



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



JORGE ALBERTO SILVA TRIGUEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA
QUITOSANA/OPIÓIDES PARA USO PÓS-CIRURGICO**

**CAMPINA GRANDE
2013**

JORGE ALBERTO SILVA TRIGUEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA
QUITOSANA/OPIÓIDES PARA USO PÓS-CIRURGICO**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Engenharia de Materiais
como requisito à obtenção do
título de mestre em Ciência e
Engenharia de Materiais

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

CAMPINA GRANDE
2013



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCC

T828d Trigueiro, Jorge Alberto Silva. 1990.
Desenvolvimento de sistemas de liberação controlada quitosana/opioides para uso pós-cirúrgico / Jorge Alberto Silva Trigueiro. – Campina Grande, 2013.
59 f.: il. Color.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia.

"Orientação: Prof. Dr. Reginaldo Severo de Macedo".
Referências.


1. Biomateriais. 2. Quitosana. 3. Fentanil. I. Macedo, Reginaldo Severo de. II. Título.

CDU 577.114.4(043)

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA
QUITOSANA/OPIÓIDES PARA USO PÓS-CIRURGICO**

JORGE ALBERTO SILVA TRIGUEIRO

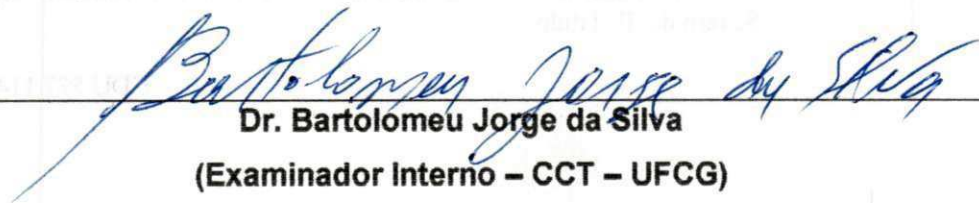
Dissertação Aprovada em 29/11/2013 pela banca examinadora constituída dos seguintes membros:



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



Dr. Rosemberg Cardoso Barbosa
(Examinador Interno - CCT - UFCG)



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

DEDICATÓRIA

Dedicado ao maior poder dentro de você – seu poder de amar e realizar – e todos aqueles que ajudaram a compartilhar sua magia.

E também a:

Celecina (autora do autor),

Rosângela, minha adorada esposa,

Jorge Alberto Filho, Yuri Trigueiro, meus queridos e inesquecíveis filhos.

In memoriam:

Em lembrança do meu pai, Otávio (co-autor do autor) e da minha querida filha, Ilanna, com rotineira saudade e emoção.

AGRADECIMENTOS

Quando começo a pensar em todas as pessoas às quais gostaria de expressar minha gratidão pela ajuda, sugestões e árduo trabalho para tornar esta dissertação apresentável, a lista não para de crescer. Primeiro, agradeço a Deus, fonte de inspiração e luz, e à minha esposa e família, por permitirem um ambiente onde pude concentrar-me para expressar minhas ideias com poucas interrupções ou distrações.

Óbvio, houve esforços conjuntos de vários colegas da Universidade Federal da Paraíba, pelo contínuo e decisivo poder de convencimento em perseverar e atingir este objetivo.

Meus agradecimentos também ao meu professor e orientador Reginaldo Severo de Macedo e Marcus Vinícius Fook, cujas personalidades, métodos e benevolências muito me sensibilizaram – desde a minha primeira volta ao passado, onde pude lembrar, depois de quase meio século, ligações químicas e tabela periódica – nunca poderiam ser esquecidos.

E por último, mas não menos importante, especiais agradecimentos ao pessoal da Associação Médica da Paraíba e a UFCG, que em parceria com o Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais/UAEMa e CERTBIO, e a dezenas de membros da equipe que permitiu e disponibilizou incontestes condições para a plena execução desta dissertação.



The cry – Edvard Munch (1863 – 1944)

“A DOR APODEROU-SE DO MEU CORPO. PODE DEUS LIVRAR-ME DESTE SOFRIMENTO?”.

Há 4 mil anos esta citação foi encontrada em escrita cuneiforme numa pedra em Nippur-Babilônia, referindo-se a uma prece da filha de um rei da época.

Esta é o 1º registro escrito conhecido sobre o sofrimento e a angústia da dor.

É muito triste encarar o fato que por mais de 4000 anos os seres humanos vivem e morrem sob o martírio da dor.

Este quadro, “O Grito” – de autoria do norueguês Edvard Munch (1863-1944) – é considerada a sua obra máxima, e uma das mais importantes da história do expressionismo. Reforça a necessidade de que eliminar a dor e o sofrimento que ela determina, deve ser prioridade extensiva a todos os profissionais de saúde.

RESUMO

Na terapia medicamentosa convencional, o fármaco é administrado através de uma forma farmacêutica e produz um nível tecidual do fármaco que não se mantém dentro da faixa terapêutica por um período prolongado de tempo. A importância dos sistemas de liberação de princípios ativos advém do fato que raramente um fármaco consegue atingir um alvo específico no organismo em concentrações adequadas para provocar o efeito terapêutico esperado. Um sistema ideal de distribuição de fármacos deve ser biocompatível, facilmente liberado, permitir um controle da taxa de distribuição de fármacos e não deve alterar a atividade do fármaco na distribuição, ultimamente a quitosana tem ganhado amplo espaço entre os materiais utilizados na confecção desses sistemas por atender a essas necessidades. Baseado no exposto este trabalho teve como objetivo desenvolver um sistema de liberação controle de fentanil a partir de membranas Quitosana/ Fentanil nas proporções de 5, 3 e 1 % de fármaco. O fentanil foi adicionado a solução de quitosana e submetida a secagem do solvente para formação das membranas, as mesmas foram caracterizadas para avaliar as interações fármaco/ polímero. Observou-se que a adição do fentanil apropriou aspecto cristalino as membranas, tornando-as menos suscetíveis a biodegradação *in vitro*. As estruturas finais apresentaram-se rugosas e com pequenos grãos dispersos em sua superfície, grãos esses que foram considerados contaminantes oriundos do processamento industrial do fármaco. Houve uma diminuição na hidrofiliabilidade diretamente proporcional ao aumento da concentração de fármaco e não apresentaram toxicidade. Diante do exposto pode-se concluir que a metodologia empregada para a síntese das membranas Quitosana/ Fentanil apresentou-se eficaz. As análises efetuadas sugerem a presença de fentanil nas membranas sintetizadas acarretando variações na sua degradabilidade, indicando ser um promissor material para utilização em sistemas de liberação controlada de fármaco.

Palavras-chave: Biomateriais. Quitosana. Fentanil.

ABSTRACT

In conventional drug therapy, the drug is administered in a dosage form and produces a tissue level of the drug is not maintained within the therapeutic range over an extended period of time. The importance of the release of active principles stems from the fact that a drug can rarely achieve a specific target in the body in adequate concentrations to cause the expected therapeutic effect systems. An ideal drug delivery system should be biocompatible , easily released , allowing a control of the rate of drug delivery and should not alter the activity of the drug distribution lately chitosan has gained wide space between the materials used in the manufacture of these systems meet these needs . Based on the above this study aimed to develop a system of controls release of fentanyl parti membrane Chitosan / Fentanyl in the proportions of 5 , 3 and 1 % drug . Fentanyl was added to chitosan solution and subjected to drying the solvent to form the membranes , they were characterized to assess the drug / polymer interactions. It was observed that the addition of fentanyl appropriated Crystalline membranes , making them less susceptible to biodegradation in vitro. The final structures had become rough and small grains scattered on its surface , these grains that were considered contaminants originating from industrial processing of the drug . There was a decrease in hydrophilicity directly proportional to the increase of drug concentration and showed no toxicity. Given the above it can be concluded that the methodology used for the synthesis of membranes Chitosan / Fentanyl appeared to be effective . Analyses suggest the presence of fentanyl in the synthesized membranes causing changes in its degradability , could be a promising material for use in controlled release drug delivery systems .

Keywords : Biomaterials . Chitosan . Fentanyl .

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Comparação das variações de concentração de fármacos administrados por (a) métodos convencionais de multidosagem e (b) sistemas de liberação controlada. A = dose do fármaco	21
Figura 2 – Figura esquemática representando as principais barreiras encontradas pelos fármacos em seu caminho até seu destino	22
Figura 3 – Classificação da liberação controlada de fármaco e suas principais vias de administração.....	23
Figura 4 – Estrutura da quitosana	24
Figura 5 – Derivados e aplicações de quitosana	26
Figura 6 – 1Ângulo de contato	35
Figura 7 – Membrana Quitosana\ Fentanil 1%	37
Figura 8 – Membrana Quitosana\ Fentanil 3%	37
Figura 9 – Membrana Quitosana\ Fentanil 5%	37
Figura 10 – Difractogramas das membranas de Quitosana\ Fentanil 5%; Quitosana\ Fentanil 3%; Quitosana\ Fentanil 1% e Quitosana	38
Figura 11 – Calorimetria exploratória diferencial das membranas a - Quitosana\ Fentanil 1%; b – Quitosana\ Fentanil 3% e c – Quitosana\ Fentanil 5%	39
Figura 12 – Microscopia Óptica das membranas de quitosana, a – 350x; b – 1050x e c – 2100x.....	40
Figura 13 – Microscopia Óptica das membranas Quitosana\ Fentail 5% nos aumentos a – 350x; b – 1050x e c – 2100x.....	41
Figura 14 – Microscopia Óptica das membranas Quitosana\ Fentail 3% nos aumentos a – 350x; b – 1050x e c – 2100x.....	42
Figura 15 – Microscopia Óptica das membranas Quitosana\ Fentail 1% nos aumentos a – 350x; b – 1050x e c – 2100x.....	42
Figura 16 – Microscopia Eletrônica de Varredura das membranas de quitosana, a – 1500x. b – 5000x e c 10000x	43
Figura 17 – Microscopia Eletrônica de Varredura das membranas Quitosana\ Fentanil 5%, a – 1500x. b – 5000x e c 10000x.....	43
Figura 18 – Microscopia Eletrônica de Varredura das membranas Quitosana\ Fentanil 3%, a – 1500x. b – 5000x e c 10000x.....	44

Figura 19 – Microscopia Eletrônica de Varredura das membranas Quitosana\Fentanil 1%, a – 1500x. b – 5000x e c 10000x.....	44
Figura 20 – Espectroscopia dispersiva de raios X da membrana Quitosana\Fentanil 5%	45
Figura 21 – Espectroscopia dispersiva de raios X da membrana Quitosana\Fentanil 5%, análise pontual do grão	46
Figura 22 – Espectroscopia dispersiva de raios X da membrana Quitosana\Fentanil 3%	47
Figura 23 – Espectroscopia dispersiva de raios x da membrana Quitosana\Fentanil 3%, análise pontual do grão	47
Figura 24 – Espectroscopia dispersiva de raios X da membrana Quitosana\Fentanil 1%	48
Figura 25 - Espectroscopia dispersiva de raios X da membrana Quitosana\Fentanil 1%, análise pontual do grão	49
Figura 26 – Tensão superficial por medida do ângulo de contato para as membranas Quitosana; Quitosana\Fentanil 1%; Quitosana\Fentanil 3% e Quitosana\Fentanil 5%	50
Figura 27 – Membrana Quitosana/ Fentanil a – 3% e b – 1% após 14 dias de ensaio.....	51
Figura 28 – Resultados do ensaio de citotoxicidade.	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de aplicação biomédica de polímeros.....	19
Tabela 2 - Receptores opióides e suas ações.....	28
Tabela 3 - Ensaio de biodegradação <i>in vitro</i>	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivos gerais	16
2.2	Objetivos específicos	16
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
3.1	Biomateriais	17
3.2	Liberação controlada de fármacos	19
3.3	Quitosana	23
3.4	Opiáceo	27
3.4.1	<i>Efeitos dos opióides</i>	28
3.5	Dor	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1	Local da pesquisa	32
4.2	Materiais	32
4.2.1	<i>Biopolímero</i>	32
4.2.2	<i>Reagentes</i>	32
4.2.3	<i>Animais</i>	32
4.3	Métodos	33
4.3.1	<i>Preparação das membranas de quitosana e quitosana\ fentanil</i>	33
4.3.2	<i>Caracterização das membranas</i>	33
4.3.2.1	<i>Difração de raio X (DRX)</i>	34
4.3.2.2	<i>Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</i>	34
4.3.2.3	<i>Microscopia Óptica (MO)</i>	34
4.3.2.4	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	34
4.3.2.5	<i>Tensão superficial/ Molhabilidade</i>	35
4.3.2.6	<i>Ensaio de Biodegradação in vitro</i>	36
4.3.2.7	<i>Ensaio de citotoxicidade</i>	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1	Difração de raios X (DRX)	38
5.2	Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	39
5.3	Microscopia Óptica (MO)	40
5.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	42

5.5	Espectroscopia dispersiva de raios X (EDS)	45
5.6	Tensão superficial/ Molhabilidade	49
5.7	Ensaio de Biodegradação in vitro.....	50
5.8	Ensaio de citotoxicidade	52
6	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

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 por 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 (WILLIAMS, 1999).

Os biomateriais apresentam classificação de acordo com a composição química em materiais sintéticos metálicos, cerâmicos, poliméricos, compósitos e naturais como: colágeno, elastina, quitina e de acordo com o comportamento fisiológico em bioinerte, biotolerável, bioativo, biorreativo e bioabsorvível (WILLIAMS, 1999).

O surgimento da engenharia de tecidos como disciplina acadêmica e da indústria global abriu oportunidades sem precedentes para o desenvolvimento de terapias avançadas para o tratamento de doenças congênitas ou adquiridas. A engenharia de tecidos fornece novas combinações de células, biomateriais, medicamentos, produtos de genes, ou genes que podem ser projetados, especificados, fabricados e fornecidos de forma simultânea ou sequencialmente, como agentes terapêuticos (WILLIAMS, 1999).

Na terapia medicamentosa convencional, o fármaco é administrado através de uma forma farmacêutica e produz um nível tecidual (geralmente sanguíneo) do fármaco, que não se mantêm dentro da faixa terapêutica, por um período prolongado de tempo. A importância dos sistemas de liberação de princípios ativos advém do fato que raramente um fármaco veiculado em solução aquosa, ou numa forma convencional, consegue atingir um alvo específico no organismo em concentrações adequadas para provocar o efeito terapêutico esperado. Um sistema ideal de distribuição de fármacos deve ser biocompatível, facilmente liberado, permitir um controle da taxa de distribuição de fármacos e não deve alterar a atividade do fármaco na distribuição, ultimamente a quitosana tem ganhado amplo espaço entre os materiais

utilizados na confecção desses sistemas por anteder as essas necessidades (BOYCE, 2002; LEE e ROBINSON, 2004; DRUMMOND, 1999; FELDMAN et al., 2003)

A quitosana é obtida pela desacetilação parcial da quitina, sendo, portanto, um polímero de longa cadeia linear composto por monômeros de 2-amino-2-desoxi-D-glucose (GlcN) e de N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucose (GlcNAc) unidos por ligações covalentes β -1,4 (FERNANDES et al, 2011; KRAJEWSKA, 2004).

A quitosana apresentam diversas propriedades biológicas, como biocompatibilidade, biodegradabilidade, hemostáticas, analgésicas, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes, anti-colesterolêmicas, antitumorais e imunoestimuladoras (XIA et al. 2011; SHAHIDI, ARACHCHI e JEON, 1999; KIM e RAJAPAKSE, 2005).

Os materiais naturais, incluindo polímeros como a quitosana têm sido aplicados topicamente nos sistemas de liberação de fármacos apresentando vantagens com relação aos materiais sintéticos, onde em estudos, membranas e microesferas de quitosana apresentaram grande permeabilidade tanto para fármacos ácidos, degradação controlada pelas células de acordo com os mecanismos fisiológicos como para fármacos básicos. Os opióides permanecem como os fármacos mais efetivos e mais comumente utilizados no tratamento da dor moderada a intensa. As diferenças de respostas dos pacientes ao uso dos opióides são aceitas, atualmente, por serem devidos a polimorfismos genéticos relacionados aos receptores opioides (FELDMAN et al., 2003; SINHA et al., 2004; MINSON, et al. 2010).

O Fentanil transdérmico (tipo de opióide) é um potente agonista com meia-vida longa, que não deve ser usado para titulação rápida. O fentanil transdérmico deve ser considerado quando o paciente já está em terapia com opióide, com dor constante, mas com pouca dor episódica (WILLIAMS, 1999).

Em face das propriedades intrínsecas da quitosana e a possibilidade de uma melhoria na analgesia pós-operatória, particularmente, da analgesia pós-amidalectomia, esse projeto visa o desenvolvimento de um dispositivo para liberação controlada de fármaco que amenize os sintomas de dor pós-operatória, associando as propriedades da quitosana ao opióide (fentanil) em uma membrana com esta finalidade.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver membranas poliméricas de quitosana e fentanil para uso em sistema de liberação controlada de fármacos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a incorporação do fentanil na membrana de quitosana;
- Analisar, comparativamente, a molhabilidade das membranas de quitosana e das desenvolvidas com quitosana/fentanil;
- Verificar a estabilidade das membranas em condições de biodegradação;
- Estabelecer perspectivas de liberação controlada do fentanil, a partir das membranas desenvolvidas.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 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 definiu 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 e ÉDEN, 1984).

A biocompatibilidade é um termo que abrange vários aspectos do material, incluindo desde suas propriedades físicas, mecânicas e químicas até seu potencial citotóxico, alergênico e mutagênico, não apresentando efeitos tóxicos ou causando injúrias na função biológica. Trata-se, portanto, a relação entre um material e o organismo, de tal forma que ambos não produzam efeitos indesejáveis (LEMMONS e NATIELLA, 1986; SHMALZ, 2002).

O uso de biomateriais não se tornou prática até o advento de uma técnica asséptica cirúrgica desenvolvida pelo Dr. J. Lister, em 1860. Procedimentos cirúrgicos anteriormente quer biomateriais envolvidos ou não, foram geralmente mal sucedidos resultando em infecções. Problemas de infecção tendem a ser exacerbada na presença de biomateriais, uma vez que o implante pode proporcionar uma região inacessível às células imunologicamente competentes do corpo. Os primeiros implantes bem sucedidos foram no sistema esquelético. Placas ósseas foram introduzidas no início de 1900 para ajudar na fixação das fraturas de ossos longos. Muitas dessas placas iniciais quebraram. Também, materiais tais como o aço de vanádio, o qual foi escolhido por suas boas propriedades mecânicas, corroído

rapidamente no corpo, causou efeitos adversos sobre os processos de cura. Após a introdução de aços inoxidáveis e ligas de cromo-cobalto na década de 1930 foi alcançado um maior sucesso em fixação de fraturas, e as primeiras cirurgias de substituição articular puderam ser realizadas. Quanto aos polímeros, descobriu-se que os pilotos de avião na II Guerra Mundial que foram feridos por fragmentos de plástico (polimetacrilato de metilo) do dossel da aeronave não sofrem reações adversas crônicas pela presença dos fragmentos no corpo (BLACK, 1992; BRUCK, 1980; HENCH e ERTHRIDGE, 1982).

Os biomateriais apresentam classificação de acordo com a composição química em materiais sintéticos metálicos, cerâmicos, poliméricos, compósitos e naturais como: colágeno, elastina, quitina e de acordo com o comportamento fisiológico em bioinerte, biotolerável, bioativo, biorreativo e bioabsorvível (WILLIAMS, 1999).

Os polímeros são os materiais mais amplamente utilizados em aplicações biomédicas devido à facilidade de fabricação na variedade de formas, processabilidade, custo favorável e disponibilidade aliadas as propriedades físicas e mecânicas desejadas. Eles são os materiais de escolha para dispositivos cardiovasculares, bem como para a substituição de vários tecidos moles. Os polímeros também são utilizados em sistemas de distribuição de drogas e em aparelhos de diagnóstico, com amplas aplicações em engenharia de tecidos. Exemplos de aplicações atuais incluem enxertos vasculares, válvulas cardíacas, corações artificiais, implantes de mama, lentes de contato, lentes intra-oculares, componentes de oxigenadores extracorpórea, dialisadores e unidades de plasmáfêrese, revestimentos para comprimidos e cápsulas farmacêuticas, suturas, adesivos, e os substitutos do sangue (PARK e LAKES, 1992; BORETOS e EDEN, 1984). Exemplos de polímeros e os seus usos são dados na Tabela 1.

Tabela 1 - Exemplos de aplicação biomédica de polímeros.

Aplicações	Polímero(s)
Implantes cardíaco-vasculares	Poliétileno; cloridrato de polivinil; poliéster; silicone; borracha; politetrafluoretileno
Implantes ortopédicos	Poliétileno de alto peso molecular; poli(metil metacrilato)
Liberação de drogas	Poli(co-glicólido láctico)
Engenharia de tecidos	Poli(ác. láctico; poli(ác. Glicólico; poli(co-glicólido láctico)

Fonte: Adaptado de BORETOS; EDEN (1984).

A aplicação de um biomaterial deve ser baseada em vários critérios como, propriedades físico-químicas e durabilidade do material, a função desejada da prótese, a natureza do meio ambiente fisiológico no nível do órgão / tecido, bem como problemas de custo e de produção. Biocompatibilidade é o critério fundamental que deve ser cumprida por todos os biomateriais (COOK, LEMONS e RATNER, 1996; PEPPAS e LANGER, 1994; RATNER, 1993), ultimamente, vem crescente a utilização dos biomateriais para sistemas de liberação controlada de fármacos.

3.2 Liberação controlada de fármacos

Na terapia medicamentosa convencional, o fármaco é administrado através de uma forma farmacêutica e produz um nível tecidual (geralmente sanguíneo) do fármaco, que não se mantêm dentro da faixa terapêutica, por um período prolongado de tempo. Desta forma, o êxito do tratamento vai depender de vários fatores como dosagens precisas e frequentes, em horários específicos pré-determinados e adesão do paciente à terapêutica, de modo que a não obediência ao esquema terapêutico pode resultar em utilização do fármaco em faixa não efetiva ou em níveis tóxicos (LEE e ROBINSON, 2004).

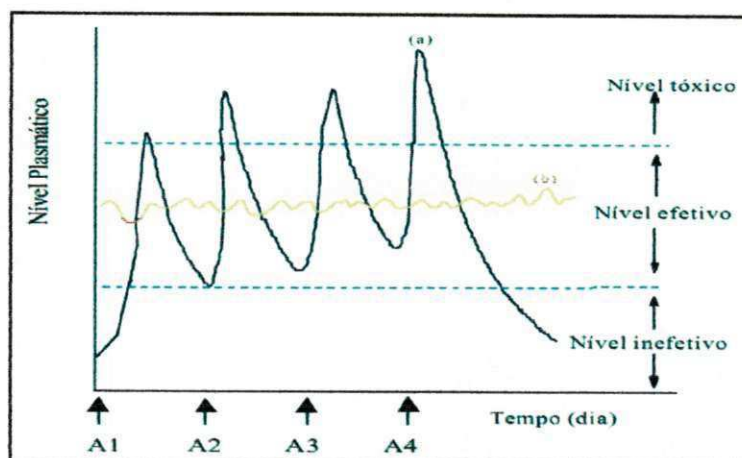
A partir da década de 1950 iniciaram-se estudos de processos de liberação controlada de substâncias biologicamente ativas, sendo que anteriormente não se conheciam materiais que pudessem liberar moléculas de massa molecular alta, tais como peptídeos e proteínas sem induzir inflamações (FOLKMANN, 1990).

A importância dos sistemas de liberação de princípios ativos advém do fato que raramente um fármaco veiculado em solução aquosa, ou numa forma convencional, consegue atingir um alvo específico no organismo em concentrações adequadas para provocar o efeito terapêutico esperado. Isso pode ser facilmente entendido quando verificamos que entre o local de administração do fármaco e o órgão ou tecido alvo, se interpõe uma série de obstáculos de naturezas diversas (anatômicos, químicos e biológicos), que devem ser vencidos para que se obtenha o efeito desejado. Somente uma parte em dez mil de um fármaco injetado intravenosamente alcança seu alvo celular final quando o alvo está localizado em sítios profundos (DRUMMOND, 1999).

A liberação controlada de fármacos proporciona algumas vantagens em relação aos sistemas convencionais de multidosagem de fármacos, como melhora da eficácia, diminuição da toxicidade, liberação do fármaco no local específico de ação (direcionamento de fármacos), mascaramento do sabor/odor desagradável de alguns fármacos, diminuição do número de doses diárias, tratamento contínuo (sem administrações noturnas), proteção do fármaco de uma eventual degradação pelos componentes dos fluidos biológicos, diminuição ou mesmo desaparecimento dos picos plasmáticos, diminuição ou eliminação dos efeitos locais e sistêmicos além de otimização da administração de produtos oriundos da biotecnologia, tais como vacinas, peptídeos e proteínas, entre outras (AZEVEDO, 2002).

Comparando-se, na Figura 1, o método convencional de multidosagem e o sistema de liberação controlada percebe-se que o primeiro está longe do ideal, proporcionando variações consideráveis na concentração do fármaco no plasma sanguíneo, podendo não haver efeito farmacológico ou ocasionar intoxicação, pois há uma faixa de concentração efetiva para a ação no organismo. Já o método de liberação controlada proporciona uma pequena variação na concentração do fármaco com o tempo, impossibilitando inefetividade ou toxicidade (VULCANI, 2004).

Figura 1 - Comparação das variações de concentração de fármacos administrados por (a) métodos convencionais de multidose e (b) sistemas de liberação controlada. A = dose do fármaco.



Fonte: Adaptado de VULCANI (2004).

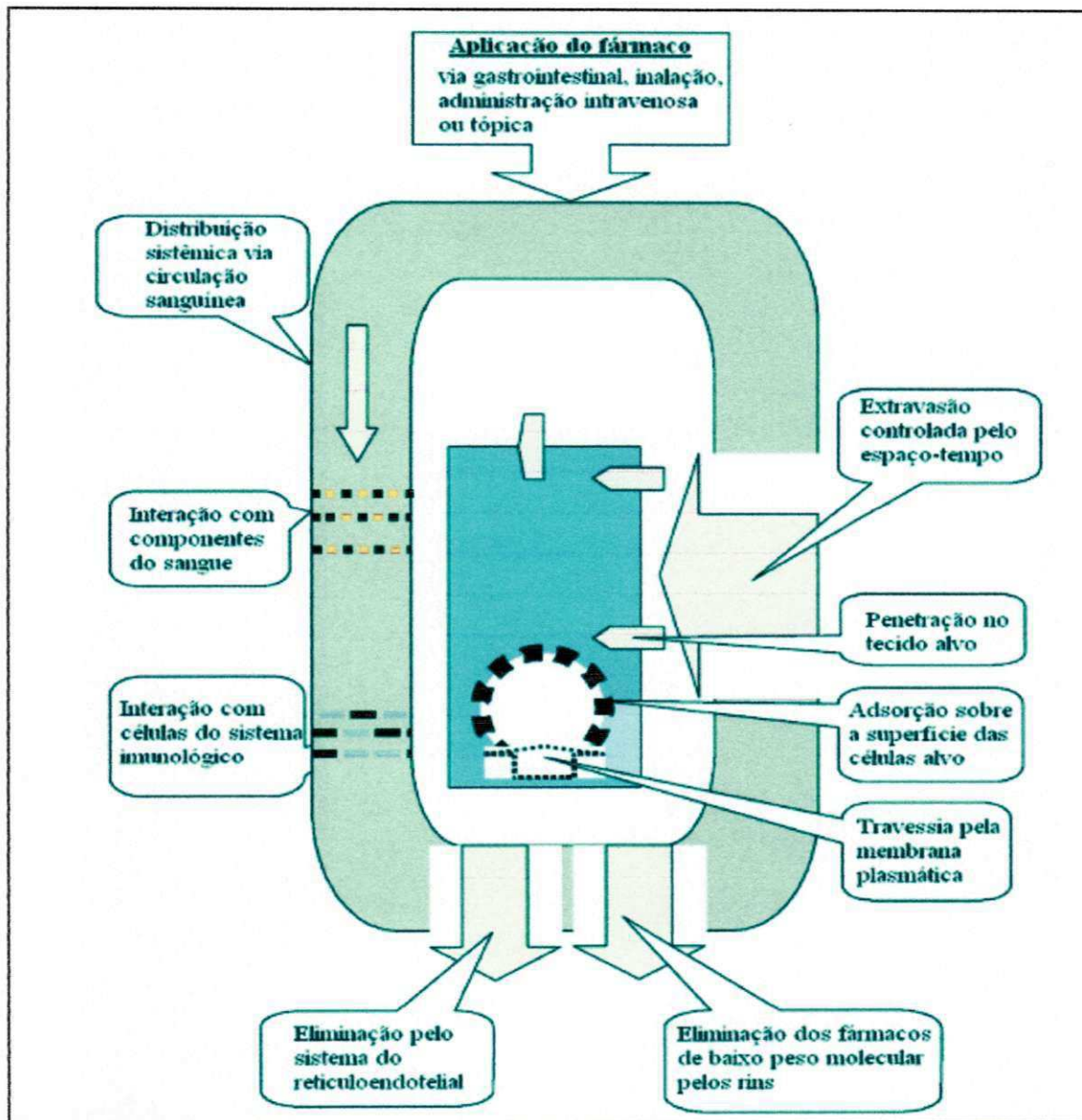
Os sistemas de liberação controlada oferecem algumas vantagens sobre os métodos convencionais que liberam o agente ativo em um curto período de tempo (GRAHAM, 1998), como por exemplo:

- Manutenção de níveis constantes de substância no organismo, implicando em uma eficiência maior na utilização do agente, ou seja, é necessário menor quantidade de fármaco para produzir o mesmo efeito que os sistemas convencionais;
- Aplicações do agente diretamente no sítio de ação, produzindo altas concentrações localizadas e evitando efeitos colaterais sistêmicos;
- Menos frequência de administração do agente ativo, aumentando o conforto do paciente e a eficácia do tratamento.

Existem muitas barreiras potenciais para a liberação eficiente e seletiva de um fármaco na sua forma ativa. A maioria dos agentes terapêuticos são moléculas pequenas que têm vasta gama de distribuição no organismo após sua injeção intravenosa. O resultado disto é frequentemente um baixo índice terapêutico devido aos altos índices de toxicidade nos tecidos saudáveis. Para conseguir seus objetivos, o fármaco, deve penetrar várias barreiras biológicas e está sujeito à eliminação por uma variedade de processos. Na Figura 2

observa-se a representação esquemática das principais barreiras encontradas pelo fármaco em sua rota até seu destino (DRUMMOND, 1999; LAGNER e UGORSKI, 2000).

Figura 2 - Figura esquemática representando as principais barreiras encontradas pelos fármacos em seu caminho até seu destino.

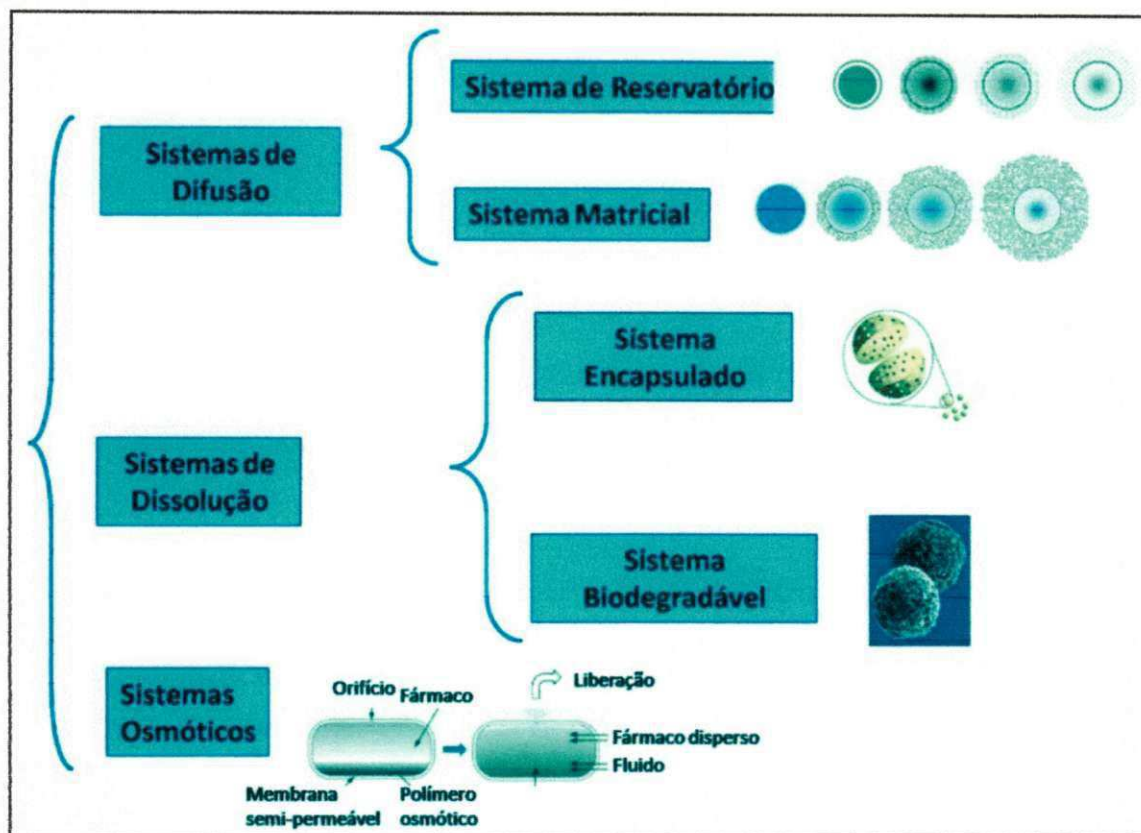


Fonte: LAGNER e UGORSKI, (2000).

Em geral, a liberação controlada de fármaco utiliza como métodos de liberação a difusão, a dissolução e a osmose, nos quais quase sempre é possível utilizar o sistema de reservatório e o sistema matricial. Na Figura 3

constam os principais itens de classificação da Liberação Controlada de Fármacos (FELDMAN et al., 2003).

Figura 3 - Classificação da liberação controlada de fármaco e suas principais vias de administração.



Fonte: LIMA, (2010).

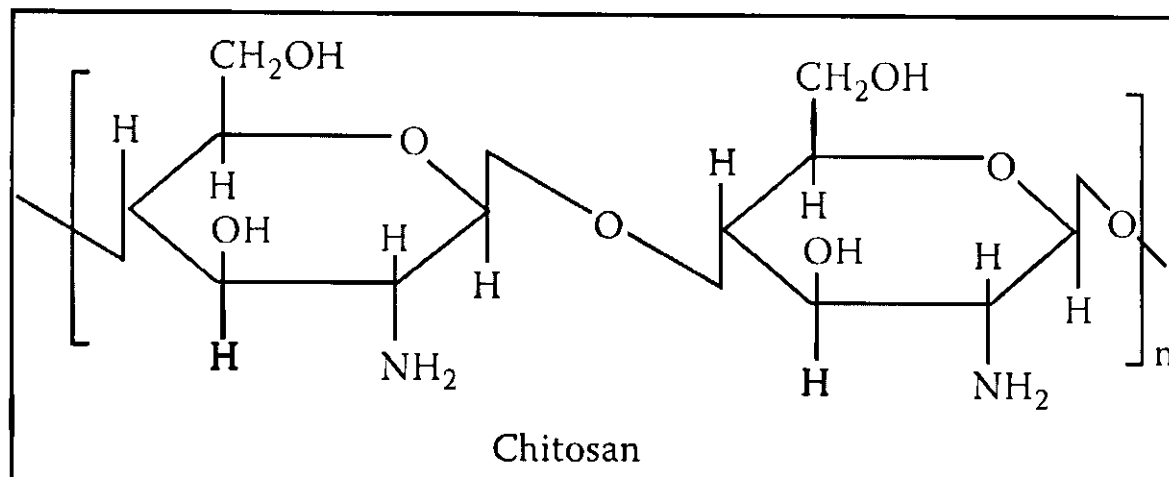
Um sistema ideal de distribuição de fármacos deve ser biocompatível, facilmente liberado, permitir um controle da taxa de distribuição de fármacos e não deve alterar a atividade do fármaco na distribuição (FELDMAN et al., 2003), ultimamente a quitosana tem ganhado amplo espaço entre os materiais utilizados na confecção desses sistemas por atender a essas necessidades.

3.3 Quitosana

A quitosana (Figura 4) é obtida por desacetilação parcial da quitina, sendo, portanto, um polímero de longa cadeia linear composto por monômeros de 2 amino-2-desoxi-D-glucose (GlcN) e de N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucose (GlcNAc) unidos por ligações covalentes β -1,4. A distinção entre a

quitina e a quitosana é baseada no grau de acetilação (GA), considerando-se que a quitosana corresponde ao polissacarídeo com GA inferior a 50 % (FERNANDES, et al. 2011; KRAJEWSKA, 2004).

Figura 4 - Estrutura da quitosana.



Fonte: KUMAR, (2000).

Esse polímero natural possui uma estrutura cristalina, sendo, dessa forma insolúvel em meio aquoso e na maioria dos solventes orgânicos e tem baixa reatividade química (LARANJEIRA e FEVERE, 2009).

A quitina é encontrada em abundância na natureza e tem como principais fontes naturais as carapaças de crustáceos (notadamente caranguejo, camarão e lagosta), sendo também encontrada em insetos, moluscos e na parede celular de fungos (DALLAN, 2005).

A quitosana apresenta elevada biocompatibilidade e biodegradabilidade. Estas propriedades dependem das características da amostra (fonte de onde foi extraída, o método de obtenção, GA e MM). Embora esteja ausente nos mamíferos, a quitosana pode ser degradada *in vivo* por várias enzimas proteolíticas, como a lisozima, a papaína e a pepsina. A sua biodegradação leva à liberação de oligoquitosanas de comprimento variável (ARANAZ et al., 2009).

A quitosana apresentam diversas propriedades biológicas, como biocompatibilidade, biodegradabilidade, hemostáticas, analgésicas, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes, anti-colesterolémicas,

antitumorais e imunoestimuladoras. Por isso, têm atraído interesse científico e industrial em áreas como biotecnologia, farmacêutica, biomedicina, cosméticos e indústria alimentar, entre outros (XIA et al. 2011; SHAHIDI, ARACHCHI e JEON, 1999; KIM e RAJAPAKSE, 2005).

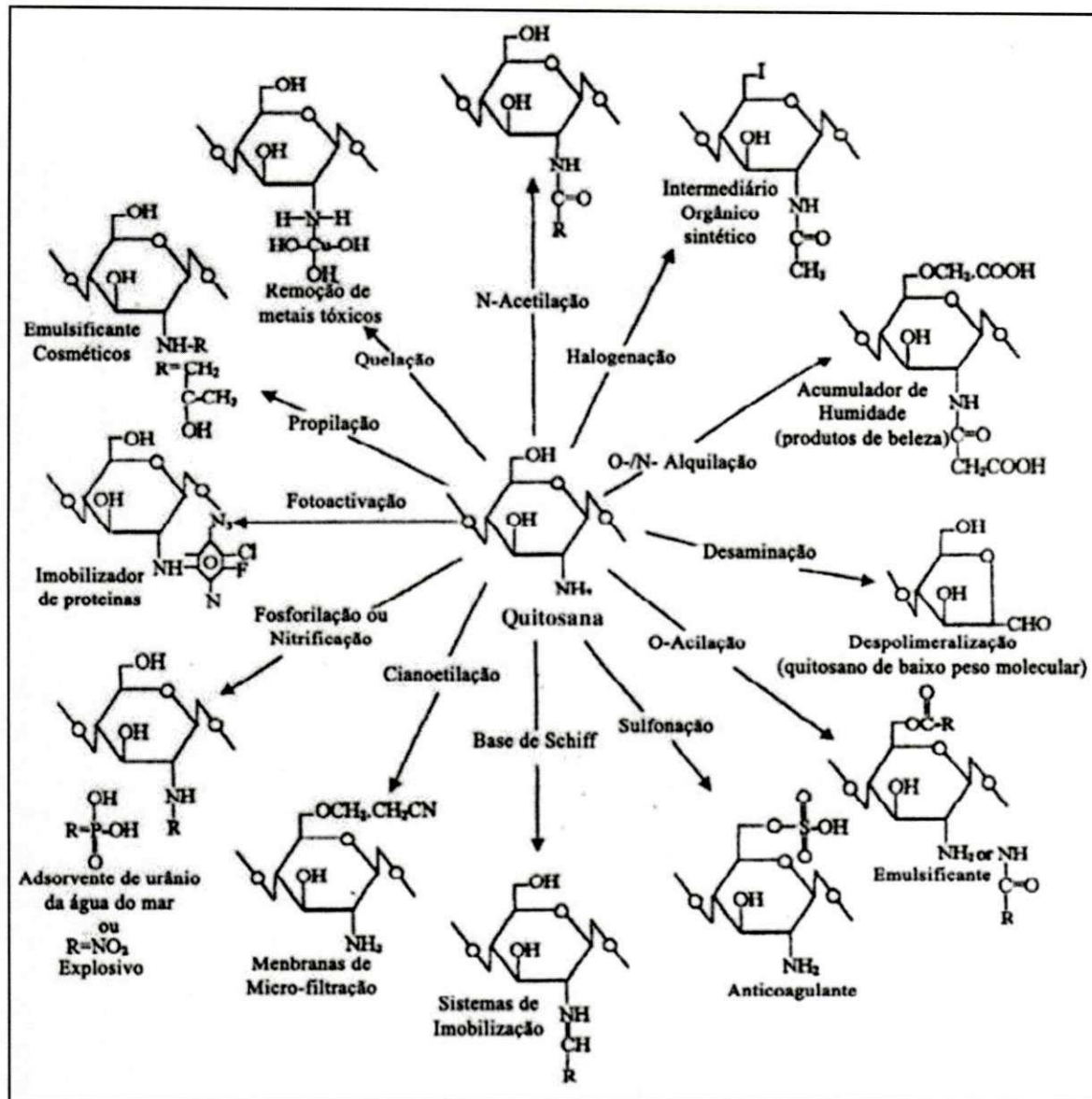
A atividade antimicrobiana está relacionada à presença de grupos amínicos que, uma vez em contato com os fluidos fisiológicos, provavelmente são protonados e se ligam a grupos aniônicos dos microrganismos, resultando na aglutinação das células microbianas e inibição do crescimento (CLEASEN, WHILHELMS e KULICKE, 2006).

A quitosana reduz o tempo de coagulação sanguínea de forma dose-dependente devido a sua capacidade em agregar plaquetas e eritrócitos (SILVA; SANTOS e FERREIRA, 2006).

É atribuída à quitosana uma potente ação analgésica tópica. O principal efeito analgésico da quitosana é decorrente da captura de hidrogênios ácidos liberados no local da inflamação pela ionização do grupo amínico a NH_3^+ . A quitosana teria a propriedade de absorver a bradicinina liberada no sítio de inflamação, que tem importante papel no mecanismo da dor. Estudos tem mostrado que, quando aplicada topicamente, em feridas abertas, a quitosana forneceu uma sensação refrescante, agradável e calmante (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

A quitosana é um biomaterial consideravelmente versátil, devido à sua elevada reatividade, sendo possível a obtenção de diversos derivados da quitosana, com diferentes propriedades e aplicações (Figura 5). A quitosana pode ser modificada por reticulação polimérica (crosslinking) covalente ou iônica e ligação de enxertos (grafting). As reações típicas da quitosana ocorrem principalmente nos grupos amina, entre as quais, as mais importantes são as reações de N-acilação e a formação de bases de Schiff (BERGER, et al. 2004; KUMAR, 2000)

Figura 5 - Derivados e aplicações de quitosana.



Fonte: Adaptado de THARANATHAN; KITTUR, (2003).

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

Os materiais naturais, incluindo polímeros como a quitosana têm sido aplicados topicamente nos sistemas de liberação de fármacos apresentando vantagens com relação aos materiais sintéticos, onde em estudos, membranas e microesferas de quitosana apresentaram grande degradação controlada pelas células de acordo com os mecanismos fisiológicos e permeabilidade tanto para fármacos ácidos, como para fármacos básicos (FELDMAN et al., 2003; SINHA et al., 2004).

3.4 Opiáceo

Segundo Sakata, Issy (2008), opiáceo é qualquer agente derivado do ópio, e opióide é qualquer componente, endógeno ou exógeno, que se liga ao receptor opióide.

Os receptores opióides são parte do sistema endógeno que inclui um grande número de peptídeos ligantes opioides endógenos, das quais três famílias distintas de peptídeos endógenos são descritos: as encefalinas (originárias da pró-encefalina); as endorfinas (da pró-opiomelanocortina) e as dinorfinas (da pró-dinorfina). Os receptores estão dispostos em todo o Sistema Nervoso Central (SNC) (encéfalo e medula espinhal) e no sistema nervoso periférico (SNP). Na medula os receptores são mais concentrados na lâmina II de Rexed da substância gelatinosa; estão presentes no sistema simpático, monócitos, linfócitos e macrófagos. Os genes de receptores opióides do tipo MU existem em tecidos periféricos após ativação por lesão ou inflamação, assim como na medula espinhal, no tálamo, sistema límbico e no córtex somatossensitiva.

A fisiologia completa destes peptídeos opioides endógenos não é completamente esclarecida, parecendo funcionar como neurotransmissores, neuromoduladores e, em alguns casos, como neurohormônios. Em 1976, a equipe de Martin W.R. reconheceu a existência de 3 tipos de receptores opióides que foram designados pelas letras gregas μ (mu), κ (kappa) e σ (sigma) com base nas respostas neurofisiológicas e comportamentais observadas em cães com lesões crônicas na medula e cujos nomes derivam dos diferentes ligantes específicos para cada um dos receptores mencionados:

morfina, ketazocina e *N*-alilnormetazocina (SKF 10047), respectivamente (MINSON et al. 2010; SOWERBY e SMITH, 1918).

Os receptores opióides e suas ações são descritas na Tabela 2 (MINSON et al. 2010).

Tabela 2 - Receptores opióides e suas ações.

Receptor	Resposta
μ	Analgesia, depressão respiratória, miose, euforia e diminuição do trânsito intestinal
κ	Analgesia, disforia, efeitos psicomiméticos, miose e depressão respiratória
δ	Analgesia

Fonte: Adaptado de Minson, et al. (2010).

3.4.1 Efeitos dos opióides

O alívio da dor pela morfina (tipo de opióide) é relativamente seletivo. Diferentemente dos anti-inflamatórios, não existe dose máxima (dose-teto) para os efeitos analgésicos dos opioides. O aumento da dose é associado com efeitos adversos que incluem sedação, confusão mental, náuseas, vômitos e depressão respiratória. A dose necessária para analgesia varia muito, dependendo do tipo de dor e de vários fatores relacionados ao paciente. Opioides produzem alterações do humor, incluindo alívio da ansiedade, euforia (sentimentos agradáveis) e disforia (sentimentos desagradáveis) (INTURRISI, 2000).

Opióides estimulam o núcleo de Edinger-Wesphal (parassimpático) do nervo óculomotor, produzindo miose. Pupilas puntiformes e perda da consciência são sinais patognomônicos de sobredose de opioides (INTURRISI, 2000).

Existe uma grande gama de opióides utilizados no alívio da dor, entre eles destacam-se a morfina, metadona, fentanil transdérmico, hidromorfina e oxicodona (MINSON et al. 2010).

- Morfina: É o fármaco de escolha para dores intensas. A dose analgésica varia de 5 mg até mais de 200 mg, a cada 4 horas. Na maioria dos

casos, a dor é controlada com doses de 10 a 30 mg, de 4/4 horas (INTURRISI, 2000). A morfina é metabolizada formando: morfina-3-glicuronídeo e morfina-6-glicuronídeo, tendo a última ação analgésica significativa. O primeiro é inativo, mas liga-se aos receptores, impedindo a ligação da morfina. Os metabólitos se acumulam em pacientes com insuficiência renal. É bem tolerada em pacientes com hepatopatias, sendo que, nestes pacientes, a sua meia-vida pode aumentar e a dose deve ser espaçada para três a quatro vezes ao dia (BARROS e FERRIS, 2009). Na maioria dos casos a dor é controlada com doses de 10 mg a 30 mg, de 4/4 h, devendo ser aumentada gradativamente, sendo que a dose noturna pode ser dobrada a fim de evitar dor ao despertar (BARROS e FERRIS, 2009).

- **Metadona:** É um opióide sintético, antagonista dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA). É uma alternativa à morfina, sendo cada vez mais utilizado na “rotação” dos opioides, no tratamento de retirada da dependência dos opioides e em pacientes que necessitam de tratamento prolongado. Causa menos dependência, menos euforia e sedação do que a maioria dos outros opioides. É bem absorvido por via oral, com biodisponibilidade de 80% a 90%. Apresenta redistribuição extensa para músculo e gordura (VASCELLO e MCQUILLAN, 2006).
- **Hidromorfona:** Disponível desde 1920, só recentemente foi liberada para utilização no Brasil. É um congênere semissintético da morfina, com meia-vida de 4 horas. É aproximadamente 5 vezes mais potente do que a morfina e sua dose usual é de 2 a 4 mg a cada 4 ou 6 horas (MINSON, et al. 2010).
- **Oxicodona:** É um agonista mu, com atividade como agonista kappa. Por sua ação nos receptores kappa tem vantagens na dor de origem visceral como na cólica biliar ou doenças do pâncreas. É um derivado da tebaína (MINSON et al. 2010).
- **Fentanil transdérmico:** É um potente agonista com meia-vida longa, que não deve ser usado para titulação rápida. O fentanil transdérmico deve ser considerado quando o paciente já está em terapia com opioide, com dor constante, mas com pouca dor episódica (KING e PORRECA, 2010).

Os opioides permanecem como os fármacos mais efetivos e mais comumente utilizados no tratamento da dor moderada a intensa. As diferenças de respostas dos pacientes ao uso dos opioides são aceitas, atualmente, por serem devidos a polimorfismos genéticos relacionados aos receptores opioides (MINSON et al. 2010).

3.5 Dor

O comitê de taxonomia da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) conceituou dor como “experiência sensitiva e emocional desagradável decorrente ou descrita em termos de lesões teciduais reais ou potenciais” (MERSKEY; ALBE-FESSARD; BONICA, 1979).

A história do manejo intervencionista da dor tem sua origem no bloqueio neural e na analgesia regional, e tudo começou quando Köller, em 1849, utilizou a cocaína para anestésiar as amígdalas, a evolução seguinte se deu quando Tuffer, em 1891, utilizou a cocaína por via espinhal para tratar a dor de um sarcoma em um membro, sendo o primeiro bloqueio terapêutico. Em 1901, Siccard utilizou pela primeira vez a analgesia peridural sacra com cocaína para tratar a dor ciática e o lumbago. A primeira alcoolização do trigêmeo foi realizada por Sholoesser, em 1903. O primeiro bloqueio diagnóstico ocorreu em 1924, quando Gaza estudava naquela época as obscuras vias da dor. Em 1924, Mandl e outros autores estudando as vias simpáticas na dor visceral, realizaram o primeiro bloqueio terapêutico para a dor visceral. Dogliotti, em 1930, de uma maneira bastante ousada utilizou o álcool no espaço subaracnóideo para conseguir a neurólise das raízes posteriores (JORNAL DA DOR, 2011).

Dor é uma experiência vivenciada pela quase totalidade dos seres humanos. Como sintoma ou doença, é frequentemente objeto da procura por assistência. O tratamento inadequado da dor é uma constante em todo o mundo. Inúmeras barreiras de causas multifatoriais contribuem para o efetivo tratamento da dor, sendo a principal delas a inadequada avaliação da dor (TEIXEIRA, 2009; FERREIRA et al. 2006; PIMENTA, 1995).

Entre as condições que podem afetar a recuperação do indivíduo pós-trauma operatório, a dor merece destaque por provocar alterações fisiológicas

e emocionais que, se não adequadamente controladas, predisõem os doentes a complicações e podem prolongar a internação. (FERREIRA et al. 2006; PIMENTA, 1995).

A dor aguda sinaliza a ocorrência de lesão e, portanto, apresenta valor biológico fundamental de defesa que alerta para a ocorrência de lesão tecidual em via de se instalar ou já instalada e induz no indivíduo reações de defesa, de fuga ou de remoção do agente causal (OLIVEIRA e NOGUEIRA, 2003).

A dor compromete a imunidade, agrava o já aumentado metabolismo, o aumento das catecolaminas e do cortisol e as reações neurovegetativas próprias do estresse da doença oncológica, compromete o sono, o apetite, o humor e a disposição do indivíduo, agrava a hipercoagulabilidade sanguínea e acentua a hiperatividade motora (do que podem resultar deslocamento dos enxertos cutâneos, cateteres vasculares, sondas tubos endotraqueais, etc.). O estresse dela resultante libera agudamente citocinas, catecolaminas, cortisol, hormônios do crescimento e adrenocorticotrófico, ativa o sistema renina-angiotensina, compromete a coagulação do sangue e altera as reações imunológicas. A dor aguda causa ou agrava as anormalidades ventilatórias, hemodinâmicas, gastrointestinais e renais, aumenta a mortalidade e pode resultar em modificações anatômicas e fisiológicas no SNP (Sistema Nervoso Periférico) e SNC (Sistema Nervoso Central) que a tornam mais frequentemente cronicada, a possibilidade de cronicização da dor é maior quando ocorre lesão do tecido nervoso (OLIVEIRA, ANDRADE e AMARAL, 1998; FIGUEIRÓ e TEIXEIRA, 1995; TEIXIRA, 2003).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais – CERTBIO - Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais, UFCG.

4.2 Materiais

4.2.1 Biopolímero

Quitosana ($C_{12}H_{24}N_2O_9$) – Quitosana médio peso molecular, 75 – 85%, desacetilada, massa molar (190.000 – 310.000 daltons), grau de polimerização entre 1186 – 1924.

4.2.2 Reagentes

- Ácido Acético Glacial ($C_2H_4O_2$);
- Hidróxido de Sódio (NaOH);
- Fentanil;
- Lisozima;
- Phosphate Buffered Saline (PBS).

4.2.3 Animais

Foram utilizados, como fonte de macrófagos peritoneais, para o ensaio de citotoxicidade, camundongos machos tipo Swiss, provenientes do biotério do Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais (CERTBIO), UFCG. Todos os procedimentos foram conduzidos conforme normas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e mediante parecer do Comitê de Ética Local.

4.3 Métodos

4.3.1 Preparação das membranas de quitosana e quitosana/fentanil

A solução de quitosana foi preparada pela dissolução de quitosana em solução de ácido acético glacial (1 % v/v) sob agitação magnética por 24 h. Em seguida, a solução polimérica foi filtrada a vácuo para remover o material insolúvel. O filtrado foi vertidas em placas de petri e acondicionadas em ambiente com exaustor por 20 h para evaporação do ácido e formação da membrana utilizando o método de evaporação do solvente, adaptado de Osório (2007) e implementado pelo Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais (CERTBIO) da Universidade Federal de Campina Grande. Após secagem das membranas, as mesmas foram retiradas da estufa e 50 ml de solução de hidróxido de sódio a 1 M foi adicionado a fim de assegurar a completa neutralização das membranas. Em seguida, foram lavadas com água corrente, e posteriormente submersas em um recipiente com água destilada durante 1h 30min, tempo suficiente para que ocorresse a neutralização. Depois da neutralização, as mesmas foram secas por 24 h a temperatura ambiente. A solução de quitosana/fenatil foi obtida com a adição do Fentanil a solução de quitosana nas proporções de 1, 3 e 5 % sob agitação magnética por 20 min. As etapas seguintes seguiram o mesmo procedimento descrito anteriormente para confecção das membranas de quitosana.

4.3.2 Caracterização das membranas

Após preparadas as amostras foram caracterizadas por Difração de raios X (DRX), Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Microscopia Óptica (MO), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDS), Tensão Superficial/Molhabilidade, Ensaio de Biodegradação *in vitro* e Ensaio de Citotoxicidade.

4.3.2.1 Difração de raios X (DRX)

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

4.3.2.2 Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

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

4.3.2.3 Microscopia Ótica (MO)

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

4.3.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para realização das análises foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura de bancada, modelo TM-1000, marca Hitachi, com aumento de 10000x, profundidade de foco de 1 mm, resolução de 30 nm, 15 KV, baixo

vácuo e pressão variada (1 a 270 Pa), sem recobrimento metálico. Para análise da Energia Dispersiva de raios X (EDS), foi utilizado o equipamento acoplado ao MEV para uma maior confiabilidade dos resultados.

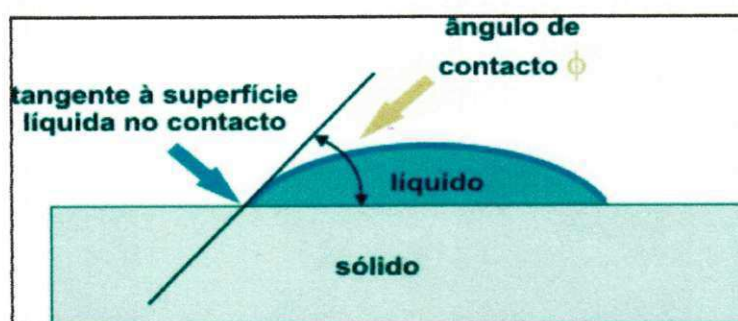
4.3.2.5 Tensão Superficial/Molhabilidade

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

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

O resultado depende das forças intermoleculares que se estabelecem entre as fases, resultando na medida chamada ângulo de contato (Figura 14). Por meio da medida desse ângulo de contato entre a superfície do sólido e o plano tangencial à superfície líquida, pode-se obter a molhabilidade do líquido sobre um determinado substrato (ALHANATI, 2011).

Figura 6 - Ângulo de contato.



Fonte: ALHANATI, 2011

Se o ângulo de contato estático for um valor maior que 90° , o líquido tem a tendência a não molhar a superfície e a fase é dita não-molhante. Com um

valor aproximado a 0° , o líquido recobre toda a superfície formando um filme fino de fluido molhante. Quando o valor do ângulo for menor ou igual a 90° , a molhabilidade é considerada parcial. Portanto, quanto menor for o ângulo, maior será o molhamento (WISNIEWSKI; ARGUELHO, 2011; ALHANATI, 2011).

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

4.3.2.6 Ensaio de Biodegradação *in vitro*

O estudo da taxa de biodegradação dos filmes reticulados foi realizados com a exposição dos filmes reticulados em solução preparada de lisozima e PBS, com tempo de exposição de 7 e 14 dias a 37°C .

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

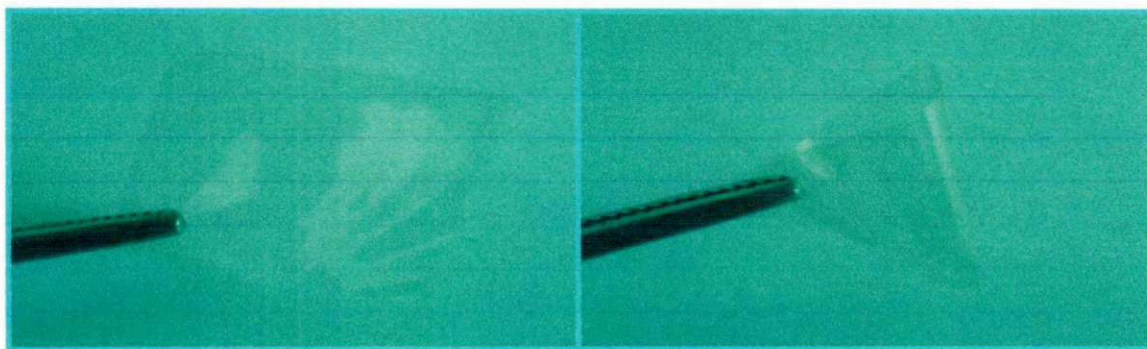
4.3.2.7 Ensaio de Citotoxicidade

Com o objetivo de atender a norma ISO 0993 que recomenda ensaios *in vitro* de citotoxicidade como testes iniciais para materiais que ficarão 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]. Serão utilizados 5 fragmentos de cada amostra para cada animal. A técnica utilizada foi a descrita por Mosmann, 1983. A viabilidade celular foi calculada em porcentagem, considerando-se o controle negativo como 100% de viabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

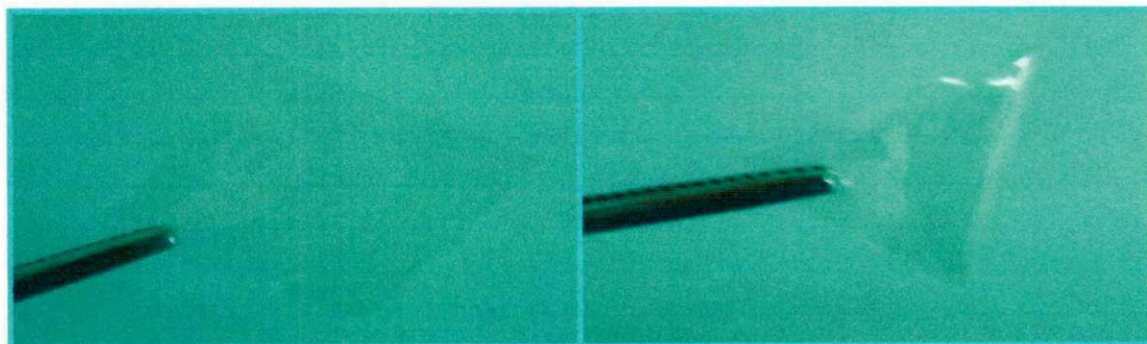
As Figuras 7, 8 e 9 apresentam as membranas sintetizadas neste trabalho em fotografias realizadas em máquinas convencionais.

Figura 7 – Membrana Quitosana\Fentanil 1%.



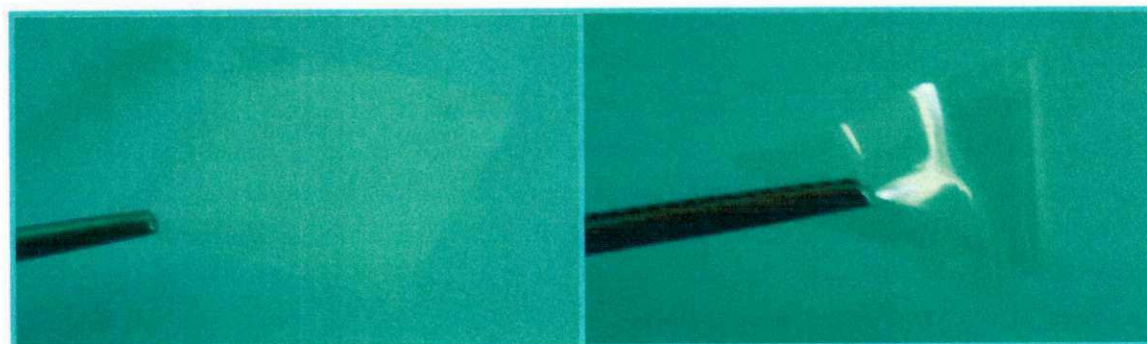
Fonte: Próprio autor.

Figura 8 – Membrana Quitosana\Fentanil 3%.



Fonte: Próprio autor.

Figura 9 – Membrana Quitosana\Fentanil 5%.



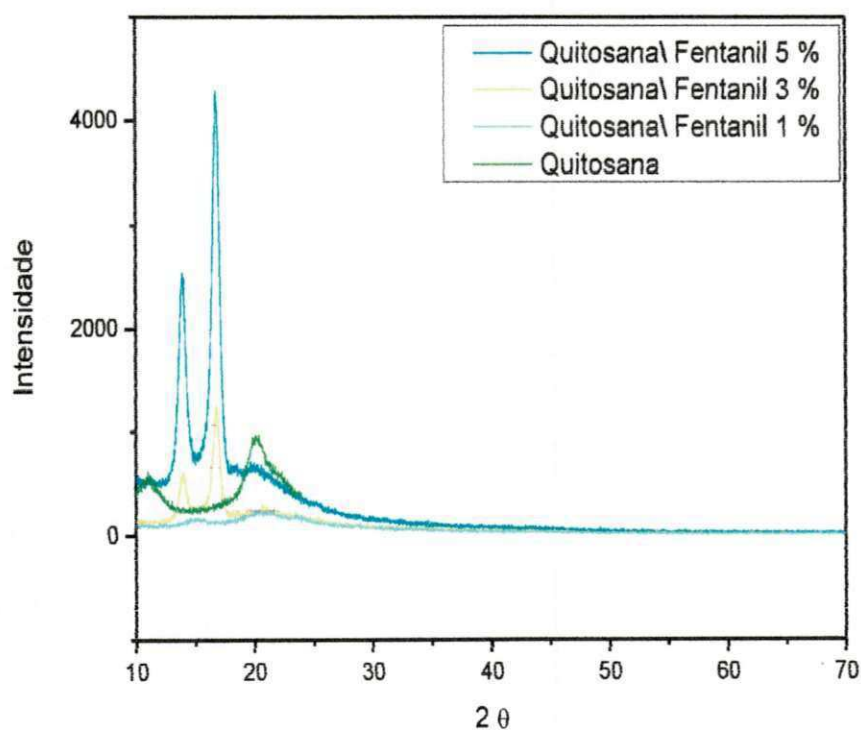
Fonte: Próprio autor.

Observou-se que visualmente não foi possível perceber diferença significativa entre as membranas sintetizadas neste trabalho. Notou-se que a incorporação do fármaco à solução de quitosana não gerou uma membrana onde fosse percebida a separação de fases, apresentando-se homogênea.

5.1 Difração de raios X (DRX)

Na Figura 10 observa-se os difratogramas das membranas de quitosana\ fentanil nas proporções quitosana\ 5%, 3% e 1% fentanil e quitosana pura sintetizadas neste trabalho.

Figura 10 – Difratogramas das membranas de Quitosana\ Fentanil 5%; Quitosana\ Fentanil 3%; Quitosana\ Fentanil 1% e Quitosana.



Fonte - Próprio autor.

A quitosana apresenta perfil semi-cristalino com picos de base larga entre 10 e 25 θ (Figura 10 em verde). Observa-se na Figura 10 que as membranas com adição de 5 e 3% de fentanil (em verde e vermelho

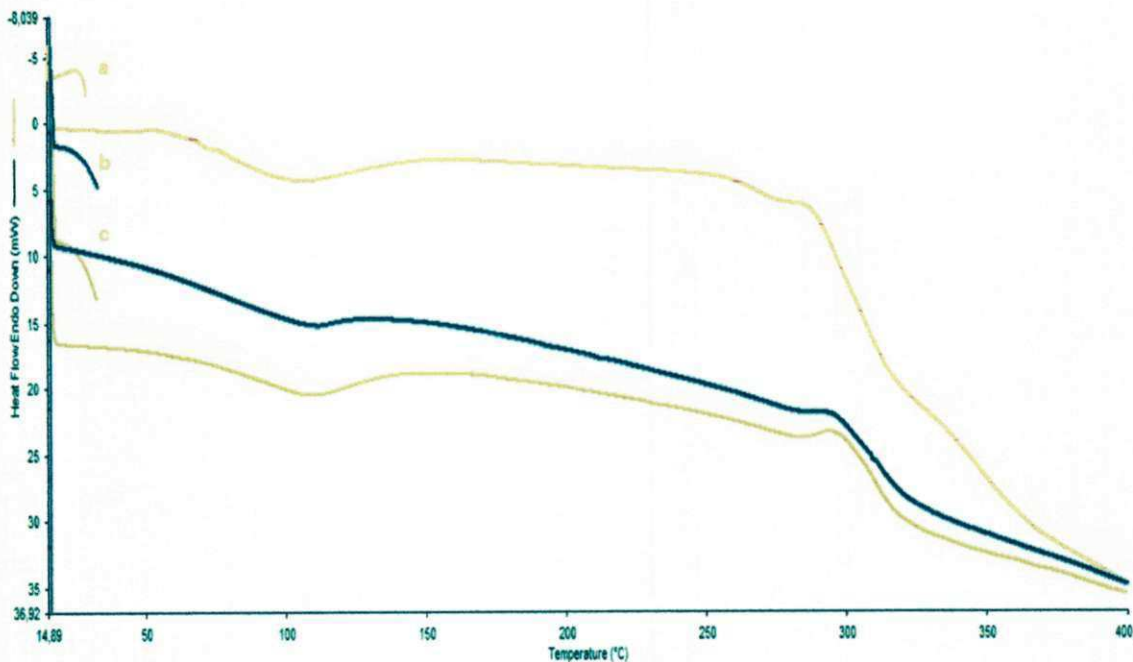
respectivamente) apresentaram perfil cristalino com picos intensos e fechados entre 12 e 18 Θ , a adição do fármaco tonou menos intensos os picos característicos da quitosana localizados entre 10 e 25 Θ .

As membranas com adição de 1% de fentanil (Figura 10 em rosa) apresentaram perfil praticamente amorfo onde foi possível observar um dos picos característicos da quitosana (porém com menor intensidade que o apresentado na membrana apenas de quitosana (Figura 10 em verde)) localizado entre aproximadamente 18 e 25 Θ e um pico de base larga aproximadamente entre 12 e 18 Θ pertencentes ao fentanil como observado anteriormente.

5.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Na Figura 11 observam-se os gráficos de DSC das membranas sintetizadas neste trabalho.

Figura 11 – Calorimetria exploratória diferencial das membranas a - Quitosana\Fentanil 1%;
b – Quitosana\Fentanil 3% e c – Quitosana\Fentanil 5%.



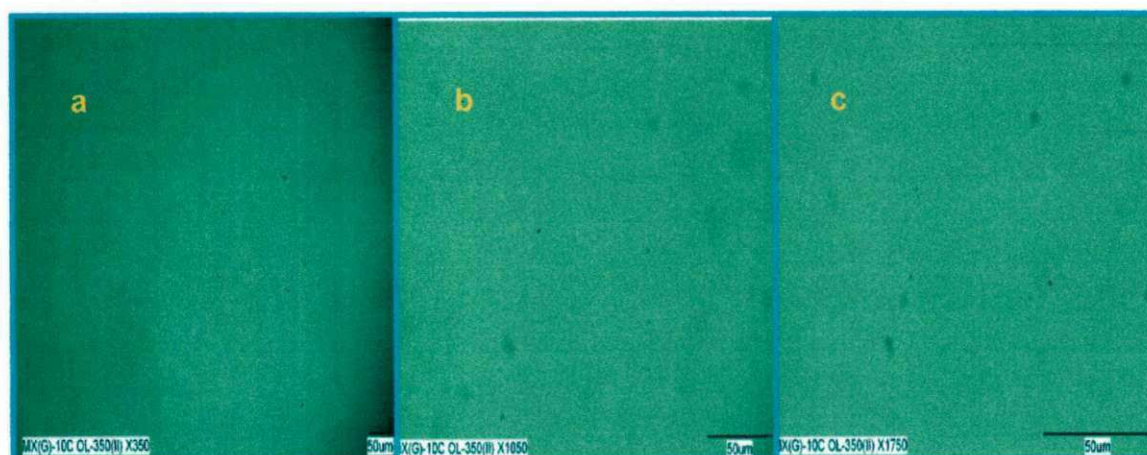
Fonte: Próprio autor.

Não ocorreu variação na resistência térmica das membranas relacionadas a variação da concentração do fármaco. Todas as membranas sintetizadas apresentaram um pico endotérmico e outro exotérmico, onde, em todos os casos o pico endotérmico teve início, em valores aproximados, em 75°C tendo fim em 150°C com pico máximo em 110°C, esse pico está relacionado a perda de água de umidade da membrana, podendo ser mais ou menos intenso dependendo do tratamento térmico empregado pré-análise. Os picos exotérmicos apresentados por todas as amostras tiveram início, em valores aproximados, em 280°C com pico máximo em 300°C, este pico está relacionado a degradação do material, indicando que em temperaturas acima de 280°C o mesmo começa a deteriorar-se.

5.3 Microscopia Óptica (MO)

Na Figura 12 observam-se as imagens da MO correspondentes as membranas de quitosana sintetizadas neste trabalho que apresentam uma superfície uniforme e lisa, características de uma membrana densa, o que está de acordo com estudos realizados por Lima (2010); Fidèles (2010); Marreco et. al (2004) e Dallan (2005).

Figura 12 – Microscopia Óptica das membranas de quitosana, a – 350x; b – 1050x e c – 1750x.

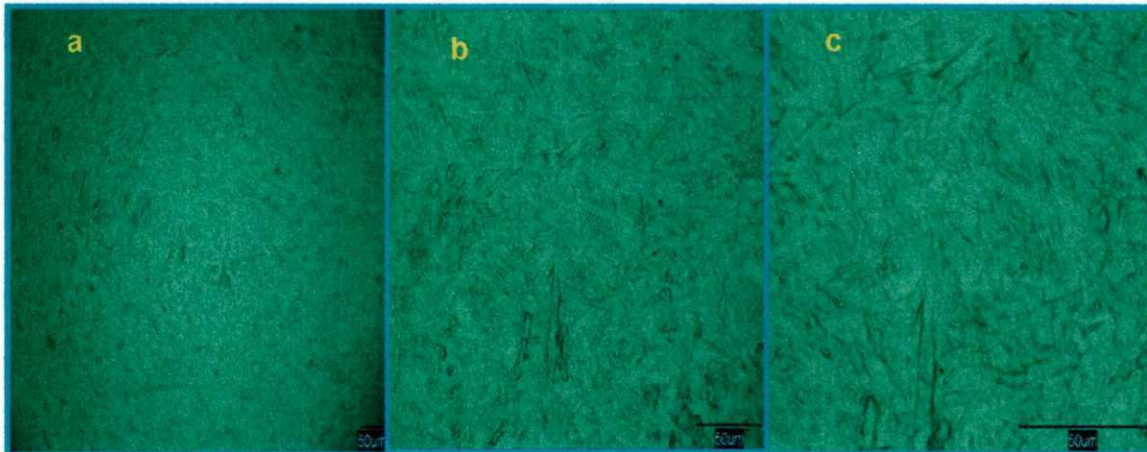


Fonte: Próprio autor.

Na Figura 13 observam-se as imagens da MO correspondentes as amostras Quitosana\Fentanil 5 %. Observa-se que as membranas após a

adição do fármaco na concentração de 5% adquiriram uma superfície rugosa, alterando assim completamente o aspecto liso apresentado pelas membranas apenas de quitosana, o que indica uma possível interação polímero/ fármaco.

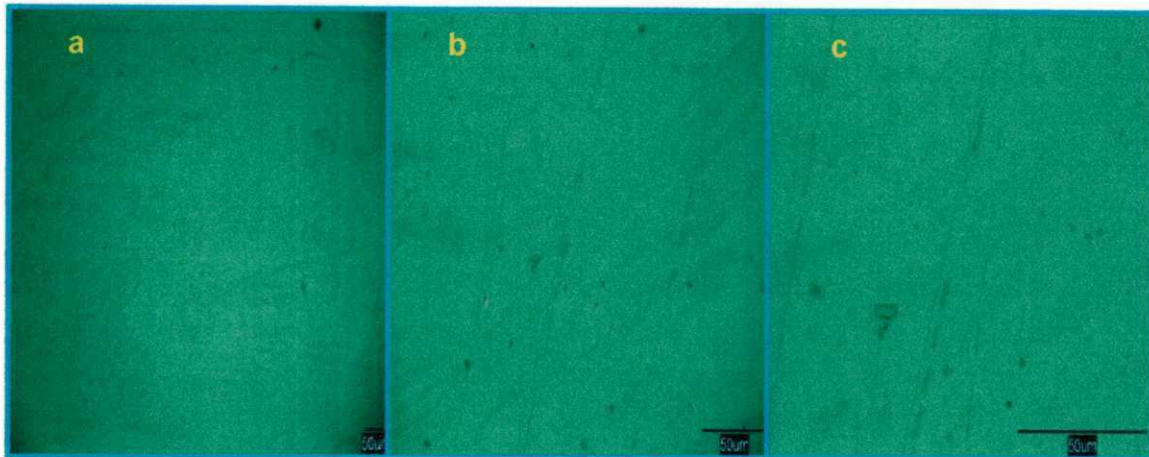
Figura 13 – Microscopia Óptica das membranas Quitosana\ Fentail 5% nos aumentos a – 350x; b – 1050x e c – 2100x.



Fonte: Próprio autor.

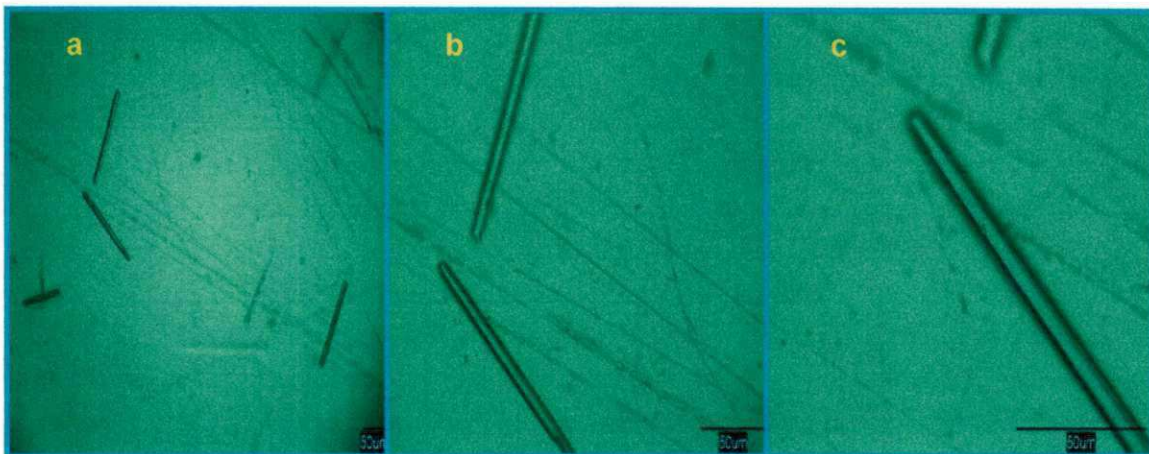
As Figuras 14 e 15 correspondentes as membranas Quitosana/ Fentanil 3 e 5% respectivamente não apresentaram modificação de superfície, apresentando membranas uniformes e lisas como as de quitosana pura. Algumas rugosidades direcionadas podem ser observadas na superfície das membranas com 3 e 5% de fármaco, porém essas topografias foram adquiridas por imperfeições nas placas de petri as quais foram submetidas a evaporação do solvente para formação da membrana. Essa ausência de rugosidades e de aparente interação polímero\ fármaco nestas concentrações pode estar ligado ao fato de que o fármaco utilizado na amostra de 5% é oriundo de um fornecedor diferente do utilizado nas membranas de 3 e 1%, essa diferença entre os fármacos pode ser observada também na MEV e na EDS, como também pode estar relacionado com a baixa interação dos mesmos nesta concentração.

Figura 14 – Microscopia Óptica das membranas Quitosana\Fentail 3 % nos aumentos a – 350x; b – 1050x e c – 2100.x



Fonte: Próprio autor.

Figura 15 – Microscopia Óptica das membranas Quitosana\Fentail 1 % nos aumentos a – 350x; b – 1050x e c – 2100x.

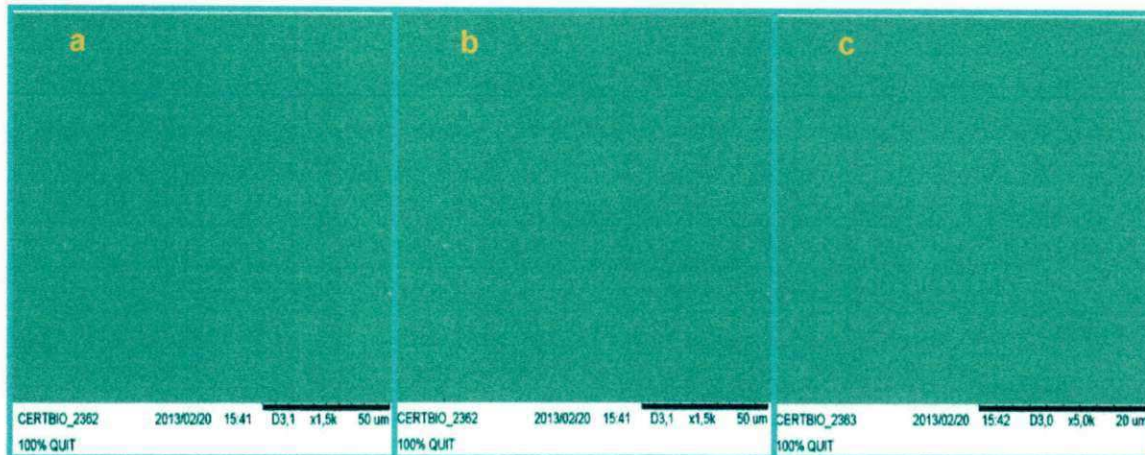


Fonte: Próprio autor.

5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Na Figura 16 observa-se a MEV da membrana de quitosana que é condizente com a observada na MO apresentando uma superfície uniforme e lisa.

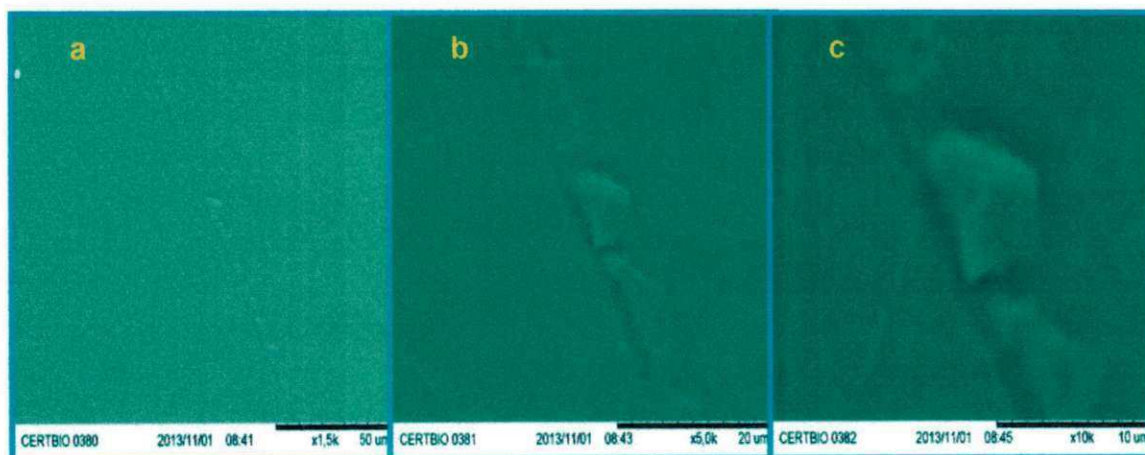
Figura 16 – Microscopia Eletrônica de Varredura das membranas de quitosana, a – 1500x. b – 1500x e c 10000x.



Fonte – Próprio autor.

Observa-se na Figura 17 a MEV da membrana Quitosana/ Fentanil 5 % a existência de regiões parcialmente lisas na membrana, não sendo a mesma completamente rugosa como observado na MO. Observa-se também que essas rugosidades são formadas por um aglomerado parcialmente organizado de rugosidades de tamanho inferior. No canto esquerdo superior da Figura 17 (a), observa-se a presença de um grão que destaca-se na superfície da membrana.

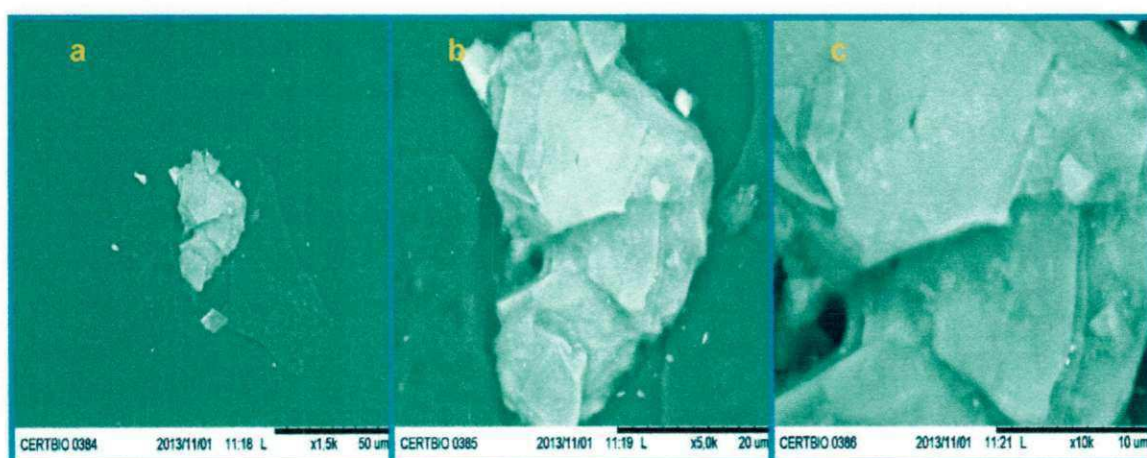
Figura 17 – Microscopia Eletrônica de Varredura das membranas Quitosana\ Fentanil 5%, a – 1500x. b – 5000x e c 10000x



.Fonte: Próprio autor.

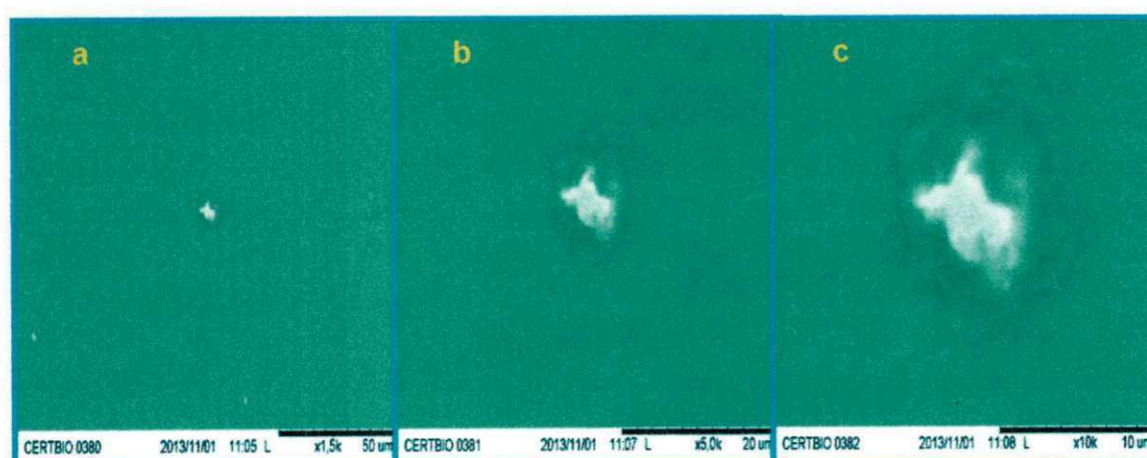
Na Figura 18 correspondente a membrana Quitosana/ Fentanil 3% verificou-se a presença de grãos de tamanhos variados dispersos pela membrana como o observado na membrana Quitosana/ Fentanil 5% contudo em maior quantidade. Esses grãos são relacionados a presença do fármaco na membrana uma vez que os mesmos não foram observados na Figura 19 referente a membrana apenas de quitosana. Esses grãos também foram verificados nas membranas Quitosana/ Fentanil 1%.

Figura 18 – Microscopia Eletrônica de Varredura das membranas Quitosana/ Fentanil 3%,
a – 1500x. b – 5000x e c 10000x.



Fonte: Próprio autor.

Figura 19 – Microscopia Eletrônica de Varredura das membranas Quitosana/ Fentanil 1%,
a – 1500x. b – 5000x e c 10000x.



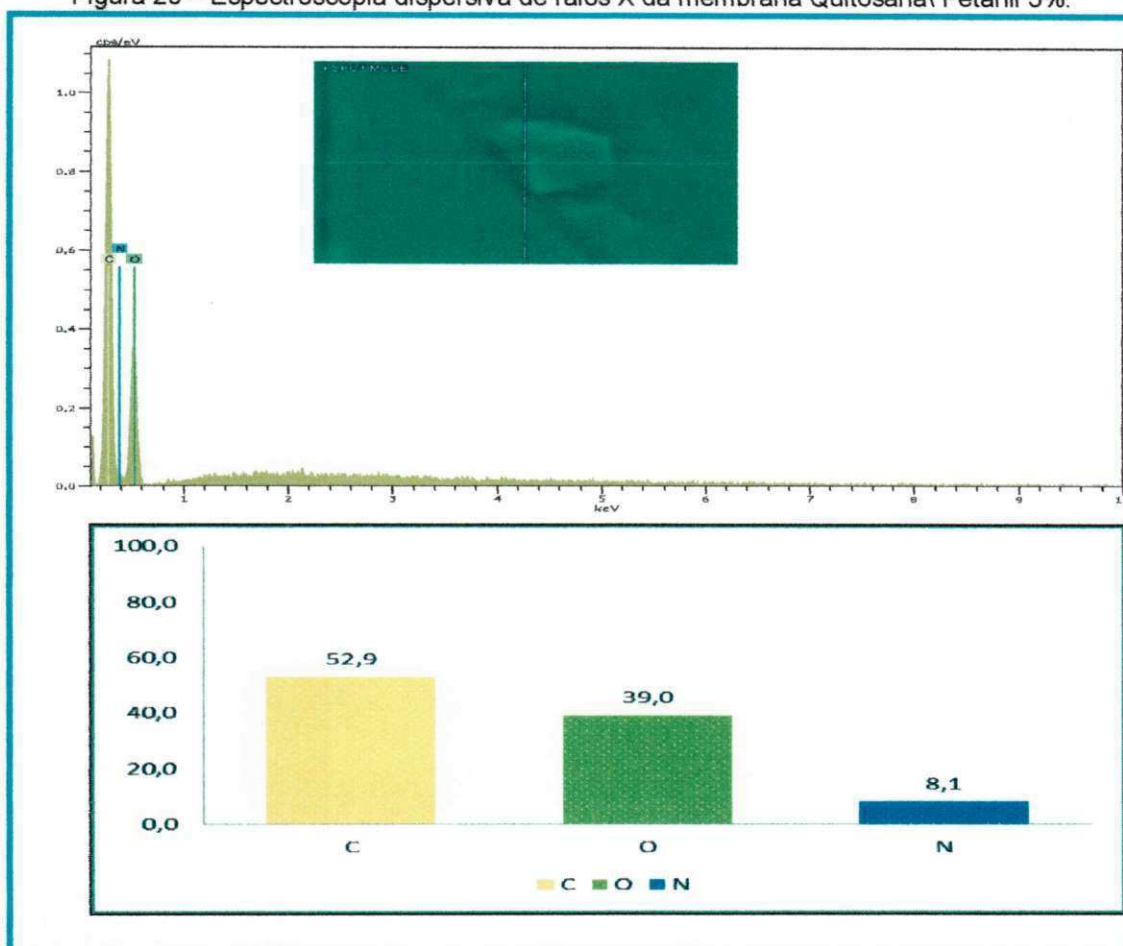
Fonte: Próprio autor.

5.5 Espectroscopia dispersiva de raios X (EDS)

Visando-se verificar os elementos contidos nas membranas sintetizadas realizou-se a análise de EDS em todas as membranas sintetizadas.

Observa-se na Figura 20 a EDS para membrana Quitosana/ Fentanil 5% onde detectou-se a presença de carbono, oxigênio e nitrogênio, elementos esses que participam da composição das cadeias de quitosona e fentanil.

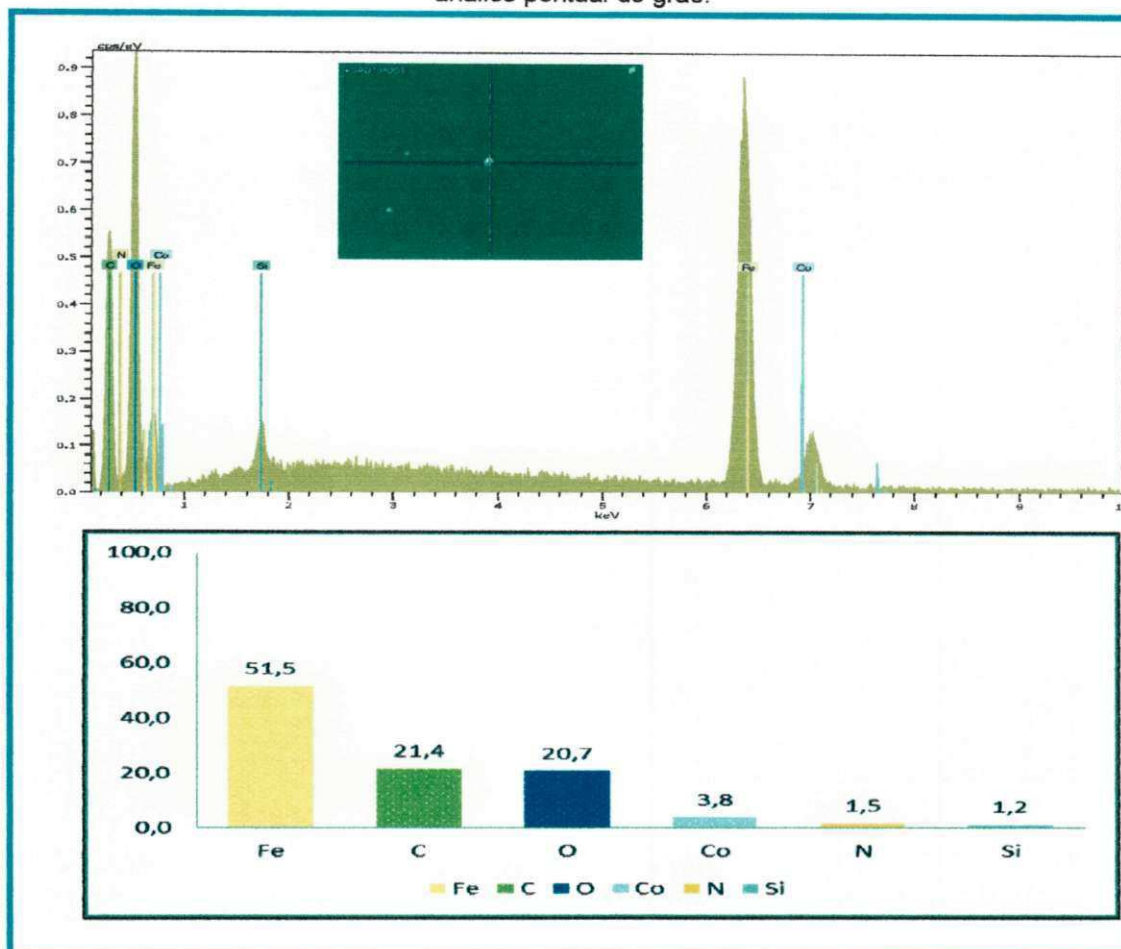
Figura 20 – Espectroscopia dispersiva de raios X da membrana Quitosana\ Fetanil 5%.



Fonte: Próprio autor.

Na MEV (Figura 17 (a) lateral superior esquerda) foi visualizada a presença de grãos em destaque na superfície da membrana, com a finalidade de caracterizá-los foi efetuada uma análise de EDS pontual do grão, esta análise está apresentada na Figura 21.

Figura 21 – Espectroscopia dispersiva de raios X da membrana Quitosana/ Fentanil 5%, análise pontual do grão.

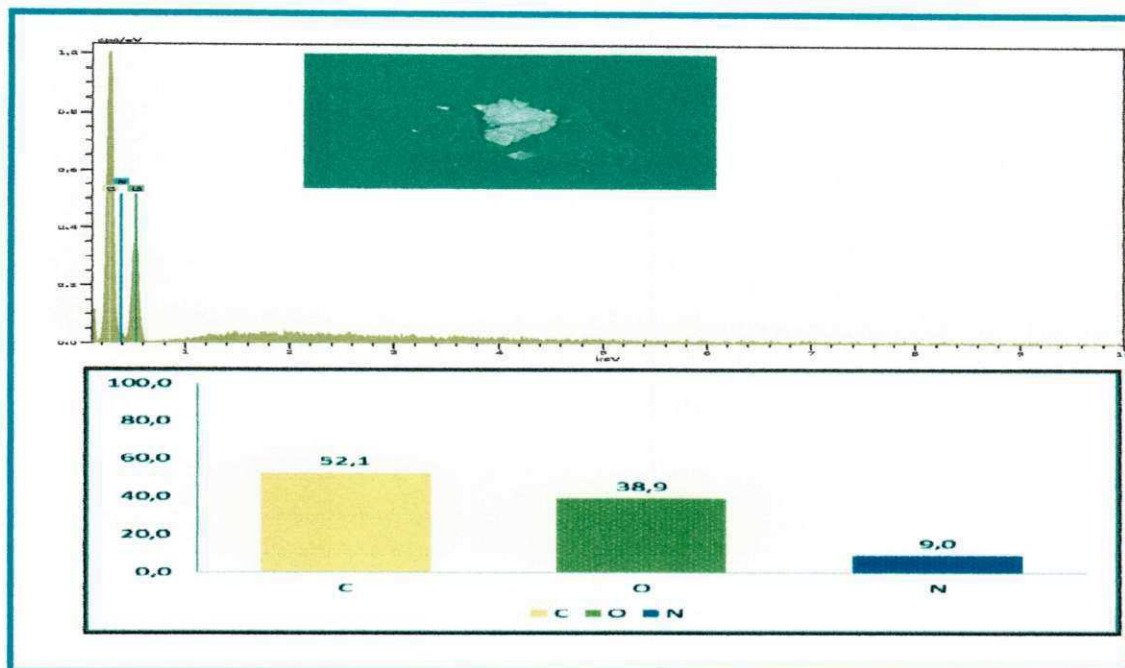


Fonte: Próprio autor.

Observou-se pela análise de EDS que o grão tratava-se em grande parte de ferro, contudo ainda possuía em sua constituição o cobalto e o silício, elementos esses que não pertencem a estrutura da quitosana e do fentanil. Esses elementos não foram informados vide bula pelos fabricantes do fármaco, sendo vistos como contaminantes. Dentre estes elementos o mais preocupante é o cobalto, considerado um metal pesado por em determinadas concentrações e tempo de exposição pode causar danos a saúde humana, sua tolerância no corpo humano segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde) é de 1 μg para uma pessoa adulta (60 kg) (SPERLING, 2005).

Na Figura 22 observa-se o EDS da membrana Quitosana/ Fentanil 3% onde detectou-se a presença dos elementos carbono, oxigênio e nitrogênio assim como verificados na análise da Figura 20.

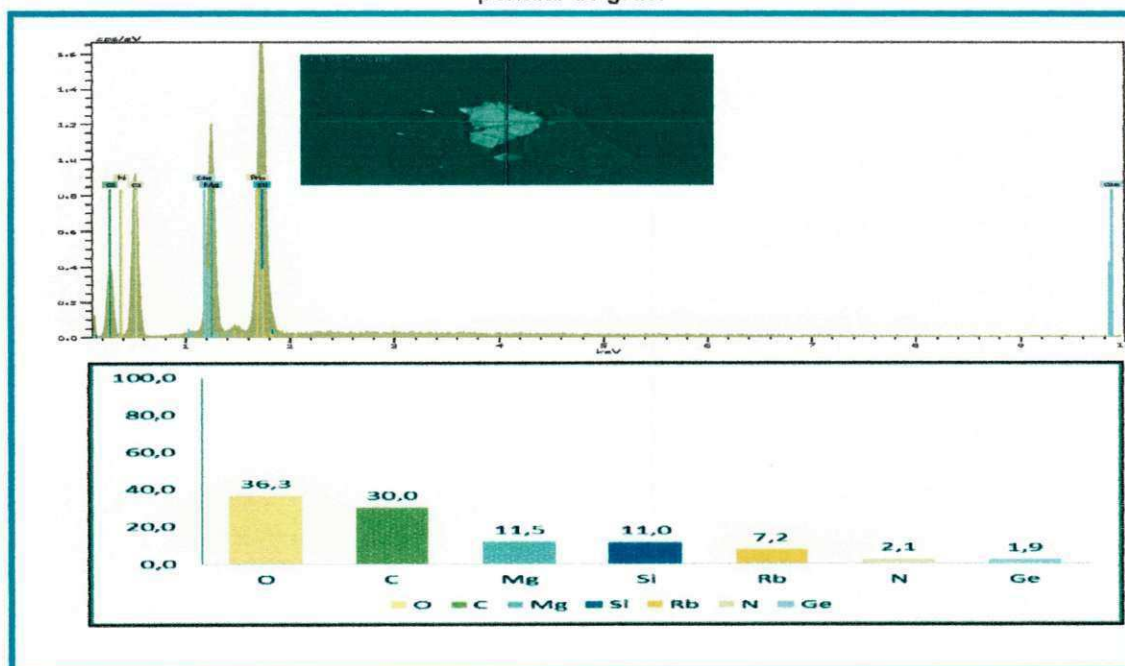
Figura 22 – Espectroscopia dispersiva de raios X da membrana Quitosana/ Fentanil 3%.



Fonte: Próprio autor.

Foi realizada a análise de EDS para identificar a composição do grão apresentado pela MEV na membrana Quitosana/ Fentanil 3%. A Figura 23 apresenta o resultado desta análise.

Figura 23 – Espectroscopia dispersiva de raios x da membrana Quitosana/ Fentanil 3%, análise pontual do grão.



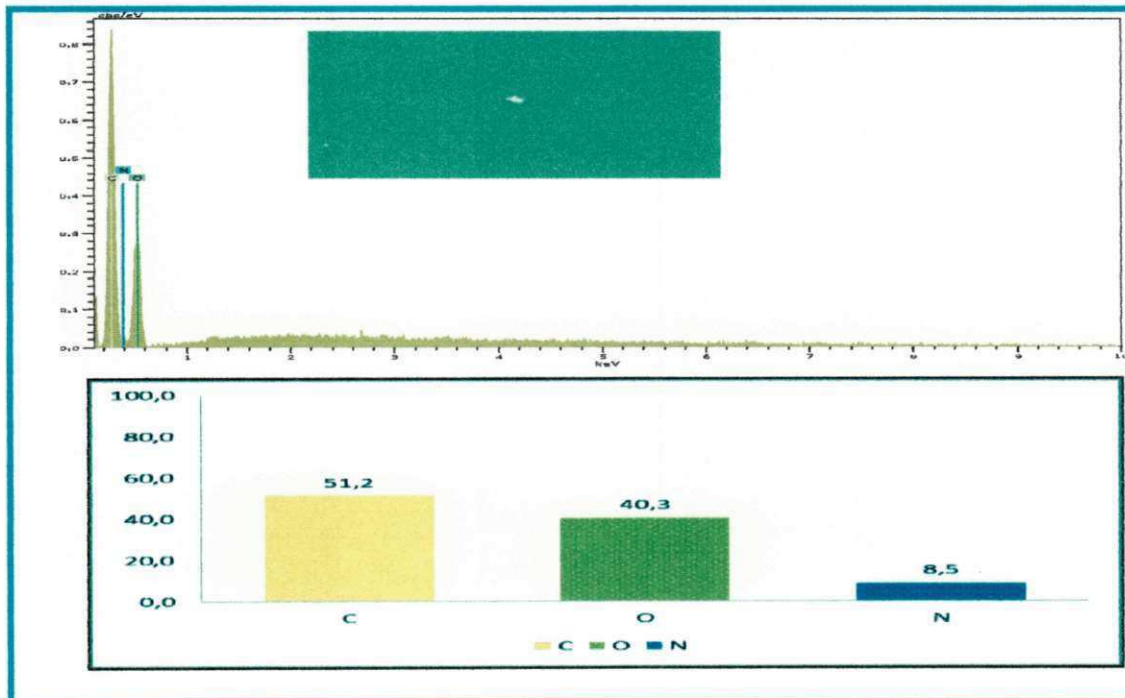
Fonte: Próprio autor.

Observou-se pela análise da EDS pontual do grão presente na membrana Quitosana/ Fentanil 3% que a mesma possui vários outros elementos em sua constituição que não pertencem a estrutura da quitosana nem do fentanil, esses elementos são: magnésio, silício, rubídio e germânio. Esses elementos citados não são referenciados na bula do medicamento como constituinte do mesmo e nem possuem na literatura referências sobre sua utilização neste fármaco.

Notou-se uma significativa diferença na análise da EDS pontual entre a membrana Quitosana/ Fentanil 5% e a membrana Quitosana/ Fentanil 3%, essa diferença de composições tem mesma origem que a dissemelhança de superfície apresentada na análise de MO, fornecedores diferentes do fármaco.

A Figura 24 apresenta a EDS da membrana Quitosana/ Fentanil 1% que assim como as outras análises da região foram verificados os elementos carbono, oxigênio e nitrogênio, constituintes das cadeias da quitosana e do fentanil.

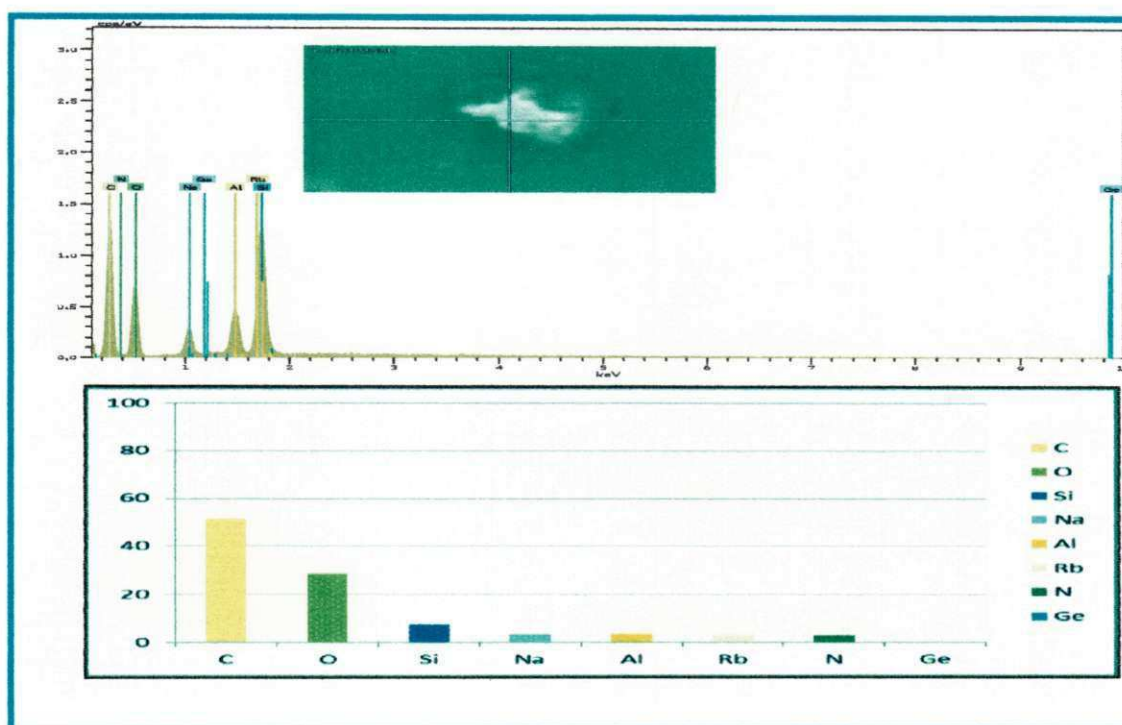
Figura 24 – Espectroscopia dispersiva de raios X da membrana Quitosana/ Fentanil 1%.



Fonte: Próprio autor.

Para amostra Quitosana\ Fentanil 1 % também foi realizada análise pontual dos grãos identificados na superfície da membrana, os resultados da análise estão apresentados na Figura 25.

Figura 25 - Espectroscopia dispersiva de raios X da membrana Quitosana/ Fentanil1%, análise pontual do grão.



Fonte: Próprio autor.

Observa-se a presença de elementos que não fazem parte da constituição da estrutura da quitosana nem do fentanil, elementos esses que não são indicados vide bula e nem encontram-se referenciados na literatura como constituintes do fármaco.

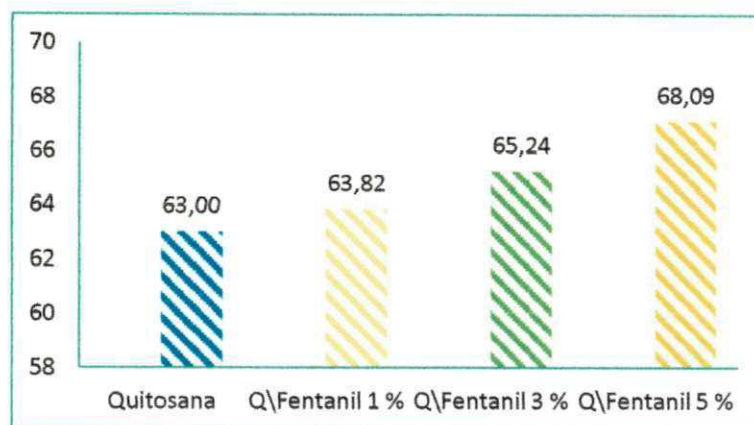
Os elementos rubídio, germânio e silício já haviam sido identificados na análise da membrana Quitosana/ Fentanil 1%, entretanto, o sódio e o alumínio ainda não haviam sido identificados.

5.6 Tensão superficial/ Molhabilidade

Na Figura 26 observam-se os resultados para o ensaio de tensão superficial por medida do ângulo de contato. Notou-se que a hidrofobicidade apresenta-se inversamente proporcional a quantidade de fármaco utilizado, ou

seja, quanto maior a concentração de fentanil menor o comportamento hidrofílico da membrana.

Figura 26 – Tensão superficial por medida do ângulo de contato para as membranas Quitosana; Quitosana\Fentanil 1 %; Quitosana\Fentanil 3 % e Quitosana\Fentanil 5 %.



Fonte: Próprio autor.

5.7 Biodegradação *in vitro*

O ensaio de biodegradação enzimática foi realizado em quintuplicata para todas as variações de concentração de fármaco em membrana desenvolvidas neste trabalho. As membranas foram submetidas ao ensaio no período de 7 e 14 dias, os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3 – Ensaio de biodegradação *in vitro*.

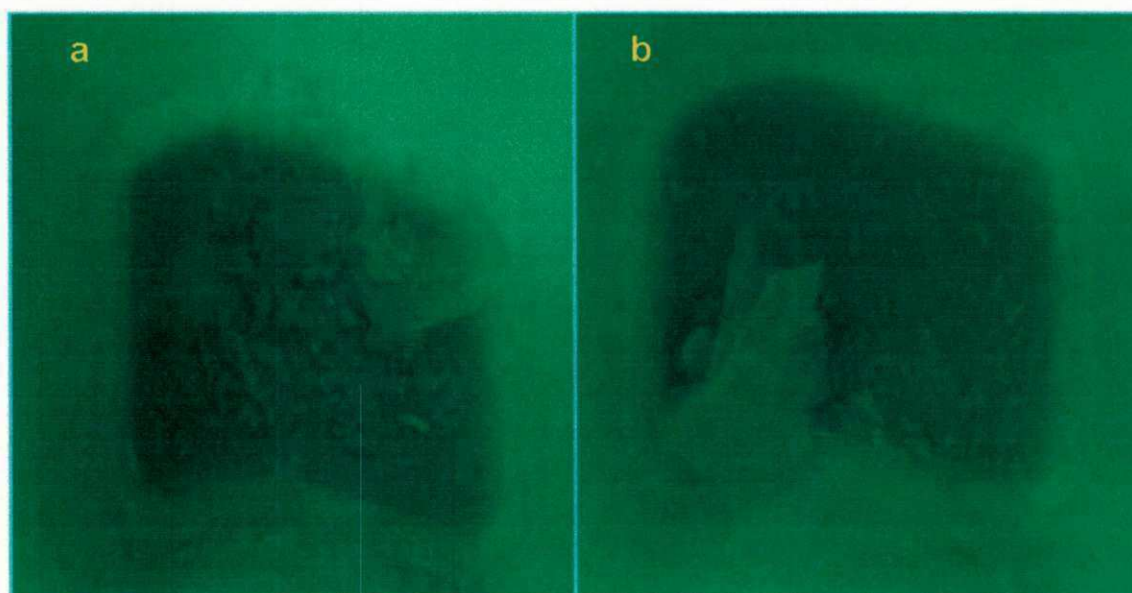
Ensaio	Perda de massa das membranas							
	7 dias				14 dias			
	PBS (pH=7,35)		PBS+Lisozima (pH=7,41)		PBS (pH=7,32)		PBS+Lisozima (pH=7,44)	
	Média (%)	Desvio Padrão (%)	Média (%)	Desvio Padrão (%)	Média (%)	Desvio Padrão (%)	Média (%)	Desvio Padrão (%)
Q/F 5 %	3,6	0,6	30,6	0,5	6,5	0,1	65,2	0,5
Q/F 3 %	4,5	0,5	36,8	0,2	7,3	0,0	76,5	0,5
Q/F 1 %	7,7	0,3	45,5	0,5	9,1	0,3	82,6	0,3

Fonte: Próprio autor.

As membranas sintetizadas foram renomeadas na Tabela 3 para Q/F 5% - Quitosana/ Fentanil 5%, Q/F 3% - Quitosana/ Fentanil 3% e Q/F 1% - Quitosana/ Fentanil 1%..

Observa-se nos dados da Tabela 3 que a degradação das membranas sintetizadas ocorreu principalmente pela ação da lisozima, logo verifica-se que os percentuais de degradação relacionados ao PBS em todas as concentrações não excede 9,1%. Notou-se que a concentração do fármaco é inversamente proporcional a degradação da membrana, já que quanto maior sua concentração menor foi sua degradação em todas as variações estudadas, o que corrobora com a análise de DRX realizada neste trabalho, onde apresentou um espectrograma mais amorfo para as membranas Quitosana/ Fentanil 1 e 3%. Verificou-se que em 14 dias, algumas das membranas com concentração de 3 e 1% de fármaco encontravam-se severamente degradadas (Figura 27) , o que não foi verificado nas membranas com concentração de 5% de fármaco.

Figura 27 – Membrana Quitosana/ Fentanil a – 3% e b – 1% após 14 dias de ensaio.

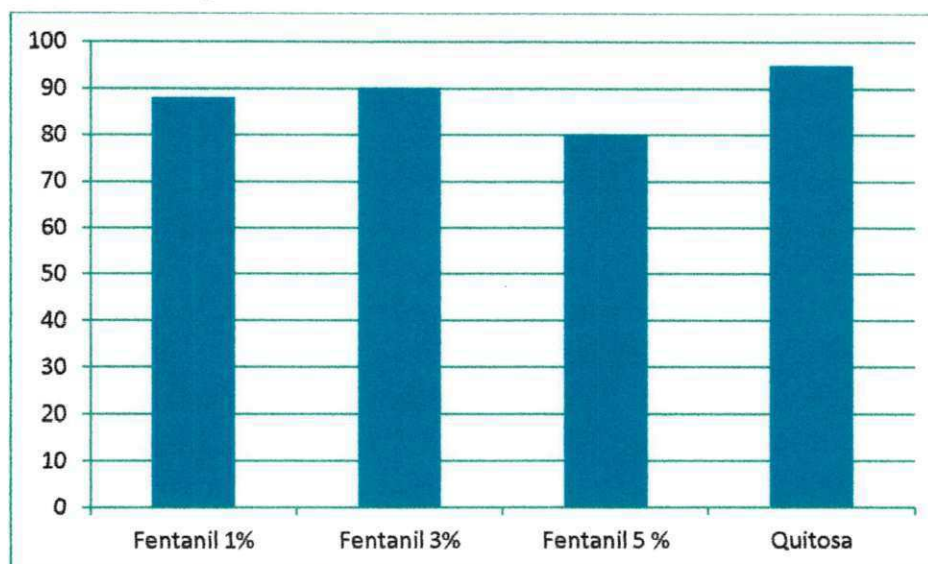


Fonte: Próprio autor.

5.8 Ensaio de citotoxicidade

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

Figura 28 – Resultados do ensaio de citotoxicidade.



Fonte: Próprio autor.

A viabilidade das células expostas as membranas de Quitosana/ Fentanil em todas as concentrações do fármaco foi em média 86%. Dessa forma, a partir dos resultados obtidos na presente pesquisa, pode-se inferir que membranas de Quitosana/ Fentanil produzidas mostraram-se promissoras para serem testadas como biomaterial em ensaios *in vivo*.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados pode se inferir que:

- A adição do fármaco a solução de quitosana para síntese da membrana apropriou o mesmo caráter cristalino observado na análise de Difração de raios X, esse perfil cristalino foi constatado em membranas com concentração maior ou igual a 3 % de fentanil;
- A técnica de Calorimetria Exploratória Diferencial demonstrou uma não alteração na resistência térmica do material oriunda da variação de concentração do fármaco nas proporções analisadas neste trabalho;
- A Microscopia Óptica em conjunto com a Microscopia Eletrônica de Varredura identificou a incorporação fármaco/ polímero, onde não foi verificada a presença de uma segunda fase. Pode-se notar na MO que a utilização de fármacos de diferentes fornecedores podem configurar diferentes superfícies as membranas, fator esse que está relacionado aos excipientes utilizados por cada fabricante;
- Observaram-se grãos presentes na superfície das membranas, grãos esses que continham elementos não informados pelos fornecedores do medicamento assim como verificado na análise de Espectroscopia Dispersiva de raios X, indicando assim uma contaminação industrial do fármaco;
- Na análise de tensão superficial observou-se uma diminuição na hidrofiliidade da membrana diretamente proporcional a concentração de fármaco na mesma, ou seja, quanto maior a concentração de fármaco menor sua hidrofiliidade. Todas as membranas estudadas neste trabalho apresentaram aspecto hidrofílico;
- O ensaio de biodegradação *in vitro* demonstrou que o material sintetizado foi parcialmente biodegradado no período de 14 dias;
- Verificou-se que com o aumento da concentração do fármaco obtêm-se uma menor degradação da membrana, o que indica que esse processo pode ser controlado a partir da quantidade de fármaco incorporado no processamento da membrana.

- Com os resultados do ensaio de citotoxicidade, verificou-se que, nas concentrações estudadas, tanto a adição como a variação da quantidade de fármaco na membrana sintetizada não as tornaram tóxicas.

Diante do exposto pode-se concluir que a metodologia empregada para a síntese das membranas Quitosana/ Fentanil apresentou-se eficaz. As análises efetuadas sugerem a presença de fentanil nas membranas sintetizadas acarretando variações na sua degradabilidade, indicando ser um promissor material para utilização em sistemas de liberação controlada de fármaco.

REFERÊNCIAS

ARANAZ, I.; MENGIBAR, M.; HARRIS, R.; PANOS, I.; MIRALLES, B., ACOSTA, N.; GALED, G. and Heras, A., Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology*, vol. 3, nº 2, p. 203-230, 2009.

ALHANATI, L.S. Tensão Superficial. Alfa Virtual School – Física. Disponível em: http://alfaconnection.net/pag_avsf/fqm0101.htm. Acesso em 01/03/2013.

ASTM F 1635-04 – Standart Test Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants. West Conshohocken, PA: American Society for Testing and Materials International; 2004.

AYALA, G. G.; MALINCONICO, M.; LAURIENZO, P. *Molecules*, vol. 13, p. 2069, 2008.

AZEVEDO, J. R. et al. Caracterização Físico-química de nanopartículas de quitosana-TPP contendo insulina. In: VII Congresso Brasileiro de análise Térmica e Calorimetria, São Pedro, Anais, São Paulo, 2010.

BARROS, G. A. M.; FERRIS, F. K. Analgésicos opioides sistêmicos, p. 1074 = 1083, 2009.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; PEPPAS, N. A.; GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 57, nº 1, p. 19-34, 2004.

BIANCO, G.; NONATO, B. Roteiro de aulas práticas. Universidade Federal do Espírito Santo, 2011. Disponível em: <http://www.ceunes.ufes.br/downloads/2/brenomelo-APOSTILA%20FQII.pdf>. Acesso em 01/03/2013.

BLACK, J. *Biological Performance of Materials*, 2ª Ed., 1992.

BORETOS, J. W.; EDEN, M. *Contemporary Biomaterials, Material and Host Response, Clinical Applications, New Technology and Legal Aspects*, Noyes Publications, Park Ridge, p. 232–233, 1984.

BOYCE, S. T. *Regulatory Issues and Standardization, Methods of Tissue Engineering*, Orlando: Academic Press, p. 3-17. 2002.

BRUCK, S. D. *Properties of Biomaterials in the Physiological Environment* 1980.

CLEASEN, C.; WHILHELMS, T.; KULICKE, W. M. Formation and characterization of chitosan membranes. *Biomacromolecules*, vol. 7, p. 3210-3222, 2006.

COOKE, F. W.; LEMONS, J. E.; RATNER, B. D. Properties of Materials in Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine, Academic Press, p. 11–35, 1996.

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

DRUMMOND, D. C. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors, *Pharmacological Reviews*, vol. 51, p. 691 – 743, 1999.

EMBUSCASO, M. E., HUBER, K. C. Edible Filmes and Coatings for Food Applications, Dordrecht; London, Springer, 2009.

FELDMAN, D. et al., Biomaterial-Enhance Regeneration for Skin Wounds. In: WISE, D. L. Biomaterials and Bioengineering Handbook, Cap. 36. p.807-836, 2003.

FERNANDES, S. C. M.; FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; PASCOAL NETO, C.; GANDINI, A. Novel materials based on chitosan and cellulose. *Polymer International*, vol. 60, nº 6, p. 875-882, 2011.

FERREIRA, K. A. S. L.; KIMURA, M.; TEIXEIRA, M. J.; NOBREGA, J. C. M. Preditores de controle inadequado da dor entre pacientes com dor oncológica, 7º Congresso Brasileiro de Dor, Gramado, *Revista Dor: pesquisa, clínica e Terapêutica*, 2006.

FIDÉLES, T.B. Filmes Reticulados de Quitosana para Aplicação como Biomaterial. Programa de pós-graduação em Ciência e engenharia de Materiais. Universidade Federal de Campina Grande (Dissertação), 72f, 2010.

FIGUEIRÓ, J. A. B.; TEIXEIRA, M. J. Reações comportamentais desencadeadas pela dor. *Rev. Med.*, São Paulo, nº 74, p. 67 – 68, 1995.
Teixeira, M. J. Dor no doente com câncer, Curitiba, Editora Maio, Cap. 21, p. 327 – 341, 2003.

FOLKMANN, J. How th Field of the controlled release technology began, and its central controlled role in the development of a angiogeneses research, *Biomaterials*, vol. 11, p. 18 – 615, 1990.

FOOK, M. V. L. Desenvolvimento da técnica de deposição de hidroxiapatita na superfície de polietileno de ultra-peso molecular para aplicação como biomaterial. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 128 f, 2005.

GOOSEN, M. E. A – “Applications of chitin and chitosan”, Technomic Publishing Company, Lancaster, 1996.

GRAHAM, N. B. *Br. Poly. J.* vol. 10, p. 6 – 260, 1998.

HENCH, L. L.; ERTHRIDGE, E. C. *Biomaterials - An Interfacial Approach*, vol. 4, Noordergraaf, Ed. New York: Academic Press, 1982.

INTURRISI, C. E. Clinical pharmacology of opioids for pain, *Clin. J. Pain.*, nº 18, p. 3 – 13, 2000.

INTURRISI, C. E.; LIPMAN, A. G. opioid analgesics, *Management of Pain*, 4ª ed., p. 1172 - 1186, 2010.

JORNAL DA DOR, SBED – Sociedade Brasileira para Estudos da Dor, Ano XI, nº 42, 2011.

KIM, S. K.; RAJAPAKSE, N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydrate Polymers*, vol. 62, nº 4, p. 357-368, 2005.

KING, T.; PORRECA, F. Opioids in cancer pain: new considerations, *Pain Clinical Updates*, IASP, p. 1 – 5, 2010.

KOWALSKI, L. P. *Bases da oncologia*, p. 543-599, 1998.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review, *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 35, nº 2 e 3, p. 126-139, 2004.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications, *Reactive and Functional Polymers*, vol. 46, nº 1, p. 1-27, 2000.

LANGNER, M.; UGORSKI, M. The macromolecular aggregate as drug carrier, *Cellular and Molecular Biology Letters*, vol. 5, p. 433 – 440, 2000.

LARANJEIRA, M. C.; FAVÉRE, V. T. Quitosana: Biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. *Química Nova*, vol.32, p.672-678, 2009.

LEE, T. W. Y.; ROBINSON, J. R. Sistema de Liberação Controlada de Drogas. In: GENNARO, A.R.(Ed.) *Remington: A Ciência e a Prática da Farmácia*, 20ªed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.47, p.931-960, 2004.

LEMMONS, J.; NATIELLA, J. Biomaterials, biocompatibility and Peri-implant considerations, *Dent. Clin. North AM.*, Philadelphia, E.U.A., vol. 30, nº 1, p. 3 – 23, 1986.

LIMA, R. S. C. Desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos: Quitosana/ Insulina, *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Campina Grande, 2010.

MARTIN, W. R.; EADES, C. G.; THOMPSON, J. A.; HUPPLER, R. E.; GILBERT, P. E. The effects of morphine - and nalorphine-like drugs in the

nondependent and morphine dependent chronic spinal dog, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, nº 197, p. 517-532, 1976.

MARRECO, P.R.; MOREIRA, P.L.; GENARI, S.C.; MORAES, A.M. Effect of Different Sterilization Methods on the Morphology.Mechanical Properties, and Cytotoxicity of Chitosan Membranes Used as Wound Dressings. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 71A, p. 268-277, 2004.

MERSKEY, H.; ALBE-FESSARD, D. G.; BONICA, J. J. Pain terms: a list with definitions and notes on usage, Recommended by the IASP subcommittee on Taxonomy, *Pain*, nº 6, p. 52 – 249, 1979.

MINSON, F. P.; GÁRCIA, J. B. S.; JÚNIOR, J. O. O.; SIQUEIRA, J. T. T.; JÚNIOR, L. H. J. e colaboradores, *II Consenso Nacional de dor oncológica*, 1ª ed., EPM – Editora de Projetos, São Paulo, 2010.

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

OLIVEIRA, JR. J. O.; NOGUEIRA, M. N. Dor em emergências, *Diagnóstico e terapêutica das urgências médicas*, nº 33, p. 88 – 277, 2003.

OLIVEIRA, JR. J. O.; ANDRADE, M. P.; AMARAL, E. M. F. A dor em oncologia. In: Brentani MM, Coelho FRG, Iyeyasu H, nº 33, p. 90 – 270, 1998.

OSÓRIO, S.M.L. Novel polymeric systems based on natural materials: development and biological performance, *Dissertação (Mestrado em Processamento e Caracterização de Materiais)*, Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2007.

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

PEPPAS, N. A.; LANGER, R. "New Challenges in Biomaterials", *Science*: 263, p. 1715–1720, 1994.

PIMENTA, C. A. M. Aspectos culturais, afetivos e terapêuticos relacionadas à dor no câncer, São Paulo, Universidade de São Paulo, 1995.

RATNER, B. D. "New ideas in biomaterials science - a path to engineered biomaterials" *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 27, p. 837–850, 1993.

ROBERTS, G. A. F. - "Chitin Chemistry", The Macmillan Press, London, 1992.

SAKATA, R. K.; ISSY, A. M. Fármacos para tratamento da dor, Ed. Manole, São Paulo, p. 45 – 80, 2008.

SCHMALZ, G. Material science: biological aspect. J. Dent. Res., Alexandria, vol. 81, nº 10, p. 660 – 663, 2002.

SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J. K. V.; JEON, Y. J. Food applications of chitin and chitosans, Trends in Food Science & Technology, vol. 10, nº 2, p. 37-51, 1999.

SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados Hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. Química nova, vol. 29, nº 4, p. 776-785, 2006.

SOWERBY, J.; SMITH, E. J. English Botany. Disponível em <http://www.books.google.com>. Acesso em 10/05/2010, (1918).

SPERLING, V. M. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFMG, 1995. 240 p. (Princípios do tratamento biológico de águas residuárias, v. 1).

TEIXEIRA, M. J. Dor: princípios e prática, nº 12, p. 75 – 145, 2009.

THARANATHAN, R. N.; KITTUR, F. S. Chitin-The undisputed biomolecule of great potential. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, vol. 43, nº 1, p. 61-87, 2003.

VASCELLO, L.; MCQUILLAN, R. J. Opioid analgesics and routes of administration, Cancer pain – Pharmacological, interventional and palliative approaches, p. 171 – 193, 2006.

VULCANI, V. A. S. Matrizes de Colágeno para liberação controlada de Progesterona, Dissertação de mestrado, São Carlos, 2004.

WILLIAMS, D. F. WILLIAMS Dictionary of Biomaterials, Liverpool University Press, 1999.

WISNIEWSKI, A.; ARGUELHO, M. L. Manual de Instruções e Roteiros de Experimentos. Laboratório de Química. Universidade Federal de Sergipe, 2011. Disponível em: http://albertowj.files.wordpress.com/2011/03/106372-apostila-2011_1-t3.pdf. Acesso em 25/08/2011.

XIA, W. S.; LIU, P.; ZHANG, J. L.; AND CHEN, J. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides, Food Hydrocolloids, vol. 25, nº 2, p. 170-179, 2011.