



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



VALTER PEREIRA DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE SCALFFOLDS DE QUITOSANA PARA DOSAGEM
DE ANALITOS**

**Campina Grande
2014**

VALTER PEREIRA DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE SCALFFOLDS DE QUITOSANA PARA DOSAGEM
DE ANALITOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande, Área de Concentração: Polímeros, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Romualdo Rodrigues Menezes

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook

Campina Grande

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

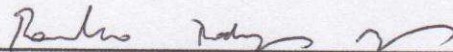
- O48d Oliveira, Valter Pereira de.
Desenvolvimento de scaffolds de quitosana para dosagem de analitos /
Valter Pereira de Oliveira. – Campina Grande, 2014.
59 f. : color.
- Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) –
Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia,
2014.
- "Orientação: Prof. Dr. Romualdo Rodrigues Menezes".
Referências.
1. Quitosana. 2. Ciclosporina. 3. Imunocromatografia. 4. Teste Rápido.
5. Nitrocelulose. I. Menezes, Romualdo Rodrigues. II. Título.

CDU 677.473(043)

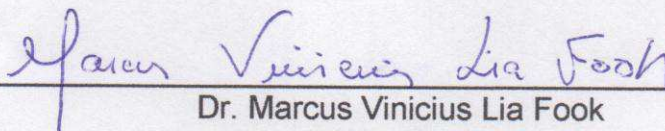
**PRODUÇÃO DE FILMES DE QUITOSANA PARA UTILIZAÇÃO COMO TIRAS
REAGENTES E DOSAGEM DE ANALITOS EM SANGUE**

VALTER PEREIRA DE OLIVEIRA

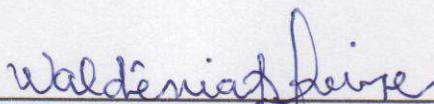
Dissertação aprovada em 19/12/2014 pela banca examinadora constituída dos
seguintes membros:



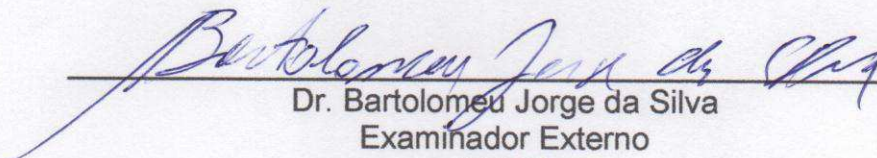
Dr. Romualdo Rodrigues Menezes
Orientador
PPG-CEMat/UAEMa/UFCG



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



Dr.ª Waldenira Pereira Freire
Examinadora Externa
CCBS /UEPB



Dr. Bartolomeu Jorge da Silva
Examinador Externo
UFCG

À minha esposa Nina e a
minha mãe D. Terezinha,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores, pesquisadores e demais colaboradores da UFCG pelo apoio e orientação na realização desse trabalho;

Ao Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook e ao Prof. Dr. Romualdo Rodrigues Menezes pela orientação.

Ao Pesquisador Dr. Rossemberg Cardoso Barbosa pela atenção, desprendimento e envolvimento na realização deste trabalho;

Ao Doutorando Wladymyr Jefferson B. de Sousa pelo constante auxílio e orientação na condução do trabalho;

À Profa. Dra. Rosemary Sousa Cunha Lima pelas valiosas orientações quando foi envolvida no planejamento e realização do projeto;

Aos colegas da Anvisa pelo companheirismo e colaboração durante todas as etapas do curso.

RESUMO

A quantificação de substâncias em amostras humanas é de grande importância para o diagnóstico, acompanhamento e tratamento de diversas situações que afetam a saúde e condições fisiológicas da população. Entre os analitos cuja quantificação no sangue tem grande importância, encontra-se a ciclosporina que é administrada em pacientes transplantados e que a utilizam no tratamento imunossupressor. As análises para quantificação da droga são atualmente feitas por meio de testes complexos e caros, sendo uma importante fonte de gastos na saúde pública visto que o Brasil possui o maior sistema público de transplantes do mundo e que subsidia 95% do tratamento, incluindo procedimento cirúrgico, medicação e acompanhamento necessários ao pós-transplante. Atualmente dispositivos de testes de utilização simples que dispensa equipamentos e instalações laboratoriais estão sendo utilizados para diversos tipos de diagnósticos. São os denominados testes rápidos que utilizam o princípio da imunocromatografia como metodologia. O estudo teve o objetivo de desenvolver scaffolds a base de quitosana para carrear substâncias semelhantes ao sangue humano e comparar esta capacidade à da nitrocelulose com a finalidade de estabelecer uma possível substituição da nitrocelulose pela quitosana na produção de dispositivos de testes rápidos, possibilitando a confecção de um dispositivo para quantificação de ciclosporina e outros analitos estabelecendo um novo campo de aplicação para a quitosana como material carreador. Os scaffolds foram desenvolvidos pela preparação de uma solução de quitosana a 1% a qual foi filtrada, congelada e liofilizada. Os scaffolds foram então neutralizados, lavados, liofilizados e secos. As tiras de nitrocelulose com registro na Anvisa foram obtidas em farmácia, as amostras foram selecionadas aleatoriamente realizadas as mesmas caracterizações realizadas nos scaffolds. A caracterização foi realizada por meio das técnicas de Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)/ Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDS), Molhabilidade e Intumescimento. Os espectros em infravermelho demonstraram que a nitrocelulose e a quitosana possuem grupos funcionais compatíveis com as características descritas na literatura. As micrografias e espectros mostraram uma composição condizente com as características de absorção e carreamento de líquidos devido à presença de polaridade. Os ensaios de molhabilidade evidenciaram que a nitrocelulose e a quitosana possuem alta hidrofiliabilidade e os ensaios de intumescimento mostraram um alto grau de intumescimento da nitrocelulose e da quitosana corroborando suas características de material carreador. O produto desenvolvido possui potencial viabilidade para utilização como material carreador em dispositivos diagnósticos.

Palavras-chave: Ciclosporina. Quitosana. Imunocromatografia. Teste Rápido. Nitrocelulose.

ABSTRACT

The quantification of substances in human samples has great importance for the diagnosis, monitoring and treatment for several situations that affect health and physiological conditions of the population. Among the analytes to be quantified, you have cyclosporine that is administered in transplanted patients for immunosuppressive treatment. The drug quantification are currently done by complex and expansive devices and is an important source of costs on public health as Brazil has the Highest Attendance Transplant System of the World and subsidizes 95 % of the treatment , including surgical procedures , medication and monitoring needed in post- transplant. Now a days, simple devices that do not require instruments and laboratory facilities are being used for various types of diagnoses. They are called rapid tests that use immunochromatography, as methodology. The study had the scope to develop a material with chitosan films to carry similar substances human blood and compare this capacity to the nitrocellulose with the goal of establishing a possible replacement of nitrocellulose for chitosan in the productions of a rapid test device, enabling a new field of application for chitosan as a carrier material. The scaffolds had been developed by the preparation of a chitosan 1% solution which was filtered, frozen and lyophilized. The scaffolds were then neutralized, washed, dried and lyophilized again. The strips of nitrocellulose registered with Anvisa were obtained in pharmacy, so samples were selected randomly to be performed the same characterizations performed in scaffolds. The characterization was performed using spectroscopy techniques in the Fourier Transform Infrared Region (FTIR), Scanning Electron Microscopy (SEM) /Energy Dispersive Spectroscopy X-ray (EDS), Wettability and Swelling. The infrared spectra showed that the nitrocellulose and chitosan have functional groups compatible with the features described in the literature. The micrographs and spectra showed a composition compatible for characteristics of absorption and liquid carrying due to the presence of polarity. The wettability tests have shown that the nitrocellulose and chitosan have high hydrophilicity and swelling measurements showed a high degree of nitrocellulose and chitosan swelling and its supporting carrier material characteristics. The product developed has the potential feasibility for use as carrier material in diagnostic devices.

Keywords: Cyclosporin. Chitosan. Immunochromatography. Rapid test. Nitrocellulose.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Testes Rápidos (TR) para HIV, (A) imunocromatografia ou fluxo lateral, (B) imunocromatografia de dupla migração – DPP, (C) imunocconcentração, (D) fase sólida.....	16
Figura 2 - Testes Rápidos Reagentes (TR) para HIV. Observa-se presença de linha na área T (Teste) e na área C (Controle), (A) imunocromatografia ou fluxo lateral, (B) imunocromatografia de dupla migração – DPP, (C) imunocconcentração, (D) fase sólida.....	17
Figura 3 - Testes Rápidos Não Reagentes (TR) para HIV. Presença de linha ou ponto apenas na área C (Controle), (A) imunocromatografia ou fluxo lateral, (B) imunocromatografia de dupla migração – DPP, (C) imunocconcentração, (D) fase sólida.....	17
Figura 4 - Testes rápido para Dengue.....	18
Figura 5 – Princípio da Imunocromatografia.....	19
Figura 6 – Estrutura do teste de Imunocromatografia	20
Figura 7 - Imunocromatografia de fluxo lateral.....	20
Figura 8 - Molécula de ciclosporina.....	22
Figura 9 - Método Enzyme Multiplied Immunoassay Technique	25
Figura 10 - Imunoensaio por Fluorescência Polarizada	27
Figura 11 - Teste de ELISA.....	29
Figura 12 - Molécula da glicose e celulose	33
Figura 13 - Estrutura da Nitrocelulose.....	34
Figura 14 - Molécula de Quitina e Quitosana.	37
Figura 15 - Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) das tiras de nitrocelulose (amostras A e B).	44
Figura 16 - Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier da Quitosana em pó e do scalffold de quitosana	45
Figura 17 - MEV/EDS das tiras de nitrocelulose da amostra A	47
Figura 18 - MEV/EDS das tiras de nitrocelulose da amostra B	47
Figura 19 - MEV e EDS do Scalffold de Quitosana	48
Figura 20 - Molhabilidade das tiras de nitrocelulose amostras A e B.....	49

Figura 21 – Molhabilidade do scaffold de quitosana inicial e após 3 segundos.50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AZA - Azatioprina

CEDIA - Cloned Enzyme Donor Immunoassay

CG - Cromatografia Gasosa

CL- Cromatografia Líquida

CNI – Calcineurina

CsA- Ciclosporina

DPP- Imunocromatografia de dupla migração

ECL - Eletroquimioluminescencia

EDS - Energy Dispersive System

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EMIT - Enzyme Multiplied Immunoassay Technique

EVE- Everolimus

FPA - Fluorescence polarization immunoassay

FPIA - Fluorescence Polarization Immunoassay

GA - Grau médio de acetilação

g/mol – Grama por mol

HPLC - High Performance/Pressure Liquide Chromatography

IGG – Imunoglobulina G

IGM – Imunoglobulina M

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry

MEIA - Ensaio imunoenzimático de micropartículas

MFS - Micofenolato de sódio

MMF - Micofenolato mofetil

MS - Espectrometria de Massas

nM – Nanômetro

PBS – Tampão Salina Fosfato

RIA – Radioimunoensaio

SIR – sirolimo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3 REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1 TESTES RÁPIDOS.....	16
3.2 IMUNOCROMATOGRAFIA.....	19
3.3 CICLOSPORINA.....	21
3.3.1 Enzyme Multiplied Immunoassay Technique - emit	24
3.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	25
3.3.3 Imunoensaio por Fluorescência Polarizada - FPIA	26
3.3.4 Imunoenzimático de Micropartículas (MEIA)	27
3.3.5 Cloned Enzyme Donor Immunoassay (CEDIA)	28
3.3.6 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ELISA	28
3.3.7 Imunoensaio Enzimático (EIA)	29
3.3.8 Eletroquímico Luminescência (ECL)	30
3.3.9 Cromatografia Líquida – Espectrometria de Massas	30
3.3.10 Espectrometria de Massas Sequencial (MSMS)	31
3.4 POLÍMEROS.....	31
3.5 CELULOSE	32
3.6 NITROCELULOSE.....	33
3.7 QUITOSANA.....	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 LOCAL DA PESQUISA.....	40
4.2 MATERIAIS.....	40
4.3 MÉTODOS	40
4.3.1 Preparação das Membranas de Quitosana	40
4.3.2 Obtenção das tiras de diagnóstico de nitrocelulose	41
4.4 CARACTERIZAÇÕES	41

4.4.1 Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) / Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDS)	41
4.4.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	42
4.4.3 Molhabilidade por Medidas de Ângulo de Contato	42
4.4.4 Ensaio de Intumescimento	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	44
5.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) / ESPECTROSCOPIA POR ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS X (EDS)	46
5.3 MOLHABILIDADE	49
5.4 ENSAIO DE INTUMESCIMENTO.....	51
6 CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

A quantificação de substâncias em amostras humanas como sangue, soro e urina são de grande importância para o diagnóstico, acompanhamento e tratamento de diversas condições que afetam a saúde e condições fisiológicas da população. Ao longo das últimas décadas foram desenvolvidos dispositivos de testes de utilização simples que dispensa equipamentos e instalações laboratoriais e que permitem inclusive a realização de ensaios pelo próprio indivíduo. Estes dispositivos consistem de uma tira reagente composta por diversas camadas incluindo uma camada de material carreador que permite que a amostra contendo os analitos siga até o local onde se encontram os reagentes e as reações promovem uma alteração visível na zona reagente. O material carreador da amostra é formado por nitrocelulose com uma porosidade padronizada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Entre os analitos cuja quantificação no sangue tem grande importância, encontra-se a ciclosporina que é administrada em pacientes transplantados e que a utilizam no tratamento imunossupressor. A ciclosporina é uma das drogas mais utilizadas no acompanhamento de pacientes transplantados e o monitoramento das suas concentrações séricas se constitui numa fonte de gastos públicos com compras de produtos para diagnóstico laboratorial para transplantados devido ao alto custo, poucos fornecedores e grande uso (BRASIL, 2002).

Atualmente, o Brasil possui o maior sistema público de transplantes do mundo, subsidiando 95% desse tratamento, incluindo procedimento cirúrgico, medicação e acompanhamento necessários ao pós-transplante (MACHADO et al., 2012; APPELLESSO, S. et al, 2000).

Durante o acompanhamento pós-transplante se faz necessário a administração de drogas imunossupressoras. Para o manejo do paciente é necessário muitas vezes conhecer os níveis plasmáticos da droga de forma a controlar os níveis plasmáticos da ciclosporina e para tanto se faz necessário a realização de testes laboratoriais. Os reagentes utilizados são de alto custo e possuem apenas cinco fornecedores no Brasil, todos importados e o diagnóstico é demorado e relativamente complexo, carecendo de grandes equipamentos (ACURCIO et al., 2013).

Atualmente, os dispositivos de testes de utilização simples utilizam-se tiras reagentes compostas de nitrocelulose, material que se assemelha quimicamente a quitosana e que possivelmente possa ser substituída por esta.

A quitosana é um amino polissacarídeo que tem sido utilizado em diversas áreas da engenharia, biotecnologia, ciências farmacêuticas e medicina. Ela é encontrada na natureza em pequenas quantidades nas paredes celulares e esporos de alguns fungos (MUCOR e ZYGOMICETES) ou pode ser obtida pela hidrólise alcalina da quitina, principal componente dos exoesqueletos dos artrópodes. O termo quitosana não identifica um único composto, mas copolímeros formados por unidades monoméricas de (1,4)-2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose e β -(1,4)-2-acetoamino-2-desoxi-D-glicopiranosose (ou D-glucosamina), que se ligam entre si por ligações glicosídicas em diferentes graus de polimerização dispostos em uma cadeia linear similar à da celulose com exceção da substituição dos grupos hidroxila na posição 2 por grupos amino (ASSIS, 2010).

Este trabalho, em razão do propósito apresentado e pela constante busca e desenvolvimento de novos produtos, para melhoria da qualidade de vida de todos, desperta cada vez mais o interesse às pesquisas para o seguimento biomédico, portanto, o escopo desse estudo é desenvolver um material com filmes de quitosana, para carrear substâncias semelhantes ao sangue humano e comparar esta capacidade à da nitrocelulose com o objetivo de estabelecer uma possível substituição da nitrocelulose pela quitosana na produção de dispositivos de testes rápidos, possibilitando a confecção de um dispositivo para quantificação de ciclosporina estabelecendo um novo campo de aplicação para a quitosana como material carreador, utilizável também como biomateriais.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Desenvolver scaffolds de quitosana com propriedades comparáveis às tiras de nitrocelulose utilizadas no mercado de dispositivos diagnósticos.

2.2 SPECÍFICOS

- Comparar a capacidade carreadora de líquido dos scaffolds de quitosana à capacidade carreadora de tiras de nitrocelulose;
- Caracterizar scaffolds de quitosana e tiras de nitrocelulose quanto às características físicas, químicas e estruturais;
- Comparar todas as características estudadas neste trabalho dos scaffolds de quitosana e das tiras de nitrocelulose;

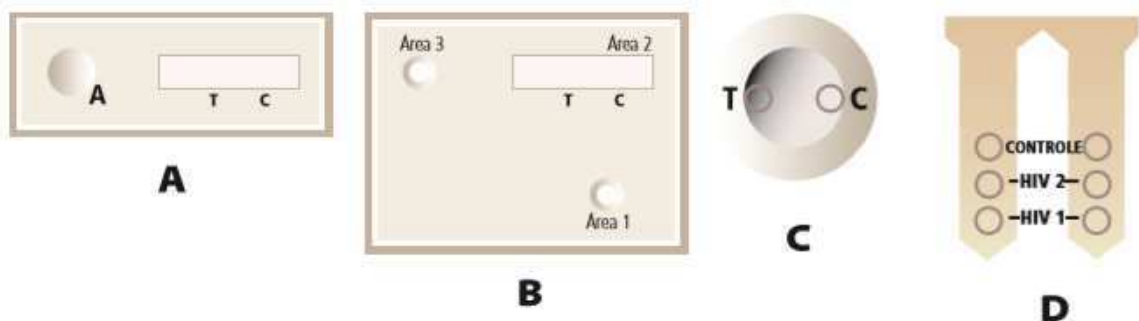
3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 TESTES RÁPIDOS

Teste rápido é definido pelo Ministério da Saúde como um dispositivo de testes de uso único que não depende de infraestrutura laboratorial e que produz resultado em tempo igual ou inferior a 30 minutos. Um procedimento com teste rápido pode ser realizado a partir da coleta de uma gota de sangue da ponta do dedo ou de uma gota de urina. A amostra é colocada no dispositivo de testagem e para chegar ao resultado, quem realiza o teste segue o fluxo determinado pelo fabricante. Esse método permite que em até meia hora o teste seja realizado e se conheça o resultado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

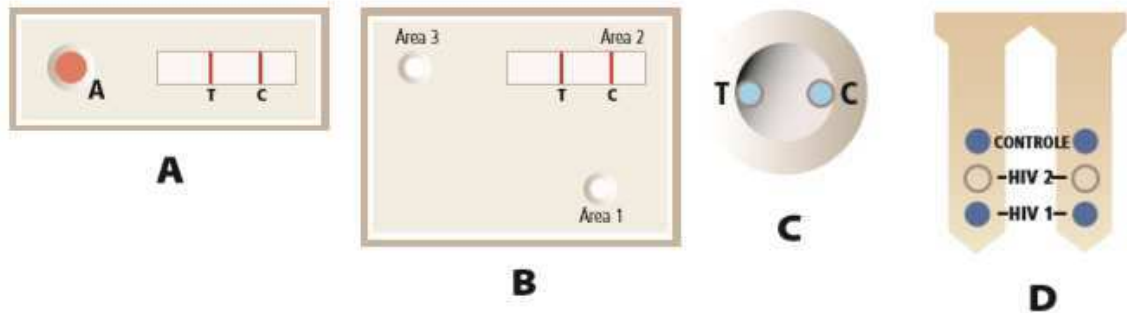
Geralmente os testes rápidos são ensaios imunoenzimáticos simples e entre os vários formatos disponíveis os utilizados mais frequentemente são dispositivos (ou tiras) de imunocromatografia (ou fluxo lateral), imunocromatografia de dupla migração (DPP) e dispositivos de imunocaptação e fase sólida. É uma metodologia utilizada no mundo inteiro e traz vantagens significativas quanto ao método laboratorial, pois são de simples realização, dispensando equipamentos de laboratório, permitindo o conhecimento dos resultados e assistência imediata aos pacientes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). As Figuras 1, 2 e 3 ilustram exemplos de Testes Rápidos.

Figura 1 - Testes Rápidos (TR) para HIV, (A) imunocromatografia ou fluxo lateral, (B) imunocromatografia de dupla migração – DPP, (C) imunocaptação, (D) fase sólida.



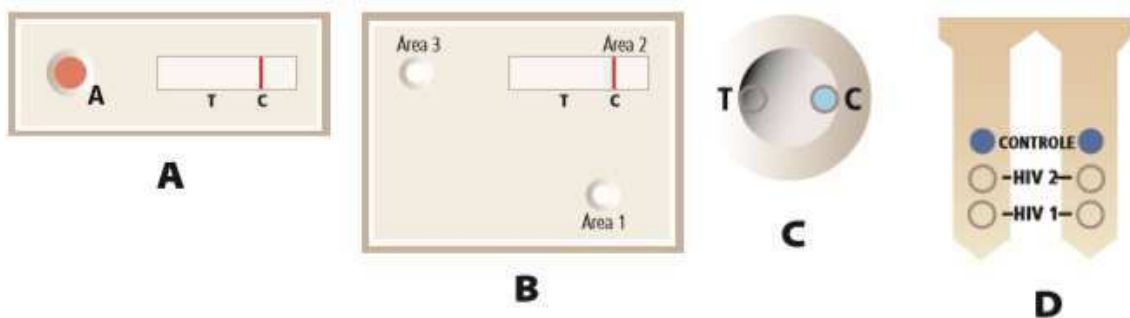
Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010

Figura 2 - Testes Rápidos Reagentes (TR) para HIV. Observa-se presença de linha na área T (Teste) e na área C (Controle), (A) imunocromatografia ou fluxo lateral, (B) imunocromatografia de dupla migração – DPP, (C) imunoconcentração, (D) fase sólida.



Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010.

Figura 3 - Testes Rápidos Não Reagentes (TR) para HIV. Presença de linha ou ponto apenas na área C (Controle), (A) imunocromatografia ou fluxo lateral, (B) imunocromatografia de dupla migração – DPP, (C) imunoconcentração, (D) fase sólida.



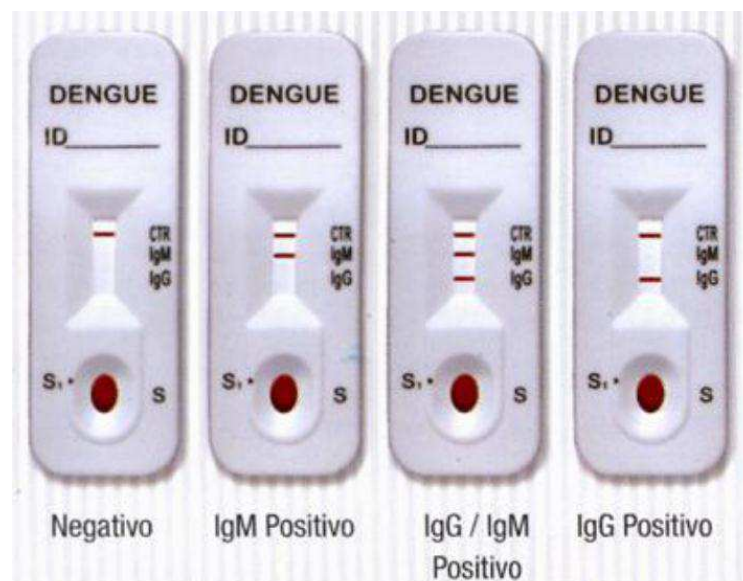
Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010.

Existem atualmente no mercado diversos testes rápidos disponíveis, produzidos por vários fabricantes e que utilizam diferentes princípios técnicos. Geralmente os testes rápidos apresentam metodologia simples, utilizando antígenos fixados em um suporte sólido (membranas de celulose ou nylon, látex, micropartículas ou cartelas plásticas) e são acondicionados em embalagens individualizadas, permitindo a testagem individual das amostras. Esses testes, que foram inicialmente desenvolvidos no final da década de 80, ganharam maior popularidade a partir do começo dos anos 90. À medida que as tecnologias de desenvolvimento e produção de kits foram se tornando mais refinadas, os testes

rápidos revelaram ser tão acurados quanto os convencionais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

São encontrados no mercado testes rápidos para dosagem de glicose, colesterol, triglicerídeos, testes de gravidez quantificação de drogas de abuso e medicamentosas. Os testes diagnósticos rápidos são particularmente úteis na triagem inicial de uma determinada infecção ou doença em populações específicas como, por exemplo, em programas preventivos de transmissão vertical de infecções em gestantes (doença de chagas, hepatite B ou HIV), candidatos a doação de sangue ou inquéritos populacionais. Portanto, a OMS (Organização Mundial de Saúde) reconhece o desenvolvimento de diagnósticos rápidos, práticos, sensíveis, específicos e de baixo custo como estratégia essencial no processo de otimização dos sistemas de saúde pública e no controle de epidemias (UNIVERSIA BRASIL, 2006). A Figura 4 ilustra exemplo de Teste Rápido para dengue.

Figura 4 - Testes rápido para Dengue



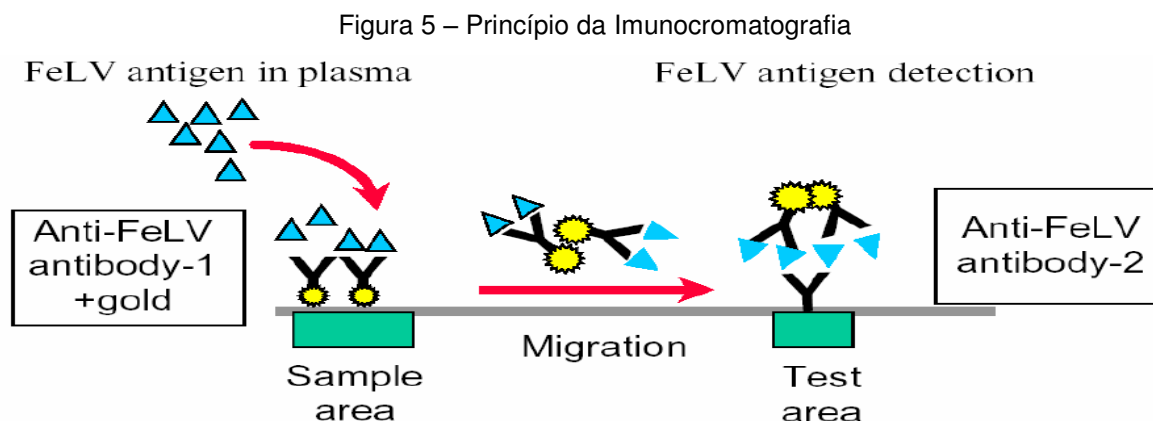
Fonte: Calado, 2014

As tiras reagentes são construídas por um substrato de poliéster, uma camada de carbono como material condutivo, uma camada de isolamento condutivo com poliéster de baixo alongamento, uma camada enzimática com ingredientes ativos, mediador químico redox, ingredientes inativos para garantir especificidade. Possui ainda uma camada hidrofílica, barreira protetora para reduzir a evaporação do sangue e diminuir a quantidade da amostra. Os condutores de carbono oferecem

energia para a reação de oxido-redução, e podem ser fabricados pela técnica de imunocromatografia (BANCO DE DADOS DA ANVISA).

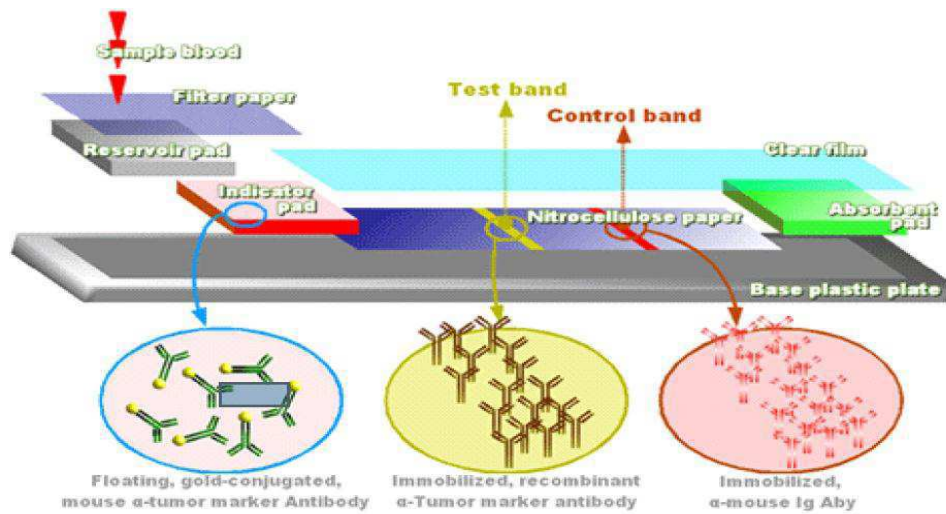
3.2 IMUNOCROMATOGRAFIA

A imunocromatografia é uma técnica que começou a ser desenvolvida nos anos 60, sendo primeiramente criada para o estudo das proteínas séricas e atualmente é utilizada para a detecção de muitas situações tendo grande valor em situações nas quais os profissionais de saúde necessitem tomar decisões e assumir condutas imediatas. São análises qualitativas ou semi-quantitativas, que servem como teste de triagem, é rápido, econômico, de fácil interpretação, leitura feita a olho nu, apresenta sensibilidade e especificidade similares ao ELISA de terceira geração. A técnica utilizada consiste de uma matriz de membrana de nitrocelulose ligada a uma tira de acetato, para detectar antígeno emprega-se um anticorpo de captura, ligado à matriz e um anticorpo marcado específico ao antígeno pesquisado. Para detecção de antígenos podem ser utilizados anticorpos fixados na linha de captura e como conjugado um segundo anticorpo conjugado ao corante. Um dos métodos imunológicos desses testes emprega corante insolúvel, como ouro coloidal (róseo) ou prata coloidal (azul marinho) como revelador da interação antígeno-anticorpo (CAVALCANTI et al,2008). As Figuras 5, 6 e 7 ilustram exemplos de imunocromatografia.



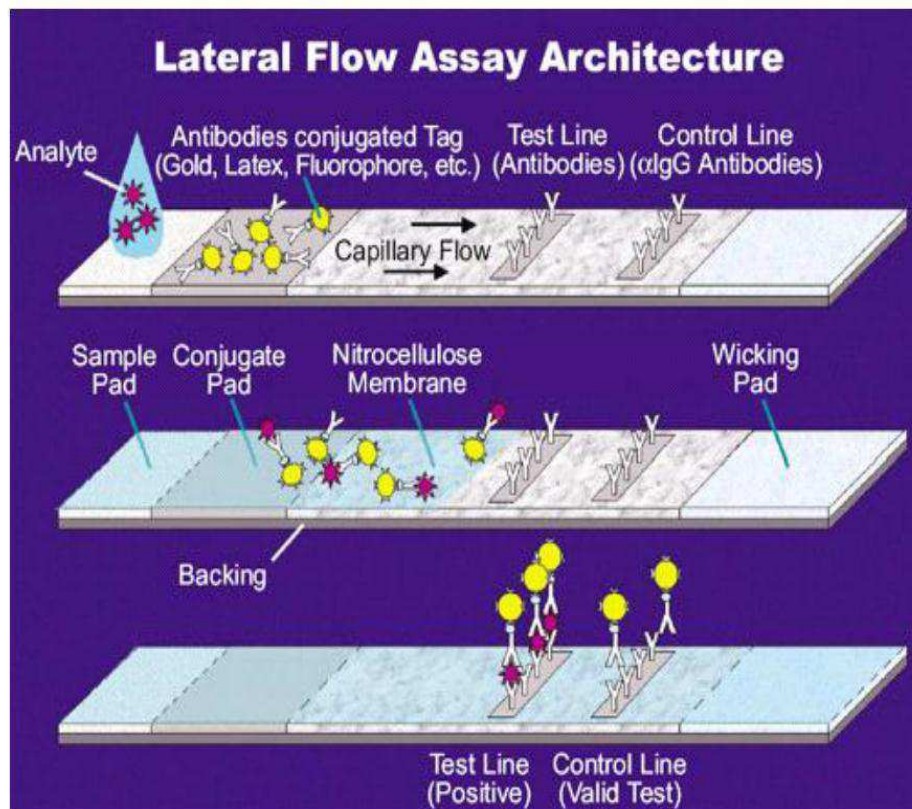
Fonte: Calado, 2014

Figura 6 – Estrutura do teste de Imunocromatografia



Fonte: Calado, 2014

Figura 7 - Imunocromatografia de fluxo lateral



Fonte: Calado, 2014

Pode gerar independência tecnológica na área de diagnóstico laboratorial, melhorando o desenvolvimento e a disponibilidade de *kits* diagnósticos situações prioritárias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

A imunocromatografia significa uma alternativa aos métodos tradicionais, pois se trata de uma tecnologia inovadora que concentra a reação antígeno-anticorpo em uma única fase sólida, sendo esta mantida e utilizada a temperatura ambiente. Além de possuir sensibilidade e especificidade elevadas, a imunocromatografia possui baixo custo, pois não exige equipamento ou treinamento específico para realizar o teste ou interpretar o resultado (UNIVERSIA BRASIL, 2006).

A técnica de testes imunocromatográficos, é uma metodologia de detecção baseada na utilização de tiras de um material de suporte impregnadas com reagentes secos que são ativadas pela aplicação de amostras fluidas. Aplicações desta metodologia incluem testes para detecção de patógenos, drogas, hormônios e metabolitos presentes em amostras médicas, veterinárias, alimentos, análises ambientais e outros (MACHADO, 2013).

3.3 CICLOSPORINA

De acordo com as Diretrizes Terapêuticas e Protocolos Clínicos aprovados pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2012), a terapia de imunossupressão para manutenção pós-transplante renal deve combinar três classes terapêuticas: um corticosteroide, geralmente a prednisona (P); um inibidor de calcineurina (CNI) representado pela ciclosporina (CsA) ou pelo tacrolimo (TAC); e um agente antiproliferativo podendo ser a azatioprina (AZA), o micofenolato mofetil (MMF) ou o micofenolato de sódio (MFS). Alternativamente, os protocolos permitem a substituição de uma dessas duas últimas classes pelos sirolimo (SIR) ou everolimo (EVE) que são inibidores da rapamicina (ACURCIO et al., 2013).

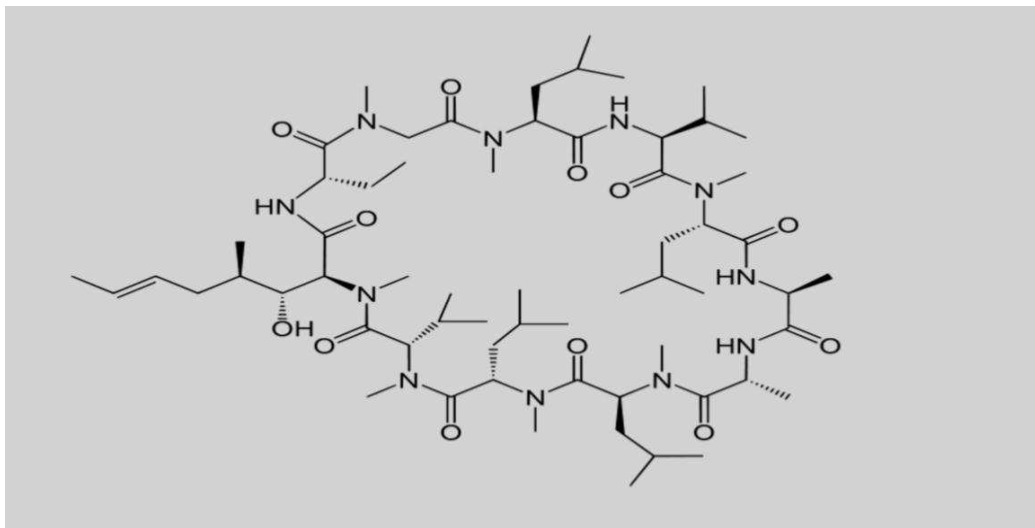
A Ciclosporina A é uma das drogas imunossupressoras mais eficazes. Ela inibe a função dos linfócitos T, que desempenham um papel importante na indução da resposta imunitária. As respostas imunitárias normalmente ocorrem após transplantes de órgãos, tais como o fígado, rim, e medula óssea. A ciclosporina A é um péptido cíclico fracamente solúvel em água que compreende 11 aminoácidos. Uma das razões que limitam a sua utilização é sua faixa terapêutica estreita, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, e neurotoxicidade (ZHANG et al, 2013).

A ciclosporina A (CsA) é um decapeptido cíclico extremamente hidrofóbico que é praticamente insolúvel em água (solubilidade: 0.04mg/mL). É empregado, na prática clínica, como terapia de primeira linha na prevenção da rejeição de

xenotransplante sistêmica após transplante de órgãos. No olho, a CsA é também benéfica para o tratamento de doenças auto-imunes, uveíte anterior e posterior, doença de Behcet, síndrome de Sjögren, queratoconjuntivite seca e córnea transplantadas (SANDRI, 2010).

Ela é um decapeptídeo fúngico originado do *Tolypocladium inflatum gams* (Figura 8) (GARCIA et al., 2004) e foi introduzido na década de 70 para provável uso em transplante de órgãos sólidos. No entanto, seu uso efetivo ocorreu em 1983 no European Multicenter revolucionando o transplante de órgãos com a diminuição da rejeição e melhorando substancialmente a sobrevivência de pacientes submetidos a transplantes cardíaco, renal, hepático, pancreático e pulmonar (McMILLAN, 1989). A Figura 8 ilustra a molécula de ciclosporina.

Figura 8 - Molécula de ciclosporina



Fonte: Garcia et al, 2004

A monitorização terapêutica de imunossupressores CsA é indispensável para manter níveis estáveis da droga, evitando para o transplantado a perda do enxerto, no caso de baixas doses, ou a toxicidade, em altas doses, permitindo ajustes individuais (ACURCIO et al., 2013).

Como as drogas imunossupressoras representam um problema devido à estreita faixa entre a dose terapêutica e seus efeitos tóxicos, existe um potente estímulo para monitorização biológica dessas drogas (KAHAN, 1986), respeitando os ajustes individuais. É fundamental, em pacientes transplantados, a manutenção de drogas imunossupressoras em níveis estáveis que sejam suficientemente altas

para prevenir a rejeição mas, ao mesmo tempo, abaixo do limiar tóxico para minimizar efeitos como a nefro e a neurotoxicidade (VERLEDEN, 2002).

A Ciclosporina A é uma droga imunossupressora potente e efetiva no combate à rejeição de órgãos transplantados. A dosagem a ser administrada ao paciente requer ajustes individuais, sendo, então, necessário um monitoramento constante de seu nível sérico a fim de se obter o máximo de efeito imunossupressor com um mínimo de efeitos tóxicos. Cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) fornece determinações bastante precisas e específicas da concentração da droga, mas, por tratar-se de um método complexo, não é utilizada na rotina laboratorial. O método laboratorial mais utilizado para o monitoramento de ciclosporina, até o momento, tem sido o radioimunoensaio com anticorpos monoclonais (RIA), por ser pouco influenciado pela concentração dos metabólitos da droga em questão (BOTTINI, 1998).

As principais recomendações, com relação à dosagem de ciclosporina, dizem respeito: 1) ao tempo de coleta entre 11 a 12 horas após a última dose, se estiver fazendo uso da medicação duas vezes ao dia, ou 23 a 24 horas após a última dose, se estiver fazendo uso de dose única diária; 2) à periodicidade da dosagem: na maioria dos casos, no pós-transplante imediato, a frequência máxima recomendada é de uma dosagem a cada 24 horas; 3) ao material: sangue total. O anticoagulante recomendado é o EDTA; 4) à estabilidade da amostra: ciclosporina em sangue com EDTA é estável por até sete dias em temperatura ambiente ou geladeira; para períodos de armazenagem superiores a sete dias, deve-se manter o material a -20°C; 5) ao método de dosagem: deve-se utilizar um método específico e validado para a droga-mãe; 6) aos metabólitos da Ciclosporina: não devem ser utilizados como referência para o ajuste de dose da medicação, uma vez que sua atividade terapêutica e tóxica ainda não é bem estabelecida (BOTTINI, 1998).

O ensaio por FPIA com anticorpos monoclonais foi o primeiro ensaio semi-automatizado desenvolvido para a dosagem de ciclosporina e, a partir daí, vários estudos foram realizados com a finalidade de se estabelecer a correlação dessa metodologia com aquelas anteriormente utilizadas (RIA e HPLC), empregando-se, na maioria das vezes, o cálculo do coeficiente de correlação para validar o novo ensaio (BOTTINI, 1998). O FPIAm é uma metodologia de rápida execução (demora média de 40 minutos para cada 20 amostras, contra 6 a 8 horas na determinação por radioimunoensaio), possibilitando maior agilidade na emissão de seus

resultados, além de permitir a realização de dosagens em caráter de urgência em curto período de tempo.

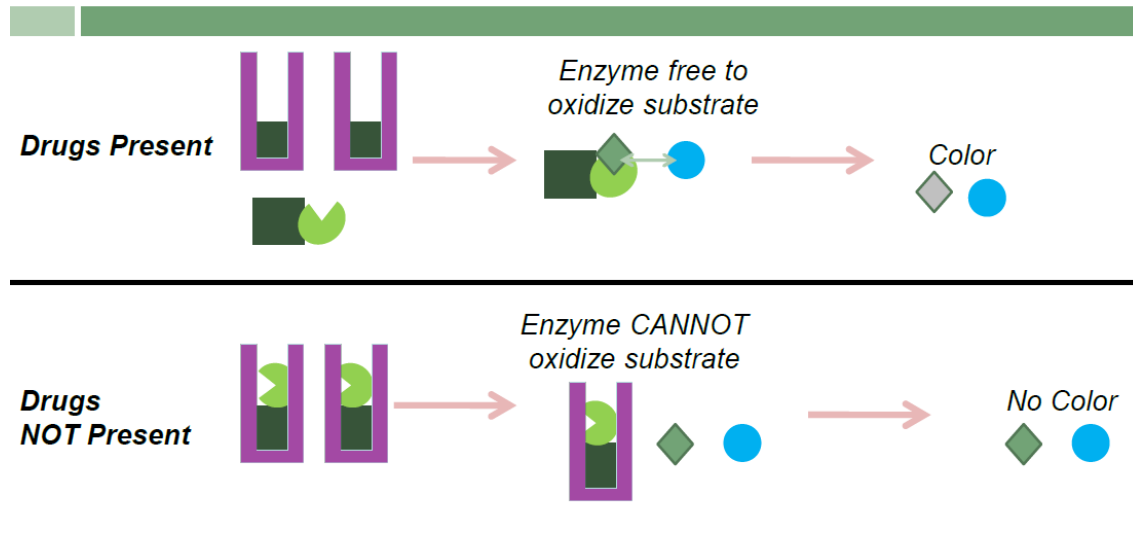
O Brasil dispõe atualmente de produtos registrados que utiliza a técnica de imunoensaio por multiplicação enzimática (EMIT) para análise em sangue total baseada na competição para fixação de anticorpos na ciclosporina. Possui ainda registro de um produto utilizado para realizar ensaio de electroquimioluminescência (electrochemiluminescence immunoassay ou “ECLIA”), concebido para ser utilizado nos analisadores de imunoensaios. (BANCO DE DADOS DA ANVISA). Mundialmente estão disponíveis diversas técnicas para quantificação de ciclosporina, as quais passamos a descrever.

3.3.1 Enzyme Multiplied Immunoassay Technique - EMIT

A metodologia Enzyme Multiplied Immunoassay Technique - EMIT é um método comum utilizado para determinações qualitativas e quantitativas de drogas e outras substâncias no soro e urina. Foi introduzido no mercado em 1973 como o primeiro imunoensaio homogêneo usado em escala comercial (SUNG et al, 1985). Por imunoensaio homogêneo entende-se como aquele que pode ser desenvolvido usando protocolos definidos de forma rápida e simples. As principais aplicações são para o monitoramento de drogas terapêuticas no soro e como teste de triagem para drogas de abuso e seus metabólitos na urina (SUNG et al, 1985).

O antígeno compete com o local do anticorpo marcado com a enzima. O reagente de anticorpo bloqueia qualquer atividade enzimática quando está ligado ao complexo antígeno enzimático. Então os complexos antígenos enzimáticos livres competem com os antígenos da mostra formando alteração na cor da solução que será proporcional à concentração do antígeno presente na amostra (SUNG et al, 1985). A Figura 9 ilustra o método Enzyme Multiplied Immunoassay Technique - EMIT .

Figura 9 - Método Enzyme Multiplied Immunoassay Technique



Fonte: SUNG et al, 1985.

3.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - HPLC

Mais conhecida como HPLC – *High Performance/Pressure Liquid Chromatography* ou CLAE é uma técnica cromatográfica que se distingue das demais por usar a fase móvel à alta pressão. O uso de pressões elevadas permite uma redução no diâmetro das partículas da fase estacionária, localizada no interior da coluna cromatográfica. O uso de partículas menores (na ordem de 5,0 μm) no interior da coluna resulta em uma área superficial, o local de adsorção, maior (geralmente da ordem de centenas de metros quadrados por grama de fase estacionária), o que promove uma separação mais eficiente dos componentes da amostra. Essa "miniaturização" das partículas da coluna permite o uso de colunas menores, volumes menores de amostras e um gasto menor de fase móvel. Assim sendo, em cromatografia líquida de alta eficiência trabalha-se na faixa dos microlitros (COLLINS, C. H. e GUIMARÃES, L. F. L., 1988) (CIOLA, R., 1998).

A cromatografia se baseia na diferença de afinidade das substâncias por um material ativo ou adsorvente. (COLLINS, C. H. e GUIMARÃES, L. F. L., 1988). O objetivo da cromatografia é separar individualmente os diversos constituintes de uma mistura de substâncias seja para identificação, quantificação ou obtenção da substância pura para os mais diversos fins. Tal separação dá-se através da migração

da amostra através de uma fase estacionária por intermédio de um fluido (fase móvel) (MACRAE, R, 1982).

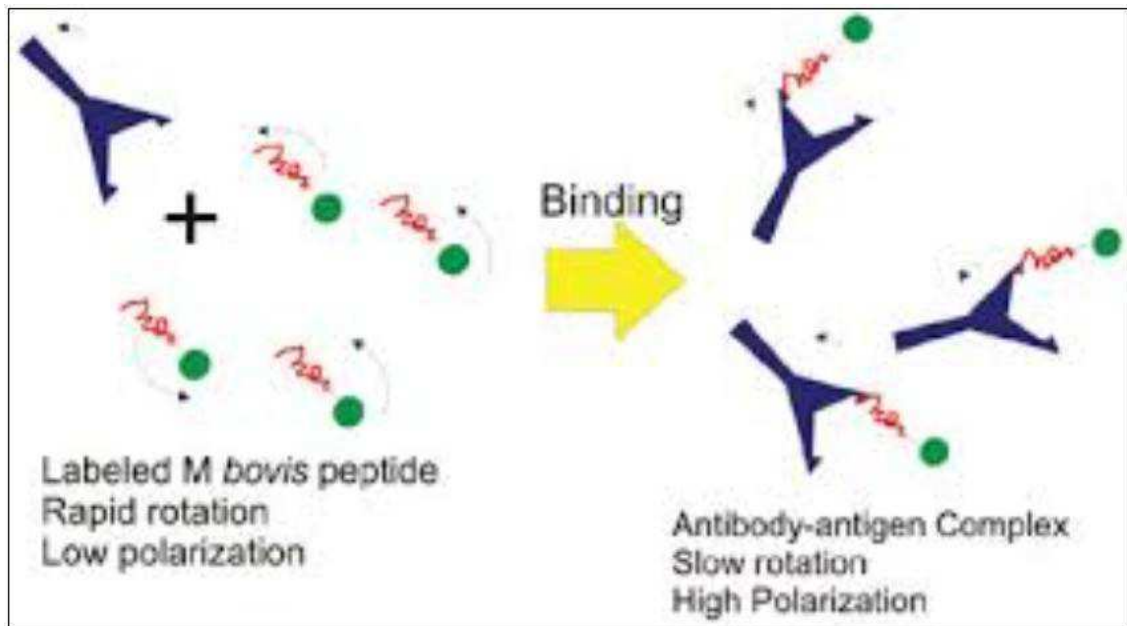
Outro membro das cromatografias, tão comum quanto a CL, é a Cromatografia Gasosa (CG). Enquanto a CL usa um eluente (fluxo gerado por uma bomba), a CG utiliza um gás (gás carreador) proveniente de um cilindro, de modo que não necessita de bomba. (COLLINS, C. H. e GUIMARÃES, L. F. L., 1988).

3.3.3 Imunoensaio por Fluorescência Polarizada - FPIA

O ensaio de fluorescência polarizado - Fluorescence polarization immunoassay - FPIA é um imunoensaio homogêneo utilizado para obter uma rápida e acurada detecção de anticorpos ou antígenos. O princípio do ensaio está em um corante fluorescente ligado a um antígeno ou fragmento de anticorpo poder ser excitado pela luz plana polarizada em um determinado comprimento de ondas. Como regra uma molécula pequena se movimenta mais rápido quanto em solução do que grandes moléculas. Esta velocidade de movimentação das moléculas pode ser medida pela intensidade da luz nos planos horizontal e vertical. Geralmente o tempo que leva para uma molécula girar em torno de um determinado ângulo é uma indicação do seu tamanho. Quando uma molécula pequena que gira rapidamente é ligada à uma outra molécula grande a velocidade de rotação é diminuída e este decréscimo pode ser medido (HEMMIL, 1985).

Neste método uma droga marcada com fluoresceína compete com outra droga não marcada pelas ligações de anticorpos específicos. A amostra é excitada com luz plana polarizada (490 nm), a fluoresceína emite luz plana polarizada (520 nm), a droga livre de fluoresceína emite menos luz devido à sua alta movimentação enquanto o complexo anticorpo-droga-fluoresceína se movimenta mais lentamente e produz mais emissões. A droga da amostra compete pelos anticorpos com a fluoresceína ligada à droga do reagente. Quanto mais droga estiver presente na amostra menor a quantidade de fluoresceína marcada ligada ao anticorpo e menor a emissão de luz polarizada. Quanto maior as concentrações de droga menores serão os valores da emissão de luz (HEMMIL, 1985). A Figura 10 ilustra o Imunoensaio por Fluorescência Polarizada.

Figura 10 - Imunoensaio por Fluorescência Polarizada



Fonte: HEMMIL,1985

3.3.4 Imunoenzimático de Micropartículas - MEIA

O método MEIA, teste de triagem, é uma derivação do princípio do ELISA, desenvolvido em sistema de processamento automático. As micropartículas revestidas com antígenos recombinantes são adicionadas a amostra previamente diluída e o sistema é incubado para formação do complexo antígeno-anticorpo. Uma parte da mistura é transferida para uma matriz de fibra de vidro, na qual a micropartícula adere de forma irreversível (RÊGO et al, 2013).

O resultado é expresso por comparação da taxa de formação do produto fluorescente pela taxa da zona de corte calculado previamente por um calibrador *index* corrido em duplicada. Os resultados são automaticamente expressos pelo aparelho como a relação DO/CO, onde a densidade óptica (DO) da amostra é avaliada em relação ao *cut-off* (CO) previamente calculado. Considera-se não reagente toda amostra com relação DO/CO inferior a 1,00 e reagente toda amostra com relação superior a 1,00 (VOGLER, 2003).

3.3.5 Cloned Enzyme Donor Immunoassay - CEDIA

O CEDIA é um imunoenensaio enzimático competitivo homogêneo. Este ensaio faz uso de dois fragmentos componentes de enzimas que separadamente são inativos. Sob certas condições estes fragmentos em solução podem de forma espontânea se rearranjarem para formar uma enzima ativa. Em ensaios biomédicos os fragmentos das enzimas são juntados ao analito de interesse. O conjugado fragmento-enzima-analito ainda é capaz de rearranjar-se com outro fragmento enzimático para formar uma enzima ativa. No entanto, não é capaz caso o analito esteja ligado a um anticorpo (BURTIS, 2012).

Para determinar a quantidade de analito em uma amostra, parte da amostra é adicionada a uma solução contendo o conjugado, o outro fragmento da enzima, o anticorpo destinado ao analito, e o substrato contendo a enzima para reação. A competição pelo anticorpo ocorre entre o analito da amostra e conjugado. Altas concentrações do analito na amostra leva a uma pequena quantidade de conjugado levando a formação de enzima ativa e conseqüentemente ocorre alta atividade enzimática. Por outro lado, baixas concentrações de analitos na amostra gera uma alta concentração de conjugado que diminui a formação de enzima ativa e conseqüentemente uma baixa atividade enzimática (BURTIS, 2012).

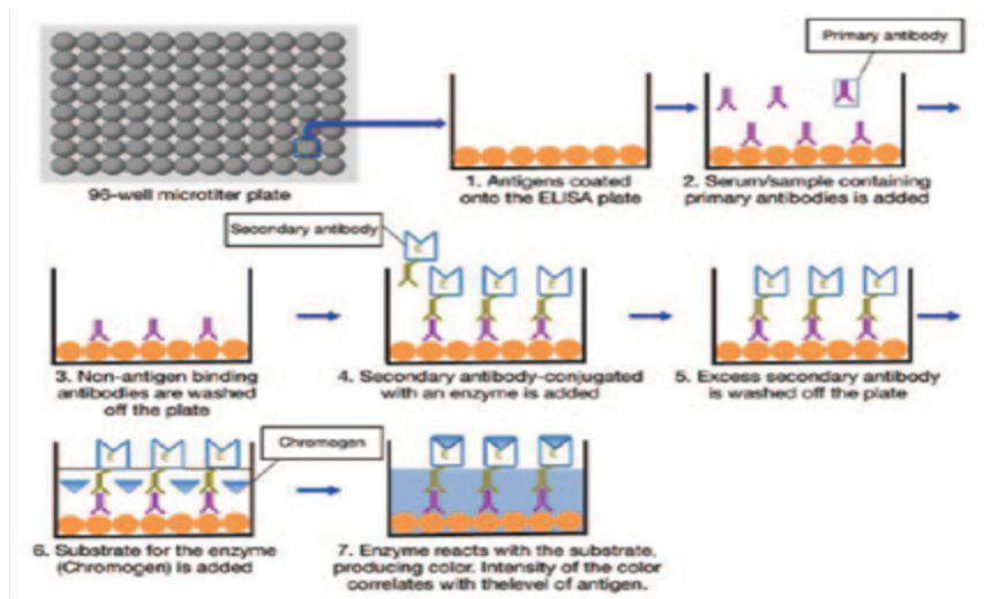
3.3.6 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ELISA

O ELISA é um teste imunoenzimático que permite a detecção de anticorpos presentes em amostras humanas utilizado para o diagnóstico de doenças ou situações que induzam a produção de imunoglobulinas. O complexo contendo o anticorpo é visualizado pelo acoplamento da enzima ao anticorpo uma vez que a adição de um substrato ao complexo enzima-anticorpo-antígeno produção uma coloração específica (GAN; PATEL, 2013).

O método ELISA foi primeiramente desenvolvido na década de 1970 para substituição dos radio imunoesaios que por serem radioativos geram uma série de inconvenientes. O método permanece tendo ampla utilização no seu formato original e em formatos com modificações que permitem leituras cada vez mais sensíveis (GAN; PATEL, 2013). O ensaio se baseia fundamentalmente na interação entre um epípeto, uma pequena sequência de aminoácidos de um antígeno, e um local

específico de ligação de um anticorpo. Os anticorpos utilizados podem ser monoclonal (derivado de uma única célula) ou policlonal (um pool de anticorpos purificados do soro de um animal) (GAN; PATEL, 2013). A Figura 11 ilustra o teste de ELISA

Figura 11 - Teste de ELISA



Fonte: GAN; PATEL, 2013

3.3.7 Imunoensaio Enzimático - EIA

O Imunoensaio Enzimático - EIA assim como o ELISA é largamente empregado como ferramenta diagnóstica em medicina e em controle de qualidade industrial para detecção e quantificação de antígenos ou anticorpos em uma determinada amostra. São métodos similares ambos derivados do radioimunoensaio (RIA). RIA foi primeiramente descrito por Berson e Yalow em 1960, pelo qual Yalow recebeu o prêmio Nobel em 1977 por medir insulina endógena em plasma. RIA foi então desenvolvido como uma técnica inovadora para detecção e medição de moléculas biológicas que se apresentam em pequenas quantidades pavimentando o caminho para a análise de incontáveis outras moléculas como hormônios, peptídeos e proteínas. Por questões de segurança, os radioisótopos utilizados no RIA foram substituídos por enzimas no métodos EIA e ELISA (MARIANI, 1998).

3.3.8 Eletroquímio Luminescência - ECL

A ECL é um tipo de luminescência produzida durante reações eletroquímicas. Em quimiluminescência, um estado eletrônico excitado intermediário é gerado por reações altamente exotérmicas que, em seguida, durante a fase de relaxamento emite uma luz. Este comprimento de onda da luz emitida pelo fóton corresponde à diferença de energia entre estes dois estados (FORSTER, 2009). A excitação na ECL pode ser causada por transferência de elétrons energéticos envolvidos nas reações. Tal excitação é uma forma de quimiluminescência em que um ou todos os reagentes são produzidos electroquimicamente (ALLEN,2004).

ECL tem muita aplicação em métodos analíticos por ser um método com alta sensibilidade e especificidade. Geralmente são utilizados complexos de rutênio como o $[\text{Ru}(\text{Bpy})_3]^{2+}$ (que libera um fóton de ~620 nm). A detecção do fóton é feito com tubos fotomultiplicadores (PMT) ou fotodiodo de silício revestido de ouro ou de sensores de fibra ópticas (VALENTI, 2010; RAMPAZZO,2012).

3.3.9 Cromatografia Líquida – Espectrometria de Massas

Com o desenvolvimento das fontes de ionização a pressão atmosférica a partir do final da década de 80, o acoplamento Cromatografia Líquida (LC) – Espectrometria de Massas (MS) aumentou consideravelmente a capacidade analítica dos laboratórios do ponto de vista de sensibilidade, seletividade, velocidade de análise e facilidade no desenvolvimento de métodos analíticos (CAHILL et al, 2004).

De acordo com a IUPAC, a Espectrometria de Massas (MS) é definida como o estudo da matéria pela formação de íons em fase gasosa e posteriormente caracterizados por um Espectrômetro de Massas de acordo com sua massa, carga, estrutura ou propriedades físico-químicas (*IUPAC Gold Book*). Em virtude do alto grau informativo das análises, MS pode ser utilizada tanto qualitativamente (ou seja, para identificação de composição elementar de compostos e elucidação estrutural) quanto como para análises quantitativas, em geral onde se buscam determinar analitos nos níveis de traços em matrizes complexas. O espectro de MS apresenta o sinal referente ao padrão isotópico do analito, que por sua vez é resultante do padrão isotópico dos átomos constituintes do composto. Com isso, essa informação

pode ser utilizada para prever a presença de alguns átomos com padrões isotópicos bem característicos (Cl, Br, S, dentre outros) (CAHILL et al, 2004). Além disso, o espectro de MS também pode, dependendo das condições de aquisição, apresentar sinais referentes à fragmentação do íon originalmente gerado na fonte. Esses fragmentos por sua vez podem ser muito úteis tanto do ponto de vista qualitativo, fornecendo informações auxiliares para elucidação estrutural, quanto quantitativo, no sentido de aumentar a seletividade do método analítico. Finalmente, em virtude do seu caráter universal, o espectro de MS em geral apresenta sinal de outras espécies que são simultaneamente ionizadas ao analito de interesse. Nesse caso é importante ressaltar que a relação de intensidade entre dois íons diferentes no espectro não está diretamente relacionada às concentrações relativas do mesmo em solução, visto o caráter intrinsecamente não-quantitativo da técnica (CARROLL et al, 2003).

3.3.10 Espectrometria de Massas Sequencial - MSMS

Quando se deseja obter informações estruturais ou aumentar a seletividade de métodos quantitativos, a fragmentação do analito passa a ser desejada. Nesse caso, isso ocorre em condições muito bem controladas dentro do próprio MS, em dispositivos conhecidos como Câmara de Colisão ou dentro do próprio Analisador (no caso de *Ion Traps*). Essa fragmentação se dá por meio de colisões do analito de interesse, com um gás neutro (em geral, Ar ou N₂). Outros modos de aquisição em MSMS com fins qualitativos são os modos de Varredura de Íons Precusores (PIS) e Varredura de Perda Neutra (NL) (MARSHALL, 1998).

3.4 POLÍMEROS

Várias técnicas para determinação da ciclosporina e de outros fármacos em amostras biológicas se utilizam de polímeros na composição. Dentre esses polímeros, a nitrocelulose tem sido o mais utilizado.

Os polímeros são macromoléculas formadas pela repetição de muitas unidades químicas iguais, os meros ou unidades repetitivas ligadas covalentemente. Para formação de um polímero deve haver determinadas condições de reação que permitam a união dos monômeros. Em primeiro lugar para acontecer a

polimerização a molécula deve possuir funcionalidade igual ou superior a dois (pontos reativos ≥ 2) que pode se apresentar de três maneiras: presença de pelo menos dois grupos funcionais, presença de insaturação e moléculas cíclicas (3/4 átomos) (BATICH; LEAMY,2003).

Quanto a origem os polímeros são classificados como naturais e sintéticos. Dentre os naturais, estão os polímeros a base de proteínas e os polissacarídeos como a quitosana (LIMA, 2010).

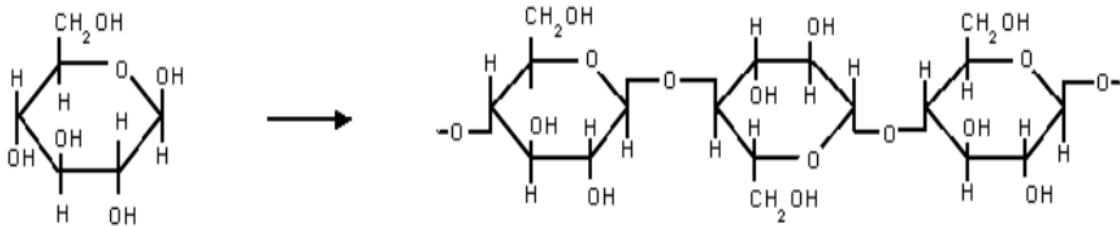
Entre os diversos tipos de classificação, os polímeros podem ser denominados homopolímeros, quando formados de um único monômero, e copolímeros ou heteropolímeros, formados por mais de um tipo monômero. Os copolímeros podem ser alternados, aleatórios, ou em blocos (SINKO, 2008). No caso dos copolímeros alternados, dois tipos de polímeros se alternam sistematicamente. Para os copolímeros aleatórios os meros seguem uma seqüência aleatória dentro da cadeia. Já os copolímeros em bloco apresentam seqüências longas de um mesmo mero, alternando com seqüências de outro mero (SINKO, 2008). A quitosana é um copolímero aleatório, cujas unidades monoméricas são a glicosamina e acetilglicosamina.

3.5 CELULOSE

A celulose $(C_6H_{10}O_5)_n$ é um polímero polissacarídeo de cadeia longa, monomérico, composto por glicose. A estrutura da celulose é formada pela união de moléculas de β -glicose através de ligações β -1,4-glicosídicas. A celulose possui peso molecular variável, com um valor mínimo de $n=200$ (tipicamente 300 a 700 g/mol, podendo passar de 7000 g/mol) (NISHIYAMA, 2002). A Figura 12 ilustra a molécula de glicose e celulose

A celulose é o mais abundante biopolímero da natureza e de grande importância na economia global (ALMEIDA,2013). A celulose é de grande interesse devido à sua abundância na natureza e biodegradabilidade, sendo usada em diversas aplicações. (MORGADO, 2011).

Figura 12 - Molécula da glicose e celulose



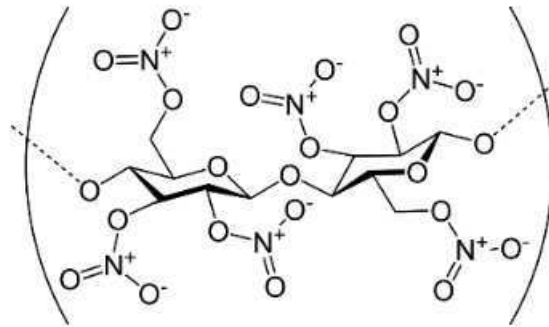
Fonte: NISHIYAMA, 2002

Em 1984, foi desenvolvido processo industrial de celulose bacteriana. A membrana resultante desta síntese, após o processamento, é dotada de permeabilidade seletiva, permitindo a passagem de vapor de água, mas impedindo a passagem de microorganismos. É homogênea, com espessura média de 0,05mm e não contém adesivos ou aditivos. É constituída basicamente por celulose, substância inerte, resistente e insolúvel em todos os solventes orgânicos. Além disso, possui características físicas específicas, tais como: permeabilidade definida a líquidos e gases, resistência à tração e alongamento e peso e estrutura molecular característico e estável. A membrana de celulose vem sendo testada nas mais variadas áreas desde a utilização como pele artificial até em indústrias para confecção de coletes a prova de projéteis de arma de fogo, telas para computadores e papel para preservação de documentos históricos (AMORIM, 2009).

3.6 NITROCELULOSE

Quando a celulose é exposta à mistura de Ácido Sulfúrico com Ácido Nítrico ela ganha átomos de Nitrogênio (N), passando a ser chamada de nitrocelulose. A principal matéria – prima para a produção de nitrocelulose é a celulose, retirada principalmente da madeira e do linter de algodão. Cada monômero da celulose possui uma hidroxila primária, mais reativa, e duas secundárias. Estas funções são responsáveis por reagirem com o ácido nítrico e formarem, posteriormente, a nitrocelulose. Tal processo se dá pela imersão da matéria – prima em uma solução sulfonítrica (mistura de ácido nítrico e ácido sulfúrico). Na reação, o hidrogênio do grupo hidroxila é substituído pelo -NO₂ (do ácido nítrico através de uma reação do tipo esterificação de forma parcial (WORDEN, 2012)). A Figura 13 ilustra a Estrutura da Nitrocelulose.

Figura 13 - Estrutura da Nitrocelulose



Fonte: WORDEN, 2012

O processo de fabricação consiste na purificação do linter bruto para obtenção de celulose; nitração da celulose com mistura sulfonítrica; estabilização e extração de ácido residual, ocluso nas fibras da nitrocelulose, através da fervura (WORDEN, 2012).

A nitrocelulose apresenta como características ampla solubilidade em solventes orgânicos, compatibilidade com diferentes resinas e plastificantes, filmes transparentes e incolores, inodora e atóxica, fácil de ser processada, eliminação rápida de solventes na aplicação, Secagem rápida, baixa retenção de solventes residuais, preço competitivo, Disponibilidade em diversas viscosidades, solubilidade em álcool (para baixas concentrações de nitrogênio). A nitrocelulose é classificada em três tipos: a piroxilina (pyroxylin), a pirocelulose (pyrocellulose) e o algodão pólvora (guncotton). Esses três tipos são diferenciados quanto à solubilidade e os valores da viscosidade da solução (WORDEN, 2012).

3.7 QUITOSANA

A quitosana é um biopolímero que pode ser utilizado em diversos campos como engenharia, biotecnologia, ciências farmacêuticas e medicina. Como biopolímero entende-se um conjunto de materiais poliméricos produzidos por sistemas biológicos como microrganismos, plantas e animais e polímeros que são sintetizados quimicamente, mas que são derivados de materiais biológicos iniciais, como aminoácidos, açúcares, gorduras naturais ou óleos (U.S.CONGRESS, 1993). Ela é obtida da transformação da estrutura química, desacetilação da quitina, um

polímero encontrado em carapaças de artrópodes, principalmente os crustáceos. É usada como meio complexante de íons metálicos, para a confecção de matrizes de liberação controlada de fármacos, produção de filmes com diversas aplicações. A cadeia polimérica da quitosana é do tipo ramificada e para determinadas aplicações ela tem sido reticulada por agentes reticulantes e ainda pode ser semi-cristalina ou cristalina dependendo do estado físico, do tratamento do polímero durante a extração e da origem (LIMA, 2010).

A Quitina é o segundo polímero mais abundante da natureza, depois da celulose, sendo o constituinte principal das carapaças dos artrópodes, dentre os quais se destacam os crustáceos (caranguejos, camarões, lagostas e siris) e encontrado em menor quantidade em outras espécies animais. É, também, o constituinte principal das paredes celulares nos fungos (FRAGA et al. 2006).

A quitina e a quitosana passaram a ser utilizadas na área biomédica pelo fato de possuírem características técnicas econômicas importantes e por apresentarem propriedades biológicas como atoxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade além de serem oriundos de fontes naturais renováveis. A quitina e a quitosana podem ser empregadas como biomateriais sob a forma de biofilmes de recobrimento (membranas), soluções coloidais ou esponjas, no tratamento de ferimentos ou queimaduras, como carreadores de fármacos e outras moléculas e apresentam várias utilizações na agricultura e na indústria de alimentos (DALLAN, 2005; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

A quitina é um polímero constituído por uma seqüência linear de açúcares monoméricos β -(1-4) 2-acetamido-2-desoxi-D-glicose (N-acetilglicosamina) possuindo, assim, estrutura semelhante à das fibras de celulose. A diferença estrutural entre estas duas fibras se deve aos grupos hidroxila, localizados na posição dois, que na quitina foram substituídos por grupos acetamino, sendo a mais abundante fibra de ocorrência natural depois da celulose (GIL; FERREIRA, 2006).

A quitosana é obtida pela desacetilação da quitina, mais especificamente do carbono 2 do segundo monômero. Desta forma, quanto à estrutura química, a principal diferença entre a quitina e a quitosana diz respeito à presença do radical acetato, ligado ao radical amino, no carbono 2 que compõe o anel principal da estrutura (CAMPANA FILHO et al., 2007; KUMAR, 2000).

O processo de desacetilação consiste na remoção da maioria dos radicais acetilas da estrutura e substituição dos mesmos por um átomo de hidrogênio,

resultando em um radical amina. Então, os polímeros desacetilados, com grau de desacetilação acima de 50%, podem ser considerados quitosana. Outros autores consideram que o termo quitosana refere-se a um grande número de polímeros com diferentes graus de desacetilação (40-98%) e massas molares (50.000-2.000.000 Da) e que estas são as características mais importantes na determinação de suas propriedades físico-químicas e de suas propriedades biológicas (HEJAZI, AMIJI, 2003).

A quitosana é um copolímero de 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose e 2-acetomido-2-deoxi-D-glicopiranosose unidos alternadamente por ligações glicosídicas $\beta(1-4)$ de composição variável em função do grau médio de acetilação (GA), que representa a fração de unidades 2-acetomido-2-glicopiranosose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose e é um dos principais parâmetros para a sua caracterização. A proporção relativa dessas unidades nas cadeias macromoleculares de quitosana tem efeito marcante na sua solubilidade. Em pH ácido, a quitosana comporta-se como um polieletrólito catiônico insolúvel em água, porém torna-se solúvel em soluções aquosas de ácidos orgânicos. Trata-se de um polímero natural muito versátil originado do exoesqueleto de crustáceos. É um copolímero de quantidades variáveis de monômeros com unidades estruturais de N-acetil ligados covalentemente com N-glucosamina (SEVERINO et al, 2007).

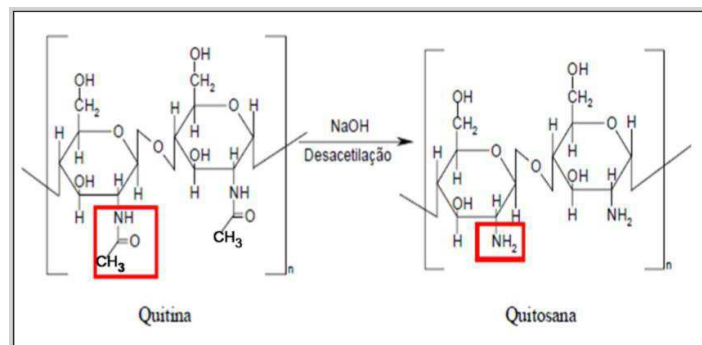
Durante o processamento a quitosana se comporta como um pseudoplástico e sua viscosidade pode ser adaptada pelo controle dos tipos e concentrações de reagentes, acidez do ambiente, tempo e temperatura empregados. Do peso molecular também dependem propriedades como viscosidade, solubilidade, elasticidade. A viscosidade determina a resistência do produto (BANSAL et al, 2011).

Devido as suas propriedades de bioabsorção ela pode adsorver moléculas como drogas rapidamente tornando possível seu uso em procedimentos odontológicos, ortopédicos e oftalmológicos (BANSAL et al, 2011)

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. 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 desacetilação da quitina pode ser realizada por processos químicos ou enzimáticos, porém esses últimos não são empregados em escala industrial, devido aos custos elevados de extração das desacetilases bem como de sua baixa produtividade. Nos processos químicos da desacetilação geralmente a quitina é suspensa em soluções aquosas concentradas de NaOH ou KOH (40 – 60%) por tempo variável (0,5 – 24h) e a temperaturas relativamente elevadas (50 – 130oC). As características da quitosana obtida são determinadas pela concentração da solução alcalina e razão quitina/solução alcalina, tamanho das partículas de quitina, temperatura, tempo e atmosfera de reação (CAMPANA FILHO et. al., 2007). A Figura 14 ilustra a molécula de Quitina e Quitosana.

Figura 14 - Molécula de Quitina e Quitosana.



Fonte: CAMPANA FILHO et. al.(2007).

Segundo Lourenço (2006), a quitosana apresenta propriedades interessantes para a utilização na área farmacêutica, pois, comparada a muitos outros polímeros naturais, ela tem a vantagem de possuir carga positiva em pH ácido, o que confere à mesma, propriedade de mucoadesividade.

Quando polímeros são aquecidos a temperaturas mais elevadas, várias mudanças físico-químicas podem ocorrer como a formação de gases, líquidos e mudanças de coloração. A degradação térmica é uma reação que envolve a ruptura das ligações das cadeias principais e secundárias. A habilidade do polímero em resistir à decomposição química causada pelo aquecimento a altas temperaturas é chamada de estabilidade térmica. Um dos fatores determinantes da estabilidade térmica do polímero é a energia das ligações da cadeia principal. A ligação C-C é uma das mais resistentes à degradação térmica. A presença de átomos de hidrogênio na molécula do polímero diminui a energia entre a ligação C-C, motivo

pelo qual os hidrocarbonetos com elevada massa molecular e seus derivados possuem comparativamente baixa estabilidade sendo facilmente degradados com o aquecimento a temperaturas mais elevadas. A quitosana, quando aquecida a temperaturas mais elevadas sofre degradação. A enzima responsável pela degradação da quitosana, a lisozima, está presente em tecidos, órgãos e fluidos corporais de mamíferos e os produtos da degradação enzimática da quitosana são oligômeros de n-acetil-D-glicosamina, que, além de apresentarem propriedades cicatrizantes e antimicrobianas, são totalmente absorvidos pelo organismo. Dessa forma, a quitosana tem atraído a atenção devido a sua decomposição por enzimas e por apresentar produtos de degradação não tóxicos (DAMIAN et. al., 2005).

Por tratar-se de um polímero catiônico, em condições de pH neutro e alcalino, apresenta grupamentos amino livres sendo, desta forma, insolúvel em água, em solventes orgânicos e em bases, mas é solúvel na maioria das soluções de ácidos orgânicos com pH inferior a 6, pois em pH ácido os grupamentos amino podem ser protonados (NH_3^+), tornando o polissacarídeo solúvel. O ácido acético e o fórmico são os mais usados para a solubilização da quitosana. Alguns ácidos inorgânicos diluídos, tais como: ácido nítrico, clorídrico, perclórico e fosfórico, também podem ser usados para preparar uma dispersão da quitosana, mas somente após prolongada agitação e aquecimento. Misturas como dimetilformamida com tetróxido de dinitrogênio numa proporção de 3:1 também podem ser utilizados como solventes. A estrutura D-glicosamina do polissacarídeo quitosana é rígida e hidrofílica. Apresenta muitos grupos reativos para ativação química e reticulação e é capaz de formar sais com ácidos orgânicos e inorgânicos. Apresenta propriedades quelantes e condutividade iônica. Agentes reticulantes, tais como glutaraldeído, etilenoglicol diglicidil éter, tripolifosfato, ácido sulfúrico e epicloriglina, são usados para aumentar a estabilidade química e a resistência mecânica da quitosana. A quitosana apresenta grupos funcionais potencialmente reativos como grupamentos amina ($-\text{NH}_2$), vários grupos hidroxilas primários e secundários nas posições C-2, C-3 e C-6 que, por sua vez, apresentam forte afinidade com a água. Modificações feitas nestes grupamentos produzem diferentes materiais que podem ser utilizados em diversas aplicações. O biopolímero quitosana apresenta uma carga positiva por resíduo glicosamina, dessa forma interage com moléculas de carga negativas e tem propriedade de adsorção. Apresenta habilidade formadora de filme; pode ser usado como material para isolamento de biomoléculas (CRINI; BADOT, 2007).

Possui atividade antimicrobiana que pode ser explicada por três mecanismos: 1) A interação superficial iônica entre a quitosana e o microorganismo resulta em vazamento de eletrólitos e outros constituintes protéicos de baixa massa molar pela parede celular; 2) A penetração da quitosana dentro do núcleo dos microorganismos inibe a síntese de RNA e proteínas e 3) A formação de uma barreira externa provoca a diminuição de nutrientes essenciais para o crescimento microbiano. A massa molar e o grau de acetilação são importantes fatores na determinação da atividade antimicrobiana da quitosana. Quanto mais baixa a massa molar e menor o grau de acetilação mais eficiente será essa atividade na redução do crescimento e multiplicação do microorganismo (DAMIAN et. al, 2005).

Possui ainda efeito coagulante, efeito analgésico, aceleração da cicatrização, efeito hipocolesterolêmico e hipolipidêmico devido à sua capacidade de se ligar aos lipídeos da dieta, interferindo na absorção intestinal dessas gorduras (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LOCAL DA PESQUISA

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Desenvolvimento e Avaliação de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO), na Universidade Federal de Campina Grande–UFCG/UAEMa.

4.2 MATERIAIS

- Quitosana de baixo peso molecular (Sigma Aldrich);
- Tiras de nitrocelulose utilizados em kits de diagnóstico de dois fabricantes;
- Ácido Acético PA (VETEC);
- Hidróxido de Sódio PA (VETEC).

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Preparação dos Scalfolds de Quitosana

Foi preparada uma solução de quitosana a 1% a qual foi e filtrada para remover a parte insolúvel, vertida 10 mL de quitosana em placa do tipo Petri e submetida ao processo de congelamento por Bio Freezer na temperatura de -5 °C por um período de 24h.

Após o processo de congelamento, as amostras foram liofilizadas por 48h na temperatura de -5 °C para remoção dos cristais de gelo pelo método de sublimação.

Terminado o processo de liofilização, os scalfolds foram neutralizados com solução de hidróxido de sódio 1 mol/L por um período de 1h. Lavou-se com água destilada para retirada do excesso de hidróxido de sódio, aferiu-se o pH, congelou-se novamente e liofilizou-se. Posteriormente os scalfolds foram secos em temperatura ambiente e submetidos às caracterizações.

4.3.2 Obtenção das tiras de diagnóstico de nitrocelulose

As tiras de nitrocelulose utilizadas em teste de diagnóstico rápido registradas na Anvisa foram obtidas em farmácia. Após a obtenção, as amostras de tiras de nitrocelulose foram selecionadas aleatoriamente e enviadas para realização das mesmas caracterizações realizadas nos scaffolds de quitosana.

4.4 CARACTERIZAÇÕES

4.4.1 Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) / Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDS)

O MEV/EDS foi realizado em um equipamento da marca PHENOM, modelo MEV PROX, do fabricante PHENOM WORD, com um aumento máximo de 40000x, profundidade de foco 1mm, resolução de 30nm, tensão de 5, 10 e 15 KV, baixo vácuo e pressão variada (1 a 270 Pa), sem recobrimento metálico. O MEV foi acoplado ao sistema de EDS (Energy Dispersive System), o qual possibilitou a determinação da composição qualitativa e semiquantitativa das amostras, a partir da emissão de raios X característicos.

Para realização das análises de microscopia eletrônica de varredura foram utilizadas amostras de 2 mm x 0,5 mm. As imagens foram obtidas nos aumentos de 100x e 1000x.

Para a identificação química do material foi utilizado um equipamento da marca PHENOM, modelo MEV PROX, acoplado com sistema para micro análise químico por Espectroscopia de Energia Dispersiva.

A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura possui uma elevada resolução que é aliada a uma adequada profundidade de campo, podendo produzir imagens de grande relevo geométrico da superfície da amostra.

Na microscopia eletrônica de varredura o feixe de elétrons é rastreado pela superfície da amostra e a imagem é produzida pela coleta dos elétrons secundários emitidos pela superfície excitada por um cintilador. Este ensaio foi realizado com a finalidade de observar a morfologia todas as amostras ensaiadas nesta pesquisa e compará-las.

Já a técnica de Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X, é um dos mais importantes instrumentos para a análise química de materiais orgânicos e inorgânicos. Este tipo de análise usa um material semicondutor para detectar os raios-X, e um analisador multicanal e converte a energia de raios-X em uma contagem eletrônica. A partir do valor acumulado destas contagens é criado um espectro que representa a análise química da amostra. Desta forma este ensaio foi realizado com o objetivo de analisar, quantitativamente os elementos químicos presentes nas amostras estudadas.

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

As análises utilizando a técnica de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das amostras foram realizadas em temperatura ambiente e o equipamento utilizado foi um Spectrum 400 da Perkin Elmer. A técnica FTIR foi usada para identificar as bandas características dos grupos funcionais presentes nas amostras estudadas nesta pesquisa, utilizando a faixa de varredura de 4000 a 600 cm^{-1} . As tiras de carreamento (denominadas A e B) de nitrocelulose adquiridas no mercado brasileiro foram analisadas por FTIR para identificação das bandas características dos grupos funcionais presentes nas amostras. A identificação dos grupos funcionais se mostra importante para determinação do grau de hidrofobicidade do material estudado nesta pesquisa

4.4.3 Molhabilidade por Medidas de Ângulo de Contato

A técnica consiste no cálculo da tensão superficial da membrana baseada na análise do formato da gota. O ângulo de molhabilidade entre a gota de água destilada com tensão superficial conhecida e a superfície sólida depende da relação entre as forças adesivas, que fariam a gota espalhar-se sobre a superfície. Na realização desta análise foi utilizado um goniômetro desenvolvido por técnicos da Unidade Acadêmica de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG.

Por meio de medidas de ângulo de contato (θ) entre o substrato e água pôde-se avaliar a hidrofiliicidade da superfície das amostras.

4.4.4 Ensaio de Intumescimento

Este ensaio foi realizado em PBS. Triplicatas do material analisado, seco, inicialmente pesado, foram colocadas em imersão em solução de PBS. A medida de massa foi feita a cada intervalo de tempo e o ensaio foi realizado até a amostra obter massa constante. O grau de intumescimento foi calculado pela equação 1.

$$\% I = \left[\frac{m_f - m_i}{m_i} \right] \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

Onde: m_i = massa inicial

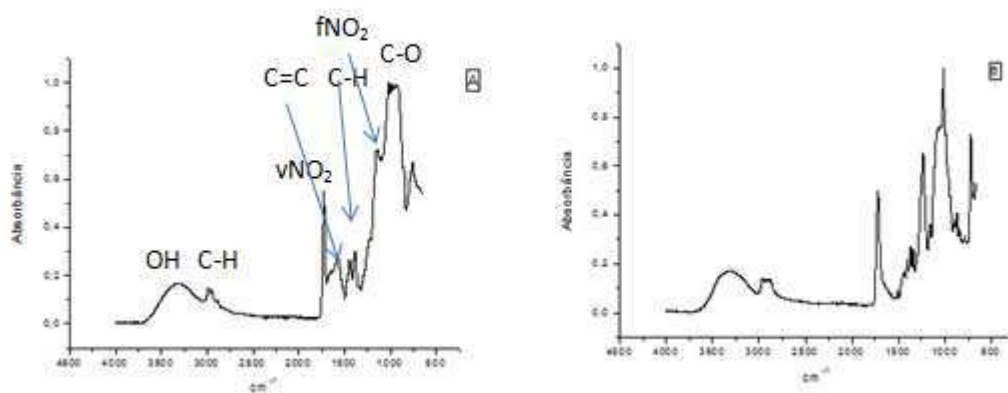
m_f = massa intumescida

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).

A Figura 15 ilustra os espectros das tiras de nitrocelulose.

Figura 15 - Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) das tiras de nitrocelulose (amostras A e B).

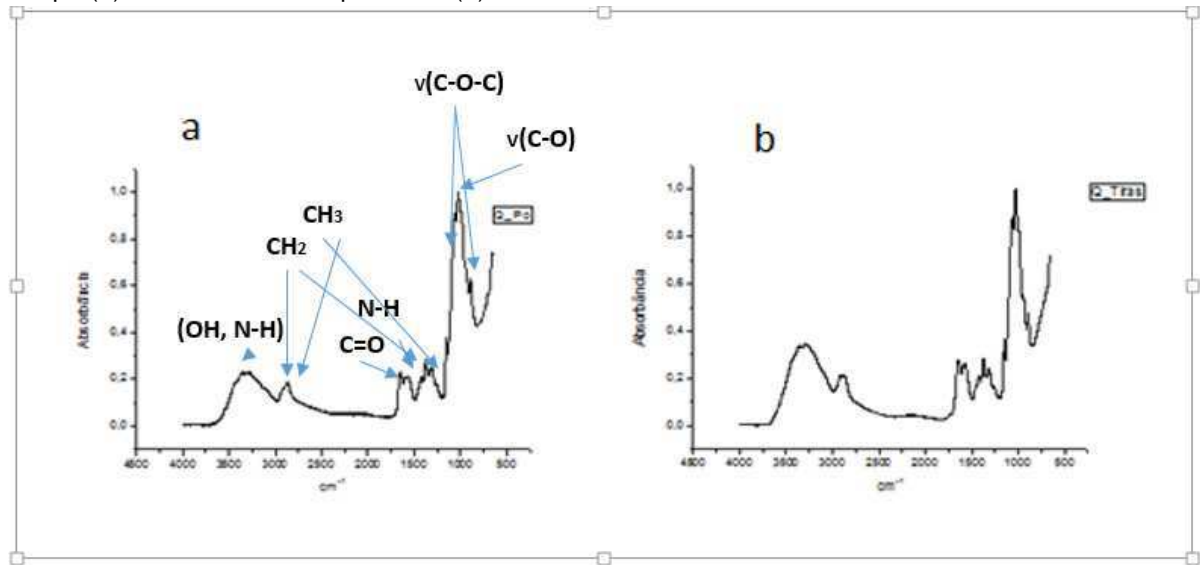


Fonte: Própria

O espectro de FTIR para a nitrocelulose mostra a banda do grupamento OH em torno de 3440 cm^{-1} , a vibração do grupo NO_2 em 1643 cm^{-1} , a flexão do grupo NO_2 em 1274 cm^{-1} . Os picos em torno de 1643 e 1274 cm^{-1} são característicos de nitrocelulose corroborando com a pesquisa de SUDE, et.al., (2012).

As amostras de quitosana em pó e em forma de scaffolds foram analisados por FTIR para comparação com os resultados obtidos nas tiras de nitrocelulose e os espectros de infravermelho obtido estão apresentados na Figura 16.

Figura 16 - Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier da Quitosana em pó (a) e do scaffold de quitosana (b).



Fonte: Própria

Nos dois espectrogramas não são observadas alterações e ambos apresentam todos os picos característicos da quitosana e corrobora com a literatura. Segundo Wang, Du, Liu (2004) e Fidèles (2010) espectros entre 3400 a 3500 cm^{-1} são atribuídos a vibrações de estiramentos dos grupos funcionais O-H e/ ou N-H, assim como as ligações de hidrogênio intermoleculares das cadeias do polissacarídeo. As bandas em 2918 cm^{-1} (menor intensidade) e 2880 cm^{-1} (maior intensidade) são atribuídas às vibrações de estiramento do grupo C-H assimétrico e simétrico, respectivamente. Além disso, uma banda característica da deformação angular do CH_2 aparece na região de 1407 cm^{-1} . As bandas a 1643 cm^{-1} e 1553 cm^{-1} correspondem ao modo de vibração por estiramento da ligação C=O e à deformação da ligação N-H, respectivamente. A existência dessas duas bandas (C=O e N-H), conjuntamente indica a presença de grupos amidas (AROF; OSMAN, 2003), da mesma forma, a banda na região de 1378 cm^{-1} é característica da vibração de deformação angular simétrica dos grupos metil (CH_3) do grupo acetamido (KOLHE, KANNAN, 2003; TORRES et al., 2005), dados que confirmam que a quitosana utilizada naquele estudo era um produto parcialmente desacetilado (SIONKOWSKA et al., 2004). As bandas de absorção na região de 1152 e 895 cm^{-1} (estiramento de ligações C-O-C), 1057 e 1027 cm^{-1} (vibrações de estiramento do grupo C-O) são características da estrutura sacarídica da quitosana (MINCHEVA et. al, 2004). As

frequências vibracionais das bandas e suas atribuições estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1 - Atribuições das frequências vibracionais observadas no espectro de FTIR da quitosana.

Atribuições	Frequências vibracionais (cm⁻¹)
OH, N-H	3331
CH ₂	2918
CH ₃	2880
C=O	1643
N-H(Amidas)	1553
CH ₂	1407
CH ₃	1378
ν(C-O-C)	1152
ν(C-O)	1057
ν(C-O)	1027
ν(C-O-C)	895

Fonte: HOLANDA, 2010

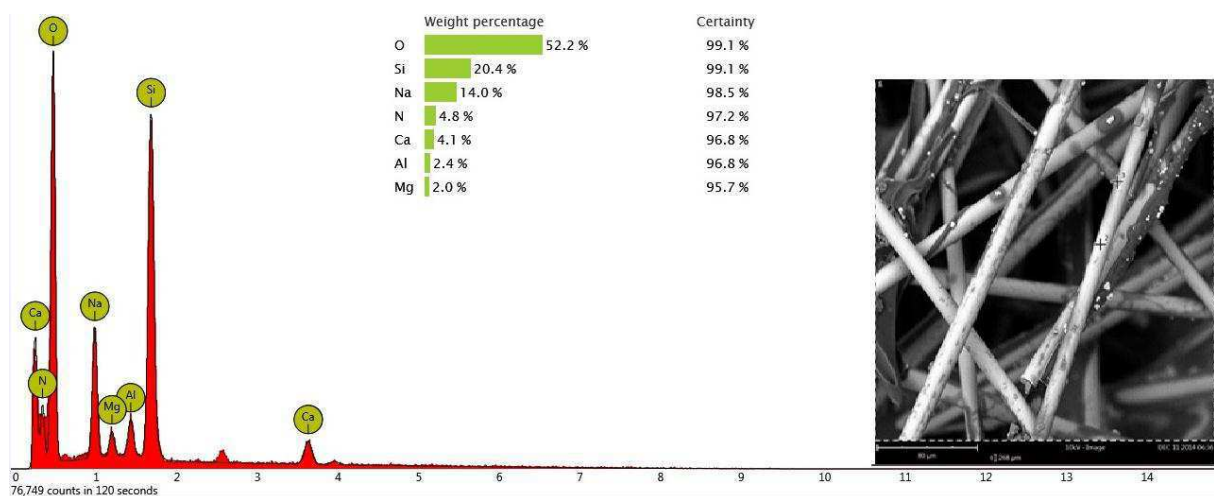
O espectro de infravermelho obtido do scaffold de quitosana é apresentado na Figura 16, onde se observa picos de absorção muitos semelhantes aos encontrados na amostra de quitosana em pó. Não foi visualizada diferença de grupos funcionais indicando que o processo de neutralização da quitosana foi eficaz.

Os espectros encontrados para as tiras de nitrocelulose e para a quitosana mostram a presença de grupos funcionais compatíveis com a característica de hidrofiliabilidade necessária aos dois produtos.

5.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) / ESPECTROSCOPIA POR ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS X (EDS)

A Figura 17 ilustra a micrografia da tira de nitrocelulose (A) e seu respectivo EDS.

Figura 17 - MEV/EDS das tiras de nitrocelulose da amostra A



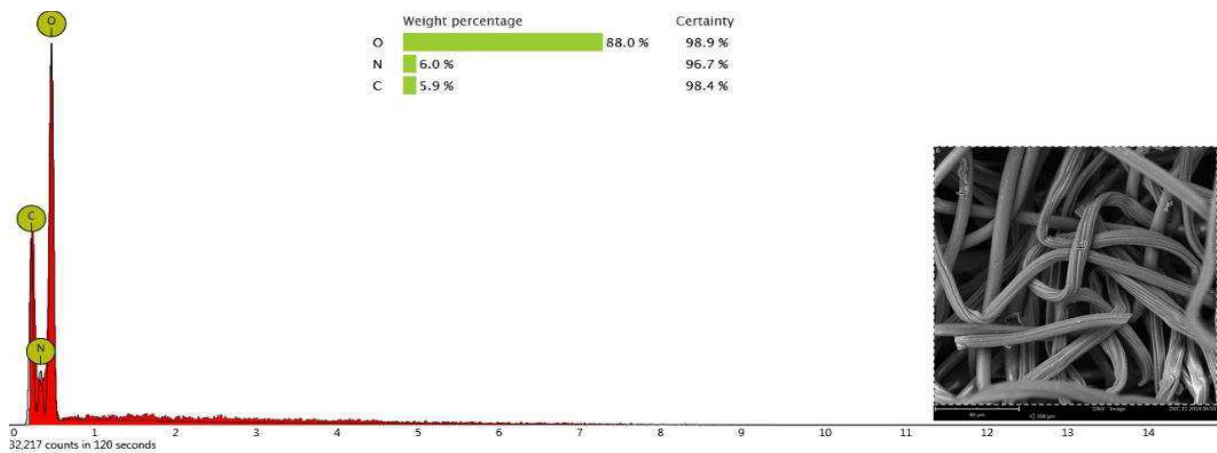
Fonte: Própria

Na micrografia da Figura 17 é possível observar uma estrutura com presença de fibras entrecruzadas de diâmetro uniforme com aspectos de palitos sem dobras e que origina poros interconectados. Verificam-se nas superfícies das fibras partículas brancas de tamanho e forma variados que possivelmente seja carga inorgânica que são utilizadas para aumentar o perfil hidrofílico do material. Este fato é justificado pelo resultado de EDS, onde foram encontrados elementos químicos como Si, Al, Ca, Na e Mg. Foi encontrando também, elementos químicos como O e N, elementos que compõe as fibras de nitrocelulose.

Na Figura 18 é observada a micrografia da tira de nitrocelulose (B) e seu respectivo EDS.

Na micrografia da Figura 18 observar-se estrutura parecida com o observado na Figura 17 com presença de fibras entrecruzadas de diâmetro uniforme, flexível e que origina poros interconectados. A superfície da fibra difere da observada nas amostras A e também não apresenta estruturas particulares o que corrobora com os elementos químicos encontrados no EDS. Sendo este material, aparentemente de composição química mais simples, que foram encontrados apenas O, C e N, elementos que compõe as fibras de nitrocelulose.

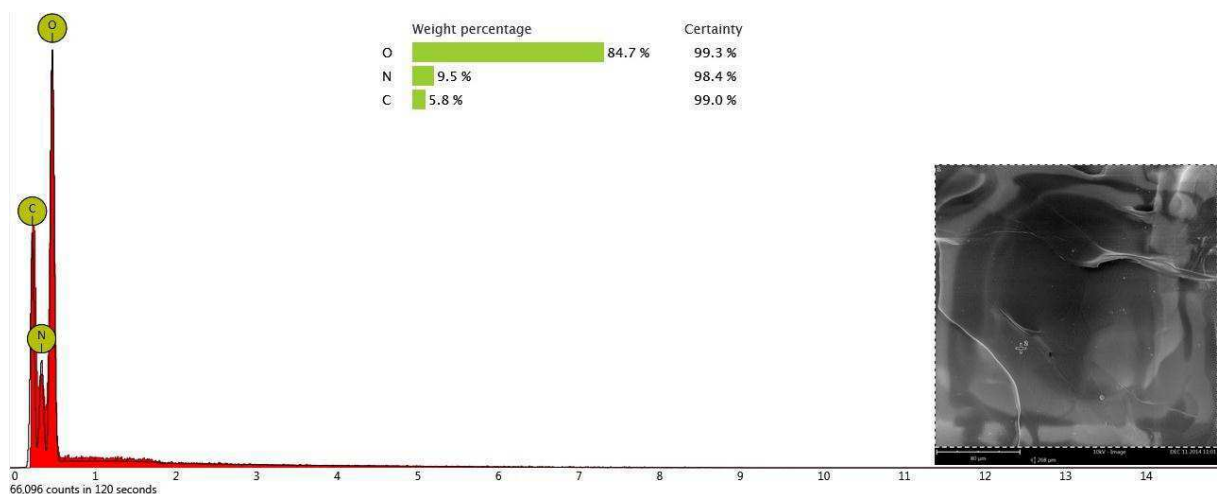
Figura 18 - MEV/EDS das tiras de nitrocelulose da amostra B



Fonte: Própria

Na Figura 19 observa-se a microfotografia do Scaffold de Quitosana com seu respectivo EDS.

Figura 19 - MEV e EDS do Scaffold de Quitosana



Fonte: Própria

Observa-se uma superfície uniforme, lisa e plana, aparentemente sem a presença de poros visíveis. Este aspecto pode estar relacionado a região avaliada da amostra estudada como também ao tamanho dos poros, pois os Scaffolds quando observados macroscopicamente verificou-se um material de aspecto esponjoso com presença de grande quantidade de poros. Já no EDS evidenciou-se a presença dos elementos C, O e N, típicos da composição química da quitosana.

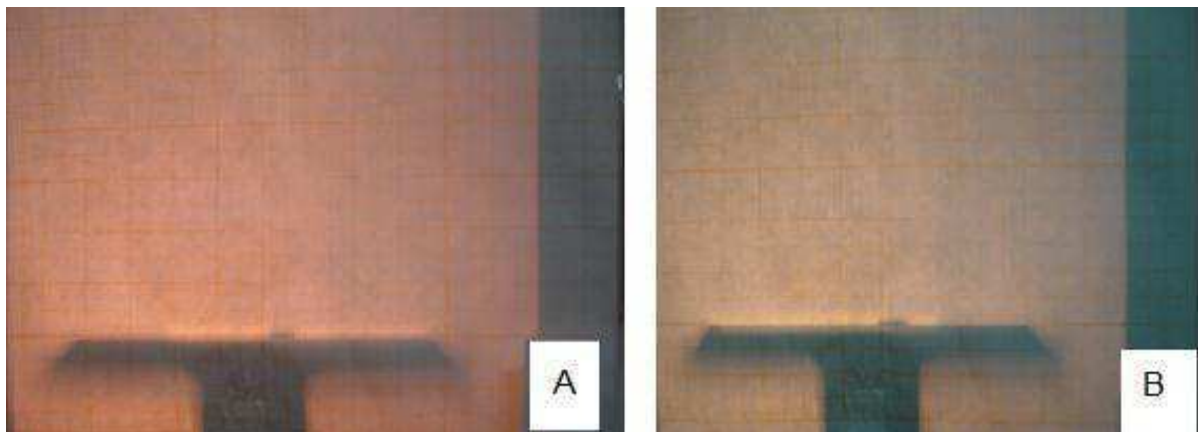
Pode-se dizer que o MEV e o EDS foram importantes para verificação de morfologia e composição química respectivamente de todas as amostras, pois verificou-se que a composição química das tiras é realmente de nitrocelulose como afirma o fabricante. No entanto observou-se algumas diferenças entre os dois fabricantes quanto a composição química das amostras que podem estar relacionadas ao segredo industrial. As informações de composição têm importância para compreensão do comportamento funcional dos produtos especialmente na sua capacidade de absorção e carreamento de líquidos.

5.3 MOLHABILIDADE

As tiras de carreamento de nitrocelulose adquiridas foram analisadas pela técnica da molhabilidade para avaliação da hidrofiliicidade da superfície das amostras. Para este ensaio foram utilizadas três amostras de cada scaffold e realizadas 5 medições em cada uma delas.

A Figura 20 ilustra o resultado da molhabilidade das tiras A e B de nitrocelulose.

Figura 20 - Molhabilidade das tiras de nitrocelulose amostras A e B.



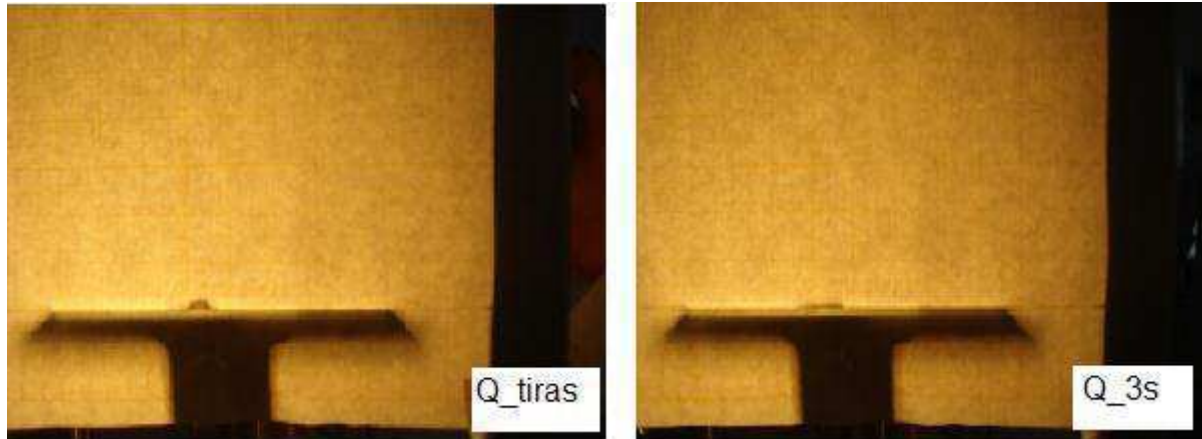
Fonte: Própria

Foram utilizadas três amostras de cada tipo de tira de nitrocelulose. As medidas de ângulo não foram realizadas devido a não formação da gota sobre as mesmas o que resultou no ângulo de contato igual a zero e conseqüentemente alta hidrofiliicidade e molhabilidade. De acordo com os resultados, verifica-se que as tiras não apresentaram formação de gota, o que indica hidrofiliicidade 100%. As tiras têm

a função de permitir a capilaridade das amostras (líquido biológico) com o analito a ser pesquisado, desta forma era esperado que elas fossem realmente hidrofílicas.

A Figura 21 ilustra o resultado da molhabilidade dos scaffolds de quitosana.

Figura 21 – Molhabilidade do scaffold de quitosana inicial e após 3 segundos.



Fonte: Própria

Os scaffolds de quitosana produzidos também foram analisados quanto a molhabilidade e observou-se que ocorreu a formação da gota na superfície do material (Figura 21) com ângulo de contato médio de 38%. No entanto, aproximadamente, após 3 segundos de contato, o líquido foi totalmente absorvido pelo scaffold, evidenciando uma alta hidrofiliabilidade, mas que, quando comparada as amostras de nitrocelulose pode afirmar que esta foi menor. Pelo fato de ter sido encontrados elementos como Ca, Si, Mg entre outros em uma das amostras de nitrocelulose e as conhecidas propriedades de absorção de líquidos dos elementos encontrados, pode-se acreditar que a adição de carga mineral nas amostras de quitosana poderá aumentar ainda mais a hidrofiliabilidade destes materiais.

Os resultados expressos na Figura 21 foram obtidos a partir da média dos ângulos de contato encontrados nas amostras. De acordo com os resultados, verifica-se que os scaffolds apresentaram uma medida de ângulo de contato menor que 90° , característica de material hidrofílico.

Os resultados da molhabilidade evidenciaram que a nitrocelulose possui 100% de hidrofiliabilidade o que justifica seu uso como a substância de escolha para confecção das tiras carreadoras. Já o material desenvolvido com quitosana demonstrou ter hidrofiliabilidade de 38% no tempo zero e 100% de hidrofiliabilidade após

3 segundos de contato conferindo-lhe um alto grau de hidrofiliçidade, caracterizando-a como possível material de escolha para tal finalidade.

5.4 ENSAIO DE INTUMESCIMENTO

As tiras de carregamento de nitrocelulose e os scalfolds foram analisados pela técnica de intumescimento para avaliação da capacidade de retenção de líquido. A Tabela 2 ilustra os resultados do grau de intumescimento e seus respectivos desvios padrão das tiras de nitrocelulose amostras A e B e do scalfold de quitosana.

Tabela 2 - Grau de Intumescimento

Amostra	Grau de Intumescimento (%)	Desvio Padrão (±)
A	1749	9
B	1619	117
Scalfolds	2258	104

Fonte própria

Nos resultados observados na Tabela 2, verifica-se que o grau de intumescimento da amostra scalfold de quitosana foi superior aos graus das amostras de tiras de nitrocelulose indicando maior absorção de água pela quitosana, pois quanto menor o grau de intumescimento menor a absorção de água pela amostra.

Tendo como base os resultados de molhabilidade e do grau de intumescimento pode-se inferir que a quitosana possui potencial para carreadores de líquidos. No entanto, esta capacidade de intumescimento também deve ser considerada quando a finalidade é carregamento dos líquidos. Ou seja, para que as tiras de quitosana sejam aptas na substituição das tiras de nitrocelulose deverá receber tratamento com a finalidade de aumentar sua hidrofiliçidade e limitar sua capacidade de intumescimento para que não ocorra a absorção e conseqüente expansão demasiada no momento do seu uso, pois o alto grau de intumescimento pode interferir no deslocamento do líquido.

6 CONCLUSÕES

Os ensaios de Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) mostraram a presença de grupos funcionais característicos da nitrocelulose como OH, C-H, NO₂, C=C, C-H e C-O e da quitosana os grupos O-H, CH₂, CH₃, C=O, N-H, CH₂, CH₃, (C-O-C) e (C-O).

A Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X foram importantes para verificação de morfologia e composição química elementar respectivamente. A amostra A de nitrocelulose é formada por elementos típicos como C, O e N e pelos elementos inorgânicos Si, Ca, Mg, Na e Al possivelmente adicionados para melhorar suas características de absorção e condução. A amostra B mostrou-se ser constituída apenas pelos elementos típicos C, O e N, mesmos elementos encontrados na quitosana.

As informações de composição elementar aliadas à análise das fórmulas estruturais e da morfologia evidenciada nas micrografias tiveram importância para compreensão do comportamento funcional dos produtos especialmente na sua capacidade de absorção e carreamento de líquidos.

Os resultados da molhabilidade evidenciaram que a nitrocelulose possui alta hidrofiliabilidade e que a quitosana também demonstrou-se hidrofílica, no entanto, em menor grau. Infere-se que a nitrocelulose e a quitosana possuem alto grau de molhabilidade o que indica serem materiais com potencial para utilização como carreador.

Este trabalho, portanto, abre uma perspectiva de estudo voltado para desenvolvimento de produtos à base de quitosana como material carreador com a finalidade de uso em dispositivos diagnóstico de testagem rápida, amplia o campo de utilização da quitosana, cria novas opções no desenvolvimento e produção de produtos diagnósticos e incentiva o desenvolvimento da tecnologia nacional.

REFERÊNCIAS

ACURCIO, F.A. et al. Análise de custo-efetividade dos imunossupressores utilizados no tratamento de manutenção do transplante renal em pacientes adultos no Brasil. *Cad. Saúde Pública* v.29 supl.1 Rio de Janeiro 2013.

ALLEN, J. *Electrogenerated Chemiluminescence*. Edited by Allen J. Bard, Marcel Dekker, Inc., 2004.

ALMEIDA, Denise M. et al . Propriedades físicas, químicas e de barreira em filme formados por blenda de celulose bacteriana e fécula de batata. *Polímeros*, São Carlos , v. 23, n. 4, 2013 .

AMORIM, Wander Lopes et al . Estudo experimental da resposta tecidual à presença de celulose produzida por *Acetobacter xylinum* no dorso nasal de coelhos. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.*, São Paulo , v. 75, n. 2, Apr. 2009 .

APPELLESSO, S. et al. Endothelial cells provide costimulatory signals to trigger both allogeneic adult and cord blood (naive) CD4+ T-cell proliferation. *Transplant Proc.* 2000;32(2):355-6.

AROF, A.K.; OSMAN, Z. FTIR studies of chitosan acetate based polymer electrolytes. *Electrochim. Acta*, v. 48, p.993-999, 2003.

ARMSTRONG, V. W. et al. Modified pentamer formation assay for measurement of tacrolimus and its active metabolites: comparison with liquid chromatography-tandem mass spectrometry and microparticle enzyme-linked immunoassay (MEIA-II). *Clin Chem*, v. 44, n. 12, p. 2516-23, 1998.

ASSIS, O.B.G. Alteração do caráter hidrofílico de filmes de quitosana por tratamento de plasma de HMDS. Embrapa Instrumentação Agropecuária, Rua XV de Novembro, 1452, 13560-970 São Carlos, SP – Brasil. *Quím. Nova*. vol.33 no.3 São Paulo 2010.

BANSAL, V, et al. Applications of Chitosan and Chitosan Derivatives in Drug Delivery. *Advances in Biological Research* 5 (1): 28-37, 2011 ISSN 1992-0067 © IDOSI Publications, 2011.

BATICH, C.; LEAMY, P. Biopolymers. In: KUTZ, M.(Ed.) Standard Handbook of Biomedical Engineering and Design. U.S.A.:Library of Congress Cataloging-in-publication Data, 2003, p.11.3-11.30.

BOTTINI, P.V. et al . Monitoramento dos níveis de ciclosporina em sangue total em transplantes renais. Rev. Assoc. Med. Bras., São Paulo , v. 44, n. 3, Sept. 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria SAS/MS no 221 de 01 de abril de 2002. Aprova o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas de medicamentos excepcionais e de alto custo no SUS. Diário Oficial da União 2002; 2 abril.

BURTIS, C. A. Tietz Textbook of Clinical Biochemistry and Molecular diagnostics. ed. (2012). USA: Elsevier Saunders. p. 393.

CAHILL, J. D. et al. Determination of pharmaceutical compounds in surface- and ground-water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. J. Chromat. A, 2004, 1-2, 171.

CALADO, A. Imunocromatografia e Dot-ELISA. <http://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/patologia/HELIOJOSEMONTASSIER/immunocromatografia-e-imunodot.pdf>. Acessado no dia 21 de agosto de 2014.

CAMPANA FILHO et al. Extração, estrutura e propriedades de α e β -quitina. Química Nova, v. 3, n. 3, p. 644-650, 2007.

CARROLL, D. I. et al. C. Anal. Chem. 1975, 47, 2369.

CAVALCANTI, M.P et al. Avanços Biotecnológicos para o Diagnóstico das Doenças Infecciosas e Parasitárias. Revista de Patologia Tropical. Vol. 37 (1): 1-14. jan.-abr. 2008.

CIOLA, R. Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho. ed. Edgard Blücher Ltda., São Paulo, 1998.

COLLINS, C. H. e GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: Collins, C. H. e Braga, G. L.; Introdução a Métodos Cromatográficos, 3. ed., Ed. UNICAMP, São Paulo, 1988, p 179 - 243.

CRINI, G.; BADOT, P. Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: a review of recent literature. *Progress in polymer science*, p. 1-49, 2007.

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

DAMIAN, C.; BEIRÃO, L.H.; FRANCISCO, A.; ESPÍRITO SANTO, M.L.P.; TEIXEIRA, E. Quitosana: Um Amino Polissacarídeo com Características Funcionais. *Alim. Nutri, Araraquara*, v.16, n. 2, p.195-205, 2005.

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.

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, 2005, 128 f.

FORSTER, R.J. et al. Electrogenenerated Chemiluminescence. *Annual Review of Analytical Chemistry* 2: (2009). 359–85. Bibcode:2009ARAC....2..359F. doi:10.1146/annurev-anchem-060908-155305. PMID 20636067.

FRAGA, A. F. et al. Ensaio de membranas de quitosana recobertas com hidroxiapatita: efeito da adição de hidróxido de sódio. In: Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2006, Foz do Iguaçu, Anais... Foz de Iguaçu : IPEN, 2006, p. 2715-2725.

GAN, S.D. and PATEL, K.R. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Investigative Dermatology* (2013) 133, e12. doi:10.1038/jid.2013.287

GARCIA, S.C. et al. Ciclosporina A e tacrolimus: uma revisão. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* vol.40 no.6 Rio de Janeiro Dec. 2004.

GIL, M. H.; FERREIRA, P. Polissacarídeos como biomateriais. *Química* 100, Jan-mar 2006.

GREGORINI, A.C. Doar Ou Não? Aspectos Envolvidos na Doação de Órgãos e Tecidos. 2010. 73 p. Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC. Criciúma.

HEJAZI, R.; AMIJI, M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. Journal of Controlled Release v. 89, 2003, p.151-165.

HEMMIL, I. Fluoroimmuno assays and Immunofluorometric Assays. Clinical Chemistry, Vol. 31, No. 3, 1985 359.

HOLANDA, A.L. Membranas de quitosana para uso em sistema de liberação controlada de insulina: síntese e caracterização. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos). – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia. Campina Grande, 2011, 113 f.

Instruções de Uso do Kit Reagente ADVIA Centaur Ciclosporina (CsA) da Siemens Healthcare Diagnósticos Ltda.

Instruções de Uso do Kit Reagente ARCHITECT Cyclosporine Reagent Kit / ARCHITECT Ciclosporina Kit Reagente da Abbott Laboratorios do Brasil Ltda.

Instruções de Uso do Kit Reagente AXSYM CICLOSPORINA REAGENTES da Abbott Laboratorios do Brasil Ltda.

Instruções de Uso do Kit Reagente CARTUCHO DE REAGENTE FLEX DE CICLOSPORINA (CSA) DIMENSION da Siemens Healthcare Diagnósticos Ltda.

Instruções de Uso do Kit Reagente de Ciclosporina de Faixa Extendida Dimension da Siemens Healthcare Diagnósticos Ltda.

Instruções de Uso do Kit Reagente Ciclosporina da Siemens Healthcare Diagnósticos Ltda.

Instruções de Uso do Kit Reagente CEDIA Cyclosporine PLUS Assay da Phadia Diagnósticos Ltda.

Instruções de Uso do Kit Reagente COBAS INTEGRA CSA II da Roche Diagnóstica Brasil Ltda.

Instruções de Uso do Kit Reagente Cyclosporine da Roche Diagnóstica Brasil Ltda.

Instruções de Uso do Kit Reagente MassTox immunosuppressants in whole blood da Biosys Ltda.

IUPAC Gold Book, http://mass-spec.lsu.edu/msterms/index.php/Category:Gold_Book_term. access on 10 Jul. 2014.

JOHNSTONE, M.J. A nursing perspective. Sydney, W. B. Saunders, Bailliére Tindall, 1994.

KAHAN, B. D. Individualization of cyclosporine therapy using pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. *Transplantation*, v. 40, n. 5, p. 457-76, 1985.

KAHAN, B. D. et al. Demographic factors affecting the pharmacokinetics of cyclosporine estimated by radioimmunoassay. *Transplantation*, v. 41, n. 4, p. 459-64, 1986.

KOLHE, P.; KANNAN, R. M. Improvement in ductility of chitosan through blending and copolymerization with PEG: FTIR investigation of molecular interactions. *Biomacromolecules*, v. 4, n.1, p.173-180, 2003.

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

LIMA, R.S.C. Desenvolvimento de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos: Quitosana / Insulina. 2010. 110 f.: il. col. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia. Campina Grande.

LOURENÇO, V.A. Desenvolvimento e avaliação de micropartículas de quitosana para veiculação de dimetilaminoetanol (DMAE) na pele. 2006. 118f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Rio Preto, 2006.

MACHADO E.L. et al. Fatores associados ao tempo de espera e ao acesso ao transplante renal em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, vol.28 no.12 Rio de Janeiro Dec. 2012.

MACHADO, J. M. et al. Desenvolvimento de teste imunocromatográfico para detecção de proteínas não estruturais da Dengue. *BBR - Biochemistry and*

Biotechnology Reports. Edição Especial, v. 2, n. 2, jun., p. 73-75, 2013. IV Jornada Acadêmica Internacional de Bioquímica e I Semana Científica de Biotecnologia.

MACRAE, R. HPLC in Food Analysis. Academic Press Inc., London, 1982, 341p.

MARIANI, M. et al. A competitive enzyme-linked immunosorbent assay for measuring the levels of serum antibody to Haemophilus influenzae type B. Clin Diagn Lab Immunol (1998) 5:667–74.

MARSHALL, A. G. et al. Biophysical Mass Spectrometry for Biopharmaceutical Process Development. Mass Spectrom. Rev., 1998, 17, 1.

MINCHEVA, R. et. al. Hydrogels from chitosan crosslinked with poly(ethyleneglycol) diacid as bone regeneration materials, e-Polymers, v.58, p.1-11, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. HIV: Estratégias para utilização de testes rápidos no Brasil. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Brasília 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Testes Rápidos: Considerações Gerais para Seu Uso com Ênfase na Indicação de Terapia Anti-Retroviral em Situações de Emergência. Unidade de Assistência, Unidade de Laboratório e Rede de Direitos Humanos da Coordenação Nacional de DST/Aids. Brasília, 2009. Disponível em <http://bvsmms.saude.gov.br/>

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual Técnico para o Diagnóstico da Infecção pelo HIV. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Brasília, 2013.

McMILLAN, M. A. Clinical pharmacokinetics of cyclosporin. Pharmac Ther, v. 42, n. 1, p. 135-56, 1989.

MORGADO, Daniella L. et al . Agregação de cadeias de acetatos de celulose em LiCl/DMAc: avaliação via viscosimetria. Polímeros, São Carlos , v. 21, n. 2, 2011.

MOURA, C. M. et al. Secagem de pasta de quitosana em camada delgada: avaliação do efeito da secagem sobre o grau de desacetilação e a massa molecular viscosimétrica. Publ. UEPG Exact Earth Sci., Agr. Sci. Eng., Ponta Grossa, 15 (2): 89-96, Ago. 2009.

NISHIYAMA, Y. et al. Crystal Structure and Hydrogen-Bonding System in Cellulose I β from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction. *J. Am. Chem. Soc* 2002. 124 (31): 9074–82.

RAMPAZZO, E. et al. Nanoparticles in metal complexes-based electrogenerated chemiluminescence for highly sensitive applications. *Coordination Chemistry Reviews* 256 (August 2012). (15-16): 1664–1681. doi:10.1016/j.ccr.2012.03.021.

RÊGO, M.O.S. et al. Estudo comparativo entre ensaios sorológicos utilizados no diagnóstico de hepatite C no laboratório central de saúde pública de Macapá – Amapá. *Ciência Equatorial*, Volume 3 - Número 1 - 1º Semestre 2013.

SANCHEZ, M.C.A. Testes sorológicos. In: FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. M. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. Cap. 2, p. 9-48.

SANDRI, G. et al. Chitosan-associated SLN: in vitro and ex vivo characterization of cyclosporine A loaded ophthalmic systems. *Journal of Microencapsulation*, 2010; 27(8): 735–746.

SEVERINO, P. et al. Uso tópico de quitosana em oftalmologia. *Rev. Bras. Farm.*, 88(4), 2007.

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

SINKO, P.J.(Org.) *Martin: físico-farmácia e Ciências Farmacêuticas*. 5ª ed. Artmed: São Paulo, 2008, 810p.

SIONKOWSKA, A.; WISNIEWSKI, M.; SKOPINSKA, J.; KENNEDY, C.J.; WESS, T.J. Molecular interactions in collagen and chitosan blends. *Biomaterials*, v. 25, p.795–801, 2004.

SCHÜTZ, E. et al. Cyclosporine whole blood immunoassays (AxSYM, CEDIA, and Emit): a critical overview of performance characteristics and comparison with HPLC. *Clin Chem*, v. 44, n. 10, p. 2158-64, 1998.

SNYDER, L. R. e KIRKLAND, J. J. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*., 2 ed., John Wiley e Sons, New York, 1979.

SUDE M, SONG G. FENGA N. Preparation and characterization of self-emulsified waterborne nitrocellulose. *Carbohydrate Polymers* 89 (2012) 36–40.

SUNG, E. et al. A Cost-effective system for the performing therapeutic drug assays. I. Optimization of the theophylline assay, *Clin. Chem.* 31, 1210-1215 (1985).

UNIVERSIA BRASIL. Diagnóstico por imunocromatografia. 2006.

U.S. CONGRESS. Biopolymers: Making Materials Nature's Way-Background Paper, OTA-BP-E-102 (Washington,DC: U.S. Government Printing Office, September 1993).

VERLEDEN, G. M. et al. Successful conversion from cyclosporine to tacrolimus for gastric motor dysfunction in a lung transplant recipient. *Transplantation*, v. 73, n. 12, p. 1974-6, 2002.

VALENTI, G. et al. Intense and Tunable Electrochemiluminescence of Corannulene. *J. Phys. Chem.* (October 2010). C 114 (45): 19467–19472. doi:10.1021/jp107964r.

VOGLER, I. H. Infecção pelo vírus da Hepatite C na população de Londrina e região norte do Paraná: aspectos soropidemiológicos e moleculares. Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2003.

WORDEN, E. C. Nitrocellulose Industry. Volume 2. D. 2012. Van Nostrand Company. pp. 726–727.

WANG, X.; DU, Y.; LIU. Preparation, characterization and antibacterial activity of chitosan-Zn complex, *Carbohyd. Polym.* v.56, p.21-26, 2004.

ZHANG, L. et al. Preparation and in vitro and in vivo characterization of cyclosporin A-loaded, PEGylated chitosan-modified, lipid-based nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. 2013.