



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
E ENGENHARIA DE MATERIAIS/UAEMa**



LUZINETE VIEIRA DE ALMEIDA TEREHOFF GONZÁLEZ

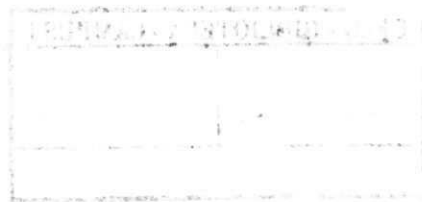
**DESENVOLVIMENTO DE ESTRUTURAS HÍBRIDAS
QUITOSANA/FENITOÍNA PARA O CONTROLE DAS CRISES EPILÉPTICAS**

CAMPINA GRANDE – PB

2013

LUZINETE VIEIRA DE ALMEIDA TEREHOFF GONZÁLEZ

**DESENVOLVIMENTO DE ESTRUTURAS HÍBRIDAS
QUITOSANA/FENITOÍNA PARA CONTROLE DAS CRISES EPILÉPTICAS**



Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Engenharia de Materiais
como requisito para a Obtenção
do título de mestre em CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Severo de Macedo – UAEMa/UFCG

**CAMPINA GRANDE
2013**



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCC

- G643d Gonzáles, Luzinete Vieira de Almeida Terehoff.
Desenvolvimento de estruturas híbridas quitosana/fenitoína para o controle das crises epiléticas / Luzinete Vieira de Almeida Terehoff Gonzáles. – Campina Grande, 2013.
74 f.: il. Color.
- Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia.
- "Orientação: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook".
Referências.
1. Epilepsia. 2. Fenitoína. 3. Hidantoína. 4. Nível Sérico.
5. Monitorização. I. Fook, Marcus Vinicius Lia. II. Título.

CDU 620:616.853(043)

**DESENVOLVIMENTO DE ESTRUTURAS HÍBRIDAS
QUITOSANA/FENITOÍNA PARA O CONTROLE DAS CRISES EPILÉPTICAS**

LUZINETE VIEIRA DE ALMEIDA TEREHOFF GONZÁLEZ

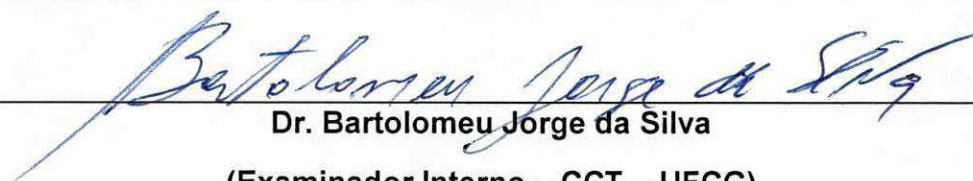
Dissertação Aprovada em ^{29/11} 2013 pela banca examinadora constituída dos seguintes membros:



Prof. Dr. Reginaldo Severo de Macedo
(Orientador - UFCG)



Dr. Rossemberg Cardoso Barbosa
(Examinador Interno – CCT – UFCG)



Dr. Bartolomeu Jorge da Silva
(Examinador Interno – CCT – UFCG)

METAMORFOSE



*Lagarta, me deito, incerta
Princesa ainda não desperta.
Mistérios Minh 'alma encerra
De uma beleza ainda não descoberta.*

*Me cubro de sol, lua, estrelas,
E de repente o escuro me invade,
No silêncio, o som dos meus passos
Vagando sem rumo pela cidade.*

*E na estrada da vida
Longa, sem fim
Busco respostas dentro de mim.*

*Se um dia pudesse entender quem
sou,
Sairia do casulo e seria apenas
Eu. Borboleta. Mulher*

Thais Vieira Terehoff

Ao meu pai José Vieira e minha mãe Maria Almeida (in memoriam) pela base familiar sólida, pautada no amor, no respeito, na fidelidade e sobretudo no espírito de luta incansável em busca de um objetivo maior. Aos meus filhos Thais e Igor, amor que não se mede, aquele que realmente dá sentido à vida. Ao meu marido pelo amor e respeito que nos une e pelo apoio, sobretudo em momentos difíceis e de grandes decisões. Aos meus irmãos, sobrinhos e sobrinhos-netos, com carinho.

RESUMO

Epilepsia é doença relativamente comum na população geral, decorrente de distúrbios neurológicos diversos, caracterizada pela ocorrência periódica e espontânea de atividade neuronal altamente sincronizada e manifestações comportamentais. Manifestação única de crise, embora a princípio não possa ser catalogada como epilepsia, requer acompanhamento clínico, investigação através de exames complementares específicos para cada caso, devido ao risco de recorrência. Entre as medicações utilizadas para o controle das crises epiléticas, a fenitoína, é um dos principais fármacos antiepiléticos, utilizada tanto a nível ambulatorial quanto em situações de emergências/ urgências. A proposta é desenvolver um material para monitorização, rápida e precisa, da fenitoína sérica, em pacientes que fazem uso desta medicação, objetivando a individualização na dosimetria e assim maior sucesso terapêutico. Para se cumprir os objetivos indicados, inicialmente foi sintetizada uma membrana de quitosana com a incorporação desse fármaco (fenitoína) e feitas as caracterizações mais pertinentes (MO, DRX, MEV, FTIR, DSC, Ensaio de biodegradação, Tensão superficial e teste de citotoxicidade), bem como analisado as reações desta membrana frente a diferentes níveis de pH.

Palavras-chave: Epilepsia. Fenitoína. Hidantoína. Nível sérico. Monitorização.

ABSTRACT

Epilepsy report is relatively common disease in the population generates, due to various neurological disorders characterized by periodic and spontaneous occurrence of highly synchronized neuronal activity and behavioral manifestations. Only manifestation of crisis, although the principle can not be cataloged as epilepsy, requires clinical monitoring, research through specific complementary tests for each case, because of the risk of recurrence . Among the medications used to control seizures, phenytoin , is a major antiepileptic drugs , used both outpatient and in emergencies / urgencies . The proposal is to develop a material for monitoring, fast and accurate serum phenytoin in patients taking this medication, aiming to individualize the dosimetry and therefore greater therapeutic success. To meet the objectives mentioned above, was initially synthesized a membrane of chitosan with the incorporation of this drug (phenytoin) and made the most pertinent characterizations (OM, XRD, SEM , FTIR , DSC , biodegradation test , Surface Tension and cytotoxicity test) and analyzed the reactions of this front at different levels of pH membrane.

Keywords: Epilepsy. Phenytoin. Hydantoin. Serum. Monitoring.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASTM	Standart test Method for <i>in vitro</i> Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer and Fabricated Forms for Surgical implants
CERTBIO	Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste
C₁₂H₂₄N₂O₉	Quitosana
C₂H₄O₂	Ácido Acético
DAE	Drogas antiepilépticas
DRX	Difração de raios X
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EDS	Espectroscopia por energia dispersiva de raios X
et al.	entre outros
GA	Grau de acetilação
GlcNAc	N – acetil – 2 – amino – 2 – desoxi – D – glucose
GlcN	2 amino – 2 – desoxi – D – glucose
h	hora
<i>In vitro</i>	em vidro
ISO	International Organization for Standardization
M	molar
MM	Massa molar
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
MO	Microscopia Óptica
MTT	brometo de 3 – (4,5 – dimetiltiazol – 2 – Il) – 2,5 – difenil – tetrazólio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NH₃⁺	Amônia
NMDA	N – metil – D – aspartato
PBS	Phosphate Buffered Saline
Q/F	Quitosana/ Fentanil

SE	Status epiléptico
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
UAEMa	Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VO	Via oral
�C	graus Celsius

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Crise generalizada tônico-clônica	20
Figura 2 – Concentração sérica de fenitoína em vários pacientes em função da dose diária por quilo de peso administrada	27
Figura 3 – Aplicações de materiais cerâmicos, metálicos e poliméricos como biomateriais	31
Figura 4 – Estrutura química da quitina e da quitosana	33
Figura 5 – Microscópio Óptico (MO) acoplado a estação de Captura e Análise de Imagens com Software	38
Figura 6 – Difratorômetro de raios X	38
Figura 7 – Spectrum 400	39
Figura 8 – Microscópio Eletrônico de Varredura com equipamento para análise de Energia Dispersiva de raios X acoplado	40
Figura 9 – Ângulo de contato	41
Figura 10 – Goniômetro utilizado para medir tensão superficial.....	41
Figura 11 – Equipamento de Calorimetria Exploratória Diferencial	42
Figura 12 – Membranas Quitosana/ Fenitoína líquida a) – 5 %; b) – 3 % e c) – 1 %, e membranas Quitosana/ Fenitoína comprimido d) – 1; e) – 1/2 e f) – 1/4 .	44
Figura 13 – Ênfase a diferença visual entre as membranas a) – Quitosana/ Fenitoína líquida e b) – Quitosana/ Fenitoína comprimido	45
Figura 14 – Avaliação do comportamento das membranas Quitosana\ Fenitoína líquida e comprimido nos pH's 4,01; 6,81; 8,81 e 10,01. Fotos representativas de todas as variações	46
Figura 15 – Avaliação do comportamento das membranas Quitosana\ Fenitoína líquida e comprimido no pH 7,01. Fotos representativas de todas as variações	47
Figura 16 – Avaliação do comportamento das membranas Quitosana\ Fenitoína líquida 5 % e 1 comprimido no pH 7,01. Fotos representativas de todas as variações	48
Figura 17 – Espectogramas das membranas de Quitosana e Quitosana \ Fármaco líquido sintetizadas neste trabalho	49
Figura 18 – Espectogramas das membranas de Quitosana e Quitosana \ Fármaco comprimido sintetizadas neste trabalho	49

Figura 19 – Resultados da análise de Espectroscopia na região de infravermelho com transformada de Fourier	51
Figura 20 – Microscopia Óptica das membranas de quitosana, a – 350x; b – 1050x e c – 2100x	52
Figura 21 – Membrana Quitosana\ Fenitoína líquida 5 % nos aumentos de a – 350x; b – 1050x	53
Figura 22 – Membrana Quitosana\ Fenitoína líquida 3 % nos aumentos de a – 350x; b – 1050x	53
Figura 23 – Membrana Quitosana\ Fenitoína 1 comprimido nos aumentos de a – 350x; b – 1050x e c - 2100x	54
Figura 24 – Membrana Quitosana\ Fenitoína 1 comprimido nos aumentos de a – 350x; b – 1050x e c - 2100x	55
Figura 25 - Membrana Quitosana\ Fenitoína 1/2 comprimido nos aumentos de a – 350x; b – 1050x e c - 2100x	56
Figura 26 – Membrana Quitosana\ Fenitoína 1/4 comprimido nos aumentos de a – 350x; b – 1050x e c - 2100x	56
Figura 27 – Microscopia Eletrônica de Varredura da membrana apenas de quitosana nos aumentos a) – 1500x e b) – 5000x	58
Figura 28 – Microscopia Eletrônica de Varredura da membrana Quitosana/ Fenitoína líquida 5 % nos aumentos de a) – 1500x, b) – 5000x e c) – 10000..	58
Figura 29 – Microscopia Eletrônica de Varredura da membrana Quitosana/ Fenitoína 1 comprimido nos aumentos de a) – 1500x, b) – 5000x e c) – 10000	59
Figura 30 – Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X da membrana Quitosan/ Fenitoína líquida 5 %	60
Figura 31 – Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X pontual do grão presente na membrana Quitosana/ Fenitoína líquida 5 %	61
Figura 32 – Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X da membrana Quitosana/ Fenitoína 1 comprimido	62
Figura 33 – Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X pontual do grão presente na membrana Quitosana/ Fenitoína 1 comprimido	63
Figura 34 – Resultados do ensaio de tensão superficial paras as membranas sintetizadas neste trabalho	64

Figura 35 – Calorimetria Exploratória Diferencial das membranas Quitosana/ Fenitoína líquida 5, 3 e 1 %	65
Figura 36 – Calorimetria Exploratória Diferencial das membranas Quitosana/ Fenitoína 1, 1/2 e 1/3 comprimido	66
Figura 37 – Resultado do ensaio de biodegradação enzimática no período de 7 dias para as membranas a) e b) – Quitosana/ Fenitoína líquida 3 %; c) – Quitosana/ Fenitoína 1 %; d) e e) – Quitosana/ Fenitoína ½ comprimido e f) – Quitosana/ Fenitoína ¼ comprimido	68
Figura 38 – Resultados do ensaio de citotoxicidade	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Bandas de absorção no FTIR da quitosana	52
Tabela 2 – Resultados dos ensaios de biodegradação <i>in vitro</i>	67

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	18
2.1	Gerais	18
2.2	Específicos	18
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
3.1	Epilepsia.....	19
3.1.1	<i>Status Epilepticus (SE)</i>	23
3.2	Fármacos	24
3.3	Fenitoína	24
3.3.1	<i>Fenitoína no Status Epiléptico</i>	28
3.4	Farmacocinética Linear e Não-Linear	29
3.5	Métodos para detecção dos níveis séricos da fenitoína	29
3.6	Biomateriais.....	30
3.7	Polímeros.....	32
3.7.1	<i>Quitina e quitosana</i>	32
3.7.1.1	<i>Quitosana</i>	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	Materiais.....	36
4.2	Métodos	36
4.2.1	<i>Preparação das membranas</i>	35
4.2.2	<i>Caracterização das membranas</i>	37
4.2.2.1	<i>Difração de raio X (DRX)</i>	37
4.2.2.2	<i>Espectroscopia na Região de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	38
4.2.2.3	<i>Microscopia Óptica (MO)</i>	39
4.2.2.4	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	39
4.2.2.5	<i>Tensão superficial/ Molhabilidade</i>	40
4.2.2.6	<i>Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</i>	42
4.2.2.7	<i>Ensaio de Biodegradação in vitro</i>	42
4.2.2.8	<i>Ensaio de citotoxicidade</i>	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1	Submetimento das membranas a diferentes pH's	45
5.2	Difração de raios X (DRX).....	48
5.3	Espectroscopia na Região de Infravermelho com transformada de Fourier	50
5.4	Microscopia Óptica (MO)	52
5.5	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	57
5.6	Espectroscopia dispersiva de raios X (EDS)	60
5.7	Tensão superficial/ Molhabilidade	63
5.8	Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	64
5.9	Ensaio de Biodegradação in vitro.....	67
5.10	Ensaio de citotoxicidade	70
6	CONCLUSÃO	72

REFERÊNCIAS.....	72
------------------	----

1 INTRODUÇÃO

A epilepsia afeta cerca de 60 milhões de pessoas em todo o mundo e centenas de milhares de novos casos são registrados a cada ano, o que torna essa síndrome um problema médico de alta gravidade, sobretudo porque frequentemente inutiliza funcionalmente os que dela padecem. Não é incomum que um paciente epiléptico não melhore porque os medicamentos usuais são inoperantes, seja devido à etiologia da enfermidade, seja pela extensão das lesões, que se ampliam por falta de tratamento adequado ou por falta completa de tratamento. (CUKIERT, 2002).

O termo epilepsia refere-se a um distúrbio da atividade elétrica cerebral, caracterizado pela ocorrência periódica e espontânea de atividade altamente sincronizada, acompanhada de manifestações comportamentais. Devido ao caráter frequentemente focal do gerador da atividade epiléptica, os pacientes podem apresentar uma grande variedade de sinais clínicos, assim como um mesmo paciente pode apresentar diferentes formas de crises epilépticas (CUKIERT, 2002).

A forma mais comum de síndrome epiléptica é a epilepsia do lobo temporal (ELT), que atinge cerca de 40% de todos os casos de epilepsia e vem sendo reconhecida como uma síndrome específica, devido à sua alta prevalência e à frequente refratariedade ao tratamento medicamentoso. (CUKIERT, 2002)

A difenil-hidantoína (fenitoína), medicação antiepiléptica amplamente utilizada para o controle das crises epilépticas foi primeiro sintetizada por Biltz em 1908 e somente após 30 anos disponibilizada nas farmácias (YACUBIAN, 2004).

A fenitoína está indicada no controle das crises epilépticas, principalmente nas crises generalizadas tônico-clônicas primárias e as focais (YACUBIAN, 2004).

O uso pela via endovenosa torna a fenitoína uma das drogas mais usadas em situações de emergência, por exemplo, no estado de mal epiléptico. Sua principal vantagem em relação ao diazepam é o tempo de ação, mais prolongado do que o do diazepam, que é extremamente curto (YACUBIAN, 2004).

Por não causar efeitos hipnóticos e/ou sedativos (não deprimem o Sistema Nervoso Central), torna-se a medicação antiepiléptica de eleição nos casos de traumas cranioencefálicos e em cirurgias neurológicas. Pode ser indicada também nas convulsões da eclampsia, em arritmias cardíacas, como antiarrítmico e em neuralgias do trigêmeo (YACUBIAN, 2004).

Clinicamente há muitos fatores que podem causar diferenças significativas nos níveis sanguíneos de uma droga, sendo assim indiscutível a necessidade de ajustes individualizados da prescrição terapêutica ao se pretender maior benefício e menor risco. Há duas condutas para a otimização de um esquema terapêutico: calcular a “dose ideal” baseando-se em modelos farmacocinéticos gerais, com adaptações para o paciente em questão e realizar monitorização terapêutica com dosagem da concentração sanguínea da droga e corrigir eventuais distorções. A primeira reduz, mas não elimina, a incidência de efeitos tóxicos. A segunda, se realizada apropriadamente, permite o estabelecimento e a manutenção de esquema terapêutico realmente seguro e útil (ANDRIOLO et al 1984).

A fenitoína é um dos fármacos que mais frequentemente se monitorizam pelo laboratório clínico por vários motivos: a relação entre a dose e o nível plasmático pode resultar imprevisível, devido à grande variabilidade interindividual; a cinética do metabolismo é saturável dentro da faixa terapêutica, ou seja, pequenos aumentos nas doses podem produzir grandes aumentos de níveis plasmáticos. As indicações de sua monitorização são as suspeitas da falta de aderência à terapia ou de intoxicação e apresentação de convulsões (Martin-Calderón et al 2001).

A demora na obtenção de dosagens séricas de fenitoína obriga os médicos dos centros de atendimento de urgência a tomar condutas baseadas em parâmetros clínicos, embora por vezes insuficientes, aumentando o índice de complicações no tratamento destes pacientes. Um método que possibilite medida rápida da fenitoína sérica poderia mudar o curso do tratamento destes pacientes, por permitir a tomada de decisões com muito maior segurança e eficiência.

Numa primeira etapa nos propomos a sintetizar uma membrana de quitosana, adicionar a fenitoína a esta membrana e avaliar o comportamento deste composto híbrido fenitoína/quitosana, quando submetido a diferentes

níveis de pH, ácidos, neutros e básicos, bem como submetê-lo aos métodos de caracterização. Tal procedimento será usado como base para estudos mais aprofundados que se seguirão, com a meta de qualificar e quantificar níveis séricos da fenitoína.

Baseado no exposto visa-se desenvolver um biossensor capaz de realizar a monitorização rápida e precisa da fenitoína sérica.

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

Desenvolver um biomaterial (membrana) à base de quitosana, para monitorização rápida e precisa, da fenitoína sérica, em pacientes que fazem uso desta medicação, de forma crônica ou em serviços de urgência/emergência.

2.2 Específicos

- Estabelecer parâmetros de processamento para obtenção da estrutura (membrana) quitosana/fenitoína;
- Analisar o comportamento da fenitoína quando submetida a meios com diferentes níveis de pH (ácido, neutro e básico);
- Avaliar o efeito da concentração da fenitoína na cinética de liberação;
- Estabelecer parâmetros de obtenção de membrana quitosana/fenitoína para aplicação como biomaterial.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Epilepsia

O termo epilepsia refere-se a um distúrbio da atividade elétrica cerebral caracterizado pela ocorrência periódica e espontânea de atividade altamente sincronizada, acompanhada de manifestações comportamentais (CUKIERT, 2002).

Epilepsia é uma doença cerebral crônica causada por diversas etiologias e caracterizada pela recorrência de crises epiléticas não provocadas. Esta condição tem consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sócias e prejudica diretamente a qualidade de vida do indivíduo afetado (Ministério da Saúde-Secretaria de Atenção à Saúde, 2010).

A epilepsia é um importante problema de saúde pública devido à sua alta prevalência e às desvantagens socioeconômicas associadas a esta doença crônica (CUKIERT, 2002).

Cerca de 45 % das epilepsias têm seu início antes dos 10 anos de idade (MARINO Jr.).

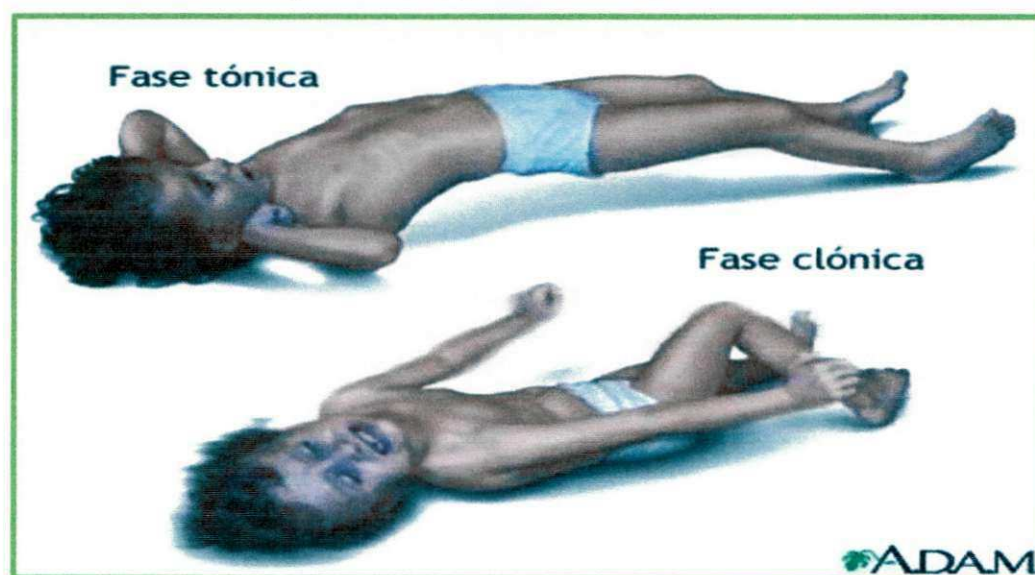
Uma pesquisa domiciliar feita pela Liga Brasileira de Epilepsia na zona urbana da de São Paulo, com um total de 7.604 entrevistas realizadas por 50 alunos de medicina e enfermagem, destas 388 pessoas foram consideradas suspeitas e encaminhadas ao HCFMUSP para maiores esclarecimentos; 348 foram examinadas e em 91 o diagnóstico de epilepsia foi confirmado, originando taxa de prevalência de 11,9/1000 (MARINO Jr.)

Estima-se que a prevalência mundial de epilepsia ativa esteja em torno de 0,5% a 1,0% da população e cerca de 30% dos pacientes sejam refratários. A incidência estimada na população ocidental é de 1 caso para cada 2.000 pessoas por ano. A incidência de epilepsia é maior no primeiro ano de vida e volta a aumentar após os 60 anos de idade. A probabilidade geral de ser afetado por epilepsia ao longo da vida é de cerca de 3%. No Brasil, Marino e colaboradores e Fernandes e colaboradores encontraram prevalências de 11,9:1.000 na Grande São Paulo e de 16,5:1.000 para epilepsia ativa em Porto Alegre (Ministério da Saúde-Secretaria de Atenção à Saúde, 2010).

A atividade elétrica cerebral normal é mantida através de um equilíbrio entre a neurotransmissão inibitória e a excitatória. O aumento da susceptibilidade do tecido nervoso às crises epilépticas tem sido ligado a um aumento na transmissão excitatória, ou por uma diminuição na transmissão inibitória ou por ambos os mecanismos. No tecido epiléptico humano, vários estudos têm demonstrado um aumento na concentração dos aminoácidos excitatórios em áreas com presença de espículas do córtex temporal e em dialisados hipocámpais (CUKIERT, 2002).

De forma prática, as epilepsias podem ser classificadas segundo dois grandes eixos: topográfico e etiológico. No eixo topográfico, as epilepsias são separadas em generalizadas e focais. As generalizadas manifestam-se por crises epilépticas cujo início envolve ambos os hemisférios simultaneamente. Em geral, são geneticamente determinadas e acompanhadas de alteração da consciência; quando presentes, as manifestações motoras são sempre bilaterais. Crises de ausência, crises mioclônicas e crises tônico-clônicas (Figura 1) generalizadas (TCG) são seus principais exemplos (CUKIERT, 2002).

Figura 1 – Crise generalizada tônico-clônica.



Fonte: Liga Portuguesa Contra a Epilepsia - www.lpce.pt/.

Nas epilepsias focais, as crises epilépticas iniciam de forma localizada numa área específica do cérebro, e suas manifestações clínicas dependem do

local de início e da velocidade de propagação da descarga epileptogênica. As crises dividem-se em focais simples (sem comprometimento da consciência) e focais complexas (com comprometimento ao menos parcial da consciência durante o episódio). Por fim, uma crise focal, seja simples ou complexa, quando propagada para todo o córtex cerebral, pode terminar numa crise TCG, sendo então denominada crise focal secundariamente generalizada (Ministério da Saúde-Secretaria de Atenção à Saúde, 2010).

No eixo etiológico, as epilepsias são divididas em idiopáticas (sem lesão estrutural subjacente), sintomáticas (com lesão) ou criptogênicas (presumivelmente sintomáticas, mas sem uma lesão aos exames de imagem disponíveis no momento) As causas lesionais mais frequentes das epilepsias focais sintomáticas são esclerose temporal mesial, neoplasias cerebrais primárias, anomalias vasculares e malformações do desenvolvimento cortiço cerebral (Ministério da Saúde-Secretaria de Atenção à Saúde, 2010).

Pacientes com epilepsia apresentam comprometimento difuso das suas atividades, com maiores índices de desemprego, dificuldades de inclusão social, menor nível educacional e ainda alterações cognitivas secundárias às crises epilépticas ou ao uso crônico de medicações. Algumas etiologias da epilepsia levam também a dificuldades de desenvolvimento, particularmente nos casos em que o início é precoce. Todos esses fatores favorecem o comprometimento global em pacientes com epilepsia, envolvendo toda a família (YACUBIAN, 2004).

A grande maioria das pessoas com epilepsia, se tratada de forma adequada, apresentará controle total ou quase total de suas crises. Para isso é necessário o diagnóstico correto em relação ao tipo de crise e síndrome e a caracterização de sua natureza epiléptica ou não. O conhecimento das diversas síndromes possibilita o encaminhamento adequado do paciente, pois agiliza o tratamento daqueles com crises refratárias e tranquiliza os de evolução mais benigna (YACUBIAN, 2004).

O tratamento farmacológico deve ter como objetivo o controle completo das crises, que pode ser alcançado em cerca de 70% dos casos. Se após um ano de tratamento medicamentoso, os pacientes continuam apresentando crises, deverão ser encaminhados a um centro de epilepsia e, se crises incapacitantes persistem após dois anos de tratamento farmacológico

adequado, deverão ser avaliados quanto à possibilidade de terapêutica cirúrgica. Esse intervalo pode ser menor em crianças e em epilepsias catastróficas. (YACUBIAN, 2004).

Nas últimas décadas tornou-se disponível um número crescente de novas drogas antiepiléticas, entretanto a percentagem de pacientes refratários ao tratamento farmacológico permanece estável, em torno de 20 a 25%, provavelmente devido aos múltiplos mecanismos subjacentes à refratariedade (CUKIERT, 2002).

Para os próximos anos, há inúmeros tratamentos experimentais idealizados:

- Introdução de novos fármacos;
- Estimulação elétrica de áreas cerebrais, como núcleos talâmicos e áreas do hipocampo;
- Terapias individualizadas baseadas nos avanços da genética.

Tais avanços causarão grande impacto no tratamento e prognóstico da epilepsia, possibilitando maior reintegração social e profissional dos pacientes e diminuindo o tempo de hospitalização. (YACUBIAN, 2004).

O prognóstico do tratamento das epilepsias de longa duração é reconhecidamente pior do que as de curta duração (MARINO Jr.).

Ponto conflitante é a necessidade ou não de abordagem farmacológica da convulsão única. A convulsão pode representar resposta fisiológica ao "stress", da mesma forma que a hipoglicemia, a privação do sono e mesmo o trauma. Nestas situações não há muito provavelmente vínculo prognóstico com uma futura incidência de epilepsia (MARINO Jr.).

Convulsões únicas sem fatores desencadeantes conhecidos, ao contrário da anterior, com uma possibilidade de 79,1% de que ela venha se repetir, fala a favor da intervenção medicamentosa imediata. Obviamente a instituição terapêutica, nestes casos dependerá sempre de um compromisso entre o médico e seu paciente (MARINO Jr.).

O risco de recorrência de crises é maior nas primeiras semanas ou meses após a crise inicial (COSTA et. al, 1998).

Setenta a oitenta por cento dos pacientes em tratamento com DAE ficarão livres de crises. Por causa da possibilidade de efeitos colaterais a longo prazo, é boa prática considerar a retirada da medicação após um período substancial de remissão. Mesmo assim existe o risco de recorrência (COSTA et. al, 1998).

A probabilidade de recorrência após a retirada da medicação varia entre 11 e 41% (COSTA et. al, 1998).

A maioria dos estudos revela taxas de recorrência maior em adultos e menor em crianças (COSTA et. al, 1998).

As variações na incidência e prevalência podem ser devidas a reais diferenças entre as populações estudadas, ou a diversos problemas metodológicos, entre eles, sua definição, critérios diagnósticos, classificação e métodos de detecção de casos. Outro aspecto importante é a distinção entre epilepsia ativa, que vai desde pelo menos duas crises no último ano até pelo menos uma crise nos últimos cinco anos e epilepsia inativa. É nesta questão de diferenciar ou não epilepsia ativa e inativa e de como são definidas que reside uma das principais causas das variações das taxas da prevalência da epilepsia (COSTA et. al, 1998).

3.1.1 *Status Epilepticus (SE)*

SE é a condição na qual a atividade crítica se prolonga por mais de 5 minutos. O SE generalizado convulsivo refere-se, entre os outros subtipos dessa forma de SE, à ocorrência de uma crise tônico-clônica generalizada, com duração superior a 5 minutos ou duas ou mais crises tônico-clônicas generalizadas, entre as quais há recuperação incompleta da consciência (YACUBIAN, 2011)

A incidência de SE é de cerca de 50 casos por 100.000 pessoas/ano. A mortalidade é de 3 a 40%, dependendo da etiologia, da idade, do tipo e da duração do SE. (YACUBIAN, 2011).

3.2 Fármacos

Os fármacos são substâncias usadas para impedir ou curar doenças em homens e animais. A introdução de novos fármacos na terapêutica é necessária para o aperfeiçoamento do tratamento de doenças já existentes ou recém-identificadas ou, ainda, para a implementação de tratamentos mais seguros e eficazes. Desde a Antiguidade, diversas civilizações possuíam produtos naturais que usavam como tratamento para os diversos males.

No final do século XIX, a busca por medicamentos menos tóxicos resultou na introdução de substâncias sintéticas na terapêutica e seu uso foi amplamente disseminado no século XX (OLIVEIRA et.al, 2008).

Em estatísticas da área de química medicinal, em 2001, cerca de 85% dos fármacos disponíveis na terapêutica moderna são de origem sintética, isto sem considerar aqueles oriundos de processos semissintéticos. Das diversas substâncias sintéticas obtidas de derivações de anéis heterocíclicos, destaca-se a hidantoína, devido a sua potencialidade como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos (OLIVEIRA et.al, 2008).

3.3 Fenitoína

Medicação antiepilética utilizada para o controle das crises epiléticas, principalmente as crises generalizadas tônico-clônicas e as focais.

A Hidantoína foi descoberta por Bayer, em 1861, enquanto pesquisava as reações do ácido úrico e corresponde ao 2,4-diceto-tetra-hidro-imidazol ou imidazolidina-2,4-diona. A primeira fórmula estrutural da hidantoína foi sugerida por Kolbe, em 1870, tendo sido modificada por Strecker, que, neste mesmo ano, propôs uma nova fórmula que é aceita até hoje (OLIVEIRA et.al, 2008).

A substituição dos átomos de oxigênio carbonílicos da hidantoína por átomos de enxofre origina três tio-derivados: a 2- tio-hidantoína (2-tioxo-imidazolidin-4-ona) (Figura 1b), a 4-tio- hidantoína (4-tioxo-imidazolidin-2-ona) (Figura 1c) e a 2,4-ditio- hidantoína (imidazolidina-2,4-ditiona (OLIVEIRA et.al, 2008).

A difenil-hidantoína foi primeiro sintetizada por Biltz em 1908 e, somente após 30 anos tornou-se disponível nas farmácias.

Em 1923 Dox e Thomas, dois químicos orgânicos, trabalhando para o Laboratório Parke-Davis, com o objetivo de obter substâncias hipnóticas potentes, sintetizaram derivados fenil a partir do ácido barbitúrico. A hidantoína tinha um anel estrutural semelhante ao dos barbitúricos e a difenil-hidantoína, com dois anéis fenil, era, curiosamente, desprovida de efeitos hipnóticos (YACUBIAN, 2004).

Dr. Putnam e Merrit testaram vários compostos, incluindo a fenitoína, com o objetivo de encontrar compostos com propriedades antiepilépticas, porém sem os efeitos colaterais do fenobarbital. Eles procuraram ativamente por substâncias com estrutura química que possuísse anel fenil, com efeito anticonvulsivante e sem efeito sedativo. Modificações da estrutura química resultaram em vários hidantoinatos e a difenil-hidantoína ou fenitoína foi descoberta como a mais potente droga no modelo de avaliação pelo eletrochoque em gatos, apresentando menos efeitos sedativos (GUERREIRO, 2006).

Este fato foi de grande relevância, pois até então acreditava-se que para que uma medicação tivesse ação antiepiléptica, necessariamente deveria ser hipnótica (GUERREIRO, 2006).

Cerca de 95% da Fenitoína é metabolizada pelo Sistema microssomal hepático P450, que apresenta uma série de enzimas denominadas oxidases de função mista, referidas como CYP (CY: Citocromo, P: a primeira letra de P450), seguidas do algarismo arábico da família específica, de uma letra maiúscula que especifica sua subfamília e de um segundo algarismo arábico designando a forma individual do P450 (por exemplo CYP2C9). Essas enzimas são variáveis de indivíduo para indivíduo e sujeitos a importantes diferenças entre os sexos e as raças (YACUBIAN, 2004).

A fenitoína é biotransformada extensamente e menos de 5% são excretados inalterados na urina. Sua principal via de biotransformação é a p-hidroxilação. Esta p-hidroxilação ocorre, principalmente, às custas do CYP2C9 (cerca de 90%) e CYP2C19 (cerca de 10%). Alguns pacientes parecem ter déficit de CYP2C9 e eliminam fenitoína muito mais lentamente (YACUBIAN, 2004).

Diferentes indivíduos podem apresentar taxas diversas de metabolismo de uma droga particular em decorrência das características genéticas de seus citocromos. Esses polimorfismos genéticos, presentes em pequena percentagem da população fazem com que alguns indivíduos sejam incapazes de metabolizar uma droga de forma adequada, o que promove elevação de seus níveis no sangue e toxicidade dose-dependente se a forma não metabolizada da droga for farmacologicamente ativa (YACUBIAN, 2004).

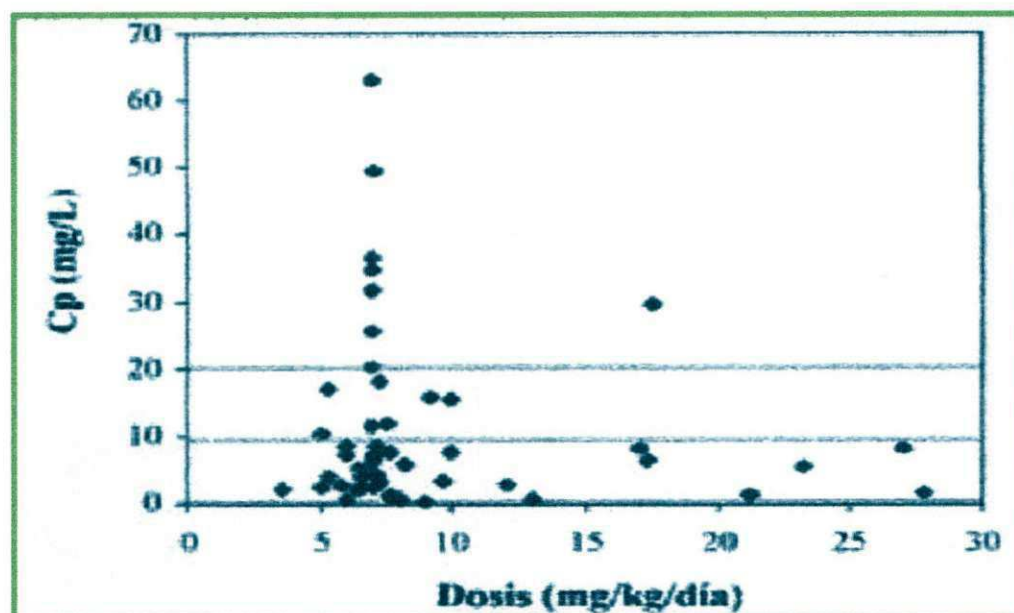
A difenil-hidantoína se une em grande extensão às proteínas plasmáticas. Uma fração maior permanece livre em neonatos, em pacientes com hipoalbuminemia e nos urêmicos (MARTIN-CALDERÓN, 2001).

Dado o caráter ácido de sua molécula, a fenitoína se une preferentemente à albumina sérica, e se assume que em condições normais 90% do fármaco circulante se encontra unida a esta proteína (PIEDRAS, 2007).

A concentração plasmática total de fenitoína não fornece uma estimativa dos efeitos farmacológicos. A concentração plasmática da fenitoína livre é preferível para avaliar doses da medicação, melhorar o controle das crises e reduzir os efeitos adversos. A monitorização da droga na saliva pode ser uma boa alternativa a dosagem sérica de fenitoína livre devido ao baixo custo e boa correlação com seus efeitos (IBARRA, 2010).

A meia-vida plasmática da fenitoína é muito variável, é estimada em 8 a 60 horas nos adultos e em 12 a 22 horas nas crianças. O equilíbrio da concentração plasmática da fenitoína é alcançado aproximadamente após uma semana de administração (MARTIN-CALDERÓN, 2001).

Figura 2 - Concentração sérica de fenitoína em vários pacientes em função da dose diária por quilo de peso administrada.



Fonte: PIEDRAS, (2007).

A Figura 2 mostra como uma dose em torno de 5mg/kg de peso aplicada a vários indivíduos pode resultar em variações séricas que vão de níveis subterapêuticos a níveis tóxicos, mostrando claramente as dificuldades no manejo da droga. Mais de 85% dos pacientes não alcançaram níveis terapêuticos (PIEDRAS, 2007).

O mecanismo de ação da fenitoína não está totalmente esclarecido, mas acredita-se em uma ação estabilizante de membrana, tanto em tecidos cerebrais quanto em outros como músculos estriado e cardíaco, daí sua indicação em arritmias cardíacas. Parece que a fenitoína inibe os potenciais de ação que descarregam a alta velocidade em resposta a correntes despolarizantes, o que poderia dever-se ao bloqueio de canais de sódio voltagem-dependentes. Outras ações a nível celular como as pós-sinápticas (facilitação da inibição pelo ácido gama amino butírico - GABA ou redução da transmissão por aminoácidos excitatórios) e pré-sinápticas (bloqueio da entrada de cálcio no neurônio e portanto da liberação de neuromediador). Essas ações somente ocorreriam em níveis supra terapêuticos (MARTIN-CALDERÓN, 2001).

Durante o processo de biotransformação, via epóxido-hidrolase, pode ocorrer a formação de radicais livres, o que explicaria, em parte, a toxicidade

da substância. Estes metabólitos intermediários têm sido relacionados com os efeitos teratogênicos e de hipersensibilidade à fenitoína. A politerapia e/ou déficit de epóxido-hidrolase podem aumentar esse risco (YACUBIAN, 2004).

A formulação sódica parenteral é feita em um veículo aquoso contendo propilenoglicol, etanol e hidróxido de sódio, estando contraindicada em pacientes com miocardiopatia grave, bloqueio atrioventricular de segundo e terceiro grau e arritmia cardíaca grave, devendo ser utilizada com cautela em idosos. Pode ser também administrada por via oral e não é bem absorvida pelas vias intramuscular e retal, mas a grande vantagem da fenitoína sobre a maioria das outras drogas antiepilépticas é a possibilidade da administração por via endovenosa (YACUBIAN, 2004).

Doses de fenitoína comumente utilizados: em adultos 4 a 6 mg/Kg/dia, em crianças 5 a 8 mg/Kg/dia e em idosos 3 a 4 mg/Kg/dia (MARTIN-CALDERÓN, 2001).

Fatores que interferem com o nível sérico da fenitoína: Absorção, metabolização e/ou excreção destas drogas. Idade, sexo e peso. Doenças concomitantes (principalmente hepáticas e renais). Interações medicamentosas (indução ou inibição enzimática). Variabilidade individual. Farmacocinética não-linear

3.3.1 Fenitoína no Status Epiléptico

A fenitoína é droga de primeira escolha no tratamento do SE estabelecido (SE que continua por 30 minutos a despeito do tratamento precoce e no qual é mandatório o cuidado intensivo), por ser anticonvulsivante altamente eficaz, com ação prolongada e de poder ser continuado em longo prazo. Causa pouca depressão respiratória e cerebral e pode causar arritmias cardíacas e hipotensão (devido ao solvente propilenoglicol). Por esses motivos a infusão de fenitoína deve ser realizada com monitorização da pressão arterial e eletrocardiograma (ECG). Sua dose em idosos deve ser reduzida (YACUBIAN, 2011).

A fenitoína é efetiva no controle das crises em 80% dos casos de SE. Apresenta a vantagem de ser disponível na apresentação VO, podendo ser

usada como droga de manutenção, sem necessidade de mudança (KNOBEL,2002).

3.4 Farmacocinética Linear e Não-Linear

A fenitoína é quimicamente uma diamida cíclica substituída, comporta-se como um ácido fraco, com P_{ka} 8,3, é extremamente insolúvel em água, o que condiciona, em grande parte, sua farmacocinética (MARTIN-CALDERÓN, 2001).

Na maioria das circunstâncias as drogas antiepilépticas são metabolizadas de acordo com a cinética de primeira ordem, ou seja, a velocidade do metabolismo é proporcional à concentração plasmática da droga. Há algumas situações em que a enzima responsável pela metabolização da droga torna-se saturada após certa concentração de tal forma que o metabolismo não se eleva proporcionalmente ao aumento da dose. Esta constitui a cinética da ordem zero, na qual acréscimos mínimos da dose poderão promover aumento da meia-vida e níveis séricos muito superiores aos esperados (YACUBIAN, 2004).

3.5 Métodos para detecção dos níveis séricos da fenitoína

A eficácia clínica, a ocorrência de efeitos colaterais e a toxicidade estão intimamente relacionadas com o nível plasmático do anticonvulsivante, pelo que a determinação de seus níveis é de real utilidade prática. Há muitos fatores que podem causar diferenças significativas nos níveis sanguíneos de uma droga, sendo assim indiscutível a necessidade de ajustes individualizados da prescrição terapêutica ao se pretender maior benefício e menor risco (ANDRIOLO, 1984).

O procedimento ideal para a determinação de anticonvulsivante, em líquidos biológicos é, certamente o que possibilita rápida, simples, econômica e simultânea quantificação das drogas mais comumente empregadas, principalmente quando da ocorrência de associações terapêuticas. O número

de novos métodos descritos com esta finalidade parece indicar que, a par do alto grau de interesse que o assunto tem despertado, ainda não foram atingidos completamente os objetivos desejados (ANDRIOLO, 1984).

Dentre os métodos mais utilizados para a dosagem de anticonvulsivantes no soro do paciente destacam-se a espectrofotometria, a cromatografia gás-líquido, o enzima imune ensaio e a cromatografia líquida de alta resolução. Esta última destaca-se pela simplicidade do preparo da amostra, baixo custo operacional e possibilidade de quantificação simultânea de várias drogas e alguns metabólitos. (ANDRIOLO et al., p 203, 1984).

O material humano mais usado para a monitorização da fenitoína é o soro sanguíneo, embora se tenha utilizado a monitorização em saliva, mostrando-se boa correlação entre níveis plasmáticos e salivares, com a vantagem de ser um método incruento e com acesso rápido a uma grande quantidade de amostra. (MARTIN-CALDERON, 2001). Visa-se desenvolver um biomaterial capaz de detectar rapidamente níveis séricos fenitoína sódica nos pacientes.

3.6 Biomaterial

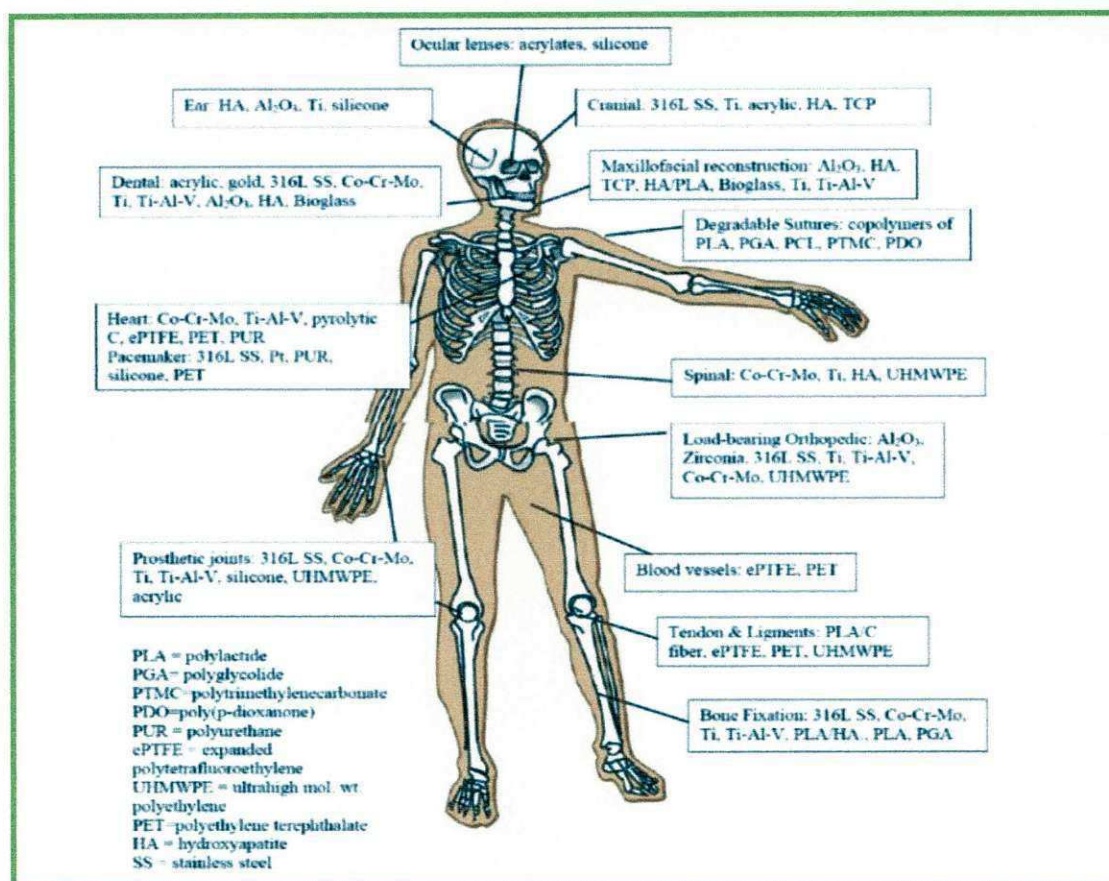
O termo biomaterial consiste em qualquer substância ou combinação de substâncias de origem natural ou sintética, idealizada para ser implantada no corpo por qualquer período de tempo, com a finalidade de substituir matéria viva que deixou de ter sua função, podendo ou não servir como veículo, matriz, suporte ou estimulador para o crescimento de novo tecido (WILLIAM, 2008).

Os Biomateriais podem ser de origem metálica, polimérica, cerâmica e também a combinação destes nos denominados compósitos. Os de origem polimérica são os mais utilizados no campo biomédico devido à facilidade de processamento e por apresentarem propriedades mecânicas semelhantes às dos materiais biológicos (PARK; LAKES, 1992; ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006).

Para que qualquer material sintético possa ser utilizado como biomaterial é fundamental que o mesmo seja aceito pelo tecido ou órgão em questão de forma que não origine processos inflamatórios anormais, não inicie reações

alérgicas ou imunológicas e também não cause câncer. Esta propriedade elementar é conhecida como biocompatibilidade (FOOK, 2005, PARK; BRONZINO, 2003). A biocompatibilidade trata-se da habilidade de um material em proporcionar uma resposta apropriada do hospedeiro em uma aplicação específica. Entretanto, a biocompatibilidade não é uma propriedade do material por si só. O material necessita induzir uma resposta apropriada, e o quanto essa resposta será adequada, irá depender do sítio de aplicação no corpo. (NICHOLSON, 2002; MATSUI, 2007).

Figura 3 - Aplicações de materiais cerâmicos, metálicos e poliméricos como biomateriais.



Fonte: Adaptado de NICHOLSON, (2002).

Os biomateriais utilizados clinicamente induzem diferentes respostas do tecido e, em função do tipo de interface tecido/implante desenvolvida, podem ser classificados em: Bioinertes, que são biomateriais bem tolerados pelo organismo, praticamente não liberando nenhum tipo de componente, não causando nenhuma reação. Bioativos, são materiais que favorecem a ligação

química entre o material implantado e o tecido ósseo (osseointegração); Em função da similaridade química entre tais minerais e a parte mineral óssea, os tecidos ósseos se ligam a eles, permitindo a osteocondução através de recobrimento por células ósseas. Quando o material bioativo é implantado no corpo, uma série de reações bioquímicas e biofísicas ocorre na interface implante/tecido. Essas reações eventualmente resultam em uma ligação interfacial de natureza química e não física. Materiais bioabsorvíveis são biomateriais fagocitados pelo organismo após certo período de contato com o tecido. Possuem papel fundamental em aplicações químicas, pois são desnecessárias novas intervenções cirúrgicas para a retirada do material implantado. E biodegradáveis que são degradados pelo organismo durante um período de tempo, e seus produtos da degradação não são tóxicos (HENCH, WILSON, 1993).

3.7 Polímeros

Os polímeros são macromoléculas caracterizadas por seu tamanho, sua estrutura química e interações intra e intermoleculares. Possuem unidades químicas que são unidas por ligações covalentes, que se repetem ao longo da cadeia. Eles podem ser naturais, como a seda, a celulose, as fibras de algodão, quitina, quitosana, etc., ou sintéticos, como o polipropileno (PP), o poli(tereftalato de etileno) (PET), o polietileno (PE), o poli(cloreto de vinila) (PVC), etc. (SPINACÉ, 2004). Dentre os biopolímeros (polímeros de origem natural) destacam-se a quitina e a quitosana.

3.7.1 *Quitina e quitosana*

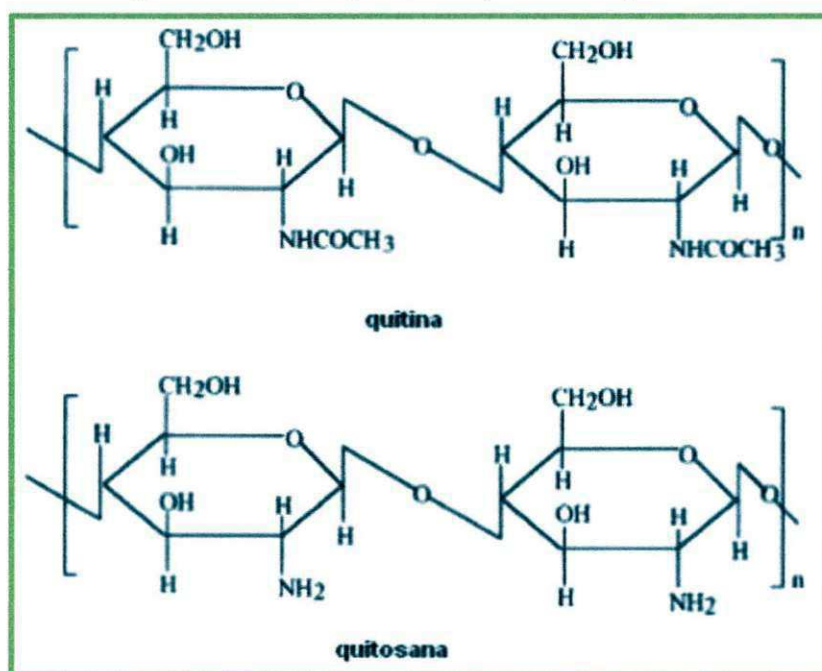
Quitina e quitosana são produtos naturais encontrados em exoesqueletos dos insetos, crustáceos e parede celular de fungos.

Quitina e quitosana são polímeros atóxicos, biodegradáveis, biocompatíveis e produzidos por fontes naturais renováveis, cujas propriedades vem sendo exploradas em aplicações industriais e tecnológicas há quase

setenta anos. Tem ainda grande importância econômica e ambiental. (AZEVEDO V. V. C. et al, 2007).

A quitina e a quitosana (Figura 3) são estruturas constituídas por unidades de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranosose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose unidas por ligações glicosídicas B(1→4), e diferem quanto à proporção dessas unidades e quanto à solubilidade. Na estrutura da quitina, que é insolúvel na maioria dos solventes testados, predominam unidades de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranosose enquanto a quitosana é predominantemente formada por unidades de 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose, é solúvel em soluções aquosas diluídas de ácidos orgânicos e inorgânicos (AZEVEDO V. V. C. et al, 2007).

Figura 4 - Estrutura química da quitina e da quitosana



. Fonte: Azevedo, 2007

A quitina é separada de outros componentes da carapaça por um processo químico que envolve as etapas de desmineralização e desproteinização das carapaças com soluções de HCl e NaOH, seguida de descoloração com KMnO₄ e ácido oxálico, por exemplo. A quitina obtida é desacetilada com solução concentrada de NaOH, produzindo a quitosana (AZEVEDO V. V. C. et al, 2007).

3.7.1.1 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo amino, derivado do processo de desacetilação da quitina, por hidrólise dos grupos acetamida, com soluções básicas muito concentradas (NaOH ou KOH, 40 a 50%) e a temperaturas superiores a 60°C (AZEVEDO V. V. C. et al, 2007).

A quitosana é um polímero natural, atóxico, biodegradável, biocompatível e produzido por fontes naturais renováveis, cujas propriedades vem sendo exploradas em, aplicações industriais e tecnológicas há quase 70 anos. Tem ainda grande importância econômica e ambiental. É o segundo biopolímero mais abundante na natureza, superado apenas pela celulose (AZEVEDO V. V. C. et al, 2007).

A preparação e utilização das estruturas de quitosana, sejam elas porosas ou densas, exploram a natureza policatiónica da quitosana. Todas essas estruturas são normalmente sintetizadas por secagem ou coagulação de soluções aquosas de quitosana levemente acidificadas (a quitosana é composta de grupos aminos protonáveis e torna-se solúvel em meios polares a pH s baixos). Posteriormente, podem ser realizadas modificações ou derivatizações específicas dos grupos funcionais, de acordo com a utilização final (BEPPU, 1999).

Esta versatilidade da quitosana permite sua conformação em forma tão variadas quanto sua aplicabilidade: fibras, glóbulos, membranas, etc. (BEPPU, 1999).

Em solução, a quitosana forma agregados micelares de segmentos de polissacarídeos totalmente acetilados, interligados por blocos de polissacarídeos totalmente desacetilados, esticados por forças de repulsão eletrostática. A quitosana é insolúvel em água a pH neutro, contudo, devido a protonação dos grupos amina, é possível solubilizá-lo em soluções aquosas de ácidos orgânicos, como ácidos acético, láctico, fórmico e cítrico, e em ácidos inorgânicos diluídos, como o ácidos clorídrico, nítrico e perclórico. O seu pKa situa-se entre 6,3 e 7,0, variando em função do grau de acetilação. Isto deve-se ao fato de que, quanto maior a quantidade de grupos aminos protonados na cadeia do polissacarídeo, maior o numero de interações eletrostáticas repulsivas entre as cadeias, influenciando assim a capacidade de dissolução. É

importante não esquecer que a massa molecular (normalmente entre os 100 e os 1200 kDa) tem, no que diz respeito à solubilidade e às propriedades reológicas, um papel importante, visto o tamanho da cadeia conseqüentemente, a sua solubilidade, bem como a sua viscosidade. (EMBUSCADO et al., 2009 e SANTOS, 2006).

O aumento das aplicações biomédicas da quitosana tem gerado oportunidades de produção de biomateriais especializados, principalmente com novas modificações químicas e físicas. Estas estratégias também têm envolvido uma combinação da quitosana com outros polímeros. Publicações científicas utilizando a quitosana e suas modificações estruturais têm discutido vários aspectos das aplicações biomédicas deste polímero, principalmente na engenharia de tecidos, liberação de fármacos e biossensores para diagnósticos clínicos (AYALA et al., 2008).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste – CERTBIO, localizado na Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais, na Universidade Federal de Campina Grande – UFCG e desenvolvida utilizando-se os seguintes materiais.

- Fenitoína ($C_{15}H_{12}N_2O_2$). Fenitoína de uso comercial, sob a forma de fenitoína sódica, na concentração de 50 mg/ml, ampolas com 5 ml, uso injetável;
- Quitosana ($C_{12}H_{24}N_2O_9$). Quitosana em pó (massa molar (MW) = 190.000-310 g/mol, GD=75-85% desacetilada);
- Ácido Acético Glacial ($C_2H_4O_2$);
- Hidróxido de sódio (NaOH).

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo das membranas

A solução de quitosana foi preparada pela dissolução de quitosana em solução de ácido acético glacial (1% v/v) sob agitação magnética por 24h. Em seguida, a solução polimérica será filtrada a vácuo para remover o material insolúvel. O filtrado será vertido em placas de Petri e acondicionadas em estufa a 50°C por 20 h para evaporação do ácido e formação da membrana utilizando o método de evaporação do solvente, adaptado de Osório (2007) e implementado pelo CERTBIO / UFCG. Após secagem das membranas, as mesmas serão retiradas da estufa e 50 ml de solução de hidróxido de sódio a 1M será adicionado a fim de assegurar a completa neutralização das membranas. Em seguida, serão lavadas com água corrente, e posteriormente submersas em um recipiente com água destilada durante 1h 30min, tempo

suficiente para que ocorra a neutralização. Depois da neutralização, as mesmas serão secas por 24h a temperatura ambiente.

O preparo das membranas de quitosana/fenitoína foi obtido com a adição da fenitoína nas proporções de 1 3 e 5% (v/v). As etapas seguintes seguirão o mesmo procedimento descrito anteriormente para confecção das membranas de quitosana.

4.2.2 Caracterizações

Todas as membranas foram caracterizadas por Difração de raios-X (DRX), Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Microscopia Óptica (MO), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS), Tensão Superficial por medidas do ângulo de contato, Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Ensaio de biodegradação *in vitro* e Teste de citotoxicidade.

4.2.2.1 Difração de raios X (DRX)

A Difração de Raios X é um fenômeno de espalhamento da radiação eletromagnética, provocada pela interação entre o feixe de raios X incidente e os elétrons dos átomos componentes de um material. A técnica de Difração de Raios X foi usada para se obter informações estruturais importantes sobre a cristalinidade de um composto qualquer. A principal aplicação da difração de raios X refere-se à identificação de compostos cristalinos, sejam eles orgânicos ou inorgânicos. As análises por difração de raios X (DRX) foram realizadas através de um difratômetro de raios X Shimadzu (modelo XRD 6000) (Figura 6), em temperatura ambiente, a montagem Bragg-Brentano, sistema θ -2 θ , radiação monocromática de cobre. A varredura foi realizada num intervalo de 2 θ entre 5 e 40 graus, usando uma velocidade de 1° min^{-1} e radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) gerada aplicando-se voltagem e corrente de 40 KV e 30 mA, respectivamente.

Figura 5 – Difratorômetro de raios X.



Fonte: Próprio autor (2013).

4.2.2.2 Espectroscopia na Região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As análises utilizando a técnica de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das amostras serão realizadas em temperatura ambiente e o equipamento utilizado será um Spectrum 400 da Perkin Elmer (Figura 7). A técnica FTIR será usada para identificar as bandas características dos grupos funcionais presentes nas matérias primas utilizadas nesta pesquisa, utilizando a faixa de varredura de 4000 a 400 cm^{-1} .

Figura 6 – Spectrum 400.



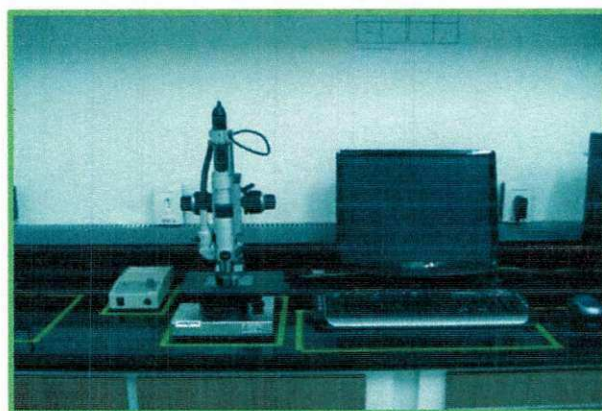
Fonte: Próprio autor (2013).

4.2.2.3 Microscopia Óptica (MO)

A caracterização por microscopia ótica foi realizada em um Microscópio Óptico HIROX, com resolução máxima de 3500X, por luz transmitida, acoplado a uma estação de Captura e Análise de imagens com Software (Figura 5).

O contraste da imagem é resultado da diferença de refletividade da luz nas diversas regiões da microestrutura, uma vez que o sistema é constituído basicamente pela fonte de iluminação e do sistema de lentes (PICCOLI et al, 2006).

Figura 7 – Microscópio Óptico (MO) acoplado a estação de Captura e Análise de Imagens com Software.

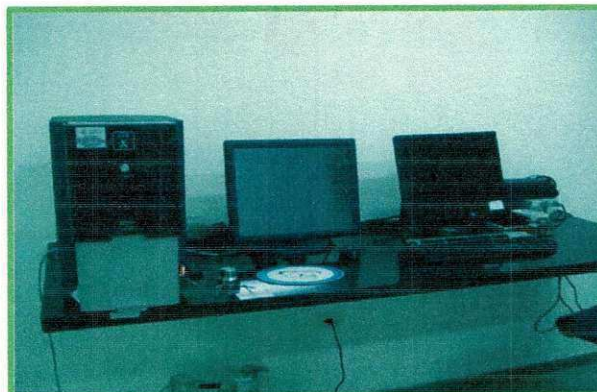


Fonte: Próprio autor (2013).

4.2.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para realização das análises foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura de bancada, modelo TM-1000, marca Hitachi, com aumento de 10000x, profundidade de foco de 1 mm, resolução de 30 nm, 15 KV, baixo vácuo e pressão variada (1 a 270 Pa), sem recobrimento metálico. Para análise da Energia Dispersiva de raios X (EDS), foi utilizado o equipamento acoplado ao MEV para uma maior confiabilidade dos resultados (Figura 8).

Figura 8 – Microscópio Eletrônico de Varredura com equipamento para análise de Energia Dispersiva de raios X acoplado..



Fonte: Próprio autor (2013).

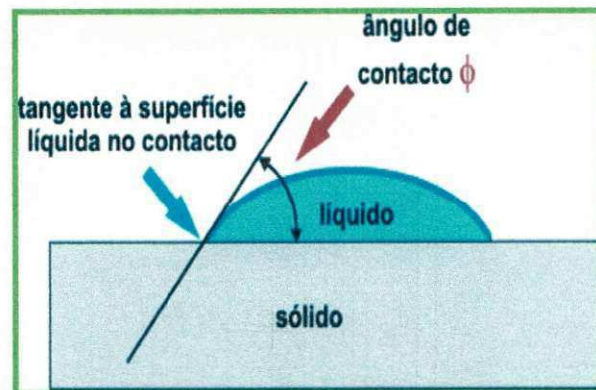
4.2.2.5 Tensão Superficial/Molhabilidade

Diversos métodos podem ser empregados para obter uma avaliação da interação entre as fases sólido/líquido (molhabilidade), mas o ângulo de contato tem sido um parâmetro que apresenta excelente relação custo/benefício (FOOK, 2005).

As moléculas da superfície de um líquido estão sujeitas a fortes forças de atração das moléculas interiores. A resultante dessas forças, cuja direção é a mesma de plano tangente à superfície (em qualquer ponto desta) atua de maneira a que a superfície líquida seja a menor possível. A grandeza desta força, atuando perpendicularmente (por unidade de comprimento) ao plano na superfície é dita tensão superficial (BIANCO; NONATO, 2011).

O resultado depende das forças intermoleculares que se estabelecem entre as fases, resultando na medida chamada ângulo de contato (Figura 9). Por meio da medida desse ângulo de contato entre a superfície do sólido e o plano tangencial à superfície líquida, pode-se obter a molhabilidade do líquido sobre um determinado substrato (ALHANATI, 2011).

Figura 9 – Ângulo de contato.

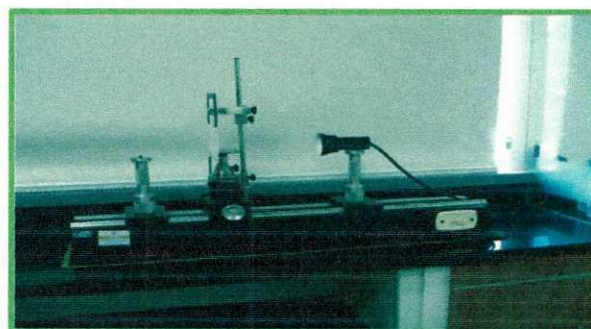


Fonte: ALHANATI, 2011

Se o ângulo de contato estático for um valor maior que 90° , o líquido tem a tendência a não molhar a superfície e a fase é dita não-molhante. Com um valor aproximado a 0° , o líquido recobre toda a superfície formando um filme fino de fluido molhante. Quando o valor do ângulo for menor ou igual a 90° , a molhabilidade é considerada parcial (Figura 15). Portanto, quanto menor for o ângulo, maior será o molhamento (WISNIEWSKI; ARGUELHO, 2011; ALHANATI, 2011).

Para a realização desta análise foi utilizado um goniômetro desenvolvido por técnicos da Unidade Acadêmica de Engenharia Mecânica da UFCG (Universidade Federal de Campina Grande) que se encontra instalado no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais (CERTBIO) da Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais, da UFCG (Figura 10).

Figura 10 – Goniômetro utilizado para medir tensão superficial.



Fonte: Próprio autor (2013).

4.2.2.6 Calorimetria Exploratória de Diferencial (DSC)

A análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) avalia a diferença da temperatura fornecida a uma substância sob um material de referência. Foi utilizado o equipamento DSC Q20 (TA Instruments) (Figura 11) operando por atmosfera de nitrogênio para análise de Transições de fase para observação de modificações na estrutura cristalina das amostras.

Figura 11 – Equipamento de Calorimetria Exploratória Diferencial.



Fonte: Próprio autor (2013).

4.2.2.7 Ensaio de Biodegradação *in vitro*

O estudo da taxa de biodegradação dos filmes reticulados foram realizados com a exposição dos filmes reticulados em solução preparada de lisozima e PBS, com tempo de exposição de 30 dias a 37 °C.

A metodologia foi empregada com base na norma ASTM F1635-04 (*Standard Test Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants*).

4.2.2.8 Teste de Citotoxicidade

Muitos testes biológicos, como os de citotoxicidade, necessitam mensurar a sobrevivência e/ ou proliferação celular, os quais podem ser realizados por vários métodos, entre eles, a contagem de células que inclui/exclui um corante, avaliação da proteína Cromo (⁵¹ CR) depois da lise celular e

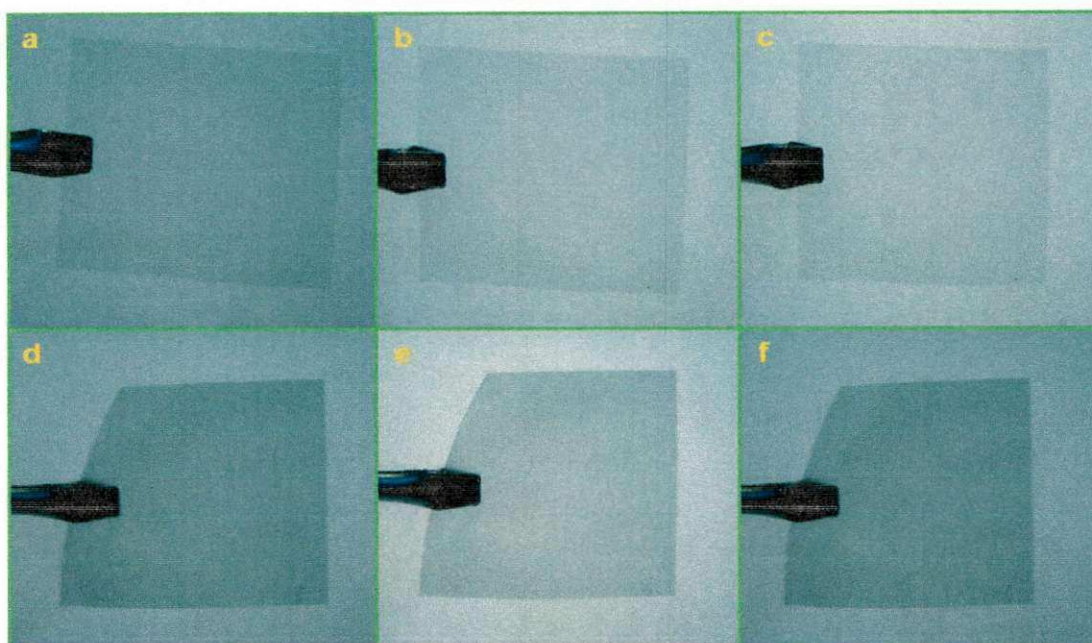
avaliação da incorporação de nucleotídeos radioativos (^3H timidina) durante a proliferação celular. O sal de tetrazólio ou MMT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazólio) pode ser empregado como método quantitativo colimétrico para avaliação da sobrevivência e proliferação das células (MOSMANN, 1983; apud MARTINEZ, 2011).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foram sintetizadas membranas tanto com fármaco na forma de líquido (nas proporções 5, 3 e 1 %) como com o fármaco na forma de pó, pó esse oriundo da maceração do comprimido (nas proporções 1 comprimido, $\frac{1}{2}$ comprimido e $\frac{1}{4}$ comprimido).

As membranas sintetizadas neste trabalho podem ser vistas na Figura 12.

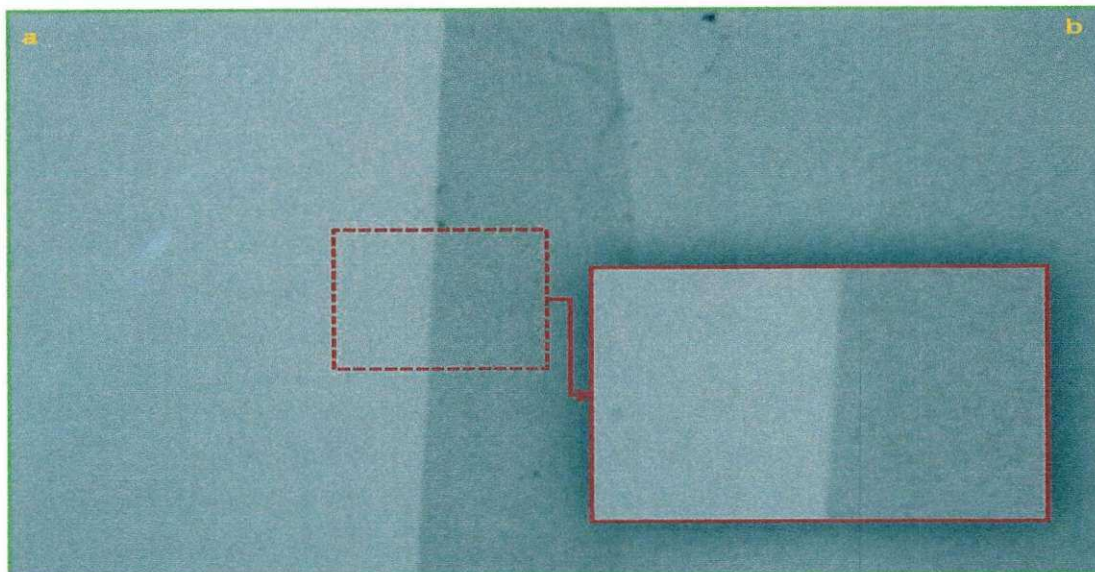
Figura 12 – Membranas Quitosana/ Fenitoína líquida a) – 5 %; b) – 3 % e c) – 1 %, e membranas Quitosana/ Fenitoína comprimido d) – 1; e) – $\frac{1}{2}$ e f) – $\frac{1}{4}$.



Fonte: Próprio autor (2013).

Notou-se uma ínfima diferença entre o aspecto visual das membranas sintetizadas com o fármaco líquido em comparação com as membranas sintetizadas com os comprimidos (Figura 13). Percebeu-se que as membranas sintetizadas com o comprimido apresentaram maior opacidade que as membranas Quitosana/ Fenitoína líquida, o que pode estar relacionado à presença de excipientes do comprimido na membrana, como o amido, que em solução, apresenta aspecto leitoso e de baixa dissolução a temperatura ambiente formando membranas de aspecto opaco.

Figura 13 – Ênfase a diferença visual entre as membranas a) – Quitosana/ Fenitoína líquida e b) – Quitosana/ Fenitoína comprimido.



Fonte: Próprio autor (2013).

A incorporação do fármaco líquido a solução de quitosana para síntese da membrana teve de ocorrer sobre agitação magnética da solução de quitosana e adição por gotejamento do fármaco (durante 20 min), a adição brusca do mesmo ocasiona dificuldades na homogeneização da solução por o soluto apresentar pH alcalino, que em contato com a solução de quitosana de pH ácido, precipitava-se.

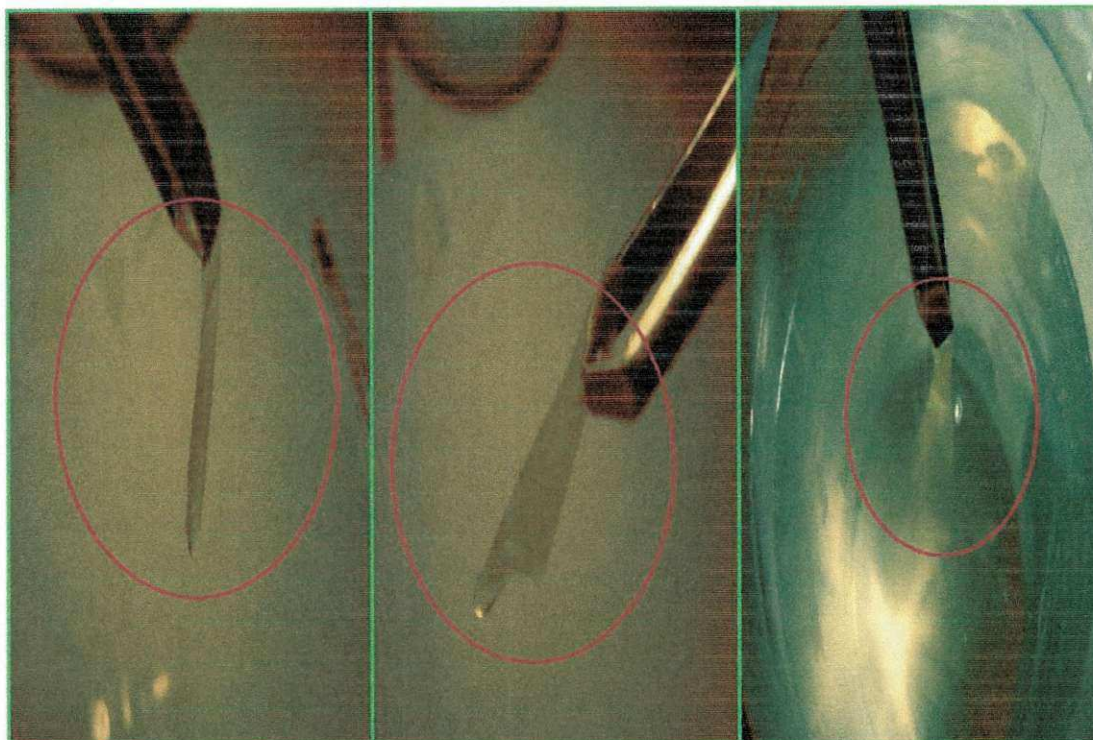
Os comprimidos de fenitoína foram triturados em almofariz e incorporados em pequenas quantidades na solução de quitosana sob agitação magnética durante 20 min para que evitasse a precipitação e a deposição do pó.

5.1 Submetimento das membranas a diferentes pH's

As membranas sintetizadas neste trabalho foram submetidas a diferentes pH's para avaliar o seu comportamento em diferentes meios, com o intuito de verificar alterações perceptíveis a olho nu, que possam ajudar no desenvolvimento de um dispositivo (sensor) capaz de identificar e quantificar o nível sérico de fenitoína em pacientes.

As membranas foram depositadas em recipientes contendo buffer padrão de pH durante 5 min, as variações de pH estudadas foram 4,01; 6,81; 7,01; 8,81 e 10,01. Os resultados observados foram fotografados e estão apresentados nas Figuras 14 e 15.

Figura 14 – Avaliação do comportamento das membranas Quitosana\Fenitoína líquida e comprimido nos pH's 4,01; 6,81; 8,81 e 10,01. Fotos representativas de todas as variações.

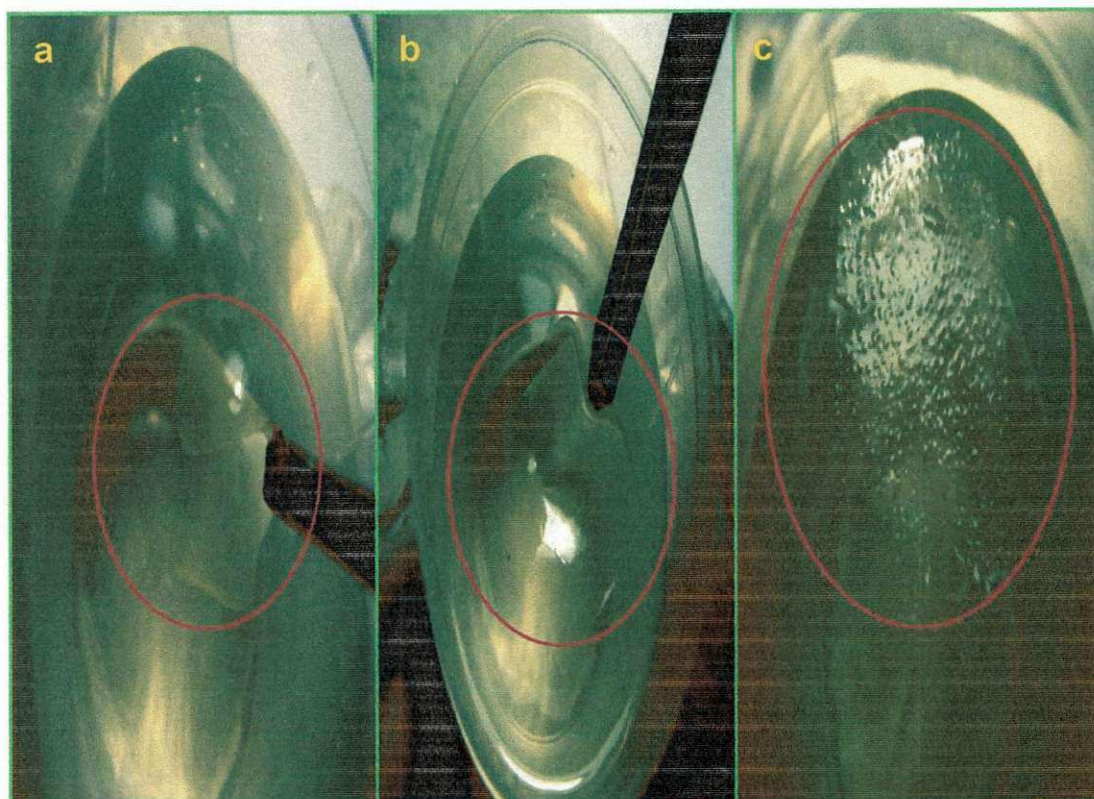


Fonte: Próprio autor (2013).

A Figura 14 apresenta fotos representativas de todas as variações, tanto da membrana com o fármaco líquido como da membrana com o fármaco em comprimidos submetidas aos pH's 4,01; 6,81; 8,81 e 10,01. Todas as membranas em todas as variações estudadas, nestes pH's, apresentaram um perfil hidrofóbico de retração, e leve princípio de maleabilidade logo após entrarem em contato com as soluções. O que não nos permitiu desenvolver para esses pH's parâmetros que possam indicar a concentração do fármaco, já que nessas mesmas soluções o mesmo ocorre com as membranas apenas de quitosana.

Na Figura 15 observam-se as fotos das membranas submetidas a solução de pH 7,01.

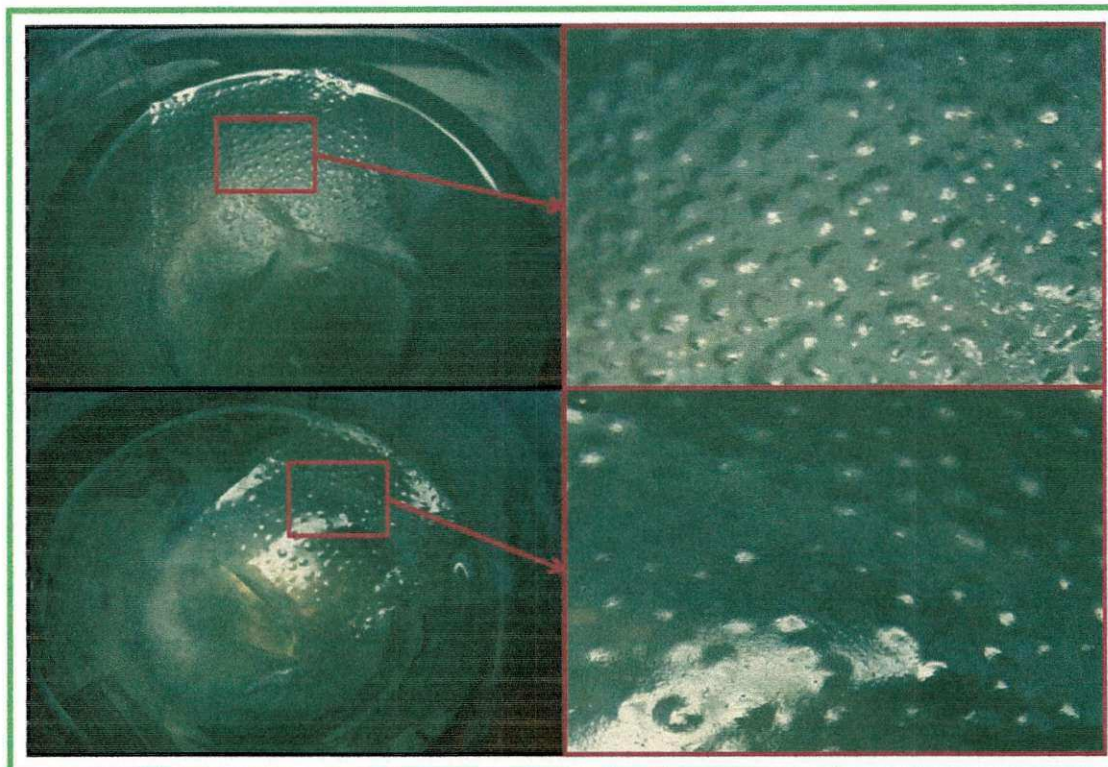
Figura 15 – Avaliação do comportamento das membranas Quitosana\Fenitoína líquida e comprimido no pH 7,01. Fotos representativas de todas as variações.



Fonte: Próprio autor (2013).

A Figura 15 (a) e (b) são representativas de todas as concentrações e variações de membrana, exceto Quitosana\Fentanil líquido e sólido 5 % e 1 comprimido respectivamente, submetidas ao pH 7,01 que apresentaram-se levemente maleáveis e com retração indicando um perfil hidrofóbico, porém em menos intensidade que os resultados apresentados nos demais pH's. Na Figura 15 (c) observa-se uma foto representativa do comportamento das membranas Quitosana\Fenitoína líquida 5 % e 1 comprimido, as mesmas apresentaram variação na superfície, passando de lisa para rugosa, rugosidades essas oriundas de morfologias de formato circular irregular, que após o período de 5 min encontravam-se distribuídas por toda a superfície, não apresentou o aspecto hidrofóbico, ou seja, não ocorreu retração, mas sim, leve expansão, pode-se melhor observar esses resultados na Figura 16.

Figura 16 – Avaliação do comportamento das membranas Quitosana\Fenitoína líquida 5 % e 1 comprimido no pH 7,01. Fotos representativas de todas as variações.



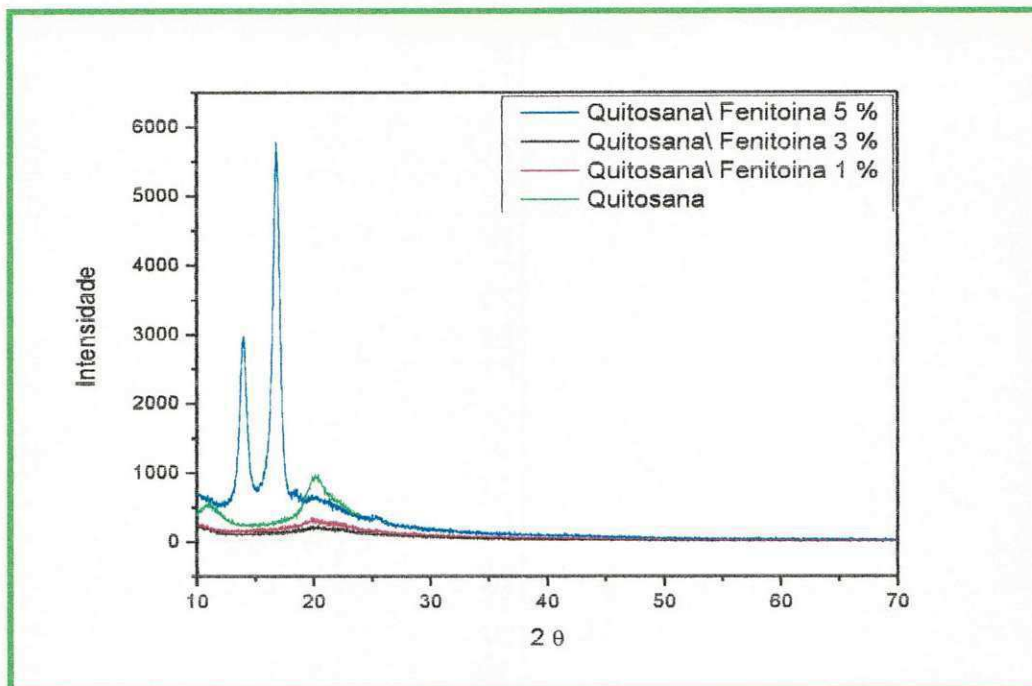
Fonte: Próprio autor (2013).

Com a ênfase dada a região segmentada da Figura 16 fica fácil perceber a nova morfologia adquirida pela membrana Quitosana\Fármaco quando submetida ao pH 7,01 com concentrações de fármaco de 5 % (para o líquido) e 1 comprimido. Essa variação de estrutura pode auxiliar na identificação da concentração do fármaco, já que nesse mesmo pH a membrana apenas de quitosana não apresenta este comportamento,

5.2 Difração de raios X (DRX)

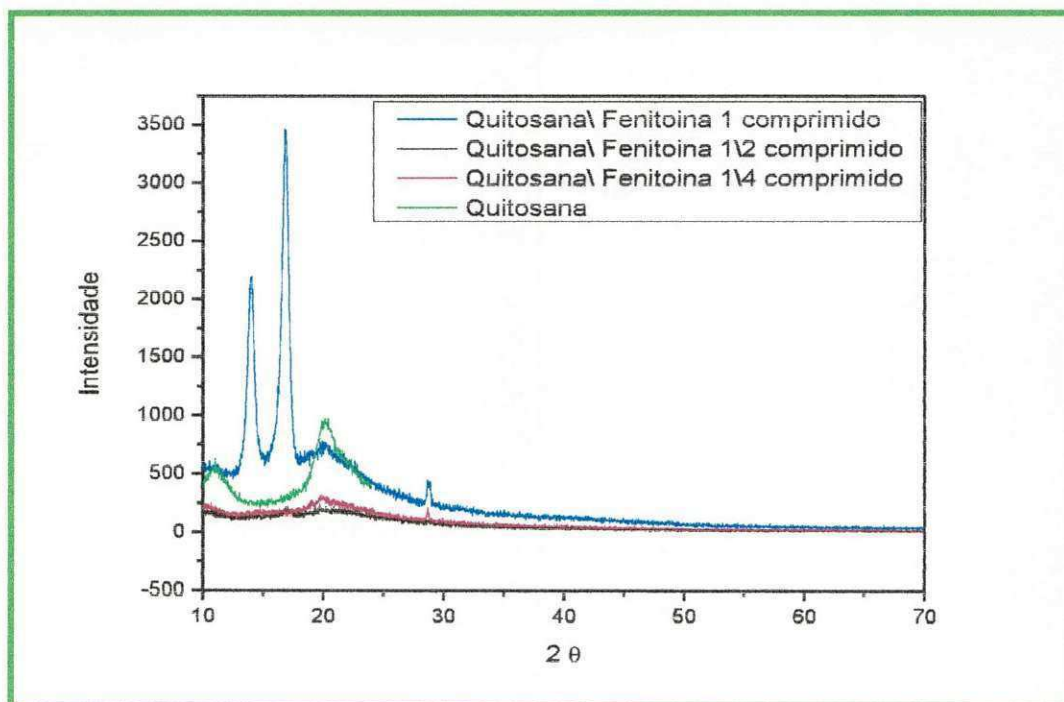
Nas Figuras 17 e 18 estão apresentados os espectrogramas das membranas sintetizadas neste trabalho.

Figura 17 – Espectogramas das membranas de Quitosana e Quitosana \ Fármaco líquido sintetizadas neste trabalho.



Fonte: Próprio autor (2013).

Figura 18 – Espectogramas das membranas de Quitosana e Quitosana \ Fármaco comprimido sintetizadas neste trabalho.



Fonte: Próprio autor (2013).

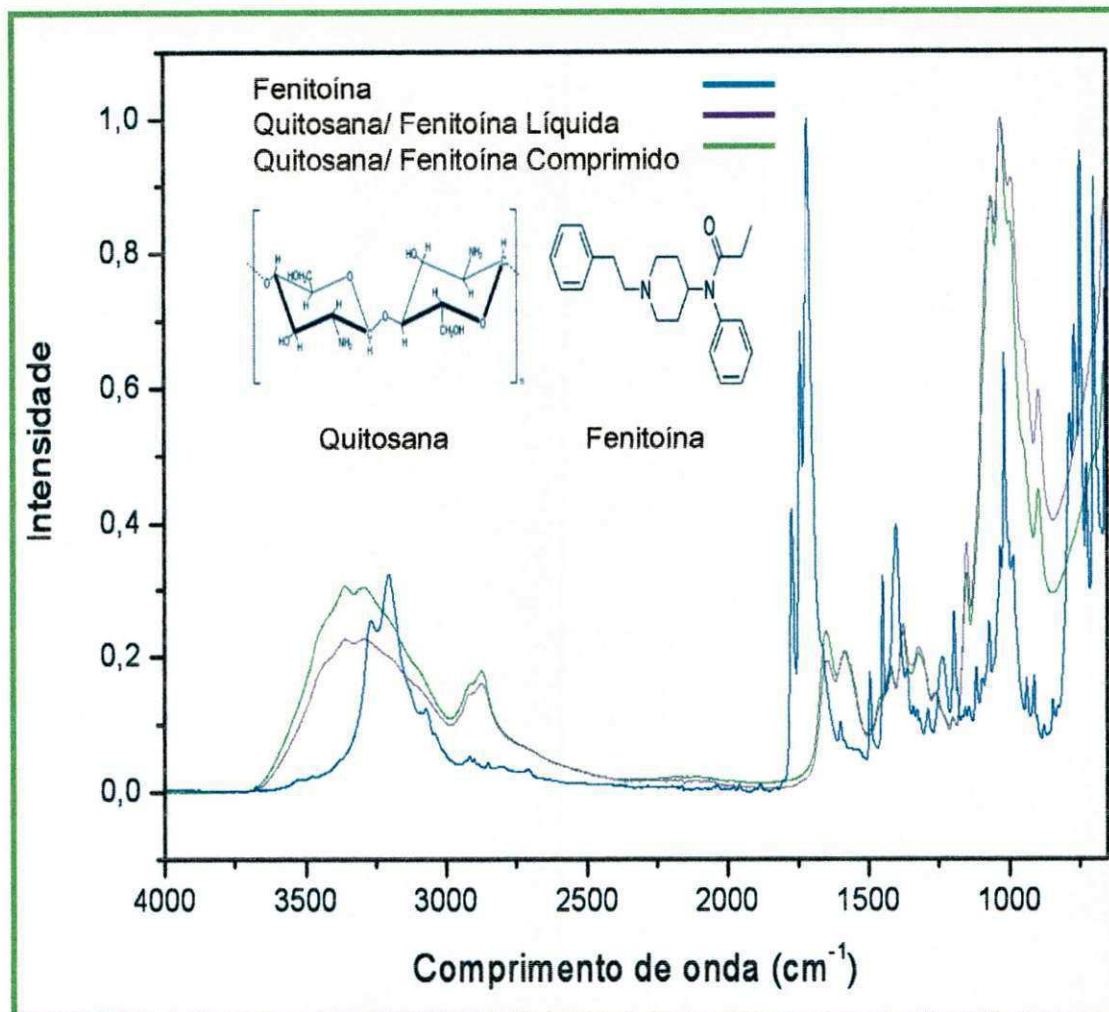
Observou-se que os espectrogramas das membranas sintetizadas tanto com o fármaco líquido (Figura 17) como com o fármaco em comprimido (Figura 18) não apresentaram grandes diferenças entre si, divergindo significativamente apenas na intensidade dos picos presentes entre aproximadamente 12 e 18 θ . Nota-se entre aproximadamente 12 e 18 θ (para Quitosana\ Fenitoína 5 % (Figura 17 em azul) e Quitosana\ Fenitoína 1 comprimido (Figura 18 em azul)) dois picos de caráter cristalino, picos esses não pertencentes ao espectrograma da quitosana que apresenta tipicamente um caráter semi-cristalino (Figura 17 e 18 em verde), deduz-se que esses dois picos correspondem a presença do fármaco na membrana, e assim a incorporação fármaco/ polímero, porém quando a quantidade de fármaco é reduzida, não é possível perceber a presença significativa destes picos, fato esse decorrente da baixa concentração da fenitoína no meio. Observou-se que a presença do fármaco em ambas as variações de membrana amenizam a intensidade das bandas características da quitosana, tornando-as mais amorfas em aproximadamente 10 a 12 θ e 18 a 25 θ , e conseqüentemente mais biodegradáveis.

5.3 Espectroscopia na região de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise de FTIR foi realizada com intuito de verificar os espectros das membranas sintetizadas assim como o espectro do fármaco utilizado. As variações estudadas foram Quitosana/ Fenitoína líquida 5 % e Quitosana/ Fenitoína 1 comprimido, tomando-as como representativas das demais por conterem a maior concentração de fármaco estudada.

Os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 19.

Figura 19 – Resultados da análise de Espectroscopia na região de infravermelho com transformada de Fourier.



Fonte: Próprio autor (2013).

Na Figura XX em azul pode-se observar o espectro da fenitoína utilizada neste trabalho, segundo Konrath, Piedade e Lima (2012) esse espectro realmente corresponde a fenitoína, comprovando a veracidade do fármaco utilizado neste experimento. Os demais espectros, Quitosana/ Fenitoína líquida 5 % e Quitosana/ Fenitoína 1 comprimido, são oriundos da mescla do espectro da quitosana (onde suas principais bandas são expostas na Tabela XX) com o espectro do fármaco, o que nos oportuniza observar que ocorreu a incorporação efetiva fármaco/ polímero.

Tabela 1 - Bandas de absorção no FTIR da quitosana.

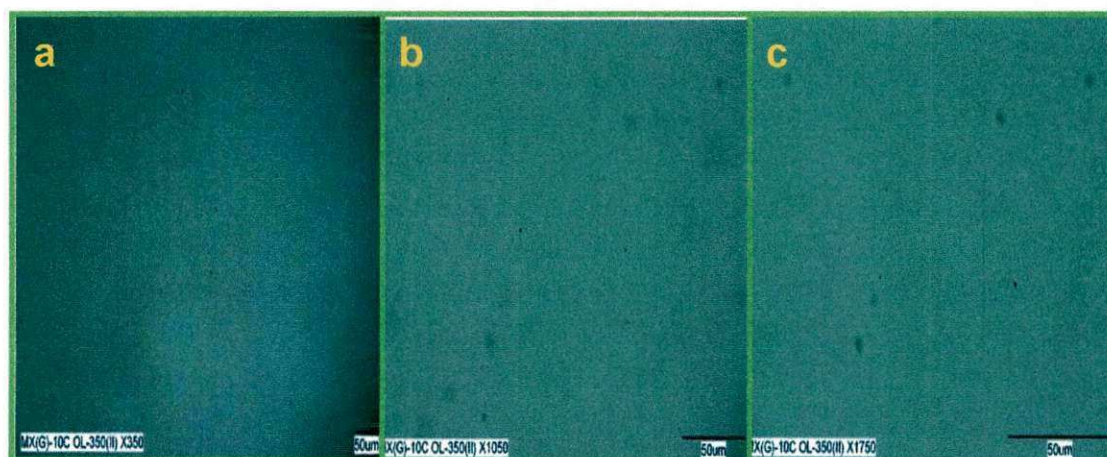
Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
3334	Deformação axial de O-H e N-H do grupo NH_2
2928 e 2873	Deformação axial de C-H de grupos CH_2 e CH_3
1652	Deformação axial de RHN-C=O (amida)
1586	Deformação angular N-H do grupo NH_2 (amina)
1423 e 1319	Deformação angular de O-H e deformação angular de C-H do anel glicosídico
1377	Deformação angular do C-H de CH_3
1150, 1062 e 1020	Deformação axial do C-O-C da ligação éter

Fonte: Ponciano, 2010.

5.4 Microscopia Óptica (MO)

Na Figura 20 observam-se as imagens da MO correspondentes as membranas de quitosana sintetizadas neste trabalho que apresentam uma superfície uniforme e lisa, características de uma membrana densa, o que está de acordo com estudos realizados por Lima (2010); Fidéles (2010); Marreco et. al (2004) e Dailan (2005).

Figura 20 – Microscopia Óptica das membranas de quitosana, a – 350x; b – 1050x e c – 2100x.



Fonte: Próprio autor (2013).

Observa-se na Figura 21 a MO da membrana Quitosana\Fenitoína líquida 5 % nos aumentos de 350x, 1050x e 2100x.

Figura 21 – Membrana Quitosana\ Fenitoína líquida 5 % nos aumentos de a – 350x; b – 1050x e c - 2100x.



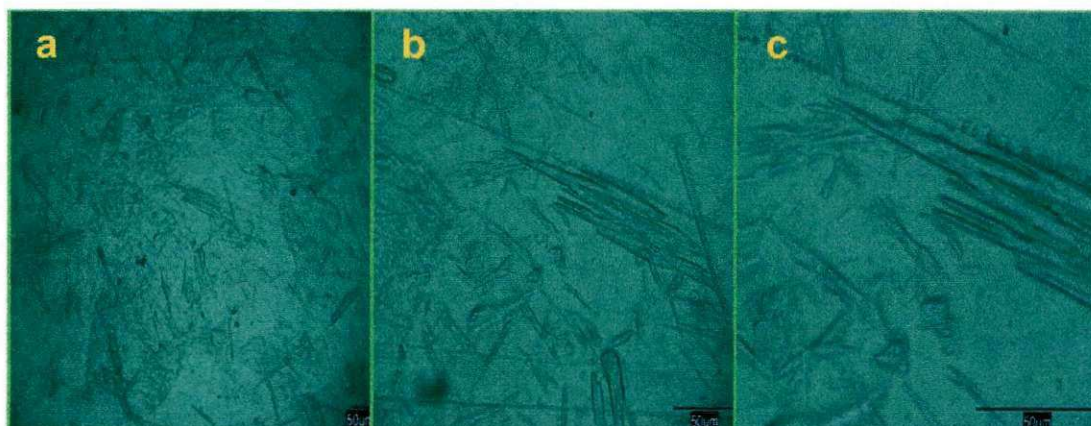
Fonte: Próprio autor (2013).

Nota-se na superfície da membrana da Figura 21 conglomerados de cristais de tamanhos variados distribuídos de forma não homogênea pela superfície da membrana alterando o aspecto liso apresentado pela membrana apenas de quitosana (Figura 20), porém, mesmo não sendo distribuídos em grupos homogêneos, esses cristais podem ser percebidos por toda a superfície da membrana e aparentemente recobertos por quitosana, o que indica uma incorporação efetiva fármaco/ polímero.

Não observa-se a presença de poros superficiais nas membranas.

Na Figura 22 observa a MO da membrana Quitosana\ Fenitoína líquida 3 % nos aumentos de 350x, 1050x e 2100x.

Figura 22 – Membrana Quitosana\ Fenitoína líquida 3 % nos aumentos de a – 350x; b – 1050x e c - 2100x.



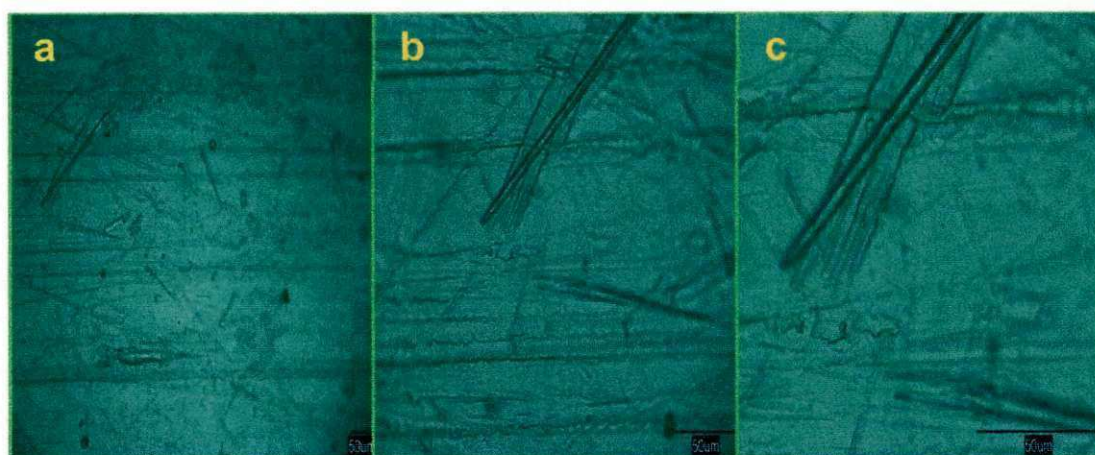
Fonte: Próprio autor (2013).

Nota-se na Figura 22 que a membrana apresenta menores quantidades de cristais distribuídos em conglomerados pela superfície da mesma, porém, podem ser observados em toda a membrana entretanto de forma mais dispersa que os observados na análise da membrana Quitosana\ Fenitoína líquida 5 % (Figura 21), esse fato é decorrente simplesmente da diminuição de concentração do fármaco na solução raiz da membrana.

Não observa-se a presença de poros superficiais nas membranas.

Na Figura 23 observa a MO da membrana Quitosana\ Fenitoína líquida 1 % nos aumentos de 350x, 1050x e 2100x.

Figura 23 – Membrana Quitosana\ Fenitoína líquida 1 % nos aumentos de a – 350x; b – 1050x e c - 2100x.



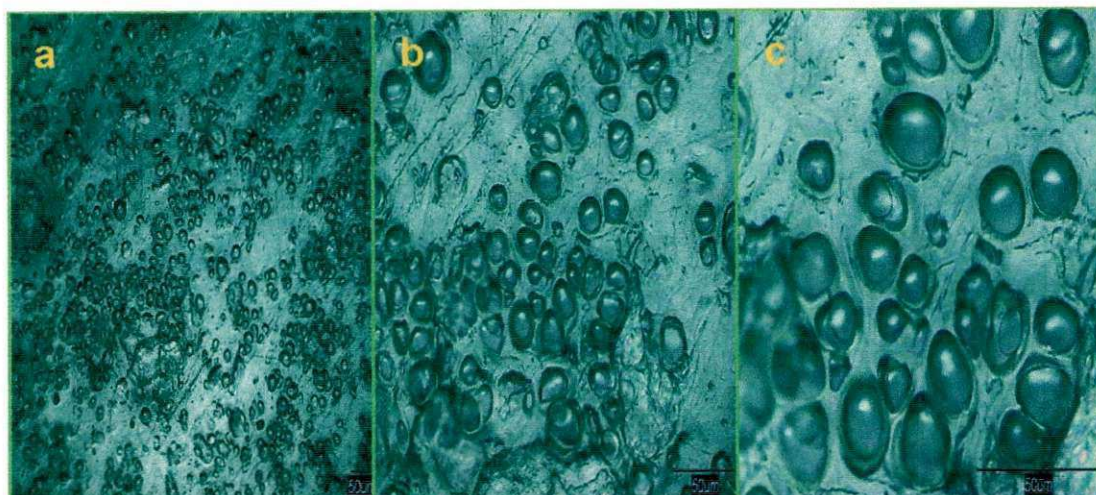
Fonte: Próprio autor (2013).

Percebe-se que a diminuição da concentração do fármaco contido na membrana pode ser considerada diretamente proporcional a diminuição da quantidade de cristais em sua superfície, como observado na Figura 23 em comparação com as Figuras 21 e 22.

Não observa-se a presença de poros superficiais nas membranas.

A mesma análise foi realizada para as membranas sintetizadas com o fármaco em formato de comprimidos para avaliar o aspecto morfológico das mesmas. Na Figura 24 observa-se a MO da membrana Quitosana\ Fenitoína 1 comprimido nos aumentos de 350x, 1050x e 2100x.

Figura 24 – Membrana Quitosana\ Fenitoína 1 comprimido nos aumentos de a – 350x; b – 1050x e c - 2100x.



Fonte: Próprio autor (2013).

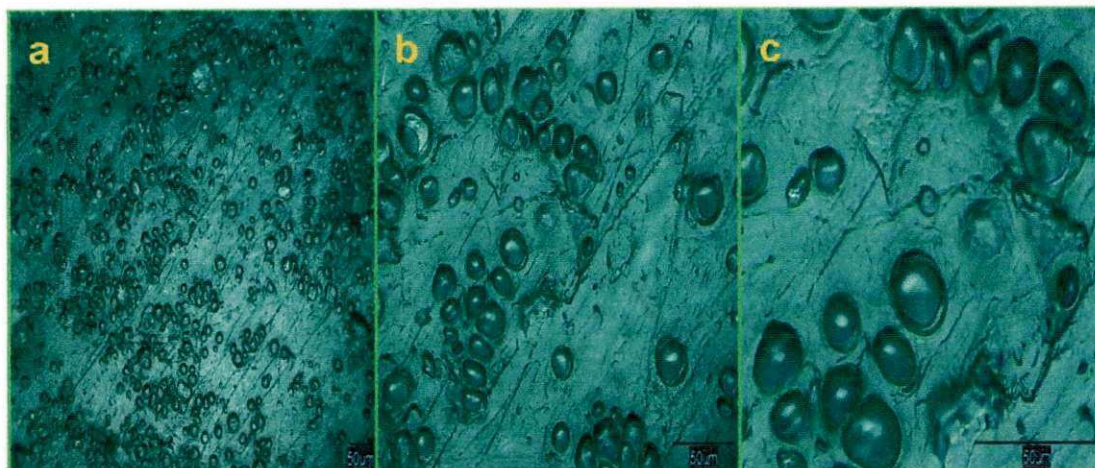
Observa-se uma notável divergência em relação à morfologia apresentada pela membrana Quitosana\ Fenitoína líquida e a membrana Quitosana\ Fenitoína 1 comprimido (Figura 21). Não é possível visualizar cristais na superfície da membrana, sendo a mesma formada por conglomerados de morfologias semelhantes a bolhas de tamanhos variados, distribuídas por toda sua superfície formando poros superficiais.

Na síntese de membranas sempre são tomadas precauções para que não ocorra a formação de bolhas, logo essas bolhas interfeririam na análise que iria apresentar poros não existentes, neste caso, esse procedimento foi seguido, o que elimina a hipótese de que essas formações circulares observadas na Figura 24 sejam decorrentes de problemas no processamento, sendo as mesmas, oriundas da união fármaco/ polímero.

Na Figura 24 (b) canto inferior central, é possível verificar a presença de alguns grãos de tamanhos não uniformes aparentemente recobertos por quitosana, esses grãos podem ser visualizados por toda a superfície e correspondem a fragmentos não dissolvidos tanto do fármaco como dos excipientes do mesmo.

Na Figura 25 observa-se a MÓ da membrana Quitosana\ Fenitoína 1/2 comprimido nos aumentos de 350x, 1050x e 2100x.

Figura 25 – Membrana Quitosana\ Fenitoína 1/2 comprimido nos aumentos de a – 350x; b – 1050x e c - 2100x.

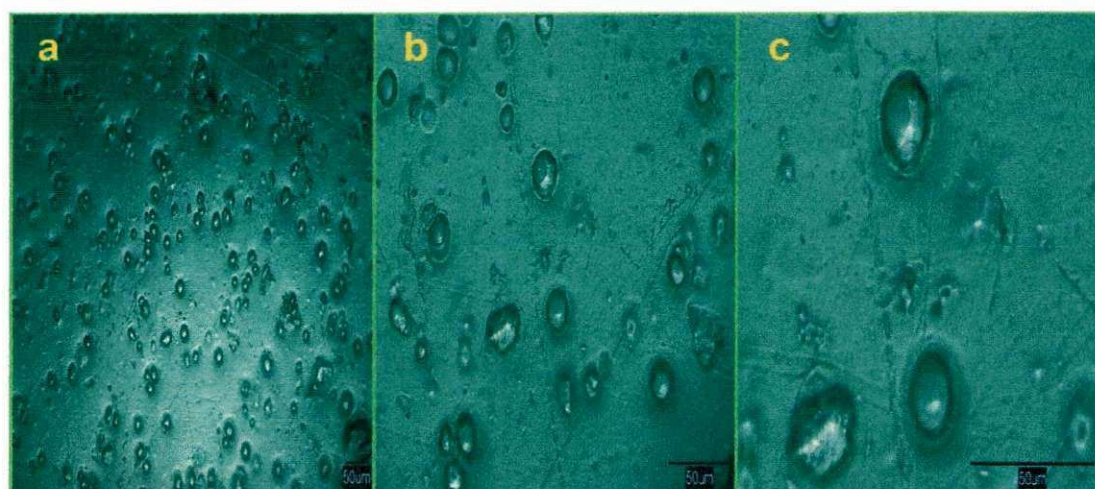


Fonte: Próprio autor (2013).

Como observado para membrana com 1 comprimido (Figura 24), a presença de morfologias em forma de bolhas irregulares pode ser verificada na membrana com 1/2 de comprimido (Figura 25), porém em menor quantidade, formando poros superficiais. Observa-se também a presença de grãos não dissolvidos aparentemente recobertos com quitosana (Figura 25 (a) centro superior da imagem).

Na Figura 26 observa-se a MO da membrana Quitosana\ Fenitoína 1/4 comprimido nos aumentos de 350x, 1050x e 2100x.

Figura 26 – Membrana Quitosana\ Fenitoína 1/4 comprimido nos aumentos de a – 350x; b – 1050x e c - 2100x.



Fonte: Próprio autor (2013).

A Figura 26 corrobora com os outros resultados já apresentados para as membranas Quitosana\ Fenitoína comprimido, já que a mesma apresenta formações morfológicas de formato circular distribuídas pela sua superfície, formando poros superficiais, e grãos não dissolvidos. Assim como verificado para membrana Quitosana\ Fenitoína líquida em relação à quantidade de cristais presentes na superfície, nota-se que a quantidade de poros superficiais presentes na membrana é diretamente proporcional a concentração de fármaco, o que fortalece a hipótese de que essas formações correspondem a interação fármaco/ polímero e não a problemas de processamento.

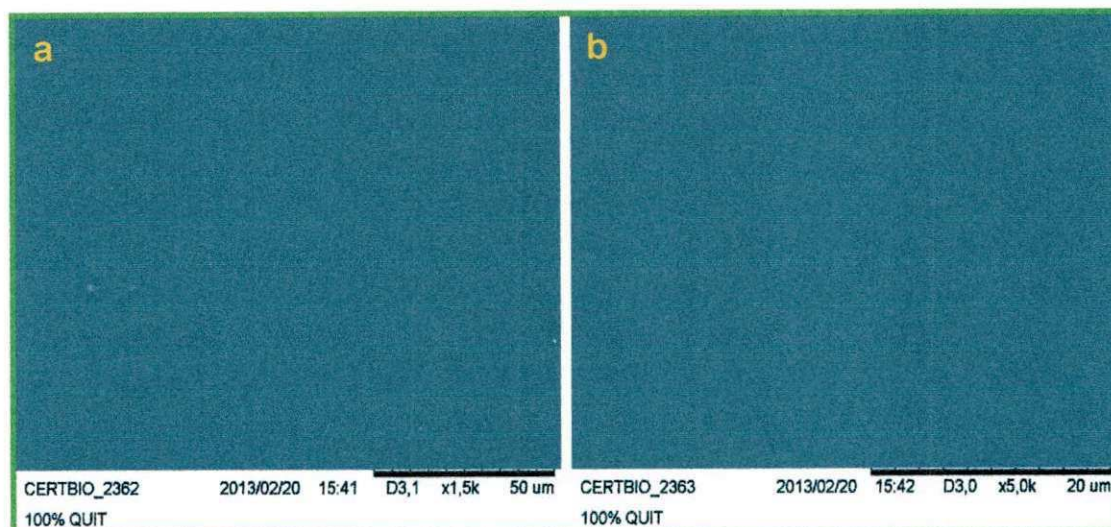
5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Observou-se ser interessante avaliar pela MEV apenas as membranas Quitosana/ Fenitoína líquida 5 % e Quitosana/ Fenitoína 1 comprimido, já que foram as que apresentaram maior alteração na sua estrutura, como visualizada na análise da MO, e que todas as demais variações de membrana apresentam apenas uma amenização dessa alteração decorrente da diminuição da concentração do fármaco, sem apresentarem estruturas secundárias que as diferenciassem uma das outras.

Como prova em branco foi realizada a análise da MEV em membranas apenas de quitosana para que os efeitos da adição do fármaco fossem mais fáceis de ser identificados.

Na Figura 27 observa-se a análise por MEV da membrana apenas de quitosana.

Figura 27 – Microscopia Eletrônica de Varredura da membrana apenas de quitosana nos aumentos a) – 1500x e b) – 5000x.

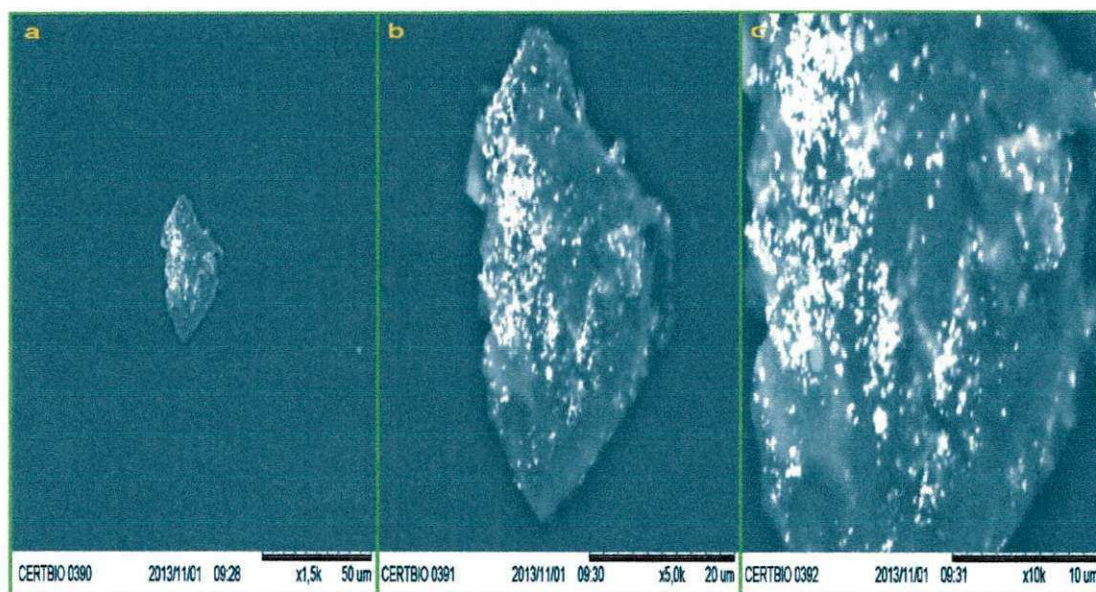


Fonte: Próprio autor (2013).

A análise da MEV para a membrana apenas de quitosana (Figura 27) foi condizente com os resultados apresentados pela MO da mesma, onde foi observada uma estrutura densa sem a presença de poros superficiais.

A Figura 28 apresenta a análise da MEV para a membrana Quitosana/ Fenitopina líquida 5 %.

Figura 28 – Microscopia Eletrônica de Varredura da membrana Quitosana/ Fenitoína líquida 5 % nos aumentos de a) – 1500x, b) – 5000x e c) – 10000.



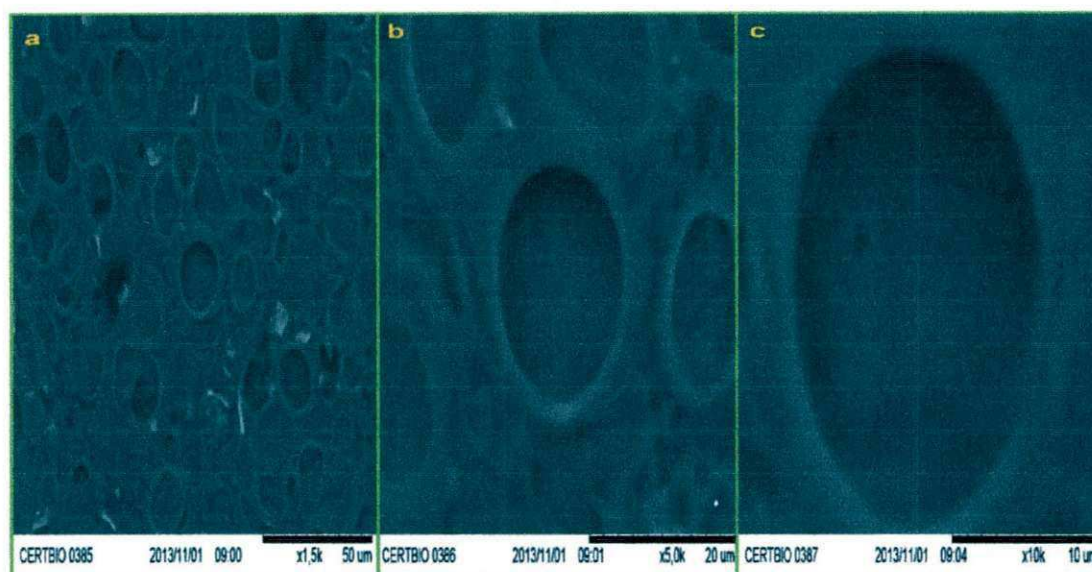
Fonte: Próprio autor (2013).

Não foi possível verificar a presença dos cristais observados na MO da membrana Quitosana/ Fenitoína (Figura 28), porém, como foi observada na MO, esses cristais distribuíam-se em aglomerados por toda a superfície, o que devido ao aumento da MEV pode ter focado em uma região intermediária entre os grupamentos de cristais não sendo possível sua verificação.

Observa-se na Figura 28 a presença de um grão não disperso aparentemente formando por uma fração não solúvel do fármaco, pois o mesmo não pertence a estrutura da quitosana como observado na Figura 27..

A Figura 29 apresenta os resultados da MEV para membrana Quitosana/ Fenitoína 1 comprimido.

Figura 29 – Microscopia Eletrônica de Varredura da membrana Quitosana/ Fenitoína 1 comprimido nos aumentos de a) – 1500x, b) – 5000x e c) – 10000.



Fonte: Próprio autor (2013).

Observa-se que os resultados obtidos pela MEV da membrana Quitosana/ Fenitoína 1 comprimido corroboram com os observados na análise da MO, onde pode-se verificar a presença de morfologias circulares e irregulares distribuídas pela superfície da mesma, aspecto esse não pertencente a membrana apenas de quitosana apresentada na Figura 27, o que nos leva a acreditar que essas formações são oriundas da interação fármaco/ polímero.

Pode-se observar na Figura 29 a presença de grãos de diferentes tamanhos distribuídos pela superfície da membrana, grãos esses que assim

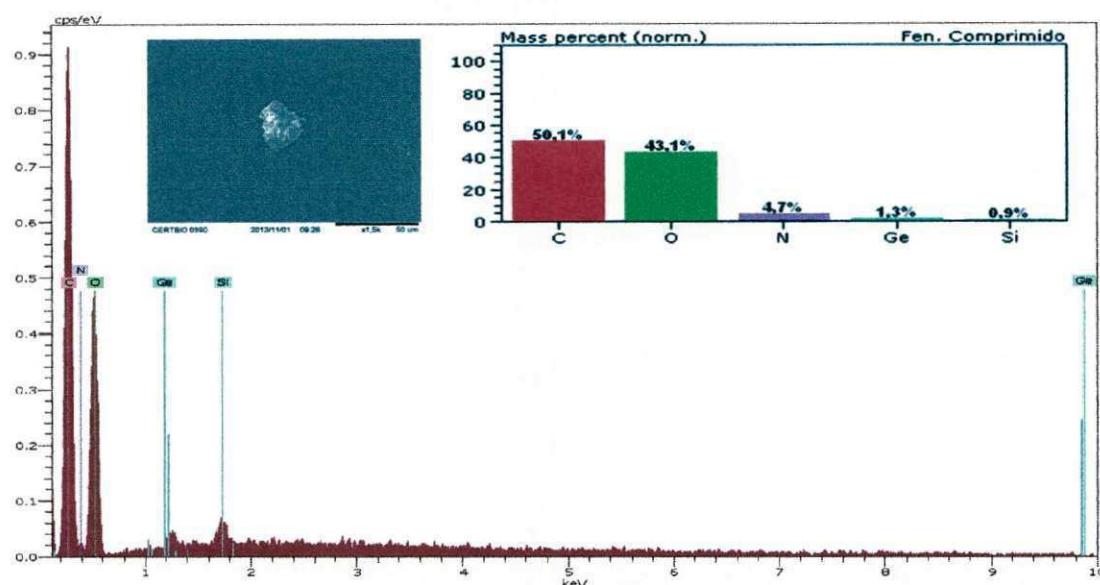
como os observados na Figura 28 não fazem parte da estrutura da quitosana, indicando serem derivados de frações insolúveis do fármaco.

5.6 Espectroscopia Dispersiva de raios X (EDS)

Com o intuito de verificar a composição química das membranas submetidas a análise da MEV (por serem equipamento acopiados) realizou-se a caracterização por EDS.

A Figura 30 apresenta os resultados da análise de EDS da membrana Quitosana/ Fenitoína líquida 5 %.

Figura 30 – Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X da membrana Quitosana/ Fenitoína líquida 5 %.



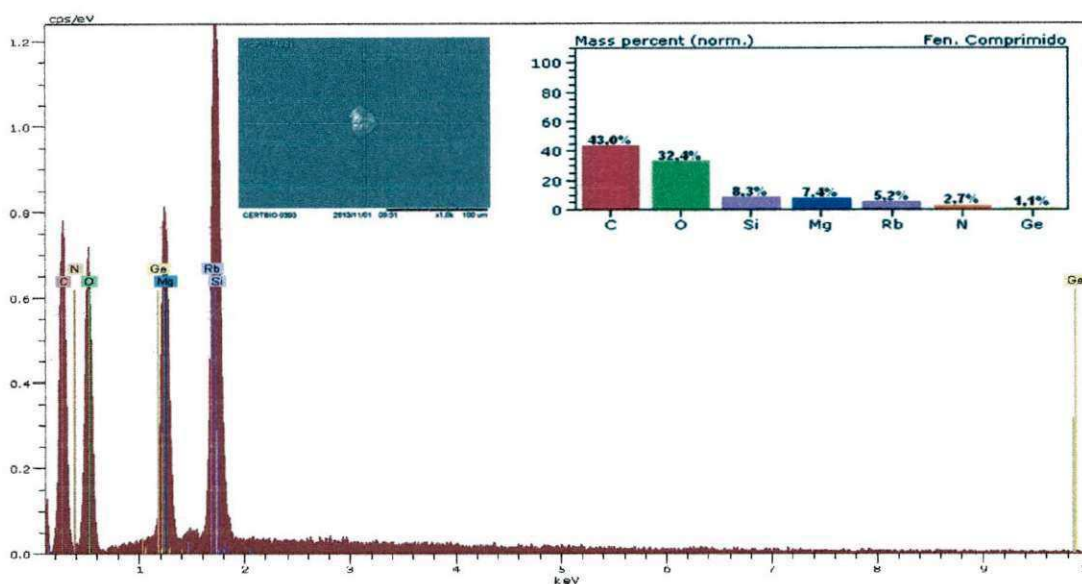
Fonte: Próprio autor (2013).

Observa-se na análise de EDS a presença dos elementos carbono, oxigênio e nitrogênio, elementos esses constituintes da estrutura da quitosana e da fenitoína, porém, foram verificados a presença dos elementos germânio e silício, elementos esses que não são informados vide bula como constituintes da composição do fármaco, e sabe-se que os mesmos não constituem a estrutura da quitosana. Nenhuma das etapas do processamento da membrana indica possível contaminação laboratorial por esses elementos, o que nos leva

a tratar esses dois (germânio e silício) como contaminantes no processamento industrial do fármaco.

Foi verificada a presença de grãos na superfície da membrana Quitosana Fenitoína líquida 5 %, no intuito de verificar a composição desse grão em específico foi realizada uma análise pontual de EDS nessa região, o resultado desta análise encontra-se na Figura 31.

Figura 31 – Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X pontual do grão presente na membrana Quitosana/ Fenitoína líquida 5 %.



Fonte: Próprio autor (2013).

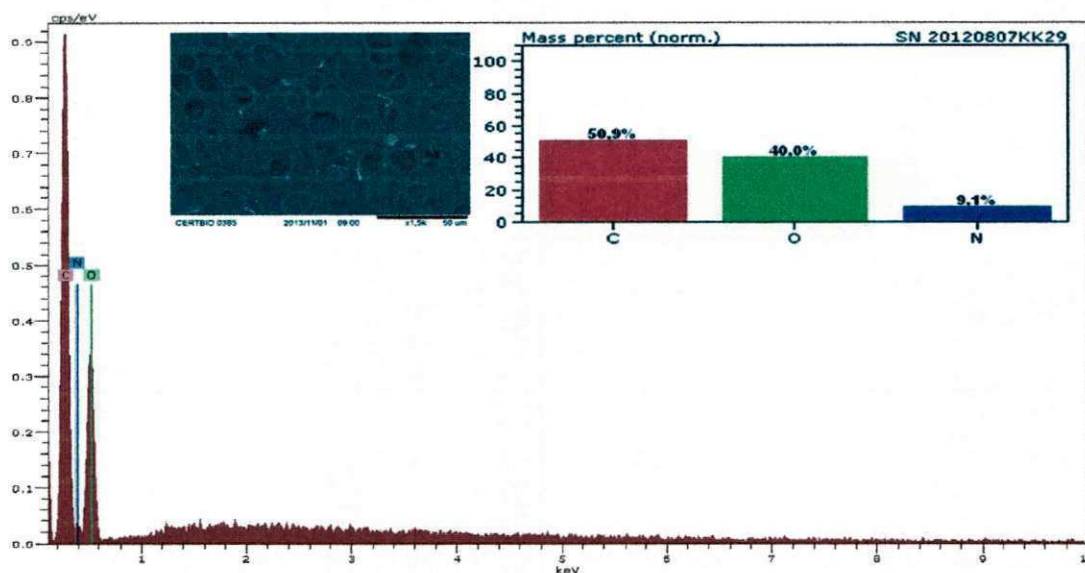
Observa-se na Figura 31 a presença dos elementos carbono, oxigênio e nitrogênio, o que indica uma incorporação do grão a membrana mesmo não sendo o mesmo dissolvido, e verificasse a presença dos elementos silício e germânio, já observados anteriormente na análise de EDS da região da membrana, como também o magnésio e rubídio, elementos não verificados na análise anterior, ambos também não declarados vide bula como constituintes do fármaco, e se sabe não serem constituintes da quitosana.

Segundo Albuquerque, Scorza, Arida e Scorza, (2011) o magnésio pode, em alguns casos, ser um biomarcador de morte súbita de epilepsia (SUDEP), pois em alguns casos, pacientes que sofreram SUPED possuíam níveis séricos baixos de magnésio. O rubídio participa da constituição de alguns medicamentos para epilepsia. Esses fatores podem explicar a presença desses

dois elementos (magnésio e rubídio) na composição do medicamento, porém, os mesmos, como já declarado, não foram informados vide bula como sendo componentes do medicamento utilizado neste trabalho.

Na Figura 32 observa-se a EDS da membrana Quitosana/ Fenitoína 1 comprimido.

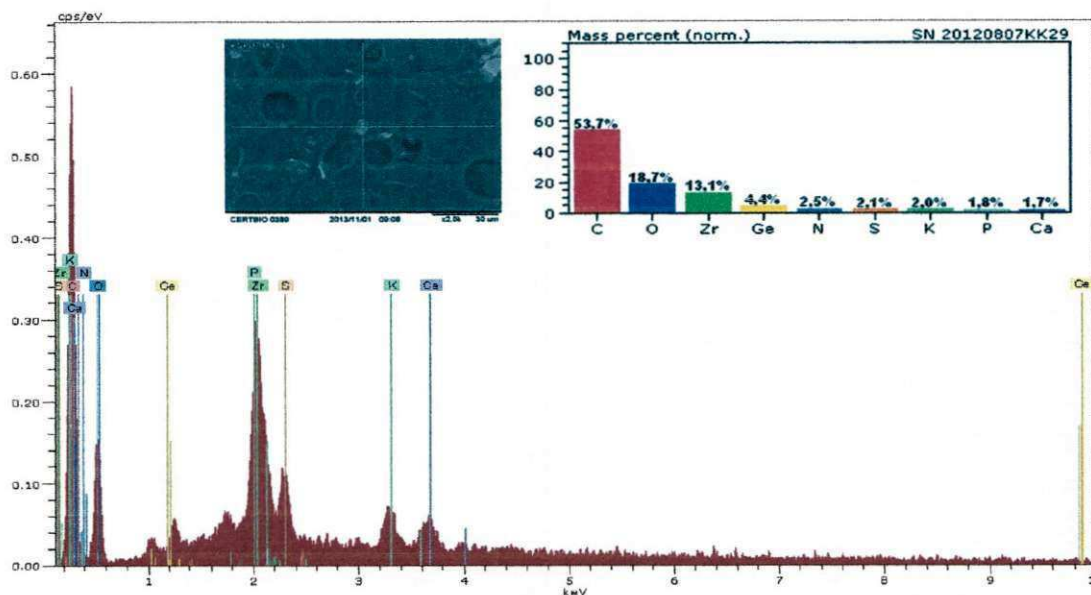
Figura 32 – Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X da membrana Quitosana/ Fenitoína 1 comprimido.



Fonte: Próprio autor (2013).

Verificou-se a presença dos elementos carbono, oxigênio e nitrogênio na Figura 32, elementos esses constituintes da estrutura da quitosana e da fenitoína. Para análise de região não foi verificada a presença de elementos que não são constituintes da estrutura dos materiais em estudo assim como na Figura 30, porém, verificou-se na análise da MEV a presença de grãos dispersos na superfície da membrana, o que nos leva a realizar uma análise pontual dos mesmos no intuito de conhecer a sua constituição. Os resultados desta análise encontram-se na Figura 33.

Figura 33 – Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X pontual do grão presente na membrana Quitosana/ Fenitoína 1 comprimido.



Fonte: Próprio autor (2013).

Assim como para o grão da Figura 31 também foi constatada a presença de outros elementos na constituição do mesmo, porém, em maior número. Verificou-se para a análise de EDS apresentada na Figura 33 a presença dos elementos carbono, oxigênio e nitrogênio, constituintes da estrutura da quitosana e da fenitoína, dentre os elementos zircônio, germânio, enxofre, potássio, fósforo e cálcio, elementos esses que não são informados vide bula como constituintes do fármaco e os quais não apresentam na literatura ligação com uso medicamentoso no caso de pacientes com epilepsia. Pelo processamento usado na obtenção das membranas se tem certeza que a presença destes elementos não se trata de uma contaminação laboratorial, mas sim, de uma contaminação no processamento industrial do fármaco.

5.7 Tensão superficial

Na Figura 34 observa-se os resultados obtidos pelo ensaio de tensão superficial.

Figura 34 – Resultados do ensaio de tensão superficial para as membranas sintetizadas neste trabalho.



Fonte: Próprio autor (2013).

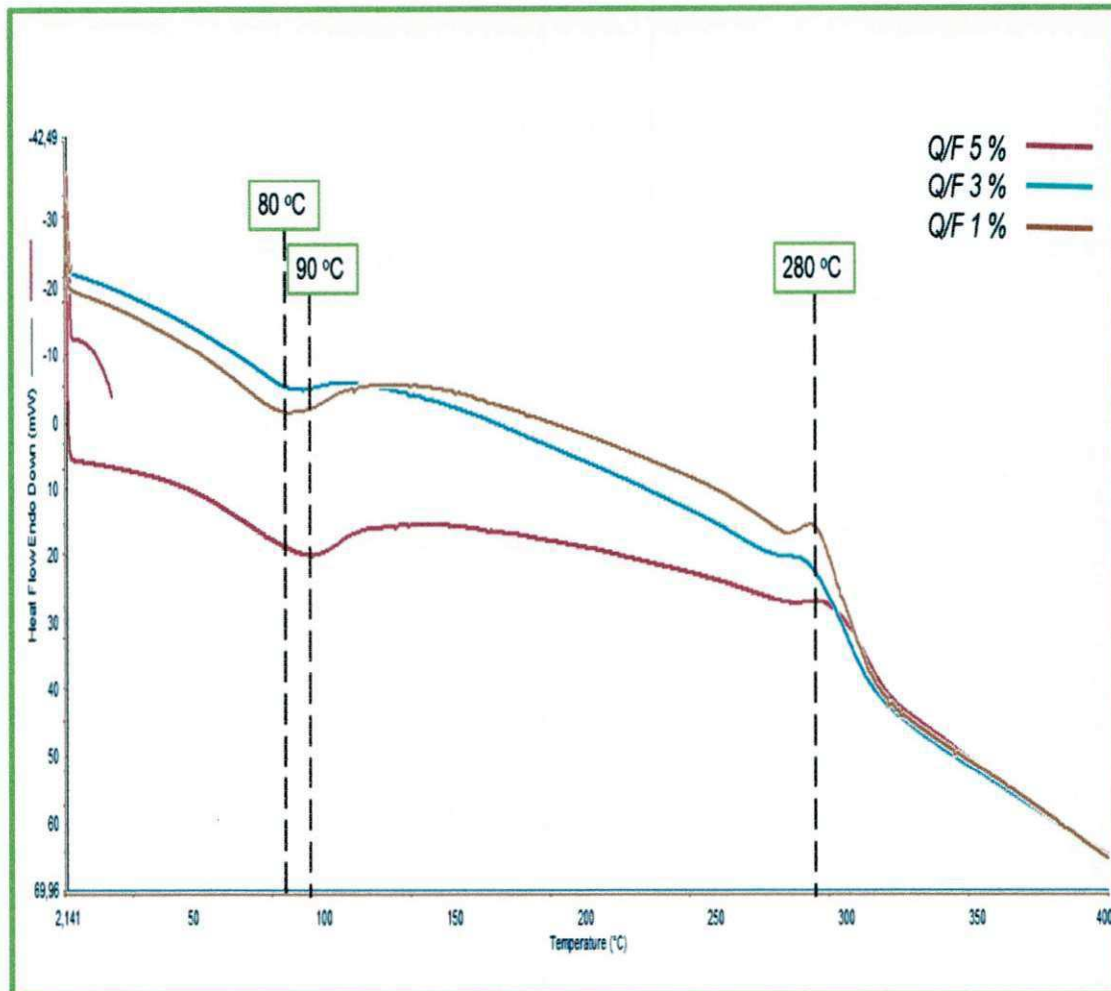
Observou-se pelos resultados do ensaio de tensão superficial que a adição do fármaco a quitosana, tanto na forma líquida como na forma de comprimidos, em todas as proporções estudadas neste trabalho, diminuíram o aspecto hidrofílico da mesma, onde as membranas sintetizadas apresentaram um maior ângulo de contato quando comparadas a membrana apenas de quitosana. Mesmo com este aumento nenhuma das membranas em estudo apresentou caráter hidrofóbico.

5.8 Calorimetria Exploratória Diferencial

A análise por Calorimetria Exploratória Diferencial foi efetuada para verificar a resistência térmica dos materiais sintetizados e como estas propriedades das membranas sofrem alteração variando a concentração do fármaco em estudo.

Os resultados da análise para as membranas Quitosan/ Fenitoína líquida 5, 3 e 1 % estão dispostos na Figura 35.

Figura 35 – Calorimetria Exploratória Diferencial das membranas Quitosana/ Fenitoína líquida 5, 3 e 1 %.

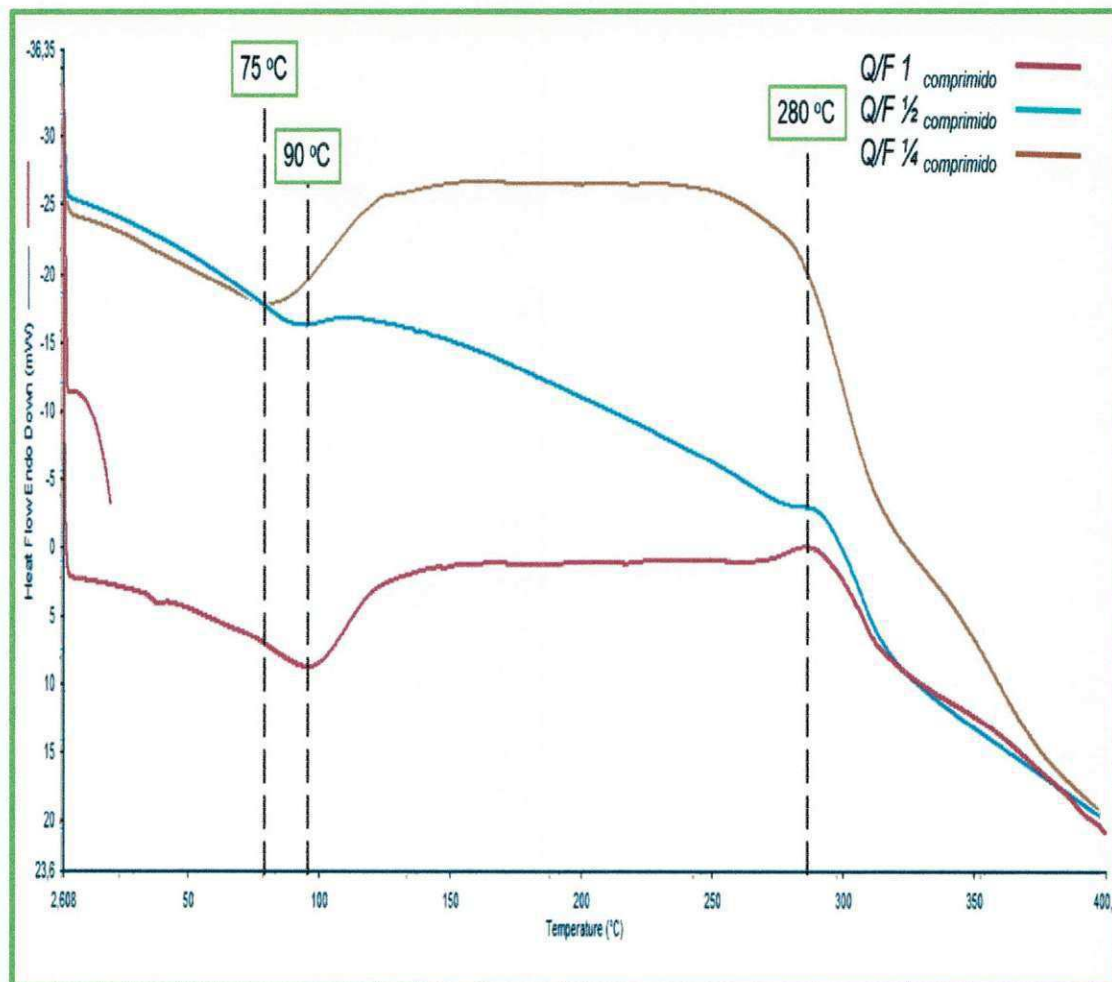


Fonte: Próprio autor (2013).

Pode-se observar que para todas as membranas da Figura 35 foi possível verificar a presença de dois picos, um endotérmico, que tem início em aproximadamente 60 °C e término em aproximadamente 120 °C que está relacionado a perda de água do material, e outro exotérmico que tem início em aproximadamente 275 °C e prossegue até completa degradação do material. Verificasse que a única variação ocorrida foi para membrana Quitosana/ Fenitoína 5 % com relação ao pico máximo endotérmico que é atingido em 90 °C diferindo dos demais (80 °C), o que indica que a membrana nessa proporção pode apresentar uma maior propriedade de retenção de água.

Na Figura 36 observa-se os resultados da análise de DSC para as membranas Quitosana/ Fentanil 1, ½ e ¼ comprimido.

Figura 36 – Calorimetria Exploratória Diferencial das membranas Quitosana/ Fenitoína 1, 1/2 e 1/3 comprimido.



Fonte: Próprio autor (2013).

Assim como verificado para as membranas Quitosana/ Fenitoína líquida, não ocorreu grande variação entre os picos endotérmicos e exotérmicos das membranas Quitosana/ Fenitoína comprimido, o que nos leva a notar que a variação do fármaco não influencia de forma significativa nas propriedades térmicas do material sintetizado.

5.9 Biodegradação *in vitro*

O ensaio de biodegradação enzimática foi realizado em quintuplicata para todas as variações de concentração de fármaco em membrana desenvolvidas neste trabalho. As membranas foram submetidas ao ensaio no período de 7 e 14 dias, os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultados dos ensaios de biodegradação *in vitro*.

Ensaio	Perda de massa das membranas							
	7 dias				14 dias			
	PBS (pH=7,35)		PBS+Lisozima (pH=7,41)		PBS (pH=7,32)		PBS+Lisozima (pH=7,44)	
	Média (%)	Desvio Padrão (%)	Média (%)	Desvio Padrão (%)	Média (%)	Desvio Padrão (%)	Média (%)	Desvio Padrão (%)
Q/F 5 %	4,2	0,5	90,6	0,6	4,9	0,2	98,3	0,2
Q/F 3 %	5,1	0,4	100	0,0				
Q/F 1 %	8,1	0,6	100	0,0				
Q/F 1	5,3	0,5	93,1	0,3	5,9	0,5	97,2	0,6
Q/F 1/2	5,1	0,6	100	0,0				
Q/F 1/4	8,6	0,6	100	00				

Fonte: Próprio autor (2013).

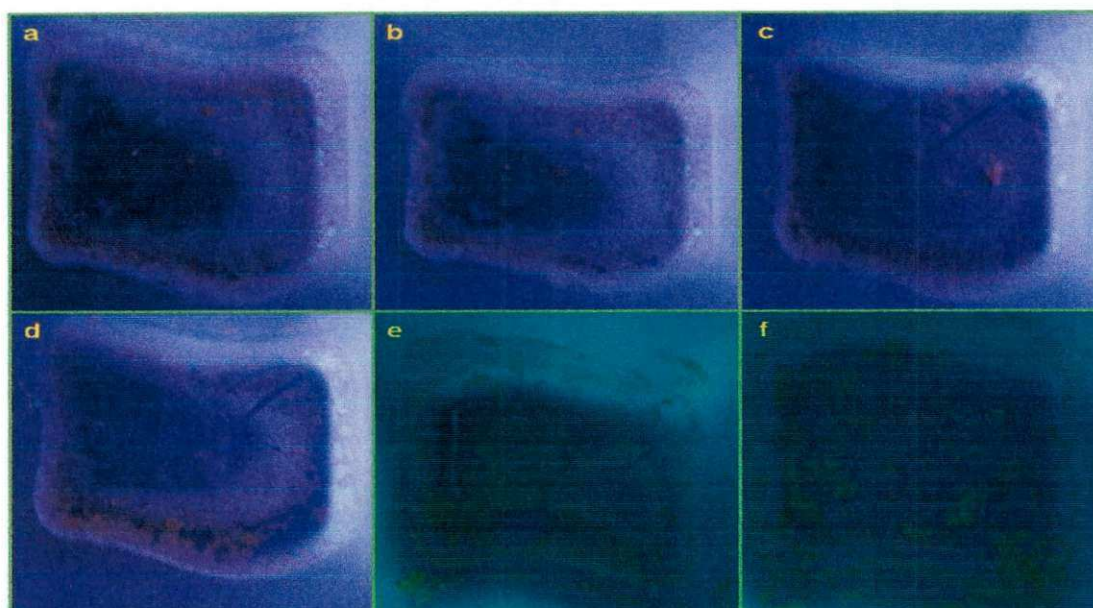
As membranas sintetizadas foram renomeadas na Tabela 2 para Q/F 5 % - Quitosana/ Fenitoína líquida 5 %, Q/F 3 % - Quitosana/ Fenitoína líquida 3 % e Q/F 1 % - Quitosana/ Fenitoína líquida 1 %, Q/F 1 – Quitosana/ Fenitoína 1 comprimido, Q/F ½ - Quitosana/ Fenitoína ½ comprimido e Q/F ¼ - Quitosana/ Fenitoína ¼ comprimido.

Observa-se nos dados da Tabela 2 que a degradação das membranas sintetizadas ocorreu principalmente pela ação da lisozima, logo verifica-se que os percentuais de degradação relacionados ao PBS em todas as concentrações não excede 8,6 %.

As membranas nas proporções de fármaco de 3 e 1 %, ½ e ¼ de comprimido degradaram-se completamente no período de 7 dias (Figura 37),

fato esse que corrobora com os resultados obtidos para essas variações na análise de DRX, onde as mesmas apresentaram caráter amorfo. Verificou-se que grande parte das membranas com proporções de fármaco de 5 % e 1 comprimido sofreram processo de degradação no período de sete dias (média aproximada em relação as duas de 90 %), porém, mantiveram parte de sua estrutura até o período de 14 dias.

Figura 37 – Resultado do ensaio de biodegradação enzimática no período de 7 dias para as membranas a) e b) – Quitosana/ Fenitoína Líquida 3 %; c) – Quitosana/ Fenitoína 1 %; d) e e) – Quitosana/ Fenitoína ½ comprimido e f) – Quitosana/ Fenitoína ¼ comprimido.



Fonte: Próprio autor (2013).

Foi notada uma maior degradação nas membranas que continham menor quantidade de fármaco, o que pode indicar que a concentração é inversamente proporcional a biodegradação do material já que as únicas membranas que resistiram parcialmente a 14 dias de ensaio foram as variações com 5 % e 1 comprimido, esse parâmetro torna-se interessante por ser facilmente manipulado durante o processamento da estrutura polímero/fármaco.

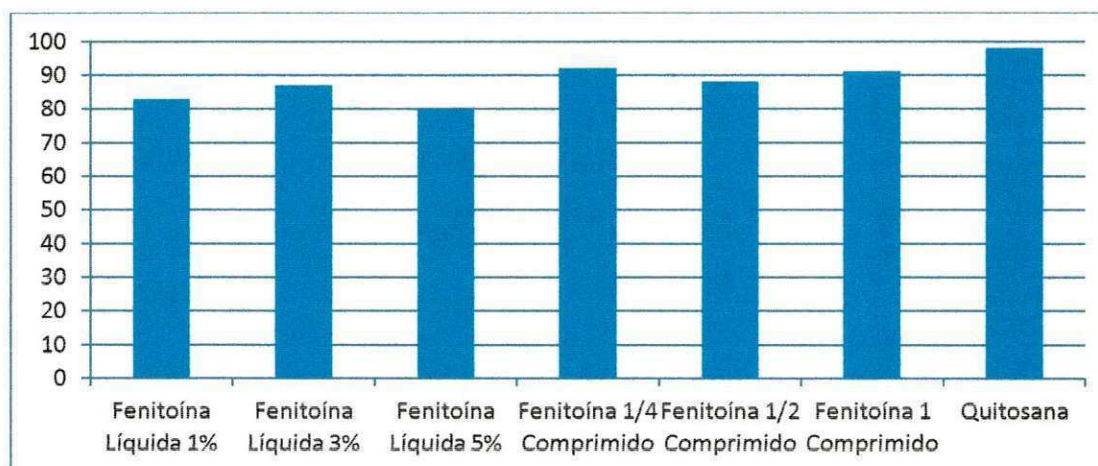
Notou-se que a concentração do fármaco é inversamente proporcional a degradação da membrana, já que quanto maior sua concentração menor foi sua degradação em todas as variações estudadas, o que corrobora com a

análise de DRX realizada neste trabalho, onde apresentou um espectrograma mais amorfo para as membranas Quitosana/ Fentanil 1 e 3 %.

5.10 Ensaio de citotoxicidade

O objetivo deste ensaio foi avaliar a viabilidade das células em face do material produzido para uso em organismos vivos. A Figura 28 ilustra o resultado deste teste.

Figura 38 – Resultados do ensaio de citotoxicidade.



Fonte: Próprio autor.

A viabilidade das células expostas as membranas de Quitosana/ Fenitoína em todas as concentrações do fármaco foi em média 88%. Dessa forma, a partir dos resultados obtidos na presente pesquisa, pode-se inferir que membranas de Quitosana/ Fenitoína produzidas mostraram-se promissoras para serem testadas como biomaterial em ensaios *in vivo*.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados pode se inferir que:

- A adição do fármaco a solução de quitosana no processo de síntese da estrutura polímero/ fármaco apropriou a mesma caráter cristalino nas proporções 5 % para o fármaco líquido e 1 comprimido para as membranas sintetizadas a partir do pó do comprimido, para as demais variações a adição de fenitoína tornou-as amorfas, essas constatações foram feitas a partir do ensaio de Difração de raios X;
- A análise de Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier comprovou a veracidade da fenitoína utilizada neste trabalho além de apresentar, a partir do espectro, a incorporação do fármaco a membrana;
- A Microscopia Óptica em conjunto com a Microscopia Eletrônica de Varredura identificou a incorporação fármaco/ polímero, onde não foi verificada a presença de uma segunda fase. Ocorreu uma grande diferenciação entre as membranas sintetizadas com o fármaco líquido e as sintetizadas com o fármaco na forma de comprimido. As membranas sintetizadas com a fenitoína líquida apresentaram superfície pouco rugosa com presença de cristais de tamanhos variados distribuídos em aglomerados, as sintetizadas com o pó do comprimido apresentaram superfície muito rugosa com presença de morfologias circulares semelhantes a poros superficiais aglomerados por toda a membrana;
- Verificou-se a presença de grãos não dissolvidos na superfície da membrana, grãos esses, que pela análise de Espectroscopia Dispersiva de raios X, eram constituídos por elementos não informados vide bula pelo fornecedor, dentre eles pode se verificar a presença dos elementos magnésio e rubídio (para o fármaco em comprimido), os quais possuem referência na literatura por sua utilização medicamentosa no tratamento de epilepsia, os demais foram tratados aqui, como contaminantes do processamento industrial do fármaco;

- Na análise de tensão superficial observou-se uma diminuição na hidrofobicidade da membrana para todas as variações estudadas sem grande variação de ângulo entre elas. Todas as membranas estudadas neste trabalho apresentaram aspecto hidrofílico.
- O ensaio de biodegradação *in vitro* demonstrou que as membranas nas variações de 1 e 3 % para a fenitoína líquida e ½ e ¼ comprimido degradaram-se completamente no período de 7 dias, o que corrobora com os resultados apresentados pela análise de DRX que apresentaram membranas, nestas proporções, mais amorfas. As membranas com variações de 5 % do fármaco líquido e 1 comprimido degradaram-se quase que completamente no período de 14 dias, essa resistência a degradação pode estar relacionada ao aspecto cristalino adquirido pela membrana quando está possui fármaco nessas concentrações incorporado, o que nos permite concluir que a biodegradação das membranas é inversamente proporcional a concentração do fármaco. A biodegradação ocorreu principalmente pela presença da lisozima, ou seja, a degradação pela solução de PBS foi ínfima;
- A técnica de Calorimetria Exploratória Diferencial demonstrou uma não alteração na resistência térmica do material oriunda da variação de concentração do fármaco nas proporções analisadas neste trabalho;
- Todas as membranas em todas as concentrações de fármaco não apresentaram toxicidade.

Diante do exposto pode-se concluir que a metodologia empregada para a síntese das membranas Quitosana/ Fenitoína apresentou-se eficaz. As análises sugeriram que o fármaco realmente foi incorporado a solução para síntese da membrana.

O estudo realizado com a variação de pH demonstrou que para concentrações de 5 % da fenitoína líquida e 1 comprimido para a fenitoína em pó observa-se alterações na estrutura quando submetidas a meios com pH de 7,01, não reagindo da mesma forma quando submetido ao meio ácido e alcalino, o que nos proporciona um parâmetro relacionado a variação de estrutura para futura aplicação como detector de níveis séricos de fenitoína em pacientes.

REFERÊNCIAS

- ANDRIOLO A; Germek O. A.; Pereira A. B. -- Determinação simultânea de quatro anticonvulsivantes por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), Arquivos de neuro-psiquiatria, v. 48 n.3, 1984.
- Albuquerque, M.; Scorza, C. A.; Arida, R. M.; Scorza, F. A., Serum Magnesium: A Clinical Biomarker for Sudden Unexpected Death in Epilepsy?, UNIFESP/EPM, 2011.
- AYALA, G. G.; MALINCONICO, M.; LAURIENZO, P.; Molecules, n.13, p. 2069, 2008.
- AZEVEDO V. V. C. et al; Quitina e quitosana: aplicações com biomateriais – Revista eletrônica de materiais e processos v.2.3, p. 27-34 (2007)
- BEPPU, M.M., ARRUDA, E. J., SANTANA C. C. Síntese e Caracterização de Estruturas Densas e Porosas de Quitosana. Polímeros: Ciência e Tecnologia-Out/Dez-99
- BIANCO, G.; NONATO, B. Roteiro de aulas práticas. Universidade Federal do Espírito Santo, 2011
- COSTA, Jaderson Costa da; PALMINI, André; YACUBIAN, Elza Márcia Targas; CAVALHEIRO, Esper A. Fundamentos Neurobiológicos Das Epilepsias. p. 3-14. São Paulo. Editora Lemos1998.
- CUKIERT, ARTHUR. Tratamento Clínico e Cirúrgico das Epilepsias de Difícil Controle. São Paulo. Lemos Editorial. 2002.
- EMBUSCASO, M. E., HUBER, K. C., Edible Filmes and Coatings for Food Applications, Dordrecht; London, Springer, 2009
- FIDÉLES, T.B. Filmes reticulados de quitosana para aplicação como biomaterial. 2010. 72f. Dissertação (Mestrado) - Programa de pós-graduação em Ciência e engenharia de Materiais. Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2010.
- FOOK, M.V.L. Desenvolvimento da técnica de deposição de hidroxiapatita na superfície de polietileno de ultra-peso molecular para aplicação como biomaterial. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 128 f, 2005.
- GUERREIRO, Carlos A. M. Journal Of Epilepsy And Clinical Neurophysiology. vol.12, n.1 suppl.1 Porto Alegre. Mar. 2006.
- HENCH, 1998; RAVI KUMAR, 2000; KOIDE, 1998; HENCH e ETHRIDGE, 1982; MUZZARELLI, 1997).

IBARRA, M.; VÁSQUEZ, Marta; FAGIOLINO, P; MUTILVA, F.; CANALE, A.. Total, Unbound Plasma and Salivary Phenytoin Levels in Critically Ill Patients. *J Epilepsy Clin Neurophysiol* 2010;16(2): p 69-73

KNOBEL Elias. *Terapia Intensiva: Neurologia*. São Paulo Atheneu, 2002.

KONRATH, E. L.; PIEDADE, M.; LIMA, V. L. E, Síntese da fenitoína assistida por micro-ondas: proposta de aula prática para alunos de graduação, Departamento de Produção de Matéria-Prima, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

MARINO Jr. R., CUKIERT, A., PINHO E., ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA EPILEPSIA EM SÃO PAULO UM ESTUDO DA PREVALÊNCIA

MARTÍN-CALDERON J.L.; Varona J.; Espina L.M., (2001) Monitorización de niveles plasmáticos de fenitoína; *Revista de diagnóstico biológico*, v 50 n 2: Madrid 2001.

Ministério da Saúde- Secretaria de Atenção à Saúde
PORTARIA SAS/MS Nº 492, DE 23 DE SETEMBRO DE 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, *J. Immunol. Methods*, vol.65, p. 55-63, 1983.

NICHOLSON, J. W. *The Chemical of Medical and Dental Materials*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2002, p.250

ORÉFICE, R.L.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, H.S. *Biomateriais: fundamentos e aplicações*. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2006.

PARK, J. B. & LAKES, R. S. - "Biomaterials an introduction", Plenum Press, New York, 1992.

PARK, J. B.; BRONZINO, J. D. *Biomaterials: Principles and application*. New York: CRC Press. 2003, p.264.

PICCOLI, R., et al. Características das principais técnicas analíticas aplicadas à caracterização dos materiais. Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciências Dos Materiais, Foz do Iguaçu, p.289-300, 15-19 nov. 2006

PIEDRAS, Ana Luisa Robles -- Niveles plasmáticos de fenitoína y farmacocinética de Michaelis-Menten en población pediátrica mexicana: *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*: México: v 38, n 2, 2007

PONCIANO, J. J. In: Desenvolvimento de membranas bioabsorvíveis com variado nível de orientação molecular para aplicação como biomaterial. 2010. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciência e Tecnologia. Campina Grande, 2010.

RAVICHANDRAN, R. Auxiliary Information, USP29-NF24, p. 1720, 2011.

ROMANAZZI, G., GABLER, F. M., MARGOSAN D., MACKEY, B. E. & SMILANICK, J. L., Effect of Chitosan Dissolved in Different Acids on Its Ability to Control Postharvest Gray Mold of Table Grape. *Phytopathology*, vol. 99, p. 1028-1036, 2009.

SANTOS, C., Propriedades de Filmes de Quitosana – Influência do grau de acetilação e da massa molecular do bipolímero. Tese de Mestrado. Universidade de Aveiro, 2006

SPINACÉ, Márcia Aparecida da Silva; DE PAOLI, Marco Aurélio. *Quim. Nova*, Vol. 28, No. 1, 65-72, 2005. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13084-971 Campinas – SP. publicado na web em 12/11/2004.

WISNIEWSKI, A.; ARGUELHO, M. L. Manual de Instruções e Roteiros de Experimentos. Laboratório de Química. Universidade Federal de Sergipe, 2011.

YACUBIAN Elza Márcia Targas. Guia de Neurologia/Coordenação Paulo H. F. Bertolucci...[et.al].-Barueri, SP: Manole, 2011. part.4 cap.12

YACUBIAN, Elza Márcia Targas. Tratamento medicamentoso das epilepsias. São Paulo: Lemos Editorial, 2004.

WILLIAM, D. F. On the Mechanisms of Biocompatibility. *Biomaterials*. Elsevier, 2008, p. 2941-2953.