



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



LEONARDO FALCÃO FEITOSA

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE MATRIZ POROSA QUITOSANA/FENTANIL
PARA IMPLEMENTAÇÃO COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO
CONTROLADA DE FENTANIL**

**CAMPINA GRANDE
DEZEMBRO/2014**

LEONARDO FALCÃO FEITOSA

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE MATRIZ POROSA QUITOSANA/FENTANIL
PARA IMPLEMENTAÇÃO COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO
CONTROLADA DE FENTANIL**

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 parcial à Obtenção do título de mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Gelmires de Araújo Neves

CAMPINA GRANDE
DEZEMBRO/2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

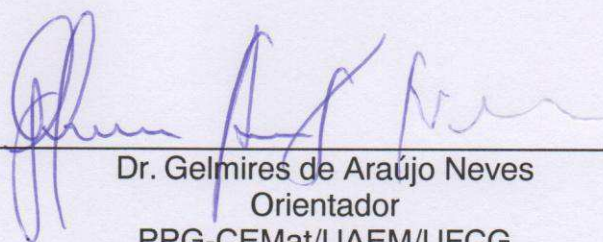
- F311s Feitosa, Leonardo Falcão.
 Síntese e caracterização de matriz porosa quitosana/fentanil para
 implementação como sistema de liberação... / Leonardo Falcão Feitosa. –
 Campina Grande, 2014.
 50 f. : color.
- Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) –
 Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia,
 2014.
- "Orientação: Prof. Dr. Gelmires de Araújo Neves".
 Referências.
1. Quitosana. 2. Biomateriais. 3. Opióides. 4. Citrato de Fentanila.
 5. Fentanil. I. Neves, Gelmires de Araújo. II. Título.

CDU 677.473(043)

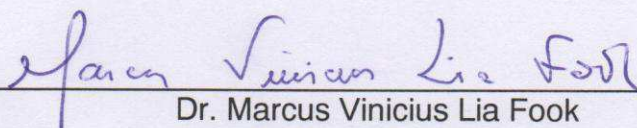
**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE MATRIZ POROSA
QUITOSANA/FENTANIL PARA IMPLEMENTAÇÃO COMO SISTEMA DE
LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS**

LEONARDO FALCÃO FEITOSA

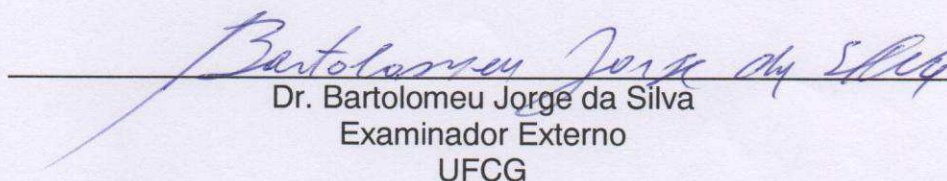
Dissertação Aprovada em 29/12/2014 pela banca examinadora constituída dos seguintes membros:



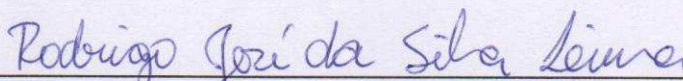
Dr. Gelmires de Araújo Neves
Orientador
PPG-CEMat/UAEM/UFCG



Dr. Marcus Vinicius Lia Fook
Orientador
PPG-CEMat/UAEM/UFCG



Dr. Bartolomeu Jorge da Silva
Examinador Externo
UFCG



Dr. Rodrigo José da Silva Lima
Examinador Externo
UFCG

Aos meus familiares.

DEDICO

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. 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. Devido a grande problemática da manutenção de níveis séricos de fármacos no organismo humano, principalmente quando se tratam de fármacos relacionados ao tratamento de dores de moderadas a intensa, este trabalho propõe o desenvolvimento de membranas porosas a base de quitosana, que é um polímero natural biocompatível, capazes de promover a liberação controlada de fentanil. As matrizes obtidas foram caracterizadas por: MO, MEV, EDS, FTIR, DRX, Ensaio de Intumescimento, Ensaio de Biodegradação e Ensaio de Citotoxicidade. Por MO e MEV verificou-se uma superfície com poros aparentemente interconectados. A partir da análise por EDS pode-se verificar os elementos componentes da quitosana e do fármaco. Por FTIR e DRX notou-se a não alteração dos grupos funcionais e cristalinidade, respectivamente, do material devido a incorporação do fármaco. Baseado nos ensaios de intumescimentos e biodegradação verificou-se a capacidade de controlar as variáveis: razão de intumescimento e taxa de degradação exclusivamente pela variação da concentração de quitosana na membrana porosa. Verificou-se no ensaio de citotoxicidade que as membranas, mesmo com a incorporação do fármaco, não apresentaram citotoxicidade. Baseado nos resultados obtidos pôde-se concluir que é possível sintetizar uma matriz polimérica com promissoras propriedades para carrear fármaco e para testes in vivo.

Palavras-chave: Biomateriais. Quitosana. Opióides. Citrato de Fentanila. Fentanil.

ABSTRACT

In conventional medical therapy the drug is administered via a dosage form and produces a tissue level of the drug that is not maintained within the therapeutic range over an extended period of time. Thus, the success of the treatment will depend on several factors such as accurate and frequent dosing at predetermined specific times and patient adherence to therapy so that the non-compliance to the treatment regimen can result in use of the drug in not effective range or toxic levels. Due to the great problem of maintaining serum levels of drugs in the human body, especially in the case of drugs related to the treatment of moderate to severe pain, this paper proposes the development of porous membranes chitosan base, which is a biocompatible natural polymer, capable of promoting the controlled release of fentanyl. The matrices obtained were characterized by: OM, SEM, EDS, FTIR, XRD, Swelling test, biodegradation test and Cytotoxicity Assay. For OM and SEM there was apparently a surface with interconnected pores. From the EDS analysis can verify the elements of chitosan and drug. FTIR and XRD noted not to change functional groups of crystallinity and, respectively, of the material due to the incorporation of the drug. Based on swellings and biodegradation tests verified the ability to control the following variables: swelling ratio and degradation rate solely by varying the concentration of the chitosan porous membrane. It was found that the cytotoxicity assay the membranes, even with the incorporation of the drug did not show cytotoxicity. Based on the results obtained it was concluded that it is possible to synthesize a polymer matrix with promising properties to adduce drug and in vivo tests.

Keywords: Biomaterials. Chitosan. Opioids. Fentanyl citrate. Fentanyl.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01	Estrutura da quitosana	16
Figura 02	Derivados e aplicações de quitosana	18
Figura 03	Comparação das variações de concentração de fármacos administrados por (a) métodos convencionais de multidose e (b) sistemas de liberação controlada. A = dose do fármaco	21
Figura 04	Classificação da liberação controlada de fármaco e suas principais vias de administração.....	22
Figura 05	Estrutura química do citrato de fentanil	23
Figura 06	MO da membrana porosa de quitosana na concentração de 0,5% (m/v) nos aumentos de a) 20x, b) 80x e c) 160x	30
Figura 07	MO da membrana porosa de quitosana na concentração de 1,0% (m/v) nos aumentos de a) 20x, b) 80x e c) 160x	30
Figura 08	MO da membrana porosa de quitosana na concentração de 2,0% (m/v) nos aumentos de a) 20x, b) 80x e c) 160x	31
Figura 09	MO da membrana porosa de quitosana/F na concentração de 0,5% (m/v) de quitosana nos aumentos de a) 20x, b) 80x e c) 160x	31
Figura 10	MO da membrana porosa de quitosana/F na concentração de 1,0% (m/v) de quitosana nos aumentos de a) 20x, b) 80x e c) 160x	32
Figura 11	MO da membrana porosa de quitosana/F na concentração de 2,0% (m/v) de quitosana nos aumentos de a) 20x, b) 80x e c) 160x	32
Figura 12	MEV da membrana porosa de quitosana na concentração de 0,5% (m/v) nos aumentos de a) 1000x, b) 2000x e c) 3000x.....	33
Figura 13	MEV da membrana porosa de quitosana na concentração de 1,0% (m/v) nos aumentos de a) 1000x, b) 2000x e c) 3000x.....	33
Figura 14	MEV da membrana porosa de quitosana na concentração de 1,0% (m/v) nos aumentos de a) 1000x, b) 2000x e c) 3000x.....	34
Figura 15	MEV da membrana porosa de quitosana/F na concentração de 0,5% (m/v) de quitosana nos aumentos de a) 1000x, b) 2000x e c) 3000x	35
Figura 16	MEV da membrana porosa de quitosana/F na concentração de 1,0% (m/v) de quitosana nos aumentos de a) 1000x, b) 2000x e c) 3000x	35
Figura 17	MEV da membrana porosa de quitosana/F na concentração de 2,0% (m/v) de quitosana nos aumentos de a) 1000x, b) 2000x e c) 3000x	36

Figura 18	EDS das membranas de quitosana pura nas concentrações de a) 0,5%, b) 1,0% e c) 2,0%	37
Figura 19	EDS das membranas de quitosana/F nas concentrações de a) 0,5%, b) 1,0% e c) 2,0% (m/v) de quitosana	38
Figura 20	FTIR do citrato de fentanila puro, das membranas de quitosana pura nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 2,0% e das membranas de quitosana/F nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 2,0% de quitosana	39
Figura 21	DRX das membranas porosas de quitosana pura e quitosana/F nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 2,0% (m/v).....	40
Figura 22	Resultados do ensaio de intumescimento das membranas sintetizadas neste trabalho	41
Figura 23	Ensaio de biodegradação das membranas porosas sintetizadas submetidas a solução tampão de PBS.....	42
Figura 24	Ensaio de biodegradação das membranas porosas sintetizadas submetidas a solução tampão de PBS+enzima lisozima.....	43
Figura 25	Resultados do ensaio de citotoxicidade para todas as membranas sintetizadas neste trabalho.....	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	14
2.1	Geral	14
2.2	Específicos	14
3	REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1	Biomateriais	15
3.2	Quitosana	16
3.3	Liberação Controlada de Fármacos	19
3.4	Opióides	22
3.4.1	Fentanil	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1	Materiais	25
4.2	Métodos	25
4.2.1	Preparação da solução de quitosana e membranas porosas de quitosana	25
4.2.2	Preparação da solução de quitosana/F e membranas de quitosana/F	25
4.2.3	Caracterizações	26
4.2.3.1	<i>Microscopia Óptica (MO)</i>	26
4.2.3.2	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	26
4.2.3.3	<i>Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS)</i>	27
4.2.3.4	<i>Espectroscopia da Região de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i>	27
4.2.3.5	<i>Difração de raios X (DRX)</i>	27
4.2.3.6	<i>Ensaio de Intumescimento</i>	28
4.3.3.7	<i>Ensaio de Biodegradação Enzimática</i>	28
4.3.3.8	<i>Ensaio de Citotoxicidade</i>	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1	Microscopia Óptica (MO)	30
5.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	33
5.3	Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS)	36
5.4	Espectroscopia da Região de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	38

5.5	Difração de raios X (DRX)	40
5.6	Ensaio de Intumescimento	41
5.7	Ensaio de Biodegradação Enzimática	42
5.8	Ensaio de Citotoxicidade	44
6	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

O estudo dos biomateriais, termo utilizado para definir qualquer substância (que não seja uma droga) ou 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, onde trata, aumenta ou substitui tecidos, órgãos ou funções do corpo, está fundamentalmente atrelado a dois conceitos básicos: biofuncionalidade e biocompatibilidade, sendo estes os pilares de sustentação no estudo e aplicação desse importante campo da ciência. Funcionalidade, de forma clara e objetiva, é o conjunto de propriedades inerentes ao material que o permite desempenhar uma função desejada, enquanto que biocompatibilidade é a aceitação do material pelo meio biológico que o aloja (BERGMAN, et al., 2013; BORETOS; ÉDEN, 1984; PUCCI et al., 2002).

Os biomateriais podem ser classificados de acordo com sua composição química em biomateriais metálicos, cerâmicos e poliméricos. Alguns autores consideram os compósitos a quarta classe dos biomateriais (WILLIAMS, 1999).

Os biomateriais poliméricos de origem natural, 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. Uma das vantagens destes materiais é seu baixo custo como resultado da disponibilidade da matéria-prima, exemplos de biopolímeros são a quitina, quitosana, colágeno, elastina, ácido hialurônico, dextrana e celulose (KAPLAN, 1998).

A quitosana, poli[β -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranos], é obtida pela desacetilação parcial da quitina, sendo, portanto, um biopolímero de cadeia longa e linear composta por monómeros 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 quitosana quando o biopolímero apresenta GA inferior a 50% (FERNANDES, et al. 2011; KRAJEWSKA, 2004).

A quitosana apresenta elevada biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de propriedades hemostáticas, analgésicas, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes, anti-colesterolêmicas, antitumorais e imunoestimuladoras. Embora esteja ausente nos mamíferos, a quitosana pode ser degradada in vivo por várias enzimas proteolíticas, como a lisozima, a papaína e a pepsina (ARANAZ, et al., 2009).

Os materiais naturais, como a quitosana, têm sido aplicados topicamente nos sistemas de liberação de fármacos, tanto em forma de membrana como em esferas, apresentando vantagens com relação aos materiais sintéticos, como a degradação controlada em meio biológico de acordo com os mecanismos fisiológicos e a permeabilidade tanto para fármacos ácidos, como para fármacos básicos (FELDMAN et al., 2003).

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 da 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, fatores esses que auxiliam na manutenção do bem estar do paciente, que muitas vezes deve ser mantido sob medicação constante em decorrência da dor (AZEVEDO, 2002).

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, predispõem os doentes a complicações e podem prolongar a internação. (FERREIRA, et al. 2006; PIMENTA, 1995).

Os opioides permanecem como os fármacos mais efetivos e mais comumente utilizados no tratamento da dor de 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).

O alívio da dor pelo Fentanil® (tipo de opioide) 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).

Devido a grande problemática da manutenção de níveis séricos de fármacos no organismo humano, o que pode acarretar, dentre outros fatores, intoxicação e dependência, principalmente quando se tratam de fármacos relacionados ao tratamento de dores de moderadas a intensa, este trabalho propõe o desenvolvimento e caracterização de uma matriz porosa de quitosana capaz de promover a liberação controlada do fármaco Fentanil em meio biológico.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Desenvolver matrizes poliméricas porosas (na forma de membranas porosas) de quitosana capazes de promover a liberação controlada de Fentanil.

2.2 Específicos

- Caracterizar membranas porosas com diferentes concentrações de quitosana;
- Verificar o grau de intumescimento do material;
- Verificar como a presença do fármaco altera a citotoxicidade da membrana porosa;
- Verificar biodegradação *in vitro* das membranas sintetizadas;
- Utilizar de planejamento experimental *one-way* para correlacionar a variação da concentração de quitosana com a degradação das membranas porosas.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Biomateriais

Biomateriais, termo utilizado para definir qualquer substância (que não seja uma droga) ou 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, onde trata, aumenta ou substitui tecidos, órgãos ou funções do corpo, está fundamentalmente atrelado a dois conceitos básicos: biofuncionalidade e biocompatibilidade, sendo estes os pilares de sustentação no estudo e aplicação desse importante campo da ciência, onde, funcionalidade, de forma clara e objetiva, é o conjunto de propriedades inerentes ao material que o permite desempenhar uma função desejada, enquanto que biocompatibilidade é a aceitação do material pelo meio biológico que o aloja (BERGMAN, et al., 2013; BORETOS, ÉDEN, 1984; PUCCI et al., 2002).

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).

Os biomateriais são utilizados desde as civilizações mais antigas. Chineses e indianos já usavam ceras, resinas e tecidos para reconstruir partes perdidas ou defeitos do corpo. Ao longo dos séculos, avanços nos tipos de materiais sintéticos, técnicas cirúrgicas e métodos de esterilização vêm permitindo o uso de biomateriais em partes do corpo não visualizadas até então (SCHILLING et al., 2004).

Os biomateriais podem ser divididos em 3 classes principais de materiais: poliméricos, cerâmicos, e metálicos. Os polímeros representam a maior classe dentre os biomateriais (RATNER et al., 2013).

Os biomateriais poliméricos de origem natural 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, permitindo a seleção de propriedades importantes, tais como capacidade de absorção de água, cinética de degradação, ou

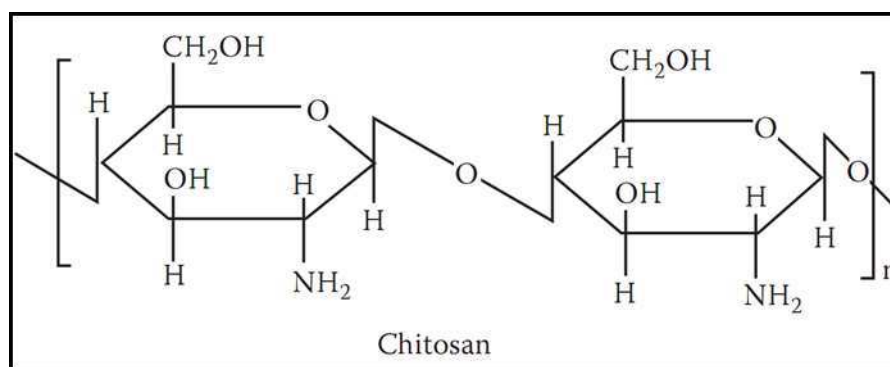
propriedades mecânicas com especificações apropriadas e determinadas aplicações (KAPLAN, 1998).

A grande variedade de polímeros naturais relevantes para o campo de biomateriais inclui desde materiais derivados de plantas como a celulose, alginato de sódio e a borracha natural, a materiais derivados de animais como colágeno, glicosaminoglicanos (GAGs), heparina, quitina, quitosana e ácido hialurônico. (RATNER et al., 2013).

3.2 Quitosana

A quitosana (Figura 01), é obtida por desacetilação parcial da quitina, constituindo-se de um polímero de cadeia linear e longa composta 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 01 - Estrutura da quitosana.



Fonte - Kumar, (2000).

A quitosana é um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável, de grande importância econômica e ambiental (AZEVEDO et al, 2007). A quitosana é de interesse comercial, devido à sua elevada percentagem de nitrogênio (6,89%) em comparação com a celulose sinteticamente substituída (1,25%). A quitosana foi produzida industrialmente por volta de 1971, no Japão e EUA, países líderes do

mercado mundial deste produto. Por volta de 1993, o Brasil também passou a comercializar quitina e quitosana em larga escala, sendo esta última atualmente comercializada por diversos fornecedores em variados graus de pureza, peso molecular e grau de desacetilação. Dentre as empresas brasileiras que produzem quitosana, duas têm obtido destaque na produção e comercialização destes biopolímeros. São elas: Polymar Indústria Comércio Exportação e Importação, situada em Fortaleza-CE, e Kito Química Fina, localizada em Palhoça-SC (KUMAR, 2000; SANTOS, 2004).

A quitosana apresenta em maior proporção, na cadeia polimérica, unidades de $-(1-4)-2\text{-amino-2-desóxi-D-glicose}$ e, um menor número de unidades de $-(1-4)-2\text{-acetamido-2-desóxi-D-glicose}$ da quitina. Possui semelhança na sua estrutura química com a celulose, porém exibe propriedades diferenciadas devido à presença dos grupos amínicos. Pode ser encontrada naturalmente na parede dos fungos, especialmente nas espécies do gênero *Mucor*, e no exoesqueleto de crustáceos, como o caranguejo e o camarão. Certamente, o parâmetro que diferencia quitosana e quitina é o grau de desacetilação ou grau de acetilação, já que são complementares entre si para o valor de 100% do grau determinado. Esta é uma das características químicas mais importantes, que pode influenciar no desempenho e em diversas aplicações da quitosana. O termo quitosana é usado para identificar a quitina na com mais de 50% dos monômeros na forma desacetilada 50%. Contudo, o correto grau de desacetilação que diferencia a quitina da quitosana não está totalmente definido, ocorrendo divergência entre os autores quanto ao limite de desacetilação que categoriza a quitina ou a quitosana (FILHO et al, 2007).

A reação de desacetilação da quitina envolve a remoção dos grupamentos de acetamida ($-\text{NHCOCH}_3$) que são transformados, em graus variados, em grupos amino ($-\text{NH}_2$), dando origem à quitosana. A versatilidade da quitosana depende principalmente destes grupos amino altamente reativos. O grau de desacetilação depende principalmente do método de purificação e das condições de reação para sua obtenção. Portanto, é importante caracterizar a quitosana por meio da determinação do grau de desacetilação antes da sua utilização. Essa caracterização é muito importante, devido à ocorrência no mercado de comercialização indevida de quitina como quitosana (BAXTER et al., 1992).

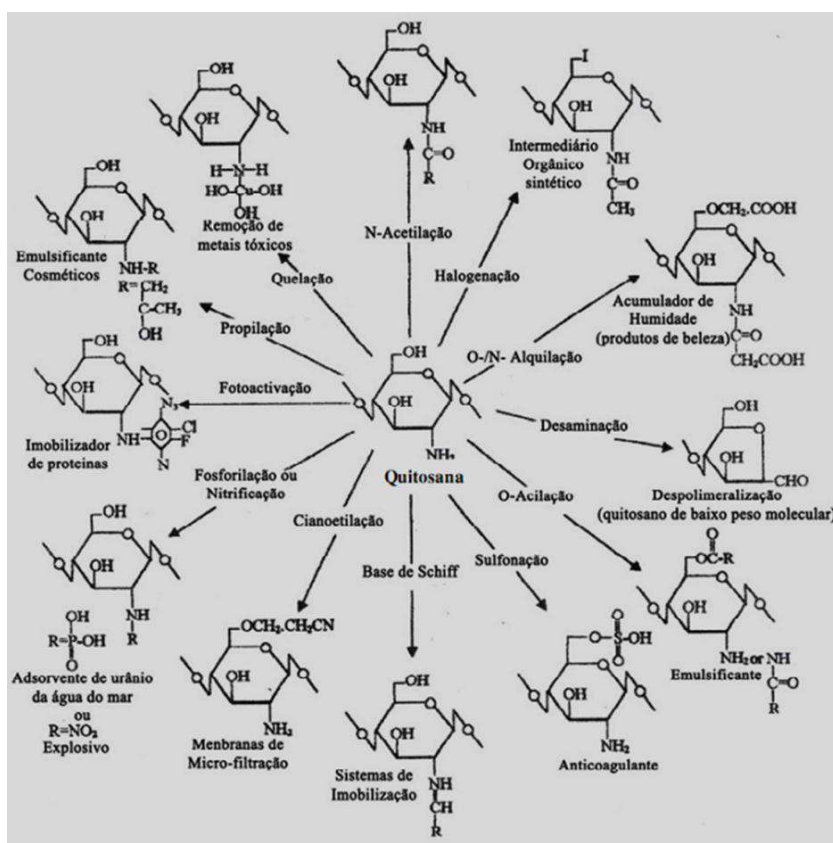
A quitosana é considerada não tóxica, não alergênica, biodegradável, biofuncional e biocompatível. As suas atividades biológicas compreendem, anti-

oxidante, antimicrobiana, efeito analgésico, aceleração da cicatrização, anti-inflamatórias (AIDER, 2010; YANG et al., 2010; ANRAKU et al., 2009).

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).

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 02) (BERGER, et al. 2004; KUMAR, 2000).

Figura 02 - Derivados e aplicações de quitosana.



Fonte - Adaptado de Tharanathan, Kittur, (2003).

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).

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, biossensores para diagnósticos clínicos e liberação de fármacos (AYALA et al., 2008).

3.3 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 mantém 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, ROBINSON, 2004).

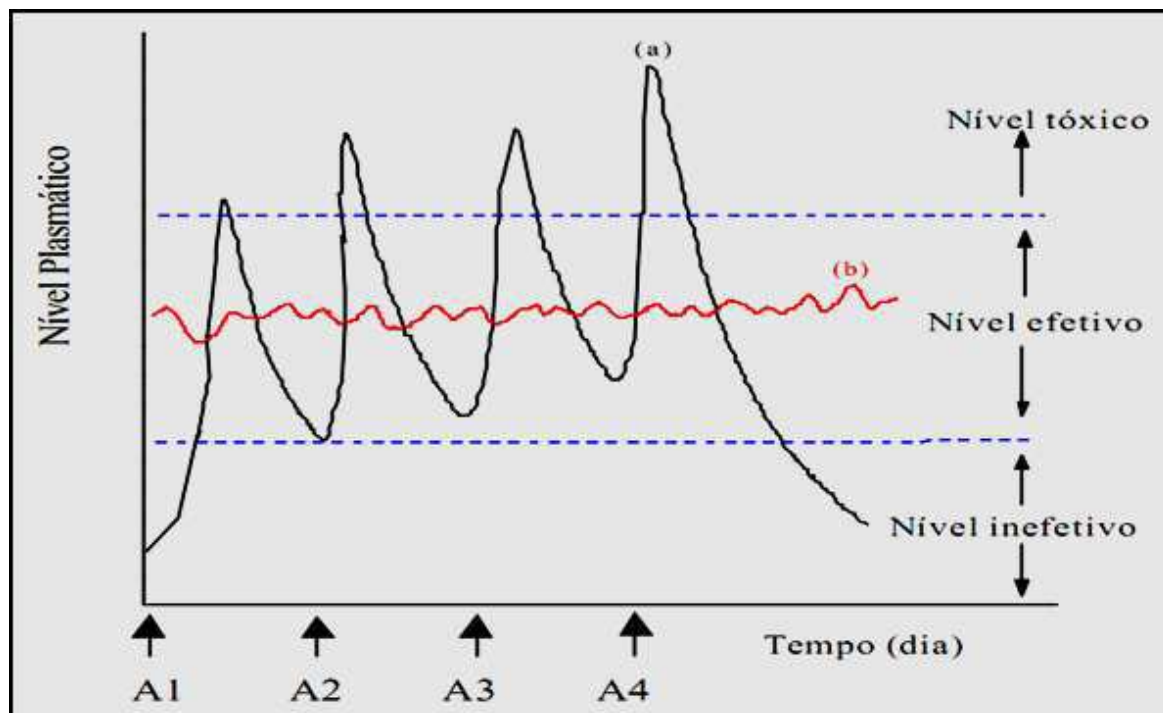
A importância dos sistemas de liberação de princípios ativos advém do fato que raramente um fármaco veiculado em solução aquosa, ou numa forma convencional, consegue atingir um alvo específico no organismo em concentrações adequadas para provocar o efeito terapêutico esperado. Isso pode ser facilmente 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, 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).

A duração da atividade dos medicamentos é bastante variada, sendo, em geral, de alguns minutos a algumas horas (VOIGHT, 1982). Em formas farmacêuticas convencionais, ou também chamadas de sistemas de liberação imediata, o sistema farmacêutico serve apenas de suporte para a substância ativa, pouco interferindo nas características de liberação. Logo depois da administração dessas formas farmacêuticas (nebulização ou “spray”, injeção e comprimidos), a maioria do conteúdo do fármaco é liberada e o efeito terapêutico se manifesta mais ou menos rapidamente e de forma indiscriminada (ANSEL, 2000; MOURA, 2012). Depois de atingir o pico de concentração máxima de fármaco no sangue, o efeito terapêutico começa a diminuir. Para assegurar um efeito terapêutico contínuo, cada nova dose deve ser administrada enquanto o nível sanguíneo do fármaco ainda se encontra acima do limite mínimo necessário para que haja efeito terapêutico. Deste modo, se os intervalos de tempo forem excessivamente curtos, cada concentração máxima é mais elevada que a anterior e poderá ultrapassar o efeito terapêutico e atingir o nível tóxico. Ao contrário, se as doses individuais forem excessivamente espaçadas, então o problema adquire o aspecto inverso e ao fim de pouco tempo as concentrações mínimas são insuficientes para conseguir o nível terapêutico aceitável. Portanto, a solução consiste em estabelecer um plano de tratamento no qual a dose máxima não ultrapasse a necessária para o efeito terapêutico, com o objetivo de não provocar fenômenos de intoxicação, e a dose mínima não se reduza a valores que façam com que o doente fique privado por um certo tempo da ação efetiva do fármaco, como pode ser vista na Figura 03 (MOURA, 2012).

Figura 03 - Comparação das variações de concentração de fármacos administrados por (a) métodos convencionais de multidose e (b) sistemas de liberação controlada. A = dose do fármaco.

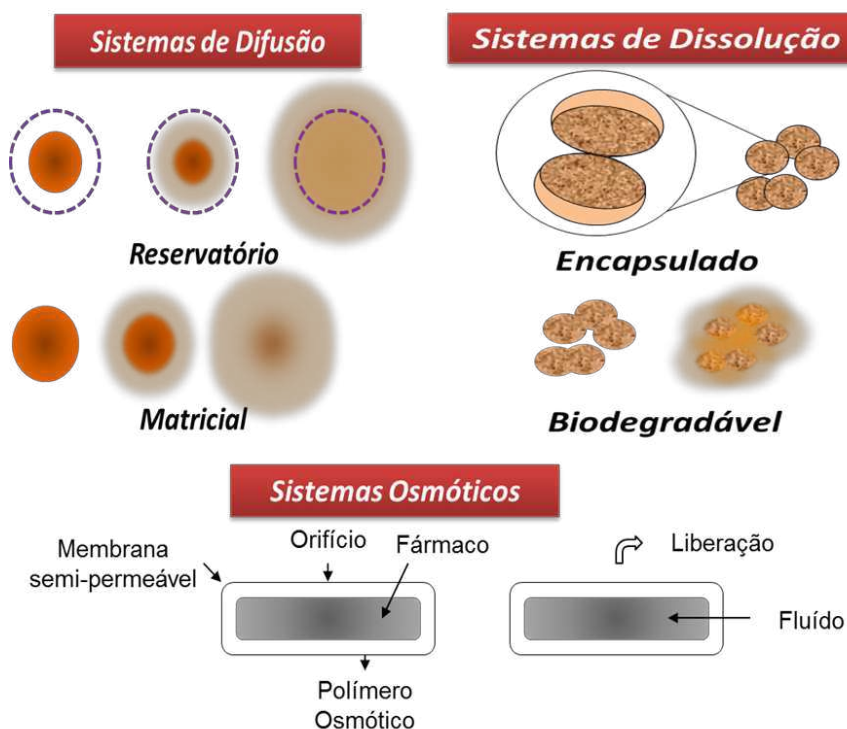


Fonte - Adaptado de Vulcani (2004).

A ação biológica produzida por um medicamento não é simplesmente função da atividade intrínseca do fármaco que ele veicula (PRISTA, 1996; PANDIT, 2008). Inúmeros fenômenos, mais ou menos complexos, se manifestam a partir do momento da administração, os quais dependem não só dos princípios ativos e do organismo ao qual eles são administrados, mais ainda, em larga escala, da fórmula e formulação farmacêutica utilizada (SILVA, 2006; PANDIT, 2008). Sem dúvida, para que um fármaco seja eficaz, é necessário que uma quantidade suficiente dele chegue ao sítio ou sítios de ação e ali permaneça por um tempo suficiente para exercer o seu efeito farmacológico. Isso depende da via e da forma pelas quais o fármaco é administrado e da velocidade com que ele é liberado (AULTON, 2005; PANDIT, 2008).

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

Figura 04 - Classificação da liberação controlada de fármaco e suas principais vias de administração.



Fonte – Adaptado de Lima, (2010).

Estudos vêm sendo direcionados para a obtenção de sistemas de liberação controlada de opióides para utilização no tratamento da dor proveniente do pós-operatória.

3.4 Opióides

Os opióides são medicamentos que originalmente eram derivados do suco desidratado das sementes maduras da papoula (*Papaver somniferum*) denominado de ópio. São tradicionalmente recomendados para o controle da dor aguda e dor crônica oncológica, de moderada à intensa, entretanto, recentemente, em algumas situações, observa-se maior indicação para o controle da dor crônica não-oncológica (MOREIRA, 2001; FANTONI, MASTROCINQUE, 2002; GUTSTEIN, AKILL, 2003).

Dentre os analgésicos são os opióides os mais velhos fármacos conhecidos, pois sua utilização é descrita há mais de 2300 anos. Em 1806, o farmacêutico alemão Frederick Sertürner, isolou e descreveu uma substância pura no ópio e em homenagem ao deus grego do sono Morfeu, a denominou morfina (WERNER, TABOADA, 1994; GÓRNIK, 1996; SACKMAN, 1997; MOREIRA, 2001).

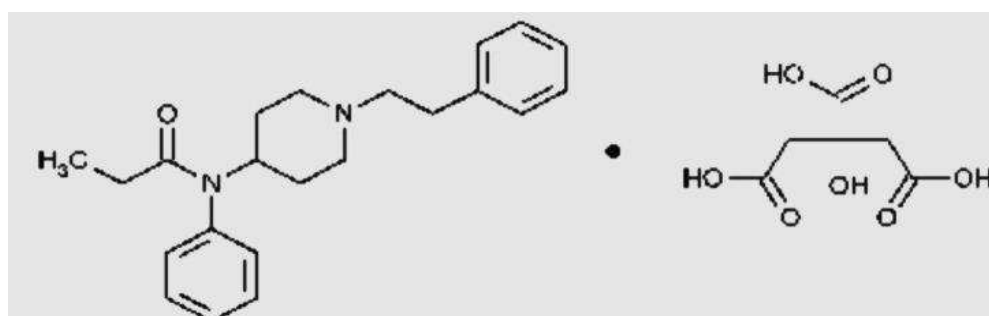
O termo opióide é utilizado para denominar um grupo de drogas com propriedades semelhantes ao ópio. Denomina-se opiáceo os derivados naturais e alguns congêneres semi-sintéticos; e os sintéticos, de opióides. No entanto, há a tendência de se generalizar o termo opióide para todas as substâncias que atuam por meio da interação com receptores opióides. A denominação "narcóticos" deve ser preterida para dissociar-se da idéia de sono e torpor, pois a principal ação dos opióides é a analgesia (GUTSTEIN, AKILL, 2003).

Dentre os opióides esta pesquisa explora os potenciais do fentanil em sistemas de liberação controlada de fármaco incorporado às matrizes poliméricas de quitosana.

3.4.1 Fentanil

O citrato de fentanil (Figura 05) é um opióide, derivado sintético da morfina, agonista de receptores opióides do tipo μ , com potência analgésica cerca de 100 vezes maior que a da morfina. Quando administrado pela via intravenosa, seus efeitos têm início em 1 a 5 minutos apresentando pico de efeito entre 3 e 5 minutos e meia-vida plasmática de cerca de 45 minutos. Este fármaco possui propriedades lipofílicas, atingindo rapidamente o sistema nervoso central (SNC) e sua meia-vida de eliminação é de 3 a 12 horas, sendo biotransformado no fígado e eliminado pelos rins (BODNAR, KLEIN, 2004; BRANSON, GROSS, 2001; NIEMEGEREERS et al., 1976; BOVILL et al., 1984; THURMON et al., 1996; PASERO, 2005).

Figura 05 – Estrutura química do citrato de fentanil.



Fonte – Yaqui et al. (2004).

O fentanil é muito eficiente no tratamento de dores crônicas ou agudas. A dose bolus empregada em cães varia de 2 a 40 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ e, em infusão contínua, pode

variar de 0,1 a 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{min}$. Seus efeitos podem ser antagonizados pela naloxona (PASERO, 2005; VALADÃO et al., 1982; KOIZUMI et al., 1998; CAFIERO, MASTRONARDI, 2000; MASSONE, 2003).

Em associação com halogenados, como o isofluorano, em cães, o fentanil, na taxa de 0,2 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{min}$, possibilita reduzir em até 42% a concentração alveolar mínima (CAM) do anestésico sem causar instabilidade cardiovascular, mas pode produzir depressão respiratória, devido à inibição dos neurônios do bulbo respiratório, alterando o volume corrente (BODNAR, KLEIN, 2004). Apesar de seu curto período de ação, apnéia ocasional pode ocorrer durante a recuperação, devido à redistribuição do fármaco presente no tecido adiposo. MANZKE et al. (2003) relataram que a estimulação dos receptores de 5-HT revertem a depressão respiratória causada pelo fentanil, sem interferir no seu efeito analgésico, sugerindo que os receptores opióides- μ não estejam diretamente relacionados à depressão dessa função. A severidade desses efeitos está relacionada à concentração plasmática do fármaco e sua velocidade de administração, particularmente, pela via intravenosa (PASERO, 2005).

Sobre o sistema cardiovascular, o fentanil produz redução da frequência cardíaca (FC) (BOVILL et al., 1984), além de propiciar o aparecimento de arritmias em consequência do aumento da atividade vagal, como bloqueios atrioventriculares de 2º grau, contrações ventriculares e supraventriculares características de ritmo de escape. Contudo, a administração prévia de sulfato de atropina, por via subcutânea, na dose de 0,044 mg/Kg, pode evitar estes efeitos. Este opióide exerce pouca ação sobre a pressão arterial (PA), mesmo quando associado ao propofol em procedimentos cirúrgicos (KADOI et al., 2005).

Em cães anestesiados com propofol ou isofluorano, há boa correlação entre as alterações nos valores de BIS e a probabilidade de resposta à incisão de pele. Entretanto, quando analgésicos opióides são utilizados em adição aos anestésicos, previamente ao estímulo, esta correlação torna-se menos significativa (SEBEL et al., 1997). Em contrapartida, Conceição (2006) associou ao propofol fentanil ou sufentanil, durante procedimento cirúrgico em cadelas, concluindo que estes opióides, nas doses de 0,5 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{min}$ e 0,1 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{min}$, respectivamente, não prejudicam a avaliação do índice bispectral.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

- Quitosana ($C_{12}H_{24}N_2O_9$), médio peso molecular, 75 – 85% desacetilada com massa molar de aproximadamente (190.000 – 310.000 daltons), da Sigma Aldrich;
- Ampolas de citrato de fentanila (CF), cada mL da solução da ampola contém 78,5 mcg de CF e cada 1,57 mcg de CF equivale a 1 mcg de fentanil base (F);
- Ácido Acético P.A., da Nuclear;
- Hidróxido de Sódio P.A., da Nuclear.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação da solução de quitosana e membranas porosas de quitosana

Foram preparadas soluções de quitosana com concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0% (m/v) por dissolução do pó de quitosana em solução de ácido acético 1% (v/v) por um período de 24 horas sob agitação mecânica e temperatura ambiente. Após completa dissolução a solução obtida foi vertida em placas petri de 5 cm de diâmetro, congeladas em congelador convencional a $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante um período de 24 horas e em seguida liofilizadas durante 24 horas. Após a liofilização o conteúdo das placas petri foi neutralizado com solução de hidróxido de sódio 1 M por um período de 1 h seguida de lavagem com água destilada para retirada do excesso de hidróxido de sódio. O conteúdo das placas petri foi novamente congelado em congelador convencional a $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante um período de 24 horas e em seguida liofilizadas durante 24 horas, obtendo assim as membranas porosas de quitosana nas concentrações de 0,5, 1,0, e 2,0% (m/v) de quitosana.

4.2.2 Preparação da solução de quitosana/F e membranas de quitosana/F

A solução de quitosana pura foi preparada conforme descrito no item 4.2.1, à solução de quitosana foi adicionada solução de CF necessária para obtenção da concentração de 0,5 mg de F por ml de solução de quitosana, esta concentração de

fármaco foi adotada para todas as concentrações de quitosana (0,5, 1,0 e 2,0% (m/v)). A homogeneização da solução de quitosana com a solução de fármaco foi a princípio realizada com o auxílio de um bastão de vidro, em seguida as soluções foram homogeneizadas em ultra som por um período de 1 h para completa dispersão do fármaco na solução de quitosana. Após incorporação do F nas soluções de quitosana as mesmas foram vertidas em placas petri de 5 cm de diâmetro e todos os demais passos para obtenção das membranas porosas de quitosana/F foram idênticos aos descritos no item 4.2.1 para obtenção das membranas de quitosana pura.

4.2.3 Caracterizações

Foi utilizado planejamento experimental *one-way*, com intervalo de confiança de 95,0% ($\alpha=0,05$), para verificar a relação entre a concentração de quitosana e as propriedades da matriz. As matrizes obtidas foram caracterizadas por: Microscopia Óptica (MO), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDS), Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Difração de raios-X (DRX), Ensaio de Intumescimento, Ensaio de Biodegradação e Ensaio de Citotoxicidade.

4.2.3.1 Microscopia Óptica (MO)

A caracterização por microscopia ótica foi realizada em um Microscópio Óptico HIROX, com resolução máxima de 3500X, por luz transmitida, acoplado a uma estação de Captura e Análise de Imagens com Software especializado. As amostras utilizadas na análise consistiam em um corpo de prova quadrado 2x2 cm, os aumentos utilizados foram de 20x, 80x e 100x.

4.2.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para realização das análises de microscopia eletrônica de varredura foi utilizado microscópio eletrônico de varredura de bancada, modelo TM-1000, marca Hitachi, com aumento de 5000x, profundidade de foco de 1 mm, resolução de 30 nm, 15KV, baixo vácuo e pressão variada (1 a 270 Pa), sem recobrimento metálico,

mesmo em amostras não condutoras. As amostras utilizadas na análise consistiam em um corpo de prova quadrado 2x2 cm, os aumentos utilizados foram de 1000x, 2000x e 3000x.

4.2.3.3 Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDS)

As análises por espectroscopia por energia dispersiva de raios X foram realizadas no equipamento TM-1000, marca Hitachi, acoplado ao MEV TM-1000, marca Hitachi. Um detector instalado na câmara de vácuo do MEV mede a energia associada aos elétrons da amostra, como os elétrons de um determinado átomo possuem energias distintas, é possível determinar quais elementos químicos estão presentes na amostra. As amostras utilizadas para a análise de EDS foram as mesmas utilizadas na análise de MEV.

4.2.3.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As análises utilizando a técnica de espectroscopia na região de infravermelho com transformada de Fourier das membranas foram realizadas em temperatura ambiente e o equipamento utilizado será um Spectrum 400 da Perkin Elmer. A técnica FTIR será utilizada para identificar as bandas características dos grupos funcionais presentes nas membranas sintetizadas nesta pesquisa utilizando a faixa de varredura de 4000 a 650 cm^{-1} . As amostras utilizadas na análise consistiam em um corpo de prova quadrado 2x2 cm.

4.2.3.5 Difração de raios X (DRX)

As análises de difração de raios X foram conduzidas a temperatura ambiente em aparelho XRD-6000 Shimadzu, utilizando radiação $K\alpha$ do cobre (1,5418 Å), tensão de 40 kV e corrente 30 mA. As membranas foram examinadas em um intervalo de 2θ entre 5 e 40 ° a uma velocidade de 1°/min. As amostras utilizadas na análise consistiam em um corpo de prova quadrado 2x2 cm.

4.2.3.6 Ensaio de Intumescimento

As membranas sintetizadas foram submersas em solução tampão de PBS por diferentes períodos de tempo até que a quantidade de solução absorvida se tornou constante, o ensaio foi realizado em triplicata com amostras de formato quadrático de 2x2 cm. O grau de intumescimento (Q) foi obtido pela relação entre a massa da membrana com solução absorvida (M_f) pela massa da membrana seca (M_i) como apresentado na Equação 1:

$$Q = \frac{M_f}{M_i} \quad (1)$$

4.2.3.7 Ensaio de Biodegradação Enzimática

O Ensaio de Biodegradação enzimática foi realizado para verificar as taxas de degradação, em solução tampão e na presença de enzimas lisozima, das membranas sintetizadas por um período de 7 dias. O ensaio foi realizado em triplicata para ambas as variações com amostras de formato quadrático 2x2 cm. Para a metodologia empregada neste ensaio foi utilizado como base as normas ASTM F1635-04 Standard teste Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants (2010) e a ASTM F2103-01 Standard Guide for Characterization and Testing of Chitosan Salts as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue-Engineered Medical Products Applications (2007), a concentração de lisozima utilizada será de 0,1 g/L, concentração está semelhante a encontrada na pele humana.

4.2.1.8 Ensaio de Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado em todas as membranas sintetizadas neste trabalho com o objetivo de avaliar sua toxicidade em meio biológico. Tal ensaio foi realizado pelo teste de avaliação da viabilidade celular dos macrófagos por MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) de acordo com a

ISO 10993 de 2009 com fibroblastos L 929 adquiridos no Banco de Célula do Rio de Janeiro (BCRJ).

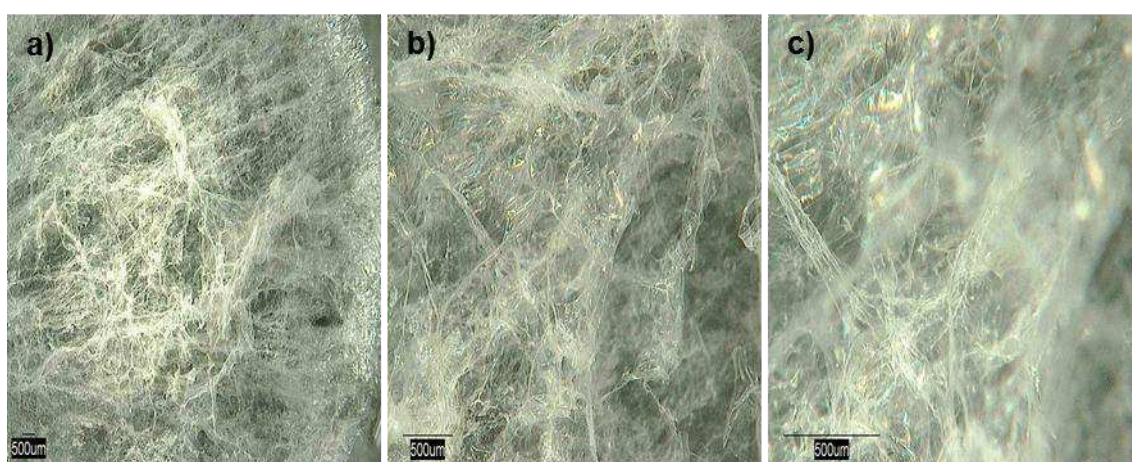
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Microscopia Ótica (MO)

A análise por MO foi realizada com o interesse de analisar a morfologia das membranas de quitosana com e sem a presença do fármaco.

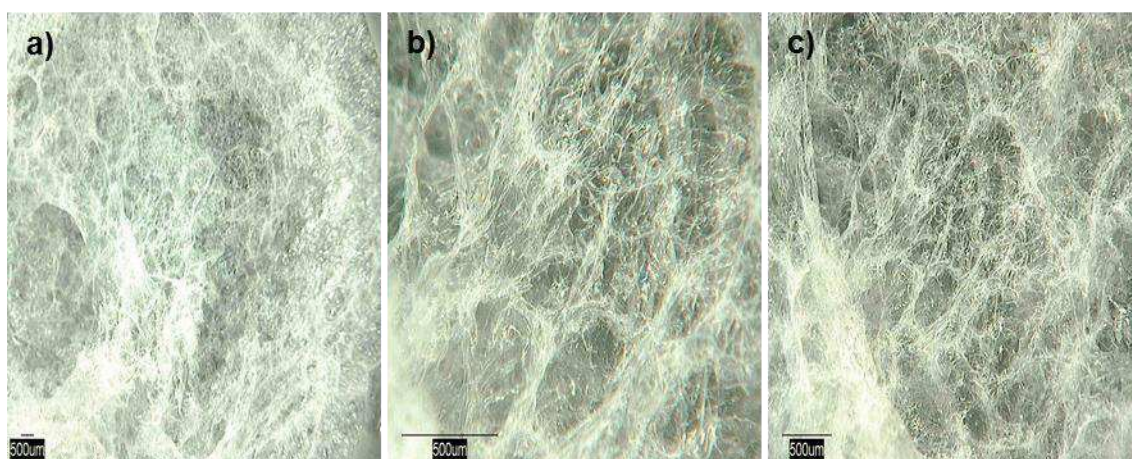
Na Figura 06, 07 e 08 observam-se as microscopias das membranas de quitosana pura nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 2,0% (m/v) respectivamente.

Figura 06 – MO da membrana porosa de quitosana na concentração de 0,5% (m/v) nos aumentos de a) 20x, b) 80x e c) 160x.



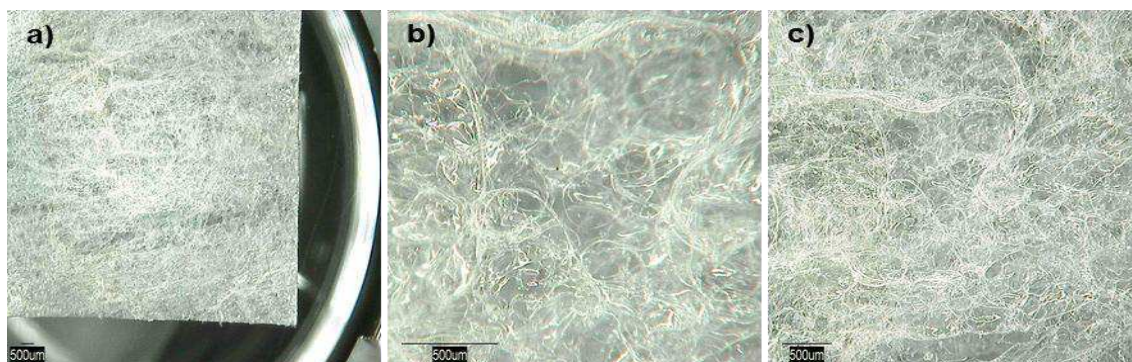
Fonte – Próprio autor.

Figura 07 – MO da membrana porosa de quitosana na concentração de 1,0% (m/v) nos aumentos de a) 20x, b) 80x e c) 160x.



Fonte – Próprio autor.

Figura 08 – MO da membrana porosa de quitosana na concentração de 2,0% (m/v) nos aumentos de a) 20x, b) 80x e c) 160x.



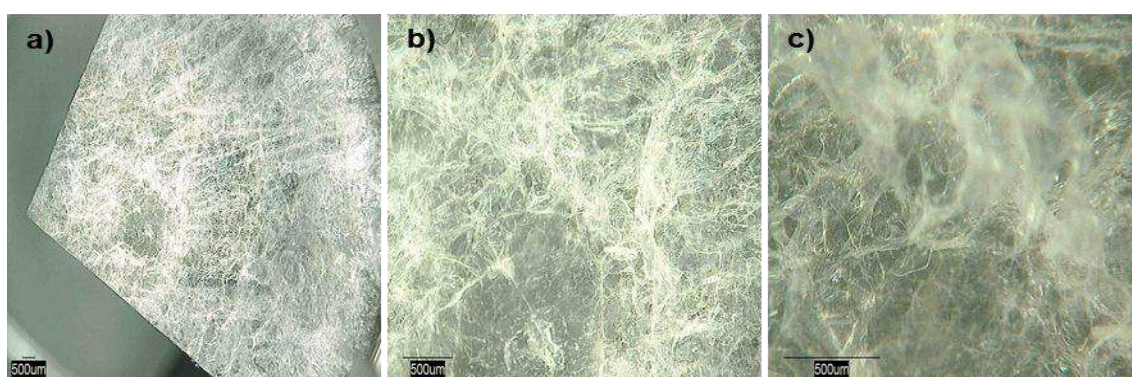
Fonte – Próprio autor.

Observam-se nas microscopias das Figuras 06, 07 e 08 superfícies semelhantes a tufo de algodão, porosas e com poros aparentemente interconectados, resultados semelhantes para membranas porosas de quitosana foram observados por Freitas e Barbosa (2014). Verifica-se aparente aumento da densidade das membranas de acordo com os aumentos da concentração de quitosana na membrana porosa, levando a formação de membranas mais densas de acordo com o aumento da concentração de quitosana.

Para avaliar as possíveis diferenças ocorridas na morfologia da membrana decorrente da incorporação do fármaco foram realizadas análises por microscopia ótica nas membranas de quitosana/F sintetizadas.

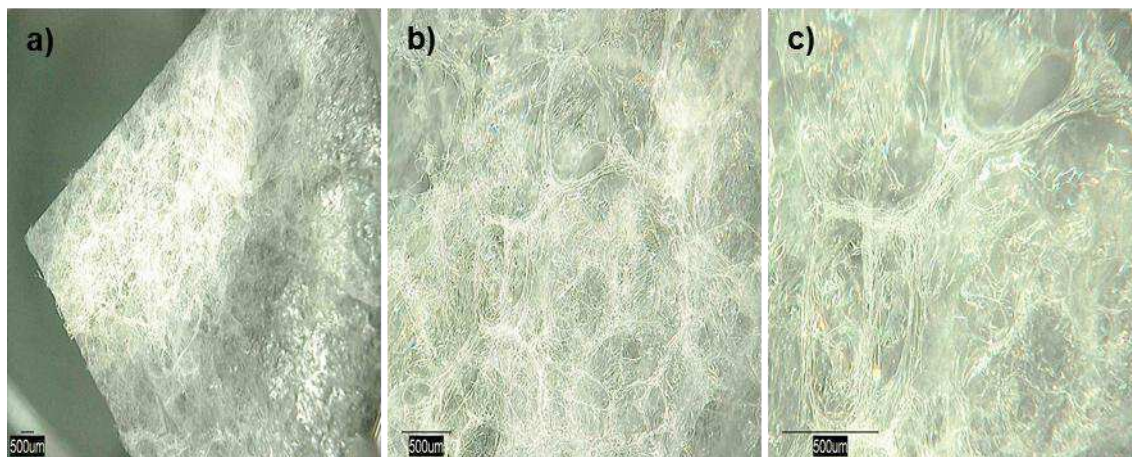
Nas Figuras 09, 10 e 11 observam-se os resultados de MO para as membranas de quitosana/F nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 2,0% (m/v) de quitosana respectivamente.

Figura 09 – MO da membrana porosa de quitosana/F na concentração de 0,5% (m/v) de quitosana nos aumentos de a) 20x, b) 80x e c) 160x.



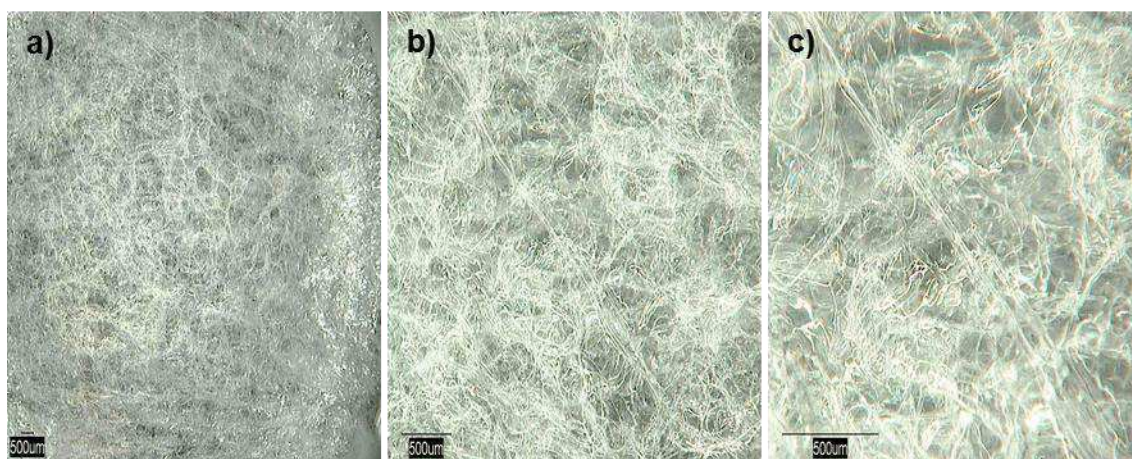
Fonte – Próprio autor.

Figura 10 – MO da membrana porosa de quitosana/F na concentração de 1,0% (m/v) de quitosana nos aumentos de a) 20x, b) 80x e c) 160x.



Fonte – Próprio autor.

Figura 11 – MO da membrana porosa de quitosana/F na concentração de 2,0% (m/v) de quitosana nos aumentos de a) 20x, b) 80x e c) 160x.



Fonte – Próprio autor.

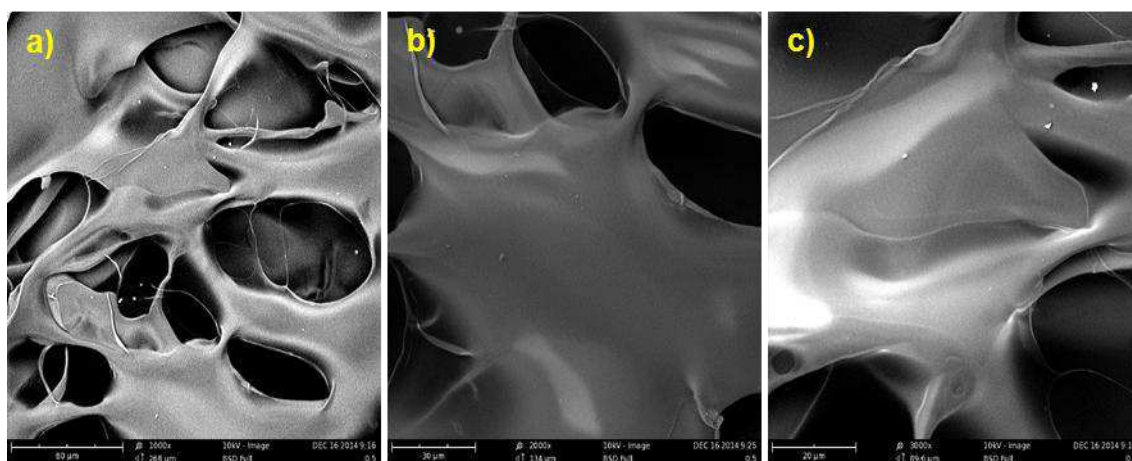
Observam-se nas Figuras 09, 10 e 11 superfícies semelhantes as apresentadas pelas membranas de quitosana sem a presença do fármaco, superfícies estas também semelhantes a tufo de algodão e com a presença de poros aparentemente interconectados distribuídos por toda sua extensão. O aparente aumento da densidade da membrana também pode ser observado. Isto indica que a incorporação do fármaco não ocasionou modificações na morfologia da membrana que pudessem ser percebidas por MO.

5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Dando continuidade a análise morfológica das membranas sintetizadas foi realizada a análise por MEV.

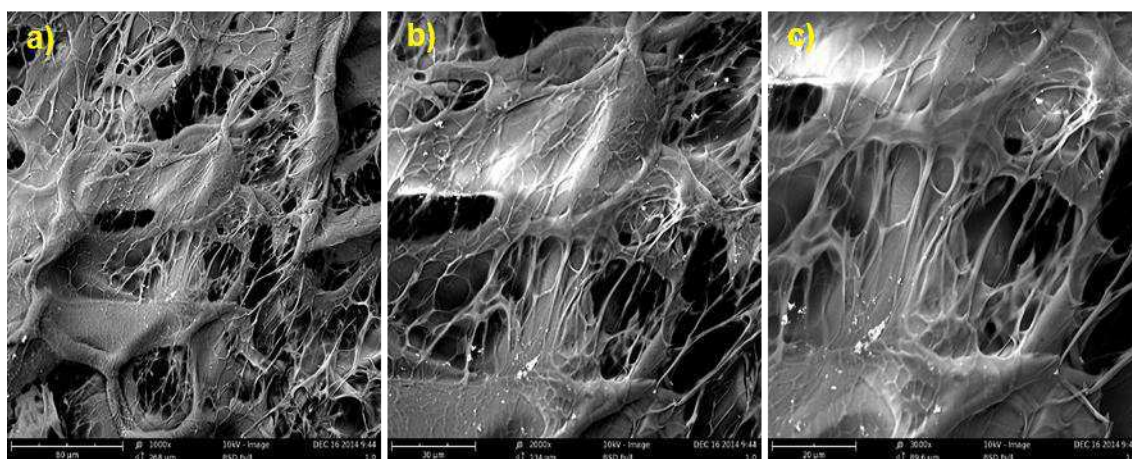
Observam-se nas Figuras 12, 13 e 14 as micrografias das membranas de quitosana pura nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 2,0% (m/v) respectivamente.

Figura 12 – MEV da membrana porosa de quitosana na concentração de 0,5% (m/v) nos aumentos de a) 1000x, b) 2000x e c) 3000x.



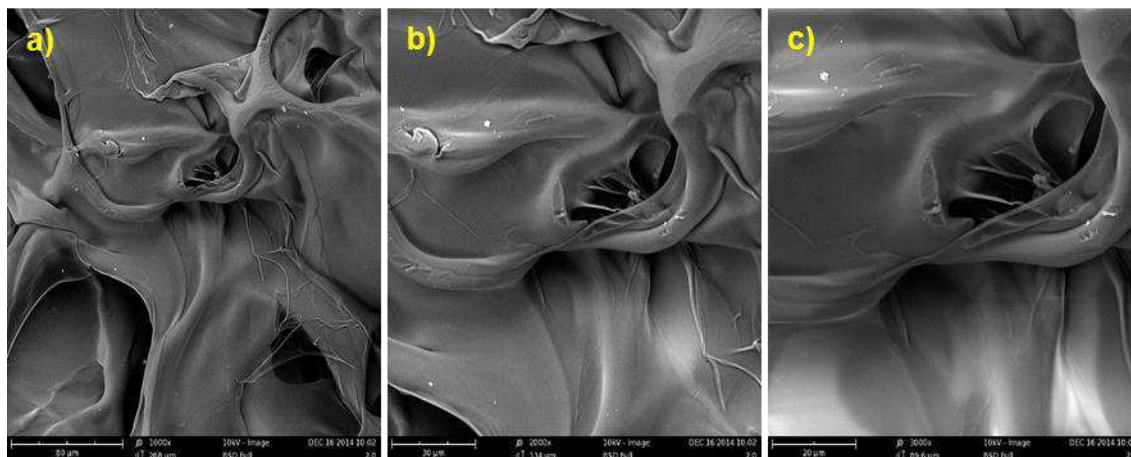
Fonte – Próprio autor.

Figura 13 – MEV da membrana porosa de quitosana na concentração de 1,0% (m/v) nos aumentos de a) 1000x, b) 2000x e c) 3000x.



Fonte – Próprio autor.

Figura 14 – MEV da membrana porosa de quitosana na concentração de 1,0% (m/v) nos aumentos de a) 1000x, b) 2000x e c) 3000x.



Fonte – Próprio autor.

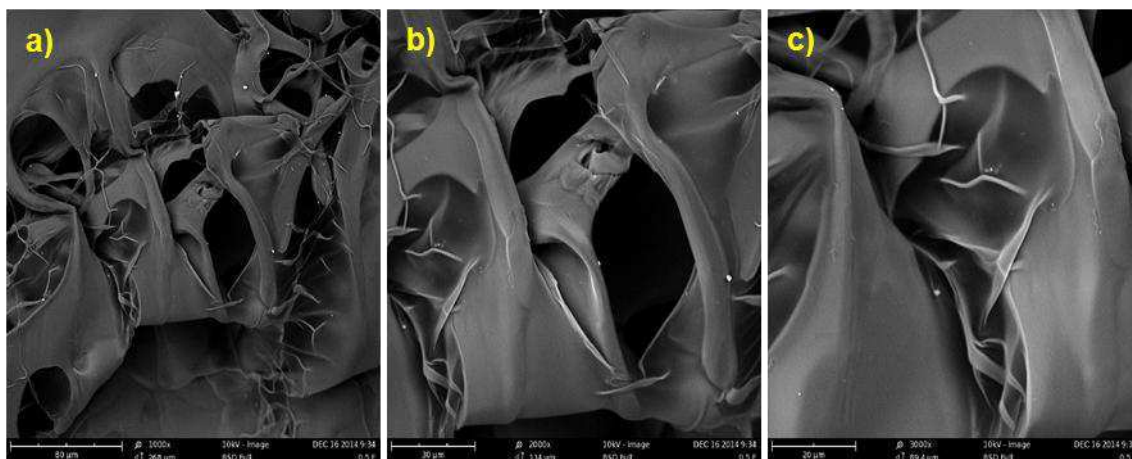
Os resultados observados nas Figuras 12, 13 e 14 para as micrografias das membranas de quitosana pura nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 2,0% (m/v) respectivamente, corroboram com os observados na análise por MO, onde pode-se verificar a presença de uma superfície porosa, com poros estes aparentemente interligados. Resultados semelhantes de morfologia também foram observados por Freitas e Barbosa (2014) para membranas porosas de quitosana pura. A superfície da membrana de quitosana pura com concentração de 1,0% (Figura 13) difere das demais por apresentar maior número de poros superficiais, este acontecimento pode estar relacionado ao fato que a região analisada tratava-se do verso da membrana, o que fica em contato com a placa petri durante seu processamento. Freitas e Barbosa (2014) observaram alterações entre as morfologias da superfície livre e a superfície fixa na placa petri da membrana semelhantes as observados neste trabalho.

Pode ser verificada a presença de alguns fragmentos dispersos na superfície das membranas porosas de quitosana, por análise pontual de EDS pode-se comprovar que estes fragmentos correspondem majoritariamente a sódio, elementos este oriundo de acetato de sódio não retirado durante o processo de lavagem após a neutralização.

Para avaliar as possíveis diferenças ocorridas na morfologia da membrana decorrente da incorporação do fármaco foram realizadas análises por microscopia eletrônica de varredura nas membranas de quitosana/F sintetizadas.

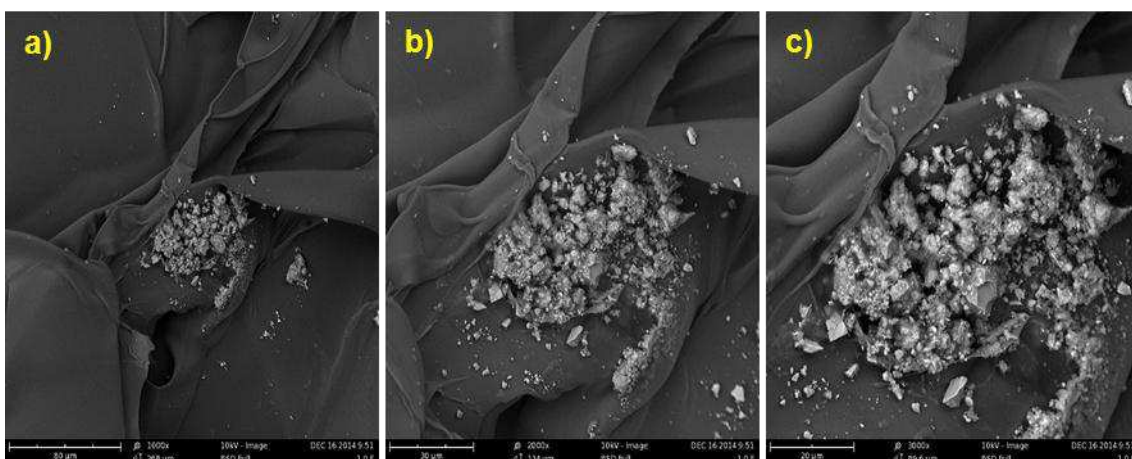
Nas Figuras 15, 16 e 17 observam-se os resultados de MEV para as membranas de quitosana/F nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 2,0% (m/v) de quitosana, respectivamente.

Figura 15 – MEV da membrana porosa de quitosana/F na concentração de 0,5% (m/v) de quitosana nos aumentos de a) 1000x, b) 2000x e c) 3000x.



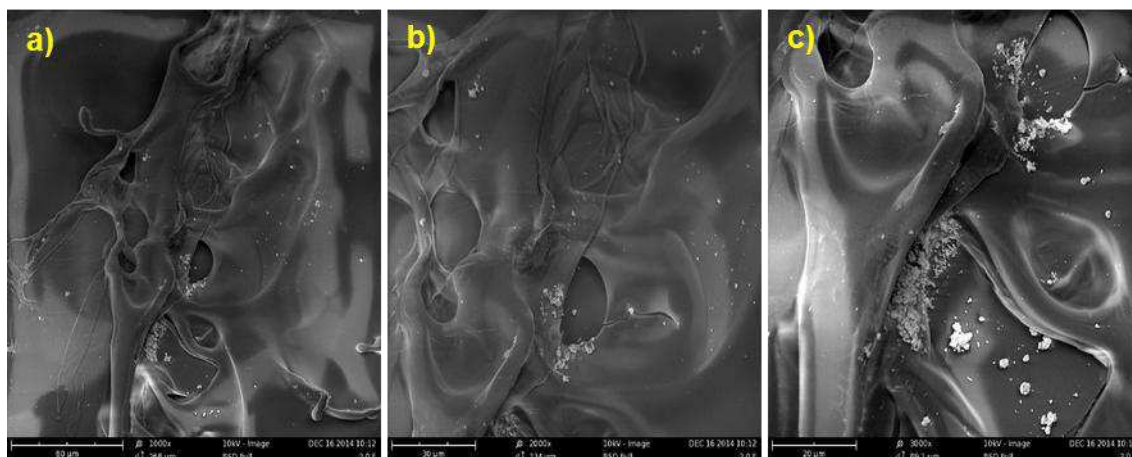
Fonte – Próprio autor.

Figura 16 – MEV da membrana porosa de quitosana/F na concentração de 1,0% (m/v) de quitosana nos aumentos de a) 1000x, b) 2000x e c) 3000x.



Fonte – Próprio autor.

Figura 17 – MEV da membrana porosa de quitosana/F na concentração de 2,0% (m/v) de quitosana nos aumentos de a) 1000x, b) 2000x e c) 3000x.



Fonte – Próprio autor.

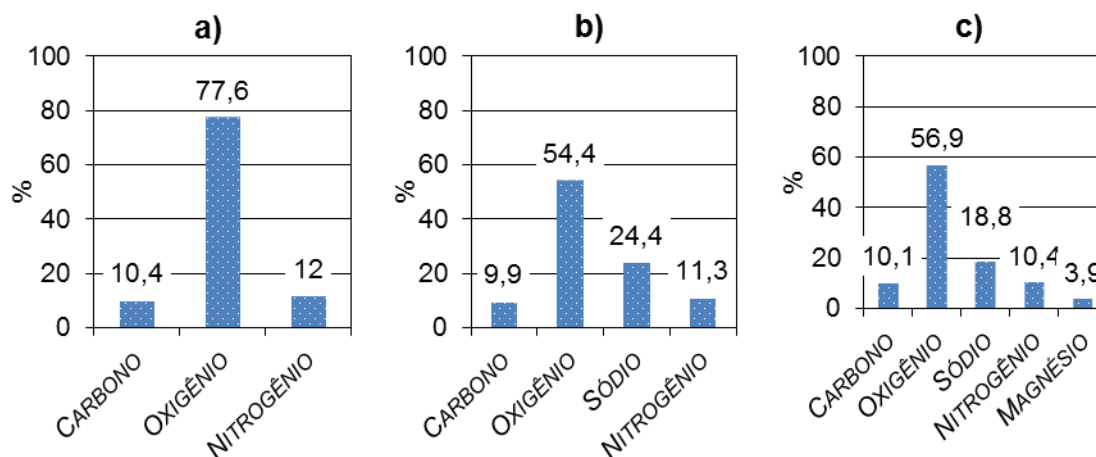
Observam-se morfologias semelhantes entre as amostras de quitosana pura e quitosana/F das Figuras 15, 16 e 17, corroborando assim com os resultados observados nas microscopias óticas. Verificam-se fragmentos dispersos na superfície da membrana de quitosana/F 0,5% (Figura 15), fragmentos que por análise de EDS apresentaram como elementos formadores carbono, oxigênio e nitrogênio, o que nos leva a crer que se tratam do fármaco incorporado. Esta presença de fragmentos acentua-se nas membranas de quitosana/F com concentração de 1,0% e 2,0%, onde observam-se aglomerados de fragmentos. Por EDS pode-se comprovar que estes aglomerados também são constituídos de carbono, oxigênio e nitrogênio, o que também nos leva a crer que se tratam do fármaco incorporado. O aumento da concentração de quitosana pode ter dificultado a homogeneização do fármaco na solução matriz formando aglomerados de fármaco pela superfície da membrana porosa.

5.3 Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS)

A análise por EDS foi realizada para identificar os elementos que compõem as membranas de quitosana e quitosana/F em todas as concentrações estudadas.

Na Figura 18 observam-se os resultados de EDS para as membranas de quitosana pura nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 2,0% (m/v) de quitosana.

Figura 18 – EDS das membranas de quitosana pura nas concentrações de a) 0,5%, b) 1,0% e c) 2,0%.

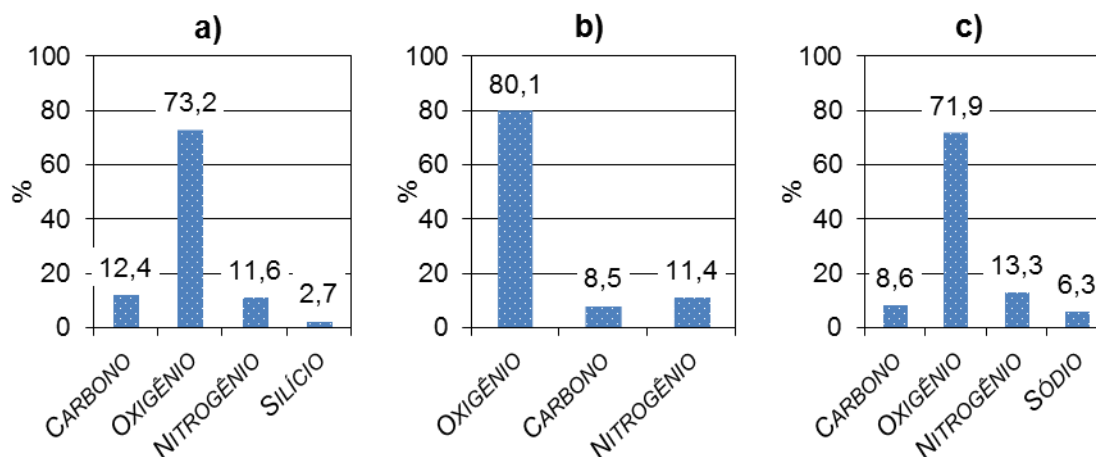


Fonte – Próprio autor.

Observa-se na Figura 18 a) para a membrana de quitosana pura com concentração de 0,5% (m/v) a presença dos elementos carbono, oxigênio e nitrogênio, elementos estes constituintes da estrutura química da quitosana. Para a membrana de quitosana pura 1,0% (m/v) (Figura 18 b)), verifica-se a presença do elemento sódio que não corresponde a estrutura química da quitosana, a presença deste elemento está relacionado ao acetato de sódio não retirado pelo processo de lavagem após a neutralização com hidróxido de sódio. Na Figura 18 c) observam-se os elementos constituintes da membrana de quitosana pura 2,0% (m/v), verifica-se também para esta membrana a presença do elementos sódio de origem semelhante a descrita anteriormente. Nota-se também a presença do elemento magnésio, elemento este considerado uma contaminação laboratorial.

Na Figura 19 observam-se os resultados da análise de EDS para as membranas de quitosana/F nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 2,0% (m/v) de quitosana.

Figura 19 – EDS das membranas de quitosana/F nas concentrações de a) 0,5%, b) 1,0% e c) 2,0% (m/v) de quitosana.



Fonte – Próprio autor.

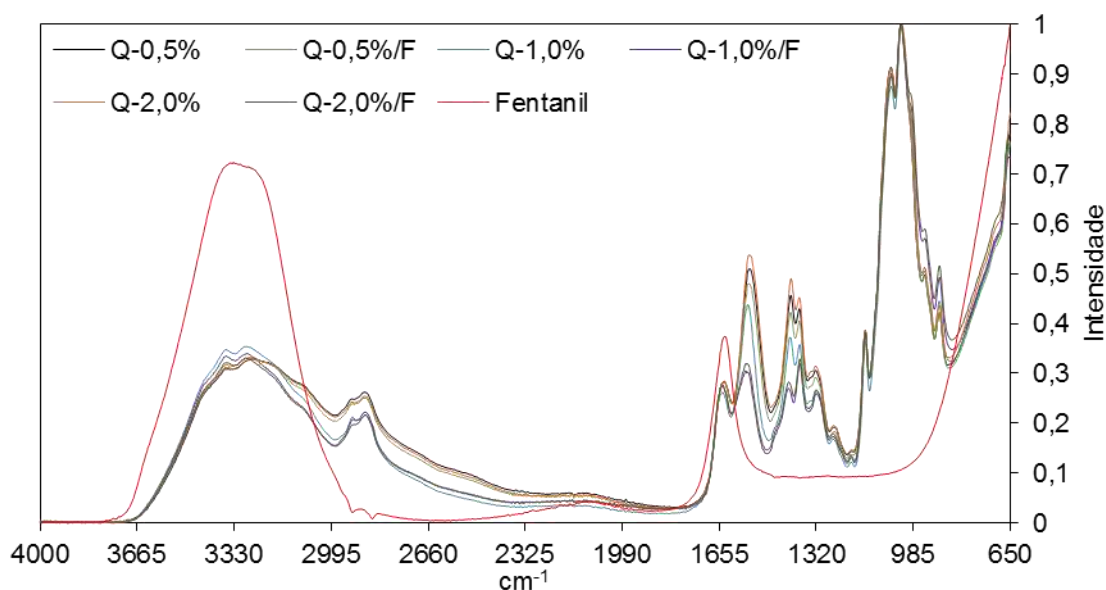
Os resultados obtidos para as membranas de quitosana/F são semelhantes aos observados para as membranas de quitosana pura, excetuando-se pela presença do elemento silício (Figura 19 a)), que assim como o elemento magnésio observado no resultado anterior, foi considerado uma contaminação laboratorial.

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

A análise por FTIR foi realizada para verificar os grupos funcionais presentes nas membranas porosas de quitosana pura e as possíveis alterações nas vibrações características dos grupos funcionais da quitosana decorrentes da incorporação do fármaco fentanil.

Na Figura 20 observam-se os resultados de FTIR da solução de citrato de fentanila puro, das membranas porosas de quitosana pura e das membranas porosas de quitosana/F.

Figura 20 – FTIR do citrato de fentanila puro, das membranas de quitosana pura nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 2,0% e das membranas de quitosana/F nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 2,0% de quitosana.



Fonte – Próprio autor.

O espectro de infravermelho da quitosana obtido para todas as concentrações (Figura 20) 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 em $\sim 3400\text{--}2995\text{ cm}^{-1}$, C-H do CH_2 e CH_3 em $\sim 2995\text{--}2873\text{ cm}^{-1}$, 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 $\sim 1020\text{ cm}^{-1}$.

A partir do espectrograma da solução de citrato de fentanila pode-se obter poucas informações do fármaco dissolvido devido a grade concentração de solução aquosa em relação a concentração de fármaco. Verifica-se esta elevada concentração de solução diluente a partir da banda localizada em aproximadamente $\sim 3400\text{--}2995\text{ cm}^{-1}$ correspondente a O-H da hidroxila. Observa-se em aproximadamente 1650 cm^{-1} uma banda correspondente a vibrações do grupo amida da estrutura química do fentanil.

Verifica-se nos espectros de infravermelho para as membranas de quitosana/F em todas as concentrações de quitosana estudadas (0,5%, 1,0% e 2,0% (m/v)), que não ocorreu modificação no espectro típico de quitosana, indicando que

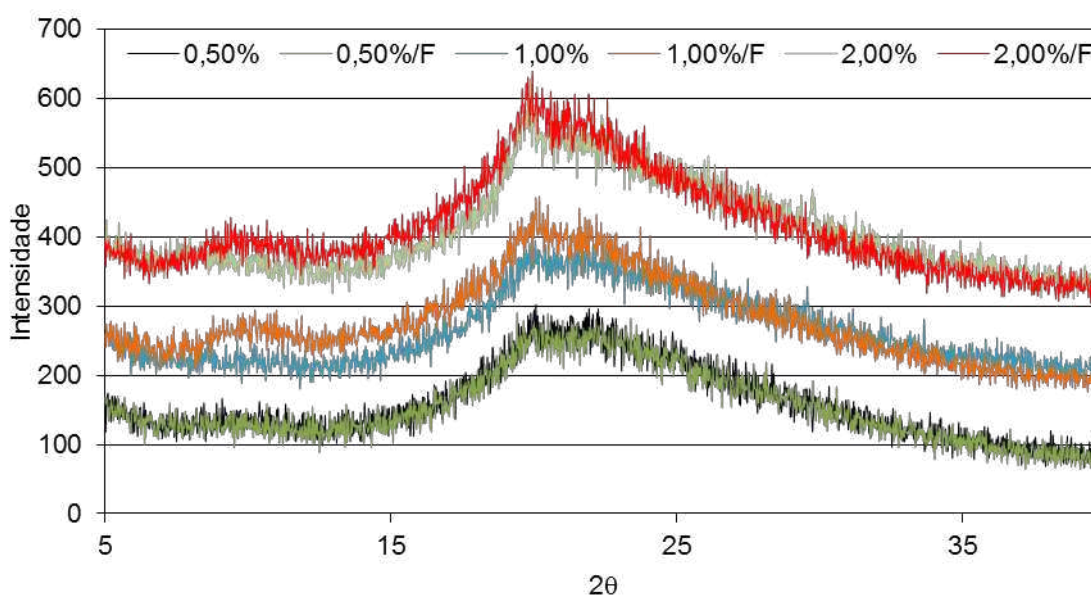
o fármaco, ao ser incorporado, não reagiu com as cadeias de quitosana originando novos radicais a estrutura, ou seja, ocorreu apenas a mistura do fentanil com a solução de quitosana.

5.5 Difração de Raios X (DRX)

A análise por DRX foi realizada para avaliar possíveis alterações ocorridas na estrutura cristalina da membrana porosa de quitosana decorrentes da incorporação de citrato de fentanila a solução formadora das membranas.

Na Figura 21 observam-se os difratogramas de DRX de todas as membranas sintetizadas neste trabalho. As intensidades dos difratogramas das membranas de quitosana e quitosana/F nas concentrações de 1,0% e 2,0% (m/v) de quitosana estão acrescidas dos valores de 100 e 200 para melhor visualização dos resultados.

Figura 21 – DRX das membranas porosas de quitosana pura e quitosana/F nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 2,0% (m/v).



Fonte – Próprio autor.

Verifica-se na Figura 21 para os difratograma da quitosana pura 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.

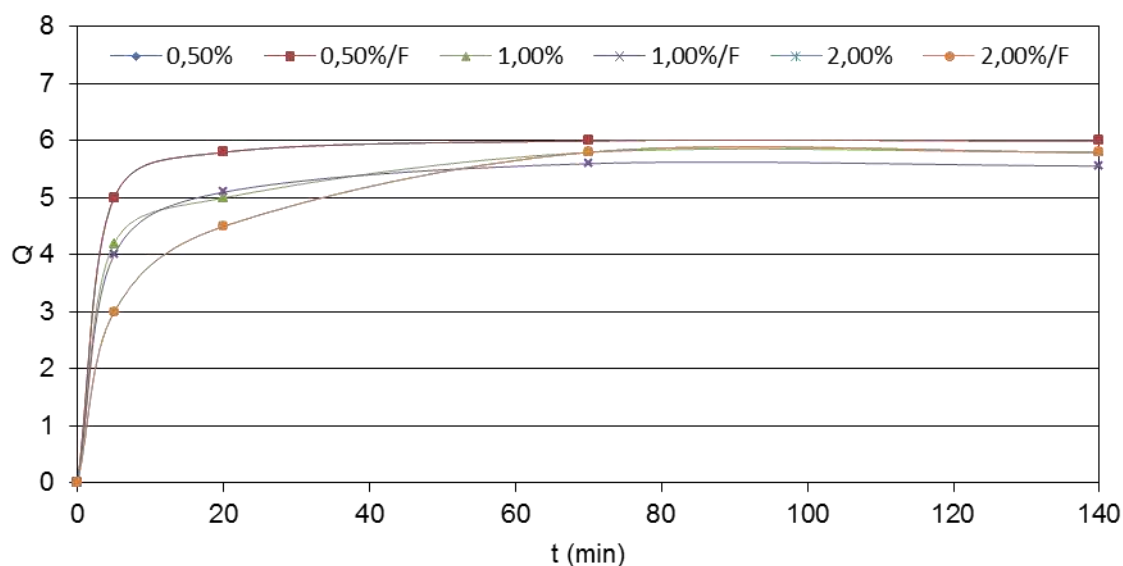
Observa-se a partir da Figura 21 que a incorporações do fármaco, em todas as concentrações de quitosana estudada, não modificou o perfil semicristalino da quitosana e nem proporcionou o surgimento de novos picos no difratograma. Indicando assim que não ocorreu modificação na membrana de quitosana decorrente da incorporação do fármaco a solução matriz da membrana.

5.6 Ensaio de Intumescimento

O ensaio de intumescimento foi realizado para verificar quantas vezes o volume da membrana é acrescido quando o mesmo é submerso em soluções aquosas, assim como observar se ocorre ou não variação neste volume de solução absorvida/adsorvida decorrente da incorporação do fármaco a solução matriz formadora da membrana porosa de quitosana/F.

Na Figura 22 observam-se os resultados obtidos a partir do ensaio de intumescimento de todas as membranas sintetizadas neste trabalho.

Figura 22 – Resultados do ensaio de intumescimento das membranas sintetizadas neste trabalho.



Fonte – Próprio autor.

Nota-se na Figura 22 que todos os perfis de intumescimento apresentam valores de razão de intumescimento muito próximos, e que os valores com e sem a adição de fármaco não diferem, indicando que o fármaco incorporado na membrana não interfere no grau de intumescimento da matriz polimérica. Todas as membranas

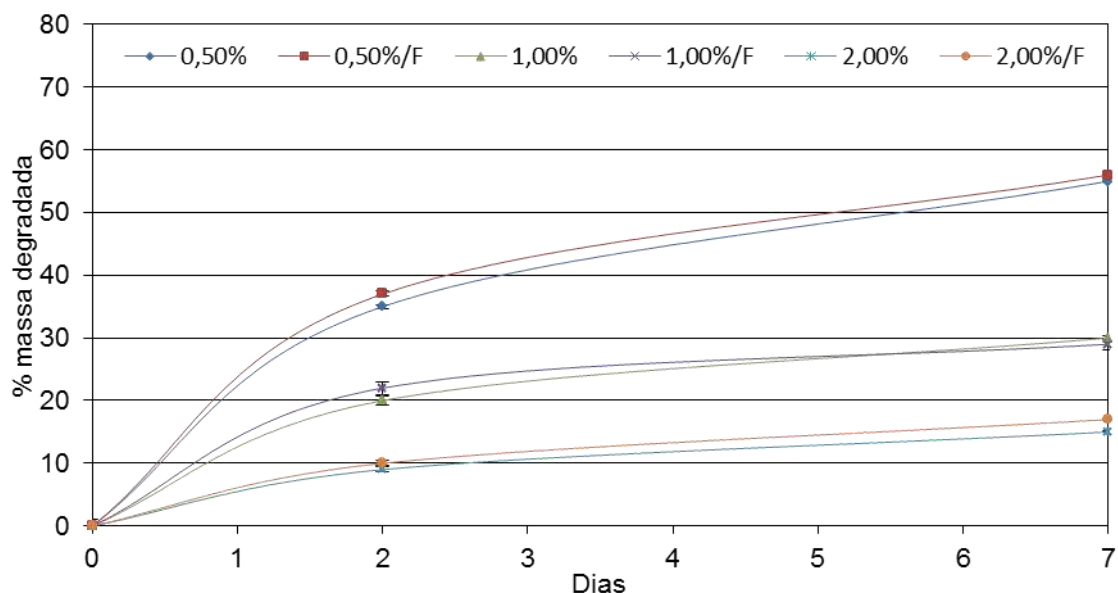
apresentarão estabilização de intumescimento em aproximadamente 70 h de ensaio com uma razão de Q entre 5,5 e 5,8. Como era esperando, de acordo com o aumento da concentração de quitosana verifica-se certo retardo na absorção de soluções, este fato está ligado a uma maior densidade de membrana como observado na análise de MO, dificultando a entrada de água na matriz polimérica.

5.7 Ensaio Biodegradação Enzimática

O ensaio de biodegradação enzimática foi realizado para verificar a degradação das matrizes poliméricas de todas as concentrações submetidas a solução tampão e solução tampão contendo enzimas lisozima.

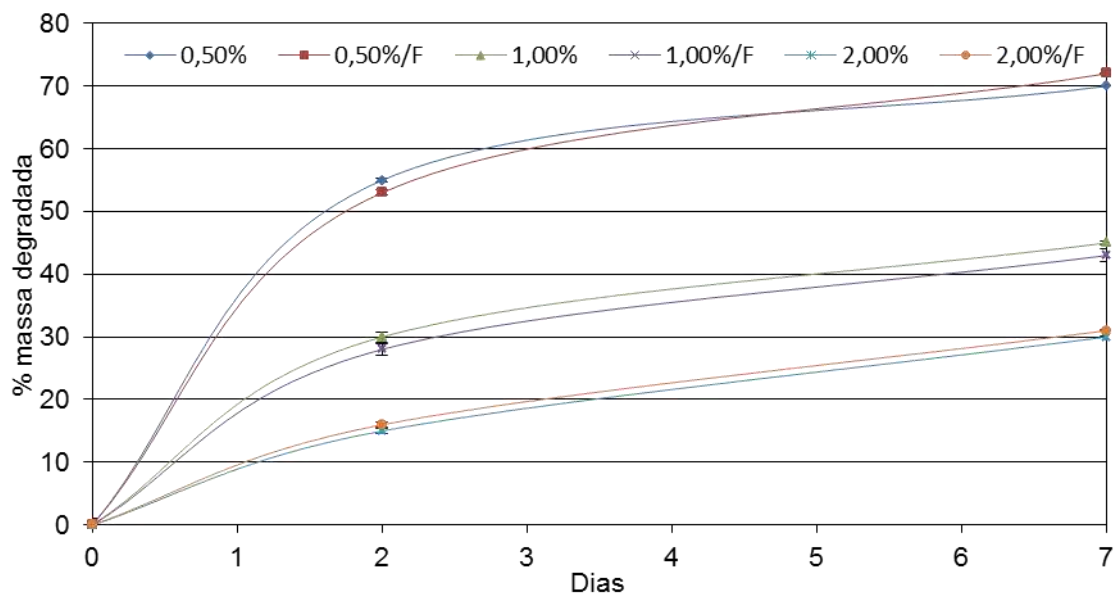
Nas Figuras 23 e 24 observam-se os resultados obtidos para o ensaio de biodegradação em solução tampão de PBS e em solução tampão de PBS+enzima lisozima.

Figura 23 – Ensaio de biodegradação das membranas porosas sintetizadas submetidas a solução tampão de PBS.



Fonte – Próprio autor.

Figura 24 – Ensaio de biodegradação das membranas porosas sintetizadas submetidas a solução tampão de PBS+enzima lisozima.



Fonte – Próprio autor.

Observa-se na Figura 23 e 24 que a adição do fármaco a membrana de quitosana não influencia significativamente na degradação da membrana, tanto em PBS como em PBS+enzima lisozima. A significância da variação foi analisada por planejamento one-way utilizando o teste t ($\alpha=0,05$), onde verificou-se que a diferença entre os valores de degradação de membranas com incorporação de fármaco não diferem estatisticamente dos valores de degradação das membranas de quitosana pura.

Com relação a concentração das soluções de quitosana, verifica-se que quanto maior a concentração de quitosana menor a degradação da membrana, este fato está ligado a uma maior densidade da membrana, o que dificulta a entrada de fluidos na matriz polimérica diminuindo a taxa de degradação, já que a degradação da quitosana se dá por quebra hidrolítica. O que corrobora com os resultados observados no ensaio de intumescimento.

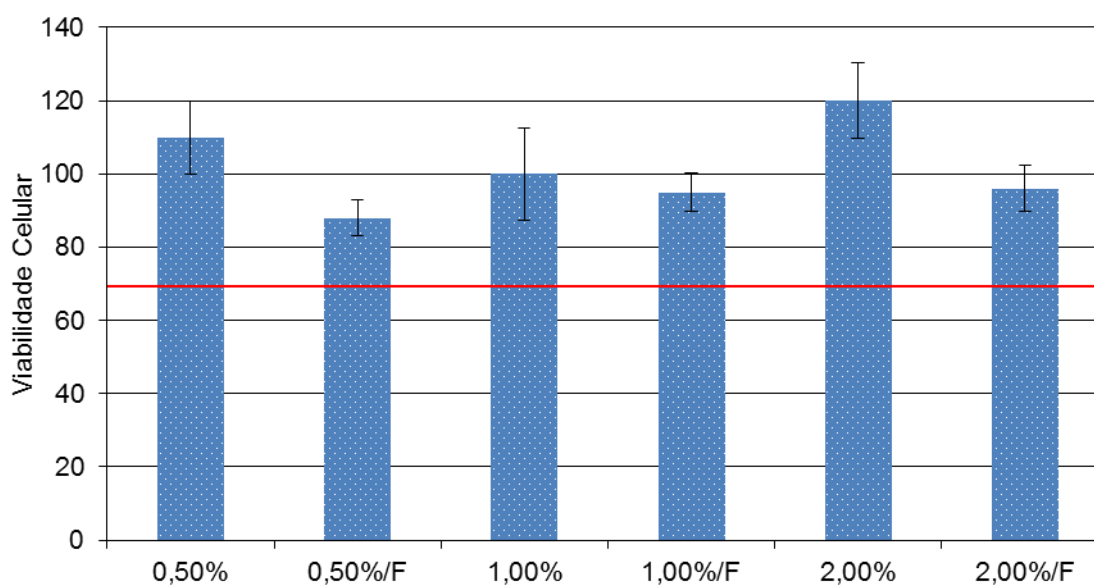
Observa-se que a adição de enzima acelera o processo de degradação, chegando a valores percentualmente maiores com relação as membranas submetidas apenas a PBS de 40% para a amostra com concentração de 0,5% de quitosana, de 50% para a amostra com concentração de 1,0% de quitosana e de 100% para a amostra com concentração de 2,0% de quitosana no 7º dia.

5.8 Ensaio de Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado visando avaliar a toxicidade das membranas sintetizadas, assim como verificar possíveis modificações nesta toxicidade decorrente da adição do fármaco a solução matriz da quitosana.

Na Figura 25 observam-se os resultados obtidos para o ensaio de citotoxicidade.

Figura 25 – Resultados do ensaio de citotoxicidade para todas as membranas sintetizadas neste trabalho.



Fonte – Próprio autor.

Observa-se que todas as membranas porosas apresentaram viabilidade celular superior a 70%, segundo a NBR ISO 10993-5:2009 (2009) viabilidades celulares maiores ou iguais a 70% indicam um material não citotóxico, o que comprova que nenhuma das membranas sintetizadas neste trabalho apresentou-se citotóxica.

6 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos pode-se concluir que é possível sintetizar uma matriz polimérica a base de quitosana em formato de membrana porosa, que apresenta poros aparentemente interconectados e que é capaz de carrear citrato de fentanila na forma de sistema matricial de carregamento de fármaco, sem que o processo de incorporação do fármaco a solução matriz de quitosana provoque alterações na estrutura, tanto da quitosana como do fármaco. Estrutura esta que exclusivamente a partir da variação da concentração de quitosana, consegue-se controlar variáveis como grau de intumescimento e taxa de biodegradação, que são variáveis de extrema importância quando o interesse é produzir um sistema matricial de liberação controlada de fármaco. Verificou-se também que a incorporação do fármaco a membrana porosa não torna a mesma citotóxica, o que torna este material promissor para testes *in vivo*.

REFERÊNCIAS

AIDER, M., Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *Lwt-Food Science and Technology*, vol. 43, p. 837-842, 2010.

ANRAKU, M., FUJUU, T., FURUTANI N., KADOWAKI, D., MARUYAMA, T., OTAGIRI, M., GEBICKI, J. M. & TOMIDA, H., Antioxidant effects of a dietary supplement: Reduction of indices of oxidative stress in normal subjects by water-soluble chitosan. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 47, p. 104-109, 2009.

ANSEL, H.C at al Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. 6.ed. São Paulo: Premier, 2000.

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.

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, 2002.

AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomaterial. *Revista Eletrônica de Materias e Processos*; v. 2,3, p. 27 – 34, 2007.

BAXTER, A.; DILLON, M.; ANTHONY TAYLOR, K. D.; ROBERTS, G. A. Improved method for ir determination of the degree of N-acetylation of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.14, n.3, p.166-169, 1992.

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.

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

BIAGINI, G.; MUZZERELLI, R. A. A.; GIARDINO, R. E.; CASTALDINI, C. Biological Material for wound healing. In: BRINE, I.; CHARLES, J. *Advanced in chitin and chitosan*. Elsevier Science Publishers, London, p. 16-24, 1992.

BODNAR, R.; KLEIN, G. E. Endogenous opiates and behavior: 2003. *Peptides*, New York, v. 25, n. 12, p. 2205-2256, 2004.

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.

BOVILL, J. G. et al. Comparison of fentanyl, sufentanyl and alfentanyl anesthesia in patients undergoing valvular heart surgery. *Anesthesia and Analgesia*, Baltimore, v. 63, p. 1081-1086, 1984.

BRANSON, K. R.; GROSS, M. E. Opioid agonists and antagonists. In: ADAMS, H. R. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 8. ed. USA: Blackwell Publishing Professional, 2001, p.268-298.

CAFIERO, T.; MASTRONARDI, P. Sufentanyl in balanced anesthesia for neurosurgery. Comparative study with fentanyl. *Minerva Anestesiologica*, Torino, v. 66, n. 11, p.787-791, 2000.

CAMPANA-FILHO, S.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F.; CARDOSO, M.; BATTISTI, M.; SIM, P.; GOY, R.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. Extração, estruturas e propriedades de α - e β -quitina. *Química Nova*, v. 30, n. 3, p.644-650, 2007.

CONCEIÇÃO, E. D. V. Infusão contínua de propofol associado ao fentanil ou sufentanil em cadelas submetidas à ovariossalpingo-histerectomia. 2006. 79 f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

DALLAN, P. R. M. Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele. 2005, 195f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Campinas, 2005.

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

FANTONI, D.T.; MASTROCINQUE, S. Fisiopatologia e controle da dor. In: FANTONI, D.T; CORTOPASSI, S.R. *Anestesia em Cães e Gatos*. São Paulo: Roca, 2002. Cap.31, p.324-326.

FELDMAN, D. et al., Biomaterial-Enhance Regeneration for Skin Wonds. In: WISE, D. L. *Biomaterials and Bioengennering 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.

GÓRNIAC, S.L. Hipnoanalgésicos e Neuroleptoanalgesia. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIAC, S.L.; BERNARDI, M.M. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. Cap. 15. p. 140-146.

GUTSTEIN HB, AKIL H. ANALGÉSICOS OPIÓIDES. In: Gilman AG, Hardman JG, Limbird LE, editores. Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. 10ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 2003. p.427-64.

HIRANO, S. Production and Application of Chitin and Chitosan in Japan. In: BREAK, S.; ANTHONSEN, T.; SANDFORD, P.A., eds. Chitin and Chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications. New York: Elsevier Applied Science, p. 37-43, 1989.

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

JING, S. B.; LI, L.; JI, D.; TAKIGUCHI, Y.; YAMAGUCHI, T. Effect of chitosan on renal function in patients with chronic renal failure. Journal of Pharmacy and Pharmacology. v. 49, n. 9, p. 721-723, 1997.

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

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.

KADOI, Y. et al. Fentanyl-induced hemodynamic changes after esophagectomy or cardiac surgery. Journal of Clinical Anesthesia, Stoneham, v. 17, n. 8, p. 598-603, 2005.

KAPLAN, D. L. Introduction to Biopolymers from renewable resources. In: Biopolymers from renewable resources, Springer-Verlag, p. 1-29, 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.

KOIZUMI, M.; MATSUMOTO, N.; UEDA, K. Influences of cardiopulmonary bypass and fentanyl anesthesia on hepatic circulation and oxygen metabolism in beagles. Anesthesia and Analgesia, Baltimore, v. 86, n. 6, p. 1177-1182, 1998.

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

MANZKE, T. et al. 5-HT₄(a) receptors avert opioid-induced breathing depression without loss of analgesia. *Science*, Washington, v. 301, n. 5630, p. 226-229, 2003.

MASSONE, F. *Anestesiologia veterinária*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, 326p.

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.

MOREIRA, J.C. Opióides na analgesia de cães e gatos. 2001. 14f. Seminário de Clínica, (Mestrado em Medicina Veterinária)- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MOURA, M. J. Aplicações da Quitosana em Liberação Controlada de Fármacos: algumas considerações. *Enciclopédia Biosfera*, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.8, N.14; 2012.

NIEMEGERGERS, C. J. E. et al. Sufentanyl, a very potent and extremely safe intravenous morphine-like compound in mice, rats and dogs. *Arzneimittel-Forschung*. Aulendorf , v. 26, n. 8, p. 1551-1556, 1976.

PANDIT, N. K. *Introdução às Ciências Farmacêuticas*. Porto Alegre: Artmed, 2008.

PASERO, C. Fentanyl for acute pain management. *Journal of Perianesthesia Nursing*. Philadelphia, v. 20, n. 4, p. 279-284, 2005.

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

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

PRISTA, L. N. et al. *Tecnologia Farmacêutica*. 4. Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996.

PUCCI, L.; PÉRTILE, L. B.; SILVA, P.R.C.; PEREIRA, R.B., *Biocerâmica: Características e aplicações*. Universidade Federal de Santa Catarina. Departamento de Engenharia de Materiais, 2002.

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. L.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. *Biomaterial Science*, 3ª Edição, 2013.

SACKMAN, J.E. Pain and it's management. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, vol. 27, n. 6, p. 1487-1503, Nov. 1997.

SANTOS, J. E.; SOARES, J.; DOCKAL, E.; CAMPANA-FILHO, S. P.; CAVALHEIRO, É. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.13, n.4, p. 242-249. 2003.

SEBEL, P. S. et al. A multicenter study of the bispectral electroencephalogram analysis for monitoring anesthetic effect. *Anesthesia and Analgesia*. Baltimore, v. 84, n. 4, p. 891-899, 1997.

SCHILLING, A. F.; LINHART, W.; FILKE, S.; GEBAUER, M.; SCHINKE, T.; RUEGER, J. M.; AMLING, M. Resorbability of bone substitute biomaterials by human osteoclasts. *Biomaterials*, v. 25, p. 3963-3972, 2004.

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

SILVA, P. *Farmacologia*. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

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.

THURMON, J. C.; TRANQUILLI, W. J.; BENSON, G. J. Injectable anesthetics. In: *Essentials of small animal anesthesia & analgesia*. Lumb & Jones' veterinary anesthesia, 3. ed. Philadelphia: Lea & Feabiger, 1996, cap. 9, p. 210-240a.

URAGAMI T.; TOKURA S, (eds.) *Material Science of Chitin and Chitosan*, Japan: Kodansha Ltd., Springer, 2006.

VALADÃO, C. A.; DUQUE, J. C.; FARIAS, A. Administração epidural de opióides em cães. *Ciência Rural*. Santa Maria, v. 32, n. 2, p. 347-355, 2002.

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

VOIGHT, R. , BORNSCHEIN, M. *Tratado de Tecnologia Farmacêutica*. 3 ed. Zaragoza: Editorial Acrilia, 1982.

WERNER, B.E.; TABOADA, J. Use of analgesics in feline medicine. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinary*, v. 16, n. 4, p. 493-499, Apr. 1994.

YAQUI, A. S. P.; MENA, D. F.; LÓPEZ, A. B.; PELÁEZ, B. C. L.; IZQUIERDO, J. C. Desarrollo tecnológico y estudio de estabilidad del citrato de fentanilo 0,05 mg/mL, 2004.

YANG, E. J., KIM, J. G., KIM, J. Y., KIM, S. C., LEE, N. H. & HYUN, C. G., Anti-inflammatory effect of chitosan oligosaccharides in RAW 264.7 cells. *Central European Journal of Biology*, vol. 5, p. 95-102, 2010.