidades de CaCl_2 . O aspecto lamelar está de acordo com as membranas de quitosana e alginato obtidas anteriormente

por Rodrigues (2008), as quais foram reticuladas com CaCl_2 a 0,18M. Uma análise detalhada a respeito das espessuras e da estrutura lamelar das membranas será realizada mais adiante.

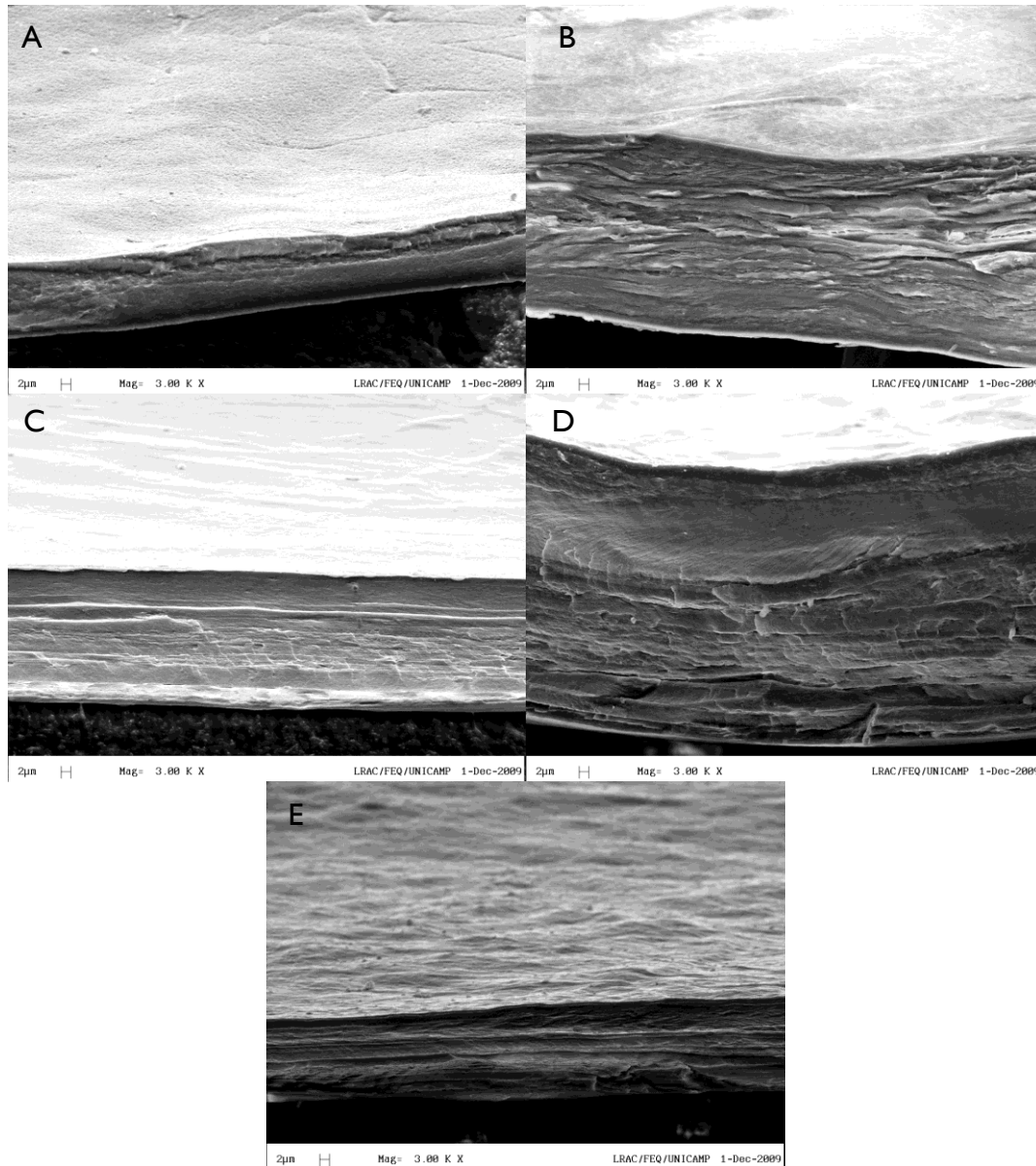


Figura 4.8: Morfologia das seções transversais das membranas (A: 0,18M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; B: 0,18M CaCl_2 ; C: 0,05M CaCl_2 e 0,05M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; D: 0,18M CaCl_2 e 0,18M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; E: 0,18M CaCl_2 e 0,36M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

4.3.4. Análise elementar das membranas por EDS

Para comprovar a presença dos íons reticulantes na estrutura das membranas, garantindo que os mesmos não foram removidos após a lavagem das mesmas com água, foi realizada uma análise de EDS (espectrometria por dispersão de energia) no mesmo equipamento usado para a microscopia eletrônica de varredura. A Figura 4.9 mostra o aspecto típico do espectro obtido.

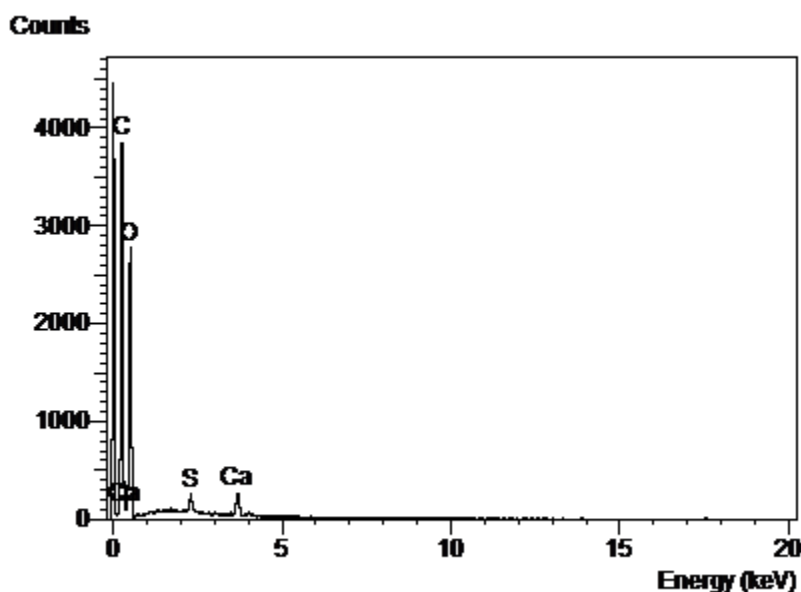


Figura 4.9: Espectro de EDS típico da membrana reticulada com CaCl_2 a 0,18M e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,18M.

Como pode ser percebido pela Figura 4.9, foram detectados quatro elementos em maior proporção, sendo estes carbono (em maior quantidade), oxigênio, enxofre e cálcio. A detecção dos dois últimos elementos confirmou a presença dos íons reticulantes Ca^{2+} e SO_4^{2-} , mesmo após a lavagem das membranas, permitindo supor que os mesmos interagiram com os grupos ionizáveis da membrana.

4.3.5. Espessura e comportamento das membranas em água

Todas as membranas de quitosana-alginato obtidas através do planejamento experimental foram analisadas quanto a sua espessura, absorção (24 hs) e perda de massa (uma semana) em água, sendo os dados mostrados na Tabela 4.2. As propriedades

mecânicas não foram medidas para todas as amostras devido à inadequação de aspecto verificada nas amostras produzidas nas condições 2, 4 e 9 do planejamento experimental.

Tabela 4.2: Propriedades das membranas resultantes do planejamento experimental em estrela.

Condição	[Ca ²⁺]	[SO ₄ ²⁻]	Espessura (µm)	Absorção (g/g)	Perda de massa (%)
1	0,05	0,05	82,50 ± 7,72 ^(b)	5,28 ± 0,38 ^(d)	4,56 ± 1,48 ^(c,d)
2	0,31	0,05	252,50 ± 20,36 ^(a)	5,41 ± 0,38 ^(d)	7,20 ± 0,33 ^(a,b,c,d)
3	0,05	0,31	65,83 ± 4,36 ^(b)	18,53 ± 0,52 ^(a)	13,35 ± 1,96 ^(a,b)
4	0,31	0,31	153,67 ± 26,35 ^(b)	8,67 ± 0,34 ^(c)	9,96 ± 1,76 ^(a,b,c,d)
5	0,18	0,18	116,67 ± 10,22 ^(b)	5,84 ± 0,20 ^(d)	8,95 ± 1,51 ^(a,b,c,d)
6	0,18	0,18	109,83 ± 8,04 ^(b)	8,85 ± 0,12 ^(c)	6,32 ± 0,88 ^(b,c,d)
7	0,18	0,18	125,50 ± 17,29 ^(b)	8,39 ± 0,26 ^(c)	8,39 ± 1,44 ^(a,b,c,d)
8	0	0,18	66,67 ± 3,07 ^(b)	13,13 ± 0,37 ^(b)	11,51 ± 0,74 ^(a,b,c)
9	0,36	0,18	319,00 ± 44,60 ^(a)	4,60 ± 0,49 ^(d)	8,01 ± 1,03 ^(a,b,c,d)
10	0,18	0	100,83 ± 17,67 ^(b)	5,67 ± 0,53 ^(d)	6,84 ± 0,69 ^(b,c,d)
11	0,18	0,36	78,00 ± 6,18 ^(b)	19,64 ± 1,13 ^(a)	12,19 ± 0,89 ^(a,b,c)

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, p<0,05).

4.3.5.1. Espessura das membranas

Os dados de espessura obtidos foram analisados através do software *Statistica 7*[®]. Na Tabela 4.3, são mostrados os efeitos linear (L) e quadrático (Q), assim como o seu desvio padrão. O valor de p indica quando um efeito é significativo. Neste caso, como foi utilizado um intervalo de confiança de 95%, ou seja, um nível de significância de 5%, o efeito é considerado significativo quando p<0,05.

Observou-se que todos os fatores apresentaram efeitos significativos, sendo mais pronunciado o efeito linear do CaCl₂, o qual foi positivo sobre as espessuras das membranas. Já o (NH₄)₂SO₄ teve efeito negativo, diminuindo a espessura das membranas.

A interação entre os fatores também se mostrou negativa. As imagens de microscopia eletrônica de varredura da secção transversal das membranas (Figura 4.8) confirmam estes dados, permitindo visualizar a variação da espessura de acordo com a quantidade de reticulante utilizada.

Tabela 4.3: Estimativa dos efeitos codificados para o modelo estatístico referente à espessura seca das membranas.

Fator	Efeito	Desvio Padrão	p
Média	117,33	4,53	0,0015*
CaCl ₂ (L)	153,67	5,55	0,0013*
CaCl ₂ (Q)	74,25	6,61	0,0078*
(NH ₄) ₂ SO ₄ (L)	-36,95	5,55	0,0219*
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Q)	-29,17	6,61	0,0477*
Interação	-41,08	7,85	0,0347*

*Efeitos significativos (p<0,05).

Na Tabela 4.4 é apresentada a análise de variância Anova, para verificar a validade do modelo estatístico.

Tabela 4.4: Tabela ANOVA para os dados de espessura.

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de g.l.	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	63451,71	5	12690,34	28,4926	5,05
Resíduos	2226,97	5	445,39		
Falta de ajuste	2103,58	3	701,19	11,3663	19,16
Erro puro	123,39	2	61,69		
Total	65678,68	10			

% de variação explicada: 96,61 %
 % máxima de variação explicável: 99,81%

Os dados da tabela Anova permitiram concluir que o modelo estatístico é válido, reproduzindo 96,61% da variação total. No teste F, o valor de F_{calculado} da regressão em relação aos resíduos foi 5,6 vezes maior do que o F_{tabelado}. Na literatura não existe um consenso a respeito dos melhores valores para a relação F_{calculado}/F_{tabelado}. Alguns autores, como Barros Neto *et al.* (2001) consideram que para razões maiores do que 5, o modelo

é significativo. Já o $F_{\text{calculado}}$ da falta de ajuste em relação ao erro puro foi 1,68 vezes menor do que o F_{tabelado} , indicando que não há falta de ajuste do modelo.

Verificada a validade do modelo, foi possível construir a superfície de resposta e a curva de contorno para a espessura em função das concentrações de CaCl_2 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, mostradas na Figura 4.10. Esta descrição gráfica do modelo ajustado permite simplificar a interpretação dos resultados.

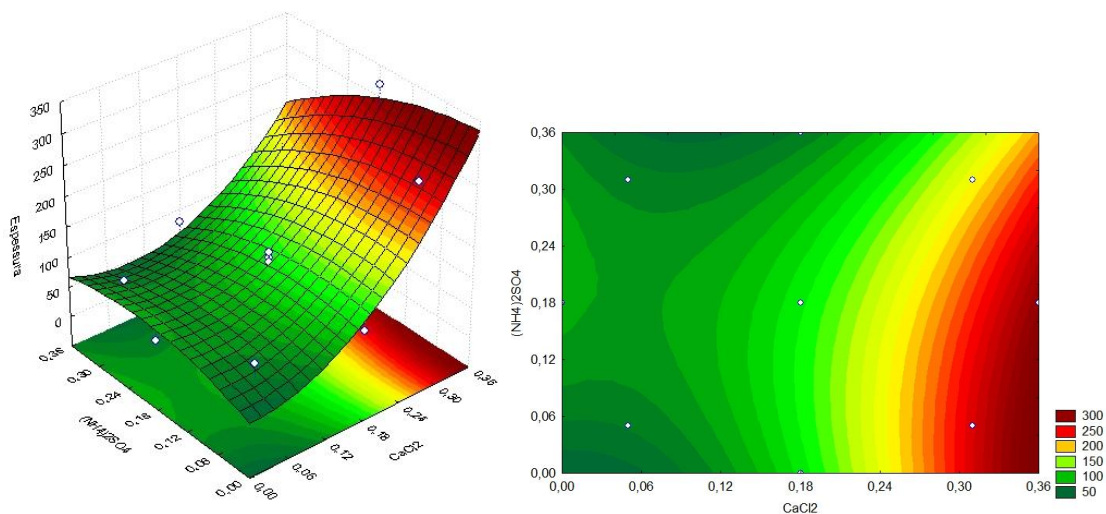


Figura 4.10: Superfície de resposta e curva de contorno para os valores de espessura das membranas em função das concentrações de CaCl_2 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Através da análise da Figura 4.10, é possível visualizar o que foi discutido com relação aos dados da Tabela 4.3. A influência do CaCl_2 sobre a espessura das membranas foi positiva enquanto a influência do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi negativa. Era de se esperar, no entanto, que o efeito de ambos os reticulantes iônicos fosse o de provocar um maior empacotamento da estrutura polimérica, diminuindo a espessura das membranas.

Uma possível explicação para esta diferença de comportamentos entre os dois agentes reticulantes iônicos é que, os íons cálcio, quando adicionados à suspensão de agregados de quitosana-alginato, reagiram fortemente com os grupos carboxila, reduzindo a mobilidade das cadeias poliméricas e estabilizando rapidamente a conformação existente na suspensão. Assim, quanto maior a quantidade de cálcio adicionada ao sistema, menor a mobilidade das cadeias, as quais não se aproximaram durante a secagem das membranas, resultando em maiores valores de espessura e em lamelas mais evidentes. Com os íons

sulfato, ocorreu um maior empacotamento da estrutura polimérica, diminuindo a espessura. Essa diferença ocorreu, provavelmente, devido à menor afinidade do sulfato pelos grupos amino da quitosana, comparada à afinidade do cálcio pelos grupos carboxila do alginato, como discutido no item 4.3.4, possibilitando, então, maior acomodação dos agregados e das cadeias eventualmente não reticuladas.

4.3.5.2. Comportamento das membranas em água

Os dados referentes aos efeitos estatísticos dos agentes reticulantes sobre a capacidade de absorção de água das membranas de quitosana-alginato são mostrados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5: Estimativa dos efeitos codificados para o modelo estatístico referente à capacidade de absorção de água das membranas.

Fator	Efeito	Desvio Padrão	P
Média	7,69	0,94	0,0145*
CaCl ₂ (L)	-5,45	1,15	0,0416*
CaCl ₂ (Q)	0,53	1,37	0,7356
(NH ₄) ₂ SO ₄ (L)	9,06	1,15	0,0157*
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Q)	4,32	1,37	0,0870
Interação	-5,00	1,62	0,0912

*Efeitos significativos (p<0,05).

Nota-se que apenas os efeitos lineares de ambos os agentes reticulantes são significativos. Verificou-se o CaCl₂ agiu de forma a diminuir a absorção de água, enquanto o (NH₄)₂SO₄ apresentou efeito positivo, aumentando a capacidade de absorção. A maior influência sobre os resultados foi do sulfato de amônio.

Na Tabela 4.6 é apresentada a análise de variância, que foi efetuada desconsiderando-se os efeitos não significativos. Verificou-se que o modelo estatístico tem uma porcentagem de variação explicada de 78,09%. No teste F, o $F_{\text{calculado}}$ da regressão em relação aos resíduos foi apenas 3,19 vezes maior do que o F_{tabelado} . Já o $F_{\text{calculado}}$ da falta de ajuste em relação ao erro puro foi 5,31 vezes menor do que o F_{tabelado} , indicando que não há falta de ajuste do modelo. Assim, validado o modelo estatístico, foram construídas a

superfície de resposta e a curva de contorno para os dados de capacidade de absorção de água, mostrados na Figura 4.11.

Tabela 4.6: Tabela ANOVA para os valores de capacidade de absorção de água das membranas.

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de g.l.	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	223,70	2	111,85	14,25	4,46
Resíduos	62,78	8	7,85		
Falta de ajuste	57,51	6	9,59	3,64	19,33
Erro puro	5,27	2	2,63		
Total	286,48	10			

% de variação explicada: 78,09%

% máxima de variação explicável: 98,16%

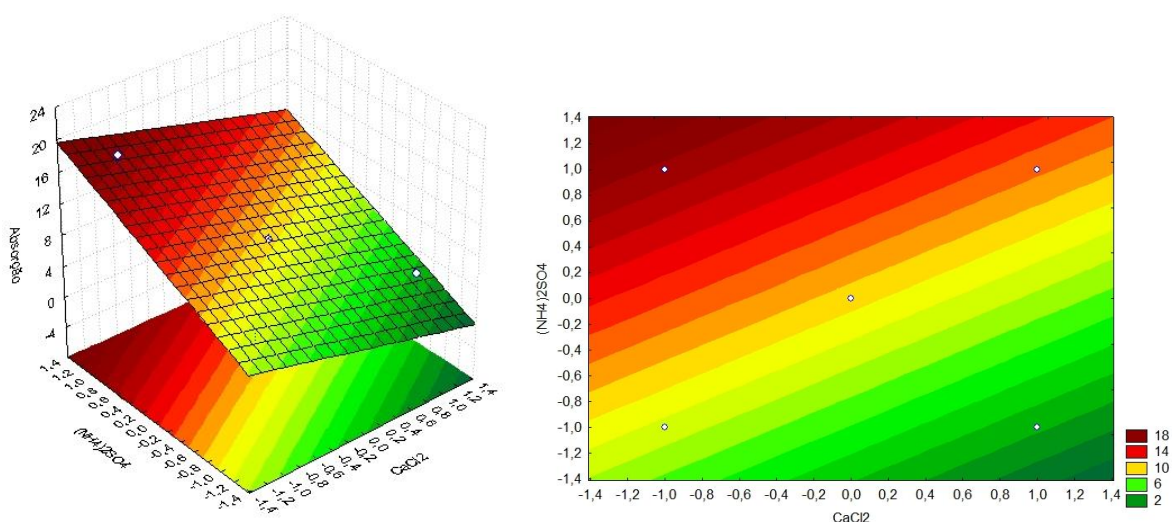


Figura 4.11: Superfície de resposta e curva de contorno para os valores de absorção (24 hs, 37°C) em função das concentrações codificadas de CaCl_2 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Verificaram-se, assim, comportamentos distintos entre os reticulantes iônicos. Com a adição de CaCl_2 ao sistema ocorreu, provavelmente, a formação de uma matriz com fibras poliméricas mais fortemente unidas e com menor mobilidade. Desta forma, uma estrutura mais rígida teria mais dificuldade para acomodar grandes quantidades de água. Sabe-se, também, que a capacidade de intumescimento do alginato é facilitada pelos grupos carboxílicos, que se associam fortemente a moléculas de água. Um aumento na concentração de íons cálcio diminui a disponibilidade destes grupos e conseqüentemente a hidrofiliidade do sistema. No trabalho de Da Silva (2009), o mesmo efeito referente ao

cálcio foi observado em filmes de alginato e quitosana-alginato, verificando-se uma diminuição do grau de intumescimento dos filmes com o aumento da concentração da solução reticuladora.

O $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, por sua vez, pareceu facilitar a entrada de água na membrana, provavelmente devido a sua pouca afinidade pela quitosana. Assim, cadeias poliméricas fracamente reticuladas poderiam se afastar com maior facilidade, de maneira a acomodar grandes quantidades de água. Além disso, Lee *et al.* (1997) observaram em seu trabalho que as interações iônicas entre os grupos amino da quitosana e os ânions sulfato aumentam a densidade de cargas da membrana, levando a um aumento da afinidade da mesma com a água.

Com relação aos dados de perda de massa, na Tabela 4.7 encontram-se os valores referentes aos efeitos e sua significância.

Tabela 4.7: Estimativa dos efeitos codificados para o modelo estatístico referente à perda de massa das membranas em água.

Fator	Efeito	Desvio Padrão	p
Média	7,89	0,80	0,0101*
$\text{CaCl}_2(\text{L})$	-1,42	0,98	0,2837
$\text{CaCl}_2(\text{Q})$	1,44	1,17	0,3432
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 (\text{L})$	4,78	0,98	0,0396*
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 (\text{Q})$	1,19	1,17	0,4148
Interação	-3,01	1,39	0,1617

*Efeitos significativos ($p < 0,05$).

Nota-se que o efeito linear do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ é o único significativo, assim, um aumento na concentração deste reticulante provoca um aumento na perda de massa das membranas de quitosana-alginato. O efeito negativo do CaCl_2 indica que seu efeito é diminuir a perda de massa das membranas, mas de forma pouco pronunciada.

Na Tabela 4.8 é apresentada a análise de variância para validação do modelo estatístico, que indicou um valor razoável para a porcentagem de variação explicada pelo modelo, de 63,29%. O teste F da regressão em relação aos resíduos resultou que o $F_{\text{calculado}}$ é apenas 3,04 vezes maior que o F_{tabelado} , no entanto, o modelo não apresentou falta de ajuste, sendo o $F_{\text{calculado}}$ 11,45 vezes menor que F_{tabelado} .

Tabela 4.8: Tabela ANOVA para os dados de perda de massa das membranas em água.

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de g.l.	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	45,68	1	45,68	15,54	5,12
Resíduos	26,50	9	2,94		
Falta de ajuste	22,66	7	3,24	1,69	19,35
Erro puro	3,84	2	1,92		
Total	72,18	10			

% de variação explicada: 63,29%

% máxima de variação explicável: 94,68%

Na Figura 4.12 são mostradas a superfície de resposta e curva de contorno para os valores de perda de massa em água, que permitiu observar que quanto maior a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, maior o valor da propriedade analisada, lembrando que o efeito do CaCl_2 não foi significativo para o modelo matemático.

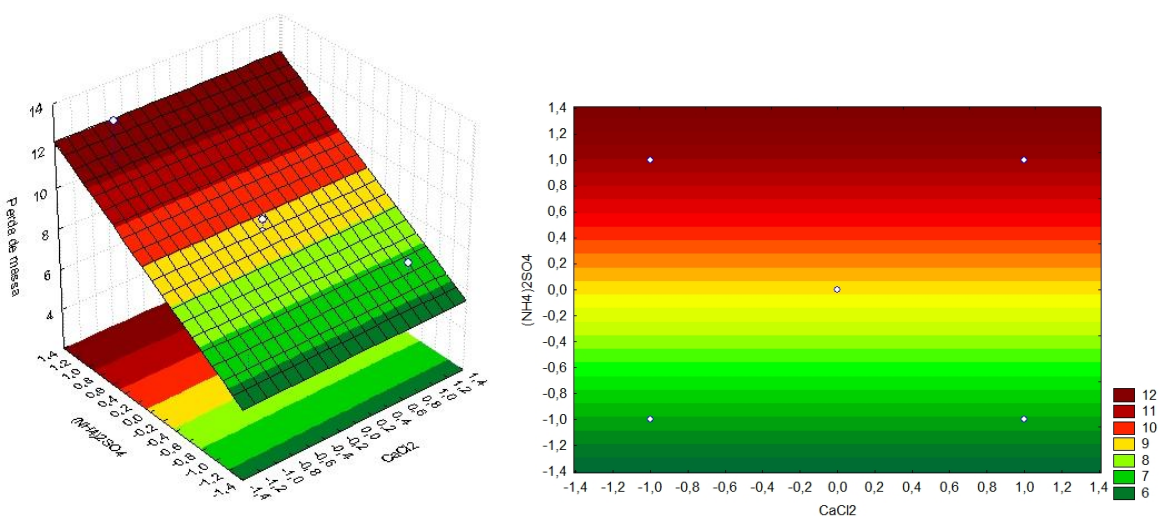


Figura 4.12: Superfície de resposta e curva de contorno para os valores de perda de massa em água (1 semana, 37°C) em função das concentrações codificadas de CaCl_2 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Analisando-se o conjunto de dados referentes tanto à absorção quanto à perda de massa em água, observou-se que o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ teve efeito positivo nos dois casos, parecendo facilitar a entrada de água nas membranas, assim como a sua solubilização. Já o CaCl_2 apresentou efeito oposto ao $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, e de menor significância estatística. Observa-se, então, que maiores valores de absorção implicam em maiores valores de

perda de massa. Assim, quanto maior a quantidade de água que a membrana absorve, maior o afastamento entre as cadeias poliméricas, o que diminui a intensidade de interação entre as mesmas provocando a solubilização da membrana.

Tendo-se em vista a otimização da produção de membranas de quitosana e alginato através do uso de condições de reticulação iônica mais adequadas, as amostras com maiores quantidades de íons sulfato e menores quantidades de íons cálcio seriam as mais indicadas para o tratamento de feridas com alta liberação de exsudato. Apesar de estas amostras também terem apresentado altos valores de perda de massa, esses não são altos o suficiente para indicar instabilidade do material em meios aquosos.

4.3.6. Propriedades mecânicas das membranas

Como já comentado, as propriedades mecânicas não puderam ser avaliadas para todas as amostras obtidas através do planejamento experimental. À resistência à tração e ao alongamento na ruptura das amostras que não se mostraram íntegras para os ensaios mecânicos (membranas referentes às condições 2, 4 e 9 do planejamento mostrado na Tabela 3.1) foram, então, atribuídos valores nulos, apenas para que se pudesse avaliar as tendências de comportamento do sistema. Essa consideração é válida, uma vez que tais amostras sofreriam ruptura praticamente imediata logo após o início do ensaio de tração, em função das diversas falhas presentes em sua estrutura. Os resultados referentes às propriedades mecânicas são mostrados na Tabela 4.9.

Observou-se que a maior resistência à tração foi de 19,43MPa, referente à membrana do ponto I do planejamento experimental. O alongamento na ruptura variou pouco entre as amostras, sendo o maior valor de, 3,87%, referente à membrana 7 (ponto central).

Dos efeitos estatísticos, mostrados na Tabela 4.10, apenas o efeito linear do CaCl_2 foi significativo, de maneira a diminuir a resistência à tração das membranas de quitosana-alginato.

A Tabela Anova, mostrada na Tabela 4.11, indicou um valor alto para a porcentagem de variação explicada pelo modelo, de 81,49%. O teste F da regressão em relação aos resíduos mostrou que $F_{\text{calculado}}$ é 7,74 vezes maior do que o F_{tabelado} . Já o teste F

da falta de ajuste em relação ao erro puro mostrou que $F_{\text{calculado}}$ é 7,93 vezes menor do que o F_{tabelado} .

Tabela 4.9: Propriedades mecânicas das membranas obtidas através do planejamento experimental em variadas condições de reticulação.

Condição	[Ca ²⁺] (M)	[SO ₄ ²⁻] (M)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento na ruptura (%)
1	0,05	0,05	19,43 ± 4,14 ^(a,b)	3,17 ± 0,78 ^(a,b,c)
2	0,31	0,05	0 ^(c,d)	0 ^(c,d)
3	0,05	0,31	9,97 ± 2,69 ^(a,b,c,d)	2,35 ± 0,42 ^(a,b,c)
4	0,31	0,31	0 ^(c,d)	0 ^(c,d)
5	0,18	0,18	8,45 ± 2,17 ^(a,b,c,d)	3,62 ± 0,83 ^(a,b,c)
6	0,18	0,18	4,48 ± 0,55 ^(b,c,d)	4,13 ± 0,56 ^(a,b,c)
7	0,18	0,18	6,46 ± 1,28 ^(b,c,d)	3,87 ± 0,48 ^(a,b)
8	0,00	0,18	15,58 ± 2,10 ^(a,b,c)	2,48 ± 0,39 ^(a,b,c)
9	0,36	0,18	0 ^(c,d)	0 ^(c,d)
10	0,18	0,00	10,97 ± 1,97 ^(a,b,c)	2,80 ± 0,20 ^(a,b,c)
11	0,18	0,36	8,01 ± 1,60 ^(b,c,d)	1,95 ± 0,16 ^(b,c,d)

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, p<0,05).

Tabela 4.10: Estimativa dos efeitos codificados para o modelo estatístico referente à resistência à tração das membranas.

Fator	Efeito	Desvio Padrão	p
Média	6,46	1,15	0,0300*
CaCl ₂ (L)	-12,86	1,40	0,0117*
CaCl ₂ (Q)	0,68	1,67	0,7231
(NH ₄) ₂ SO ₄ (L)	-3,41	1,40	0,1356
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Q)	2,38	1,67	0,2905
Interação	4,73	1,99	0,1401

*Efeitos significativos (p<0,05)

Tabela 4.11: Tabela ANOVA para os valores de resistência à tração das membranas.

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de g.l.	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	330,64	1	330,64	39,62	5,12
Resíduos	75,10	9	8,34		
Falta de ajuste	67,22	7	9,60	2,44	19,35
Erro puro	7,88	2	3,94		
Total	405,74	10			
% de variação explicada: 81,49%					
% máxima de variação explicável: 98,06%					

Com relação à análise estatística dos dados de alongamento na ruptura, os efeitos estatísticos dos reticulantes iônicos são mostrados a seguir na Tabela 4.12. Notou-se que apenas o efeito linear do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e o efeito de interação não são significativos.

Tabela 4.12: Estimativa dos efeitos codificados para o modelo estatístico referente ao alongamento na ruptura das membranas.

Fator	Efeito	Desvio Padrão	p
Média	3,87	0,15	0,0014*
CaCl ₂ (L)	-2,26	0,18	0,0063*
CaCl ₂ (Q)	-2,85	0,21	0,0056*
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (L)	-0,50	0,18	0,1079
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Q)	-1,71	0,21	0,0154*
Interação	0,41	0,26	0,2503

*Efeitos significativos ($p < 0,05$)

Tabela 4.13: Tabela ANOVA para os valores de alongamento na ruptura das membranas.

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de g.l.	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	22,83	3	7,61	31,43	4,35
Resíduos	1,69	7	0,24		
Falta de ajuste	1,56	5	0,31	4,81	19,30
Erro puro	0,13	2	0,07		
Total	24,52	10			
% de variação explicada: 93,11%					
% máxima de variação explicável: 99,47%					

O modelo estatístico se mostrou válido, sendo $F_{\text{calculado}}$ da regressão em relação aos resíduos 7,23 vezes maior do que o F_{tabelado} . O $F_{\text{calculado}}$ da falta de ajuste em relação ao

erro puro foi cerca de 4 vezes menor do que o F_{tabelado} . A porcentagem de variação explicada pelo modelo foi alta, de 93,11%.

Validados os modelos estatísticos para a resistência à tração e alongamento na ruptura, nas Figuras 4.13 e 4.14 são mostrados os gráficos de superfície de resposta e curva de contorno.

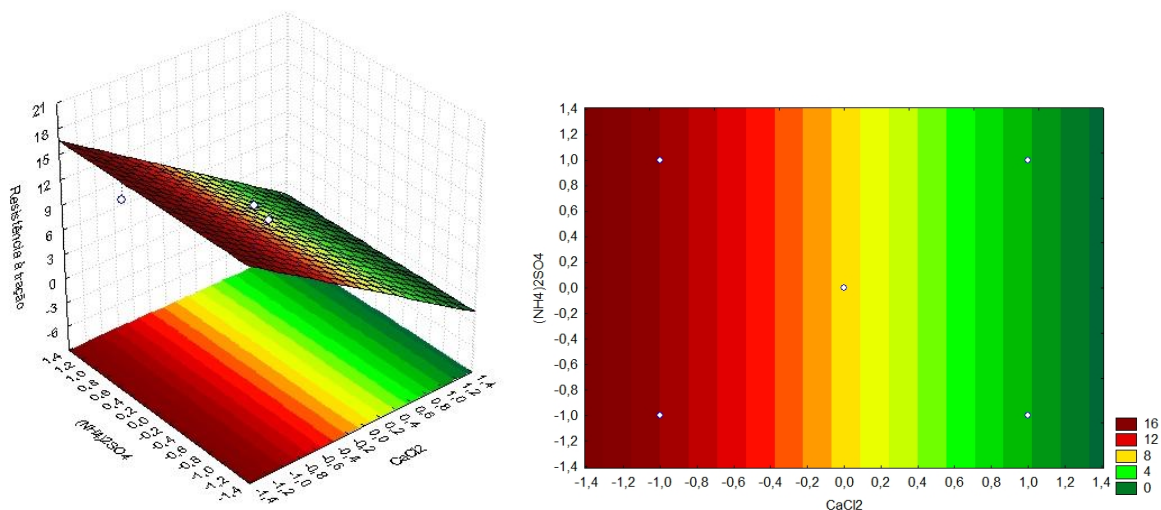


Figura 4.13: Superfície de resposta e curva de contorno para os valores de resistência à tração em função das concentrações codificadas de CaCl_2 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

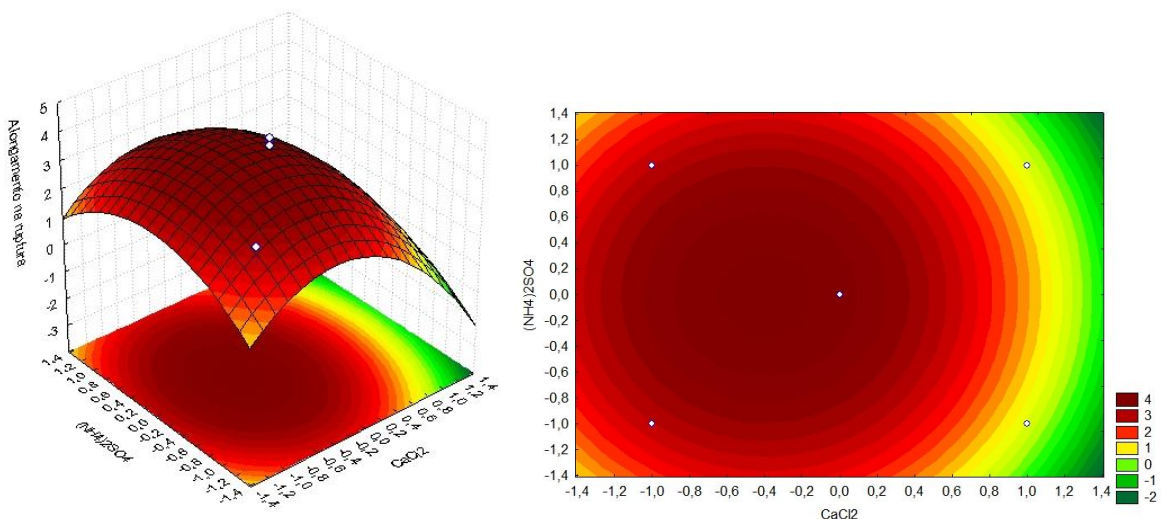


Figura 4.14: Superfície de resposta e curva de contorno para os valores de alongamento na ruptura m função das concentrações codificadas de CaCl_2 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Como pode ser observado nas Figuras 4.13 e 4.14, o aumento da quantidade de íons cálcio levou a membranas com menor resistência à tração. Além disso, verificou-se

um ponto ótimo para alongamento na ruptura em concentrações de CaCl_2 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ próximas ao ponto central.

Este comportamento não era esperado de acordo com alguns dados da literatura. Da Silva (2009) observou efeito positivo dos íons cálcio sobre a resistência à tração na reticulação de filmes de alginato e de quitosana-alginato, havendo, por outro lado, uma diminuição do alongamento na ruptura. Rhim (2004) observou comportamento semelhante para filmes de alginato de sódio reticulados com cloreto de cálcio. Em contraste com estes trabalhos, Wang *et al.* (2001, 2002) verificaram que o aumento da quantidade de CaCl_2 na reticulação de filmes de quitosana-alginato levou a um aumento tanto da resistência à tração quanto do alongamento na ruptura.

Com relação ao efeito do uso de íons sulfato ou de dupla-reticulação sobre as propriedades mecânicas de estruturas polissacarídicas, poucas referências foram encontradas. Xu *et al.* (2007) produziram partículas de quitosana-alginato reticuladas através de imersão em soluções de CaCl_2 a 0,18M e Na_2SO_4 a 0,18M. As partículas duplamente reticuladas apresentaram maior resistência mecânica do que aquelas reticuladas apenas com CaCl_2 . Os mesmos autores também produziram partículas reticuladas apenas com Na_2SO_4 , as quais se mostraram muito frágeis. Os resultados obtidos por estes autores não concordam com os obtidos neste trabalho, uma vez que não foi observada melhora de resistência mecânica quando outro agente reticulante foi incluído. Essa diferença de resultados pode ter sido devida a diferentes modos de ação de Na_2SO_4 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e também ao fato de que os autores mencionados realizaram reticulação apenas por imersão das partículas em solução salina, e não em duas etapas, como foi o caso deste trabalho.

Para entender a diferença de resultados em relação ao trabalho mencionado anteriormente, conduziram-se alguns testes simples para visualizar a reticulação da quitosana com soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e Na_2SO_4 . Uma solução de quitosana a 1% foi gotejada em um frasco contendo solução salina de Na_2SO_4 ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,5M. Para comparação do efeito reticulante, uma solução de alginato a 0,5% foi gotejada em solução de CaCl_2 a 0,5M. A reticulação do alginato foi imediatamente percebida em CaCl_2 , ocorrendo a formação de esferas gelificadas. Também a reticulação da quitosana pôde ser visualizada nas soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e Na_2SO_4 , sendo que a intensidade de gelificação foi

similar nos dois casos, porém menor em relação ao alginato. Soluções de alginato em Na_2SO_4 ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, e soluções de quitosana em CaCl_2 não tiveram nenhum resultado perceptível de gelificação, como era esperado. Esses resultados comprovam que o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tem poder reticulante sobre a quitosana, sendo que as diferenças em relação ao trabalho de Xu *et al.* (2007) não puderam ser explicadas até o momento.

Como forma de melhorar o entendimento dos resultados obtidos, tentou-se, também, quantificar os íons cálcio e sulfato nas membranas reticuladas ionicamente. O método de quantificação mais confiável e de mais fácil acesso seria a espectrofotometria de absorção atômica, que requer a prévia digestão da amostra. De acordo com resultados relatados anteriormente, membranas de quitosana complexada com alginato não se dissolvem quando expostas por 24 h a 37°C a soluções aquosas de ácido acético a 1 mol/l, hidróxido de sódio a 1 mol/l, tampão citrato de sódio a 55 mmol/l (pH 3,2) e ácido clorídrico a 1 mol/l (Rodrigues *et al.* 2008). Tentou-se, então, solubilizar as membranas de quitosana e alginato em água régia, um líquido altamente corrosivo, preparado pela mistura de ácido nítrico e ácido clorídrico na proporção de 1:3 (v/v). O tempo de imersão utilizado para testar a solubilização das membranas em água régia foi de dois dias. No entanto, também nesta solução as membranas se mostraram insolúveis. Sendo assim, a análise quantitativa de cálcio e sulfato nas membranas não se mostrou viável, considerando-se os métodos disponíveis.

A análise das propriedades mecânicas permitiu observar que os maiores valores de resistência à tração foram obtidos quando se utilizaram pequenas quantidades de reticulantes iônicos. O alongamento na ruptura variou pouco entre as amostras em comparação à variação observada para resistência à tração. Sendo assim, a resistência à tração foi utilizada como critério para a escolha da melhor condição de reticulação em relação às propriedades mecânicas. Desta forma, em condições próximas ao ponto I do planejamento (CaCl_2 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,05M), obtém-se membranas com melhores propriedades mecânicas.

4.3.7. Análise comparativa global dos efeitos sobre as propriedades das membranas avaliadas pelo uso do planejamento experimental

A Figura 4.15 a seguir permite visualizar de forma comparativa os efeitos das concentrações de soluções reticuladoras sobre a espessura, capacidade de absorção e perda de massa das membranas referentes ao planejamento experimental.

Percebe-se que o efeito da variação das condições de reticulação sobre a espessura foi muito mais pronunciado do que os efeitos sobre o comportamento das membranas em água e sobre as propriedades mecânicas.

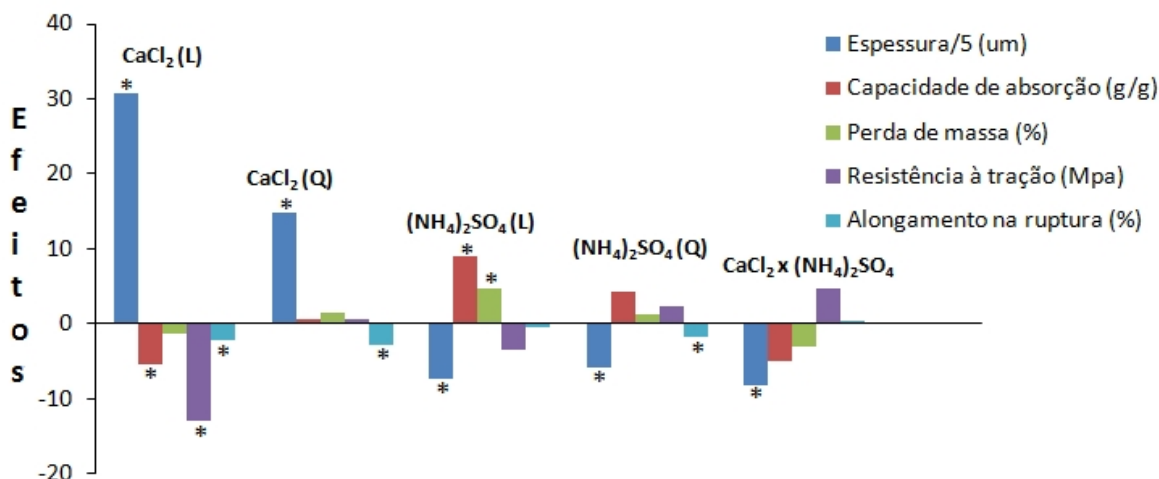


Figura 4.15: Gráfico de barras de comparação dos efeitos das concentrações de soluções reticulantes sobre as propriedades das membranas avaliadas pelo planejamento experimental (* Efeitos significativos)

Os efeitos sobre a espessura apresentaram, em muitos casos, sinal oposto aos efeitos sobre o comportamento das membranas em água. Assim, o aumento de espessura parece estar associado à diminuição dos valores de absorção e perda de massa, e vice-versa. Este comportamento é devido aos diferentes modos de ação dos agentes reticulantes, pois, como discutido anteriormente, as membranas menos espessas são reticuladas com grandes quantidades de sulfato, reticulante que favoreceu a capacidade de absorção e a perda de massa das amostras expostas à água.

Outra alternativa testada neste trabalho, com o objetivo de melhorar a dispersão polimérica, assim como as propriedades mecânicas das membranas, foi a adição de surfatantes, cujos resultados são mostrados a seguir.

4.4. Membranas obtidas na presença dos surfatantes Span 80, Tween 80 e Pluronic F68

Utilizando o método descrito no item 3.2.4, diferentes surfatantes foram adicionados à mistura reacional na proporção de 0,5%, na tentativa de obter membranas mais homogêneas e com melhores propriedades mecânicas. A condição de reticulação desta etapa foi a mesma que havia sido utilizada no início do trabalho, com base no trabalho de Rodrigues *et al.* (2008). Primeiramente, os três surfatantes utilizados neste trabalho (Span 80, Tween 80 e Pluronic F68) foram comparados entre si com respeito ao aspecto da mistura polimérica obtida após a reação e, em uma segunda etapa, com relação à aparência final das membranas produzidas.

4.4.1. Aspecto dos agregados poliméricos e das membranas

A mistura obtida com o surfatante Span 80, logo após ser retirada do reator, mostrou-se fibrosa e de difícil manuseio. Uma vez que a mistura não apresentava muitas bolhas, excluiu-se a etapa de desaeração do processo. Esperava-se que as bolhas desaparecessem no intervalo de tempo de secagem em estufa. No entanto, a membrana obtida não se mostrou adequada, sendo não maleável, com aspecto oleoso, fosco e de coloração amarelada e possuindo, ainda, algumas bolhas. Paralelamente, produziu-se uma membrana com Span 80 com a etapa de desaeração. A membrana apresentou uma distribuição polimérica não-uniforme e ainda notou-se a presença de bolhas, o que mostra que o material obtido necessita de um maior tempo de desaeração. Assim, as membranas com Span 80 foram consideradas insatisfatórias do ponto de vista da homogeneidade e maleabilidade do material, sendo este surfatante excluído de experimentos futuros. O aspecto das amostras obtidas com Span 80 é mostrado na Figura 4.16.

Os surfatantes Pluronic F68 e Tween 80 resultaram em materiais de aspecto muito semelhante entre si, na forma de espumas homogêneas de baixa consistência. Estes materiais foram desaerados de acordo com o procedimento tradicional de obtenção de membranas de quitosana-alginato. No entanto, houve a formação de membranas descontínuas, com falhas na sua estrutura, provavelmente devido à separação de fases, como pode ser visto na Figura 4.17.

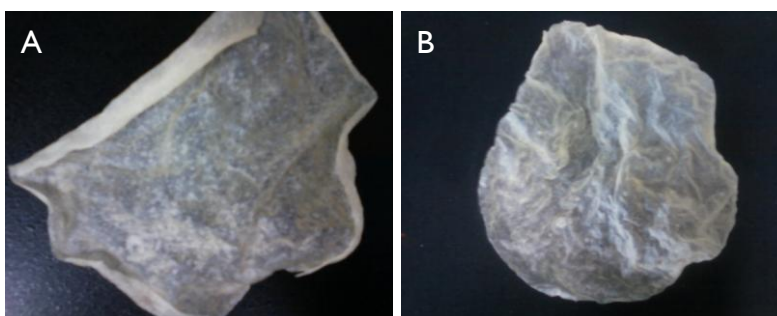


Figura 4.16: Membranas preparadas com Span 80: (A) sem desaerar, (B) desaerada.

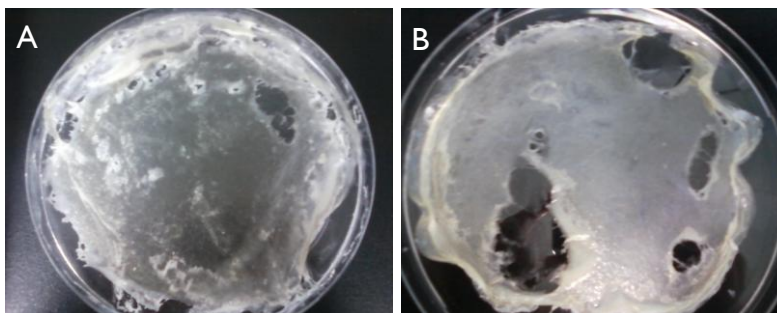


Figura 4.17: Membranas obtidas com a etapa de desaeração: (A) Tween 80, (B) Pluronic F68.

Desta forma, optou-se por excluir a etapa de desaeração do processo, para verificar se o material obtido se apresentaria contínuo. As membranas obtidas sem esta etapa apresentaram-se muito porosas, na forma de uma espuma homogênea, como pode ser visto na Figura 4.18. Notou-se que para a obtenção de tais membranas, o material deve ser colocado para secar na estufa a 37°C imediatamente. Se o mesmo for mantido em repouso por cerca de uma hora ou mais à temperatura ambiente, a dispersão se desestabiliza e não há mais manutenção de uma espuma homogênea, como pode ser visto na Figura 4.19.

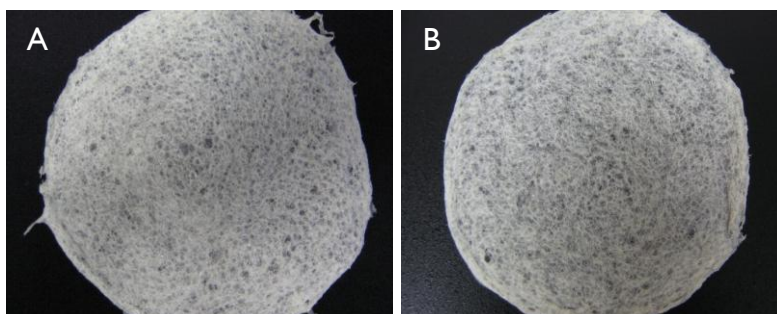


Figura 4.18: Aspecto final das membranas obtidas sem a etapa de desaeração (material não submetido a repouso antes de ser colocado na estufa): (A) Pluronic F68, (B) Tween 80.



Figura 4.19: Membrana com Pluronic F68 obtida sem a etapa de desaeração (material submetido a repouso antes de ser colocado na estufa).

Verificou-se, portanto, que a utilização de Tween 80 e Pluronic F68 levou à formação de membranas de quitosana-alginato com características peculiares, de estrutura altamente porosa e homogênea. Tais membranas foram consideradas atraentes do ponto de vista da utilização como curativos para feridas com alta produção de exsudato, assim como para arcabouços (*scaffolds*) para o crescimento de células animais.

4.4.2. Análises das interações entre os surfatantes e os polissacarídeos quitosana e alginato

As diferenças observadas entre os surfatantes testados e a possível separação de fases observada nas misturas que foram submetidas a repouso podem ser atribuídas a vários fatores. Sabe-se que os surfatantes agem diminuindo a tensão interfacial e a energia livre do sistema. Isso ocorre por serem moléculas anfifílicas, com partes hidrofílicas e hidrofóbicas. Quando um polímero é associado a um surfatante, assume uma conformação mais estendida, existindo duas alternativas de interação entre ambos: uma é a associação através de atração eletrostática, hidrofóbica ou pontes de hidrogênio, por exemplo, e outra é a formação de micelas do surfatante sobre o polímero, ou nas suas vizinhanças (Holmberg *et al.*, 2002).

Neste caso, os polissacarídeos alginato e quitosana, que são moléculas com alto caráter hidrofílico, devido à presença de muitos grupos $-OH$ (Rinaudo, 2008), podem interagir com os surfatantes Tween 80, Span 80 e Pluronic F68, que também possuem grupos $-OH$, através de pontes de hidrogênio. Outra provável interação é a hidrofóbica, que se daria pela atração entre as partes apolares das moléculas dos surfatantes e dos

polímeros (Holmberg *et al.*, 2002). As atrações eletrostáticas não ocorrem neste caso, uma vez que os surfatantes utilizados são não-iônicos.

A formação de micelas dos surfatantes interagindo com os polímeros também é uma possibilidade, mas para tanto, a concentração dos surfatantes deve estar acima da CMC (concentração micelar crítica). De acordo com Holmberg *et al.* (2002), quando as moléculas de surfatante já saturaram as moléculas poliméricas através de associações como as interações hidrofóbicas e as pontes de hidrogênio, ocorre a diminuição da tensão superficial até se atingir a CMC, quando se inicia a formação de micelas de surfatante e a tensão se estabiliza.

Verificou-se que os valores de CMC em água para os tensoativos estudados são 0,012mM para Tween 80 (Sigma-Aldrich, 2009 b), 0,04mM para Pluronic F68 (Sigma-Aldrich, 2009 c) e 0,4mM para Span 80 (Torres *et al.*, 2005). No entanto, estes valores foram determinados em água, sendo necessário verificar os efeitos da presença de cossolutos e cossolventes que, no caso do sistema reacional em questão, seriam a acetona, o ácido acético, o cloreto de cálcio e o hidróxido de sódio. A acetona está presente em quantidade mais significativa que os demais compostos, desta forma seu efeito deve ser mais pronunciado, de modo a causar uma diminuição no valor da CMC. Isso deve ocorrer porque cossolventes de menor polaridade têm preferência pelo interior das micelas, e não pela fase aquosa, o que estabiliza as estruturas micelares formadas e diminui o valor da CMC (Holmberg *et al.*, 2002). No entanto, não é possível afirmar com certeza quais os valores corretos de CMC no sistema em questão, pois não foram encontrados dados mais específicos na literatura e estes dados não foram determinados experimentalmente neste trabalho. Deve-se considerar também que a composição da fase aquosa sofre alterações durante a etapa de secagem das membranas, o que potencialmente poderia causar também modificações na forma de interação dos tensoativos com os polissacarídeos. Independentemente destes fatos, as concentrações de Tween 80, Span 80 e Pluronic F68 utilizadas neste trabalho foram muito maiores que os valores de CMC em água encontrados na literatura, assim, é bastante provável que ocorra a formação de micelas.

Portanto, supõe-se que além da atração entre as moléculas individuais de ambos os tipos de compostos (polissacarídeos e surfatantes), existe a possibilidade de haver

interação entre os polissacarídeos e as micelas de surfatantes.

Ainda com relação ao efeito da presença de acetona nas características das micelas, Chu e Kwan (2003) observaram que poluentes de solos contaminados são removidos de maneira eficiente quando se utiliza uma mistura de surfatantes e solventes orgânicos, como a acetona. Os autores mencionam que o interior das micelas de surfatantes age como uma pseudofase hidrofóbica, na qual os componentes orgânicos são solubilizados. Com a adição de acetona, o tamanho das micelas aumenta devido à solubilização do solvente orgânico no seu interior. Desta forma, tem-se um sistema com maior capacidade descontaminante, uma vez que os poluentes, que têm grande afinidade pela acetona, serão solubilizados no interior das micelas. Os autores também observaram que o Tween 80, que possuía a maior cadeia hidrofóbica em comparação aos outros tensoativos testados, polioxietileno-23-lauril éter e dodecil sulfato de sódio, teve o pior desempenho na solubilização dos compostos orgânicos.

Levando-se em consideração os resultados do estudo de Chu e Kwan (2003), pode-se inferir que, como a molécula de Span 80 é a menor dos três surfatantes testados, esta provavelmente possui maior capacidade de solubilizar a acetona no interior das micelas. Desta forma, o Span 80 diminuiria o contato da quitosana com o solvente orgânico, fazendo com que o polissacarídeo assumisse uma conformação mais estendida. Essa conformação resultaria em um aumento da taxa de reação entre a quitosana e o alginato e, conseqüentemente, haveria a formação de membranas interfásicas, levando à piora da distribuição polimérica observada nas membranas com Span 80. Já para os demais surfatantes, que possuem cadeias longas, a solubilização da acetona no interior das micelas seria dificultada.

Outro dado importante que deve ser considerado para avaliar as possibilidades de interação entre os polissacarídeos e os surfatantes, assim como a formação de espuma, é o equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) ou *hydrophilic-lipophilic balance* (HLB), que mede a hidrofilicidade dos surfatantes com base na porcentagem relativa entre seus grupos hidrofílicos e hidrofóbicos. Verificou-se na literatura que para o Span 80, o valor de HLB é de 4,3 (Torres *et al.*, 2005; Peltonen e Yliruusi, 2000), o que significa que este surfatante é olefílico e apresenta baixa capacidade de dispersão em água e de formação de espuma (Ponzetto e Rosa, 2003). Já o Tween 80 e o Pluronic F68 apresentam valores de HLB mais

elevados, sendo estes 15 e 29, respectivamente (Torres *et al.*, 2005; Kan *et al.*, 1999), o que indica alta capacidade de formar soluções aquosas límpidas e espumas (Ponzetto e Rosa, 2003). Não foram localizados na literatura dados de comportamento equivalente para sistemas aquosos contendo acetona.

Para verificar o efeito da presença dos cossolutos e cossolventes no sistema em estudo (acetona, ácido acético, NaOH e CaCl₂) sobre a solubilização dos surfatantes, foram conduzidos alguns experimentos simulando o meio reacional, sem a presença dos polímeros, que dificultariam a visualização dos resultados. Verificou-se que o Tween 80 e o Pluronic F68 formaram soluções límpidas com a água, as quais, sob agitação, formaram espumas. Já o Span 80 não foi solubilizado e tampouco formou espuma, o que é consistente com relação aos dados da literatura. Com a adição de solução aquosa de ácido acético a 2% misturada à acetona, na proporção 1:1, o Tween 80 e o Pluronic F68 mantiveram-se solubilizados, já o Span 80 permaneceu na fase oleosa, na forma de gotas grandes. A adição de NaOH a 1M seguida da adição de CaCl₂ a 2% não modificou as características visuais da solubilização do Tween 80 e Pluronic F68, já o Span 80 mostrou uma melhoria na dispersão, contudo, ainda permaneceu no sistema como uma segunda fase visível. Estes ensaios permitiram inferir que os tensoativos Tween 80 e Pluronic F68 distribuem-se uniformemente no sistema, mas o Span 80 não se dispersa adequadamente. No entanto, verificou-se também uma influência positiva dos polímeros sobre a solubilização dos tensoativos. Quando Span 80 foi adicionado a uma solução de alginato a 0,5%, houve uma dispersão mais uniforme do surfatante, com a formação de gotículas bem distribuídas por todo o volume da mistura. Este fato permite supor que o Span 80 pode associar-se ao alginato através de interações hidrofóbicas. Já com relação ao Tween 80 e ao Pluronic F68, houve uma dispersão bem mais uniforme em solução de alginato a 0,5%, em comparação com o Span 80. Com relação a estes resultados, pode-se afirmar que a baixa dispersão do Span 80 no sistema é outro fator que pode ter contribuído para formar membranas com cadeias poliméricas mal-distribuídas.

Como foi observado, quando do uso do Tween 80 e do Pluronic F68, o material obtido após a etapa de reação não resultou em membranas contínuas quando foi submetido a repouso por cerca de uma hora. Tal fato foi verificado apenas quando a membrana foi retirada da estufa, após sua secagem. Notou-se a presença de regiões contendo polímeros e regiões aparentemente vazias. Uma explicação é a que a força

gravitacional atuou na espuma, causando a drenagem do líquido depositado entre as bolhas de ar, resultando em uma separação de fases não perceptível em um primeiro momento. Tal separação de fases pode ser considerada associativa, ou seja, o tipo de separação de fases quando há uma forte atração entre as substâncias presentes na mistura, sendo que apenas a água e demais solventes (ácido acético e acetona) separaram-se do restante dos componentes (Holmberg *et al.*, 2002). Uma das fases consistiu de uma espuma mais seca e com bolhas mais próximas entre si, formada por ambos os polímeros mais o surfatante associados e outra consistiu da fase aquosa diluída. A evaporação da fase aquosa quando da secagem da membrana provocou as falhas observadas na sua estrutura. Similarmente, houve uma separação de fases do tipo associativa quando o material foi submetido à etapa de desaeração em bomba de vácuo, havendo concentração de polímeros e surfatantes em uma fase e líquidos em outra, ao mesmo tempo em que o ar era retirado da espuma.

Verificou-se que membranas porosas que não passaram pelo procedimento de reticulação posterior com CaCl_2 e lavagem com água deionizada tornaram-se amareladas após cerca de um mês, como possível consequência da oxidação do surfatante. Desta forma, é provável que, quando a membrana é reticulada e lavada, o surfatante seja parcial ou completamente removido, o que é bastante favorável do ponto de vista das aplicações desejadas, visto que a presença de altas concentrações de tensoativos poderia levar a um certo grau de toxicidade.

Na Figura 4.20 encontra-se uma representação do que se supõe que ocorra na espuma formada pelas soluções poliméricas e pelo surfatantes Tween 80 e Pluronic F68. De acordo com esta figura, as cadeias de quitosana e alginato, solubilizadas no filme líquido interagem com o surfatante, o qual se encontra na forma de micelas ou de moléculas isoladas. As moléculas de surfatante também se distribuem na interface ar/líquido, com a parte polar voltada para o líquido e a parte apolar voltada para o ar. A presença dos polissacarídeos e sua interação com os surfatantes aumenta a viscosidade do sistema, contribuindo para aumentar também a estabilidade da espuma. Além disso, devido ao grande tamanho das moléculas polissacarídicas, há impedimento do colapso do filme por impedimento estérico (Holmberg *et al.*, 2002). Desta forma, a espuma formada permanece estável por tempo suficiente, permitindo que a secagem da mesma resulte em uma membrana altamente porosa.

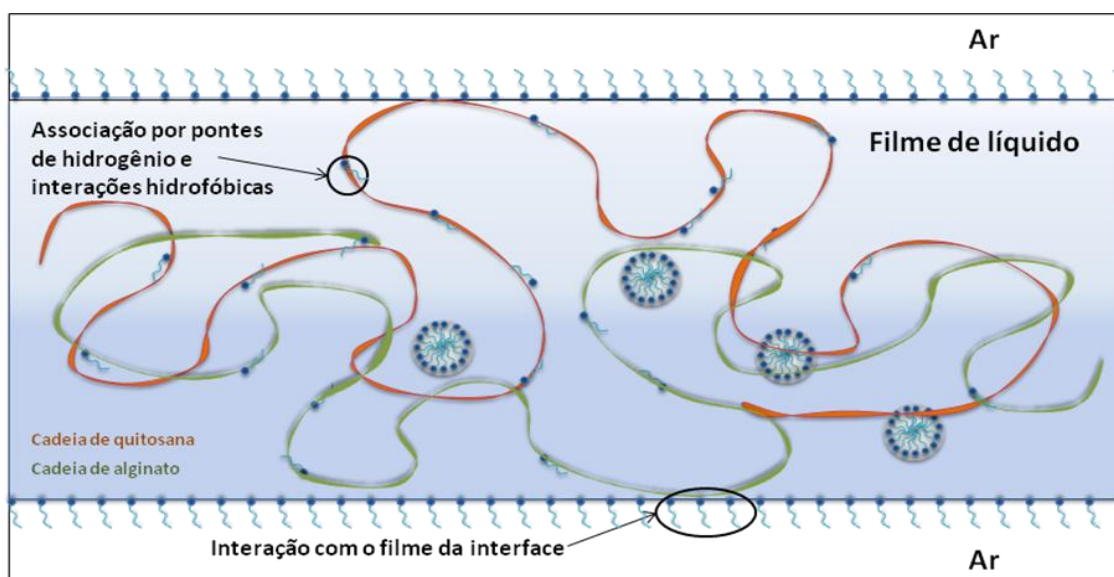


Figura 4.20: Representação do filme líquido da espuma formada no sistema contendo os polissacarídeos quitosana e alginato e os surfatantes não-iônicos.

4.4.3. Caracterização das membranas obtidas na presença de Tween 80 e Pluronic F68

As membranas obtidas na presença de Tween 80 e Pluronic F68, por serem consideradas as mais adequadas, foram avaliadas com relação à morfologia da superfície e da secção transversal, propriedades mecânicas, capacidade de absorção e espessura em diferentes soluções aquosas e perda de massa nas mesmas soluções.

4.4.3.1. Características morfológicas

Nas Figuras 4.21 e 4.22 são apresentadas imagens típicas destas membranas obtidas por microscopia eletrônica de varredura.

Através da análise da Figura 4.21, foi possível obter uma boa visualização dos poros formados. A região analisada da membrana preparada com Pluronic F68 possui uma maior quantidade de poros (partes escuras da imagem). Já a região analisada da membrana obtida na presença de Tween 80 mostra uma depressão contendo dois poros menores em seu interior. Observou-se que o tamanho e formato dos poros apresentam distribuição variada, notando-se diâmetros de cerca de 90 μm a 270 μm . As demais regiões das membranas são, em geral, rugosas.

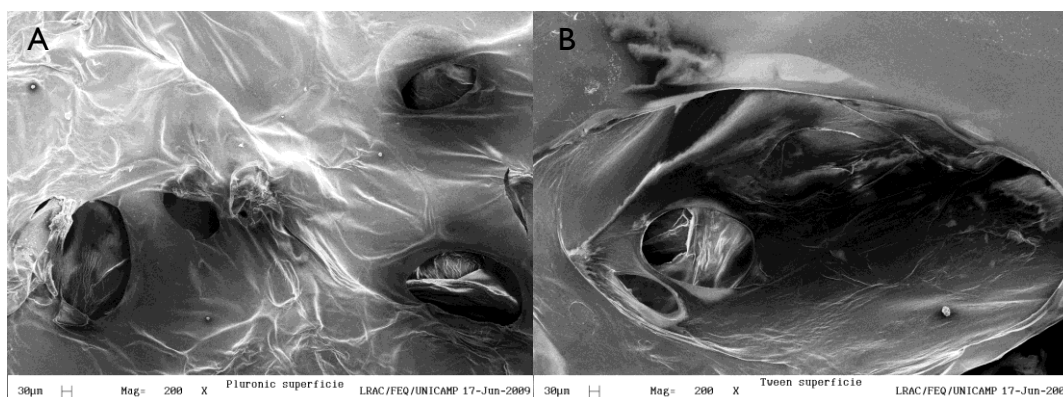


Figura 4.21: Morfologia da superfície das membranas de quitosana-alginato obtidas na presença de surfatantes: (A) Pluronic F68, (B) Tween 80.

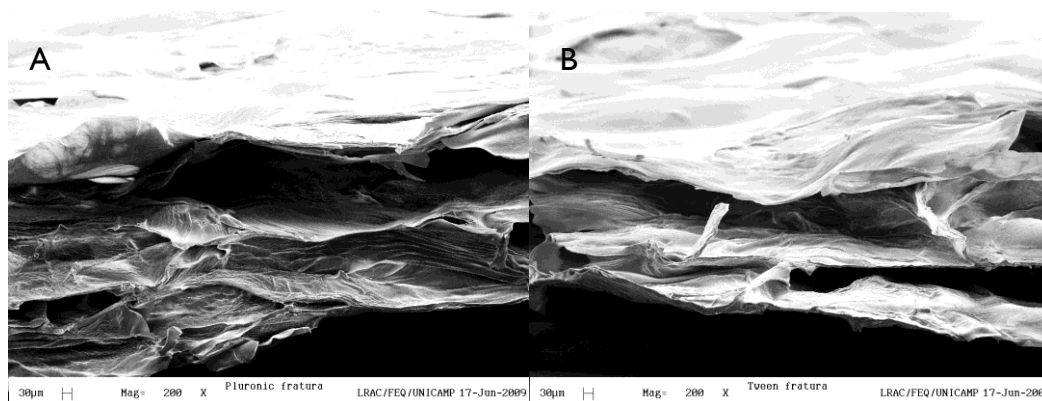


Figura 4.22: Morfologia da secção transversal das membranas de quitosana-alginato obtidas na presença de surfatantes: (A) Pluronic F68, (B) Tween 80.

Verificou-se para ambas as seções transversais das membranas uma estrutura com camadas bem espaçadas, sendo cada uma composta por finas lamelas. A estrutura lamelar já havia sido observada para membranas sem surfatantes obtidas neste trabalho e anteriormente por Rodrigues *et al.* (2008). A presença em conjunto de poros e lamelas permite denominar estas membranas de membranas lamelares porosas. Na imagem mostrada, a membrana com Pluronic F68 possui camadas mais distantes entre si do que a membrana com Tween 80. Em algumas partes das imagens também foi possível visualizar fibras poliméricas.

Ainda de acordo com a Figura 4.22, os poros aparentemente não atravessam a estrutura total da membrana de forma contínua, o que seria vantajoso com relação ao aspecto de proteção de uma lesão contra o ataque externo de microorganismos contaminantes, no caso de aplicação como curativo.

4.4.3.2. Propriedades mecânicas

Na Tabela 4.14 são mostrados os resultados obtidos para as propriedades mecânicas.

Tabela 4.14: Propriedades mecânicas das membranas preparadas na presença de Tween 80 e Pluronic F68.

Propriedade	Tween 80	Pluronic F68
Resistência à tração (MPa)	1,54 ± 0,16 ^(a)	0,98 ± 0,07 ^(b)
Alongamento na ruptura (%)	2,06 ± 0,13 ^(c)	1,96 ± 0,14 ^(c)

Mesma letra na mesma linha indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

A análise dos dados da Tabela 4.14 permite concluir que a resistência à tração foi um pouco maior para as membranas com Tween 80. Já o alongamento na ruptura não diferiu estatisticamente entre os dois tipos de membrana. Uma possível explicação encontrada na literatura para o melhor desempenho mecânico das membranas com Tween 80 está relacionada à estrutura química dos surfatantes. Devido ao menor comprimento das cadeias de polioxietileno do Tween 80, em relação às cadeias de Pluronic F68, estas se posicionam de forma mais empacotada na interface ar-líquido, diminuindo mais eficientemente a tensão superficial e talvez melhorando o empacotamento das cadeias polissacarídicas. Surfatantes com cadeias de polioxietileno mais longas, como o Pluronic F68, têm menor capacidade para formar camadas coesas em uma espuma (Holmberg *et al.*, 2002). Desta forma, supõe-se que a espuma formada pelo Tween 80 possui uma interface mais forte e elástica, possibilitando obter uma membrana mais compacta e com propriedades mecânicas um pouco melhores.

Em comparação com dados da literatura, Kucharska *et al.* (2008) prepararam esponjas de quitosana-alginato por liofilização, as quais apresentaram menor resistência à tração do que as membranas obtidas neste trabalho, ao redor de 0,6MPa (valor estimado a partir da tenacidade fornecida pelos autores). Por outro lado, o alongamento na ruptura encontrado por estes autores foi maior, de 10%. Lai *et al.* (2003) também produziram esponjas de quitosana-alginato que apresentaram alongamento na ruptura maior do que os valores encontrados neste trabalho, sendo este de 3% para uma proporção de 1:1 entre os polissacarídeos. A força máxima suportada por essas esponjas antes de sua ruptura foi

de 5N, a qual não pode ser comparada aos dados deste trabalho, uma vez que os autores não forneceram detalhes a respeito das dimensões dos corpos de prova utilizados nos ensaios. Contudo, uma vez que não existe um consenso a respeito das condições em que os ensaios são realizados (dimensões dos corpos de prova, velocidade de distensão e força aplicada à amostra, distância entre as garras do equipamento, umidade relativa, etc.), comparações diretas entre os dados da literatura podem eventualmente levar a conclusões equivocadas. Ainda, deve-se destacar que, para o uso almejado, tais membranas possivelmente estariam hidratadas, e nesta situação a água poderia atuar como um agente plastificante, alterando o comportamento mecânico das amostras.

4.4.3.3. Comportamento das membranas em soluções fisiológicas

Os valores obtidos para a capacidade de absorção de água, NaCl a 0,9%, fluido corpóreo simulado (FCS) e soro fetal bovino (SFB), assim como a perda de massa das membranas quando expostas às mesmas soluções fisiológicas são mostrados na Tabela 4.15.

Tabela 4.15: Valores de absorção por 24 h a 37°C e perda de massa após uma semana a 37°C em água e em soluções fisiológicas aquosas das membranas preparadas na presença de Tween 80 e Pluronic F68.

Solução	Absorção (g/g)		Perda de massa (%)	
	Tween 80	Pluronic F68	Tween 80	Pluronic F68
Água	13,67 ± 0,49 ^{(a)(A)}	13,83 ± 0,42 ^{(a)(A)}	31,38 ± 0,98 ^{(e)(A)}	30,47 ± 2,16 ^{(e)(A)}
NaCl 0,9%	11,27 ± 0,73 ^{(b)(B)}	11,96 ± 0,53 ^{(b)(A)}	6,54 ± 0,83 ^{(f)(B,C)}	8,33 ± 2,16 ^{(f)(A,B)}
FCS	5,90 ± 0,22 ^{(c)(C)}	7,74 ± 0,69 ^{(c)(B)}	11,84 ± 1,60 ^{(g)(B)}	13,01 ± 3,26 ^{(g)(A,B)}
SFB	6,76 ± 0,25 ^{(d)(C)}	7,95 ± 0,84 ^{(d)(B)}	-8,24 ± 6,86 ^{(h)(C)*}	3,04 ± 10,35 ^{(i)(B)*}

Mesma letra minúscula na mesma linha indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Mesma letra maiúscula na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

*Valores díspares devido à provável adsorção de proteínas do soro pela membrana preparada com Tween 80.

Os resultados obtidos para a capacidade de absorção são comparáveis a alguns dados da literatura referentes a membranas porosas ou esponjas de quitosana-alginato preparadas por liofilização. As esponjas produzidas por Kucharska *et al.* (2008) absorveram 17,50g/g de água após 180 minutos. Oztürk *et al.* (2006) produziram esponjas capazes de absorver de 6,51 a 12,04g/g de tampão fosfato (pH 7,4), após 10 minutos de exposição. Yu *et al.* (2005), por outro lado, reportaram valores maiores de absorção, que variaram de 9 a 73g/g de tampão PBS após imersão de 24 horas. Esta diferença de valores pode ser atribuída ao processo de liofilização utilizado durante o preparo das esponjas, condição de pH, proporção mássica entre a quitosana e o alginato e uso de diferentes agentes reticulantes.

Os valores de perda de massa indicam que as membranas porosas são estáveis em contato com as soluções fisiológicas, que simulam fluidos corpóreos e soluções que poderiam ser aplicadas para hidratar as membranas previamente ao seu uso como curativos. A máxima perda de massa foi observada em água, apresentando valor em torno de 31% para ambas as membranas. Quando em soro fetal bovino, as membranas aumentaram sua massa, provavelmente devido à adsorção de proteínas presentes na solução.

O teste de Tukey realizado com os resultados de capacidade de absorção e perda de massa indicou que não houve variação significativa entre as membranas preparadas com os diferentes surfatantes. Por outro lado, houve variações significativas entre as soluções fisiológicas testadas. As maiores capacidade de absorção e perda de massa foram observadas em água.

De acordo com Maurstad *et al.* (2008) e Bartkowiak (2002), a presença de íons pode causar a blindagem das cargas dos polissacarídeos em solução, através da formação de uma nuvem de contra-íons que reduziria a repulsão eletrostática entre as cadeias. Com o aumento da força iônica, essa blindagem seria mais evidente, resultando em cadeias poliméricas mais flexíveis e empacotadas (Strand *et al.*, 2001). Desta forma, quanto maior a concentração iônica, maior a aproximação entre as cadeias de polissacarídeos, o que impediria a água de penetrar na estrutura da membrana, provocando menores valores de capacidade de absorção e perda de massa. Para verificar se houve maior empacotamento na membrana quando em soluções salinas, mediram-se as espessuras

úmidas das membranas em água, NaCl a 0,9%, FCS e SFB após um período de imersão de 24 h a 37°C. Os resultados são mostrados na Tabela 4.16.

Na Tabela 4.16, a fração de variação (V) da espessura (E) em relação à amostra seca foi calculada de acordo com a Equação 3.

$$V = \frac{E_{úmida} - E_{seca}}{E_{seca}} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

No caso das amostras úmidas, a maior variação de espessura foi verificada para as membranas que estavam em contato com água, sendo identificado um aumento de 290% para o Tween 80 e 220% para o Pluronic F68 em comparação à espessura das membranas secas. Os valores das espessuras úmidas das amostras diminuíram para NaCl a 0,9%, seguido por FCS e SFB. Assim, aparentemente, o aumento da força iônica e mesmo da osmolalidade parecem ter causado uma redução da expansão da membrana no líquido. Estes resultados corroboram com a teoria da blindagem de cargas elétricas discutida anteriormente.

Tabela 4.16: Espessuras das membranas preparadas na presença de Tween 80 e Pluronic F68 em diferentes soluções fisiológicas aquosas.

Sistema	Espessura (µm)		Fração de variação da espessura em relação à amostra seca (%)	
	Tween 80	Pluronic F68	Tween 80	Pluronic F68
Membrana seca	380 ± 30 ^{(a)(A,E)}	410 ± 60 ^{(b)(A)}	-	-
Membrana em água	1480 ± 170 ^{(c)(B,C)}	1310 ± 80 ^{(c)(B)}	290	220
Membrana em NaCl 0,9%	1190 ± 50 ^{(d)(B,C,D)}	1290 ± 40 ^{(d)(B)}	213	215
Membrana em FCS	950 ± 50 ^{(e)(C,D,E)}	1130 ± 30 ^{(f)(B)}	150	176
Membrana em SFB	730 ± 90 ^{(g)(A,D,E)}	900 ± 30 ^{(g)(C)}	92	120

Mesma letra minúscula na mesma linha indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, p<0,05).

Mesma letra maiúscula na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, p<0,05).

Uma consideração importante a se fazer com relação aos dados de espessura é que, tanto no estado seco quanto úmido, ambos os tipos de membrana estão de acordo com as recomendações de Ma *et al.* (2001). Estes autores afirmam que os substitutos poliméricos da derme aplicados como *scaffolds* na área de engenharia de tecidos devem ser geralmente mais finos do que a pele humana, cuja espessura varia de 0,5 a 2mm, dependendo da idade, sexo e região do corpo. Membranas porosas produzidas por outros autores apresentaram espessuras maiores do que as obtidas neste trabalho, encontrando-se uma variação de 2,5 a 8 mm (Kucharska *et al.*, 2008; Lai *et al.*, 2003; Wan *et al.*, 2007; Li e Zhang, 2005). Essas espessuras maiores são provavelmente consequência do uso de maiores quantidades de material, assim como do maior número e tamanho dos poros formados através do processo de liofilização.

Apesar do aumento da força iônica causar redução na variação de espessura e na capacidade de absorção, o mesmo não ocorreu para a perda de massa, como pode ser visto na Tabela 4.15. Era esperado, no entanto, que a perda de massa também diminuísse gradualmente, uma vez que o aumento da força iônica dificultou a entrada de água na membrana e formou uma estrutura polimérica aparentemente mais coesa. O que se notou, contudo, foi uma maior perda de massa em FCS, de maior força iônica, do que em NaCl 0,9%, de menor força iônica. Este comportamento pode ter sido devido à diferença entre os valores de pH destas soluções. O pH da solução de FCS é de 7,4, enquanto o pH de NaCl 0,9% é de 6,0. Sabe-se, pelos valores de pKa da quitosana (6,3 a 7,0) e do alginato (3,38 e 3,65), que um valor de pH igual a 6,0 é favorável à interação eletrostática entre os polieletrólitos, uma vez que este valor é intermediário aos valores de pKa dos polissacarídeos. Já em pH igual a 7,4, os grupos amino da quitosana encontram-se, em sua maioria, desprotonados, portanto, não interagem com os grupos carboxila do alginato, negativamente carregados. Desta forma, a formação do complexo de polieletrólitos seria desfavorecida neste valor de pH, enfraquecendo a estrutura da membrana, a qual seria mais facilmente solubilizada.

4.4.3.4. Considerações sobre as membranas obtidas na presença de surfatantes

Quanto à possível toxicidade das membranas quando da adição de surfatantes à sua formulação, tanto o Tween 80 quanto o Pluronic F68 possuem aplicações como dispersantes de nutrientes em cultivos celulares. Sakai *et al.* (2001), por exemplo, apontam

que, para células CHO, obtidas de ovário de hamsters, a concentração máxima de tensoativo que não cause toxicidade pode chegar a 20 mg/l no caso do uso de Tween 80, enquanto para o Pluronic F68, não foram verificados efeitos deletérios para estas células em concentrações até 500 mg/l. Destaca-se que a concentração máxima de Tween 80 tolerada por esta linhagem celular é muito superior à empregada em membranas preparadas tanto na presença de Tween 80 quanto de Pluronic F68, mesmo se se considerar que todo o surfatante adicionado à formulação permaneceria na estrutura da membrana. No entanto, como parte do surfatante pode ser removida na lavagem, os riscos de toxicidade seriam ainda menores. Assim, pode-se inferir que as membranas podem ser preparadas na presença de quantidades de surfatantes comparáveis à massa total de polímeros, obtendo-se um material de aspecto adequado, além de biocompatível.

Considerando-se todas as propriedades analisadas para as membranas porosas, tem-se que as membranas preparadas na presença de Tween 80 e Pluronic F68 são significativamente diferentes entre si apenas com relação à espessura e à resistência à tração, sendo as membranas com Tween 80 menos espessas e mais resistentes mecanicamente. Uma vantagem apresentada pelo Tween 80 com relação ao Pluronic F68 é o seu menor custo, o que pode ser de grande impacto se se considerar a produção do curativo em escala industrial.

Na Tabela 4.17 tem-se uma comparação mais direta entre algumas propriedades das membranas preparadas na presença ou não de Tween 80.

Tabela 4.17: Comparação entre membranas com e sem o surfatante Tween 80.

Propriedade	Sem Tween 80 *	Com Tween 80
Espessura (μm)	$100,83 \pm 17,67^{(a)}$	$380,00 \pm 30,00^{(b)}$
Espessura úmida (μm)	$215,00 \pm 13,53^{(c)}$	$1480,00 \pm 170,00^{(d)}$
Absorção de água (g/g)	$5,67 \pm 0,53^{(e)}$	$13,67 \pm 0,49^{(f)}$
Perda de massa em água (%)	$6,84 \pm 0,69^{(g)}$	$31,38 \pm 0,98^{(h)}$
Resistência à tração (Mpa)	$10,97 \pm 1,97^{(i)}$	$1,54 \pm 0,16^{(j)}$
Alongamento na ruptura (%)	$2,80 \pm 0,20^{(k)}$	$2,06 \pm 0,13^{(l)}$

Mesma letra na mesma linha indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

(*) Consideraram-se os dados obtidos com 160ml/h para ambos os tipos de membrana, sendo a mesma condição de reticulação empregada para ambas as membranas (CaCl_2 a 0,18M)

Percebe-se que as membranas obtidas com Tween 80 são cerca de quatro vezes mais espessas no estado seco e cerca de sete vezes mais espessas no estado úmido em comparação às membranas sem Tween 80. Por serem mais porosas, tais membranas apresentaram uma capacidade de absorção de água cerca de 2,4 vezes maior e uma perda de massa 4,6 vezes maior.

Quanto às propriedades mecânicas, no entanto, tem-se que as membranas com Tween 80 são mais frágeis, sendo sua resistência à tração cerca de 7 vezes menor e seu alongamento na ruptura, cerca de 1,4 vezes menor. Estas diferenças nas propriedades mecânicas entre as membranas com e sem Tween 80 permitem concluir que a adição do surfatante contribuiu apenas para a homogeneização do sistema, e não para o aumento efetivo da resistência do material, como era desejado. Como comentado anteriormente, a obtenção das membranas somente foi possível com a exclusão da etapa de desaeração da mistura, o que levou a membranas com muitas bolhas de ar e camadas bem espaçadas. Tal estrutura não é vantajosa do ponto de vista das propriedades mecânicas, uma vez que membranas com camadas mais compactas e sem bolhas, como as obtidas por Rodrigues *et al.* (2008), apresentam melhor resistência e alongamento na ruptura.

Apesar dos resultados indicarem certa inferioridade do ponto de vista das propriedades mecânicas das membranas obtidas na presença de Tween 80, deve-se ressaltar que estas apresentam um aspecto de espuma interessante. Além disso, devido a sua alta porosidade, é possível utilizá-las em outros tipos de aplicações, como por exemplo, em arcabouços (*scaffolds*) para regeneração de tecidos, uma vez que as células terão suporte suficiente entre as diversas camadas lamelares observadas nas análises por MEV, e devido aos poros e às lamelas, a intercomunicação celular será possível.

Outro aspecto positivo a respeito das membranas lamelares porosas é a sua facilidade de produção. Não foi feito uso de métodos onerosos, como a liofilização, que foi utilizada por autores como Kucharska *et al.* (2008), Li *et al.* (2009), Yu *et al.* (2005), Lai *et al.* (2003), Öztürk *et al.* (2006), Madihally e Matthew (1999), Subramanian e Lin (2005), Wan *et al.* (2007) e Li e Zhang (2005).

Como forma de dar continuidade aos estudos com as membranas lamelares porosas obtidas neste trabalho, na tentativa de melhorar suas propriedades, foram

produzidas membranas na presença de Tween 80 empregando a melhor condição de reticulação encontrada para as membranas preparadas na ausência de tensoativos.

4.4.4. Membranas lamelares porosas reticuladas na melhor condição verificada para membranas lamelares

Dos métodos de reforço mecânico estudados neste trabalho, a reticulação iônica se mostrou mais eficaz do que a reticulação covalente com glutaraldeído. Como comentado no item 4.3.6, na condição de reticulação de CaCl_2 a 0,05M e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,05M foram obtidas membranas com maior resistência à tração. Essa condição foi então empregada na produção de membranas na presença de Tween 80.

O aspecto do material obtido é mostrado na Figura 4.23. Verificou-se que, apesar de uma espuma haver sido formada antes da secagem do material, a membrana resultante não apresentou estrutura homogênea e porosa, sendo que as bolhas e poros concentraram-se apenas em uma região.

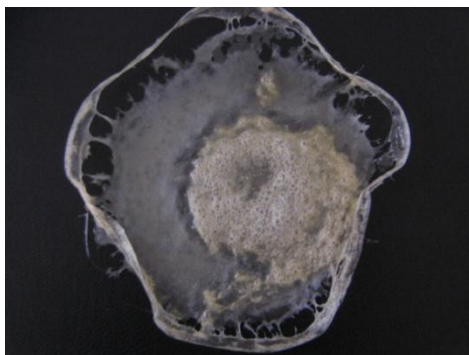


Figura 4.23: Membrana preparada na presença de Tween 80 e reticulada com CaCl_2 a 0,05M e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,05M.

Este resultado ocorreu provavelmente devido à baixa concentração de CaCl_2 empregada. Como já discutido anteriormente, o CaCl_2 provoca o aumento da viscosidade da mistura polimérica após a reticulação das cadeias de alginato, e a viscosidade do sistema é de grande importância para que o sistema formado pelos polissacarídeos e pelo surfatante se mantenha como uma espuma estável durante a secagem do material. O uso de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, por outro lado, seria prejudicial à manutenção da espuma, uma vez que o

mesmo pareceu favorecer o empacotamento, assim como o movimento das cadeias de polissacarídeos, o que provavelmente contribuiu para a desestabilização da espuma.

Apesar de a condição de reticulação de 0,05M CaCl_2 e 0,05M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ser favorável à obtenção de membranas lamelares, o mesmo não se aplica à produção de membranas lamelares porosas, embora os materiais possuam composições similares em termos dos polissacarídeos empregados.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1. Conclusões

As membranas de quitosana-alginato obtidas neste trabalho mostraram propriedades promissoras para serem usadas no tratamento de lesões de pele, sendo os valores de espessura, capacidade de absorção, perda de massa e propriedades mecânicas de resistência à tração e alongamento na ruptura considerados adequados para a proposta de aplicação.

O estudo preliminar de ampliação de escala mostrou que o aumento de vazão de adição da solução de quitosana à solução de alginato não altera as propriedades mecânicas, de absorção e perda de massa das membranas.

Das alternativas de reforço mecânico abordadas, que incluíram reticulação iônica com CaCl_2 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, reticulação covalente com glutaraldeído e adição de surfatantes à mistura polimérica, a reticulação iônica se mostrou como a única estratégia promissora. Observou-se que para se obter membranas com melhores propriedades mecânicas, devem ser usadas baixas concentrações de CaCl_2 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, uma vez que o aumento das mesmas levou a membranas com menores resistência à tração e alongamento na ruptura. A membrana com melhores propriedades mecânicas, reticulada na condição de CaCl_2 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,05M, apresentou resistência à tração de 19,43MPa, alongamento na ruptura de 3,17%, capacidade de absorção de água de 5,28 g/g e perda de massa de 4,56%. Verificou-se que os limites superiores de concentração testados nos estudos de reticulação, tanto iônica como covalente, se mostraram muito elevados, levando a membranas muito quebradiças, no caso do glutaraldeído, e altamente heterogêneas, no caso da reticulação iônica.

Dentre os surfatantes testados, o Tween 80 e o Pluronic F68 resultaram em membranas satisfatórias do ponto de vista do seu aspecto e maleabilidade, porém sua resistência mecânica e alongamento na ruptura foram baixos. No entanto, o aspecto poroso e lamelar, a alta absorção de soluções fisiológicas (de 6 a 14 g/g), além da facilidade de produção, fazem com que tais membranas sejam interessantes para uso como curativos e também como *scaffolds* para o cultivo de células animais.

5.2. Sugestões para trabalhos futuros

Sugere-se a continuação deste trabalho enfocando-se:

- O estudo de escalonamento do processo, com produção de mais membranas por batelada, assim como o uso de maiores taxa de agitação e vazão;
- O uso de outros agentes reticulantes para a quitosana, como a aglicona Genipina ou íons fosfato;
- O emprego de outros cátions bivalentes para a reticulação do alginato, como Ba^{2+} , Sr^{2+} , Zn^{2+} e Al^{3+} , com análise concomitante da toxicidade das membranas produzidas;
- O uso de menores quantidades de glutaraldeído e reticulantes iônicos para a reticulação das membranas;
- A identificação e quantificação dos agentes reticulantes através de técnicas como FTIR, Fluorescência de raios x, ou métodos espectrofotométricos;
- O emprego de menores quantidades de surfatantes na formulação das membranas;
- O controle de umidade durante os ensaios de caracterização mecânica das membranas;
- A avaliação da biocompatibilidade das membranas através de ensaios *in vitro* e *in vivo*;
- O estudo do efeito da temperatura durante a etapa de reação entre a quitosana e o alginato;
- A análise da influência do aumento da temperatura de secagem das membranas, de modo a diminuir o tempo desta etapa da produção;
- A avaliação do uso das membranas de quitosana-alginato na liberação controlada de fármacos;
- A análise da viabilidade econômica da produção industrial das membranas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABREU, F.O.M.S.; BIANCHINI, C.; FORTE, M.M.C.; KIST, T.B.L. Influence of the composition and preparation method on the morphology and swelling behavior of alginate–chitosan hydrogels. *Carbohydrate Polymers*, v. 74, p. 283–289, 2008
2. AZEVEDO, V.V.C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D.C.; LIA FOOK, M.V.; COSTA, A.C.F.M. Quitina e quitosana, aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v.2.3, p. 27-34, 2007
3. BARROS NETO, B.; SCARMINO, I.S.; BRUNS, R.E. *Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. Campinas: Editora da Unicamp, 2001
4. BARTKOWIAK, A. Effect of the ionic strength on properties of binary alginate/oligochitosan microcapsules. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 204, p. 117-124, 2002
5. BEPPU, M.M.; VIEIRA, R.S.; AIMOLI, C.G.; SANTANA, C.C. Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde: Effect on ion permeability and water absorption. *Journal of Membrane Science*, v. 301, p. 126–130, 2007
6. BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J.M.; FELT, O.; PEPPAS, N.A.; GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 57, p. 19-34, 2004
7. BERNABÉ, P.; PENICHE, C.; ARGÜELLES-MONAL, W. Swelling behavior of chitosan/pectin polyelectrolyte complex membranes. Effect of thermal cross-linking. *Polymer Bulletin*, v. 55, p. 367-375, 2005
8. BORGES, E.L.; SAAR, S.R.C.; LIMA, V.L.A.N.; GOMES, F.S.L.; MAGALHÃES, M.B.B. *Feridas: Como tratar*. 2.ed. Belo Horizonte: Editora Coopmed, 2007
9. CALMANOVICI, C.E.; GABAS, N.; LAGUERIE, C. Solubility measurements for calcium sulfate dihydrate in acid solutions at 20, 50, and 70 degree C. *Journal of Chemical & Engineering Data*, v.38, p.534-536, 1993
10. CAMPANA-FILHO, S.P.; DE BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F.R.; CARDOSO, M.B.;

- BATTISTI, M.V.; SIM, P.C.; GOY, R.C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R.L. Extração, estruturas e propriedades de α e β -quitina. *Química Nova*, v. 30, n. 3, p. 644-650, 2007.
11. CANELLA, A.M.N.C.; GARCIA, R.B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel – influência do método de preparação e do solvente. *Química Nova*. Disponível em: <<http://www.s bq.org.br/publicacoes/quimicanova/qnol/2001/vol24n1>>. 2001. Acesso em Abril/2009
 12. CÁRDENAS, A.; ARGUELLES-MONAL, W.; GOYCOOLEA, F. M.; HIGUERA-CIAPARA, I.; PENICHE, C. Diffusion through membranes of the polyelectrolyte complex of chitosan and alginate. *Macromolecular Bioscience*, v. 3(10), p. 535-539, 2003
 13. CARRASQUE, L.S.; MORAES, A.M. Avaliação do efeito da reticulação térmica nas propriedades de membranas de quitosana e alginato projetadas para o recobrimento de lesões de pele. *VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica*, 2009
 14. CERON, A.C.; RODRIGUES, A.P.; MORAES, A.M. Produção escalonável e caracterização de membranas de quitosana e alginato destinadas a terapias cutâneas. *Anais do 4º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais*, 2006
 15. CHU, W.; KWAN, C.Y. Remediation of contaminated soil by a solvent/surfactant system. *Chemosphere*, v. 53, p. 9-15, 2003
 16. DA CUNHA, P.L.R.; DE PAULA, R.C.M.; FEITOSA, J.P.A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 649-660, 2009
 17. DA SILVA, M. A. *Desenvolvimento e caracterização de filmes compostos de alginato e quitosana contendo natamicina como agente antimicótico*. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2009. Tese (Doutorado)
 18. DALLAN, P. R. M. *Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele*. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2005. Tese (Doutorado)
 19. DALLAN, P.R.M.; MOREIRA, P.L.; PETINARI, L.; MALMONGE, S.M.; BEPPU, M.M.; GENARI, S.C.; MORAES, A.M. Effects of chitosan solution concentration and incorporation of chitin and glycerol on dense chitosan membrane properties. *Journal*

- of Biomedical Materials Research part B, Applied Biomaterials*, v. 80B, n. 2, p. 394-405, 2007
20. GALESI, A.L.L. *Cultivo de células de Drosophila melanogaster em diferentes formulações de meios de cultura livres de soro visando à produção da glicoproteína do vírus da raiva*. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007. Tese (Doutorado)
 21. GEORGE, M.; ABRAHAM T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan — a review. *Journal of Controlled Release*, v. 114, p. 1–14, 2006
 22. HEIN, S.; WANG, K.; STEVENS, W.F.; KJEMS, J. Chitosan composites for biomedical applications: status, challenges and perspectives. *Materials Science and Technology*, v. 24, p. 1053-1061, 2008
 23. HOLMBERG, K.; JÖNSSON, B.; KRONBERG, B.; LINDMAN, B. *Surfactants and polymers in aqueous solutions*. 2.ed. Chichester, Inglaterra: John Wiley & Sons, 2002
 24. IL'INA, A. V.; VARLAMOV V. P. Chitosan-based polyelectrolyte complexes: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 41, n. 1, p. 5-11, 2005
 25. JAGUR-GRODZINSKI, J. Polymers for tissue engineering, medical devices, and regenerative medicine. Concise general review of recent studies. *Polymers for Advanced Technologies*, v. 17, p. 395-418, 2006
 26. JAY, S.M.; SALTZMAN, W.M. Controlled delivery of VEGF via modulation of alginate microparticle ionic crosslinking. *Journal of Controlled Release*, v. 134, p. 26–34, 2009
 27. KAN, P.; CHEN, Z.B.; KUNG, R.Y.; LEE, C.J.; CHU, I.M. Study on the formulations of o/w emulsion as carriers for lipophilic drugs. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, n. 15, p. 117-125, 1999
 28. KANTI, P.; SRIGOWRI, K.; MADHURI, J.; SMITHA, B.; SRIDHAR, S. Dehydration of ethanol through blend membranes of chitosan and sodium alginate by pervaporation. *Separation and purification technology*, v. 40, p. 259-266, 2004
 29. KARAKEÇİLİ, A.G.; SATRIANO, C.; GÜMÜŞDERELIOĞLU, M.; MARLETTA, G. Surface characteristics of ionically crosslinked chitosan membranes. *Journal of Applied*

- Polymer Science*, v. 106, p. 3884-3888, 2007
30. KARMARKAR, A.B.; GONJARI, I.D.; HOSMANI, A.H. Poloxamers and their applications. Disponível em: <<http://www.pharmainfo.net/pharma-student-magazine/poloxamers-and-their-applications-0>>. 2008. Acesso em Julho/2009
 31. KATO, K.; WALDE, P.; KOINE, N.; ICHIKAWA, S.; ISHIKAWA, T.; NAGAHAMA, R.; ISHIHARA, T.; TSUJII, T.; SHUDOU, M.; OMOKAWA, Y.; KUROIWA, T. Temperature-sensitive nonionic vesicles prepared from Span 80 (Sorbitan Monooleate). *Langmuir*, v. 24, p. 10762-10770, 2008
 32. KNAUL, J.Z.; HUDSON, S.M.; CREBER, K.A.M. Crosslinking of chitosan fibers with dialdehydes: proposal of a new reaction mechanism. *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*, v. 37, p. 1079-1094, 1999
 33. KOKUBO, T.; KUSHITANI, H.; SAKKA, S.; KITSUGI, T.; YAMAMURO, T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *J. Biomed. Mater. Res.*, v.24, p.721-734, 1990
 34. KUCHARSKA, M.; NIEKRASZEWICZ, A.; WIŚNIEWSKA-WRONA, M.; BRZOZAMALCZEWSKA, K. Dressing sponges made of chitosan and chitosan-alginate fibrils. *Fibres & Textiles in Eastern Europe*, v. 16, n.3, p. 109-113, 2008
 35. KUMAR, M.N.V.R. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, v. 46, p. 1-27, 2000
 36. LABSYNTH. Ficha de informações de segurança de produtos químicos (Tween 80). Disponível em: <[http://downloads.labsynth.com.br/fispq/FISPQ-Tween 80.pdf](http://downloads.labsynth.com.br/fispq/FISPQ-Tween%2080.pdf)>. 2008. Acesso em Julho/2009
 37. LAI, H.L.; ABU'KHALIL, A.; CRAIG, D.Q.M. The preparation and characterization of drug-loaded alginate and chitosan sponges. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 251, p. 175-181, 2003
 38. LEE, Y.M.; NAM, S.Y.; WOO, D.J. Pervaporation of ionically surface crosslinked chitosan composite membranes for water-alcohol mixtures. *Journal of Membrane Science*, v. 133, p. 103-110, 1997
 39. LI, X.; XIE, H.; LIN, J.; XIE, W.; MAA, X. Characterization and biodegradation of

- chitosan–alginate polyelectrolyte complexes. *Polymer Degradation and Stability*, v. 94, p. 1–6, 2009
40. LI, Z.; ZHANG, M. Chitosan-alginate as scaffolding material for cartilage tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v.75, n. 2, p. 485-493, 2005
 41. LIU, Y.; DENG, X. Influences of preparation conditions on particle size and DNA loading efficiency for poly(DL-lactic acid–polyethylene glycol) microspheres entrapping free DNA. *Journal of Controlled Release*, v. 83, p. 147–155, 2002
 42. LU, D.; BURGESS, D.J.; RHODES, D.G. Nonideality in mixed monolayers of sorbitan oleate is enhanced by elevated ionic strength. *Langmuir*, v. 16, p. 10329-10333, 2000
 43. MA, J.; WANG, H.; HE, B.; CHEN, J. A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts. *Biomaterials*, v. 22, p. 331-336, 2001
 44. MA, L.; YU, W.; MA, X. Preparation and characterization of novel sodium alginate/chitosan two ply composite membranes. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 106, p. 394–399, 2007
 45. MADIHALLY, S.V.; MATTHEW, H.W.T. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, v. 20, p. 1133-1142, 1999
 46. MALAFAYA, P.B.; SILVA, G.A.; REIS, R.L. Natural–origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, p. 207–233, 2007
 47. MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 78(4), p. 393-410, 2003 (a)
 48. MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte II. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 78(5), p. 525-542, 2003 (b)
 49. MARCONATO, J.C.; FRANCHETTI, S.M.M. Polímeros superabsorventes e as fraldas descartáveis: um material alternativo para o ensino de polímeros. *Química Nova na Escola*, n. 15, p. 42-44, 2002

50. MARRECO, P.R.; MOREIRA, P.L.; GENARI, C.S.; MORAES, A.M. Effects of different sterilization methods on the morphology, mechanical properties, and cytotoxicity of chitosan membranes used as wound dressings. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 71B, p. 268-277, 2004
51. MAURSTAD, G.; MØRCH, Y.A.; BAUSCH, A.R.; STOKKE, B.T. Polyelectrolyte layer interpenetration and swelling of alginate–chitosan multilayers studied by dual wavelength reflection interference contrast microscopy. *Carbohydrate Polymers*, v. 71, p. 672–681, 2008
52. MCHUGH, D.J. A guide to the seaweed industry. FAO Fisheries Technical Paper 441. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/006/Y4765E/y4765e00.HTM>>. 2003. Acesso em Agosto/2009
53. MONTEIRO, O.A.C.; AIROLDI, C. Some studies of crosslinking chitosan–glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 26, p. 119-128, 1999
54. MORELLO, A.P.; BURRILL, R.; MATHIOWITZ, E. Preparation and characterization of poly(methyl methacrylate)—iron (III) oxide microparticles using a modified solvent evaporation method. *Journal of Microencapsulation*, v. 24(5), p. 476–491, 2007
55. MUZZARELLI, R.A.A. *Natural chelating polymers. Alginic acid, chitin and chitosan*. Nova Iorque: Pergamon Press, 1973
56. NGAH, W.S.W; FATINATHAN, S. Adsorption of Cu(II) ions in aqueous solution using chitosan beads, chitosan–GLA beads and chitosan–alginate beads. *Chemical Engineering Journal*, v. 143, p. 62-72, 2008
57. NOTARA, M.; SCOTCHFORD, C.A.; GRANT, D.M.; WESTON, N.; ROBERTS, G.A.F. Cytocompatibility and hemocompatibility of a novel chitosan-alginate gel system. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 89A, n. 4, p. 854-864, 2008
58. ORREGO, C.E.; VALENCIA, J.S. Preparation and characterization of chitosan membranes by using a combined freeze gelation and mild crosslinking method. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 32, p. 197-206, 2009
59. ÖZTÜRK, E.; AĞALAR, C.; KEÇECİ, K.; DENKBAŞ, E.B. Preparation and

- characterization of ciprofloxacin-loaded alginate/chitosan sponge as a wound dressing material. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 101, p. 1602-1609, 2006
60. PAES, A.T. Desvio padrão ou erro padrão: qual utilizar? *Einstein – Educação Continuada em Saúde*, v. 6, p.107-108, 2008
61. PANIKKAR, R.; BRASCH, D.J. Composition and block structure of alginates from New Zealand brown seaweeds. *Carbohydrate Research*, v. 293, p. 119-132, 1996
62. PARK, K.M.; JOUNG, Y.K.; NA, J.S.; LEE, M.C.; PARK, K.D. Thermosensitive chitosan–Pluronic hydrogel as an injectable cell delivery carrier for cartilage regeneration. *Acta Biomaterialia*, v. 5, n. 6, p. 1956-1965, 2009
63. PAUL, W.; SHARMA, C.P. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*, v.18, p.18-23, 2004
64. PELTONEN, L.J.; YLIRUUSI, J. Surface pressure, hysteresis, interfacial tension, and CMC of four sorbitan monoesters at water-air, water-hexane, and hexane-air interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 227, p. 1-6, 2000
65. PEREIRA, V.F.; RODRIGUES, A.P.; MORAES, A.M. Efeitos observados nas propriedades das membranas de quitosana-alginato destinadas a terapia de queimaduras, quando da adição de glicerol. *XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, 2008
66. PONZETTO, E.; ROSA, F. Tensoativos para o desenvolvimento de revestimentos. Artigo Técnico da Oxiteno. Disponível em: <<http://www.oxiteno.com.br/aplicacoes/mercados/doc/documento.asp?artigotecnico=28&segmento=0500&idioma=PO&r=.pdf>>. 2003. Acesso em Setembro/2009
67. PRETÉ, P.S.C. *Solubilização de membranas de eritrócitos por surfatantes da série Tween*. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2000. Dissertação (Mestrado)
68. RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E. *Biomaterials science, an introduction to materials in medicine*. San Diego, Estados Unidos: Academic Press, 1996
69. REDDY, A.S.; KALYANI, S.; KUMAR, N.S.; BODDU, V.M.; KRISHNAIAH, A. Dehydration of 1,4-dioxane by pervaporation using crosslinked calcium alginate-

- chitosan blend membranes. *Polymer Bulletin*, v. 61, p. 779–790, 2008
70. RHEIN, L.D.; SCHLOSSMAN, M.; O'LENICK, A.; SOMASUNDARAN, P. *Surfactants in personal care products and decorative cosmetics*. 3.ed. Surfactant series v. 135. New York, Estados Unidos: CRC Press, Taylor and Francis group, 2007
71. RHIM, J.W. Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, v.37, p.323-330, 2004
72. RIBEIRO, A.J.; NEUFELD, R.J.; ARNAUD, P.; CHAUMEIL, J.C. Microencapsulation of lipophilic drugs in chitosan-coated alginate microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 187, p. 115–123, 1999
73. RINAUDO, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International*, v. 57, p. 397–430, 2008
74. RODEHEAVER, G.T.; KURTZ, L.; KIRCHER, B.J.; EDLICH, R.F. Pluronic F68: A promising new skin wound cleanser. *Annals of Emergency Medicine*, v. 9, n. 11, p. 572-576, 1980
75. RODRIGUES, A.P. *Preparação e caracterização de membranas de quitosana e alginato para aplicação na terapia de lesões*. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2008. Tese (Doutorado)
76. RODRIGUES, A.P. *Produção e caracterização de micropartículas de alginato incorporando Aeromonas Hydrophila inativada para imunização de Tilápia do Nilo por via oral*. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2004. Tese (Mestrado)
77. RODRIGUES, A.P.; GENARI, S.C.; SANCHEZ, E.M.S.; MORAES, A.M. Effect of stirring rate used in the preparation of chitosan-alginate membranes on biomaterial properties. *Anais do IV Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais*, 2006
78. RODRIGUES, A.P.; MORAES, A.M. Preparação e caracterização de membranas formadas por coacervados de quitosana e alginato projetadas para a regeneração de lesões de pele. *Anais do XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, 2006
79. RODRIGUES, A.P.; SANCHEZ, E.M.S.; COSTA, A.C.; MORAES, A.M. The influence of preparation conditions on the characteristics of chitosan-alginate dressings for skin lesions. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 109, p. 2703-2710, 2008

80. SACCHETIN, P.S.C. *Incorporação de flavobacterium columnare inativado em micropartículas de alginato e quitosana para a imunização de tilápia do nilo (oreochromis niloticus) por via oral*. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2009. Dissertação (Mestrado)
81. SAKAI, K.; HAYASHI, C.; YAMAJI, H.; FUKUDA, H. Use of nonionic surfactants for effective supply of phosphatidic acid in serum-free culture of chinese hamster ovary cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 92, n. 3, p. 256-261, 2001
82. SÆTHER, H.V.; HOLME, H.K.; MAURSTAD, G.; SMIDSRØD, O.; STOKKE, B.T. Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, v. 74, p. 813–821, 2008
83. SCHERR, G.H. Chitosan wound dressing. United States Patent Application Publication. US 2007/0237811 A1. 11 de outubro de 2007
84. SHELMA, R.; PAUL, W.; SHARMA C.P. Chitin nanofibre reinforced thin chitosan films for wound healing application. *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*, v. 22(2), p. 107-111, 2008
85. SHI, G.; CHEN, Y.; WAN, C.; YU, X.; FENG, T.; DING, Y. Study on the preparation of chitosan–alginate complex membrane and the effects on adhesion and activation of endothelial cells. *Applied Surface Science*, v. 255, p. 422–425, 2008
86. SIGMA-ALDRICH. Pluronic®F-68 P1300. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=P1300>| SIGMA&N5=Product No.|BRAND_ KEY&F=SPEC>. Acesso em Julho/2009 (C)
87. SIGMA-ALDRICH. Span®80 85548. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=85548>| FLUKA&N5=Product No.|BRAND_ KEY &F = SPEC>. Acesso em Julho/2009 (A)
88. SIGMA-ALDRICH. Tween®80 P1754. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=P1754>| SIAL&N5 = Product No.|BRAND_ KEY &F= SPEC>. Acesso em Julho/2009 (B)
89. SIMSEK-EGE, F.A.; BOND, G.M.; STRINGER, J. Polyelectrolyte complex formation between alginate and chitosan as a function of pH. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 88, p. 346-351, 2003

90. STRAND, S.P.; VANDVIK, M.S.; VÅRUM, K.M.; ØSTGAARD, K. Screening of chitosans and conditions for bacterial flocculation. *Biomacromolecules*, v.2, p. 126-133, 2001
91. SUBRAMANIAN, A.; LIN, H.Y. Crosslinked chitosan: its physical properties and the effects of matrix stiffness on chondrocyte cell morphology and proliferation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 75, n. 3, p. 742-753, 2005
92. SUZUKI, T.; MIZUSHIMA, Y. Characteristics of silica-chitosan complex membrane and their relationships to the characteristics of growth and adhesiveness of L-929 cells cultured on the biomembrane. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 84, n.2, p.128-132, 1997
93. SVANG-ARIYASKUL, A.; HUANG, R.Y.M.; DOUGLAS, P.L.; PAL, R.; FENG, X.; CHEN, P.; LIU, L. Blended chitosan and polyvinyl alcohol membranes for the pervaporation dehydration of isopropanol. *Journal of Membrane Science*, v. 280, p. 815-823, 2006
94. THOMAS, S. The role of dressings in the treatment of moisture-related skin damage. Disponível em: <<http://www.worldwidewounds.com>>. 2008. Acesso em Julho/2009
95. TORRES, L.G.; ROJAS, N.; BAUTISTA, G.; ITURBE, R. Effect of temperature, and surfactant's HLB and dose over the TPH-diesel biodegradation process in aged soils. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 3296-3302, 2005
96. VEIGA, I.G. *Uso de xantana em substituição ao alginato em membranas coacervadas de quitosana projetadas para a cicatrização de lesões de pele*. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2009. Dissertação (Mestrado)
97. WAN, Y.; WU, Q.; WANG, S.; ZHANG, S.; HU, Z. Mechanical properties of porous polylactide/chitosan blend membranes. *Macromolecular Materials and Engineering*, v. 292, p. 598-607, 2007
98. WANG, L.; KHOR, E.; LIM, L.Y. Chitosan-alginate-CaCl₂ system for membrane coat application. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 90, p. 1134-1142, 2001
99. WANG, L.; KHOR, E.; WEE, A.; LIM, L.Y. Chitosan-alginate PEC membrane as wound dressing: Assessment of incisional wound healing. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 63, p. 610-618, 2002

100. WITTAYA-AREEKUL, S.; PRAHSARN, C. Development and in vitro evaluation of chitosan-polysaccharides composite wound dressings. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 313, p. 123-128, 2006
101. XU, Y.; ZHAN, C.; FAN, L.; WANG, L.; ZHENG, H. Preparation of dual crosslinked alginate-chitosan blend gel beads and in vitro controlled release in oral site-specific drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, 336, 329-337, 2007
102. YAN, X.; KHOR, E.; LIM, L.Y. PEC films prepared from chitosan-alginate coacervates. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 48(7), p. 941-946, 2000
103. YEOM, C.K.; LEE, K. Characterization of sodium alginate membrane crosslinked with glutaraldehyde in pervaporation separation. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 67, p. 209-219, 1998
104. YU, S.H.; MI, F.L.; WU, Y.B.; PENG, C.K.; SHYU, S.S.; HUANG, R.N. Antibacterial activity of chitosan-alginate sponges incorporating silver sulfadiazine: effect of ladder-loop transition of interpolyelectrolyte complex and ionic crosslinking on the antibiotic release. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 98, p. 538-549, 2005
105. YUDANOVA, T.N.; RESHETOV, I.V. Modern wound dressings: manufacturing and properties. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, v. 40, n. 2, p. 85-92, 2006
106. ZHANG, W.; YU, Z.; QIAN, Q.; ZHANG, Z.; WANG, X. Improving the pervaporation performance of the glutaraldehyde crosslinked chitosan membrane by simultaneously changing its surface and bulk structure. *Journal of Membrane Science*, v. 348, p. 213-223, 2010