



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



DAYSE DE LOURDES MADRUGA ESPÍNOLA GUEDES

**FILME DE QUITOSANA PARA USO EM SISTEMA DE LIBERAÇÃO
CONTROLADA DE FUMARATO DE FORMOTEROL**

**CAMPINA GRANDE
DEZEMBRO/2014**

DAYSE DE LOURDES MADRUGA ESPÍNOLA GUEDES

**FILME DE QUITOSANA PARA USO EM SISTEMA DE LIBERAÇÃO
CONTROLADA DE FUMARATO DE FORMOTEROL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande, Área de Concentração: Materiais Avançados, como requisito à Obtenção do título de mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook

CAMPINA GRANDE

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

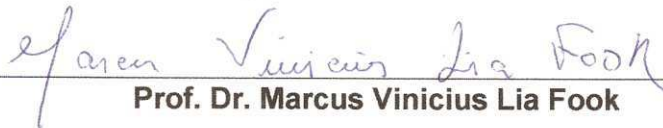
- G924f Guedes, Dayse de Lourdes Madruga Espínola.
Filme de quitosana para uso em sistema de liberação controlada de fumarato de formoterol / Dayse de Lourdes Madruga Espínola Guedes. – Campina Grande, 2014.
66 f. : color.
- Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2014.
- "Orientação: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook".
Referências.
1. Quitosana. 2. Asma. 3. Fumarato de Formoterol. 4. Controle de Crise. 5. Broncodilatador. I. Fook, Marcus Vinicius Lia, II. Título.

CDU 677.473(043)

**FILME DE QUITOSANA PARA USO EM SISTEMA DE LIBERAÇÃO
CONTROLADA DE FUMARATO DE FORMOTEROL**

DAYSE DE LOURDES MADRUGA ESPÍNOLA GUEDES

Dissertação Aprovada em 12/12/2014 pela banca examinadora constituída dos
seguintes membros:



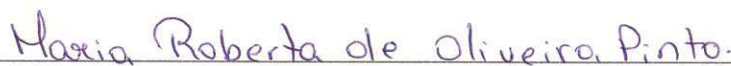
Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook

Orientador - UFCG



Prof. Dr. Rossemberg Cardoso Barbosa

Examinador Interno – CCT/UFCG



Prof. Dr.ª Maria Roberta de Oliveira Pinto

Examinadora Externa – CCT/UEPB

Dedico este trabalho ao meu esposo e aos meus filhos que souberam entender minhas horas de ausência e sabiamente incentivaram-me dando-me apoio constante.

“A aprendizagem se realiza através da conduta ativa do aluno, que aprende mediante o que ele faz e não o que faz o professor”.

(Ralph .W. Tyler)

AGRADECIMENTOS :

A Deus que em todos os dias da minha vida me dá forças para nunca desistir.

Ao CERTBIO Laboratório de Avaliação e desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste, pelo apoio à minha participação no mestrado.

A AMPb Associação Médica da Paraíba , que permitiu o convênio com a UFCG, Universidade Federal de Campina Grande ,sem o qual seria impossível a realização do mestrado .

Ao meu orientador o Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook , por seu apoio, amizade, dedicação e competência, fatores fundamentais para a conclusão deste trabalho

A todos os professores do mestrado que ministraram suas aulas com paciência e dedicação.

Ao amigo e consultor Paulo Adolfo Barbosa Freitas, que com suas orientações e correções permitiu a conclusão deste trabalho.

A todos os colegas da turma do mestrado, pelo companheirismo que tiveram desde o início dessa jornada.

Aos familiares e amigos que sempre me incentivaram e apoiaram nessa caminhada.

RESUMO

A presente pesquisa tem como objetivo, caracterizar filmes de quitosana, de aplicação sublingual, para uso em sistemas de liberação controlada de fumarato de formoterol., buscando uma nova alternativa para o tratamento emergencial das crises de asma. Sabemos que a asma é uma patologia de grande incidência no Brasil e no mundo, pois existem cerca de 300 milhões de pessoas acometidas pela doença a nível mundial e 20 milhões de brasileiros .É uma doença de caráter hereditário, crônica que não tem cura e que se apresenta muitas vezes como uma emergência médica , pois nas crises da doença o socorro deve ser imediato com o intuito de evitar o óbito do paciente. Hoje utiliza-se apenas a via inalatória como preferencial para administração dos broncodilatadores, visto que essa via tem rapidez de ação. No entanto, deparamo-nos com a difícil técnica de utilização dos inaladores que veiculam o medicamento o que muitas vezes impossibilita a sua utilização especialmente em crianças, idosos e pacientes muito debilitados. Vendo esta dificuldade, propusemos com o nosso trabalho buscar uma nova via de utilização dos medicamentos broncodilatadores, que tivesse a mesma eficácia da via inalatória, dispensando a difícil técnica de utilização dos fármacos .Para isso , escolhemos a via sublingual de rápida ação e facilidade de utilização, podendo ser empregada mais adequadamente em uma crise de asma . Selecionamos a quitosana, por ser um biopolímero versátil e muito utilizado em sistema de liberação controlada de fármaco para veicular o formoterol , que é um potente broncodilatador, através da produção de um filme para deposição sublingual. E os resultados obtidos através das caracterizações apresentaram membranas com variações de cristalinidade (por DRX) de acordo com o processo de reticulação, além de apresentarem uma possível relação entre reticulação e liberação. Por FTIR pode-se observar certa interação entre o fármaco e os grupos amina da quitosana, assim como possível isomerização do fármaco pela reticulação com 5% de TPP. Pelas microscopias ótica e eletrônica, pode-se observar que o acréscimo de fármaco proporcionou alguma rugosidade a membrana. Também pelas microscopias verificou-se a reticulação não homogênea da superfície da membrana. Por EDS não se verificou nenhum elemento estranho a estrutura da quitosana e do fármaco. Por medida do ângulo de molhabilidade pode-se verificar aumento do perfil hidrofílico da membrana por adição do fármaco, perfil este que não foi modificado pelo processo de reticulação. O ensaio de citotoxicidade apresentou resultados que indicam a membrana como promissora candidata a testes *in vivo*.

Palavras-chave: Asma. Quitosana. Fumarato de Formoterol. Controle de Crise. Filmes. Sublingual. Broncodilatador.

ABSTRACT

This research aims to characterize chitosan films, sublingual application, for use in controlled release of formoterol fumarate systems., Looking for a new alternative for the emergency treatment of asthma attacks. We know that asthma is a disease of high incidence in Brazil and in the world, because we have about 300milhões of people with the disease worldwide and 20 million Brazilians .It is one hereditary disease, chronic that has no cure and that often presents as a medical emergency, because the crisis of the disease the relief should be immediate in order to prevent the death of the patient. Today only is used inhalation as preferred for administration of bronchodilators, since this route has faster action .In entando, we are faced with the difficult technique for using inhalers that deliver the medicine which often makes it impossible to use especially in children, the elderly and very debilitados patients. Buy this difficulty, we proposed in our work to seek a new route for the use of bronchodilators, which had the same effectiveness of inhaled, eliminating the difficult technique of using drugs .For this, choose the sublingual route of fast action and ease of use and can be used more appropriately in an asthma attack. Chitosan selected because it is a versatile and widely used biopolymer for controlled drug delivery system for conveying formoterol, which is a potent bronchodilator, by producing a film for sublingual deposition. And the results obtained from the characterization showed membranes crystallinity variations (XRD) according to the crosslinking process, besides presenting a possible relationship between cross-linking and release. By FTIR one can observe some interaction between the drug and amino groups of chitosan, and can isomerization of drug by crosslinking with 5% TPP. Through optical and electronic microscopy, it can be seen that addition of drug has provided some roughness to the membrane. Also by microscopy verified the inhomogeneous crosslinking of the membrane surface. EDS there was no foreign object the structure of chitosan and the drug. By measuring the wetting angle can be checked increase the hydrophilic profile of the membrane by addition of the drug, this profile has not been modified by crosslinking process. The cytotoxicity assay results presented indicate that the membrane as a promising candidate for in vivo testing.

Key words: Asthma. Chitosan. Formoterol Fumarate. Crisis Control. Films. Sublingual. Bronchodilator.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 01 | Esquema do processo da respiração..... | 17 |
| Figura 02 | Processo inflamatório na asma..... | 20 |
| Figura 03 | Remodelamento brônquico..... | 21 |
| Figura 04 | Estrutura química da quitina e da quitosana..... | 27 |
| Figura 05 | Interação iônica entre a quitosana e o TPP..... | 29 |
| Figura 06 | 1 Comparação ilustrativa das variações de fármacos administrados por métodos convencionais de multidosagem..... | 30 |
| Figura 07 | Estrutura química do formoterol..... | 35 |
| Figura 08 | 2Fluxograma da metodologia aplicada..... | 38 |
| Figura 09 | Difração de Rx das membranas de quitosana e do conteúdo da cápsula de Fumarato de formoterol..... | 43 |
| Figura 10 | Difratograma de DRx das membranas de quitosana/FF padrão (conteúdo do comprimido)..... | 44 |
| Figura 11 | Espectograma de FTIR da membrana de quitosana e do Fumarato de Formoterol (conteúdo do comprimido)..... | 45 |
| Figura 12 | Espectros de FTIR das membranas de quitosana/FF sem e com reticulação..... | 47 |
| Figura 13 | Microscopia Óptica da membrana de quitosana nos aumentos de a)350x e b) 1050x..... | 48 |
| Figura 14 | Microscopia Óptica da membrana de quitosana/FF sem reticulação, nos aumentos de a) 350x e b) 1050x..... | 49 |
| Figura 15 | 3Microscopia Óptica da membrana/FF reticulada com solução de 1 % de TPP nos aumentos de a) 350x e b) 1050x..... | 49 |
| Figura 16 | Microscopia Óptica da membrana/FF reticulada com solução de 2,5 % de TPP nos aumentos de a) 350x e b) 1050x..... | 50 |
| Figura 17 | 4Microscopia Óptica da membrana/FF reticulada com solução de 5 % de TPP nos aumentos de a) 350x e b) 1050x..... | 50 |
| Figura 18 | MEV da membrana de quitosana pura nos aumentos de a) 1000x e b) 3000x..... | 51 |
| Figura 19 | 5 MEV da membrana de quitosana/FF nos aumentos de a) 1000x e b) 3000x..... | 51 |

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 20 | MEV da membrana de quitosana/FF reticulada com solução de 1% de TPP nos aumentos de a) 1000x e b) 3000x..... | 52 |
| Figura 21 | 6 MEV da membrana de quitosana/FF reticulada com solução de 1% de TPP nos aumentos de a) 1000x e b) 3000x..... | 53 |
| Figura 22 | MEV da membrana de quitosana/FF reticulada com solução de 5% de TPP nos aumentos de a) 1000x e b) 3000x..... | 53 |
| Figura 23 | EDS das membranas de a) quitosana/FF sem reticulação, b) quitosana/FF reticulada com solução de 1% de TPP, c) quitosana/FF reticulada com solução de 2,5% de TPP e d) quitosana/FF reticulada com solução 5% de TPP..... | 54 |
| Figura 24 | Resultados do Ensaio de Tensão Superficial das membranas de quitosana e quitosana/FF, com e sem reticulação..... | 55 |
| Figura 26 | Resultados do Ensaio de Citotoxicidade das membranas de quitosana e quitosana/FF..... | 56 |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 | OBJETIVOS | 16 |
| 2.1 | Geral | 16 |
| 2.2 | Específicos | 16 |
| 3 | REVISÃO DA LITERATURA | 17 |
| 3.1 | Sistema Respiratória..... | 17 |
| 3.2 | Dispnéia | 18 |
| 3.3 | Asma Brônquica | 19 |
| 3.4 | Biomateriais | 24 |
| 3.5 | Quitosana | 26 |
| 3.5.1 | Reticulação da Quitosana | 28 |
| 3.6 | Liberção controlada de fármaco | 29 |
| 3.6.1 | Sistema de Liberção Controlada de Fármaco | 31 |
| 3.6.2 | Via sublingual de administração de fármacos | 32 |
| 3.7 | Fumarato de Formoteroldihidratado (formoterol) | 33 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 37 |
| 4.1 | Local da Pesquisa | 37 |
| 4.2 | Materiais | 37 |
| 4.3 | Métodos | 37 |
| 4.3.1 | Preparação da solução e membrana de quitosana..... | 38 |
| 4.3.2 | Preparação da solução e membrana de quitosana/FF | 38 |
| 4.3.3 | Reticulação das membrana de quitosana e quitosana/FF em TPP . | 39 |
| 4.3.4 | Caracterizações | 39 |
| 4.3.4.1 | <i>Difração de Raios X (DRX)</i> | 39 |
| 4.3.4.2 | <i>Espectroscopia da Região de infravermelho com Transformada de Fourie (FTIR)</i> | 40 |
| 4.3.4.3 | <i>Microscopia Óptica (MO)</i> | 40 |
| 4.3.4.4 | <i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i> | 40 |
| 4.3.4.5 | <i>Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDS)</i> | 40 |
| 4.3.4.6 | <i>Molhabilidade de Ângulo de Contato</i> | 41 |
| 4.3.4.7 | <i>Ensaio de Liberção Controlada de Fármaco</i> | 41 |
| 4.3.4.8 | <i>Ensaio de Citotoxicidade</i> | 42 |

| | | |
|-----|---|----|
| 5/ | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 43 |
| 5.1 | Difração de Raios X (DRX) | 43 |
| 5.2 | Espectroscopia da Região de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) | 45 |
| 5.3 | Microscopia Óptica (MO) | 48 |
| 5.4 | Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) | 51 |
| 5.5 | Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDS) | 54 |
| 5.6 | Molhabilidade de Ângulo de Contato | 55 |
| 5.7 | Ensaio de Citotoxicidade | 56 |
| 6 | CONCLUSÃO | 57 |
| | REFERÊNCIAS | 58 |

LISTA DE ABREVIATURAS

CVF – Capacidade Vital Forçada

CERTBIO – Laboratório de Avaliação e desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste.

DRX – Difração de Raios X

DIU'S – Dispositivos intra uterino

EDS – Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X

FTIR – Espectroscopia na região de infravermelho com transformada de Fourier

FF- Fumarato de Formoterol

IGE – Imunoglobulina E

MEV- Microscopia Eletrônica de Varredura

MO – Microscopia Óptica

MTT – brometo de 3(4,5 dimetiltiazol) 2,5 difenil tetrazólio

PH – Potencial hidrogênio iônico

TPP – Tripolifosfato

TGI – Trato Gastro Intestinal

SLC – Sistema de Liberação controlada

VEF1 – Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo

1 Introdução

A evolução da humanidade permitiu avaliar as grandes modificações tecnológicas e científicas sofridas no decorrer dos séculos. Com um olhar retrospectivo vimos que muitos pesquisadores dedicaram o seu aprendizado à busca de materiais com características adequadas para a restauração ou substituição de tecidos ou de órgãos no corpo humano. No entanto, a dificuldade de utilização exclusiva de materiais biológicos levou aos avanços em pesquisas, com o objetivo de desenvolver um material que pudesse substituir, os tecidos e órgãos danificados. E assim, efetua-se a utilização em grande escala dos biomateriais.

Biomateriais são qualquer substância ou associação de substâncias, com exceção de drogas, de origem natural ou sintética, que podem ser usados por qualquer período de tempo, que aumenta ou substitui, parcial ou totalmente, qualquer tecido, órgão ou função do corpo, a fim de manter ou melhorar a qualidade de vida do indivíduo (BERGMAN et al, 2013)

Dentre os biomateriais temos os biomateriais poliméricos e, dentre eles um biopolímero específico, denominado quitosana, biopolímero este que se apresenta como um novo biomaterial com grandes aplicações médicas e um vasto campo de pesquisa (THANOU et. al, 2001). Vários biopolímeros vêm sendo estudados e utilizados nos sistemas de liberação controlada de fármacos, com o intuito de liberá-los efetivamente no alvo pretendido e, dessa maneira, aumentar os benefícios terapêuticos do tratamento (OLIVEIRA et al, 2006).

A liberação controlada de fármacos a partir de uma matriz polimérica tem atraído grande atenção científica, especialmente, devido a sua capacidade terapêutica concernente à diminuição de efeitos colaterais dos fármacos, proteção de fármacos degradáveis no trato gastrointestinal, como peptídeos, proteínas e hormônios, aumentando a biodisponibilidade dos mesmos (SCHAFFAZICK et al, 2003).

Isto nos mostra a potencialidade da utilização de biomateriais poliméricos veiculando fármacos com liberação controlada, em especial nas doenças pulmonares crônicas, onde destacamos a asma brônquica que por sua incidência, cerca de 300 milhões de asmáticos no mundo e 20 milhões no Brasil

(GINA,2011), leva-nos a buscar a utilização de um tratamento de eficácia com a menor incidência de efeitos colaterais.

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas que acomete adultos e crianças e vem sendo o grande desafio da sociedade médica mantê-la dentro do controle com a menor dose terapêutica possível dos fármacos empregados e com menores efeitos colaterais, aumentando a qualidade de vida dos pacientes portadores da doença. (IV DIRETRIZES BRASILEIRAS PARA O MANEJO DA ASMA, 2006).

O tratamento medicamentoso da asma é baseado na utilização de broncodilatadores e corticóides inalatórios administrados através de aerossóis dosimetrados ou inaladores que demandam técnica de utilização adequada e manuseio correto para o melhor aproveitamento da medicação, o que muitas vezes impossibilita o uso destas medicações em idosos com dificuldade de coordenação motora e crianças de tenra idade. (IV DIRETRIZES BRASILEIRAS PARA O MANEJO DA ASMA, 2006).

Em 2005 o fumarato de formoterol, um broncodilatador de ação prolongada, passou a ser utilizado como droga de resgate, para o tratamento das crises de exacerbações da asma, por ser um medicamento potente, com rápido início de ação e efetivo no alívio dos sintomas e que promove relaxamento do músculo brônquico e que apresenta ação antiinflamatória (FILHO, 2012).

A Asma é um grande problema de saúde pública e é caracterizada por ser uma doença inflamatória crônica, associada a hiper-reatividade brônquica. A inflamação crônica na asma pode levar a mudanças ultraestruturais nas vias aéreas. Essas mudanças não são completamente revertidas pelas estratégias terapêuticas atuais disponíveis. Entretanto, apesar dos avanços terapêuticos e utilização correta da medicação, ainda é comum encontrar-se pacientes que sofrem com as crises de exacerbações frequentes da doença, o que preocupa a todos os pneumologistas, por possibilitar o aparecimento de processo inflamatório crônico na mucosa brônquica destes pacientes levando-os ao remodelamento brônquico e ao agravamento da asma (KROEGEL, 2009).

Baseado no exposto, este trabalho propõe-se a desenvolver um novo sistema de administração do fumarato de formoterol, para ser usado pela via sublingual, incorporando-o a um sistema de liberação controlada de filme de

quitosana, o que levaria o tratamento a uma maior eficácia no tratamento das exacerbações das crises de asma, especialmente nos idosos, porque dispensaria técnicas elaboradas na administração e ofereceria mais rapidez no alívio imediato dos sintomas com maior segurança.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Produzir filmes de quitosana, de aplicação sublingual, para uso em sistema de liberação controlada de fumarato de formoterol.

2.2 Específicos

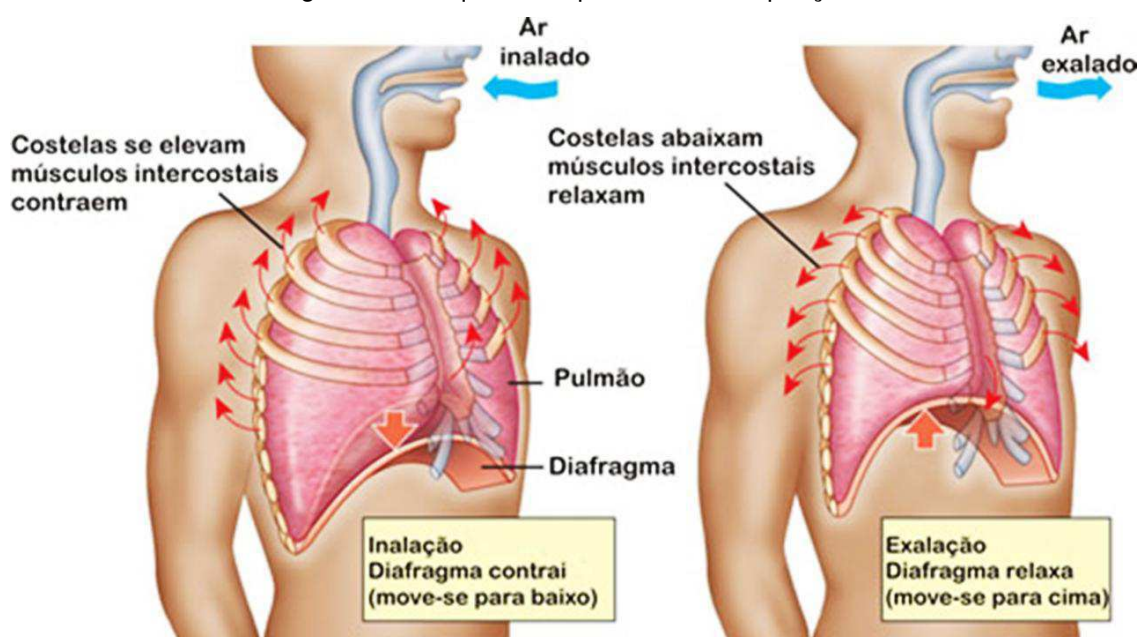
- Estabelecer as variáveis de processamento para obtenção de filmes de quitosana para o uso em sistema de liberação controlada de fármaco;
- Identificar as variáveis via reticulação química para controlar a taxa de liberação do fármaco;
- Avaliar físico-quimicamente a incorporação do fumarato de formoterol nos filmes de quitosana;

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Sistema Respiratório

A respiração é um processo pelo qual um organismo vivo troca oxigênio e dióxido de carbono com o ambiente no qual encontra-se inserido. Esse processo pode ser visto na Figura 01.

Figura 01 – Esquema do processo de respiração.



Fonte – Adaptado de Montenegro, (2001).

O ato respiratório é vital para o homem, graças a ele o oxigênio alcança os tecidos orgânicos e o dióxido de carbono se elimina do organismo (BETHLEN,1984).

O sistema respiratório é um sistema condutor, formado pelas vias aéreas superiores e inferiores. As superiores representadas por naso faringe e laringe, as inferiores representadas pela traquéia, brônquios, bronquíolos e alvéolos. É nos alvéolos onde ocorre as trocas gasosas (SILVA, 2006).

A principal função da respiração é a manutenção da homeostase, ou seja, promover a troca gasosa de maneira que oxigênio do sangue arterial, dióxido de carbono e níveis de PH permaneçam dentro dos limites normais em diferentes condições fisiológicas (GUYTON et. al, 2010). A atividade motora respiratória

emana de grupos de neurônios localizados no bulbo. As descargas respiratórias eferentes ativam os músculos respiratórios que expandem a caixa torácica, inflam os pulmões e levam à ventilação (MARTINEZ et. al , 2000).

A mecânica da respiração está diretamente relacionada com as forças da musculatura respiratória necessárias para vencer a resistência das vias aéreas, bem como a retenção elástica pulmonar e da caixa torácica. Assim o mecanismo da ventilação está associado com a complacência pulmonar e torácica, ou seja, com a capacidade de expansão pulmonar. Esta capacidade de expansão, portanto, deve-se ao movimento do diafragma para aumentar ou diminuir a capacidade torácica e da elevação e depressão das costelas para aumentar ou diminuir o diâmetro ântero-posterior da caixa torácica (WEST, 1996).

Os músculos respiratórios formam um sistema orgânico que atua funcionalmente como uma bomba, promovendo o deslocamento do ar para dentro e para fora das unidades de trocas gasosas dos pulmões, de forma coordenada e rítmica (WOLFSON et. al, 2003). Sendo assim, podemos dividir a respiração em 04 funções principais: 1 – ventilação pulmonar que significa o influxo e efluxo de ar entre a atmosfera e os alvéolos pulmonares, 2 – difusão do oxigênio e do dióxido de carbono entre os alvéolos e o sangue, 3 – transporte de oxigênio e dióxido de carbono no sangue e líquidos corporais e suas trocas com as células do todos os tecidos do corpo, 4 – regulação da ventilação pulmonar (GUYTON et. al, 2010). .

A dificuldade na manutenção desta dinâmica respiratória ocasiona a dispnéia (GUYTON et. al, 2010).

3.2 Dispnéia

A atividade motora respiratória emana de um grupo de neurônios, localizados no bulbo. As descargas respiratórias eferentes ativam os músculos respiratórios, que expandem a caixa torácica, inflam os pulmões e levam à ventilação. Quimiorreceptores localizados nos vasos e cérebro, bem como mecanorreceptores, localizados nas vias aéreas, pulmões, caixa torácica e músculos respiratórios estão envolvidos na regulação automática da respiração e parece desempenhar um papel em promover as sensações de dispnéia. A

sensação de dispnéia parece surgir pela ativação de sistemas sensoriais, envolvidos com a respiração. (MANNING, SCHWARTZSTEIN, 1995)

A palavra dispneia origina-se das raízes gregas “dys” e “pneia”, podendo ser traduzida como respiração difícil (CURLEY et. al, 1997). De acordo com um painel de especialistas reunidos pela American Thoracic Society, para discutir o tema, dispneia passou a ser definida como um termo usado para caracterizar a experiência subjetiva de desconforto respiratório que consiste de sensações qualitativamente distintas, variáveis em sua intensidade. A experiência deriva de interações entre múltiplos fatores fisiológicos, psicológicos, sociais e ambientais, podendo induzir respostas comportamentais e fisiológicas secundárias (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 1999).

A dispnéia é uma queixa comum em consultórios médicos, tendo sido relatada a sua ocorrência em até 20% da população geral. Além de sua presença associar-se a um aumento acentuado da mortalidade, esse sintoma está relacionado com grande morbidade e grave limitação para o desenvolvimento de atividades físicas e sociais (CURLEY et. al, 1997). Hoje, esta dificuldade respiratória, constitui-se o principal fator limitante da qualidade de vida, principalmente nos pacientes portadores de doenças respiratórias crônicas, como a Asma Brônquica (IV DIRETRIZES BRASILEIRAS PARA O MANEJO DA ASMA, 2006).

3.3 Asma Brônquica

A asma é uma doença inflamatória crônica caracterizada por hiperresponsividade das vias aéreas inferiores e por limitação variável ao fluxo aéreo, manifestando-se clinicamente por episódios recorrentes de dispneia, sibilância, aperto no peito e tosse, particularmente à noite e pela manhã ao despertar. Resulta de uma interação genética, exposição ambiental a alérgenos e irritantes e outros fatores específicos que levam ao desenvolvimento e manutenção dos sintomas (BUSSE et. al, 2001).

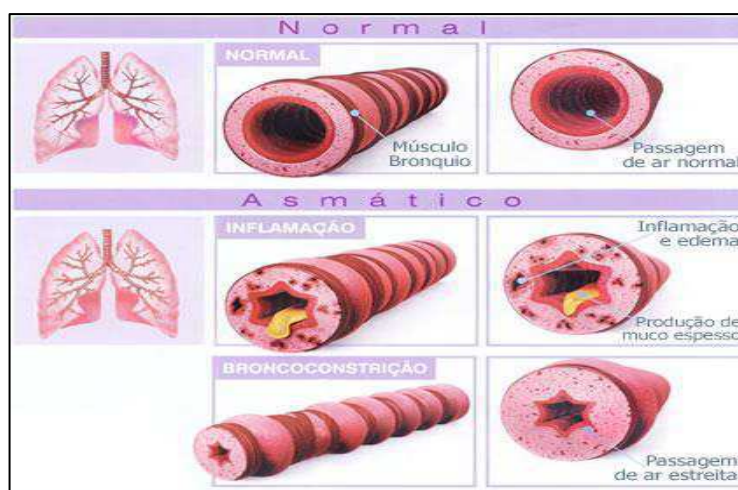
Atualmente ocorrem cerca de 350 mil internações por Asma no Brasil, constituindo-se ela na quarta causa de hospitalização pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e sendo a terceira causa entre crianças e adultos jovens (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Um estudo multicêntrico (Internacional Study for

Asthma and allergies in childhood – ISSAC) apontou ser a prevalência média mundial de asma de 11,6% em escolares oscilando entre 2,4% e 37,6% (ISSAC,1998). A mortalidade ainda é baixa, mas apresenta magnitude crescente em diversos países e regiões. Nos países em desenvolvimento a mortalidade vem aumentando nos últimos dez anos, correspondendo a 5% a 10% das mortes por causa respiratória, com elevadas proporções de óbitos domiciliares. No Brasil a taxa de mortalidade por asma no ano 2000 foi de 2,29/100000 habitantes. Nesse ano, os custos do SUS com internações por Asma, foram de 96 milhões de reais, o que correspondem a 1,4% do gasto total anual com todas as doenças (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

A principal característica fisiopatogênica da Asma é a inflamação brônquica. Ela está presente em todos os pacientes asmáticos. Existem vários agentes inflamatórios envolvidos: citocinas, histamina, leucotrienos, triptase, prostaglandinas, fator de necrose tumoral, interleucinas e outros; que causam lesões e alterações na integridade epitelial, alteram o tônus da via aérea, promovem hipersecreção de muco e aumentam a reatividade do músculo liso da via aérea (BOUSQUET et. al, 1990).

A resposta inflamatória alérgica é iniciada pela interação de alérgenos ambientais com algumas células que têm como função apresentá-los ao sistema imunológico, mais especificamente os linfócitos Th2. Estes por sua vez, produzem citocinas responsáveis pelo início e manutenção do processo inflamatório da asma (KUMAR, 2001).

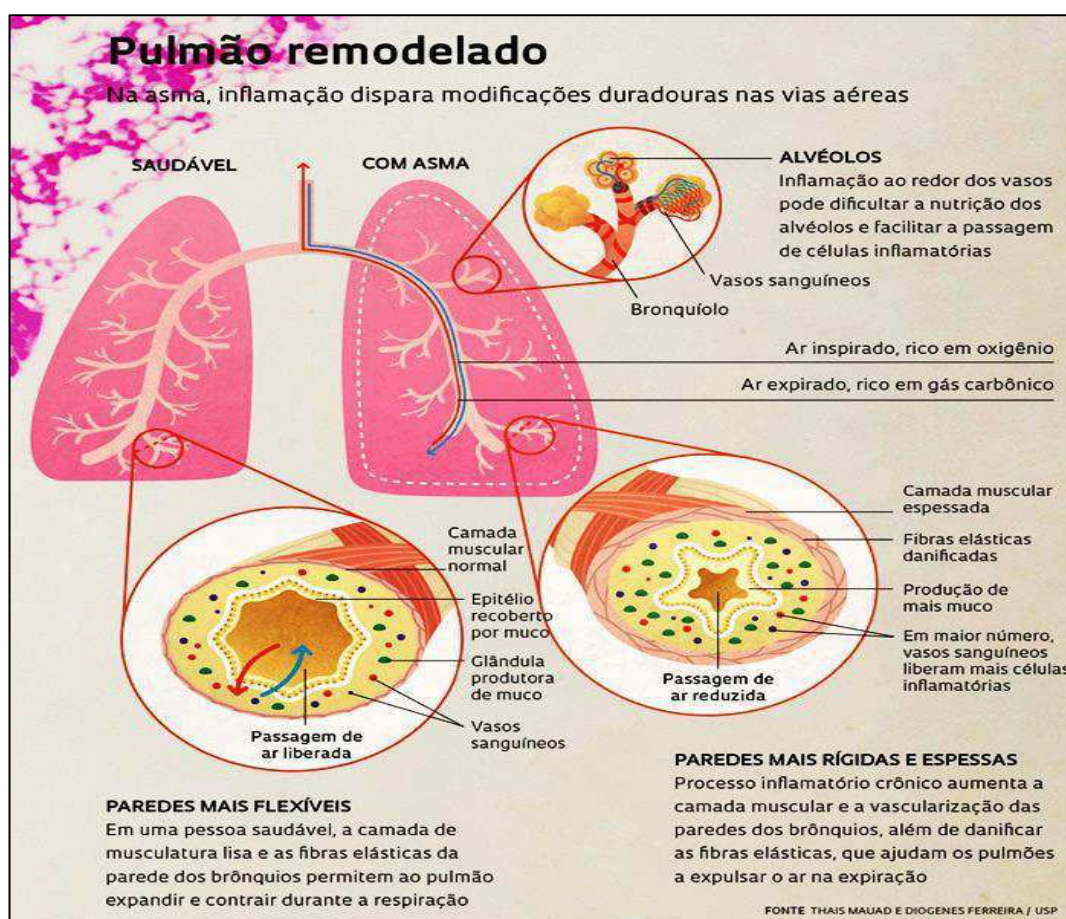
Figura 2- Processo inflamatório na asma.



Fonte - Netter, (2007).

A manutenção desse processo inflamatório de forma contínua, o que ocorre quando o paciente não é tratado adequadamente ou quando apresentam crises de exacerbações frequentes da doença, acarreta hipertrofia e hiperplasia do músculo liso, elevação do número de células calciformes, aumento das glândulas submucosas e alterações no depósito e degradação dos componentes da matriz extracelular que são constituintes do remodelamento brônquico, Figura 3, interferindo na arquitetura da via aérea, levando à irreversibilidade da obstrução e o agravamento da doença (IV DIRETRIZES BRASILEIRAS PARA O MANEJO DA ASMA, 2006).

Figura 3 - Remodelamento brônquico.



Fonte: MAUAD et. al, 2012

O diagnóstico da asma deve ser baseado na história clínica, no exame clínico do paciente, e sempre que possível nas provas de função pulmonar e avaliação da alergia. São indicativos da doença um ou mais dos sintomas de dispnéia, tosse crônica, sibilância, aperto no peito ou desconforto torácico, particularmente à noite ou nas primeiras horas da manhã, com melhora

espontânea ou pelo uso de medicações específicas tais como os broncodilatadores e antiinflamatórios corticosteróides. Ainda avaliamos a sazonalidade dos sintomas e periodicidade bem como a história familiar positiva para asma ou atopia (LEMANSKE, 2001).

O diagnóstico funcional da doença é fundamentado pela presença de sintomas característicos, sendo confirmado pela demonstração de limitação variável ao fluxo aéreo. As medidas da função pulmonar fornecem uma avaliação da gravidade da limitação ao fluxo aéreo, sua reversibilidade e variabilidade, além de confirmar o diagnóstico da doença. São indicativos de asma : obstrução das vias aéreas caracterizada por redução do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1), para abaixo de 80% do previsto e da sua relação com a capacidade vital forçada (CVF) para abaixo de 75% em adultos e 86% em crianças; obstrução ao fluxo aéreo que desaparece ou melhora significativamente após uso do broncodilatador (GINA, 2006).

O diagnóstico de alergia se dá através de histórico familiar, bem como a confirmação da sensibilização alérgica através de provas *in vivo* (testes cutâneos) ou *in vitro* (determinação da concentração sanguínea de IGE específica) (OPPENHEIMER, 2006).

O objetivo principal do manejo da asma é a obtenção do controle da doença. A classificação da gravidade tem como principal função a determinação da dose de medicamentos suficiente para que o paciente atinja o controle da doença no menor prazo possível. O tratamento deve ser iniciado de acordo com os critérios de gravidade (GINA, 2006).

Pelos critérios de gravidade, a asma pode ser classificada em: Asma intermitente, leve, moderada e grave. O uso dos broncodilatadores em associação aos corticóides inalatórios para o controle dos sintomas é a base do tratamento. (GINA, 2006). As crises da doença são consideradas emergências médicas e o tratamento deve ser instituído imediatamente. A causa de morte por asma é a asfixia na quase totalidade dos casos. O tratamento excessivo é causa rara, por isso é importante identificar os seguintes aspectos que indicam maior risco para os pacientes: crise grave prévia com necessidade de ventilação mecânica ou internação em unidade de terapia intensiva, três ou mais visitas à emergência ou duas ou mais hospitalizações por asma em um ano, uso frequente de corticoide oral, falta de aderência ao tratamento, não acompanhamento adequado da

doença .O socorro adequado e em tempo hábil , e o conhecimento dos fatores de risco de gravidade evitam as complicações da doença (TURNER, 1998).

A partir de 2005, passou-se a utilizar o formoterol, um broncodilatador de longa duração como droga de resgate. Trata-se de uma droga potente, com rápido início de ação, efetiva no alívio dos sintomas e no relaxamento do músculo brônquico e que representa ação anti-inflamatória, com importante efeito inibidor sobre os mastócitos e neutrófilos (FILHO, 2012).

A adesão ao tratamento é essencial para um resultado melhor no controle da doença. Cerca de metade dos pacientes não aderem ao tratamento, que deve ser a longo prazo e no mínimo por três meses de utilização contínua da medicação. Esses fatores estão relacionados especialmente a má identificação dos sintomas e dos agentes desencadeantes, indicação incorreta dos broncodilatadores, falta de treinamento das técnicas inalatórias e de prescrição da medicação, interrupção da medicação sem orientação médica, uso incorreto da medicação inalatória, complexidade da terapêutica, suspensão por efeitos colaterais (DRAZEN et. al, 2000).

O tratamento atual é dirigido para controlar os sintomas e prevenir exacerbações. Alguns pacientes com asma grave podem desenvolver obstrução irreversível após muitos anos de atividade da doença (IV DIRETRIZES BRASILEIRAS PARA O MANEJO DA ASMA, 2006).

Por ser uma doença crônica, a asma pode causar consideráveis restrições físicas, emocionais e sociais. Essas limitações podem modificar profundamente a vida dos pacientes, interferindo drasticamente em suas realizações profissionais. As interferências são proporcionalmente maiores à medida que os sintomas não são adequadamente controlados. Além disso as próprias características da doença, com a ocorrência de exacerbações súbitas e inesperadas, mantém os doentes em constante estresse e insegurança , interferindo em sua qualidade de vida (II CONSENSO BRASILEIRO DE ASMA, 1999).

A história da asma é pontuada de períodos variáveis de melhora e piora dos sintomas, atribui-se a esse fato a falta de adesão ao tratamento, que é comum nas doenças crônicas .Esquemas de tratamentos complexos, medicações de alto custo , com técnica de utilização difícil e receio dos efeitos colaterais. Todos esses fatores contribuem para a crescente taxa de mortalidade apresentada pela doença (II CONSENSO BRASILEIRO DE ASMA, 1999).

A educação associada ao tratamento farmacológico constitui um dos pilares fundamentais do tratamento da asma. Ajuda o paciente e os familiares na aquisição de motivações, habilidades e confiança no tratamento, o que permite um impacto positivo na mudança ativa de comportamento frente à doença, e ajuda a estabelecer vida normal a essas pessoas (FERNANDES, 2000).

Muitos esforços veem sendo direcionados na produção de biomateriais capazes de tratar pacientes asmáticos, proporcionando melhor qualidade de vida aos acometidos por esta enfermidade (OLIVEIRA et al,2006).

3.4 Biomateriais

Biomaterial é um termo usado para indicar os materiais que constituem as peças de implantes médicos, dispositivos extracorporais, e descartáveis que têm sido utilizados em medicina, cirurgia, odontologia e medicina veterinária, bem como em todos os aspectos de saúde do paciente. O National Institutes of Health Consensus Development Conference define como um biomaterial "qualquer substância (que não seja uma droga) ou a combinação de substâncias, sintéticas ou de origem natural, que podem ser utilizados para qualquer período de tempo, como um todo ou como parte de um sistema que trata, aumenta, ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do corpo". O denominador comum de todas as definições que têm sido propostas para os biomateriais é o reconhecimento indiscutível que os biomateriais são distintos das outras classes de materiais por causa dos critérios de biocompatibilidade especiais que devem apresentar (BORETOS, ÉDEN, 1984).

A biocompatibilidade refere-se à 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 implantação no corpo. Além disso, um material que demonstre excelente biocompatibilidade, por exemplo quando em contato com o osso, necessariamente não mostraria biocompatibilidade quando aplicado em contato com o sangue. Deste modo, a localização dentro do corpo é uma etapa importante para determinar o quanto o material é biocompatível, assim

como a composição química do material (NICHOLSON,2002; FOOK ,2005; WILLIAMS,2008^a; WILLIAMS,2008^b)

Há enorme diversidade de biomateriais que se diferem pelo modo de aplicação, tempo de permanência em contato com os tecidos e o material utilizado para sua fabricação. A variedade de aplicações destes materiais compreende desde implantes dentários ou de articulações, como o joelho, placas e parafusos ortopédicos, até válvulas cardíacas, lentes de contato, DIU's, fios de sutura, enchimentos para cirurgia plástica e inúmeros outros (DANTAS et al, 2011).

O desenvolvimento dos biomateriais usados em dispositivos médicos tem ocorrido como resposta ao crescimento do número de pessoas afetadas por situações de origem traumática e não traumática que requerem uma intervenção por parte da medicina para proporcionar o tratamento e respectiva recuperação do indivíduo. À medida que a população envelhece, existe uma necessidade acrescida de dispositivos médicos para substituir ou reparar tecidos ou órgãos lesados (SILVER, 1994).

Os biomateriais podem ser divididos em 3 classes principais de materiais: poliméricos, cerâmicos, e metálicos. Por vezes diferentes classes de materiais podem ser combinadas dando origem aos compósitos, podendo-se nomear como a quarta classe dos biomateriais. Os polímeros representam a maior classe dentre os biomateriais (RATNER et al., 2013).

Os biomateriais poliméricos, ou biopolímeros, constituem uma importante fonte de materiais com grande versatilidade química e elevado potencial em diversas aplicações biomédicas. As suas propriedades podem ser facilmente alteradas por diferentes métodos físicos e químicos. Isto permite a seleção de propriedades importantes, tais como capacidade de absorção de água, cinética de degradação, ou propriedades mecânicas com especificações apropriadas e determinadas aplicações (KAPLAN, 1998).

Os biopolímeros estão entre os excipientes mais utilizados na indústria farmacêutica dada a sua versatilidade quanto a aplicações e funcionalidades (OLIVEIRA et. al, 2006).

Vários biopolímeros vêm sendo estudados e utilizados nos sistemas de liberação controlada de fármacos, com o intuito de liberá-los efetivamente no alvo

pretendido e, dessa maneira, aumentar os benefícios terapêuticos do tratamento (OLIVEIRA et. al, 2006).

Polissacarídeos e seus derivados representam um grupo de polímeros naturais largamente utilizados em formas farmacêuticas, sendo os preferidos, em detrimento de polímeros sintéticos, devido à baixa toxicidade, baixo custo e disponibilidade (LAMIM,2006)

Dentre os polímeros de origem natural mais aplicados como excipientes no controle de liberação de fármacos, pode-se citar a quitosana (LAMIM,2006)

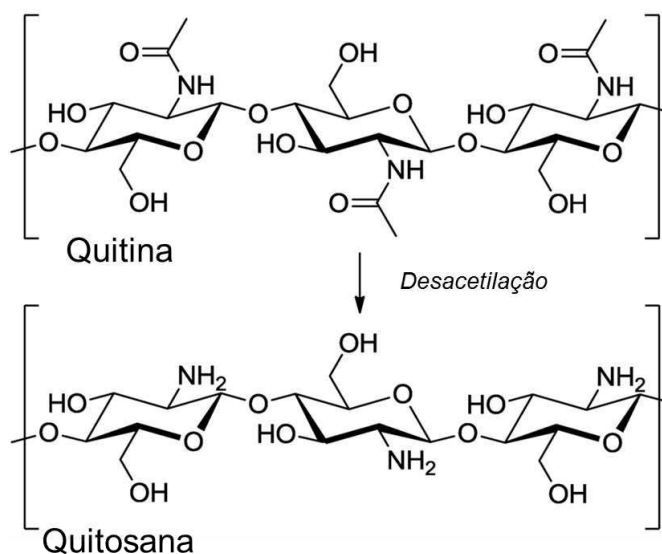
3.5 Quitosana

A quitosana, que é um polímero natural, vem se destacando como polímero biodegradável e bioabsorvível, pois seus produtos de degradação são atóxicos, não imunogênicos e não carcinogênicos (MUZZARELLI et al., 1997). A quitina é um polissacarídeo encontrado na natureza em grande escala, pois é a segunda substância orgânica mais abundante na biosfera, sendo superada apenas pela celulose, mas supera esta última em termos de taxa de reposição, que chega a ser duas vezes maior que a da celulose. Quitina e celulose possuem características estruturais semelhantes e atuam como invólucros protetores e materiais de suporte e defesa nos organismos em que ocorrem (ABRAN; HIGUERA, 2004).

Tipicamente a quitosana é obtida pela desacetilação das unidades de acetilglucosamina da quitina, em geral, por hidrólise sob condições alcalinas e em alta temperatura. A desacetilação da quitina raramente é completa. Quando o grau de acetilação cai abaixo do valor de 60% mol, a quitina natural torna-se quitosana. (ARANAZ et al,2010)

As estruturas moleculares da quitina e da quitosana estão apresentadas na Figura 4.

Figura 4 - Estrutura química da quitina e da quitosana.



Fonte – Adaptado de Biagini et al., (1992).

A quitosana tem despertado o interesse de pesquisadores de várias áreas, principalmente a médica e a farmacêutica, que tem observado na quitosana um biomaterial com grande potencial. É uma substância que tem a capacidade de formar interações químicas com materiais hidrofóbico e aniônico (BIAGINI et al., 1992), sendo produzida industrialmente pela primeira vez em 1971, no Japão. Em 1986, o Japão já possuía quinze indústrias envolvidas na produção de quitina e quitosana em escala comercial (HIRANO, 1989). Como biomaterial, é aplicada em lentes de contato, membranas artificiais, tratamento de lesões de pele, cicatrizante, agente hemostático, bactericida e fungicida (DALLAN, 2005).

O grande interesse dos cientistas pela quitosana como material polimérico com aplicação nas áreas biomédicas se dá pelo fato destes polissacarídeos possuírem características tecnológicas e econômicas relevantes ,além de apresentarem propriedades biológicas adequadas (CHAVES et al; DALLAN, 2005;FRAGA et al,2006;SANTOS et al,2006;PEDRO et al,2009;RIVERO et al 2009)

Essa versatilidade da quitosana permite sua conformação em formas tão variadas quanto sua aplicabilidade como fibras, glóbulos, membranas, etc. Por ela não ser hidrolisada pelas enzimas digestivas no homem e a sua estrutura química ser similar a da celulose, ela pode ser usada como um novo tipo de fibra dietética. Entretanto, por conter um par de elétrons livres no nitrogênio tem capacidade de formar complexos com polímeros e metais (JING et al., 1997).

É um polímero catiônico, em condições de Ph neutro e alcalino ,apresenta grupamentos amino livres sendo, desta forma insolúvel em água ,em solventes orgânicos e em bases, mas é solúvel na maioria das soluções de ácidos orgânicos com Ph inferior a 6, pois em Ph ácido os grupamentos amino podem ser protonados ,tornando o polissacarídeo solúvel (DALLAN,2005).O ácido acético e o fórmico são os mais usados para a solubilização da quitosana. Alguns ácidos inorgânicos diluídos, tais como: ácido nítrico, clorídrico, perclórico e fosfórico, também podem ser usados para preparar uma dispersão da quitosana, mas somente após prolongada agitação e aquecimento (DAMIAN et al ,2005)

A quitosana é um polissacarídeo e como se sabe, estimula o sistema imune *in vitro* e *in vivo* a favorecer o processo cicatricial e possui efeito analgésico (SENEL; McCLURE, 2004). Isso ocorre devido à ativação dos macrófagos pelos oligômeros de baixa massa molecular, que leva o mesmo a liberar interleucina-1 e estimular a proliferação de fibroblastos que influenciará na estrutura do colágeno (SANDFORD, 1989).

A quitosana é umectante e adere melhor à ferida que o ácido hialurônico e sua propriedade cicatrizante favorece a reconstituição fisiológica da pele (BIAGINI et al., 1992). O papel da quitosana na aceleração da cicatrização de lesões é devido à propriedade imunomoduladora tanto em ativar quase que exclusivamente o macrófago, como também na biodegradabilidade desse polímero no organismo (OLSEN et al., 1989). Oferece notáveis propriedades biológicas, que abriu o caminho para a sua aplicação na indústria farmacêutica e biomédica campos (ILLUM, 1998; KUMAR et. al, 2004), em sistemas de liberação (PARK et. al, 2010; PAÑOS et. al, 2008; VARSHOSAZ, 2007), ou como um scaffold para engenharia de tecidos (MADIHALLY, 1999).

3.5.1 Reticulação da quitosana

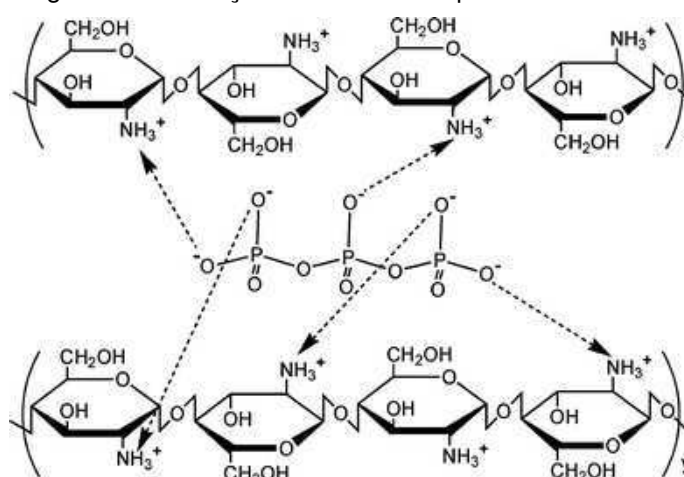
Uma das mais conhecidas modificações realizadas em polímeros é a reação de reticulação. É um processo pelo qual cada ligação química ocorre entre cadeias de moléculas de polímeros, podendo ser através de ligações primárias entre as cadeias ou por ligações iônicas (ORÉFICE et al,2006)

Muitas vezes, com fim de aumentar a estabilidade química, térmica e a resistência mecânica da quitosana agentes reticulantes, que são moléculas com

pelos menos dois grupos funcionais reativos capazes de formar pontes entre as cadeias do polímero, são utilizados, tais como glutaraldeído, etilenoglicoldiglicidil éter, ácido sulfúrico epícloridrina e tripolifosfato.

O tripolifosfato de sódio (TPP) é um ânion multivalente e atóxico que vem sendo estudado como agente reticulante alternativo ao glutaraldeído (considerado antigênico). O TPP reticula a quitosana, formando um gel, pela interação iônica entre suas cargas negativas e as cargas positivas dos grupamentos amino da quitosana (CALVO et. al, 1997). Essa interação está ilustrada na Figura 5.

Figura 05 - Interação iônica entre a quitosana e o TPP.



Fonte – Adaptado de Azevedo et al., (2011).

Efetivamente, a quitosana tem boas propriedades mucoadesivas, devido à sua carga positiva (LEHR et. al, 1992), o que aumenta a aderência à mucosa e portanto o tempo de contato, no caso de um sistema de liberação controlada a base de quitosana, viabilizando a penetração de droga por aplicação sublingual (MINGAWA, et. al, 2007; YANG et. al, 2008).

3.6 Liberação controlada de fármaco

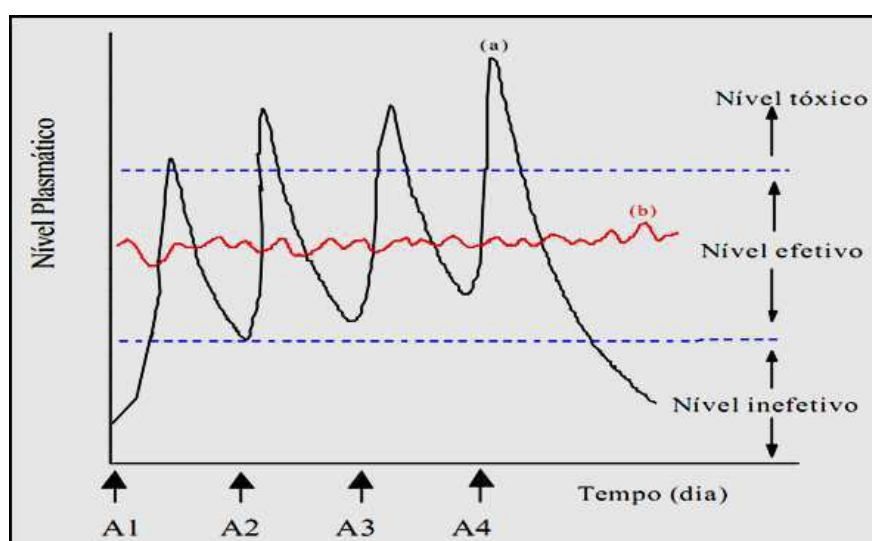
A liberação controlada de fármacos tem como objetivo principal o controle temporal e espacial, *in vivo*, da concentração de fármacos para que o benefício clínico da administração destes seja maximizado e os efeitos adversos minimizados. Neste contexto, o termo “fármaco” engloba todos compostos bioativos administrados com intuito terapêutico, desde moléculas de baixo peso

molecular a proteínas e a material genético (KOETZ et. al, 2007). Isto implica na associação, química ou física, dos fármacos com materiais biocompatíveis em sistemas que, quando administrados *in vivo*, tenham a capacidade de (i) controlar, de forma pré-determinada, a taxa de liberação/entrega do fármaco a partir desse mesmo sistema, e/ou (ii) conduzir o fármaco até ao sítio específico em que este deve atuar. Estes sistemas são designados, assim, por sistemas de liberação controlada (SLC) de fármacos (COIMBRA, 2010).

As formas farmacêuticas de liberação controlada, cuja liberação do fármaco é prolongada, requerem administração menos frequente do medicamento em relação às formas convencionais, nas quais a concentração do fármaco apresenta um aumento na corrente sanguínea, atinge um pico máximo e então declina. (THACHARODI ,D &K.P.RAO,1996).

Desde que cada fármaco possua uma faixa de ação terapêutica acima da qual ele é tóxico e abaixo da qual ele é ineficaz, os níveis plasmáticos são dependentes das dosagens administradas, isso se torna mais crítico se a dose efetiva estiver próxima à dose tóxica (DURAN N & M.M AZEVEDO ,2002). Neste fato reside uma das grandes vantagens dos sistemas de liberação controlada de fármacos, sobre os métodos convencionais, com a manutenção da concentração terapêutica e efetiva de fármacos no sistema circulatório por um extenso período de tempo.(TANAKA,N, K. OKIMOTO,et al, 2005)

Figura 6- Comparação das variações de concentração de fármacos administrados por (a) métodos convencionais de multidosagem e (b) sistemas de liberação controlada. A = dose do fármaco.



Fonte - Adaptado de VULCANI (2004).

Essas formas farmacêuticas de liberação controlada apesar de possuir inúmeras vantagens possuem algumas limitações como: restrições para fármacos com baixo tempo de meia-vida, com dificuldade de absorção no trato gastro-intestinal e muito potentes ; impossibilidade de interrupção do efeito terapêutico imediato em caso de intoxicação ou intolerância; risco de acumulação do fármaco com velocidade de eliminação lenta e dificuldade de adaptação da posologia às diferentes farmacocinéticas interindividuais.(DAS, 2003).

Em termos gerais, os fármacos que mais se adaptam a estes sistemas possuem as seguintes características: velocidades médias de absorção e excreção; absorção uniforme no trato gastro-intestinal; absorção em doses relativamente pequenas; margem de segurança relativamente larga; utilização no tratamento de doenças crônicas em vez de agudas (VENDRUSCOLO, 2005).

3.6.1 Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos

Os materiais poliméricos, pela sua variedade, versatilidade e propriedades, são a classe de materiais mais investigada no desenvolvimento do SLC (sistema de liberação controlada). De fato, o desenvolvimento atual de novos SLC, mais sofisticados e eficientes anda a par com o desenvolvimento de novos polímeros, desenhados para ter propriedades cada vez mais específicas (KIM,S et al 2009).

Os SLC preparados a partir de materiais poliméricos podem ser classificados em três grandes categorias, de acordo com o mecanismo que governa a liberação do fármaco: (i) Sistemas de liberação controlados por difusão; (ii) Sistemas de liberação ativados pelo solvente; (iii) Sistemas de liberação controlados por ação química (LI et. al, 2007).

Os sistemas de liberação controlados por difusão encontram-se divididos em dois tipos: sistemas de reservatório e sistemas matriciais.

Um SLC reservatório consiste num dispositivo constituído por um núcleo de fármaco, no estado líquido ou sólido, rodeado por uma membrana polimérica não biodegradável, através do qual o fármaco se difunde lentamente. As propriedades do fármaco e da membrana polimérica determinam a taxa de difusão e, conseqüentemente , a taxa de liberação do fármaco (JAIN, 2004).

Num sistema matricial o fármaco encontra-se uniformemente disperso ou dissolvido numa matriz polimérica, sendo a taxa de liberação controlada pela taxa de difusão do fármaco através dessa mesma matriz (COIMBRA, 2010).

Na liberação do fármaco estão envolvidos processos físicos e químicos, incluindo penetração de água na matriz, difusão do fármaco pelos poros da matriz, por degradação do polímero ou por uma combinação dos dois mecanismos. Estes materiais têm a desvantagem de o fármaco poder ser liberado repentinamente através de um colapso da matriz, podendo levar a conseqüências potencialmente sérias para o paciente.(REGO,2003).

As principais vantagens dos Sistemas de liberação controlada de fármacos são: manter níveis terapêuticos dos fármacos com baixa oscilação, impedir níveis tóxicos e efeitos colaterais locais e sistêmicos, evitar subníveis terapêuticos, aumentar concentrações plasmáticas de princípios ativos de meia-vida plasmática relativamente curta, maior segurança na utilização de alguns fármacos de elevada potência, maior comodidade pela diminuição do número de administração diária do fármaco, facilita a adesão ao tratamento, administração noturna pode ser evitada ,e efeitos indesejados reduzidos .(VENDRUSCOLO,C.W & CHAVANPATIL,2005,2006)

3.6.2 Via sublingual de administração de fármacos

A via sublingual é uma via de administração de medicamentos que consiste na absorção do fármaco por baixo da língua, evitando o efeito de primeira passagem hepática, pois a drenagem venosa é diretamente para a veia cava superior. As mucosas situadas na região sublingual são altamente vascularizadas por capilares sanguíneos, motivo pelo qual sua absorção é altamente eficaz, em comparação com a via oral. Sua absorção se dá de forma rápida, devido ao contato quase direto com os capilares sanguíneos, situados nessa região. Mas sua utilização depende da ionização e lipossolubilidade do fármaco (GOODMAN, GILMAN, 2005).

Medicamentos administrados por meio da mucosa da boca exibem rapidamente seus efeitos, porque entram diretamente na corrente sanguínea, ao mesmo tempo que não sofrem os efeitos lesivos dos sucos gástricos e do metabolismo hepático. A mucosa oral tem um epitélio fino e vasos sanguíneos

abundantes, os quais promovem a rápida absorção do medicamento, podendo aparecer no sangue do paciente dentro de 1 minuto, e alcançam os níveis sanguíneos máximos entre 10 – 15 minutos, muito mais rápido que os medicamentos ministrados pela via oral tradicional. É possível usar a mucosa oral para absorver medicamentos administrados pela via bucal (medicamento entre a bochecha e os dentes), sublingual (medicamento sob a língua, via muito utilizada para medicamentos antianginosos como o dinitrato de isosorbida) ou translingual (medicamento na superfície superior da língua). Essas vias também podem ser utilizadas caso o paciente esteja incapacitado para ingerir, engolir ou esteja intubado. Além disso, os medicamentos não sofrem o efeito da primeira passagem pelo fígado e não geram irritação no TGI. Por outro lado, apenas os medicamentos que são altamente lipossolúveis podem ser administrados por essa via, e as vezes podem irritar a mucosa oral. Os medicamentos de sabor desagradável também são, obviamente, inadequados para a administração por essa via (DOUGLAS, 2005).

Dentre as principais vantagens da via sublingual temos: a fácil deposição do medicamento sublingual, não necessitando de técnica apurada, a velocidade de absorção e a biodisponibilidade são superiores a via oral e evita-se a inativação gastrointestinal e hepática. Como desvantagens, temos a necessidade de se utilizar pequenas quantidades de fármaco, pois a superfície bucal é limitada e a dependência do pH bucal (habitualmente entre 6,7 e 7) que pode alterar a absorção do fármaco (FLOREZ, 1992).

Matrizes de quitosana podem possibilitar a liberação controlada sublingual de Fumarato de Formoteroldihidratado.

3.7 Fumarato de Formoteroldihidratado (formoterol)

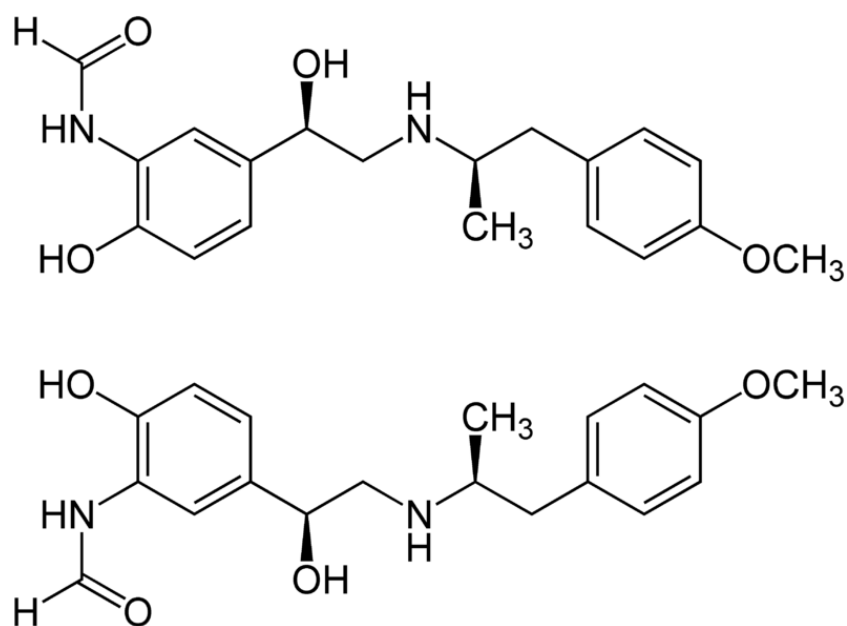
A função dos beta receptores no pulmão é regulada por vários mecanismos que afetam o controle do tônus da musculatura peribrônquica e outras importantes respostas da asma. Os beta agonistas são substâncias broncodilatadoras que ativam diretamente as beta receptores das células da musculatura lisa das vias aéreas. A ligação dos beta agonistas aos beta receptores causa a ativação da proteína estimuladora G, designada Gs, que

estimula a adenilciclase e , causando aumento na síntese de AMPcíclico, levando ao relaxamento da musculatura brônquica (STADEL, 1991).

Os broncodilatadores são as substâncias mais importantes no tratamento da asma aguda. Embora a broncodilatação seja sua principal ação, há evidências que apresentem ação antiinflamatória decorrente da supressão da ativação dos leucotrienos e histamina pelos mastócitos (HUGLES, 1983). Segundo Seale, ativam também a função mucociliar, estimulam a secreção de surfactante pelas células alveolares tipo II, diminuem a permeabilidade capilar e podem inibir a fosfolipase A2. Inibem no músculo liso das vias aéreas a liberação de acetilcolina pré-juncional de neurônios parassimpáticos. Promovem também a estimulação da secreção de íons cloro através da membrana apical das células epiteliais das vias aéreas e a secreção de células serosas e de células mucosas nas glândulas mucosas. A estimulação das células serosas produz proteínas com propriedades antibacterianas, como lisossomas e lactoferrina. Inibem a liberação de peptídeos inflamatórios e broncoconstrictores como a substância P dos nervos sensoriais. Reduzem o efeito colinérgico de broncoconstrição.

O formoterol, Figura 7, é um agente beta 2 agonistas de longa duração, seletivo, com início rápido de ação e duração de até 12 horas. À semelhança de outro beta agonistas, tem mínimos efeitos estimulantes sobre os receptores alfa2 adrenérgicos. O formoterol é um importante relaxante da musculatura lisa das vias aéreas e tem elevadas afinidades e seletividade aos receptores beta adrenérgicos. Apesar dos estudos *in vitro*, os mecanismos pelo qual ocorre a duração prolongada desses fármacos ainda permanecem não totalmente elucidadas. A hipótese de difusão microcinética tenta explicá-la (SOLÉ, 2010).

Figura 7 – Estrutura química do formoterol.



Fonte – Helmenstine, (2001).

A duração prolongada e a fixação dos agentes beta agonistas nas proximidades do receptor beta adrenérgico são dependentes de sua lipofilia. A microcinética de difusão no plasmalena, ou seja, interfase água /membrana lipídica na vizinhança do receptor beta adrenérgico, tenta explicar a ação broncodilatadora de longa duração apresentada por esse fármaco. Com um composto moderadamente lipofílico como o formoterol a alta concentração tópica cria uma partição do equilíbrio, ficando parte da droga inalada retida na membrana lipídica a seguir é liberada de modo lento, justificando a longa duração de ação e a sua manutenção (ANDERSON, 1993).

Estudos de farmacocinética apontam o início de ação do formoterol, como similar ao do salbutamol, ou seja, nos primeiros cinco minutos de sua aplicação. Esse fato justificou a avaliação do formoterol como medicação de resgate na exacerbação aguda da asma, inicialmente em adultos (HANCOX, 2001) e, a seguir, em crianças (CABRAL, 2001).

Outro ponto a considerar diz respeito à necessidade de esforço inspiratório para a inalação efetiva do formoterol quando administrado sob a forma de pó, o que pode ser um fator limitante para pacientes com quadros graves de obstrução. Assim, mais estudos ainda são necessários para que se tenha uma melhor definição das vantagens do emprego de agentes beta adrenérgicos de longa duração no tratamento da exacerbação aguda da asma (SOLÉ, 2010).

As evidências sugerem ser o formoterol um fármaco importante no tratamento de pacientes com asma persistente moderada ou grave. Em crianças com asma moderada e não controlada, apesar do tratamento com corticoide inalatório, a administração do formoterol proporcionou controle da mesma, com relação à função pulmonar e ao controle clínico. (LIPWORTH, 2000).

O formoterol é absorvido após inalação de uma dose única de 12 mcg, passa rapidamente para o plasma, atingindo a concentração máxima de 226 pmol/l em 05 minutos após a inalação.(BRIAN, 2000)

Como relatado para outros fármacos inalados é provável que a maioria do formoterol administrado pelo inalador seja ingerido e, em seguida, absorvido pelo trato gastrointestinal. A absorção da dose oral de 80 mcg é de 65% ou mais. A sua ligação com as proteínas plasmáticas foi de 61% a 64% e a ligação à albumina humana sérica foi de 34%. É eliminado principalmente pelo metabolismo, sendo a glicuronização direta a principal via de biotransformação .

O formoterol e seus metabólitos, são completamente eliminados pelo organismo, sendo aproximadamente 2/3 de uma dose oral , excretada na urina e 1/3 nas fezes. Após a inalação, cerca de 6% a 9% da dose média, é excretada inalterada na urina. O clearance renal do formoterol foi de 150 ml/min (BRIAN, 2000).

Goodman, Gilman, (1996) conduziram testes de multagenicidade cobrindo uma ampla faixa de parâmetros, onde não notaram efeitos genotóxicos em qualquer dos testes *in vitro* ou *in vivo*. Em outro teste eles verificam a não existência de potencial teratogênico, sendo, o fármaco após a administração oral, excretado no leite das ratas lactantes.

Tem como principais contra-indicações a hipersensibilidade ao produto e o uso em crianças menores de 05 anos . Como reações adversas tem-se: reações de hipersensibilidade tais como prurido e urticária , distúrbios psiquiátricos, como a ansiedade e nervosismo, distúrbios cardíacos, como palpitações , taquicardia e edema periférico, irritação na garganta , náuseas mialgia. Efeitos estes observados em uma porcentagem muito pequena de pacientes. Usado na dose de 12 mcg a cada 12/12 h (GOODMAN, GILMAN,1996).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

A pesquisa foi desenvolvida 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.

4.2 Materiais

Para o desenvolvimento da pesquisa foram utilizados os seguintes materiais:

- Quitosana Médio Peso Molecular, Sigma Aldrich[®];
- Ácido Acético Glacial P.A. (C₂H₄O₂), Vetec[®];
- Hidróxido de Sódio P.A. (NaOH), Vetec[®];
- Tripolifosfato de Sódio (TPP) (Na₅O₁₀P₃), Sigma Aldrich[®];
- Fumarato de formoterol cápsula conteúdo 12 mcg, Mantecorp[®].

4.3 Métodos

A metodologia foi desenvolvida de acordo com o fluxograma da Figura 08. As etapas do processo serão exploradas com maior profundidade nos tópicos seguintes.

Figura 08 – Fluxograma da metodologia aplicada.



Fonte – Próprio autor.

4.3.1 Preparação da solução e membrana de quitosana

A solução de quitosana foi preparada na concentração de 1% (m/v) por dissolução do pó de quitosana em solução de ácido acético 1% (v/v) sob agitação mecânica e temperatura ambiente por 20 h.

A membrana de quitosana foi obtida pelo método de evaporação do solvente, onde 50 mL da solução de quitosana foram vertidos em placa petri (15 cm de diâmetro) e, posteriormente submetidos ao processo de secagem sobre ventilação forçada de ar por um período de 24 h. As membranas secas foram neutralizadas em solução de hidróxido de sódio 1 M por 1 h, e consecutivamente estirados e secos em temperatura ambiente.

4.3.2 Preparação da solução e membrana de quitosana/fumarato de formoterol

A solução de quitosana foi preparada como no tópico 4.3.1, e em seguida a ela adicionada o conteúdo de capsulas de fumarato de formoterol necessários para obter uma concentração de 6 mg de fumarato de formoterol por cm² de

membrana, o que corresponde a $\frac{1}{4}$ da dose diária indicada para uma pessoa adulta. A homogeneização da solução foi realizada em ultrassom durante 30 min em temperatura ambiente. Os processos de formação de membrana foram idênticos aos descritos no tópico 4.3.1.

3.3.2 Reticulação das membranas de quitosana e quitosana/fumarato de formoterol em TPP

Foram preparadas soluções de Tripolifosfato de Sódio nas concentrações de 1%, 2,5% e 5% (m/v) por dissolução deste sal em água destilada. As membranas preparadas nos tópicos 4.3.1 e 4.3.2 serão reticuladas por imersão em solução de TPP (nas 3 concentrações estudadas) por um período de 1h, seguida de lavagem com água destilada e estiramento para secagem.

3.4 Caracterizações

As membranas de quitosana e quitosana/furmarato de formoterol, com e sem reticulação, foram caraterizadas 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 de Raios X (EDS), Ensaio de Ângulo de Molhabilidade, Ensaio de Liberação Controlada de Fármaco e Ensaio de Citotoxicidade.

4.4.1 Difração de Raios X (DRX)

A técnica de difração de raios X foi realizada para a determinação das fases existentes e obtenção de informações sobre a cristalinidade do material em estudo. O equipamento utilizado foi um difratômetro Shimadzu modelo XRD 6000, montagem Bragg-Brentano, sistema θ - 2θ e radiação monocromática de cobre, a leitura foi efetuada entre $2\theta = 5^\circ$ e $2\theta = 40^\circ$ a velocidade de $2^\circ/\text{min}$.

4.4.2 Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A análise por FTIR foi realizada com intuito de identificar os grupos funcionais do material desenvolvido, atentando para possíveis modificações provocadas pela adição do fármaco assim como pelo processo de reticulação. As análises foram realizadas em equipamento Spectrum 400 da Perkin Elmer a temperatura ambiente, analisando o comprimento de onda 4000 a 650 cm^{-1} .

4.4.3 Microscopia Ótica (MO)

A Microscopia Ótica foi realizada para verificar a morfologia das membranas desenvolvidas. Para a análise foi utilizado o Microscópio Óptico Hirox de reflexão e transmissão com acessórios 2D e variação de 50X-4000X, acoplado a uma estação de Análise de Imagens. Os aumentos estudados para todas as amostras foram os de 350x e 1050x.

4.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A caracterização por MEV é uma técnica utilizada para análise micro estrutural da morfologia e da topografia sobre superfícies dos sólidos e foi utilizada para esta pesquisa o equipamento da marca PHENOM, modelo MEV PROX, fabricante PHENOM WORD aumento máximo de 40000x, profundidade de foco 1mm, resolução de 30nm, tensão de 5, 10 e 15 KV, baixo vácuo e pressão variada (1 a 270 Pa), sem recobrimento metálico, mesmo em amostras não condutoras.

4.4.5 Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS)

A análise por EDS foi realizada com objetivo de analisar e quantificar os elementos químicos que constituem a estrutura do material desenvolvido. A análise foi realizada no equipamento HITACHI[®], modelo TM 1000.

4.4.6 Molhabilidade de Ângulo de Contato

Para a realização deste ensaio 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. Esse ensaio possibilita identificar o perfil hidrofílico/hidrofóbico do material estudado. O ensaio foi realizado em triplicada para cada variável estudada.

4.4.7 Ensaio de Liberação Controlada de Fármaco

O Ensaio de Liberação Controlada foi realizado para determinar a taxa de liberação do fumarato de formoterol pela membrana de quitosana. As membranas de quitosana com fármaco incorporado foram submetidas a banho agitado contendo solução tampão de PBS (pH = 7,43), as membranas permaneceram estáticas durante todo o processo com auxílio de redes de contenção. Alíquotas de 0,5 mL da solução do banho foram coletadas em diferentes períodos de tempo, sempre repondo a mesma quantidade no banho com solução de PBS virgem. As alíquotas coletadas serão analisadas por HPLC. Para a análise por Cromatografia de Fase Líquida foi utilizado cromatógrafo líquido de ultra eficiência Shimadzu (CLUE) equipado com duas bombas modelo LC-20AD, injetor automático SIL-20-A_{HT}, forno para coluna CTO-20A, detector com comprimento de onda variável UV/Vis modelo SPD-20A, controlador CBM-20A, integrador automático computadorizado com software LC Solution[®]. A fase estacionária será composta por uma coluna de sílica C18 (15cmx4,6mm), mantida à temperatura ambiente. A fase móvel foi constituída de uma mistura de acetato de amônia (65:35) (v/v) filtrada em membrana de nylon e deaerada em vácuo. O fluxo da fase móvel será de 1,0 mL/minuto. As análises serão realizadas por injeção de 25 µL de solução com tempo de corrida de 20 min. Todas as amostras foram filtradas com filtros de seringa 0,45 µm de diâmetro.

4.4.8 Ensaio de Citotoxicidade

Com o objetivo de atender a norma ISO 10993 que recomenda ensaios *in vitro* de citotoxicidade como testes iniciais para materiais que ficaram em contato com a pele, escolheu-se o teste de avaliação da viabilidade celular dos macrófagos por MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio]. Tal ensaio foi realizado com fibroblastos L 929 adquiridos no Banco de Célula do Rio de Janeiro (BCRJ). O ensaio foi realizado no CERTBIO.

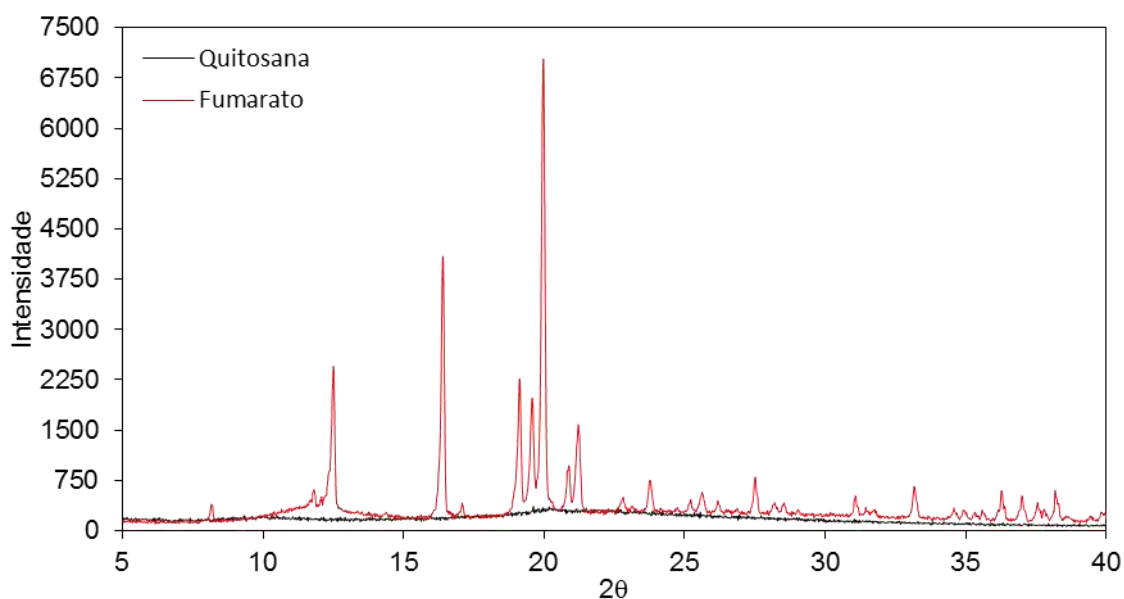
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Difração de Raios x (DRX)

A análise por DRX foi realizada visando identificar o perfil cristalino das membranas antes e após a incorporação do fármaco e consecutiva reticulação.

Para facilitar a identificação das variações ocorridas, tanto pela incorporação do fármaco como pela reticulação, foram realizadas análises em membranas apenas de quitosana e no padrão de fármaco utilizado (conteúdo da capsula de fumarato de formoterol), estes resultados podem ser observados na Figura 09.

Figura 09 – Difração de raio X das membranas de quitosana e do conteúdo da capsula de fumarato de formoterol.



Fonte – Próprio autor.

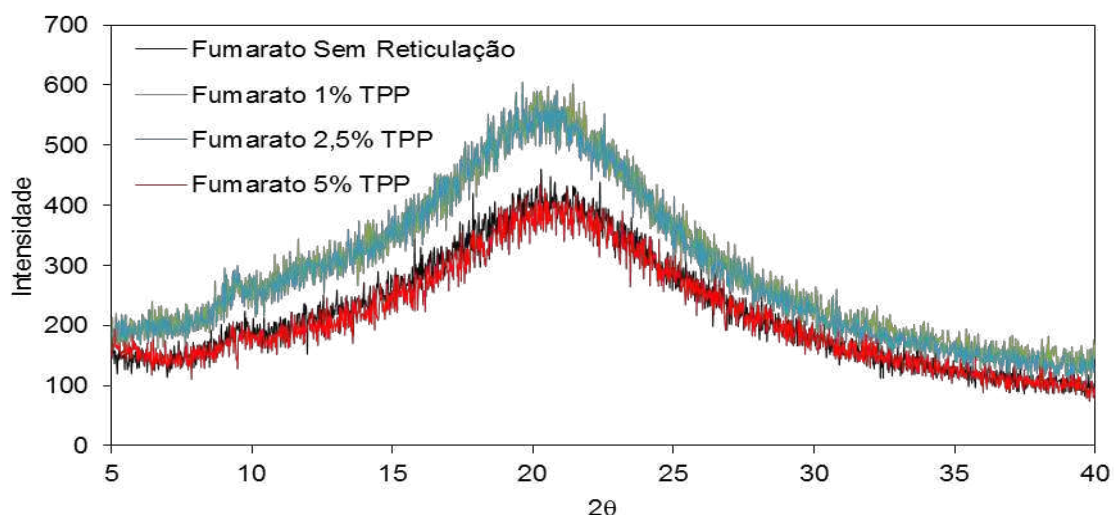
Observa-se na Figura 09 para o difratograma da quitosana um perfil típico de um material semicristalino com a presença de dois picos de base larga localizados e aproximadamente $2\theta=10^\circ$ e $2\theta=20^\circ$, que segundo Urugami, Tokuro (2006), corresponde a um difratograma típico de quitosana.

Para o difratograma do fumarato de formoterol identificam-se picos mais intensos presentes entre aproximadamente $2\theta=10^\circ$ e $2\theta=23^\circ$. Picos estes

localizados em aproximadamente $2\theta=12,5^\circ$, $2\theta=17^\circ$, $2\theta=18^\circ$, $2\theta=19^\circ$, $2\theta=20^\circ$, $2\theta=21,5^\circ$, $2\theta=22^\circ$.

Na Figura 10 observam-se os difratogramas das membranas de quitosana/FF, sem e com reticulação.

Figura 10 – Difratogramas de DRX das membrana de quitosana/FF, sem e com reticulação.



Fonte – Próprio autor.

No difratograma da Figura 10 verifica para a membrana de quitosana/FF sem reticulação exclusivamente a presença de dois picos principais localizados em aproximadamente $2\theta=10^\circ$ e $2\theta=20^\circ$ característicos da quitosana. Observa-se que estes sobrepõem todos os picos observados no difratograma do FF padrão que estão localizados entre aproximadamente $2\theta=10^\circ$ e $2\theta=23^\circ$.

Verifica-se para as membranas reticuladas com solução de 1% e 2,5% de TPP, aumento da intensidade da cristalinidade. Segundo (PATI, ADHIKARI, DHARA, 2011) o inverso deveria ocorrer, já que o processo de reticulação por TPP desestrutura as pontes de hidrogênios formadas subsequentemente a neutralização por hidróxido de sódio, gerando uma rede desordenada decorrente da reticulação iônica entre os grupamentos amina da quitosana. O que leva ao entendimento que o processo de reticulação, ao unir de forma iônica as cadeias de quitosana formando uma rede, exterioriza o fármaco na membrana, fármaco este que apresenta cristalinidade muito superior a quitosana, obtendo-se assim um difratograma com picos de intensidade mais elevados que os apresentados pela membrana sem reticulação. Esse fato é fortalecido pelo difratograma observado

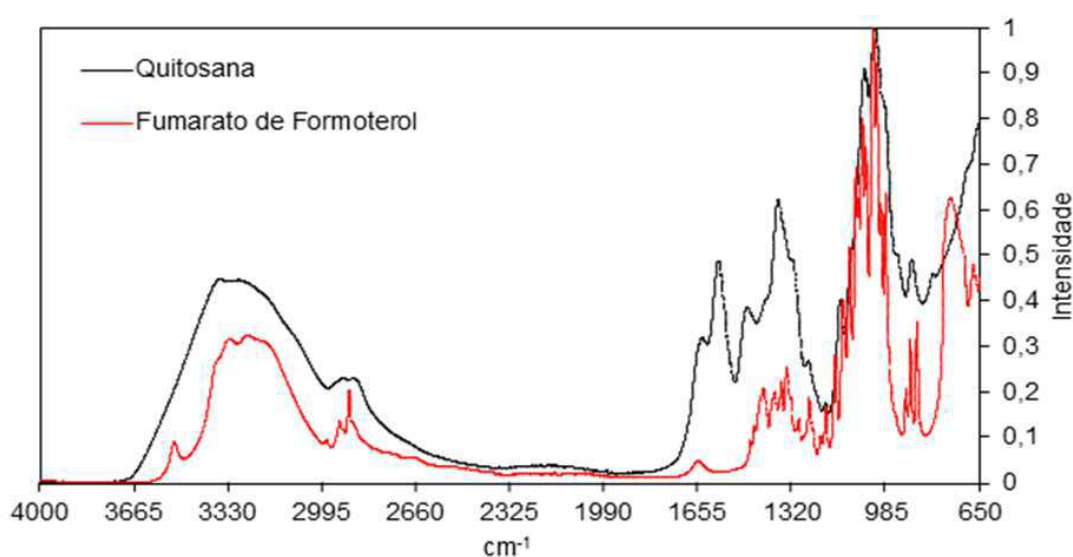
para a membrana de quitosana/FF reticulada com solução de 5% de TPP (m/v), onde observa-se sobreposição deste ao difratograma de quitosana/FF sem reticulação, indicando uma possível compensação entre a diminuição da intensidade dos picos decorrentes da reticulação com alta concentração de TPP (5% m/v) e o aumento da intensidade pela exteriorização do fármaco, obtendo um difratograma semelhante ao da membrana sem reticulação, porém com organização estrutural diferente.

5.2 Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Com o objetivo de identificar possíveis alterações nos grupos funcionais da quitosana pela incorporação do fármaco, assim como pelo processo de reticulação, foram realizadas análises de FTIR.

Para facilitar a identificação destas possíveis modificações foram realizados ensaios de FTIR para a membrana apenas de quitosana e para o fumarato de formoterol padrão (conteúdo do comprimido), os resultados podem ser observados na Figura 11.

Figura 11 – Espectrogramas de FTIR da membrana de quitosana e do fumarato de formoterol padrão (conteúdo do comprimido).



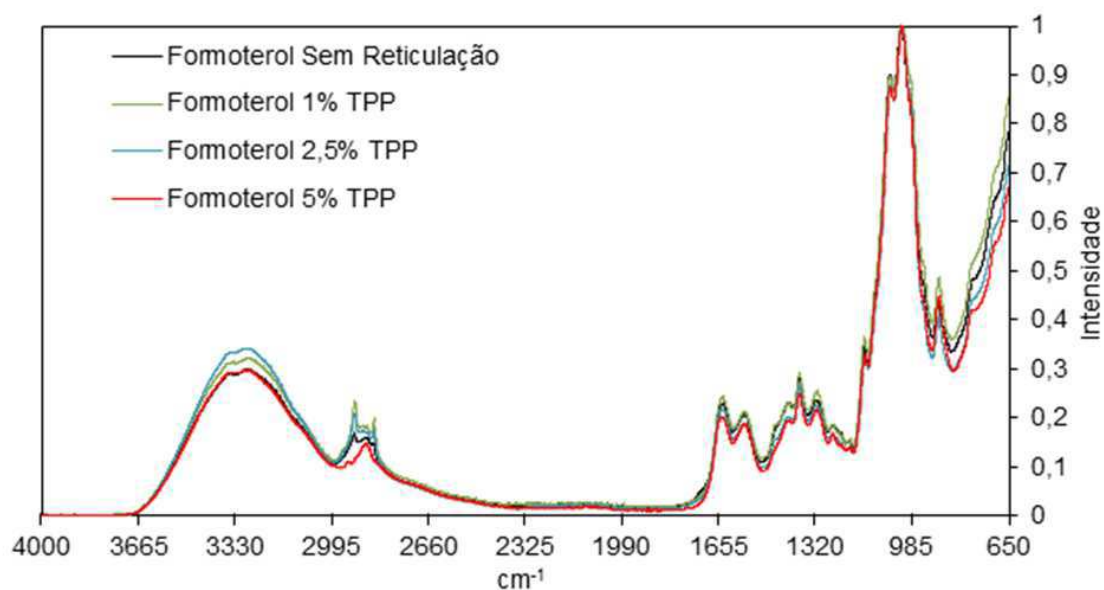
Fonte – Próprio autor.

O espectro de infravermelho da quitosana obtido (Figura 11) está de acordo com os resultados apresentados por Ponciano, (2010) onde também foi observada a presença das bandas consequentes das vibrações dos grupos funcionais correspondentes a O-H da hidroxila e N-H da amina em $\sim 3400\text{-}\sim 2995\text{ cm}^{-1}$, C-H do CH_2 e CH_3 em $\sim 2995\text{-}\sim 2873\text{ cm}^{-1}$, do RHN-C=O da amida em $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$, do N-H da amina em $\sim 1560\text{ cm}^{-1}$, novamente do O-H da hidroxila e do C-H do anel glicosídico em $\sim 1423\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 1319\text{ cm}^{-1}$ respectivamente, do C-H do CH_3 em $\sim 1377\text{ cm}^{-1}$ e do C-O-C da ligação éter em $\sim 1150\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1062\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 1020\text{ cm}^{-1}$.

Em conjunto ao espectro da quitosana observa-se o espectro do fumarato de formoterol também na Figura 09, para este espectro podem ser verificados as bandas consequentes das vibrações dos grupos funcionais correspondentes a O-H da hidroxila em $\sim 3500\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 3400\text{-}\sim 2995\text{ cm}^{-1}$, sendo a banda mais intensa em $\sim 3500\text{ cm}^{-1}$ corresponde a hidroxilas não ligadas a pontes de hidrogênio, ainda nessa banda pode-se perceber a presença de duas bandas em aproximadamente 3330 cm^{-1} e 3100 cm^{-1} (bandas essas que se sobressaem a banda de hidroxila) correspondentes as aminas II presentes no fármaco, C-H do CH_2 e CH_3 em $\sim 2995\text{-}\sim 2873\text{ cm}^{-1}$, do RHN-C=O da amida em $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$, C-H constituinte dos ciclos não aromáticos do fármaco em $\sim 1400\text{-}\sim 1300\text{ cm}^{-1}$ e C-H constituintes do anel benzeno em $\sim 860\text{-}\sim 800\text{ cm}^{-1}$; a banda localizada em $\sim 750\text{ cm}^{-1}$ corresponde a forma como o anel benzeno da estrutura do fármaco é substituído.

Tendo em vista a identificação dos grupos funcionais tanto da quitosana como do fumarato de formoterol a Figura 12 apresenta os espectros das membranas de quitosana/FF, sem e com reticulação.

Figura 12 – Espectros de FTIR das membranas de quitosana/FF, sem e com reticulação.



Fonte – Próprio autor.

Verificou-se na Figura 12 que a adição do fármaco a quitosana (membrana de quitosana/FF sem reticulação, preto) proporcionou alterações quanto a intensidade dos grupos amida e amina da membrana, essa alteração pode ser notada em $\sim 1655 \text{ cm}^{-1}$ e $\sim 1560 \text{ cm}^{-1}$ respectivamente, onde observou-se a diminuição da intensidade da banda de amina e aumento da banda de amida. Este fato pode estar ligado a possível interação do fármaco com os grupamentos amina da quitosana, já que essa diminuição da intensidade da banda de amina I pode indicar menor quantidade deste grupamento livre, assim como também pode ter ocorrido ligação direta do fármaco com essa amina I levando a formação de aminas secundárias que tem leitura praticamente encoberta pela banda de hidroxilas em aproximadamente $\sim 3400\text{--}\sim 2995 \text{ cm}^{-1}$.

Observa-se para as membranas reticuladas deslocamento brando na banda em $\sim 3400\text{--}\sim 2995 \text{ cm}^{-1}$ correspondente as hidroxilas em pontes de hidrogênio, este acontecimento pode estar associado ao aumento de concentração de grupos hidroxila, o que desloca essa banda para a direita, entretanto essas hidroxilas podem ser resultado das pontes de hidrogênio entre o TPP e a quitosana, o que causa menor organização estrutural que as pontes de hidrogênio entre as cadeias de quitosana.

Verificou-se para a membrana quitosana/FF reticulada com solução 5% TPP (m/v) o deslocamento da banda em $\sim 2962 \text{ cm}^{-1}$ relacionado ao grupo metil,

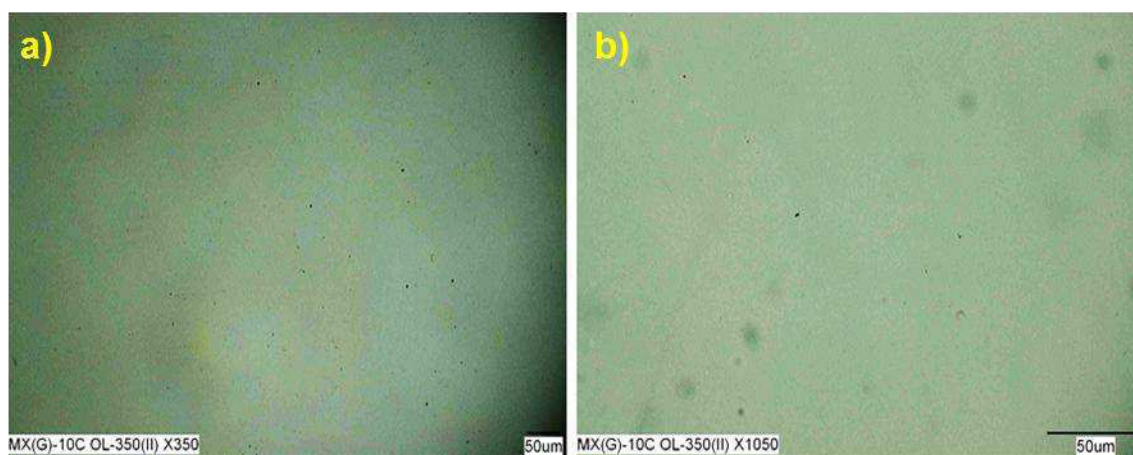
deslocamento este que ainda continua na faixa de absorção da vibração do C-H do metil, entretanto, por o fármaco possuir formas enantioméricas, este acontecimento pode indicar modificação do fármaco para sua forma isômera.

5.3 Microscopia Ótica

A análise de Microscopia Ótica foi realizada visando verificar a morfologia das membranas sintetizadas.

Na Figura 13 observa-se a membrana apenas de quitosana, o ensaio foi realizado nesta amostra para facilitar a visualização das modificações ocorridas nas membranas decorrentes da adição do fármaco e do processo de reticulação. A membrana de quitosana se mostra com superfície uniforme, lisa e densa, o que está de acordo com os estudos realizados por Lima (2010)

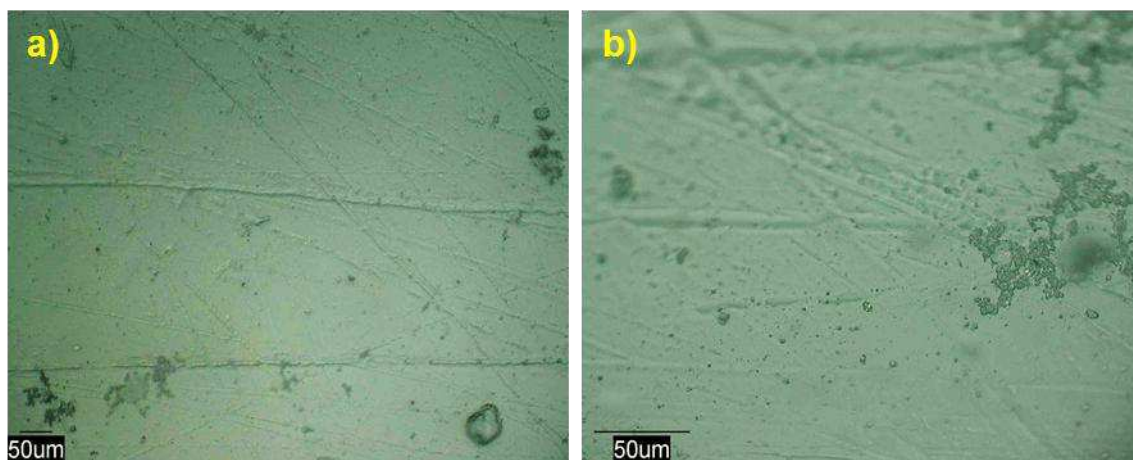
Figura 13 – Microscopia Ótica da membrana de quitosana nos aumentos de a) 350x e b) 1050x.



Fonte – Próprio autor.

Na Figura 14 observam-se as microscopias para a membrana de quitosana/FF sem reticulação.

Figura 14 – Microscopia Ótica da membrana de quitosana/FF sem reticulação nos aumentos de a) 350x e b) 1050x.

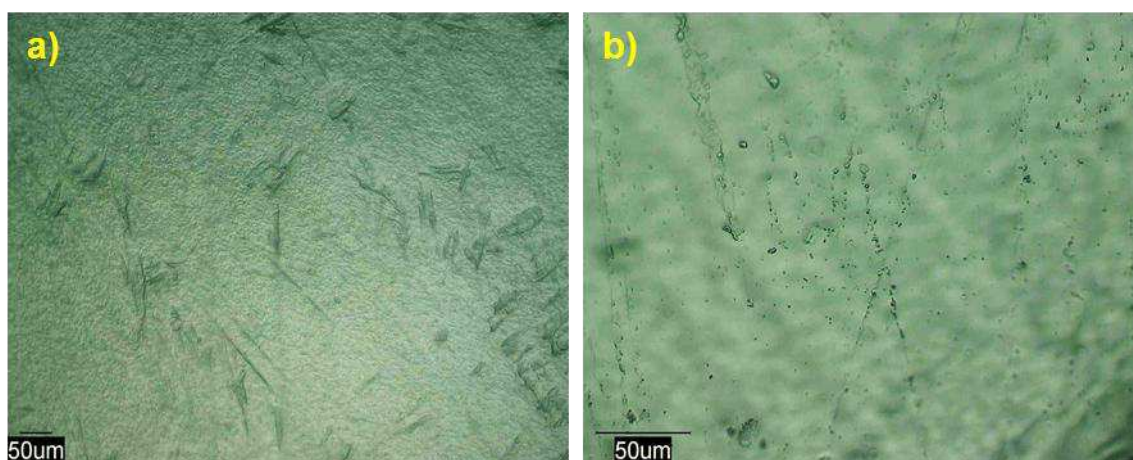


Fonte – Próprio autor.

Verifica-se para a Figura 14 uma região com rugosidades aparentemente direcionadas e inter cruzadas, não características da membrana de quitosana, indicando alterações estruturais pela incorporação do fármaco. Verificam-se também aglomerados de partículas que indicam uma possível má dispersão do fármaco na solução de quitosana, originando uma membrana não homogênea.

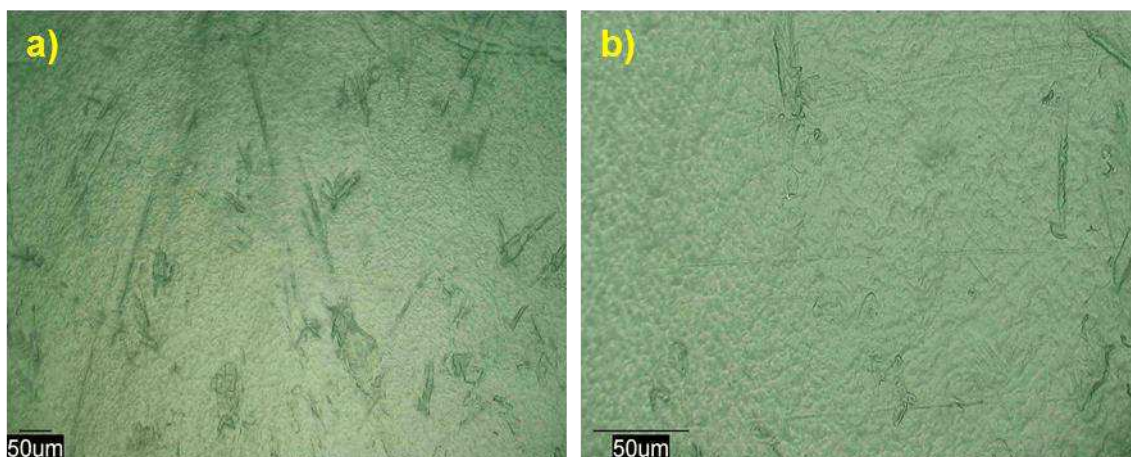
Nas Figuras 15, 16 e 17 observam-se as microscopias das membranas de quitosana/FF submetidas a reticulação em solução com 1%, 2,5% e 5% de TPP (m/v).

Figura 15 – Microscopia Ótica da membrana de quitosana/FF reticulada com solução de 1% de TPP (m/v) nos aumentos de a) 350x e b) 1050x.



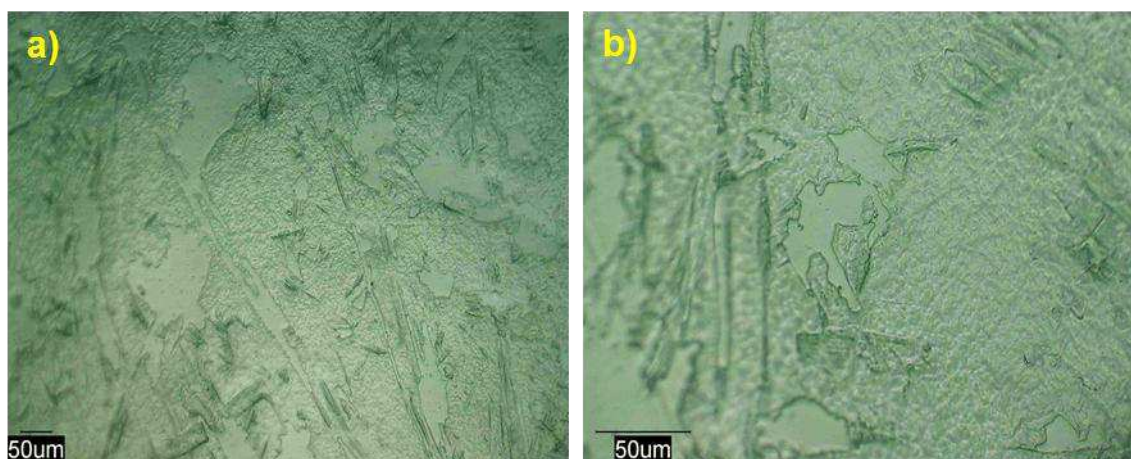
Fonte – Próprio autor.

Figura 16 – Microscopia Ótica da membrana de quitosana/FF reticulada com solução de 2,5% de TPP (m/v) nos aumentos de a) 350x e b) 1050x.



Fonte – Próprio autor.

Figura 17 – Microscopia Ótica da membrana de quitosana/FF reticulada com solução de 5% de TPP (m/v) nos aumentos de a) 350x e b) 1050x.



Fonte – Próprio autor.

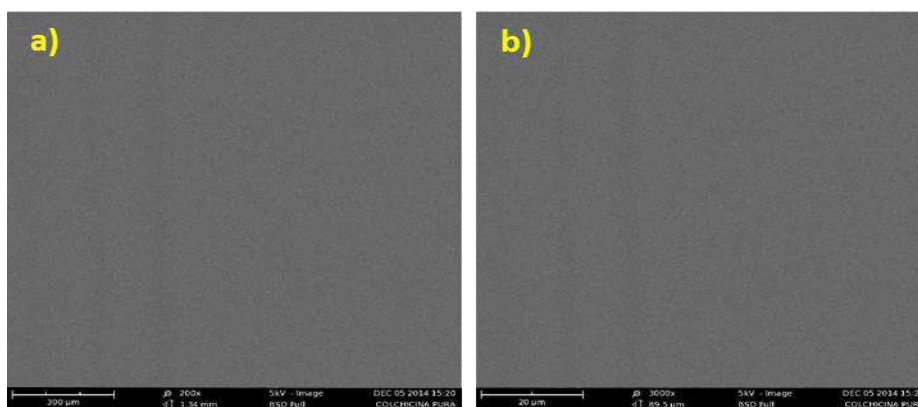
Observa-se nas Figuras 15, 16 e 17, relacionadas as microscopias das membranas quitosana/FF reticuladas com solução de 1%, 2,5% e 5% de TPP (m/v) respectivamente, aumento gradual na formação de zonas de alta e baixa concentrações nas membranas, regiões essas que são verificadas na forma de rugosidades mais acentuadas para a membrana quitosana/FF reticulada com 5% de TPP. Este fato pode estar relacionado a ação desigual do reticulante na amostra gerando regiões altamente reticuladas e regiões com baixa reticulação.

5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise por MEV foi realizada em todas as membranas sintetizadas, visando identificar, em conjunto com a análise de MO, as características morfológicas das mesmas.

Observa-se na Figura 18 as micrografias da membrana de quitosana pura, estas micrografias foram realizadas para melhor visualizar as modificações ocorridas na membrana decorrentes da incorporação do fármaco.

Figura 18 – MEV da membrana de quitosana pura nos aumentos de a) 1000x e b) 3000x.

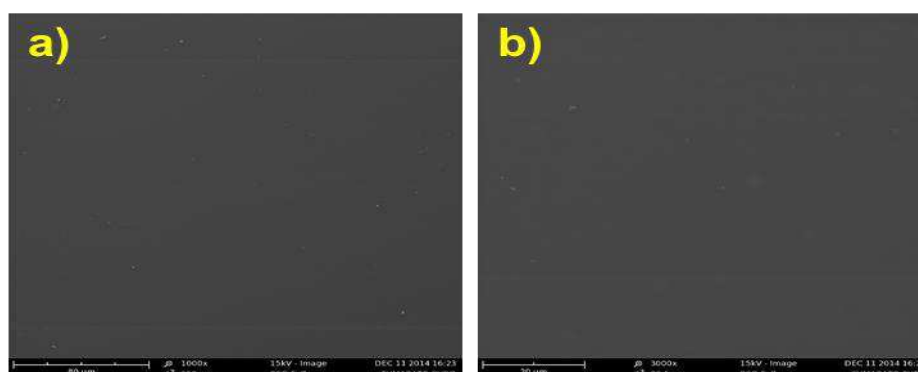


Fonte – Próprio autor.

Assim como para o resultado de MO para membrana apenas de quitosana, pode-se verificar na Figura 18 uma superfície uniforme e lisa, características de uma membrana densa de quitosana.

Na Figura 19 observam-se as micrografias da membrana de quitosana/FF sem reticulação.

Figura 19 – MEV da membrana de quitosana/FF nos aumentos de a) 1000x e b) 3000x.

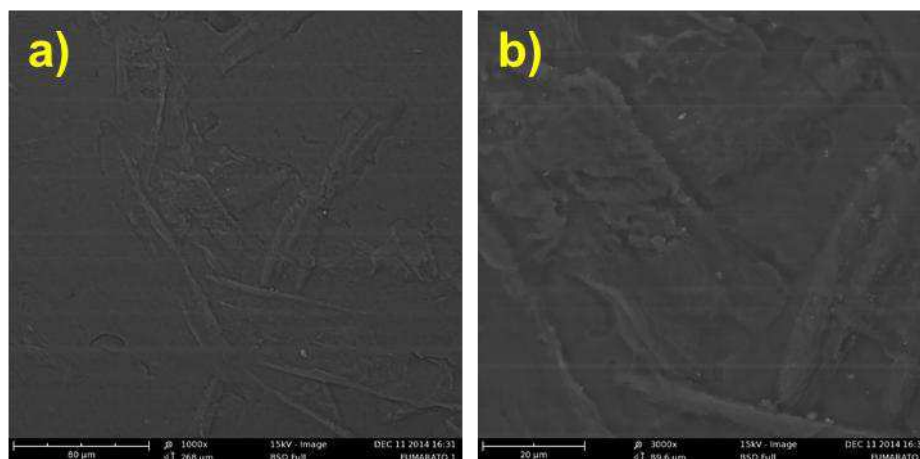


Fonte – Próprio autor.

Verifica-se na Figura 19 para a membrana de quitosana/FF sem reticulação uma estrutura semelhante a apresentada pela membrana apenas de quitosana, onde observa-se uma superfície lisa e praticamente sem rugosidades. Este resultado corrobora com os obtidos por MO, entretanto sem a possibilidade de observar as rugosidades direcionadas, onde também se observam aglomerados aparentemente relacionados a má dispersão do fármaco na solução matriz da membrana. Aglomerados estes que de acordo com análise pontual por EDS não possuem o elemento sódio em sua constituição, excluindo a hipótese destes serem resquícios de acetato de sódio provenientes da neutralização da membrana por hidróxido de sódio.

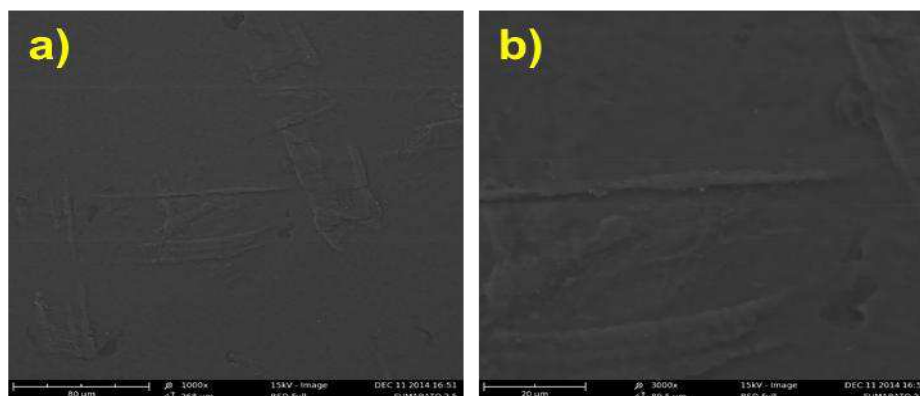
Nas Figuras 20 e 21 verificam-se as micrografias para as membranas de quitosana/FF reticuladas com solução de 1% e 2,5% de TPP (m/v).

Figura 20 – MEV da membrana de quitosana/FF reticulada com solução de 1% de TPP nos aumentos de a) 1000x e b) 3000x.



Fonte – Próprio autor.

Figura 21 – MEV da membrana de quitosana/FF reticulada com solução de 1% de TPP nos aumentos de a) 1000x e b) 3000x.

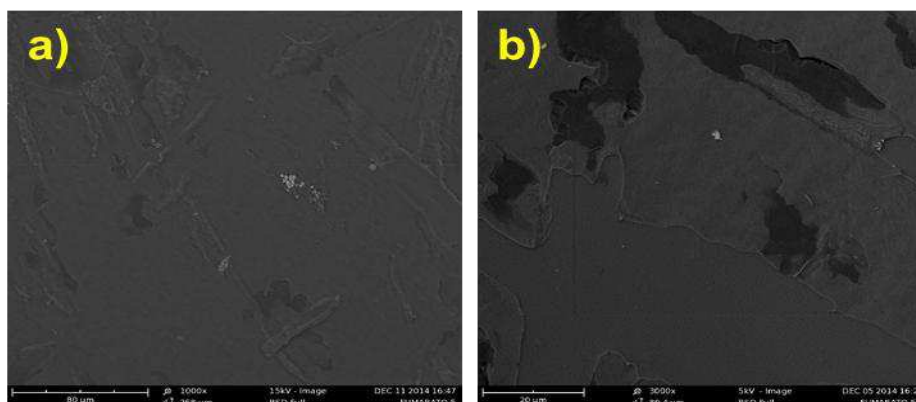


Fonte – Próprio autor.

Observam-se para as membranas de quitosana/FF reticuladas com solução de 1% e 2,5% de TPP estruturas semelhantes entre si, com rugosidades distribuídas em toda a superfície, observando-se regiões de hipo e hiper concentração, corroborando com os resultados de MO. Fortalecendo o fato de que a reticulação da membrana por TPP ocorreu de maneira desigual em sua superfície. Verificam-se na superfície da membrana de quitosana/FF reticulada com solução de 1% de TPP fragmentos dispersos, que por análise pontual de EDS puderam ser identificados como sendo TPP, indicando possível impregnação ou ineficácia do processo de lavagem das membranas após o processo de reticulação.

Na Figura 22 observam-se as microgafias para membrana de quitosana/FF reticulada com solução de 5% de TPP.

Figura 22 – MEV da membrana de quitosana/FF reticulada com solução de 5% de TPP nos aumentos de a) 1000x e b) 3000x.



Fonte – Próprio autor.

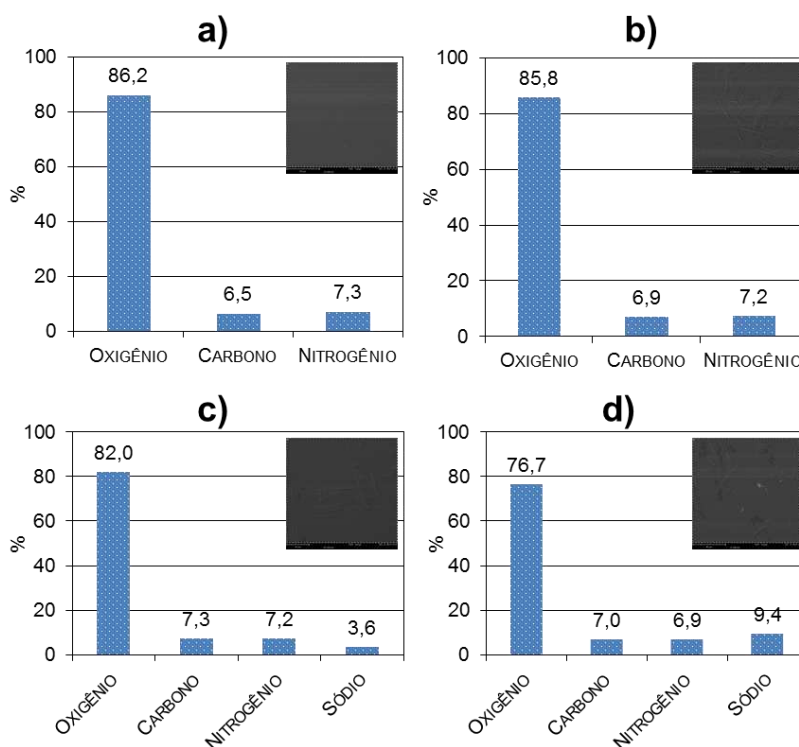
Verifica-se na Figura 22 as micrografias para a membrana de quitosana/FF reticulada com solução de 5% de TPP. Observa-se a divisão de fases na membrana formando nitidamente zonas de hipo e hiper concentração, resultado este que corrobora com o observado na MO. Fortalecendo o fato de que a reticulação ocorreu de forma desigual na superfície da membrana. Para esta variação também foi possível observar a presença de fragmentos na superfície da amostra, fragmentos estes que por análise de EDS pode-se comprovar como sendo constituídos de TPP.

5.5 Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS)

A análise por EDS foi realizada com a finalidade de identificar os elementos químicos presentes nas membranas sintetizadas.

Na Figura 23 observam-se os resultados de EDS para todas as membranas obtidas.

Figura 23 – EDS das membranas de a) quitosana/FF sem reticulação, b) quitosana/FF reticulada com solução de 1% de TPP, c) quitosana/FF reticulada com solução de 2,5% de TPP e d) quitosana/FF reticulada com solução 5% de TPP.



Fonte – Próprio autor.

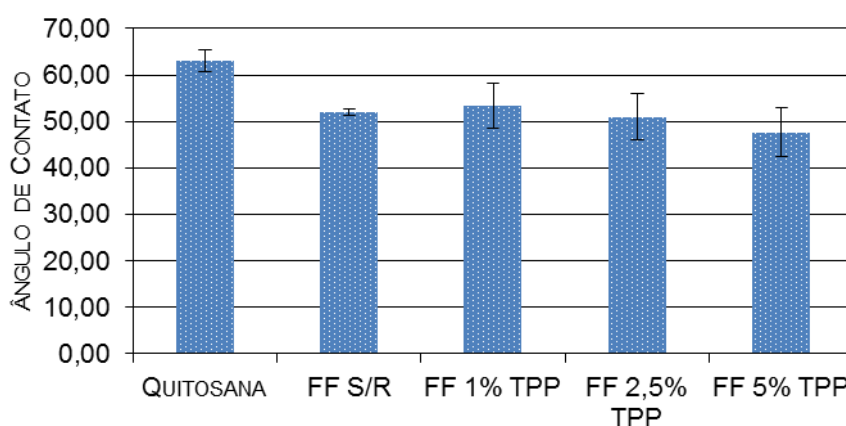
Observa-se na Figura 23 a), para a membrana de quitosana/FF sem reticulação, a presença dos átomos carbono, oxigênio e nitrogênio, átomos estes que constituem tanto a estrutura da quitosana como a do fumarato de formoterol, não foram observados átomos que divergem a estrutura das duas moléculas. Para a Figura 23 b), observou-se a presença dos átomos carbono, oxigênio e nitrogênio, com origem semelhante a mencionada anteriormente para a membrana de quitosana/FF sem reticulação, entretanto verifica-se a presença do átomo de sódio, sódio este que tem origem do TPP utilizado para reticular a membrana. O tripolisfosfato de sódio apresenta átomos de oxigênio em sua constituição que podem interferir no percentual do mesmo na análise de EDS. A Figura 23 c) e d), representando as análises de EDS das membranas de quitosana/FF reticulas com solução de 2,5% e 5% de TPP respectivamente, apresentam constituição química semelhante e com idêntica origem a da membrana de quitosana/FF reticulada com 1% de TPP.

5.6 Ensaio de Ângulo de Molhabilidade

O ensaio de tensão superficial foi realizado para avaliar o perfil hidrofóbico/hidrofílico das membranas de quitosana e quitosana/FF, com e sem reticulação.

Observa-se na Figura 24 os resultados da análise de tensão superficial das membranas de quitosana e quitosana/FF com e sem reticulação.

Figura 24 – Resultados do Ensaio de Tensão Superficial das membranas de quitosana e quitosana/FF, com e sem reticulação.



Fonte – Próprio autor.

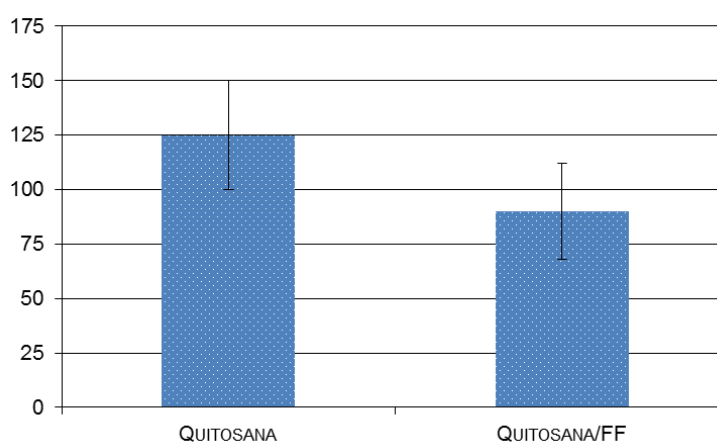
Verifica-se na Figura 24 que todas as amostras apresentaram perfil hidrofílico por possuírem ângulo de contato menor que 90° (WOODWARD, 2008). Com a adição de fumarato de formoterol a solução de quitosana para formação da membrana obteve-se aumento do perfil hidrofílico das membranas, perfil este que não sofreu modificação significativa (por teste t, $\alpha=0,05\%$) com o processo de reticulação.

5.7 Ensaio de Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado para avaliar a toxicidade do material em meio biológico, visando que a membrana desenvolvida tem como finalidade o contato íntimo com tecidos biológicos.

Observa-se na Figura 26 os resultados obtidos para a membrana de quitosana e quitosana/FF sem reticulação.

Figura 26 – Resultados do Ensaio de Citotoxicidade das membranas de quitosana e quitosana/FF.



Fonte – Próprio autor.

A avaliação da citotoxicidade foi realizada para a membrana de quitosana e quitosana/FF sem reticulação, obtendo-se viabilidade de $(125 \pm 25)\%$ e $(90 \pm 22)\%$ respectivamente, indicando que a membrana não é citotóxica e conseqüentemente potencial para aplicações em meios biológicos.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados chegaram-se as seguintes conclusões:

- A viabilidade de incorporar fumarato de formoterol em solução de quitosana e obter membranas densas destas soluções;
- A partir da difração de raios X pode-se verificar que o processo de reticulação com TPP provocou exteriorização do fármaco da membrana, fator este que poderá influenciar diretamente na taxa de liberação do fármaco de forma a proporcionar certo controle da liberação pela taxa de reticulação;
- Com o espectro de FTIR pode-se verificar certa interação entre o fármaco e os grupamentos amina da quitosana. Verificou-se também para as membranas reticuladas aumento da intensidade das pontes de hidrogênio relacionadas a reticulação por TPP, assim como uma possível modificação na isomeria do fármaco decorrente da reticulação com solução de 5% de TPP;
- Por microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura pode-se verificar alteração da morfologia densa, da quitosana, para rugosa por incorporação do fumarato de formoterol a solução matriz, rugosidade esta que foi acentuada com a reticulação com TPP. Verificou-se também que a reticulação por tripolisfosfato de sódio ocorre de diferentes formas na superfície da membrana gerando regiões com divisões de fases;
- A partir da análise de ângulo de molhabilidade verificou-se diminuição do perfil hidrofóbico da membrana decorrente da incorporação do fármaco, perfil este que permaneceu praticamente constante após os processamentos com diferentes concentrações de reticulante.
- A partir do ensaio de citotoxicidade pode-se constatar que a membrana de quitosana/fumarato de formoterol não apresenta toxicidade em meio biológico, o que torna a membrana um promissor candidato para testes *in vivo*.

REFERÊNCIAS

A, KGUL, A , AYFER T. Effect of formoterol on clinical parameters and lung functions in patients with bronchial asthma:randomesed controlled trial.Arch Dis Child 1999; 81:45-48

ALBUQUERQUE ,Carlos A.Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de sistema nanoscópios bioativos,2008.Dissertação em Engenharia de Materiais, Centro e Tecnologia, Universidade Federal de Itajubá- MG

AMERICAN THORACIC SOCIETY – Dyspnea: mechanisms assessment and management : A consensus statement Am J RespCrit Med 159 : 321-340 , 1999

ANDERSON, G. P. Formoterol: Pharmacology molecular basis of agonism, and mechanism of long duration of a hight potent and selective beta adren. receptor agonist bronchodilatador. Life Sciences, 52: 2145 – 60, 1993.

ARANAZ, I.;HARRIS, R. et. al. Chitosan amphiphilic derivatives. Chemistry and applications.Curr Org Chem14:308–330, 2010.

ARANAZ, I. et al Functional Characterizacion of chitin and chitosan Current Chemical Biology, v.3, p203-230,2009

AZEVEDO, J.R. et. al. Physical and chemical characterization insulin-loaded chitosan-TPP nanoparticles. J Therm Anal Calorim, 2011

AMERICAN THORACIC SOCIETY – Dyspnea: mechanisms assessment and management : A consensus statement Am J RespCrit Med 159 : 321-340 , 1999

BAGHERI-KHOULENJANI,S.;TAGHIZADEH, S. M. et. al. An investigation on the short-term biodegradability of chitosan with various molecular weights and degrees of deacetylation. CarbohydrPolym78:773–778, 2009.

Baloglu, E., M. Özyazici, S.Y. Hizarcioglu & H.A. Karavana (2003) // *Farmaco*58: 391-6.

BERGMAN, C. P.; STUMPF, A. Microstructure, Properties and Degradation.Dental Ceramics, VII, 84f, 2013.

BETHLEN, N. Pneumologia: Revisão Anátomo Fisiológica. 3ª.Ed., cap.2, pp.07, 1984.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J.M.; FELT, O.; PEPPAS, N.A.; GURNY, R.Structure and interactions in covalently andionicallycrosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications.European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v.57, p. 19-37, 2004.

BOUSQUET, J.; CHANEZ, P.; LACOSTE, J.Y.; BAMEON, G.; GHAVANIAN, N.; ENANDER et al. Eosinophilicinflammation in Asthma . N. Engl J Med; 323 (15): 1033-9, 1990.

BEPPU, M.M.; VIEIRA, R.S.; AIMALI, C.G.; SANTANA, C.C. Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde: effect on ion permeability and water absorption. *Journal of Membrane Science*, V. 301, p. 126-130, 2007

BUSSE, W.W.; LEMANSKE, R.F. *Asthma New England J Med* 2001 ; 344(5) ; 350-62. Comment in: *N Engl J Med*, 2001.

.(BRIAN J, Lipworth,MD and IMRAN Aziz, MD –Bronchodilator response to Albuterol after Regular Formoteroleffects of acute corticosteroid administration, *Chest* 2000 ; 117: 156-61

CABRAL, A. L.; SILVA, P. S.; RIBEIRO, J. D.; FERNANDES, J. C.; LOUREIRO, M.; CHUEIRI, C. FormoterolvsSalbutamol no tratamento de crises asmáticas leves e moderadas em crianças, 2001

CALVO, P.; REMUÑÀN-LOPEZ, C.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharm. Res.*, v.14, p. 1431-1436, 1997

CAVALCANTI A.S.R.deR.;Tese : Desenvolvimento do processo de extração de quitina e obtenção de quitosana para aplicação como biomateriais, Campina Grande , 2014.

CHAVES, E.L., MAGADÁN, J.M.M.; ROA, R.O.; GUZMAN, J.; SALGADO, J.R.,CRUZ, J.M. Molecular modeling and simulation of ion-conductivity in chitosan membranes. *Polymers*, v. 45, p. 7519-7527, 2005

COIMBRA, P. A. M. Preparação e Caracterização de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos com base em Polímeros de Origem Natural. Tese de Doutorado, Universidade de Coimbra, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2010.

CULLITY, B. D. , *Elements of X-Ray Diffraction – Cap 3-5.*; Addison-Wesley Publishing Company Inc. 1986,

II CONCENSO BRASILEIRO DE ASMA ,1999:39-40

DALLAN, P. R. M. Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração da pele. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. (Tese). 194f, 2005.

DAMIAN, C.; BEIRÃO, L.H.; FRANCISCO, A.; ESPIRITO SANTO, M. L. P.; TEIXEIRA, E. Quitosana: Um amino Polissacarídeo com características funcionais. *Alim.Nutri*, Araraquara, p. 195-205, 2005.

DAS,N.G.& S.K. DAS ,2003 *Pharm.Technol*27:10-6

DEDAVID,B.A;GOMES,C.I;MACHA:M, *Microscopia eletrônica de Varredura: Aplicações preparação de amostras:materiais poliméricos,metálicos semicondutores* PortoAlegre:EDIPUCRS,2007.

DOUGLAS C.R., Tratado de Fisiologia aplicado à saúde , 5ª edição Guanabara Koogan ., 2005

DUMITRIU, S. Polysaccharides as Biomaterials. In: DUMITRIUS, S. Polymeric Biomaterials. Marcel Dekker: New York, 2002.

IV DIRETRIZES BRASILEIRAS PARA O MANEJO DA ASMA. Jornal Brasileiro de Pneumologia, 2006.

DRAZEN, J.M.; BOCCUZZI, S.J.; WOJEN, J. Adherence to prescribed treatment for Astha. Am J Resp Crit Care Med, 2000.

DURAN N. & M.M. AZEVEDO 2002, Rede de pesquisa em nanobiotecnologia, Nanociência & nanotecnologia. Disponível em WWW.comciencia.br/reportagens/nanotecnologia/nano20.htm

FAN, M.; HU, Q.; SHEN, K. Preparation and structure of chitosan soluble in wide pH range. Carbohydrate Polymers, v. 78, p. 66-71, 2009.

FRAGA, A.F.; MARTINS, F.B.; RIGO, E.C.S; BOSCHI, A.O. Ensaio de membranas de quitosana recobertas com hidroxiapatita: efeito da adição de hidróxido de sódio. Anais. 17º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais. p. 2715-2725, 2006.

FILHO, P. A. T. Tratamento das exacerbações da asma, 2012.

FLOREZ, J. Farmacologia Humana 2ª edição Barcelona :MassouSalvat Medicina 1992

GINA - Global initiative for Asthma - 2011.

GEIGER, S.; COUARRAZE. Cross-linking of chitosan and chitosan/poly(ethylene oxide) beads: A theoretical treatment. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 67, p. 339-348, 2007

GINA – Global Initiative for Asthma – 2006

GOOGMAN & GILMAN. As bases farmacológicas da terapêutica, 10ª edição. Original: Carla de Melo Varsatz et al. Rio de Janeiro 2005.

GOODMAN & GILMAN, The pharmacological basis of therapeutics. New York, The McGraw-Hill Companies, Inc, 9th Ed, International Edition 1996

GUYTON & HALL, tratado de fisiologia médica 11ª edição, Unidade VII, Cap.37, pag 471, 2010.

HANCOX, R. J.; TAYLOR, D. C. Long Acting beta agonist treatment in patient with persistent Astha already receiving Inhaled corticosteroids. Biodrugs, 15 : 11-24, 2001.

HEJAZI, R.; AMIJI, M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems.

Journal of Controlled Release, v. 89, p. 151-165, 2003.

HELMENSTINE, A. M. Education Chemistry. Formoterol Chemical Structure, 2001.

HUGLES JM, Efects of fenoterol on immunological release of leucotrienes and histamine from human lung in vitro. J. Pharmacol 1983, 95:239

INTERNACIONAL STUDY OF ASTHMA AND ALLERGIES IN CHILDHOOD – ISSAC. Worldwide Variations in the prevalence of asthma Symptoms : The EurResp J 1998; 12(2) : 315-35 Comment in : EurResp J 1998

JAIN ,K.K, Ed Drug Delivery Systems CRC Press : Boca Raton, 2004

JUNIOR, O. A. C.M. Preparação, Modificação química e calorimetria Do biopolímero quitosana. 1999. 128f. Tese (Doutorado em Química)- Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

KIM,S: KIM,J.H : JEON, O :KNOW,I.C: PARK,K, Engineered polymers for advanced drug delivery. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2009, 71,(3), 420-430

KHOR, E.; LIM, L.Y. Implantable applications of chitin and chitosan. Biomaterials, v.24, p. 2339-234

KOETZ, J.; KOSMELLA, S. Eds. Polyelectrolytes and Nanoparticles. Springer: Berlin, 2007

KROEGEL, C. Global Initiative for Asthma Guidelines 15 Years of application Expert Ver. Clin. Immunol 5(3): 239-249, 2009.

KUMAR, M.; MUZZARELLI, R. A. A. et. al. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. Chem Rev 104:6017–6084, 2004.

KUMAR RK, understanding airway wall remodeling in Asthma .Pharmacol. The 2001

LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. Química Nova v.32, n.3, São Paulo, 2009.

LAMIM, R. Quitosana e N-Carboximetilquitosana: Desenvolvimento de biofilmes para aplicações farmacêuticas. Dissertação de mestrado disponível http://biblioteca.universia.net/html_bura/ficha/params/id/17368966.html, 2006. Acesso em 03/06/2014

LEHR, C. M.; BOUWSTRA, J. A. et. al. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. Int J Pharm 78:43–48, 1992.

LEMANSKE RF, Asthma. New England J. MED. 2001, 344(5) : 350.62

LI, Q. L.; CHEN, Z. Q.; DARVELL, B. W.; LIU, L. K.; JIANG, H. B.; ZEN, Q.; PENG, Q.; OU, G. M., Chitosan-phosphorylated chitosan polyelectrolyte complex hydrogel as an osteoblast carrier. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*, 82B, (2), 481-486, 2007.

LI,Z.S;RAMAY,H.R;HAUCH,K.D;XIAO,D.M;ZHANG,M.Q; Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering.*Biomaterials* 2005,26,(18),3919-3928

LOPES, C.M.L., J.M. S.Lobo, & P. Costa (2005)
*Rev. Bras. Ciênc.Farm.***41**: 143- 54

ILLUM, L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm Res*15:1326–1331, 1998.

YANG, J.; TIAN, F. et. al. Effect of chitosan molecular weight and deacetylation degree on hemostasis. *JBiomed Mater Res B ApplBiomater* 84B:131–137, 2008.

MADIHALLY, S. V.; MATTHEW, H.W.T. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering.*Biomaterials*20:1133–1142, 1999.

MANNING HL E SCHAWARTZSTEIN RM,Pathpphysiology of dyspnea.*New Engl.J.Med* 333-1547

MATTHEW, H.W.T. *Polymers for Tissue Engineering Scaffolds*.In:
DUMITRIUS, S. *Polymeric Biomaterials*. Marcel Dekker: New York, 2002.

MARTINEZ, J.A.B.; StracciaL ;Sobrani E ; Silva G A ; Vianna E S e Terra Filho -
DyspneaScales in pacientes withchronicobstructivepulmonardisease (COPD) *Am J. Med* 320: 240-243, 2000.

MARTINEZ, L.; AGNELY, F.; LECLERC, B.; SIEPMANN, J.; COTTE, M.;

MIRANDA, A., M. Millan& I. Caraballo (2006)
Int. J. Pharm. **311**: 75-81.

MINAGAWA, T.; OKAMURA, Y. et. al. Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing. *CarbohydrPolym*67:640–644, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - Secretaria Nacional de ações básicas. *Estatísticas de Saúde e mortalidade*. Brasília: Ministério da Saúde 2005.

MAUAD, T.; DOLHNIKOFF, M.; FERREIRA, D. S.; SIMOES, S.; SOUZA-MACHADO, A. *Imunopatologia e Remodelamento na Asma Grave*. *Gazeta Médica da Bahia*, v. 78, p. 75-85, 2008.

MONTENEGRO, M. N. *Fisiologia Humana - Componentes do sistema respiratório humano*, 2011. .

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

OLIVEIRA, R. B.; LIMA, E. M. Polímeros na obtenção de sistemas de liberação de fármacos. Revista Eletrônica de Farmácia, v. 3, p. 29-35, 2006

OPPENHEIMER J, NELSON HS, .Skin testing. Am Allergy Asthma Immunol,2006

PAÑOS, I.; ACOSTA, N. et. al. New drug delivery systems based on chitosan. Curr Drug Discov Technol5:333–341, 2008.

PARK, J.; LAKES, R.S. Biomaterials: an Introduction. 3th Edition. New York:Springer, 2007.

PATI, F.; ADHIKARI, B.; DHARA, S.; DEVELOPMENT OF CHITOSAN-TRIPOLYPHOSPHATE FIBERS THROUGH PH DEPENDENT IONOTROPIC GELATION, CARBOHYDRATE RESERCH, 2011.

PEDRO, A.S.; ALBUQUERQUE, E.C.; FERREIRA, D.; SARMENTO, B. Chitosan: An option for development of essential oil delivery systems for oral cavity care. Carbohydrate Polymers, 2009, doi: 10.1016/j.carbpol.2008.12.016..

REGO, M.G.B., S.F. Ligório, J.A. Cardilho, R.C. SIQUEIRA, R. Jorge & A.S.J. Cunha (2003) *Arq.Bras. Oftalmol.* 66: 891-6.

RIVA, R.; RAGELLE, H.; RIEUX, A.; DUHEM, N.; JEROME, C.; PRÈAT, V. Chitosan and Chitosan Derivates in Drug Delivery and Tissue Engineering, *AdvPolymSci*, PP.19-44, 244, 2011.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan:properties and applications.*ProgPolymSci* 31:603–632, 2006.

RINAUDO, M .Main Properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials.*PolymerInternacional* 2008,57,(3),397-430

RIVERO, S.; GARCIA, M.A.; PINOTTI, A. Composite and bi-layer films base don gelatin and chitosan.*Journal of Food Engineering*, v.90, p.531-539, 2009.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, v. 31, p. 603-632, 2006.

RODRIGUES, I.R. Síntese e Caracterização de Redes Poliméricas a base de Quitosana com PVP e PVA para Aplicação na Liberação Controlada de Fármacos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e Materiais. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Dissertação), 107f, 2006

RODRIGUES, I.C., A. Cerezo & I.I Salem (2000) *ArsPharmaceutica*41: 115-28.

RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E. BiomaterialsScience: A MultidisciplinaryEndeavor. In: RATNER, B.D.; s

Science: A Multidisciplinary Endeavor. In: RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E.; An Introduction to Materials in Medicine. Elsevier: Amsterdam, 2^a Ed. 2004.

RUDIN, A. The Elements of Polymers Science and Engineering: An Introductory Text and Reference for Engineers and Chemists. San Diego: Academic Press, 1999.

SANTOS, J. E. Preparação, Caracterização e estudos termoanalíticos de bases de Schiff biopoliméricas e seus complexos de cobre. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 124f, 2004.

SANTOS, C.; SEABRA, P.; VELEIRINHO, B.; DELGADILLO, I.; SILVA, J.A.L. Acetylation and molecular mass effect on barrier and mechanical properties of shortfin squid chitosan membranes. *European Polymer Journal*, v. 42, p. 3277-3285, 2006.

SMART, J.D. (2005) *Adv. Drug Delivery Rev.* **57**:1556-68.

SEALE JP. White beta adrenoreceptor agonists in treatment of Asthma? *Proc. Clin. Biol* 1988, 263:367

STADEL JM. Beta adrenergic receptors identification and characterization by radioligand binding studies. Clifton, NJ. Humana press 1991; 1-41

SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacéuticas e avanços. *Química nova*, v.29, n.4, p. 776-785, 2006.

Soane, R.J., M. Frier, A.C. Perkins, N.S. Jones, S.S. Davis & L. Illum (1999) *Int. J. Pharm.* **178**:55-65.

SASHIWA, H.; AIBA, S.I. Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials. *Prog Polym Sci* 29:887-908, 2004.

SOLÉ, D.; SARINHO, E. C. O Formoterol no Tratamento da Asma, 2010

SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E.; An Introduction to Materials in Medicine. Elsevier: Amsterdam, 2^a Ed. 2004.

SILVA, L. C. C. Compêndio de Pneumologia. Conceitos básicos da Fisiologia Pulmonar, 3^a Ed., cap. 3, pp. 17, 1986.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; Adriana Raffer Pohlmann – Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, V 26, 2003.

TAKAHASHI, T.; IMAI, M.; SUZUKI, I. Water permeability of chitosan membrane involved in deacetylation degree control. *Biochemical Engineering Journal*, v.36, p. 43-48, 2007

TANAKA,N,K.IMAI,K.OKIMOTO,S.UEDA,Y.TOKUNAGA,R.IBUKI,K.HIGAKI,T.KIMURA & T.OHIKE(2005)J.Control Release 108:386-95.

THACHARODI,D&K.P.RAO,1996 - Biomaterials 17: 1307-11

THANOU, M. et al. Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives separation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v 52 ,p 117-126, 2001.

TOKURA, S.; TAMURA, H. Chitin and Chitonsa. In: KAMERLING, T.P.; BOONS, G.J.; LEE, Y.C.; SUZUKI, A.; TANIGUCHI, N.; VORAGEM, A.G.J.*Comprehensive Glycoscience from Chemistry to Systems Biology*.Elsevier.2007

TURNER MO, Risk factors for near-fatal asthma. *Am. J. Resp. Crit. Care Med*,1998,157:180

URAGAMI, T.; TOKURA, S. *Materials Science of Chitin and Chitosan*.Japan:Kodansha Ltd., 2006.

VALENTA, C. (2005) *Adv. Drug Delivery Rev.* **57**:1692-712.

VARUM, K.M.; MYHR, M.M. et. al. In vitro degradation rates of partially N-acetylated chitosans in human serum. *Carbohydr Res*299:99–101, 1997.

VANDEVORD,P.J.; MATTHEW, H.W.T. et. al. Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. *J Biomed Mater Res*59:585-590, 2002.

VARSHOSAZ, J. The promise of chitosan microspheres in drug delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv*4:263–273, 2007.

VENDRUSCOLO, C.W., I.F. ANDREAZZ J.L.M.S. Ganter, C. Ferrero & M.B. Bresolin (2005) *Int. J. Pharm.* **296**: 1-11.

VAZ C.M.; VanDoeveren,P.F..N.M; REIS,R.L.;CUNHA,A.M,Soy matrix drug delivery systems obtained by melt-processing techniques.*biomacromolecules* 2003,4(6) 1520-1529

VARSHOSAZ, J. The promise of chitosan microspheres in drug delivery systems.*Expert Opin Drug Deliv*4:263–273, 2007.

VENDRUSCOLO, C.W., I.F. Andreazz, J.L.M.S.Ganter, C. Ferrero & M.B. Bresolin (2005) *Int.J. Pharm.* **296**: 1-11.9. Chavanpatil, M.D., P. Jain, S.

WANG,L.H;KHOR,E.;WEE,A.;LIM,L.Y.:Chitosan-alginate PEC membrane as a wound dressing: Assessment of incisional wound healing.*Journal of Biomedical Materials Research* 2002,63(5),610-618

WEST, J. B. *Fisiologia Respiratória Moderna*, 1996.

WILLIAMS, D.F. Definitions in biomaterials. *Journal of Biomechanics* V 22, p 79-151, 1999.

WONG, T.W. Chitosan and Its Uses in Design of Insulin Delivery System. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, v. 3, p.8-25, 2009

WOLFSON, M. R.; SHAFFER, P. H. *Musculatura Respiratória Moderna*, 1996.

ZHANG, M.; et. al. Properties and Biocompatibility of chitosan films modified by blending with PEG. *Biomaterials*, v.23, p. 2641-2648, 2002.