

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas

Dissertação de Mestrado

"Estudo *in vitro* da liberação controlada de  
clorexidina, incorporada em filme de quitosana, para  
potencial aplicação na cavidade oral."

Autora: Carolina Emmanuelle Camargos Lins

Orientadora: Prof(a). Marivalda de Magalhães Pereira

Fevereiro/2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas

Carolina Emmanuelle Camargos Lins

ESTUDO *IN VITRO* DA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE  
CLOREXIDINA INCORPORADA EM FILME DE QUITOSANA, PARA  
POTENCIAL APLICAÇÃO NA CAVIDADE ORAL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em  
Engenharia Metalúrgica e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais

Área de concentração: Ciência e Engenharia de Materiais

Orientadora: Prof(a). Marivalda de Magalhães Pereira

Belo Horizonte  
Escola de Engenharia da UFMG  
2011

Aos meus pais Newton e Sandra,  
aos meus irmãos,  
à tia Ana Lúcia  
e ao Daniel.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por me ajudar a trilhar mais uma etapa da minha vida.

Aos meus pais pelo apoio e dedicação.

Aos meus irmãos, amigos e familiares pelo incentivo.

Ao Daniel pelo carinho e paciência.

A minha orientadora Marivalda de Magalhães Pereira pela oportunidade, ensinamentos e amizade.

Aos meus amigos do laboratório: Agda, Alexandra, Dickson, Elke, Luísa, Sandra, e amigos dos laboratórios vizinhos: Tadeu, Janaína, Joyce, Lívio e Mílvia pela ajuda e companheirismo.

À Karina e à professora Esperanza pela ajuda e disponibilidade em utilizar os equipamentos do seu laboratório.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro a minha formação.

Aos professores e funcionários do CPGEM que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS .....	4
2.1	Objetivo geral:.....	4
2.2	Objetivos específicos: .....	4
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3.1	Patologias da cavidade oral.....	5
3.1.1	Doença Periodontal .....	5
3.1.2	Halitose .....	8
3.1.3	Mucosites .....	12
3.2	Antimicrobianos .....	14
3.2.1	Clorexidina.....	16
3.3	Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos .....	18
3.4	Quitosana .....	26
3.5	Agente Reticulante .....	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	37
4.1	Materiais .....	37
4.2	Preparação dos filmes.....	37
4.3	Caracterização dos filmes .....	39
4.3.1	Avaliação qualitativa dos filmes .....	39
4.3.2	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho FT-IR (espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier).....	39
4.3.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Análise do Espectro de Energia Dispersiva (EDS) .....	39
4.4	Teste de liberação do agente antimicrobiano.....	40
4.5	Teste de Atividade Antimicrobiana .....	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1	Avaliação qualitativa dos filmes .....	44
5.2	Análise Estrutural dos Filmes .....	47
5.2.1	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho FT-IR (espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier).....	47

5.2.2	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS).....	53
5.3	Estudo da liberação .....	56
5.4	Teste de atividade antimicrobiana .....	62
5.4.1	<i>Candida albicans (C.a)</i> .....	62
5.4.2	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans (A.a)</i> .....	67
5.4.3	<i>Porphyromonas gingivalis (P.g)</i> .....	72
6	CONCLUSÕES .....	78
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 Estruturas de suporte e proteção do elemento dental .....	5
Figura 3.2 Estrutura do elemento dental (lado esquerdo: saudável, lado direito: presença de bolsa periodontal) .....	6
Figura 3.3 Estrutura química da Clorexidina.....	16
Figura 3.4 Perfis de liberação de fármacos em função do tempo: controlada versus convencional .....	19
Figura 3.5 Representação esquemática da liberação controlada de fármacos utilizando-se polímeros biodegradáveis .....	20
Figura 3.6 Eventos da liberação do fármaco em sistemas poliméricos .....	23
Figura 3.7 Estrutura química da quitosana .....	27
Figura 3.8 Estrutura molecular e tridimensional do glutaraldeído .....	35
Figura 4.1. Filmes de quitosana cortados para o teste de liberação .....	38
Figura 4.2 Distribuição das amostras na placa de <i>petri</i> .....	43
Figura 5.1 Membranas de quitosana .....	44
Figura 5.2. Fotografia das amostras após inserção no líquido de liberação nos tempos 5 minutos, 2 e 8 horas .....	46
Figura 5.3 Espectro FTIR do filme de quitosana com e sem reticulação .....	47
Figura 5.4 Espectro FTIR dos filmes reticulados de quitosana pura e com clorexidina 0,06%, 0,12% e 0,24% .....	51
Figura 5.5 Espectro FTIR da fase clara e da fase escura do filme não reticulado de quitosana com clorexidina 0,12% .....	52
Figura 5.6 Espectro FTIR - membrana tripla. Quitosana com clorexidina 0,12% reticulada em comparação com quitosana pura reticulada .....	52
Figura 5.7 MEV do filme quitosana sem reticulação .....	54

Figura 5.8 EDS dos filmes de quitosana sem reticulação .....	55
Figura 5.9 Curva de Calibração – Absorbância UV - vis em função da concentração de clorexidina .....	56
Figura 5.10 Concentrações de Cx no líquido de liberação não centrifugado, nos tempos 5 e 15 minutos, 1, 2, 24, 48 horas, e 7dias, a partir de filmes com concentração de Cx de 0,06%, 0,12% e 0,24% .....	57
Figura 5.11 Concentrações de Cx no líquido de liberação centrifugado, nos tempos 5 e 15 minutos, 1, 2, 24, 48 horas, e 7dias, a partir de filmes com concentração de Cx de 0,06%, 0,12% e 0,24% .....	58
Figura 5.12 Concentrações de Cx no líquido de liberação, centrifugado e não centrifugado, nos tempos 5 e 15 minutos, 1, 2, 4 e 8horas a partir dos filmes triplos com Cx 0,12%, reticulado e não reticulado .....	59
Figura 5.13 Concentrações de Cx no líquido de liberação, centrifugado e não centrifugado, nos tempos 5 e 15 minutos, 1, 2, 4 e 8horas a partir de filmes reticulados simples e triplos com Cx 0,12% .....	60
Figura 5.14 Concentrações de Cx no líquido de liberação, centrifugado e não centrifugado, nos tempos 5 e 15 minutos, 1, 2, 4 e 8 horas a partir de filmes reticulados simples e triplos com Cx 0,12% .....	61
Figura 5.15 Fotografia das placas com <i>C.a</i> após incubação por 24 horas .....	63
Figura 5.16 Comparação entre o tamanho dos halos formados para cada amostra com reticulação (CR) e sem reticulação (SR) após 24 horas para <i>C.a</i> .....	66
Figura 5.17 Comparação entre o tamanho dos halos formados para cada amostra (membrana tripla) com reticulação (CR) e sem reticulação (SR) e em relação às amostras simples para <i>C.a</i> .....	67
Figura 5.18 Fotografia das placas com <i>A.a</i> após incubação por 24 horas .....	68
Figura 5.19 Comparação entre o tamanho dos halos formados para cada amostra com reticulação (CR) e sem reticulação (SR) para <i>A.a</i> .....	70

Figura 5.20 Comparação entre o tamanho dos halos formados para cada amostra (membrana tripla) com reticulação (CR) e sem reticulação (SR) e em relação às amostras simples para <i>A.a</i> .....	72
Figura 5.21 Fotografia das placas com <i>P.g</i> após incubação por 24 horas .....	73
Figura 5.22 Comparação entre o tamanho dos halos formados para cada amostra com reticulação (CR) e sem reticulação (SR) para <i>P.g</i> .....	76
Figura 5.23 Comparação entre o tamanho dos halos formados para cada amostra (membrana tripla) com reticulação (CR) e sem reticulação (SR) e em relação às amostras simples para <i>P.g</i> .....	76

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 Distribuição das amostras nas placas de petri .....	42
Tabela 5.1 Espessura média dos filmes .....	45
Tabela 5.2 Números de onda e grupos característicos da quitosana .....	48
Tabela 5.3 Números de onda e grupos característicos da clorexidina .....	50
Tabela 5.4 Resultados dos diâmetros dos halos de acordo com cada grupo e amostra para <i>C.a</i> .....	64
Tabela 5.5 Resultados dos diâmetros dos halos de acordo com cada grupo e amostra para <i>A.a</i> .....	69
Tabela 5.6 Resultados dos diâmetros dos halos de acordo com cada grupo e amostra para <i>P.g</i> .....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS

*A.a* - *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Água DI - Água deionizada

ANOVA - análise de variância

BHI - Brain heart infusion

*C.a* - *Candida albicans*

COX-2 - Cicloxigenase

CR - Com reticulação

CSV - Compostos Sulfurados Voláteis

Cx - Clorexidina

DP - Doença periodontal

EDS - Espectroscopia de energia dispersiva

FT-IR - Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

GD - Grau de desacetilação

FIOCRUZ - Instituto Oswaldo Cruz

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

MT - Membrana tripla

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards

*P.g* - *Porphyromonas gingivalis*

PGE-2 - Prostaglandina E2

Qui - Solução de quitosana em ácido acético 2%

SLF - Sistema de Liberação de Fármaco

SLIBP - Sistemas de liberação de fármaco intrabolsa periodontal

SR - Sem reticulação

TN - Tratamentos necessários

ZnSe - Seleneto de zinco

## RESUMO

Uma das maiores dificuldades para o sucesso do tratamento de patologias na cavidade bucal é a diluição e a rápida eliminação dos fármacos devido principalmente à ação da saliva. Sendo assim, os dispositivos de liberação controlada de fármacos são importantes na tentativa de prolongar a sua retenção na cavidade bucal. O uso de sistemas bioadesivos podem também reduzir a frequência de aplicação e a quantidade de fármaco administrada, o que pode melhorar a adesão e aceitação do paciente, além de reduzir os efeitos adversos.

A quitosana é um polímero natural, biologicamente seguro e tem sido proposto para esta aplicação. Neste estudo, o digluconato de clorexidina foi utilizado, por ser amplamente usado na clínica odontológica, devido à sua atividade contra vários microrganismos.

O objetivo deste estudo foi formular um sistema polimérico a partir da quitosana, para a liberação controlada de clorexidina com potencial aplicação na cavidade oral. Os filmes de quitosana incorporados com diferentes concentrações de clorexidina, reticulados com glutaraldeído e não reticulados foram desenvolvidos, caracterizados e analisados *in vitro* para avaliar semi quantitativamente a liberação e a atividade antimicrobiana.

Na análise qualitativa dos filmes foi observado um alto grau de intumescimento nos filmes não reticulados acarretando um grande aumento de volume dos mesmos. Avaliando os espectros de FTIR foi verificada a presença da banda  $830-805\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde ao CH- ligado a anel aromático, característica da clorexidina. As imagens do MEV mostraram um filme na maior parte homogêneo, porém com alguns pontos mais claros, que a análise no EDS mostrou apresentar a mesma composição química do restante do filme, contudo com uma maior intensidade da banda do cloro.

No estudo foi detectada uma liberação da clorexidina durante 8 horas a partir da membrana tripla de quitosana reticulada e o teste de difusão em ágar mostrou que a clorexidina continuou ativa após sua incorporação ao filme de quitosana.

## ABSTRACT

One of the most difficulties for the successful treatment of pathologies in the oral cavity is the dilution and the fast elimination of drugs due mainly to the action of saliva. Thus, the devices for controlled release of drugs are important in trying to prolong their retention time in the oral cavity. The use of bioadhesive systems can also reduce the frequency of application and amount of drug administered, which may improve adherence and patient acceptance and reduce the adverse effects.

Chitosan is a natural polymer, biologically safe and has been proposed for this application. In this study, chlorhexidine gluconate was used because it is widely used in clinical dentistry, due to their activity against several microorganisms.

The purpose of this study was to formulate a system from the polymeric chitosan for controlled release of chlorhexidine with potential application in the oral cavity. The chitosan films incorporated with different concentrations of chlorhexidine, glutaraldehyde cross-linked and non-cross-linked were developed, characterized and analyzed in vitro to evaluate semi quantitatively the release and antimicrobial activity.

In qualitative analysis of films was observed a high degree of swelling in the non cross-linked causing a large increase in volume of them. Evaluating the FTIR spectra was verified the presence of the band  $830\text{-}805\text{ cm}^{-1}$ , which corresponds to the CH-bonded aromatic ring, feature of chlorhexidine. The SEM images showed a film mostly homogeneous, but with some light spots, which the EDS analysis shows the same chemical composition of the rest of the film, yet with a greater intensity of the band of chlorine.

In the study was detected a release of chlorhexidine for 8 hours from the cross-linked chitosan membrane. Triple and agar diffusion test showed that chlorhexidine remained active after its incorporation into the chitosan film.

## 1 INTRODUÇÃO

A eficácia dos tratamentos convencionais das doenças bucais muitas vezes é reduzida devido à retenção limitada das formulações aplicadas na cavidade oral. O fluxo salivar, o reflexo da deglutição, a mastigação e a fala podem efetuar a diluição ou deslocamento de uma forma farmacêutica e pode levar a um rápido declínio na concentração dos princípios ativos a níveis sub-terapêuticos. Deste modo, existe uma necessidade para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos que podem conferir uma melhor disponibilidade de componentes ativos permitindo simultaneamente a diminuição da frequência de administração e de dosagem (Kockisch, 2005).

A doença periodontal (DP) possui uma alta prevalência na população mundial. É causada pelo acúmulo de componentes microbianos do biofilme dental no interior das áreas subgengivais do periodonto, desencadeando processo inflamatório que afeta as estruturas de suporte dental, resultando em formação de bolsa periodontal e perda dos dentes. O tratamento convencional consiste de raspagem e alisamento radicular, associado ou não ao uso de antimicrobianos de ação sistêmica, o que implica altas doses, porém com eficácia reduzida, efeitos adversos e dificuldades de adesão ao tratamento por parte do paciente. Nas últimas décadas, o tratamento tem sido otimizado pelo uso de sistemas de liberação de fármaco intrabolsa periodontal, com a vantagem de liberar o fármaco no local de ação, possibilitando prolongar e/ou controlar sua concentração (Bruschi et al., 2006).

O termo “mau odor oral” ou “halitose” é usado para descrever o odor desagradável que emana da cavidade bucal, é motivo, assim como a cárie e a doença periodontal, de visitas ao dentista. Surpreendentemente, um problema de tal magnitude, com tamanha prioridade para o público, tem sido tradicionalmente negligenciado pelos cirurgiões-dentistas. A halitose constitui um problema de saúde pública em razão do grande número de pessoas atingidas e da dificuldade de diagnóstico devido a sua natureza multifatorial. A maioria dos casos de halitose origina-se na boca, como resultado do metabolismo microbiano, no qual compostos sulfurados voláteis são produzidos por bactérias gram-negativas anaeróbias (Calil et al., 2006; Tarzia, 2003). Apesar da alta prevalência da halitose, e de sua grande importância por corresponder a um distúrbio

que gera desconforto e embaraço psico-social nos acometidos, ainda existem poucos estudos que tratam sobre o tema, deixando muitas lacunas. Por tanto, faz-se necessário à realização de novas pesquisas buscando aprofundar o conhecimento sobre o assunto. Assim, seria interessante o desenvolvimento de dispositivos mucoadesivos de liberação controlada de fármacos para possível emprego no tratamento da halitose, pois atualmente os enxaguatórios bucais disponíveis no mercado tem efeitos de curta duração (Amaral, 2008).

Uma das complicações bucais mais comuns do tratamento oncológico na região da cabeça e pescoço é a mucosite oral, que pode levar a desconforto oral severo, ocasionando diminuição da qualidade de vida devido à dor, a distúrbios funcionais (como o comprometimento da mastigação, da deglutição e da fonação), a distúrbios do sono e à dificuldade de higienização. A mucosite oral aumenta o risco de infecções locais e sistêmicas, pois pode levar a formação de feridas na cavidade oral que se tornam porta de entrada para bactérias, podendo comprometer o estado geral do paciente, e levando a interrupção da radioterapia. O gluconato de clorexidina 0,12% é recomendado para a prevenção e tratamento da mucosite oral (Stone et al., 2005; Velez et al., 2004). Portanto, a utilização de membranas mucoadesivas com liberação controlada de clorexidina, tem o potencial de ser uma nova alternativa de tratamento da mucosite oral, podendo recobrir a ferida, reduzindo a sintomatologia dolorosa e a invasão dos tecidos por microorganismos oportunistas.

Por definição, Sistema de Liberação de Fármaco (SLF) é um sistema de administração desenvolvido para prolongar o tempo de liberação do fármaco no organismo, sustentar sua concentração plasmática e controlar a localização temporal e espacial das moléculas *in vivo*, por meio da aplicação de princípios biológicos e químicos. Desta forma, alterações cíclicas na concentração são eliminadas e a disponibilidade biológica do fármaco é aumentada. Também, pode ser conseguida redução da toxicidade, supressão de reações adversas e diminuição do número de doses administradas, diariamente (Kalachandra et al, 2006; Kockisch, 2005).

Sendo assim, este trabalho busca estudar a utilização de membranas mucoadesivas para liberação controlada de fármacos no tratamento das patologias orais. Essa técnica traria um maior conforto e segurança para o paciente. Seria vantajoso também tanto para o clínico quanto para o paciente, pois teria uma ação constante, inclusive no período noturno, durante o sono, aumentando a efetividade do tratamento. Contudo, é

preciso enfatizar que para o sucesso desta proposta terapêutica ela deve estar sempre associada a uma detalhada anamnese clínica para definição da etiologia, explicação clara ao paciente sobre o processo da doença, além de instruções para higienização oral.

Este trabalho visa desenvolver e avaliar *in vitro* a liberação controlada da clorexidina incorporada em matrizes (filmes) do polímero mucoadesivo quitosana, reticulado ou não, para potencial aplicação no tratamento de patologias da cavidade oral.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

- Produção e caracterização de um sistema dispositivo de liberação controlada de fármacos para potencial aplicação na cavidade oral.

### **2.2 Objetivos específicos**

- obtenção de matrizes (filmes) do polímero mucoadesivo quitosana, reticulada e não reticulada, com e sem incorporação de clorexidina.

- caracterização química dos filmes de quitosana, reticulado e não reticulado, com e sem fármaco incorporado.

- avaliação da liberação *in vitro* da clorexidina a partir da matriz de quitosana.

- avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes de quitosana com e sem o fármaco.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Patologias da cavidade oral

##### 3.1.1 Doença Periodontal

A doença periodontal (DP) afeta as estruturas de suporte e proteção do elemento dental, designadamente o ligamento periodontal, cemento, osso alveolar e gengiva (figura 3.1). Está presente na maioria da população mundial, sendo a maior fonte de perda de dente após os 25 anos de idade (Deasy *et al.*, 1989).

A DP é causada por acúmulo de componentes microbianos do biofilme dental que se agregam no interior das áreas subgengivais do periodonto. O epitélio juncional é um tecido que não possui a barreira de permeabilidade superficial, constituindo uma via pela qual toxinas, antígenos e enzimas derivados de biofilme bacteriano, que se formam na superfície dental, podem penetrar e atingir o tecido conjuntivo subepitelial. Isto inicia um ciclo inflamatório e injúrias teciduais, que facilitam a entrada de irritantes pelo sulco dental e exacerbam os danos. A destruição tecidual pode envolver as estruturas de suporte dos dentes e pode levar a perda do elemento dental, se não tratada (Mondelli, 2003).

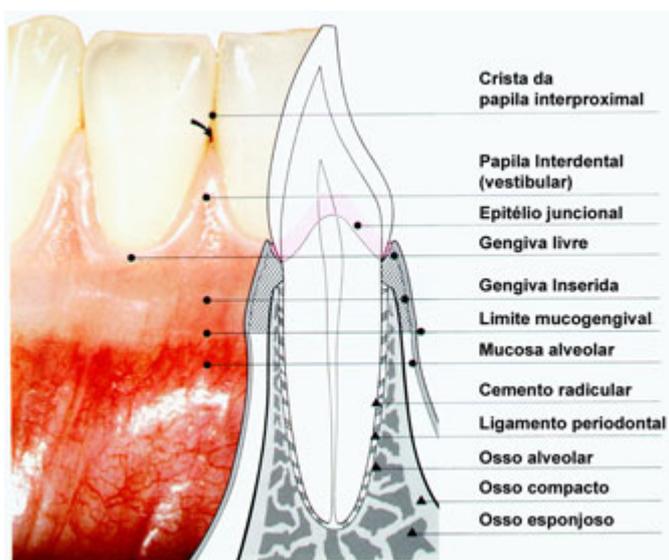


Figura 3.1 Estruturas de suporte e proteção do elemento dental.

Fonte: [www.solucoesemodontologia.com.br](http://www.solucoesemodontologia.com.br)

A DP pode ser classificada de acordo com o grau e a extensão do tecido envolvido. Na gengivite, estágio moderado da doença, a resposta inflamatória é restrita aos tecidos gengivais, sendo caracterizada por intumescimento, vermelhidão e sangramento da gengiva marginal (Medlicott *et al.*, 1994). No caso de periodontite, um estágio mais grave da doença periodontal, as alterações podem se estender a tecidos mais profundos, sendo que o número de bactérias Gram-negativas pode aumentar para 70% do total da flora. Como resultado, pode ocorrer rompimento do ligamento do tecido conectivo à superfície da raiz e migração apical do epitélio juncional, resultando na recessão gengival, formação de bolsa, exposição do cimento, perda de osso alveolar e no aumento na mobilidade do dente (Slots *et al.*, 1979).

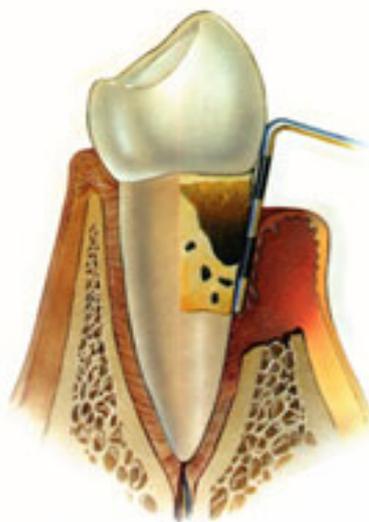


Figura 3.2 Estrutura do elemento dental (lado esquerdo: saudável, lado direito: presença de bolsa periodontal).

Fonte: [www.drfrnandoadriani.blogspot.com](http://www.drfrnandoadriani.blogspot.com)

A bolsa periodontal (figura 3.2) é um sulco aprofundado patologicamente (Friedman *et al.*, 1990) entre a gengiva e o dente, que causa retração da gengiva marginal e o desenvolvimento de um ambiente ideal para o crescimento na superfície da raiz do dente e na camada mais externa do cimento de bactérias anaeróbias e outros microrganismos responsáveis pela doença (Perioli *et al.*, 2004). Em um sulco gengival normal, o espaço entre a gengiva e o dente mede entre 1 a 3 mm de profundidade.

Entretanto, na DP, a profundidade da bolsa excede 5 mm, podendo chegar a 12 mm (Medlicott *et al.*, 1994). Além disso, em sítios saudáveis do periodonto ocorre a presença de pequenas quantidades de fluido crevicular gengival (0,04  $\mu\text{L}$ ), com baixas taxas de fluxo (0,03  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) e concentração de proteínas similar ao fluido extracelular. Por outro lado, nos sítios doentes há um aumento na produção de fluido e a composição proteica é semelhante à do soro, indicando a formação de exsudatos nesses locais. O volume e a taxa de fluxo depende do grau da infecção e da inflamação em cada local. Volumes de 0,5  $\mu\text{L}$  e fluxos de 0,5  $\mu\text{L}/\text{min}$  a 0,9  $\mu\text{L}/\text{min}$  têm sido relatados, podendo alcançar valores de 150  $\mu\text{L}/\text{h}$  (Friedman *et al.*, 1990).

Como a especificidade do biofilme dental em relação à infecção na doença periodontal é fato evidente, o combate às bactérias, a adequação do meio e a prevenção são fatores primordiais na restituição da saúde (Gabarra *et al.*, 2002). Assim, o tratamento periodontal tem por objetivo a cura do tecido inflamado, a redução do número de bactérias patogênicas e a eliminação da bolsa (Friedman *et al.*, 1990). O tempo torna o tratamento progressivamente mais difícil, necessitando de procedimentos terapêuticos cada vez mais agressivos e complexos. O tratamento periodontal tradicional consiste no controle do biofilme subgengival, através de um meticuloso desbridamento periódico da bolsa (curetagem), raspagem e aplainamento radicular, realizado pelo dentista, associado ao controle da placa supragengival, através de cuidados domiciliares por parte do paciente (Helldén *et al.*, 1979; Lindhe *et al.*, Nyman *et al.*, 1984; Van der Ouderaa, 1991). No entanto, muitas vezes o objetivo desse tratamento não é alcançado por problemas anatômicos e/ou técnicos, como a formação de nichos de microrganismos entre as raízes dentais e a capacidade de alguns destes em adentrarem nos tecidos conjuntivos, dificultando e/ou impossibilitando o acesso durante os procedimentos mecânicos de limpeza e raspagem radicular. Quando a eliminação da bolsa não é alcançada por estes métodos, a cirurgia é utilizada para remover o tecido necrótico e reduzir a sua profundidade (Friedman *et al.*, 1990; Bruschi *et al.*, 2006). Essas limitações da terapêutica permitem que bolsas refratárias ao tratamento se reativem, fato que tem levado cientistas a procurarem solução alternativa através do tratamento medicamentoso com repetidas administrações de agentes antimicrobianos com ação sistêmica ou local (Deasy *et al.*, 1989; Friedman *et al.*, 1990).

A administração de antimicrobianos de ação sistêmica demonstrou que concentrações terapêuticas são alcançadas no sítio da infecção por curtos períodos de tempo após uma dose simples (Medlicott *et al.*, 1994). No entanto, ela não pode ser utilizada por um longo período de tempo. Muitos efeitos colaterais indesejáveis podem surgir, tais como náuseas, vômito, diarreia, gastrite, úlceras, outros transtornos digestivos, alergias e desenvolvimento de resistência pelos microrganismos (Friedman *et al.*, 1982; Tinoco *et al.*, 1998), diminuindo a razão risco/benefício para um ponto no qual este tipo de tratamento não pode ser aceitável (Ciancio, 1996). Assim, a liberação de fármaco intrabolsa periodontal, uma categoria especial de liberação local na cavidade oral é geralmente utilizada no tratamento de doenças periodontais (Medlicott *et al.*, 1994; Bruschi *et al.*, 2006). A administração do fármaco no interior da bolsa periodontal é uma alternativa para minimizar a distribuição deste no organismo e, por conseguinte, aumentar a sua concentração no local e diminuir os efeitos adversos indesejáveis (Friedman *et al.*, 1990; Perioli *et al.*, 2004).

Bochechos, irrigações e jatos pulsáteis não penetram além de 1 a 2 mm abaixo da margem gengival (Friedman *et al.*, 1982). O tempo de permanência de soluções de agentes antibacterianos diretamente no interior da bolsa periodontal é curto, mesmo utilizando dispositivos de irrigação adequados, portanto, administrações freqüentes são requeridas para a manutenção das concentrações na bolsa periodontal (Medlicott *et al.*, 1994). Dessa maneira, a aderência ao tratamento por parte do paciente é um fator limitante para assegurar a eficácia clínica do tratamento. Devido a todos esses problemas, atenção tem sido dada no desenvolvimento de verdadeiros sistemas de liberação de fármaco intrabolsa periodontal (SLIBP) (Ranadive *et al.*, 1998; Kinane, 2000; Bruschi *et al.*, 2006).

### **3.1.2 Halitose**

Halitose é o termo utilizado para designar o odor fétido e desagradável emanado pela cavidade oral. Embora seja uma queixa muito prevalente, há poucos trabalhos científicos sobre o assunto. O seu diagnóstico é de grande importância, pois pode significar que há alguma alteração no organismo, além de acarretar insegurança e constrangimento social. Uma grande dificuldade que o paciente encontra é que muitas

vezes o mau odor passa despercebido, pois o epitélio olfativo acostuma-se com os odores e falha em percebê-los (Amaral, 2008).

Visando facilitar o estudo e o diagnóstico, a halitose foi classificada em:

- Pseudo- halitose: o paciente relata ser portador de mau hálito, mas o mesmo não está presente.

- Halitofobia: após tratamento, o paciente continua relatando mau hálito; é importante realizar avaliação psicológica.

- Halitose genuína fisiológica: são os casos de real presença do mau hálito resultante de má higiene oral e da saburra lingual. Este é o tipo mais prevalente e ocorre em 47% a 90% dos casos.

-Halitose genuína patológica intra-oral: ocorre devido à presença de alguma alteração patológica bucal, como por exemplo: gengivites, cáries, lesões na mucosa bucal entre outras.

-Halitose genuína patológica extra-oral: ocorre devido à presença de alterações sistêmicas, principalmente intestinais, pulmonares e/ou hormonais (Amaral, 2008; Scully *et al.*, 2008).

Os odores característicos da halitose (odorivetores) são originados de processos putrefativos, através da ação das bactérias gram-negativas anaeróbicas proteolíticas como *Solobacterium moorei*, *Prevotella intermédia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola* entre outras, que liberam gases chamados Compostos Sulfurados Voláteis (CSV) como por exemplo: sulfidreto ( $H_2S$ ), metil mercaptana ( $CH_3SH$ ) e dimetil sulfeto ( $(CH_3)_2S$ ) a partir da fermentação de aminoácidos que possuem enxofre (metionina, cisteína). O odor desagradável parece depender, particularmente, de grupos SH, oriundos de proteínas contendo aminoácidos sulfurados, principalmente do grupo cistina (S-S) e cisteína, favorecidos pela transferência de hidrogênio, convertendo os grupos S-S em SH. A análise do ar da boca demonstra que o sulfidreto e a metilmercaptana são os gases constituintes responsáveis por 90% do odor. Entretanto, a volatilidade da metilmercaptana é menor, motivo pelo qual o sulfidreto é o componente principal do mau hálito (Moraes, Amaral, 2008).

Existem mais de 50 causas para a halitose e muitas vezes mais de uma pode estar presente no mesmo indivíduo (Tarzia, 2003). Algumas delas são: má higiene oral, redução do fluxo salivar, doença periodontal, lesões cariosas extensas, lesões da mucosa bucal, cicatrizações de feridas cirúrgicas, neoplasias, miíases, tipo de alimentação, estresse, insuficiência renal crônica, cirrose hepática e diabetes descompensado (Amwt *et al.*, 2008). Com grande frequência os problemas gastrointestinais são relacionados ao mau hálito oral, o que não é verdadeiro já que cerca de 96% dos casos, o mau hálito se deve à presença da saburra lingual, que é um material viscoso e esbranquiçado ou amarelado, que se adere ao dorso da língua, mais freqüentemente na região do terço posterior. As principais causas da formação da saburra é a redução do fluxo salivar (xerostomia), a estagnação de proteínas salivares, restos alimentares, células epiteliais descamadas e bactérias aderidas. Além disso, a saliva contém proteínas em grande quantidade, sendo uma das fontes principais de enxofre. As proteínas com enxofre também estão presentes no fluido crevicular, nas células descamadas da mucosa oral, nos leucócitos migrados para a cavidade bucal, e no sangramento da doença periodontal (Tarzia, 2003).

A halitose presente na doença periodontal tem contribuição do sulco gengival e aumenta com a gravidade do problema. Evidências foram acumuladas de que o sulfidreto e a metilmercaptana, além de se relacionarem ao odor bucal, teriam efeito patológico adverso na estrutura e metabolismo de tecidos orais, com a presença dos compostos tiol na etiologia da doença periodontal. Os CSV são muito tóxicos e aumentam a permeabilidade da mucosa oral e a solubilidade do colágeno, diminuindo a síntese protéica e de colágeno, dados esses que os incluem na patogênese da doença periodontal (Moraes, Amaral, 2008).

Uma etiologia comum de halitose crônica é o cáseo amigdaliano, sua composição consiste de células epiteliais descamadas da mucosa oral, proteínas salivares e restos protéicos alimentares, que servirão de substrato alimentar às bactérias anaeróbias proteolíticas presentes. O controle na formação dos cáseos amigdalianos é um importante instrumento de prevenção às doenças, pois as bactérias presentes neste processo (praticamente as mesmas da saburra lingual) estão associadas com a etiologia de algumas doenças como a gastrite, pneumonia e a doença periodontal, esta última também relacionada com inúmeras outras doenças sistêmicas. Os tratamentos propostos para os cáseos amigdalianos são, até o momento, clínicos, através do uso

de antiinflamatórios, de gargarejos com soluções salinas e anti-sépticas, sem resultados satisfatórios, ou cirúrgicos, através de tonsilectomias (Conceição *et al.*, 2008).

Atualmente, o diagnóstico da halitose é feito através da avaliação organoléptica (que pode ser percebida com os sentidos humanos) por profissionais e/ou por mensuração dos gases bucais. O halímetro é um detector eletro-químico quantitativo de Compostos Sulfurados Voláteis (CSV); o cromatógrafo portátil detecta qualitativamente os três maiores componentes do hálito; e o Teste de Bana é sensível às bactérias que causam a doença periodontal e que também podem estar associadas à halitose. (Amaral, 2008).

Para o sucesso do tratamento deve-se avaliar a medida de fluxo salivar do paciente – sialometria- que deve ser feita por um profissional habilitado que irá estudar as causas e definir o melhor tratamento. Além disso, deve-se levar em conta sua causa primária, ou seja, deve ser feito um correto diagnóstico que inclui anamnese detalhada e exame da cavidade oral, para, então, efetivar-se a implementação da terapia de acordo com a causa. Assim, se utiliza um protocolo de acordo com a causa da halitose, que se divide em 5 grupos: TN1, usado para o tratamento da halitose fisiológica, mas pode ser utilizado como incremento em todos os tratamentos, constitui-se na explicação da halitose e instrução ao paciente sobre a higiene oral, entendimento da formação da saburra lingual e ações para redução dos CSVs e doenças periodontais. TN-2, usado em casos de halitose patológica oral, constitui-se na profilaxia oral, limpeza e tratamento oral por profissional para doenças bucais. TN-3, usado para casos de halitose extra-oral, neste caso o paciente deve ser encaminhado para um médico especialista. TN-4, usado em casos de halitose psicológica, ser enfático com o paciente provando que este não tem halitose, além de instruí-lo sobre as causas reais de halitose. TN-5, usado em casos de halitofobia, em que se deve encaminhar o paciente a um psiquiatra ou psicólogo (Winkel *et al.*, 2003; Roldán *et al.*, 2005).

Dentre as ações para a redução dos compostos sulfurados voláteis está à utilização de produtos mascaradores (pastas de dente, soluções de bochecho para limpeza bucal, gomas de mascar, sprays) que demonstraram não serem eficazes. Apenas mascaram o mau odor já que o epitélio olfativo só consegue perceber o odoriveter mais forte presente no momento e possui efeito de curta duração (menos de 2 horas). Produtos químicos com propriedades antimicrobianas são utilizados na forma de enxaguatórios

buciais para reduzir o número de microrganismos que produzem os CSV, tais como a clorexidina, triclosan e cloreto de cetilpiridínio, enquanto o dióxido de cloro, o bicarbonato de sódio entre outros, agem neutralizando os CSV, porém também por tempo limitado (Amaral, 2008).

Este trabalho busca estudar a utilização de dispositivos mucoadesivos de liberação controlada de fármacos para o tratamento da halitose, já que atualmente só existem no mercado enxaguatórios bucais com efeitos de curta duração. Essa nova técnica traria um maior conforto e segurança para o paciente que possui halitose, pois estaria com seu problema controlado por um período mais extenso de tempo, não sendo necessário ficar portando soluções de bochechos, ou agentes mascaradores do hálito, o que em muitas situações nem é possível.

### **3.1.3 Mucosites**

A mucosite é uma inflamação da mucosa oral e/ou gastrintestinal devido a complicações da terapia antineoplásica. Seu espectro clínico varia de eritema, ulceração até dor em um crescente contínuo, sendo que alguns pacientes podem apresentar a mucosite limitada a placas eritematosas pouco sensíveis enquanto em outros, áreas extensas de ulceração dolorida recoberta por pseudomembrana esbranquiçada (Scully et al., 2003).

A mucosite bucal é um dos principais efeitos colaterais induzido pelo tratamento quimioterápico e/ou radioterápico de cabeça e pescoço. As seqüelas potenciais incluem dor severa, aumento do risco de infecção local e sistêmica, comprometimento das funções bucais, faringianas e sangramento (Bonan *et al.*, 2005).

A mucosite oral é o efeito colateral agudo mais importante da radioterapia em cavidade bucal, por dificultar a deglutição de alimentos sólidos e às vezes líquidos, limita a fala e a mastigação, além de expor o paciente a infecções por microorganismos oportunistas, resultando na diminuição da qualidade de vida do paciente irradiado. Além disso, a mucosite oral grave pode exigir interrupção parcial ou completa da radioterapia antes do regime planejado ser completado, aumentando o risco de proliferação das células tumorais e dificultando o controle do câncer (Spielberg, McCloskey, 2004).

A dor causada por lesões de mucosites bucais podem ser suficientemente intensa, necessitando de altas doses de analgésicos opióides e nutrição parenteral. Disso decorre o atraso no tratamento do câncer, pela redução forçada dos agentes antineoplásicos. A qualidade de vida do paciente é afetada, além de prolongar o tempo de internação, aumentando os custos do tratamento oncológico. A mucosite é freqüentemente associada com náusea, vômito, diarréia e dor, e, consideravelmente, reduz o conforto e a sensação de bem-estar dos pacientes, levando a distúrbios de sono, anorexia e perda de peso. Aproximadamente 11% dos casos de interrupção e modificação do regime de tratamento radioterápico ocorrem devido ao desenvolvimento de mucosite oral intensa, sendo necessário o replanejamento do tratamento e em algumas situações clínicas, a internação do paciente (Scully et al., 2003).

Outro fator agravante para a mucosite oral é a susceptibilidade à infecção por microorganismos normalmente presentes na cavidade bucal que são oportunistas e invadem os tecidos lesados. A mucosite oral como processo biológico tem sido apenas recentemente estudada, e se tem sugerido envolvendo a mucosa oral, citocinas próinflamatórias e fatores locais como a saliva e a microbiota em sua patogênese (Pico et al., Sonis, 1998).

Os tratamentos empregados para a mucosite oral induzida por radioterapia são paliativos e diversificados, envolvem terapêuticas profiláticas e tentativas de atenuar a sintomatologia dolorosa (Köstler et al., Scully, 2001).

As condutas atuais para a prevenção ou tratamento paliativo da mucosite podem ser: crioterapia, uso de anestésicos tópicos, antiinflamatórios inibidores da cicloxigenase 2 (COX-2) e/ou da prostaglandina E2 (PGE-2), anti-sépticos, antivirais, antibióticos, antifúngicos, soluções de bicarbonato de sódio, agentes protetores de mucosa, analgésicos, hidrocloreto de benzidamina, antioxidantes como a vitamina E e A, aminofosfatina, L-glutamina, bem como fitoterapia com camomila e o uso do laser em baixa intensidade. Alguns casos mais severos são controlados com analgesia à base de morfina. Apesar dos avanços no entendimento da complexa etiopatogenia da mucosite, por meio de estudos em modelos animais e pesquisas multicêntricas, ainda não há um protocolo eficaz de prevenção ou tratamento para a mesma (França et al., 2009).

As tentativas de prevenção e tratamento para a mucosite oral observando as fases de desenvolvimento da mucosite parecem ser inovadoras. Em harmonia com esse raciocínio, Biron *et al* (2000) incentivaram a observação das diferentes fases biológicas da mucosite oral para a escolha da terapêutica apropriada. Na fase vascular, recomenda-se vasoconstrição (crioterapia), citoprotetores e antioxidantes e inibidores de proliferação. Na fase epitelial, devem se utilizar fatores de crescimento ou aceleradores da renovação epitelial, com atuação direta na mucosa, como sucralfato. Na fase ulcerativa, bochechos à base de clorexidina em base aquosa e antimicrobianos podem ser indicados. Na fase de reparação deve-se utilizar laser de baixa potência (Sutherland, 2001; Biron *et al.*, 2000).

Sendo assim, este trabalho propõe o estudo das membranas mucoadesivas de quitosana para a liberação controlada de clorexidina para sua potencial aplicação nas lesões ulcerativas da mucosite bucal, buscando reduzir a sintomatologia dolorosa e a invasão dos tecidos lesados por microorganismos oportunistas.

### **3.2 Antimicrobianos**

Uma das mais importantes descobertas da medicina foi os antimicrobianos e muito tem se pesquisado sobre o assunto à procura de fármacos mais eficientes e seguros. O fármaco antimicrobiano ideal deve ter uma toxicidade seletiva, ou seja, ser nociva ao microorganismo sem ser ao hospedeiro. Em muitos casos esta regra é relativa, pois a droga pode lesar o parasita numa concentração passível de não ser tolerada pelo hospedeiro. As drogas podem ser classificadas segundo o seu mecanismo de ação, sendo então divididas em:

- Fármacos que inibem a síntese da parede celular;
- Fármacos que alteram a permeabilidade da membrana celular ou o transporte ativo através da membrana celular;
- Fármacos que inibem a síntese proteica;
- Fármacos que inibem a síntese de ácido nucléico.

Os agentes antimicrobianos são comumente descritos como sendo bacteriostáticos ou bactericidas. O primeiro termo refere-se aos fármacos que inibem temporariamente o crescimento dos microorganismos. O sucesso no tratamento depende na maioria das vezes da eficiência do sistema imunológico do próprio hospedeiro. O termo bactericida refere-se aos agentes antimicrobianos que causam a morte do microorganismo e por isso dependem menos do mecanismo de defesa do hospedeiro que porventura estejam debilitados. Mas os termos bactericidas ou bacteriostáticos não são termos absolutos. Agentes bacteriostáticos podem proporcionar o extermínio de populações de microorganismos enquanto que os bactericidas podem não ser tão eficazes. Um dos fatores determinantes para a eficácia do agente antimicrobiano é o conhecimento do espectro da atividade em relação aos patógenos envolvidos na doença. Outros fatores como a dose apropriada, via de administração e duração da terapia devem ser selecionados para o paciente específico com o objetivo de maximizar a chance de alcançar concentrações adequadas do agente antimicrobiano no local da infecção (Jewetz,1994; Prober, 1991).

O uso de agentes quimioterápicos e quimioprolifáticos para tratamento e profilaxia das doenças orais não é uma idéia recente. Em 1890, MILLER já afirmava que o uso adequado e inteligente de antissépticos para destruir as bactérias, ou pelo menos limitar o seu número e atividade poderia contra-atacar ou limitar a destruição causada pela cárie dentária. Desde então, vários agentes antimicrobianos foram testados em sua capacidade de prevenir ou limitar a ação destes microorganismos. Todavia, não há consenso entre os profissionais da odontologia quanto ao uso destes agentes antimicrobianos na profilaxia e tratamento da doença cárie. Os favoráveis ao uso destes agentes afirmam que qualquer recurso que ajude no controle de formação da placa dental é bem-vindo. Aqueles de opinião contrária ao uso rotineiro destes agentes antimicrobianos afirmam que estes poderiam afetar o equilíbrio ecológico da cavidade oral favorecendo o surgimento de microbiota resistente. Mas não há evidência de que o uso comum de agentes quimioprolifáticos contra a placa dental tenha efeitos nocivos (Thylstrup, 2001).

Um requisito básico para a eficácia de um agente antibacteriano é a sua biodisponibilidade, ou seja, a liberação do agente de uma forma biologicamente ativa e em doses eficazes. A persistência do efeito vai depender da adsorção ou ligação no local em que esta foi solicitada sem a perda de sua atividade. A eficácia clínica do

agente antimicrobiano na cavidade oral depende da sua potência, do seu nível de ligação às superfícies orais e da sua cinética de liberação. A sua capacidade de manter a atividade biológica em estado de adsorção ou ligação também é de muita importância para a eficácia clínica (Thylstrup, 2001).

Um dos agentes antibacterianos mais usados na odontologia é a clorexidina.

### 3.2.1 Clorexidina

A clorexidina é ativa contra um largo espectro de bactérias Gram positivas e negativas, aeróbios e anaeróbios, bem como espécies de fungos e vírus. Não tem sido relatada resistência bacteriana, após a aplicação, a microbiota foi então mais numericamente reduzida do que seletivamente (Martin et al, 1987).

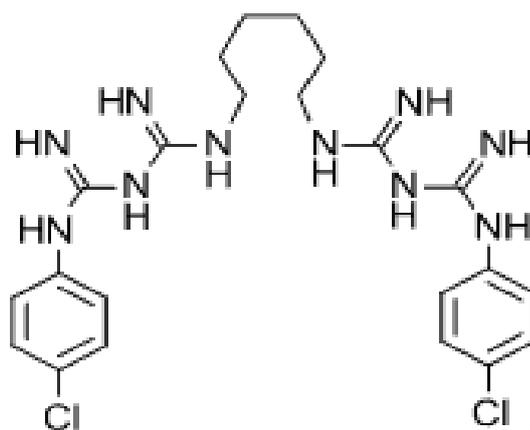


Figura 3.3 Estrutura química da Clorexidina.

Fonte: [www.upload.wikipedia.org](http://www.upload.wikipedia.org).

Durante muito tempo, a forma mais utilizada da clorexidina tem sido a solução de digluconato de clorexidina a 0,12%. Contudo, para a cavidade bucal o uso de soluções oferece efeitos passageiros, especialmente provocados pela renovação constante da saliva e do muco, substrato biológico (Baker et al., 1979; Netuschil et al, 2003). A clorexidina em altas concentrações é bactericida, causando o extravasamento dos constituintes celulares de baixo peso molecular e a precipitação do conteúdo

intracelular e em baixas concentrações, torna-se bacteriostática. Porém apresenta efeitos colaterais locais como pigmentação dos dentes, língua, restaurações, próteses, descamação e ferimento da mucosa oral e distúrbios do paladar quando utilizada por períodos prolongados (Akaki, 2005).

LANG (1986) também relatou o efeito dose-dependente da clorexidina, sendo em baixas concentrações bacteriostática e em concentrações mais altas apresenta atividade bactericida. BONESVOLL (1978) demonstrou que ela também se liga aos tecidos, mudando seu campo elétrico para competir com a ligação bacteriana. Para GJERMO (1989) sua ação pode estar envolvida com a aderência das bactérias na superfície pela competição de íons cálcio, e pela formação de pontes de cálcio entre as bactérias e a cavidade bucal.

O efeito antimicrobiano da clorexidina é mediado por diversos mecanismos. HUGO (1964), afirmou que o mecanismo de ação da clorexidina está associado, inicialmente à adsorção à parede celular bacteriana, facilitada por suas propriedades catiônicas, isto é, as moléculas com cargas positivas de clorexidina se unem às cargas negativas da parede celular, principalmente aos grupos fosfato dos lipopolissacarídeos e grupos carboxílicos das proteínas.

Por outro lado, já foi demonstrado também que o mecanismo bactericida da clorexidina é devido à interferência com o transporte da membrana produzindo um desequilíbrio osmótico, iniciando a saída de substâncias citoplasmáticas de baixo peso molecular, a precipitação e/ou coagulação das proteínas, causando lise celular, como relatado por TEIXEIRA (2008).

Com o intuito de prolongar a atividade antimicrobiana da clorexidina, uma nova abordagem tem sido proposta para este fármaco, os sistemas de liberação controlada. O grande desafio terapêutico é conseguir um sistema antimicrobiano eficaz que mantenha a concentração inibitória mínima por um determinado período de tempo e reduza a incidência de re-infecção e de efeitos adversos (Teixeira, 2008).

Recentemente estudos têm demonstrado a eficácia e vantagens de sistemas de liberação controlada de antimicrobianos em relação aos fármacos tradicionais. Aliando o uso de baixas concentrações e menor número de aplicações. Além disso, esses dispositivos têm se mostrado mais biocompatíveis, atenuando os efeitos tóxicos e colaterais dos fármacos associados aos carreadores (Langer, 1990).

A produção de dispositivos mais próximos das condições ideais, com uma liberação estável durante um período de tempo e em concentrações terapêuticas com efeitos colaterais e citotóxicos mínimos continua como objetivo farmacológico, bem como conhecer os mecanismos pelo qual esses agentes interagem com as células dos microrganismos patogênicos e com as próprias células do organismo (Teixeira, 2008).

### **3.3 Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos**

A procura por novos sistemas de liberação controlada de fármacos tem sido muito relevante no sentido de se estabelecer alternativas terapêuticas mais eficientes, que possibilitem administrar os fármacos com mais segurança e com efeitos colaterais minimizados.

Para a administração de fármacos na cavidade oral pode se recorrer às formulações convencionais, tais como, os géis, as pastas dentífricas, pastilhas e os enxaguatórios bucais. As pastilhas produzem níveis efetivos do fármaco por cerca de 1 h, requerendo administrações repetidas que levam à ingestão de grande quantidade de fármaco. A duração do efeito terapêutico dos enxaguatórios bucais também é desfavorável, devido à dificuldade na retenção do fármaco no ambiente bucal. Portanto, estas formas convencionais têm a desvantagem de liberar as substâncias ativas rapidamente, podendo assim, conduzir a níveis sub-terapêuticos em um curto período de tempo após a administração. A eficácia terapêutica de um fármaco não depende apenas da sua atividade farmacológica intrínseca, mas de fatores relacionados às suas propriedades físico-químicas e aos componentes usados na formulação, além dos processos de fabricação. Portanto o desenvolvimento de formulações bioadesivas de liberação controlada é importante pela sua superioridade em relação às formas farmacêuticas convencionais (Baby, 2007).

Os sistemas terapêuticos de liberação controlada são capazes de manter terapêuticamente concentrações efetivas do fármaco no sangue e/ou saliva sem produzir flutuações nas concentrações tipicamente observadas com regime de doses múltiplas. Além disso, podem ser definidos como preparações ou formas que liberam

um ou mais princípios ativos continuamente, em um esquema predeterminado por um período fixo de tempo, seja para a ação sistêmica ou para um órgão específico. Alguns podem ser colocados e substituídos pelo próprio paciente, tais como os de administração na conjuntiva, pele ou mucosa, outros requerem assistência de um profissional. Contudo, deve sempre ser ressaltada a importância da formulação para evitar o risco de efeitos tóxicos (Kalachandra *et al.*, 2006; Kockisch, 2005).

Sistema de liberação controlada é um sistema onde o fármaco libera-se de forma mediata, e com um tempo pré-fixado (figura 3.4). Quando um fármaco é aplicado neste tipo de sistema, os níveis sanguíneos se mantêm dentro da faixa terapêutica durante um intervalo de tempo maior, sendo mais eficaz do que as formas convencionais. O nível terapêutico descreve um platô ao longo do tempo na dose terapêutica que diminui lentamente (Lin, 2003; Kockisch, 2005) evitando níveis subterapêuticos ou tóxicos.

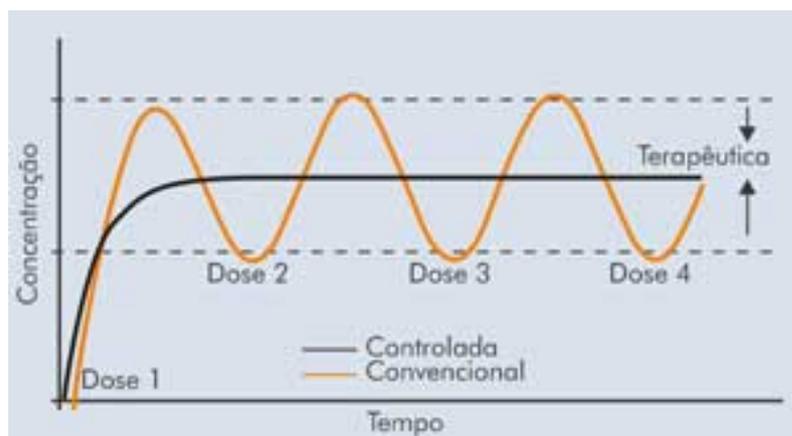


Figura 3.4 Perfis de liberação de fármacos em função do tempo: controlada versus convencional.

Fonte: [www.gerbras.com.br](http://www.gerbras.com.br)

Os sistemas de liberação controlada de fármacos desenvolvidos têm ampla aplicação, oferecem a vantagem de liberar de forma controlada e em concentrações terapêuticas. Quando são usadas as matrizes biodegradáveis para a liberação de fármacos eliminam a necessidade de retirar o dispositivo de liberação (Langer, 1990).

Polímeros biodegradáveis podem ser definidos como aqueles que sofrem degradação macromolecular *in vivo*, por ação de enzimas, microorganismos ou células (figura 3.5). O termo biodegradação descreve os processos envolvendo quebra de cadeia e modificações da massa molar e da solubilidade do polímero. Processos biológicos, físicos e químicos, podem atuar na biodegradação. A quitosana, polímero de origem natural, é hidrolisada pela lisozima sendo, portanto, biodegradável (Assis *et al.*, 2003).

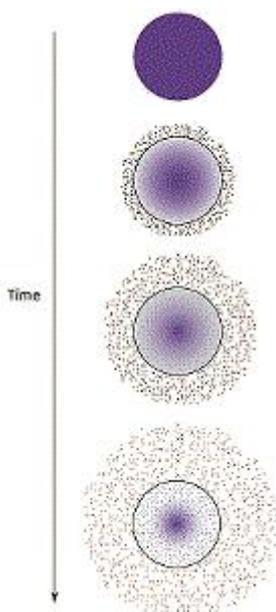


Figura 3.5 Representação esquemática da liberação controlada de Fármacos utilizando-se polímeros biodegradáveis.

Fonte: [www.upload.wikipedia.org](http://www.upload.wikipedia.org)

Na literatura podemos encontrar vários relatos referentes à incorporação de fluoretos e antimicrobianos para liberação sustentada em materiais restauradores como cimento de ionômero de vidro, resinas compostas, cimentos resinosos, vernizes, resinas acrílicas (Lara *et al.*, 1998; Kalachandra *et al.*, 2003). Segundo LEE *et al.* (2000) desde 1980, tem sido renovado o interesse pelo uso de polímeros mucoadesivos, para

prolongar o tempo de contato da forma farmacêutica na membrana mucosa. Um forte “catalisador” para o uso de polímeros bioadesivos foi o trabalho pioneiro de NAGAI e colaboradores, citado por Lee *et al.*, 2000, que constataram que aftas bucais, resultantes de úlceras cancerígenas, poderiam ser melhor tratadas utilizando um anti-inflamatório esteróide aplicado localmente com o auxílio de polímero bioadesivo. Atualmente tem sido utilizados dispositivos de liberação controlada em aplicações como mucoadesivos, para liberação direta na cavidade oral, como LARA *et al.*(1998), que estudou sistemas acrílicos bioadesivos para liberação sustentada *in vitro* de fluoreto e KALACHANDRA *et al.* (2003) que avaliou a estabilidade e a liberação de drogas anti-virais em matrizes do copolímero etileno vinil acetato. Segundo FIGUEIRAS *et al.* (2007), a utilização de polímeros bioadesivos na administração de fármacos apresenta as vantagens de prolongar a sua administração através de todas as vias parentéricas e localizar o fármaco no local terapêutico desejado.

Formas farmacêuticas sólidas de liberação convencional liberam o fármaco por um processo que envolve duas etapas dependentes do tempo, que são a desagregação e a dissolução. A maioria dos sistemas de liberação modificada pode ceder o fármaco por difusão, erosão polimérica ou intumescimento da matriz polimérica. A predominância de um mecanismo ou outro vai depender das características do material utilizado (Lopes *et al.*, 2005).

Os sistemas farmacêuticos conhecidos como *reservatórios*, são compostos por um núcleo contendo o fármaco no estado sólido ou líquido, revestido por uma membrana microporosa ou semi-permeável, que limita a passagem do fármaco, realizando o controle da liberação, geralmente, na superfície da forma farmacêutica. (Villanova *et al.*, 2010).

Os sistemas *matriciais* podem ser porosos ou não e contêm o fármaco dissolvido ou disperso na matriz. De modo geral, a cinética de liberação é linear em função da  $\sqrt{t}$ , diminuindo ao longo do tempo (Veiga, 1988). Nos sistemas matriciais, o fármaco está, de modo íntimo e mais ou menos uniforme, incluído nas cadeias poliméricas. Os sistemas matriciais existentes podem dividir-se em sistemas que mantêm sua forma relativamente constante durante o processo de liberação do fármaco (difusão) e em sistemas que aumentam de volume quando em contato com os fluidos de dissolução (degradação/erosão). Nestes últimos, ocorre dilatação da forma farmacêutica que, posteriormente, degrada-se. Assim como na difusão, no mecanismo de erosão o

fármaco está contido em uma membrana ou matriz polimérica. Contudo, esta se destina a sofrer erosão e liberar o fármaco da matriz (Lopes *et al.*, 2005).

A erosão, a difusão e o intumescimento das matrizes são os vários mecanismos pelos quais os sistemas matriciais podem controlar a liberação das substâncias ativas. A predominância de um destes mecanismos depende invariavelmente das propriedades do polímero empregado no sistema. De um modo geral, quando as estruturas matriciais entram em contacto com o meio de dissolução (ou fluído biológico) podem manter a sua estrutura mais ou menos constante ao longo de todo o processo de dissolução ou podem sofrer um fenómeno de intumescimento (“swelling”) e, posteriormente, de erosão (Lopes *et al.*, 2005).

A liberação por difusão depende da solubilidade relativa (ou permeabilidade) e do coeficiente de difusibilidade do fármaco pela membrana e no meio de dissolução. A difusão de um fármaco a partir de um sistema matricial depende da porosidade deste último e pode ser influenciada por fatores como o grau de reticulação do polímero, a cristalinidade do polímero, pelo fator de tortuosidade, pelo coeficiente de partição do fármaco entre o polímero e a solução, pela quantidade de polímero utilizada, dentre outros. Outro tipo de liberação envolve relaxamento polimérico, degradação/erosão além da difusão. O mecanismo de degradação descreve, especificamente, a quebra das cadeias poliméricas em oligômeros e monômeros. O termo erosão define a perda ou depleção do material polimérico (Lopes *et al.*, 2005).

Nos sistemas matriciais o ingrediente ativo encontra-se totalmente disperso no excipiente e as matrizes podem ser de três tipos: inertes lipídicas, inertes plásticas e hidrofílicas. Nos dois primeiros casos, a etapa limitante da velocidade de liberação é a penetração do meio de dissolução nos poros da matriz, seguida de difusão lenta do fármaco através de canalículos. Já as matrizes hidrofílicas, atuam por intumescimento/relaxamento. O polímero sofre hidratação na presença do meio de dissolução, intumescer e forma uma camada gelatinosa em torno do núcleo. A barreira formada controla tanto a velocidade de penetração da água no comprimido, quanto à liberação do fármaco. À medida que a camada mais interna vai sendo hidratada, a camada externa sofre erosão (Lopes *et al.*, 2005).

Numa primeira fase, as matrizes hidrofílicas quando em contato com o meio de dissolução absorvem água, sobretudo através dos poros do sistema matricial. Após a

hidratação do sistema, com conseqüente liberação imediata do fármaco existente na superfície. Os eventos que ocorrem após a hidratação encontram-se representados na figura 3.6. Quando a penetração da água na matriz excede uma concentração crítica, as interações água-polímero passam a superar as interações polímero-polímero existentes entre as cadeias, que tendem a espaçarem-se, permitindo a passagem do fármaco (A) e sofrendo erosão (B). O sistema se desintegra totalmente quando a distância entre as cadeias poliméricas não permite que as mesmas interajam (C) (Lopes, Sousa Lobo, Costa, 2005).

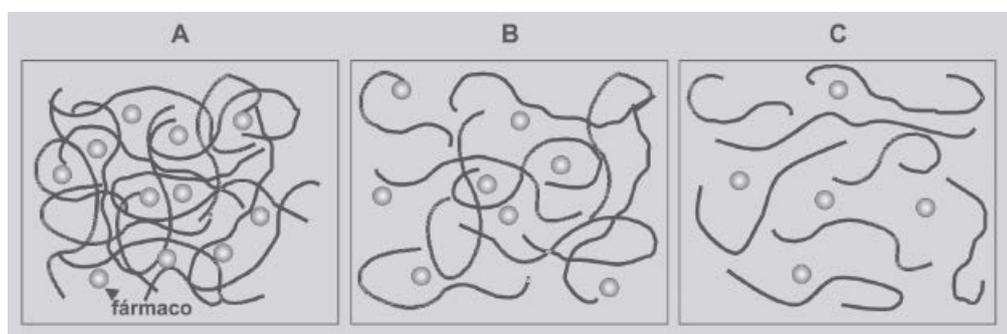


Figura 3.6 Eventos da liberação do fármaco em sistemas poliméricos.

Fonte: LOPES *et al.*, 2005.

As matrizes hidrofílicas podem ser agrupadas em duas classes, de acordo com o mecanismo controlador da liberação do fármaco: (1) matrizes hidrofílicas de intumescimento ilimitado, controlado por difusão e, (2) matrizes hidrofílicas de intumescimento limitado, nas quais, o processo que controla a liberação do fármaco é a velocidade de penetração do meio de dissolução no polímero (Veiga, 1998).

Os sistemas matriciais apresentam, como principal vantagem, a redução no risco de liberação repentina do fármaco. São fáceis de serem manipulados e, podem ser adaptados para liberarem o fármaco à velocidade aproximadamente constante. Nesse modelo, o fármaco dissolve-se e difunde-se para o exterior a partir das camadas superficiais, processo que progride lentamente em direção ao núcleo, uma vez depletadas as camadas mais externas (Lopes *et al.*, 2005).

De acordo com a lei de FICK, a velocidade de dissolução é proporcional à diferença entre as concentrações dos dois lados da membrana (interface) e ao coeficiente de difusão e, ainda, inversamente proporcional à espessura da membrana. No estudo de difusão de solventes em polímeros, diferentes comportamentos têm sido observados. A difusão em muitos polímeros não é adequadamente descrita pela lei de FICK ou por expressões dela derivadas. O solvente que penetra no polímero pode provocar, em algumas matrizes poliméricas, um grande aumento de volume, como no caso dos plastômeros, resultando em comportamento anômalo ou não-Fickiano, admitindo-se que tal efeito resulte em mudanças configuracionais no próprio polímero. À medida que o solvente penetra, a matriz passa de um estado configuracional altamente emaranhado, como um sólido parcialmente cristalino, para outro estado típico de polímeros dissolvidos em soluções mais diluídas que se traduz em disposição helicoidal e ao acaso (Costa e Lobo, 1999).

Polímeros bioadesivos são materiais capazes de se ligarem a substratos biológicos de duas maneiras: aderindo à camada mucosa (mucoadesivos) ou à membrana celular (citoadesivos). A bioadesão é uma propriedade explorada como estratégia para aumentar o tempo de permanência de um fármaco no organismo. Em consequência, a biodisponibilidade dos fármacos pode ser melhorada e o número de doses tomadas, diariamente, pode ser reduzido. Outra vantagem é que a bioadesão pode ser modulada para ocorrer em sítios específicos, diminuindo a toxicidade e aumentando a efetividade terapêutica dos fármacos (Asane *et al.*, 2008; Andrews *et al.*, 2009)

Por ser de natureza catiônica a quitosana é um polímero bioadesivo. Hidrogéis de quitosana podem ser preparados por complexação polieletrólítica, originando géis com ligações covalentes. A atração eletrostática entre o grupamento amino da quitosana com grupos aniônicos de outros eletrólitos é o fundamento da obtenção destes hidrogéis. Outras interações secundárias podem ocorrer (Berger *et al.*, 2004; Rinaudo, 2006).

A quitosana tem características biofarmacêuticas interessantes, tais como sensibilidade ao pH, biocompatibilidade e baixa toxicidade. Além disso, a quitosana é metabolizada por certas enzimas humanas, especialmente a lisozima, tornando-a biodegradável. Devido a estas propriedades favoráveis, o interesse da quitosana e seus derivados em aplicações de liberação de fármacos tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. Em tais aplicações é extremamente importante que a quitosana seja

hidrossolúvel e carregada positivamente. Estas propriedades permitem que este biopolímero interaja com polímeros carregados negativamente, macromoléculas e poliânions em meio aquoso, favorecendo a difusão de fármacos no mecanismo de liberação (Laranjeira, 2009).

A quitosana é considerada um bom sistema de liberação de fármacos na cavidade bucal, visto que a sua atividade antibacteriana pode ser devida às interações eletrostáticas entre grupos amino e grupos aniônicos nas paredes celulares das bactérias provenientes de resíduos de ácidos carboxílicos e fosfolipídeos. Sistemas de liberação bucal mucoadesivos desenvolvidos a partir de hidrogéis de quitosana parecem ser apropriados para prolongar o tempo de residência da forma farmacêutica, melhorando o efeito terapêutico no tratamento de infecções localizadas, tais como doença periodontal e estomatite. Tabletes baseados em microesferas de quitosana contendo diacetato de clorexidina mostraram uma liberação prolongada do fármaco na cavidade bucal, conforme foi relatado por LARANJEIRA (2009).

SENEL et al. (2000) relatou em seu estudo que a liberação controlada de clorexidina incorporada em quitosana é uma proposta promissora para aplicação na cavidade oral. Seus resultados mostraram que tanto a clorexidina, quanto a quitosana exercem atividade antimicrobiana contra a *P. gingivalis*. Uma interação iônica entre os cátions dos grupos aminos da quitosana e os anions da parede celular das bactérias, tais como fosfolipídios e ácidos carboxílicos tem sido proposta como o mecanismo para a atividade antimicrobiana da quitosana (Seo et al., 1994). O aumento da concentração de clorexidina não teve efeito significativo sobre a atividade antimicrobiana, indicando que na presença de quitosana, é possível liberar este composto em uma menor concentração, o que evitará indesejados efeitos colaterais, incluindo alterações de coloração e paladar.

### **3.4 Quitosana**

A quitosana é um polímero natural, biodegradável, extremamente abundante e atóxico. Possui potencial para ser aplicada em diversas áreas, principalmente engenharia, biotecnologia e medicina. Muito tem sido estudado e publicado sobre a quitosana na última década como elemento básico para confecção de matrizes de liberação controlada de fármacos.

A quitosana é um polissacarídeo amino, derivado do processo de desacetilação da quitina, que constitui a maior fração dos exoesqueletos de insetos e crustáceos, sendo o segundo composto orgânico mais abundante da natureza, ficando atrás somente da celulose. Enquanto a quitina é inerte e insolúvel, a quitosana é reativa e solúvel em ácidos fracos, podendo ser caracterizada como um polieletrólito catiônico, sendo normalmente purificada na forma neutra. Sua estrutura é formada pela repetição de unidades beta (1-4) 2- amino-2-deoxi-D-glucose ou (D- glucosamina) apresentando uma cadeia polimérica similar à da celulose (exceto pela substituição dos grupos hidroxila na posição 2 por grupos acetamido). A fórmula molecular genérica pode ser expressa como  $(C_6H_{11}O_4N)_n$ . Suas características físico-químicas resultam em propriedades como fácil formação de géis, capacidade filmogênica e boas propriedades mecânicas. Os filmes de quitosana são biodegradáveis, transparentes e suas estruturas poliméricas permitem a incorporação de agentes antimicrobianos, fungicidas ou outros bioativos (Assis *et al.*, 2003).

A quitina se apresenta em duas versões alomórficas chamadas de forma  $\alpha$  e forma  $\beta$  que podem ser diferenciadas por espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear (RMN) juntamente com difração de Raios-X. A terceira forma  $\gamma$ -quitina também já foi descrita, mas com uma análise detalhada percebe-se que ela é apenas uma variação da família  $\alpha$ -quitina (Rinaudo, 2006).

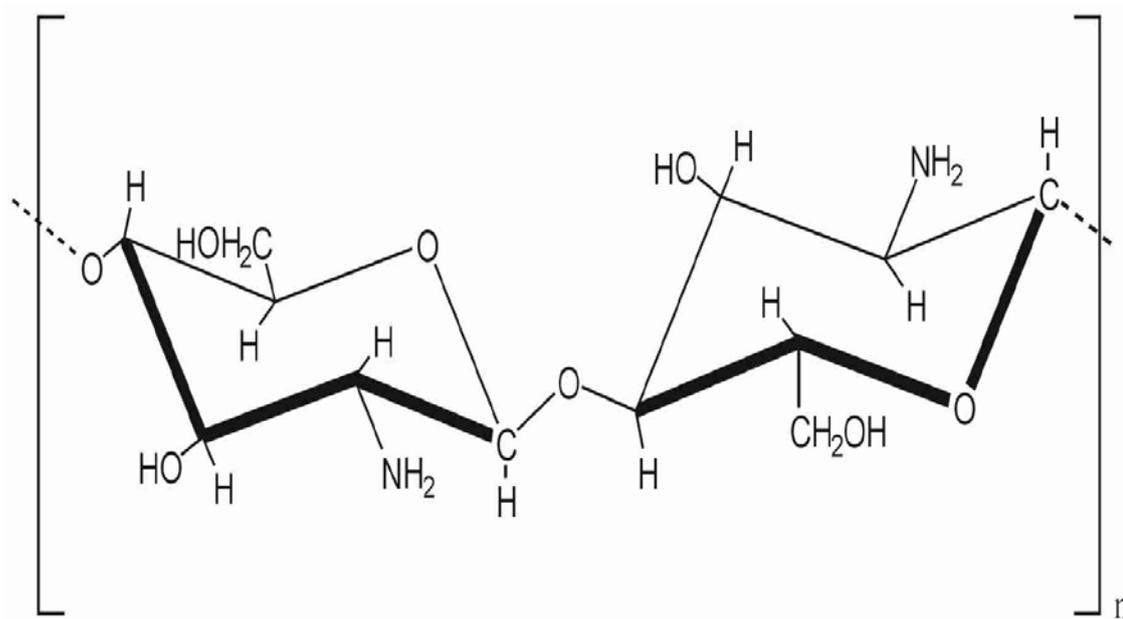


Figura 3.7 Estrutura química da quitosana.

Fonte: [quitosana.zip.net/images/Chitosan-chemie.jpg](http://quitosana.zip.net/images/Chitosan-chemie.jpg)

A quitina é um pó incolor, apresentando estrutura parte cristalina e parte amorfa, insolúvel na maioria dos solventes. Ela se dissolve em ácidos minerais concentrados com degradação simultânea da cadeia polimérica (Santos, 2004; Rodas, 2004).

A quitosana é o principal derivado da quitina, e é obtida por N-desacetilação em uma extensão variável que é caracterizada pelo grau médio de desacetilação (*GD*), que representa a porcentagem de grupos NH<sub>2</sub> livres, sendo geralmente representado como um copolímero de 2-amino-2-desoxi-D-glicose e 2-acetamido-2-desoxi-D-glicose. Quando o grau de desacetilação (*GD*) da quitina alcança em torno de 50% (dependendo da origem do polímero) ele se torna solúvel em meio aquoso ácido e é chamado quitosana. A solubilização ocorre pela protonação da função -NH<sub>2</sub> sobre o carbono 2 da unidade de repetição D-glicosamina, portanto, o polissacarídeo é convertido em um polieletrólito em meio ácido (Rinaudo, 2006). Entretanto, a solubilidade depende de vários parâmetros, tais como *GD*, massa molar, concentração do ácido e do biopolímero e da força iônica (Santos, 2004).

Comercialmente, a quitina e a quitosana são obtidas num custo relativamente baixo a partir de conchas de molusco (principalmente caranguejos, camarões, lagostas e krills),

rejeitos dos mariscos processados pela indústria. Basicamente, o processo consiste de desmineralização das cascas e ou esqueletos que são secos e moídos; o pó é tratado com solução de HCl 0,5 mol/L e, posteriormente, a desproteinação do material é executada com uma solução diluída de NaOH 1% sob agitação por 24h a 65°C. Para resultar em quitosana (GD de 70 – 90%), a quitina obtida (GD 5 – 2%) é submetida a N-desacetilação pelo tratamento com uma solução de NaOH 50% a 100°C de 2 a 5 horas sob atmosfera de nitrogênio e o resíduo é lavado para eliminação do excesso alcalino e seco a 110°C por 24 h (Santos, 2004).

Em suas cadeias lineares de poliglicosamina de alto peso molecular, a quitosana possui propriedades químicas e biológicas distintas, pois tem grupos amino e hidroxila reativos capazes de serem submetidos a modificações químicas. Adicionalmente, os grupos amino tornam a quitosana um dos únicos polieletrólitos catiônicos achados na natureza ( $pK_a \sim 6,5$ ). Esta condição confere propriedades singulares a quitosana. A quitosana é solúvel em meios aquosos ácidos de  $pH < 6,5$  e quando dissolvida possui alta carga positiva sobre os grupos  $-NH_3^+$ . Adere a superfícies carregadas negativamente, agrega-se com compostos polianiônicos, e quela íons de metal pesado. Tanto a solubilidade em soluções ácidas quanto à agregação com poliânions atribuem propriedades excelentes a quitosana na forma de gel. Junto com propriedades biológicas raras que incluem biocompatibilidade, biodegradabilidade em produtos inofensivos, não tóxicos, fisiologicamente inertes, afinidade notável a proteínas, e propriedades hemostática, fungistática, antitumoral, anticolesterol. A quitina e a quitosana até agora, indubitavelmente, oferecem um potencial extraordinário numa larga faixa de aplicações que tendem a crescer rapidamente uma vez que os materiais quitinosos padronizados tornam-se disponíveis. De maneira importante, como biopolímeros e materiais biodegradáveis a quitina/quitosana são seguros para os seres humanos e para o ambiente natural (Kumar et al., 2004; Deng, 2007).

No estado sólido a quitosana é um polímero semicristalino. Sua morfologia foi investigada e seu polimorfismo é mencionado na literatura (Clark, 1936). Cristais simples de quitosana foram obtidos de quitina totalmente desacetilada de baixo peso molecular. A difração de raios-X indicou célula unitária ortorrômbica contendo duas cadeias de quitosana antiparalelas sem molécula de água e também foi feita a descrição da influência das condições experimentais sobre a cristalinidade. CLARK

(1936) também não excluiu a possibilidade de uma estrutura monoclinica com ângulo de  $88^\circ$  entre o plano da base e o eixo do prisma.

As propriedades da solução de quitosana dependem não somente do grau médio de desacetilação, mas também da distribuição dos grupos acetil ao longo da cadeia principal e da massa molar. A desacetilação, usualmente feita no estado sólido, fornece uma estrutura irregular devido ao caráter semicristalino do polímero inicial. O exame do papel da protonação da quitosana na presença de ácidos sobre a solubilidade mostrou que o grau de ionização depende do pH e do  $pK_a$  do ácido. A solubilização em HCl da quitosana com alto GD e grau de ionização médio em torno de 0,5 corresponde a um pH entre 4,5 e 5. A solubilidade da quitosana em solução 1% ou 0,1mol/L de ácido acético demonstrou que a quantidade de ácido necessariamente depende da quantidade de quitosana a ser dissolvida. A concentração de prótons necessária é no mínimo igual à concentração de unidades  $-NH_2$  envolvidas (Rinaudo, 2006).

A literatura apresenta grandes variações nas propriedades físicas e biológicas dos filmes e membranas de quitosana associadas às características mM e GD que podem ser atribuídas a diversas combinações além da relação mM/GD, mas também à forma de obtenção do polímero, origem, modo de preparação dos filmes ou membranas, temperatura e tempo de secagem e assim por diante. O que se observa é que em valores médios para GD (60% a 80%) e mM (150kmol/kg a 450kmol/kg) o comportamento da quitosana apresenta melhor possibilidade de modulação das propriedades a partir da mistura com outros polímeros e/ou com a reticulação química (Chen, 1996; Hsu *et al.*, 2004; Wenling *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2006; Trung, 2006; Li *et al.*, 2007; Takahashi, 2007).

O grau de desacetilação da quitosana pode ser determinado por diversas técnicas como análise elementar, titulação potenciométrica (Tan *et al.*, 1998; Tolaimate *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2005), espectroscopia de ultravioleta (Wu, 2008). A escolha da técnica depende do processo de purificação, da solubilidade da amostra e da disponibilidade de equipamento.

Em função da rapidez e devido à capacidade da quitosana em formar soluções viscosas o método mais indicado para a determinação da massa molar média da quitosana é a viscosimetria, entretanto pode ser usado cromatografia de permeação em gel, espectrometria de espalhamento de luz entre outros (Santos, 2004).

Com relação às propriedades mecânicas principais a literatura apresenta variações de 600MPa a 2900MPa, 6MPa a 75MPa e 3% a 90%, respectivamente, para o Módulo de elasticidade, a tensão de tração e o alongamento percentual (Rao *et al.*, 2007; Takahashi, 2007; Santos *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2005; Wenling *et al.*, 2005; Bahrami *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 1996). Para o grau de intumescimento a literatura apresenta valores de 200% para a quitosana (Claper *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2004).

O desenvolvimento do conhecimento e aprofundamento científico da quitina e suas aplicações a partir do final do século passado seguiu os períodos dominados por tópicos específicos que podem aproximadamente ser relacionados a (Kumar *et al.*, 2004):

- i) avanços tecnológicos (rotação, corante, absorção de espécies solúveis, de ingredientes funcionais em cosméticos);
- ii) significância bioquímica (coagulação do sangue, restauração de lesão, regeneração óssea, atividade de imunoadjuvante);
- iii) inibição de biosíntese (inseticidas);
- iv) enzimologia da quitina (isolamento e caracterização das quitinases, da sua biologia molecular, da biosíntese e das hidrólises com atividade quitinolítica não específica);
- v) combinações de quitosana com os polímeros naturais e sintéticos (enxertos, complexação de polieletrólitos; misturas, revestimentos);
- vi) uso da quitosana como um suplemento dietético e de preservação de alimentos (produtos dietéticos anticolesterolêmico, revestimentos antimicrobial para grãos e de frutas exóticas).

Hoje, a liberação controlada de fármaco e a engenharia de tecido parecem ser os principais interesses para uma melhor compreensão dos princípios da química da quitina e quitosana, notadamente os de modificações químicas, de biodegradação, de efeitos em vários tecidos, de distribuição em vários órgãos do corpo, de mucoadesão; de associação de quitosana com compostos inorgânicos, e de transformações tecnológicas avançadas (Huang *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2005; Suzuki, 2008).

As considerações chaves que justificam este interesse são que a quitosana é biocompatível, têm capacidade bactericida e não provoca reações adversas quando em contato com células humanas. A quitosana pode ser degradada por enzimas amplamente encontradas no corpo humano, e os oligômeros podem ativar macrófagos e estimular a síntese de ácido hialurônico. Além disso, fornecem blocos de construção para a reconstrução de componentes da matriz extracelular. Por outro lado, a quitosana é reconhecida por células tumorais, e conseqüentemente, pode trazer fármacos ao seu alvo seletivamente. A quitosana é uma substância segura para o organismo humano; conseqüentemente, as aplicações médicas e farmacêuticas podem facilmente ser trabalhadas fora do corpo com esforços comuns de especialistas em vários campos do saber (Kumar et al., 2004; Sarasam, 2008).

Como suporte de imobilização de enzima são usados materiais à base de quitina e quitosana na forma de pós, flocos e géis de diferentes configurações geométricas. Os pós de quitina/quitosana e flocos estão disponíveis como produtos comerciais da Sigma-Aldrich, Fluka, Polymar entre outros e quitosana em pastilha gel (quitopérolas) da Fuji Spinning Co. Ltd. (Tóquio, Japão). A preparação de géis de quitosana é facilitada pelo fato de que a quitosana dissolve prontamente em soluções diluídas na maioria dos ácidos orgânicos, incluindo fórmico, acético, tartárico e ácidos cítricos, para formar soluções viscosas que se precipitam com o aumento do pH e pela formação de complexos ionotrópicos insolúveis em água com polieletrólitos aniônicos. Deste modo, podem ser fabricados géis de quitosana na forma de contas, membranas, camadas, cápsulas, fibras, fibras ocas e esponjas. Geralmente, diferentes formas de acompanhar os tratamentos e modificações são aplicadas para melhorar a estabilidade e durabilidade do gel. Os métodos de preparação de gel de quitosana descritos na literatura podem ser divididos de forma ampla em quatro grupos: método de evaporação do solvente, método de neutralização, método de ligação cruzada e método de gelificação ionotrópica (Krajewska, 2004).

Dentre as diversas possibilidades, a quitosana se apresenta na forma de microesfera, fibra, matriz porosa, membrana densa e porosa, e filme que é função do interesse da aplicação. Dentre as diversas aplicações destacamos a seguintes: liberação controlada de fármacos (Smith *et al.*, 2004; Ta *et al.*, 2008), engenharia de tecido ósseo (Fakhry et al., 2004; Shirotsaki et al., 2005; Shirotsaki et al., 2008), engenharia de tecido nervoso

(Mingyu et al., 2004) e engenharia de tecido epitelial (Fakhry et al., 2004; Neamnark et al., 2008).

Devido a modificações químicas a quitosana apresenta inúmeros derivados relatados na literatura, entretanto este polímero ainda oferece potencial para variadas opções de modificações e melhoria de propriedades para as mais diversas aplicações. Podem ser observadas algumas das várias possibilidades de modificações químicas da quitosana, devido a grande quantidade de grupos amino reativos em sua cadeia, principalmente N-acilação e reação de Schiff. A reatividade dos grupos pendentes ligados a carbonos do anel obedece à ordem decrescente  $C_2 > C_6 > C_3$ , referentes, respectivamente, ao grupo amino da quitosana, ao grupo hidroxila primário, de caráter mais instável e ao grupo hidroxila secundário, que requer um agente desprotonante para ficar pré-disponível à reação (Lima, 2005)

Os filmes de quitosana têm sido normalmente obtidos de maneira bem simples: o polímero é dissolvido em meio apropriado e vertido sobre uma superfície plana. Após a evaporação do solvente o filme é removido por destacamento (Assis *et al.*, 2003).

Uma vez formado o filme, contudo, uma característica limitante ao seu pleno emprego é a sua hidrofiliabilidade. Na quitosana há a predominância dos grupos amino caracterizados por ligações covalentes (N-H), onde a eletronegatividade das ligações gera sítios de alta polaridade tornando assim favorável o rearranjo de moléculas e água em torno desses sítios. Essa característica estrutural, associada aos grupos acetamido, que também são polares e estão presentes na cadeia polimérica, caracterizam um material com alto grau de afinidade e retenção de água (Assis *et al.*, 2003).

Essa elevada taxa de absorção de água traz conseqüências indesejáveis como a redução da estabilidade estrutural do polímero. Ou seja, a presença constante de umidade na estrutura polissacarídeo provoca o intumescimento da matriz com conseqüente desagregação das fibras e destacamento do filme, além da aceleração da degradação por ataque de microorganismos. Uma série de trabalhos tem sido propostos para reduzir essa hidrofiliabilidade pelo uso de agentes de ligação cruzada hidrofóbicos que adicionados à cadeia da quitosana diminuem sua afinidade por moléculas polares (Assis *et al.*, 2003).

Para a administração eficiente de fármacos na cavidade oral são requeridas características especiais como certa adesividade, pois o fluxo salivar dificulta a

permanência da forma farmacêutica no local de ação. A cavidade bucal apresenta condições que a diferenciam de qualquer outra região do corpo humano: *Saliva* fluido complexo que banha continuamente a cavidade bucal e as estruturas nela contidas perfazendo um total de 0,6 a 1,2 litros por dia; *presença de dentes*, o qual é recoberto por uma película denominada película adquirida, que é composta inicialmente por proteínas, glicoproteínas e sais presentes na saliva. A essa película somam-se células descamadas, restos de alimentos e bactérias que, ao se desenvolverem, formam a chamada placa bacteriana; *mucosa bucal*, que se situa entre a pele e a mucosa do trato digestivo, mostrando aspectos de ambas e basicamente existem três tipos: a mastigatória, a de revestimento e da superfície da língua com a presença de papilas e botões responsáveis pela gustação (Ten Cate, 1985; Tenovuo, 1989).

Na terapia medicamentosa, a manutenção da concentração plasmática efetiva requer, na maioria dos casos, a administração do fármaco a curtos intervalos de tempo. As vantagens da utilização de uma forma farmacêutica bioadesiva são: terapia mais eficiente das infecções locais; localização de um fármaco em uma determinada região; aumento do tempo de residência *in situ* da forma farmacêutica; melhora no nível de contato da forma farmacêutica com a superfície de absorção e conseqüente melhora na permeabilidade do fármaco através do tecido; proteção do ingrediente ativo contra a exposição a agentes degradantes existentes no meio e redução na produção de muco; manutenção de um elevado gradiente de concentração entre a superfície absorptiva e a camada de fármaco depositada sobre esta; minimização do trânsito e localização da área de administração; indução de alta velocidade de absorção, eliminando o processo de dissolução do fármaco no fluído biológico (Martini, 1995).

As substâncias mucoadesivas são caracteristicamente hidrofílicas e possuem um grande número de grupamentos hidroxila, carbonila e outros capazes de formar pontes de hidrogênio. Embora ainda haja muita controvérsia sobre a efetividade ou não da adesão, diversas substâncias foram descritas como capazes de promover a adesão: derivados do ácido acrílico como o poliacarbopol e o polimetilmetacrilato, quitosana, lecitinas de plantas, carboximetil celulose e outros derivados da celulose, gelatina, polietileno glicol, polivinilpirrolidona e gomas vegetais (Baby, 2007).

Um sistema ideal para administração bucal deve ser fácil de aplicar, resistir à ação da saliva, aos movimentos da língua e à deglutição. Traduzindo em termos mecânicos, um produto designado para esta aplicação deve ser suficientemente hidrofílico para

permitir a adesão e o íntimo contato com a mucosa oral, porém com uma hidratação limitada para manter a coesão do gel. Este sistema deve possuir também, mecanismos para resistir a cargas de tração e cisalhamento evitando ou retardando sua eliminação do local de ação (Baby, 2007).

As propriedades mucoadesivas da quitosana e microesferas de quitosana foram avaliadas pelo estudo da interação entre mucina e quitosana em solução aquosa por meio de medições turbidimétricas. A forte interação entre a quitosana e a mucina foi detectada. As soluções de polímero quitosana (e PVA como um controle) e mucina foram preparadas com tampão acetato pH 4,5. Foram filtradas com um filtro de papel número 1 e armazenados em frascos de vidro âmbar a 4° C. As amostras foram preparadas através da mistura de diferentes relações de solução de mucina com quitosana ou solução de PVA. As absorvâncias destas amostras foram registradas no comprimento de onda de 500 nm, com um espectrofotômetro UV após 30 minutos de mistura. As absorvâncias dos polímeros individuais e mucina em tampão acetato foram medidas como controles. As absorvâncias a 500 nm foram usadas para dar valores teóricos para um sistema não-interativo. A absorvância teórica para a mistura de mucina e polímero foi calculada a partir das absorvâncias individuais. A diferença da medida de absorvância encontrada e os valores teóricos para a mistura de mucina e polímero também foi calculada. Se não houver interação o valor da diferença de absorvância deve ser zero. Os valores da diferença de absorvância encontrados para a mistura de mucina e quitosana foram muito mais elevados do que aqueles calculados para as soluções individuais. Este resultado sugere que houve uma forte interação entre quitosana e mucina. Em contraste, a diferença de absorvância obtidas a partir da mistura mucina e PVA foram basicamente a mesma que o soma algébrica do valor para as soluções individuais (He, 1998).

### **3.5 Agente Reticulante**

Agentes reticulantes são moléculas de massa molar muito menor que a massa molar da cadeia entre duas ligações cruzadas consecutivas além de apresentar no mínimo dois grupos funcionais reativos que permitam a formação de ponte entre cadeias poliméricas (Berger *et al.*, 2004).

O glutaraldeído (figura 3.7) é uma molécula bifuncional que interage fortemente com compostos que possuem grupos amino na sua estrutura e com menor intensidade com o grupo tiol. O mecanismo de reação do glutaraldeído com os grupos  $\text{NH}_2$  está relacionado com a interação que ocorre entre os grupos aldeído e os grupos amino livres dos compostos originando a formação de uma base de Schiff ( $\text{C}=\text{N}$ ), embora no caso de glutaraldeído (diluído em água) e proteínas acredita-se que ocorra a formação de duplas ligações etilênicas conjugadas. Este fato ganha apoio pela estabilidade desta interação, irreversível e bastante resistente a variações de pH e temperatura, o que normalmente não é observado para interações que envolvem simplesmente uma base de Schiff (Wang *et al.*, 2004).

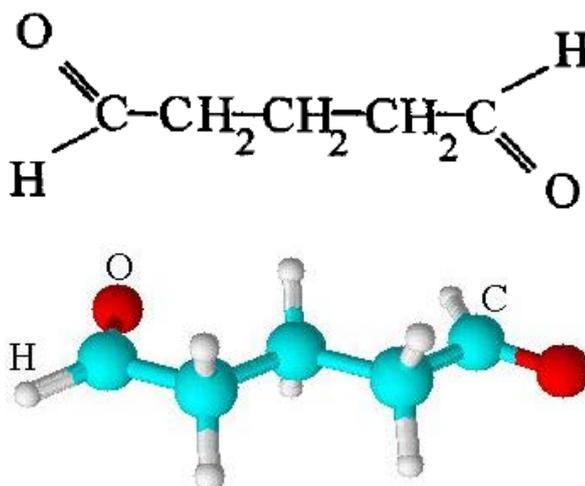


Figura 3.8 Estrutura molecular e tridimensional do glutaraldeído. Fonte: COSTA (2008).

Embora o glutaraldeído nativo seja considerado tóxico; vários substitutos sanguíneos reticulados com glutaraldeído estão disponíveis no mercado ou na avaliação clínica de fase III (Hemopure®, Hemolink® e PolyHeme®), e nenhuma toxicidade óbvia foi encontrada. O resultado da degradação obtido da análise com fluorescência de raios-X mostrou que a base de Schiff ( $\text{C}=\text{N}$ ), relativa ao glutaraldeído e a amina da quitosana durante reação de reticulação, é reduzida no fígado e no baço e se transforma em  $\text{C}-\text{N}$  que é estável *in vivo*, dificultando o retorno ao grupo aldeído. Tal biodegradação reduz

os efeitos colaterais e confirma o uso potencial do glutaraldeído como um reagente de ligação cruzada em aplicações clínicas (Costa, 2008).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

Os materiais utilizados no estudo foram:

- Quitosana alta massa molecular Sigma Aldrich<sup>®</sup>, Grau de desacetilação (GD)=75,6%.
- Digluconato de clorexidina solução 20% Evonik Degussa Brasil Ltda.
- Ácido acético glacial 100% anidro para análise, Merk<sup>®</sup>.
- Glutaraldeído 25% em H<sub>2</sub>O, Sigma Aldrich<sup>®</sup>.

### 4.2 Preparação dos filmes

A metodologia utilizada para obtenção dos filmes de quitosana foi a técnica de evaporação do solvente. Os filmes foram preparados a partir da dispersão de 2% de quitosana de alta massa molar com grau de desacetilação de 75,6% em solução aquosa de ácido acético a 2% sob agitação constante, por 24 horas (Rodrigues, 2009). Em seguida, foi adicionado o fármaco de interesse e homogeneizado por 30 minutos. Foi adicionada a clorexidina em três concentrações diferentes (0,06%, 0,12% e 0,24%), as quais foram definidas a partir da concentração utilizada nos enxaguetórios bucais convencionais e variando para mais (dobro) e para menos (metade). Outro grupo de soluções foi preparado adicionando Glutaraldeído (agente reticulante) na concentração de 3% em massa relativa à massa de quitosana. Foram preparadas também membranas de quitosana sem o fármaco, com reticulação (CR) e sem reticulação (SR), para controle. As soluções foram dispersas em placas de Petri, transferindo um volume de 35 ml em cada, e secas em estufa com circulação de ar por 24 horas na temperatura de 40°C(+2).

Foi também confeccionada outro tipo de membrana, que será denominada neste trabalho por membrana tripla. A membrana tripla também foi sintetizada pela técnica de evaporação do solvente. Foi preparada uma camada com 30 ml de solução de quitosana em ácido acético 2% (Qui) sem fármaco na placa de Petri, e deixada a

temperatura ambiente por 3 dias para sua gelação inicial. Posteriormente foi aplicada mais uma camada de Qui com Clorexidina (Cx) na concentração 0,12%, que também foi deixada a temperatura ambiente por 3 dias. Por fim, foi adicionada a terceira camada de Qui sem fármaco. Após o terceiro dia a temperatura ambiente a membrana tripla foi colocada na estufa com circulação de ar, na temperatura de 40 graus, por 24 horas para secagem final. A membrana tripla foi proposta para alterar o perfil de liberação do fármaco na tentativa de reduzir a velocidade inicial de liberação. Para análise dos filmes e estudo da liberação foram cortados finos filmes de 1,5 cm<sup>2</sup>.

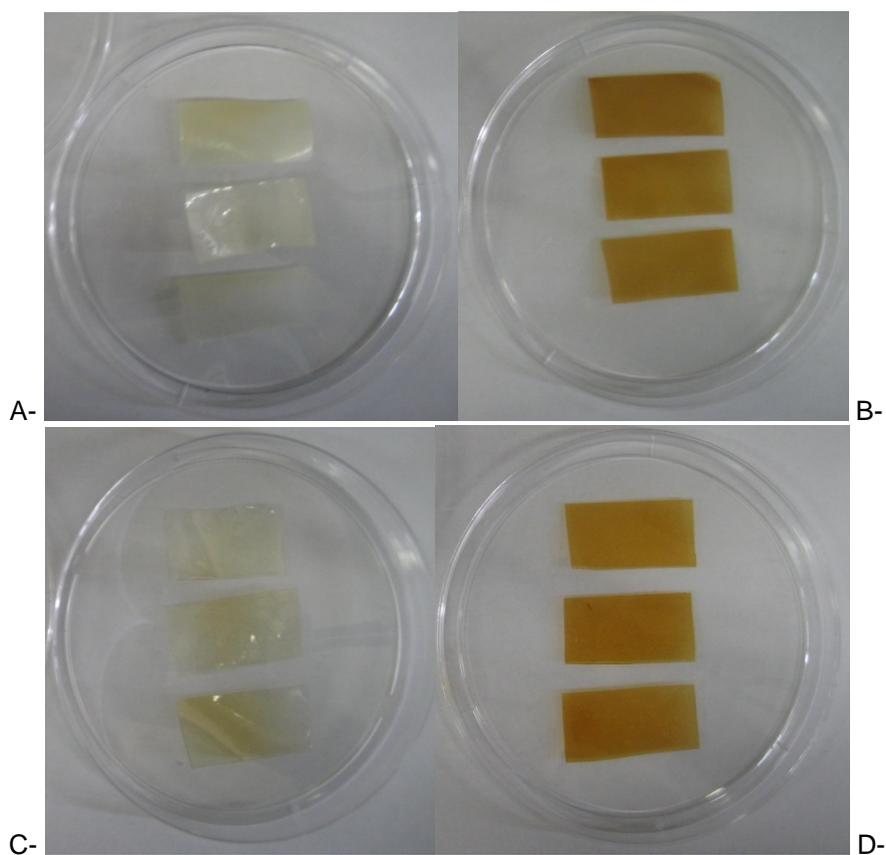


Figura 4.1. Filmes de quitosana cortados para o teste de liberação.

- A - Qui com Cx 0,12% sem reticulação
- B - Qui com Cx 0,12% com reticulação
- C - Qui sem reticulação
- D - Qui com reticulação

### **4.3 Caracterização dos filmes**

#### **4.3.1 Avaliação qualitativa dos filmes**

A avaliação qualitativa e dimensional foi realizada através de observações visuais feitas antes e após a inserção do filme no líquido de liberação. Foi verificada a espessura inicial dos filmes com a utilização um micrômetro Mitutoyo®, de 1", modelo 103-137, para avaliar se houve diferença dentro de uma mesma membrana, e entre as membranas.

#### **4.3.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier - FT-IR**

Os filmes obtidos foram caracterizados pela técnica de espectroscopia de infravermelho ATR na faixa de número de onda de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ . O equipamento utilizado foi Nicolet 380 da ThermoScientific, pertencente ao laboratório de espectroscopia de massa do Departamento de Química da UFMG, usando o cristal de seleneto de zinco (ZnSe). O objetivo da espectroscopia de absorção no infravermelho (IV) é a identificação dos grupos funcionais presentes no material em estudo.

#### **4.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Análise do Espectro de Energia Dispersiva (EDS)**

Os filmes de quitosana puros e os filmes de quitosana com clorexidina 0,12% com e sem reticulação foram recobertos por uma fina camada de ouro e submetidos à análise no microscópio JEOL tipo JSM 6360, com 4-10 Kv. O objetivo da análise foi verificar e comparar a morfologia da superfície dos filmes antes e depois da incorporação do fármaco e dos filmes com e sem reticulação.

Simultaneamente à análise no MEV, no mesmo aparelho, foram realizadas análises do EDS com o objetivo de verificar a variação da composição química das amostras.

#### 4.4 Teste de liberação do agente antimicrobiano

Foram realizados testes de liberação *in vitro* para avaliar semi-quantitativamente a liberação do agente antibacteriano digluconato de clorexidina em água deionizada, seguindo metodologia utilizada por AKAKI (2005) com algumas modificações.

Para análise da liberação do fármaco, foram utilizados recipientes plásticos de 30 ml, com tampa, devidamente rotulados. Os filmes simples foram colocados em 15 ml de água deionizada, de forma a recobrir toda a membrana. Essa proporção foi baseada na metodologia seguida por NORONHA (2010), a qual foi definida levando em consideração o fluxo salivar humano médio. Os recipientes foram mantidos fechados e vedados em banho a 37°C.

As membranas triplas foram inseridas no mesmo tipo de recipiente, porém com 26,6ml de água deionizada. Este volume foi definido proporcionalmente ao aumento das espessuras dos filmes triplos em relação aos simples.

Foram analisadas amostras para cada tempo e concentração, em triplicata. Os filmes foram retirados após 5 e 15 minutos, 1, 2, 4, 8, 24, 48 horas e 7 dias. A concentração do fármaco nas amostras foi mensurada por intermédio de espectrofotometria na região do UV-Vis. O equipamento utilizado foi o Multiskan Spectrum Instrument, version v1.2, Software 2.4.2 RE for Multiskan Spectrum, com a placa Thermo Microtiter 96-well plate pertencente ao Laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais do Departamento de Química da UFMG. O comprimento de onda utilizado para análise da clorexidina foi 255.0 nm (Tabary, 2007). Para calcular as concentrações foi realizada uma diluição padrão da solução de digluconato de clorexidina para obtenção da curva de calibração.

As amostras foram analisadas com e sem centrifugação, com o objetivo de avaliar se as moléculas de quitosana poderiam interferir nos resultados apresentados pela análise no UV-Vis. As amostras foram centrifugadas durante 5 minutos, 4000rpm, no equipamento Eppendorf centrifuge 5415d.

#### 4.5 Teste de Atividade Antimicrobiana

Foram utilizados para o cultivo dos microrganismos caldo BHI (Brain Heart Infusion) (Himedia<sup>®</sup>), Extrato de levedura (Biobrás Diagnósticos<sup>®</sup>), Hemina e Menadiona (Sigma<sup>®</sup>) e ágar Müller Hinton (Biobrás<sup>®</sup>). O digluconato de Clorexidina foi obtido da Degussa<sup>®</sup>.

A atividade antimicrobiana do digluconato de clorexidina, após a sua incorporação ao filme de quitosana, frente a microrganismos presentes na cavidade oral foi avaliada em testes de difusão em ágar frente aos seguintes microrganismos: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a*) (Y4FDC), *Porphyromonas gingivalis* (*P.g*) (ATCC 49417) e *Candida albicans* (*C.a*) (ATCC 28804) doados pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Os microrganismos foram selecionados levando em consideração que *A.a* e *P.g* estão entre os principais agentes etiológicos da doença periodontal, sendo que a *P.g* também está associada à etiologia da halitose, e o *C.a* é um dos microrganismos presente em infecções oportunistas dos pacientes com mucosite oral.

Os microrganismos foram previamente cultivados em caldo BHI (Brain Heart Infusion) em condições de aerobiose por 24 horas a 34° C para *C.a* e BHI suplementado com extrato de levedura (1%), Hemina (1%) e Menadiona (1%) em condições de anaerobiose (10% CO<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>) a 37° C para *A.a* e *P.g* por 48 horas. Após solidificação do ágar Müller Hinton em placas de petri médias, foram adicionados alíquotas de 50 µL da suspensão de cada microrganismo. A escala de turbidez foi ajustada por espectrofotometria (600 nm) de acordo com a escala de McFarland com 0,05 de absorvância que corresponde a 1x10<sup>5</sup> Unidades Formadoras de Colônia (UFC). Os filmes de quitosana foram recortados no formato de discos de 10 mm de diâmetro para mimetizar os discos de papel especificamente preparados para os testes de sensibilidade disponíveis comercialmente. As amostras foram distribuídas em três grupos (tabela 4.1), em triplicata, com Cx nas concentrações: 0%, 0.06%, 0.12% e 0.24% para os filmes simples e 0% e 0.12% para o filme triplo, para cada microrganismo (figura 4.2). Como controle positivo foram utilizados discos de blank contendo 5 µL de solução de digluconato de clorexidina 0,12%. Para *C.a* as medidas dos halos de inibição (mm) foram realizadas após 24h e para *A.a* e *P.g* após 72h, de acordo com as normas CLSI (2006, 2007). Os resultados foram estatisticamente analisados pelo método ANOVA com nível de significância ( $\alpha$ ) em 5%.

TABELA 4.1 Distribuição das amostras nas placas de *petri*.

Microor- ganismo	Grupo 1 Membrana simples sem reticulação	Grupo 2 Membrana simples com reticulação	Grupo 3 Membrana Tripla com reticulação (CR) e sem reticulação (SR)
C. a	1- Qui 2- Qui + Cx 0,06% 3- Qui + Cx 0,12% 4- Qui + Cx 0,24%	5- Qui 6- Qui + Cx 0,06% 7- Qui + Cx 0,12% 8- Qui + Cx 0,24%	9- Qui SR 10- Qui + Cx 0,12% SR 11- Qui + Cx 0,12% CR 12- Qui CR
P. g	1- Qui 2- Qui + Cx 0,06% 3- Qui + Cx 0,12% 4- Qui + Cx 0,24%	5- Qui 6- Qui + Cx 0,06% 7- Qui + Cx 0,12% 8- Qui + Cx 0,24%	9- Qui SR 10- Qui + Cx 0,12% SR 11- Qui + Cx 0,12% CR 12- Qui CR
A. a	1- Qui 2- Qui + Cx 0,06% 3- Qui + Cx 0,12% 4- Qui + Cx 0,24%	5- Qui 6- Qui + Cx 0,06% 7- Qui + Cx 0,12% 8- Qui + Cx 0,24%	9- Qui SR 10- Qui + Cx 0,12% SR 11- Qui + Cx 0,12% CR 12- Qui CR



FIGURA 4.2 Distribuição das amostras na placa de petri.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação qualitativa dos filmes

A partir da análise visual, foi possível verificar que os filmes reticulados apresentavam uma coloração amarelada com tonalidade mais forte quando comparados aos filmes não reticulados. Isto também foi constatado por COSTA, 2008, que relatou este aspecto poder estar relacionado à formação de ligações C=N.

Foi possível observar também que os filmes não estavam homogêneos em relação a sua coloração, apresentando áreas claras e escuras. Isto ocorreu em todos os grupos de filmes, inclusive nos filmes sem a incorporação da clorexidina, reticulados e não reticulados, como podem ser observados na figura 5.1.

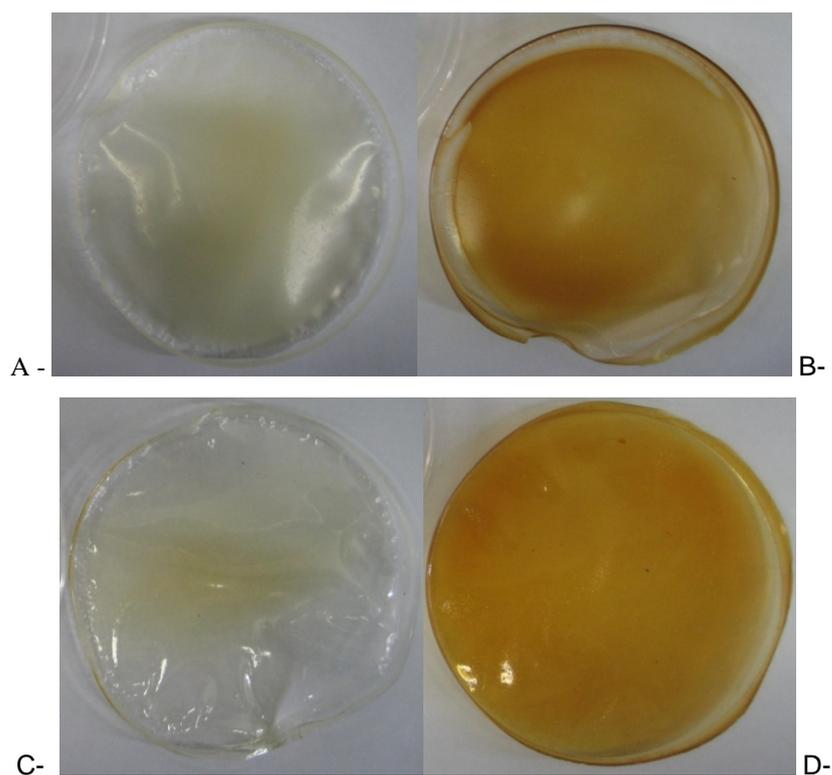


FIGURA 5.1 Membranas de quitosana.

- A - Quitosana com Cx 0,12% sem reticulação
- B - Quitosana com Cx 0,12% com reticulação
- C - Quitosana pura sem reticulação
- D - Quitosana pura com reticulação

Portanto, foram medidas as espessuras de todos os grupos de filmes, nas regiões claras e escuras, em triplicata, com um micrômetro, e as médias dos valores encontrados estão apresentadas na tabela 5.1. Analisando os resultados observa-se que as regiões claras apresentam espessuras menores que as regiões escuras, o que pode justificar em partes a variação da coloração. Esta variação da espessura pode ter sido ocasionada pela secagem em estufa com circulação de ar, que fez com que o polímero se concentrasse mais em uma determinada região. Em relação à distribuição da clorexidina no filme, esta será estudada e avaliada neste trabalho pelas técnicas de FTIR e EDS.

TABELA 5.1 Espessura média dos filmes

Região do filme Descrição do filme	Espessura média dos filmes ( $\mu\text{m}$ )	
	Clara	Escura
Qui SR	150	190
Qui CR	100	180
Q2% Cx 0,06% SR	120	140
Q2% Cx 0,06% CR	120	140
Q2% Cx 0,12% SR	140	190
Q2% Cx 0,12% CR	170	190
Q2% Cx 0,24% SR	130	170
Q2% Cx 0,24% CR	120	140
MT Q2% SR	280	320
MT Q2% CR	270	300
MT Q2% Cx 0,12% SR	290	320
MT Q2% Cx 0,12% CR	270	280

Realizou-se também a análise visual dos filmes antes e após a sua inserção no líquido de liberação e foi verificado um grande aumento de volume apenas dos filmes não reticulados, como ilustrado na figura 5.2. Este resultado foi também relatado por SENEL et al, (2000), que encontrou uma alta capacidade de absorção de água pela quitosana, na faixa de 180% e por RODRIGUES (2009), em cujo trabalho os filmes apresentaram uma hidratação muito rápida, chegando a 70% após poucos minutos. A

razão dos filmes reticulados não apresentarem grau de intumescimento semelhante aos não reticulados foi explicado por PEPAS (2000): “a proporção de ligações cruzadas é um dos fatores mais importantes que afetam o intumescimento dos hidrogéis. É definida como a razão entre a quantidade de matéria do agente reticulante e a quantidade de matéria das unidades de repetição do polímero. Quanto maior a razão de ligações cruzadas, maior quantidade de agente reticulante é incorporada a estrutura do hidrogel, tornando a estrutura mais rígida. Conseqüentemente, o intumescimento será menor, se comparado com o mesmo hidrogel, quando este apresenta menor razão de ligações cruzadas”.

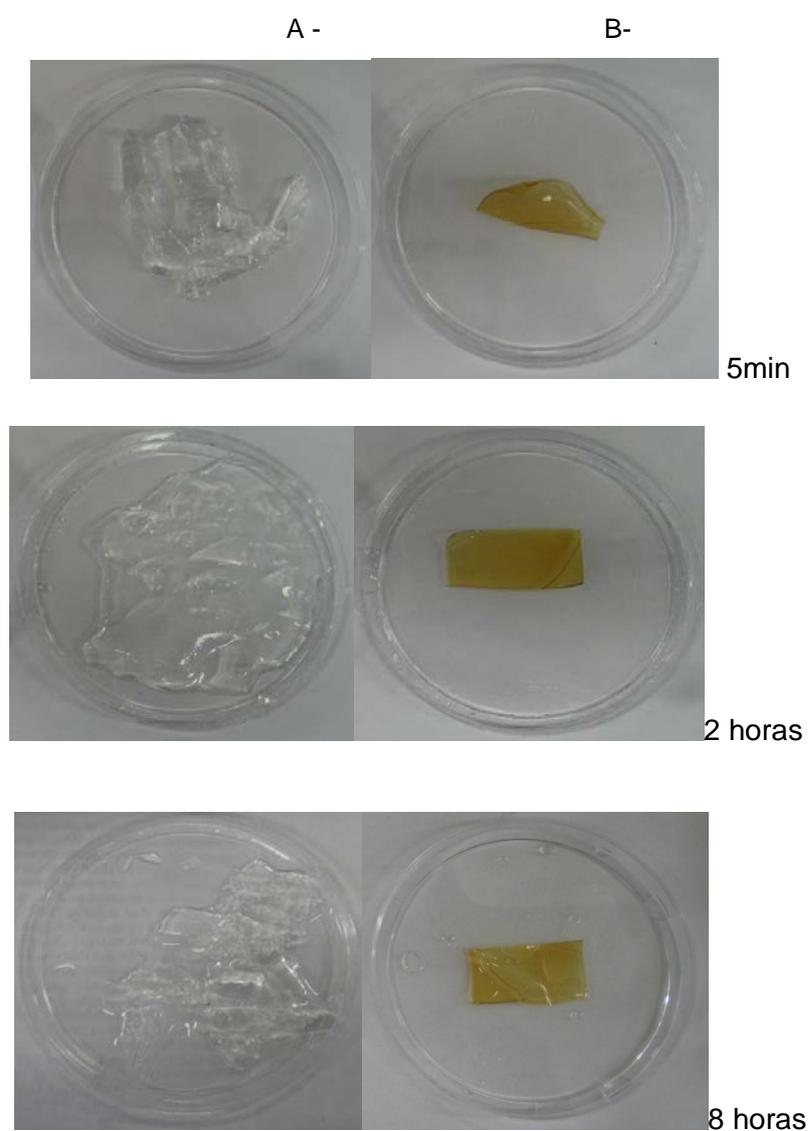


FIGURA 5.2. Fotografia das amostras após inserção no líquido de liberação nos tempos 5 minutos, 2 e 8 horas: A- não reticuladas B- reticuladas.

## 5.2 Análise Estrutural dos Filmes

### 5.2.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier - FT-IR

A figura 5.3 apresenta os espectros de infravermelho da quitosana obtidos a partir de filmes com e sem reticulação, apresentando as bandas de absorção dos grupos funcionais característicos do polímero, que estão relacionados na tabela 5.2.

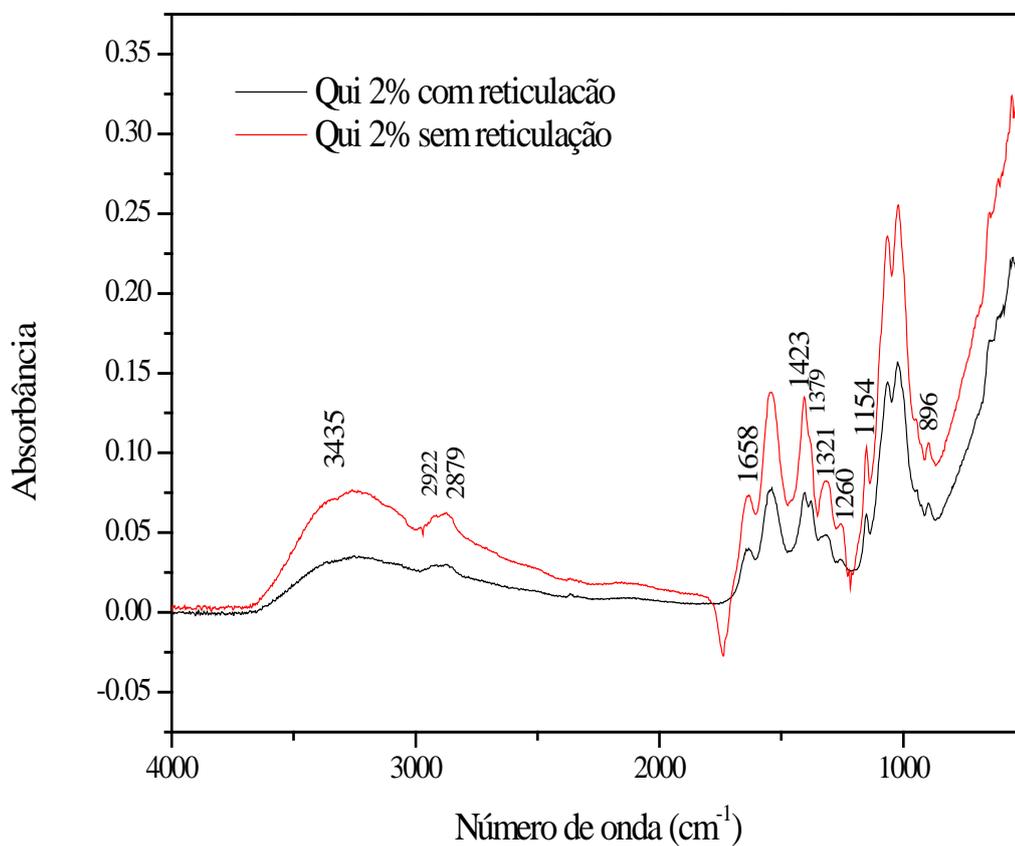


FIGURA 5.3 Espectros FTIR dos filmes de quitosana com e sem reticulação.

TABELA 5.2 Números de onda e grupos característicos da quitosana.

<b>MATERIAL</b>	<b>BANDAS (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>GRUPOS QUÍMICOS ASSOCIADOS</b>
Quitosana	3570 – 3200 3450	v OH ligado v N-H <sub>2</sub>
Quitosana	2955 – 2845 2922	v C-H (assimétrico)
Quitosana	2878	v C-H (simétrico)
Quitosana	1900 – 1500 1658	Amida I: vC=O
Quitosana	1650 – 1550 1658 – 1630	δN-H (I)
Quitosana	1321	v C-N (primária)
Quitosana	1260	v C-N (secundária)
Quitosana	1154 e 896	v COC (estrutura sacarídea - β-1-4)
Quitosana	1160 1154	v - ponte de oxigênio
Quitosana	1300 – 1000 1070	v C-O (cíclico)
Quitosana	1570-1515 1560	δ N-H (II)
Quitosana	1465 1423	δOH e CH <sub>2</sub> (tesoura)
Quitosana	1340 – 1250 1379	δC-N (terciária)
Quitosana	1030	v C-O (cíclico)
Quitosana	897	v C-O
Quitosana	1640 – 1690	v C=N (fraco) (Base .Schiff)

v=estiramento; δ= dobramento (deformação) Fonte: WANG et al., 2004.

Foram identificados nos espectros (figura 5.3) os valores dos picos de acordo com a tabela 5.2 e com a descrição feita por COSTA, 2008, que utilizou o mesmo material de partida. “O espectro apresenta a estrutura química do polissacarídeo parcialmente desacetilado, evidenciando as estruturas glicosamina e acetamido. A quitosana é uma amino glicose caracterizada por uma pequena porção de acetatos ligada à amida. O

espectro de infravermelho apresenta um amplo pico de absorção em  $3435\text{cm}^{-1}$ , que está associado ao N-H, a ligação de hidrogênio e ao estiramento O-H. Na banda relativa ao estiramento do C-H o pico de  $2922\text{cm}^{-1}$  (com menor intensidade) corresponde à vibração assimétrica e o pico de  $2879\text{cm}^{-1}$  (com maior intensidade) à vibração simétrica. Além disso na banda característica da deformação angular do  $\text{CH}_2$  (tesoura) aparece o pico de  $1423\text{cm}^{-1}$ . Devido ao grau de desacetilação da quitosana aparece o pico da ligação amida e o estiramento da ligação C=O em  $1658\text{cm}^{-1}$ . Os picos de  $1321\text{cm}^{-1}$ ,  $1260\text{cm}^{-1}$ ,  $1379\text{cm}^{-1}$  correspondem às fortes vibrações de dobramento da ligação N-H primária, secundária e terciária, respectivamente. As vibrações fora do plano da ligação C-H correspondente à estrutura sacarídea aparecem em  $1154\text{cm}^{-1}$  e  $896\text{cm}^{-1}$ .

Comparando os espectros dos filmes de quitosana sem reticulação e o com reticulação, mostrados na figura 5.3 observa-se a diminuição de intensidade e o alargamento de algumas bandas.

A TABELA 5.3 apresenta as bandas de absorção dos principais grupos funcionais da clorexidina. Analisando comparativamente as tabelas 5.2 e 5.3 verifica-se que o grupo CH- ligado a anel aromático é o único grupo característico da clorexidina que apresenta banda no espectro de FTIR com valores distintos dos grupos funcionais da quitosana. Sendo assim, a banda  $830\text{-}805\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde ao -CH ligado a anel aromático, foi a banda utilizada neste trabalho para verificar a presença do fármaco incorporado ao filme polimérico de quitosana. Foram realizadas as análises no FTIR para todos os grupos de amostras, variando as concentrações do agente antibacteriano, e nos filmes de quitosana reticulados e não reticulados, em triplicata. Deve ser ressaltado que as análises foram feitas tanto nas regiões claras quanto nas regiões escuras das membranas, as quais foram descritas nas análises visuais da seção 5.1.

Na FIGURA 5.4 pode-se observar que não houve uma alteração significativa nos espectros do polímero após a incorporação do fármaco. Ao analisar comparativamente os espectros da quitosana antes e após a incorporação, é possível verificar que as principais bandas de absorção foram mantidas após a incorporação sugerindo que a presença do agente antibacteriano manteve a estrutura química original da quitosana sem alterações significativas. Isto se deve à pequena concentração do fármaco e ao fato da clorexidina e a quitosana apresentarem várias bandas de absorção em comum. Este fato também foi observado por AKAKI (2005), no estudo que avaliou a

incorporação da clorexidina e do triclosan à cimentos resinosos, concluindo que as bandas de absorção do cimento resinoso predominavam no espectro do FTIR após a incorporação dos agentes antibacterianos.

TABELA 5.3 Números de onda e grupos característicos da clorexidina.

<b>Bandas características da Cx (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Grupos químicos associados</b>
3400-3300	N-H iminas
2962-2850	CH
1650-1550	N-H amina
1485-1445	CH <sub>2</sub>
1096-1089	Cl- ligado a grupo aromático
830-805	CH- ligado a grupo aromático

Fonte: SILVERSTEIN, 1994; MOFFAT, 1986

Verificou-se a presença da banda CH- ligado a grupo aromático nos espectros do FTIR das amostras no número de onda de 821,56 cm<sup>-1</sup>. Ocorreu uma variação da intensidade da banda, quando ocorreu variação da concentração da clorexidina incorporada ao filme (FIGURA 5.4), porém é possível fazer apenas uma comparação qualitativa, não quantitativa. A presença da banda característica também foi observada quando a análise foi realizada nas regiões claras e nas regiões mais escuras que foram identificadas na análise visual (FIGURA 5.5). Isso sugere que a heterogeneidade do filme, no que diz respeito a sua coloração, não está relacionada à presença ou ausência da clorexidina em cada região. Contudo não podemos afirmar a partir desta análise que a clorexidina está homogeneamente distribuída em toda a área da membrana.

A análise da membrana tripla de quitosana com clorexidina 0,12% sem reticulação não apresentou a banda característica do fármaco. Sugere-se que o aumento da

quantidade de quitosana em relação à quantidade de clorexidina que ocorre nestes filmes, tenha dificultado o aparecimento da banda do grupo funcional. Pois, de acordo com outras análises realizadas neste estudo, a clorexidina estava presente no filme. No mesmo tipo de filme, porém reticulado, a banda característica do fármaco foi verificada no espectro do FTIR (FIGURA 5.6), porém estes filmes apresentavam espessuras menores do que os filmes sem reticulação (TABELA 5.1). Considerando as especificações do equipamento, para o prisma de ZnSe, a profundidade de penetração é de 1,66  $\mu\text{m}$ , o que pode justificar a não detecção da banda no espectro da MT.

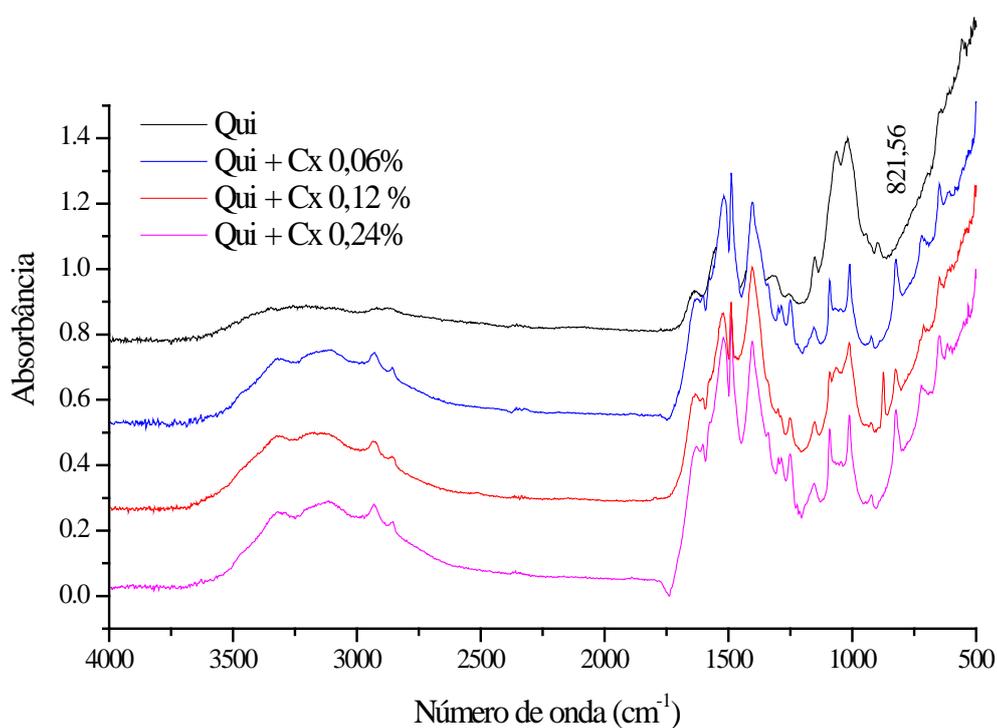


FIGURA 5.4 Espectro FTIR dos filmes reticulados de quitosana pura e com clorexidina 0,06%, 0,12% e 0,24%.

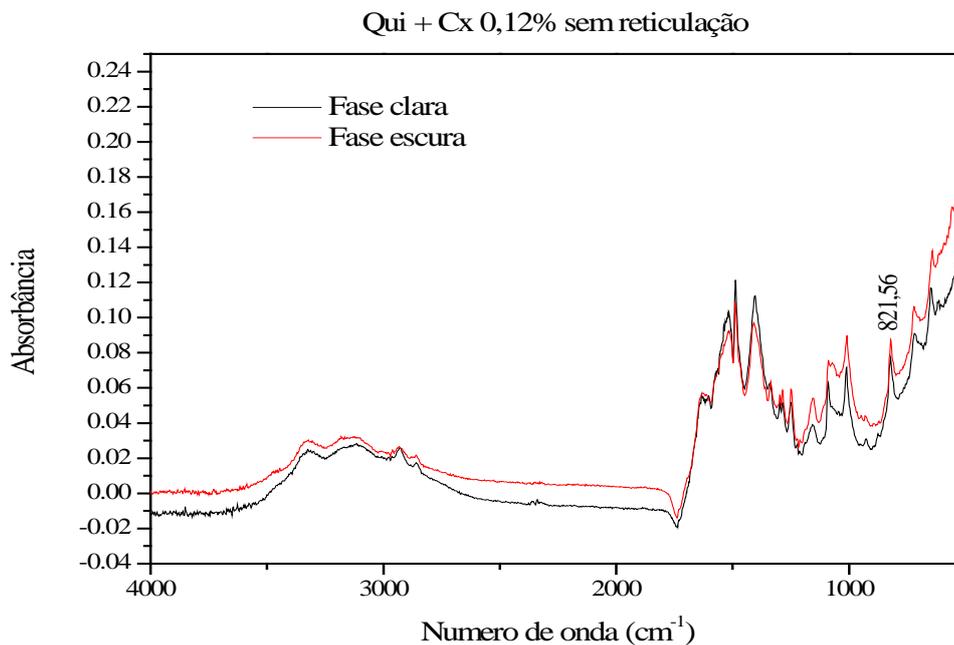


FIGURA 5.5 Espectro FTIR da fase clara e da fase escura do filme não reticulado de quitosana com clorexidina 0,12%.

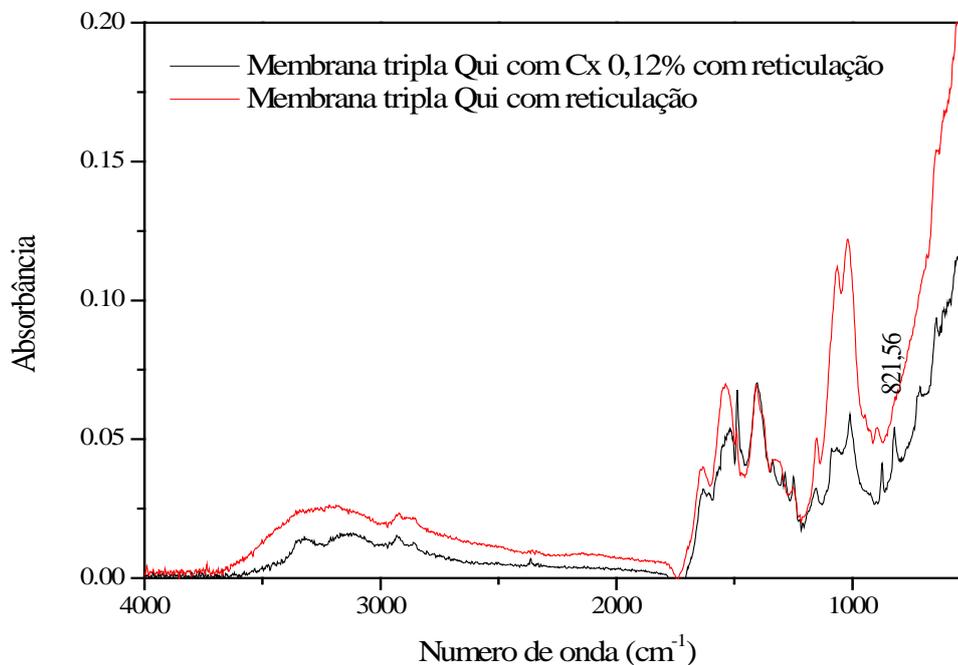


FIGURA 5.6 Espectro FTIR - membrana tripla. Quitosana com clorexidina 0,12% reticulada em comparação com quitosana pura reticulada.

### 5.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

Os filmes de quitosana com e sem reticulação e os filmes de quitosana com incorporação de clorexidina 0,12% com e sem reticulação foram submetidos à análise no MEV com o objetivo de observar possíveis alterações morfológicas após a incorporação do agente antimicrobiano e do agente reticulante. A análise no EDS foi proposta para avaliar a distribuição do fármaco nas amostras.

Foi observada durante análise no MEV que os filmes apresentavam em grande parte uma estrutura homogênea, porém em algumas regiões foi detectada a presença de fases mais claras (FIGURA 5.7 A e B).

Os filmes de quitosana com incorporação do fármaco não apresentaram nenhuma diferença morfológica perceptível em relação aos filmes de quitosana pura (FIGURA 5.7 A e B), assim como os filmes de quitosana com reticulação em relação aos não reticulados.

A análise no EDS apontou uma diferença entre os filmes puros e os com incorporação do agente antimicrobiano, pois o elemento cloro só estava presente no espectro dos filmes que continham a clorexidina, como pode ser observado na figura 5.8. A detecção da presença da clorexidina foi pelo cloro, pois se trata de um constituinte exclusivo do agente antibacteriano neste sistema.

As áreas claras dos filmes de quitosana analisadas no EDS não apresentaram diferença na composição química em relação ao restante do filme como pode ser verificado na FIGURA 5.8. As áreas claras dos filmes de quitosana com clorexidina também não apresentaram diferença na composição química em relação ao restante do filme, foi apenas observado que o pico do elemento cloro estava bem mais elevado no espectro do EDS da área mais clara, principalmente no filme de quitosana com clorexidina sem reticulação (FIGURA 5.8).

A FIGURA 5.7 (C e D) representa micrografias em maior aumento de um dos pontos mais claros presentes nos filmes de quitosana que indicam ser uma aglomeração do polímero, isto ocorreu nos filmes com e sem Cx, reticulados e não reticulados. Sendo assim, é possível sugerir, que a presença dessas regiões mais claras correspondam apenas a regiões de maior concentração do polímero, ou mesmo regiões nas quais a

quitosana não estava totalmente dissolvida, ou de quitina, já que o GD da quitosana utilizada foi de 75,6%. E que este fato, pode levar também a uma maior retenção e concentração do fármaco.

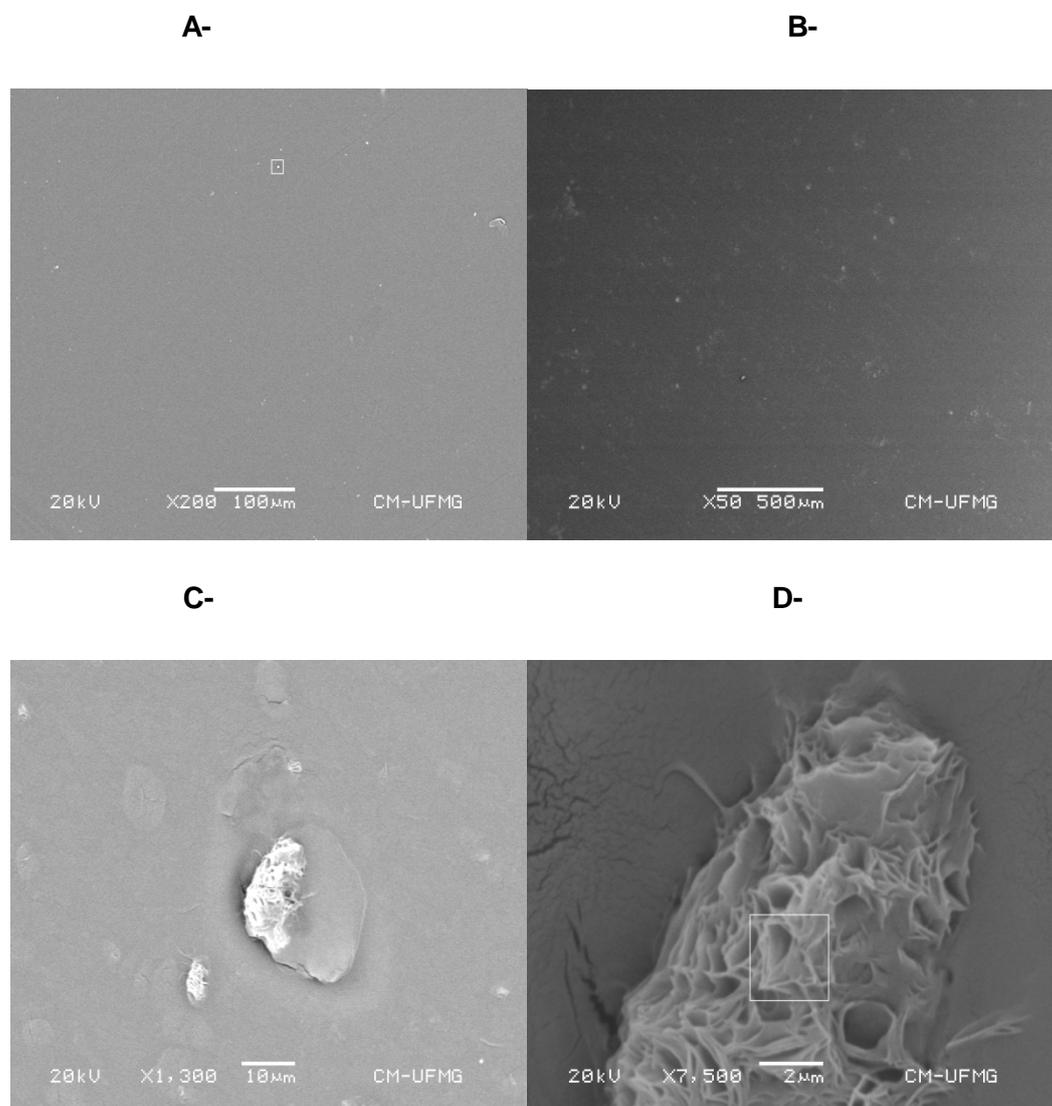


FIGURA 5.7 Micrografia do filme de quitosana sem reticulação

- A- Qui sem clorexidina
- B- Qui com Cx 0,12%
- C- Fase clara aumento 1
- D- Fase clara aumento 2

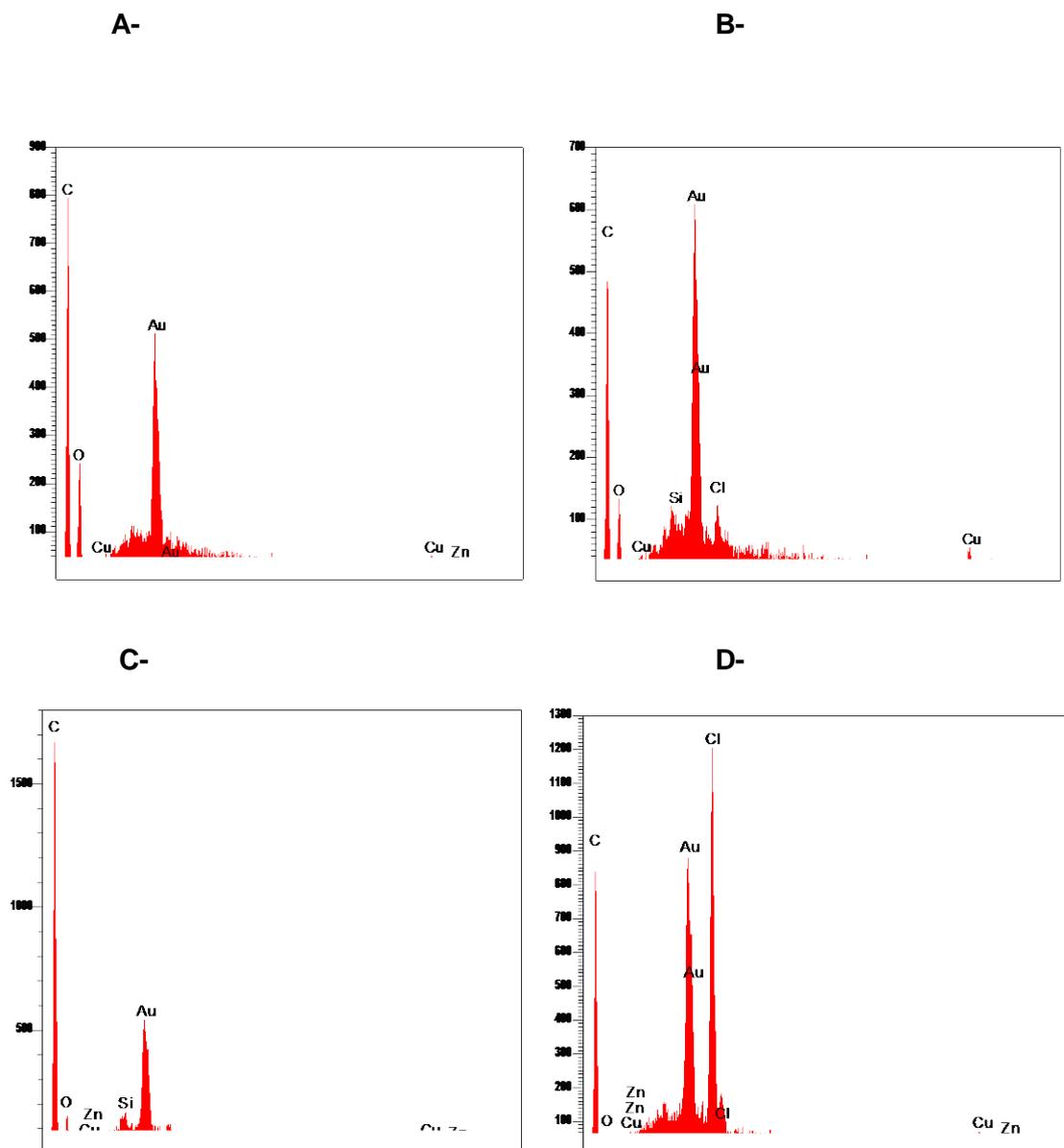


FIGURA 5.8 EDS dos filmes de quitosana sem reticulação

- A- Geral – Qui
- B- Geral – Qui com Cx 0,12%
- C- Fase clara – Qui
- D- Fase Clara – Qui com Cx 0,12%

### 5.3 Estudo da liberação

Para obter a correlação da absorvância com a concentração de clorexidina liberada foi realizada uma curva de calibração, a partir da diluição da solução padrão iniciando da concentração 0,06%.

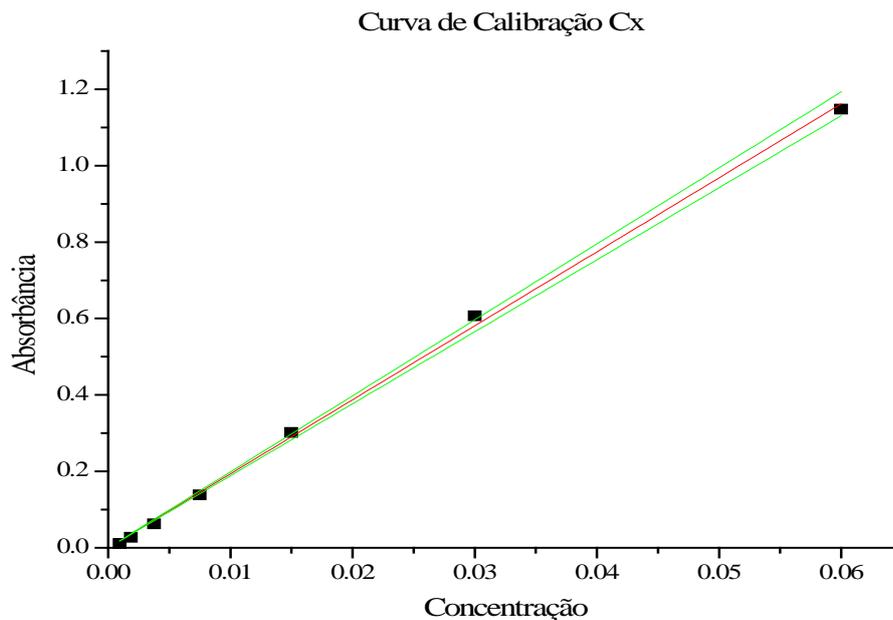


FIGURA 5.9 Curva de Calibração – Absorvância UV-vis em função da concentração de clorexidina. Intervalo de confiança = 95%,  $R^2 = 0,9991$ .

O perfil de liberação da clorexidina está apresentado nas FIGURAS 5.10 e 5.11 que apresenta a concentração do fármaco liberado em função do tempo, para todos os grupos avaliados, reticulados e não reticulados, centrifugados e não centrifugados. Foi possível perceber as diferenças de concentração da Cx no meio de liberação, coerentemente, entre os filmes de concentrações distintas 0,06%, 0,12% e 0,24%, reticulados e não reticulados. De uma maneira geral, observou-se que não ocorreu grande diferença estatisticamente significativa entre as amostras centrifugadas e não centrifugadas, e entre as amostras reticuladas e não reticuladas. Os valores de concentração encontrados no meio de liberação após 7 dias para os filmes de

quitosana 2% sem a incorporação do fármaco, reticulado e não reticulado foi de 0,002888% e 0,001676% respectivamente, atuando como controle negativo.

A partir da análise dos gráficos verificou-se o perfil de liberação da clorexidina incorporada aos filmes de quitosana, que apresentou uma alta taxa de liberação no período inicial, e uma estagnação após 24 horas. Levando em consideração estes resultados iniciais, foi proposta a confecção da membrana tripla (MT), como descrita na seção 4.2, na tentativa de reduzir a taxa inicial de Cx liberada. A MT foi analisada juntamente com a membrana simples para controle. Foi determinada para esta segunda fase do estudo, por ser um valor intermediário, a incorporação da Cx na concentração 0,12%, e como ocorreu uma estabilização na concentração da Cx, as leituras das concentrações no líquido de liberação foram realizadas nos tempos 5 e 15 minutos, 1, 2, 4 e 8 horas. A MT foi inserida no volume de 26ml de água DI, para compensar o seu maior grau de intumescimento, já que apresenta uma espessura maior.

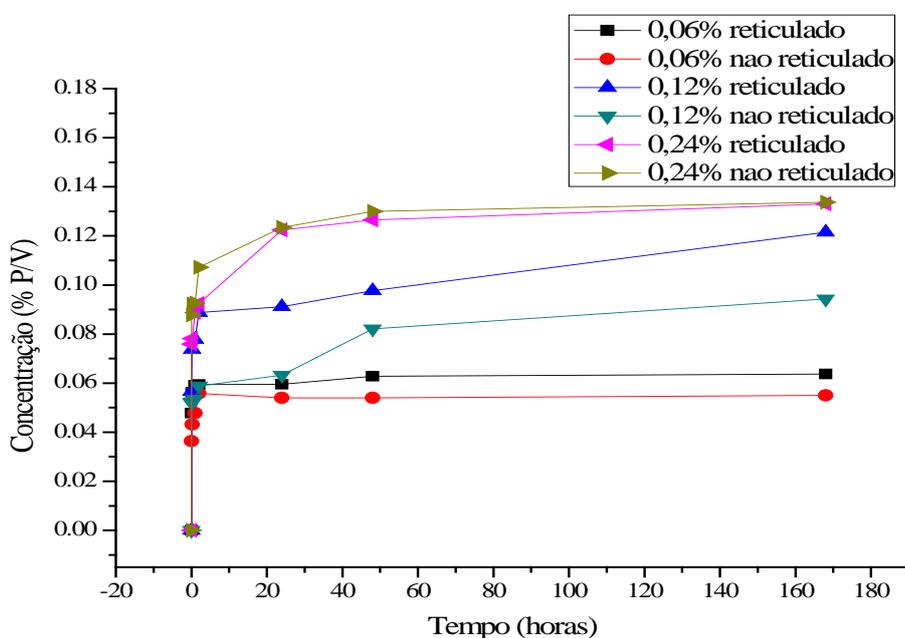


FIGURA 5.10 Concentrações de Cx no líquido de liberação não centrifugado, nos tempos 5 e 15 minutos, 1, 2, 24, 48 horas, e 7 dias, a partir de filmes com concentração de Cx de 0,06%, 0,12% e 0,24%.

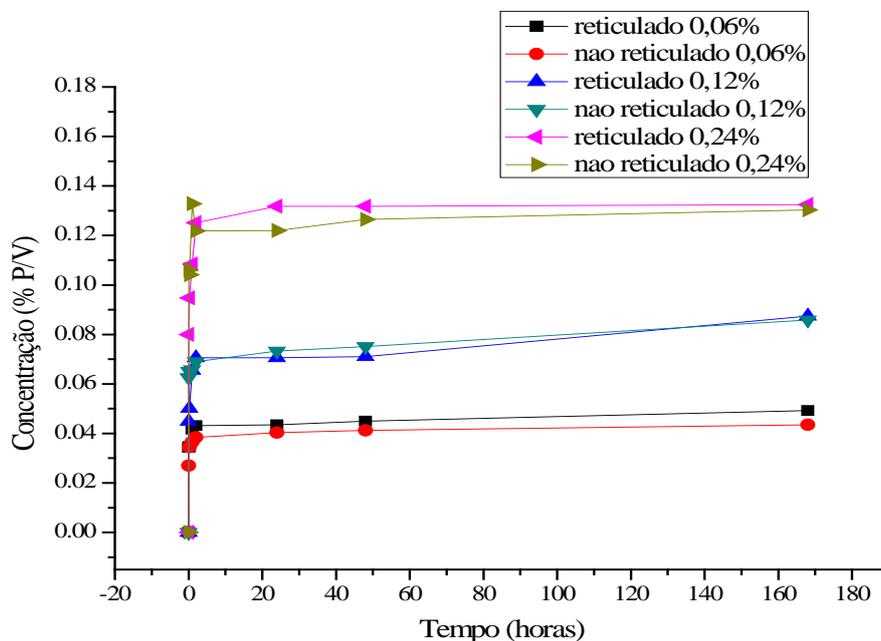


FIGURA 5.11 Concentrações de Cx no líquido de liberação centrifugado, nos tempos 5 e 15 minutos, 1, 2, 24, 48 horas, e 7 dias, a partir de filmes com concentração de Cx de 0,06%, 0,12% e 0,24%.

Os resultados obtidos no teste de liberação com a membrana tripla estão representados na figura 5.12, a qual mostra o perfil de liberação da clorexidina a partir dos filmes com concentração de Cx 0,12%, reticulado e não reticulado, analisados com e sem centrifugação. Ocorreu uma maior liberação pela MT sem reticulação, quando o líquido de liberação foi centrifugado, em seqüência, pela MT reticulada também centrifugada. As MTs reticuladas e não reticuladas, não centrifugadas, apresentaram liberação semelhante.

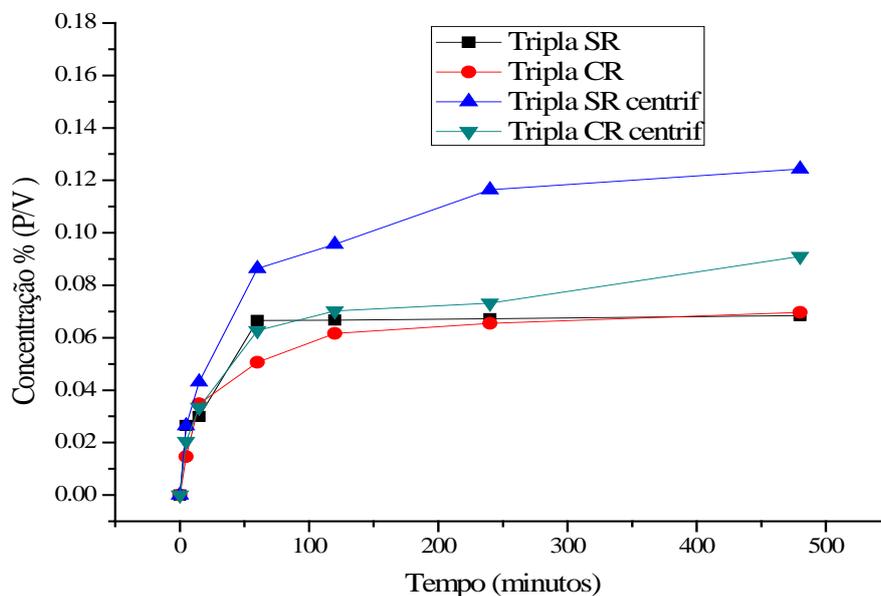


FIGURA 5.12 Concentrações de Cx no líquido de liberação, centrifugado e não centrifugado, nos tempos 5 e 15 minutos, 1, 2, 4 e 8 horas a partir dos filmes triplas com Cx 0,12%, reticulado e não reticulado.

O alto grau de intumescimento dos filmes não reticulados, descrito na seção 5.1 deste trabalho, acarretou um grande aumento de volume do mesmo, tornando inviável a sua aplicação como dispositivo de liberação controlada de fármacos na cavidade oral, sendo mais viável a utilização dos filmes reticulados. Portanto, é apresentada uma análise comparativa entre os filmes reticulados simples e triplas, com e sem centrifugação (figura 5.13). A figura 5.13 apresenta o perfil de liberação da clorexidina, avaliando sua concentração em função do tempo, nos intervalos de 5 e 15 minutos, 1, 2, 4 e 8 horas, a partir dos filmes reticulados simples e triplas com Cx 0,12%, analisados com e sem centrifugação. A avaliação geral dos resultados apresentados nesta figura mostrou que houve uma redução na taxa inicial de Cx liberada a partir das membranas triplas.

Os resultados obtidos para este teste da liberação do agente antimicrobiano foram analisados por métodos estatísticos. Comparações entre as médias foram feitas utilizando a análise de variância (ANOVA) com nível de significância ( $\alpha$ ) em 5% (Figura 5.14)

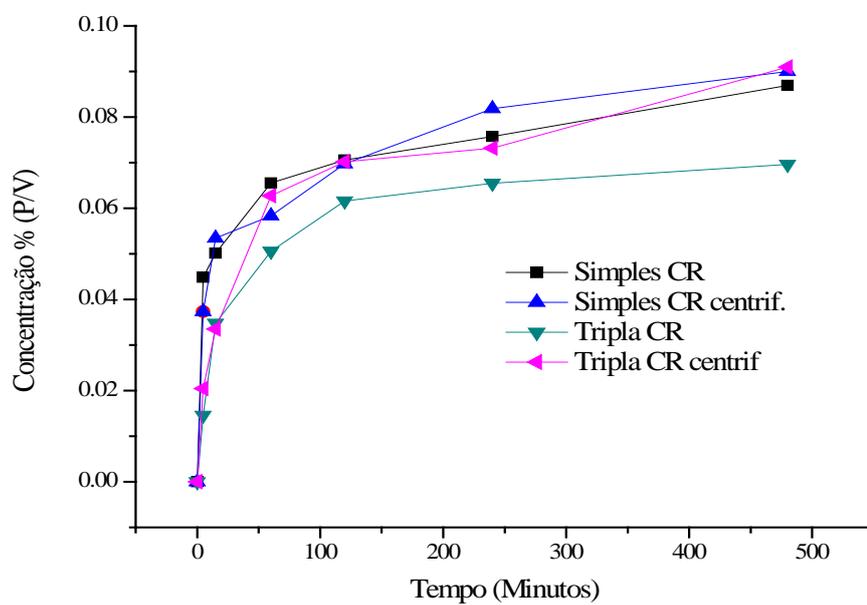


FIGURA 5.13 Concentrações de Cx no líquido de liberação, centrifugado e não centrifugado, nos tempos 5 e 15 minutos, 1, 2, 4 e 8 horas a partir de filmes reticulados simples e tripos com Cx 0,12%.

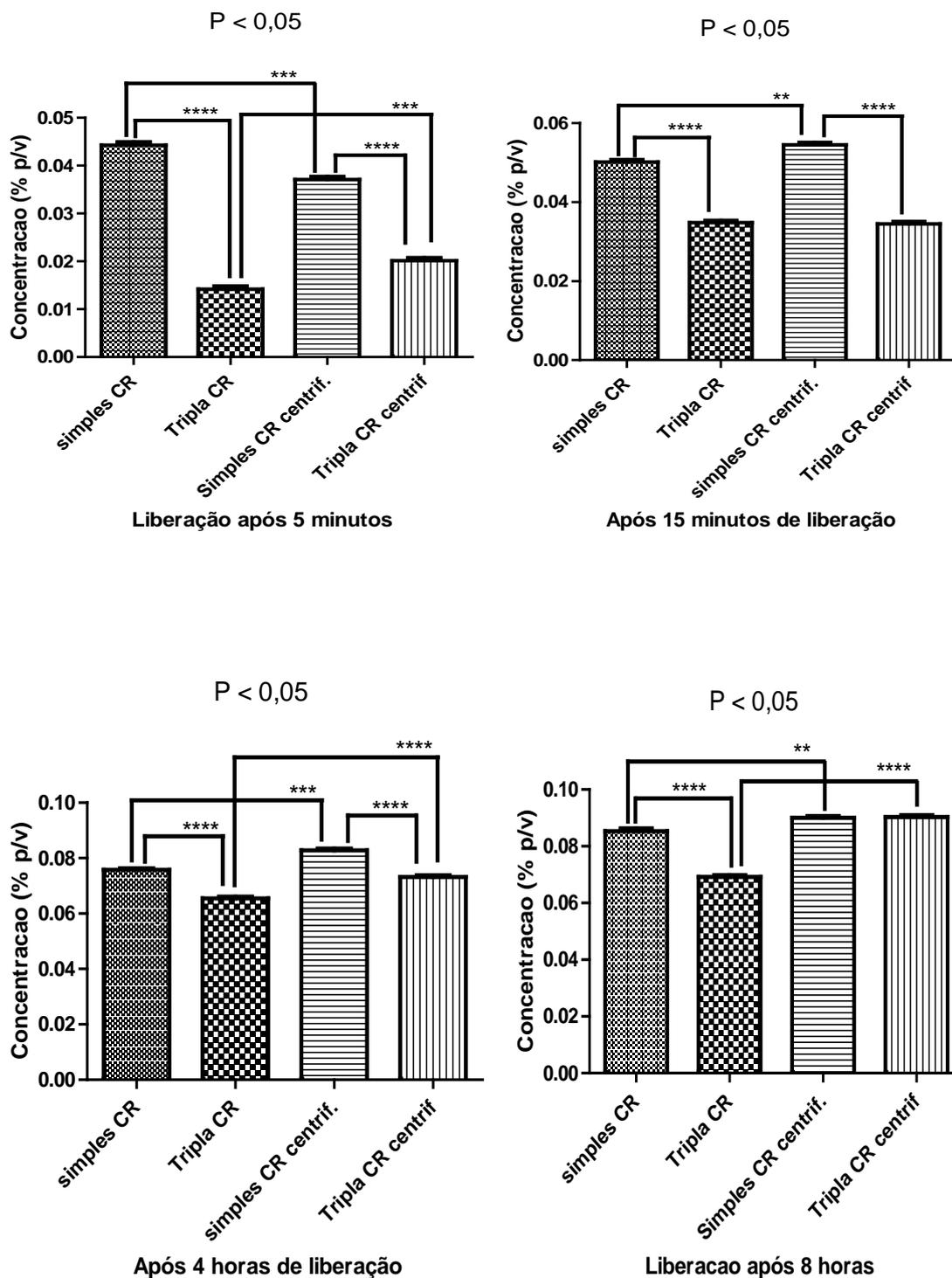


FIGURA 5.14 Concentrações de Cx no líquido de liberação, centrifugado e não centrifugado, nos tempos 5 e 15 minutos, 1, 2, 4 e 8 horas a partir de filmes reticulados simples e tripos com Cx 0,12%.

Analisando os dados apresentados na figura 5.14, pode-se relatar que nos tempo de 5 e 15 minutos, os filmes triplos apresentaram uma liberação significativamente menor que os filmes simples, tanto na análise do líquido de liberação centrifugado como no não centrifugado. Porém essa diferença permaneceu até o tempo de 8 horas apenas quando o meio de liberação foi analisado sem centrifugação.

Os valores da concentração da clorexidina apresentaram uma seqüência com menor variação quando o meio de liberação não foi centrifugado, mas os valores de liberação foram mais elevados quando os meios foram avaliados com centrifugação. Sendo assim, não podemos afirmar qual técnica apresenta resultados mais confiáveis. Na literatura encontram-se metodologias nas quais foram realizadas filtrações do meio de liberação antes da análise no UV-Vis (Senel *et al.*, 2000) e outras em que esta não foi realizada (Rodrigues, 2009).

Avaliando os resultados, verificou-se que a membrana tripla atingiu o objetivo de reduzir a liberação acentuada da clorexidina nos minutos iniciais e manteve a liberação por 8 horas. Essa quantidade inicial do fármaco resulta de uma liberação imediata, que é designada com "burst effect" e que foi explicada por LOPES *et al.* (2005) como sendo motivada ou pela liberação do fármaco existente à superfície do sistema ou por alterações que se verificam na estrutura do sistema com conseqüente liberação imediata do fármaco seguido de liberação mais lenta. SENEL *et al.* (2000), avaliando a liberação da clorexidina a partir de filmes de quitosana preparados de maneira diferente deste trabalho, e com outro agente reticulante, relatou liberação por 4 horas.

## **5.4 Teste de atividade antimicrobiana**

### **5.4.1 *Candida albicans* (C.a)**

Após 24 horas de incubação, cada placa foi examinada e observaram-se halos de inibição uniformemente circulares (FIGURA 5.15). Os diâmetros dos halos de inibição total (analisadas a olho nu) foram mensurados, incluindo o diâmetro do disco. Os halos foram medidos em milímetros usando um paquímetro encostado na parte de trás da placa de petri invertida. Os valores encontrados estão dispostos na TABELA 5.4.

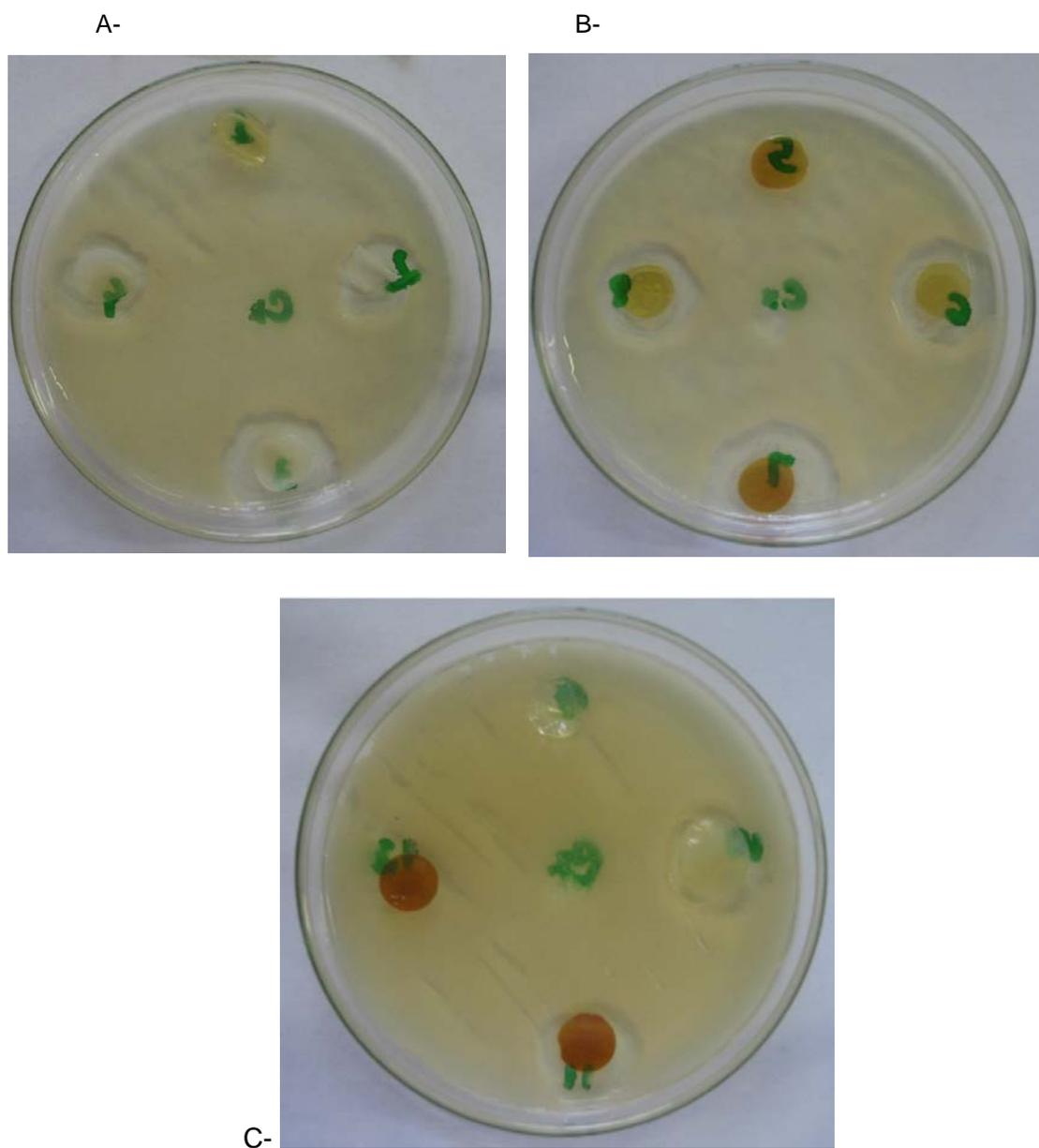


FIGURA 5.15 Fotografia das placas com *Candida albicans* após incubação por 24 horas.

- A- Discos de quitosana sem reticulação
- B- Discos de quitosana com reticulação
- C- Discos de quitosana com e sem reticulação (membrana tripla)

TABELA 5.4 Resultados dos diâmetros dos halos de acordo com cada grupo e amostra para *Candida albicans*.

Grupos	Amostras	Média do diâmetro dos halos (mm)
Grupo 1 Membrana simples sem reticulação	1- Qui 2- Qui + Cx 0,06% 3- Qui + Cx 0,12% 4- Qui + Cx 0,24%	1- Não formou halo 2- 17,0 3- 23,0 4- 26,66
Grupo 2 Membrana simples com reticulação	5- Qui 6- Qui + Cx 0,06% 7- Qui + Cx 0,12% 8- Qui + Cx 0,24%	5- Não formou halo 6- 16,0 7- 23,66 8- 26,0
Grupo 3 Membrana Tripla com reticulação (CR) e sem reticulação (SR)	9- Qui SR 10- Qui + Cx 0,12% SR 11- Qui + Cx 0,12% CR 12- Qui CR	9- Não formou halo 10- 21,0 11- 18,0 12- Não formou halo

Os resultados obtidos para o teste de difusão em ágar com C.a foram analisados por métodos estatísticos. Comparações entre as médias foram feitas utilizando a análise de variância (ANOVA) com nível de significância ( $\alpha$ ) em 5% e estão apresentados nas figuras 5.16 e 5.17.

Os resultados mostraram que nos filmes de quitosana com e sem reticulação, que não continham o agente antimicrobiano, não houve a formação do halo de inibição. Observou-se também que não houve diferença significativa entre o tamanho do diâmetro dos halos formados pelas amostras que continham a mesma concentração

do fármaco, sendo um grupo reticulado e o outro não reticulado, isso ocorreu em todas as concentrações de clorexidina avaliadas, conforme FIGURA 5.16.

Analisando os dados obtidos, comparando as concentrações de clorexidina incorporadas no filme, verificou-se que houve um aumento significativo entre o tamanho do diâmetro do halo formado pelas amostras com 0,06% de clorexidina para os formados pelas amostras com 0,12% de clorexidina. Isto foi constatado para os filmes reticulados e não reticulados. Este resultado já poderia ser esperado, pois a concentração de clorexidina foi dobrada de uma amostra para a outra. Contudo, não houve aumento estatisticamente significativo entre as amostras de 0,12% e 0,24% de clorexidina, conforme gráfico 5.16. Sendo assim, podemos sugerir que para essa determinada situação de ensaio *in vitro* e para a *Candida albicans*, a concentração de 0,06% de clorexidina já seria eficaz, porém a concentração de 0,12% poderia ser mais efetiva e a concentração de 0,24% já seria uma dose além da necessária. Esta análise, apesar de não poder ser extrapolada para a situação clínica, deve ser comentada pela importância de se evitar a resistência bacteriana e os efeitos adversos que a clorexidina causa na cavidade bucal em doses elevadas.

Avaliando os resultados encontrados para as membranas triplas, foi constatado também que não houve formação de halo para os filmes que não continham o fármaco, tanto o reticulado como o não reticulado. Não houve diferença significativa entre o tamanho do diâmetro dos halos dos filmes com 0,12% de clorexidina com reticulação e sem reticulação. Também não houve diferença significativa quando as membranas de três camadas foram comparadas com as membranas simples, com e sem o fármaco, reticuladas e não reticuladas, de acordo com a figura 5.17. A partir desses dados podemos deduzir que o fato da membrana tripla possuir três camadas, sendo as externas constituídas apenas por quitosana não influenciou a resposta do agente antimicrobiano ao *C.a*, no teste de difusão em ágar. Contudo, não é possível, devido à padronização do teste, avaliar após 24 horas de incubação dos microorganismos aeróbios, realizar uma avaliação de curto prazo, analisando os efeitos nos tempos iniciais de liberação, como foi verificado no teste de liberação (seção 5.3).

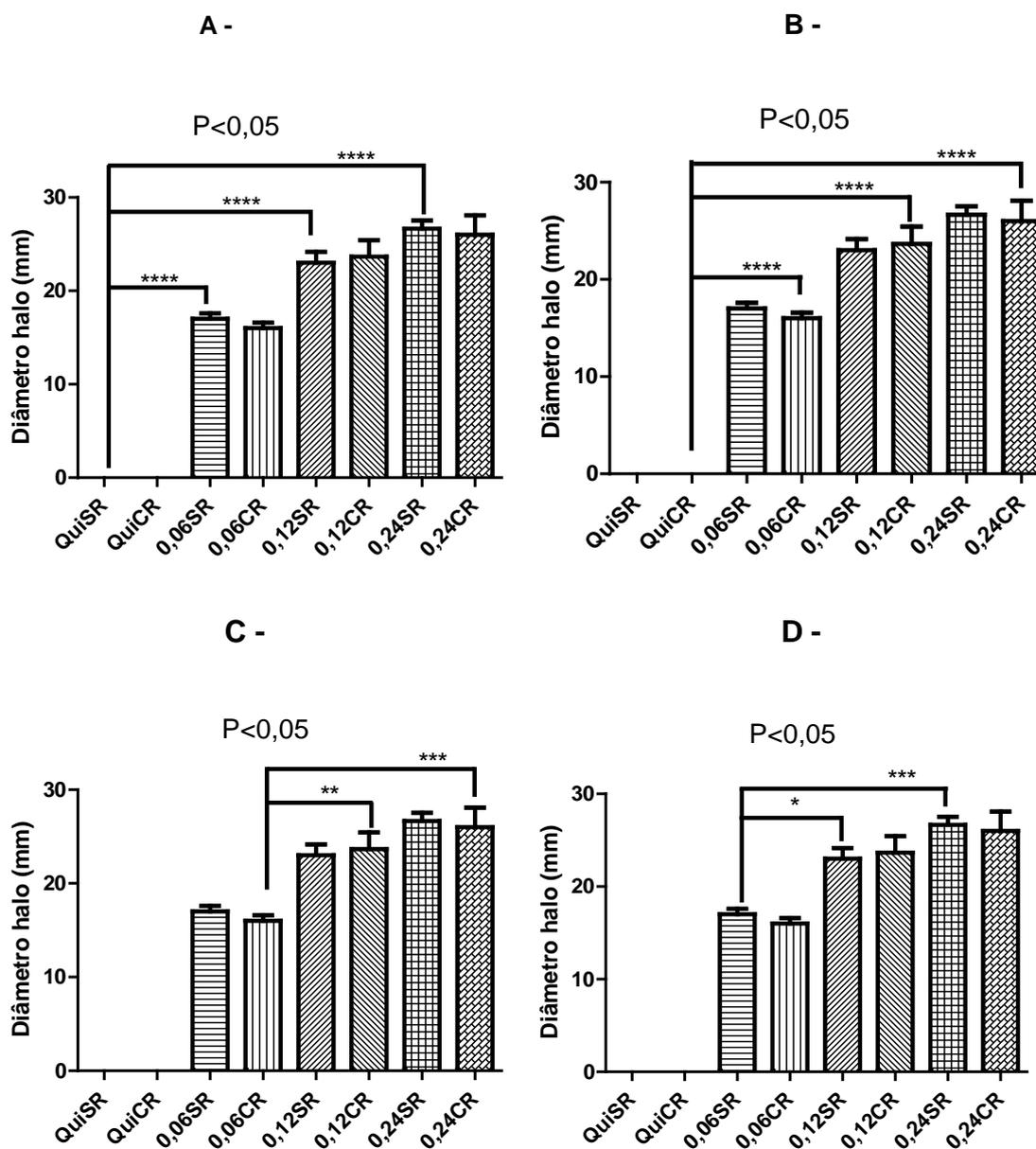


FIGURA 5.16 Comparação entre o tamanho dos halos formados para cada amostra com reticulação (CR) e sem reticulação (SR) após 24 horas, para C.a.

- A- Comparação entre Qui sem reticulação e os filmes com Cx sem reticulação.
- B- Comparação entre Qui com reticulação e os filmes com Cx com reticulação.
- C- Comparação entre os filmes com Cx com reticulação.
- D- Comparação entre os filmes com Cx sem reticulação.

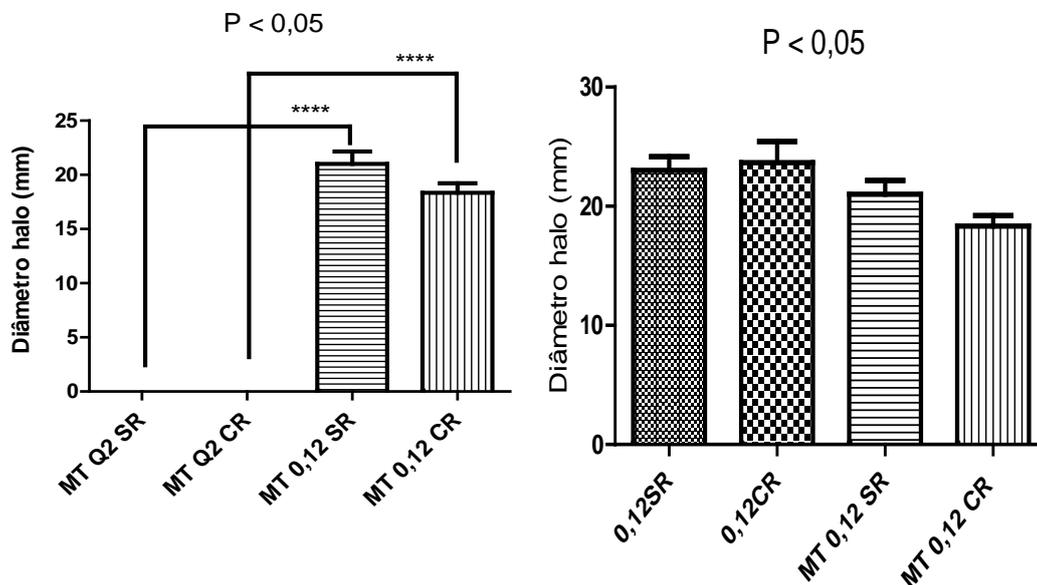


FIGURA 5.17 Comparação entre o tamanho dos halos formados para cada amostra (membrana tripla) com reticulação (CR) e sem reticulação (SR) e em relação às amostras simples, para *C.a.*

#### 5.4.2 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a)

Após 72 horas de incubação, cada placa foi examinada e observaram-se halos de inibição circulares (FIGURA 5.18). Os diâmetros dos halos de inibição total (analisadas a olho nu) foram mensurados, incluindo o diâmetro do disco. Os halos foram medidos em milímetros usando um paquímetro encostado na parte de trás da placa de petri invertida. Os valores encontrados estão dispostos na TABELA 5.5.

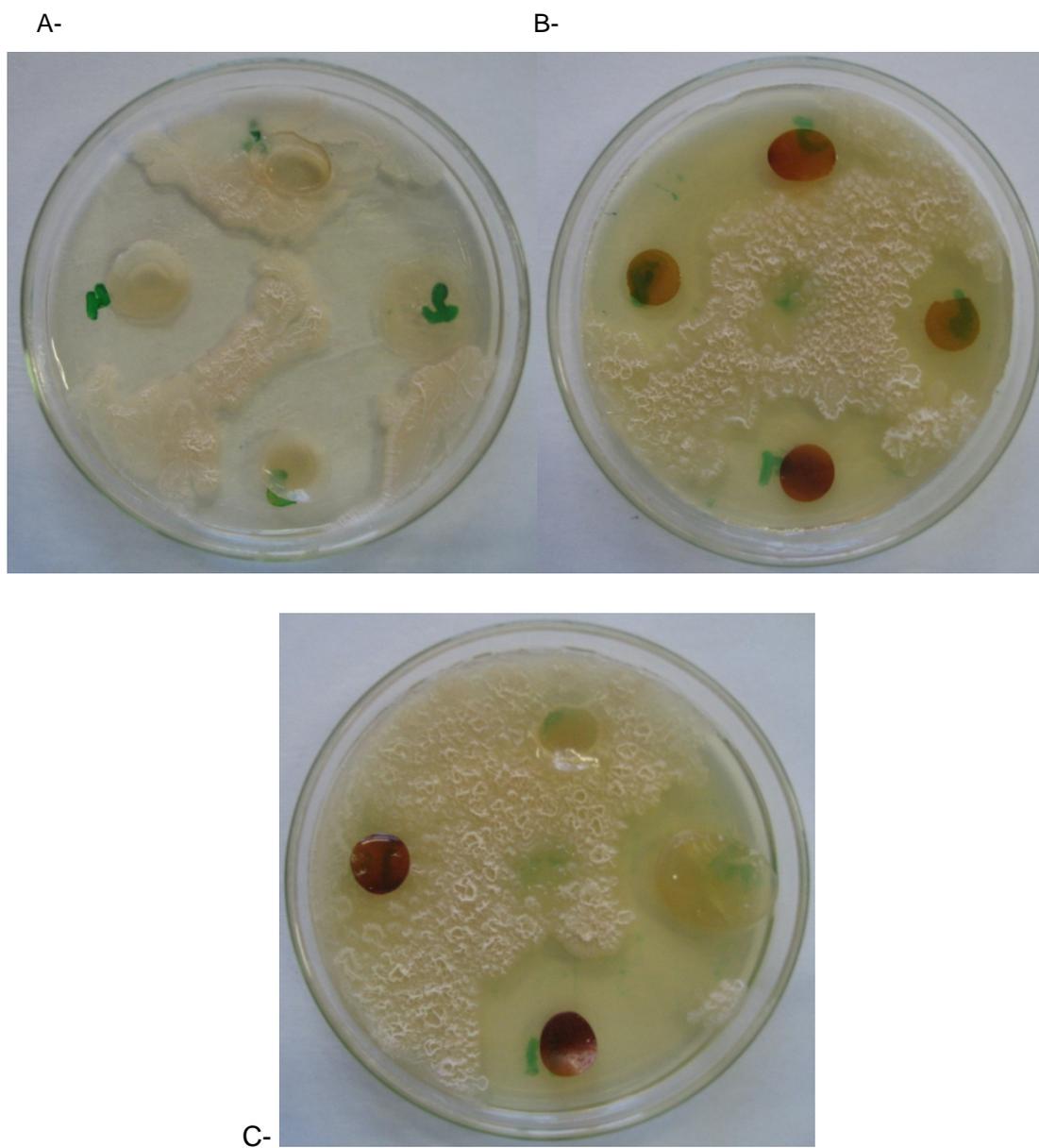


FIGURA 5.18 Fotografia das placas com A.a após incubação por 72 horas.

- A- Discos de quitosana sem reticulação
- B- Discos de quitosana com reticulação
- C- Discos de quitosana com e sem reticulação (membrana tripla)

TABELA 5.5 Resultados dos diâmetros dos halos de acordo com cada grupo e amostra para *A.a*

Grupos	Amostras	Média do diâmetro dos halos (mm)
Grupo 1 Membrana simples sem reticulação	1- Qui 2- Qui + Cx 0,06% 3- Qui + Cx 0,12% 4- Qui + Cx 0,24%	1- Não formou halo 2- 23,66 3- 26,66 4- 31,66
Grupo 2 Membrana simples com reticulação	5- Qui 6- Qui + Cx 0,06% 7- Qui + Cx 0,12% 8- Qui + Cx 0,24%	5- Não formou halo 6- 24,33 7- 28,66 8- 29,66
Grupo 3 Membrana Tripla com reticulação (CR) e sem reticulação (SR)	9- Qui SR 10- Qui + Cx 0,12% SR 11- Qui + Cx 0,12% CR 12- Qui CR	9- Não formou halo 10- 30,66 11- 29,33 12- Não formou halo

Os resultados obtidos para o teste de difusão em ágar com *A.a* foram analisados por métodos estatísticos. Comparações entre as médias foram feitas utilizando a análise de variância (ANOVA) com nível de significância ( $\alpha$ ) em 5% (FIGURAS 5.19 e 5.20).

Os resultados mostraram que nos filmes de quitosana com e sem reticulação, que não continham o agente antimicrobiano, não houve a formação do halo de inibição. Observou-se também que não houve diferença estatisticamente significativa entre o tamanho do diâmetro dos halos formados pelas amostras que continham 0,06% de

clorexidina com e sem reticulação. Porém nas concentrações 0,12% e 0,24% ocorreu uma pequena, mas significativa diferença. Na concentração de 0,12% o halo foi maior no filme com reticulação e na concentração de 0,24% o halo foi maior no filme não reticulado, conforme figura 5.19.

Comparando as concentrações de clorexidina incorporadas no filme, verificou-se que houve um aumento significativo entre o tamanho do diâmetro do halo formado pelas amostras com 0,06% de clorexidina para os formados pelas amostras com 0,12% de clorexidina. Isto foi constatado para os filmes reticulados e não reticulados, porém ocorreu um maior aumento nos filmes reticulados. Analisando os dados obtidos entre as concentrações de 0,12% e 0,24%, ocorreu um aumento significativo nos filmes sem reticulação e não teve diferença significativa nos filmes reticulados (Figura 5.19).

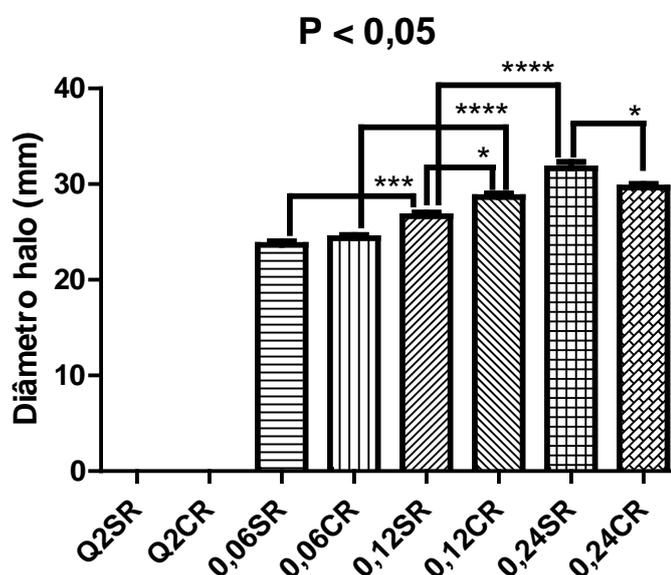


Figura 5.19 Comparação entre o tamanho dos halos formados para cada amostra com reticulação (CR) e sem reticulação (SR) para A.a.

Avaliando os resultados encontrados para as membranas triplas, foi constatado também que não houve formação de halo para os filmes que não continham o

fármaco, tanto o reticulado como o não reticulado. Foi possível verificar uma pequena diferença, porém estatisticamente significativa entre o tamanho do diâmetro dos halos dos filmes com 0,12% de clorexidina com reticulação e sem reticulação, sendo que o halo do filme não reticulado foi maior (FIGURA 5.20). Também não houve diferença significativa quando as membranas triplas foram comparadas com as membranas simples quando estas estavam reticuladas. Contudo, ocorreu uma diferença significativa entre as não reticuladas, sendo que o halo foi maior na membrana tripla, como pode ser visualizado na FIGURA 5.20. Observando a FIGURA 5.18, percebe-se que houve um intumescimento dos discos de quitosana, e que foi mais evidenciado nos filmes não reticulados. Sugere-se que este aumento no disco pode ser o responsável pelos resultados nos quais os halos de inibição foram maiores nos filmes sem reticulação, para a mesma concentração do fármaco, pois um maior intumescimento pode ocasionar o afrouxamento das cadeias poliméricas, facilitando a saída do fármaco, ou mesmo devido à questão espacial, no qual o disco ocuparia uma maior área da superfície do ágar, facilitando a difusão do fármaco em uma região maior. Porém isso não ocorreu em todas as amostras, no que se refere aos outros microorganismos estudados neste teste, e também não ocorreu em todos os perfis de liberação avaliados na seção 5.3 deste trabalho. Sendo assim, é possível supor que outros fatores, como: tempo, tipo de microorganismo, condições dos testes, também podem influenciar nos resultados.

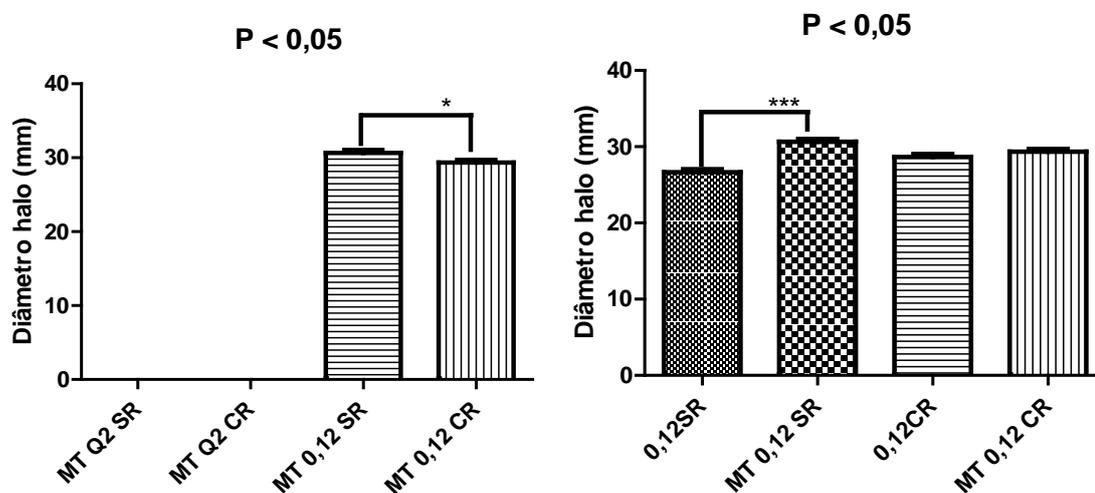


FIGURA 5.20 Comparação entre o tamanho dos halos formados para cada amostra (membrana tripla) com reticulação (CR) e sem reticulação (SR) e em relação às amostras simples para A.a.

#### 5.4.3 *Porphyromonas gingivalis* (P.g)

Após 72 horas de incubação, cada placa foi examinada e observaram-se halos de inibição (FIGURA 5.21). Os diâmetros dos halos de inibição total (analisadas a olho nu) foram mensurados, incluindo o diâmetro do disco. Os halos foram medidos em milímetros usando um paquímetro encostado na parte de trás da placa de *petri* invertida. Os valores encontrados estão dispostos na TABELA 5.6.

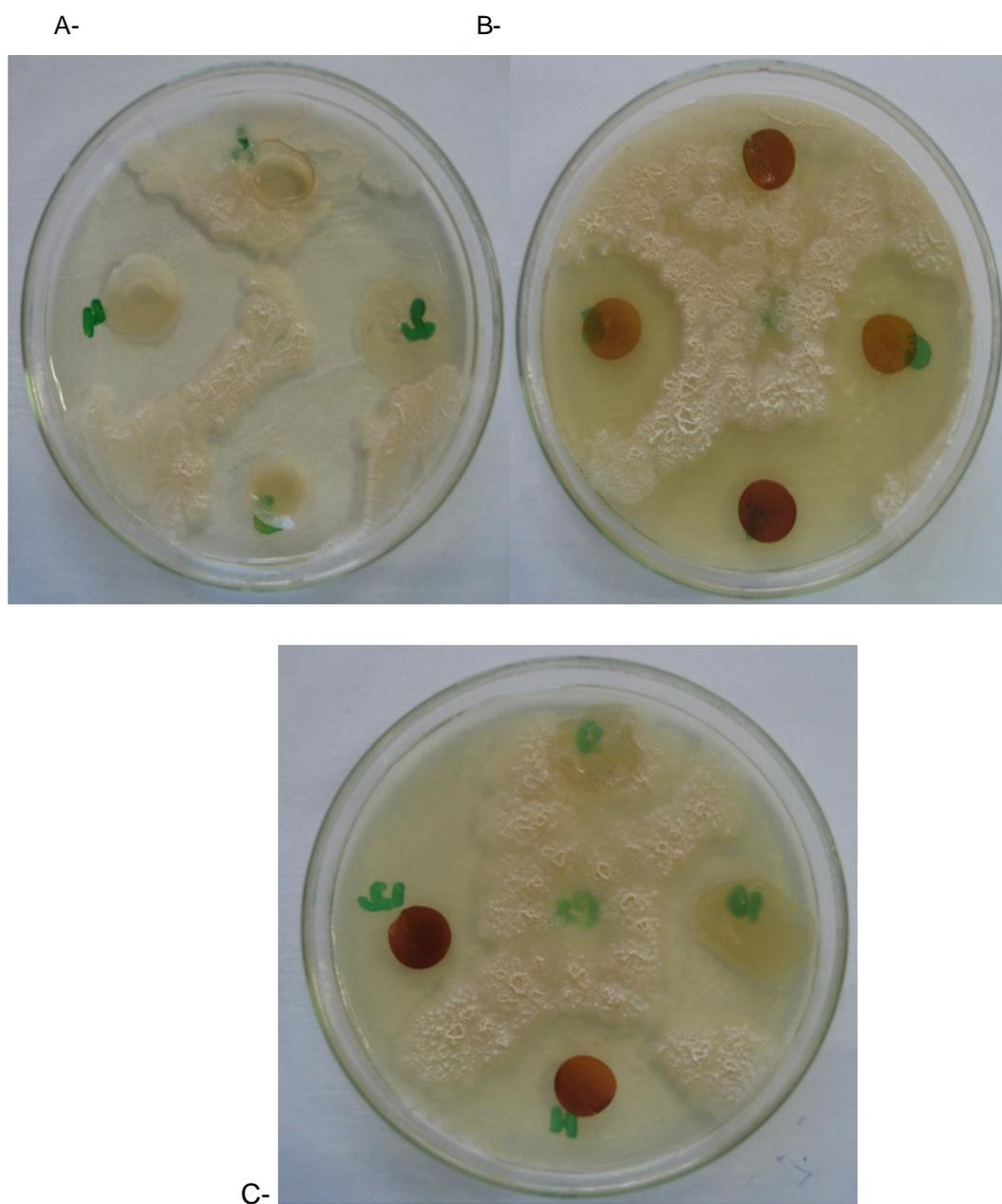


FIGURA 5.21 Fotografia das placas com *P.g* após incubação por 72 horas.

- A- Discos de quitosana sem reticulação
- B- Discos de quitosana com reticulação
- C- Discos de quitosana com e sem reticulação (membrana tripla)

TABELA 5.6 Resultados dos diâmetros dos halos de acordo com cada grupo e amostra para *P.g.*

Grupos	Amostras	Média do diâmetro dos halos (mm)
Grupo 1 Membrana simples sem reticulação	1- Qui 2- Qui + Cx 0,06% 3- Qui + Cx 0,12% 4- Qui + Cx 0,24%	1- Não formou halo 2- 31,66 3- 32,66 4- 34,33
Grupo 2 Membrana simples com reticulação	5- Qui 6- Qui + Cx 0,06% 7- Qui + Cx 0,12% 8- Qui + Cx 0,24%	5- Não formou halo 6- 33 7- 34,33 8- 34,66
Grupo 3 Membrana Tripla com reticulação (CR) e sem reticulação (SR)	9- Qui SR 10- Qui + Cx 0,12% SR 11- Qui + Cx 0,12% CR 12- Qui CR	9- 26 10- 31,33 11- 33,33 12- 26,66

Os resultados obtidos para o teste de difusão em ágar com *P.g* foram analisados por métodos estatísticos. Comparações entre as médias foram feitas utilizando a análise de variância (ANOVA) com nível de significância ( $\alpha$ ) em 5%.

Analisando os resultados observou-se que nos filmes simples de quitosana com e sem reticulação, que não continham o agente antimicrobiano, não houve a formação do halo de inibição. Já nos discos feitos a partir da membrana tripla, ocorreu halo de

inibição sem a incorporação do agente antimicrobiano, nos filmes com e sem reticulação.

Ao comparar os halos de inibição das membranas triplas sem clorexidina, reticuladas e não reticuladas, verificou-se que não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre eles. O mesmo ocorreu com as membranas triplas com o fármaco. Contudo, observa-se uma diferença significativa entre as membranas triplas com e sem clorexidina não reticuladas. Na mesma proporção, ocorreu também uma diferença significativa entre as membranas triplas com e sem clorexidina com reticulação, sendo que o halo de inibição foi maior na MT com Cx, como pode ser visualizado na FIGURA 5.23.

O fato de não conter o agente antimicrobiano e ter apresentado o halo de inibição pode ser explicado com base no trabalho de IKINCI et al. (2001) que demonstraram que tanto a clorexidina, quanto a quitosana exercem atividade antimicrobiana contra a *P.g.* SEO et al. (1994) relatou em seu trabalho que uma interação iônica entre os cátions dos grupos amino da quitosana e os ânions da parede celular das bactérias, tais como fosfolípidios e ácidos carboxílicos, tem sido proposta como o mecanismo para a atividade antimicrobiana da quitosana.

Foi observado que nas membranas simples não houve diferença significativa entre o tamanho do diâmetro dos halos formados pelas amostras que continham a mesma concentração do fármaco, sendo um grupo reticulado e o outro não reticulado, o que ocorreu nas três concentrações de clorexidina avaliadas. Avaliando a diferença de concentração da clorexidina verificou-se que não houve diferença significativa entre as concentrações 0,06% e 0,12%, e entre 0,12% e 0,24%, ocorreu diferença apenas entre as concentrações 0,06% e 0,24% não reticuladas, conforme figura 5.22. IKINCI et al. (2001) também relatou em seu estudo que o aumento da concentração de clorexidina não teve efeito significativo sobre a atividade antimicrobiana, indicando que na presença de quitosana, é possível liberar este composto em uma menor concentração, o que evitaria indesejados efeitos colaterais, incluindo alterações de coloração e paladar. Contudo, neste trabalho a quitosana só exerceu atividade antimicrobiana nas membranas triplas, o que pode ser justificado pelo aumento da quantidade de quitosana. Isso só aconteceu contra a *P.g.*, nos teste com o *A.a* e o *C.a*, não houve formação de halo de inibição.

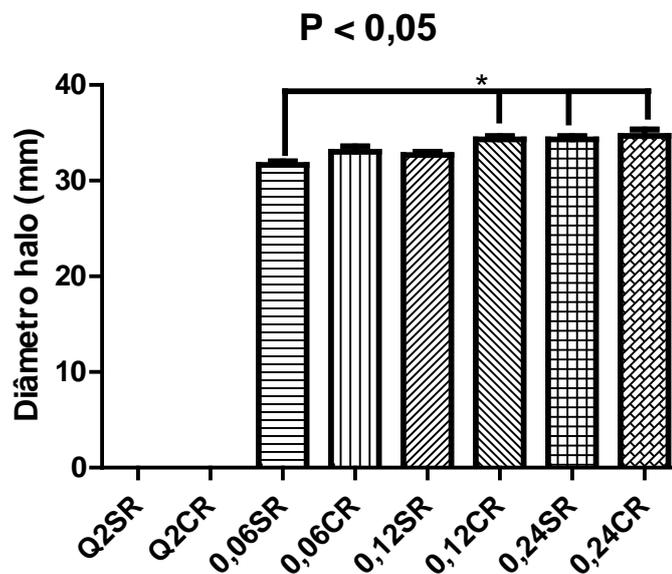


FIGURA 5.22 Comparação entre o tamanho dos halos formados para cada amostra com reticulação (CR) e sem reticulação (SR) para P.g.

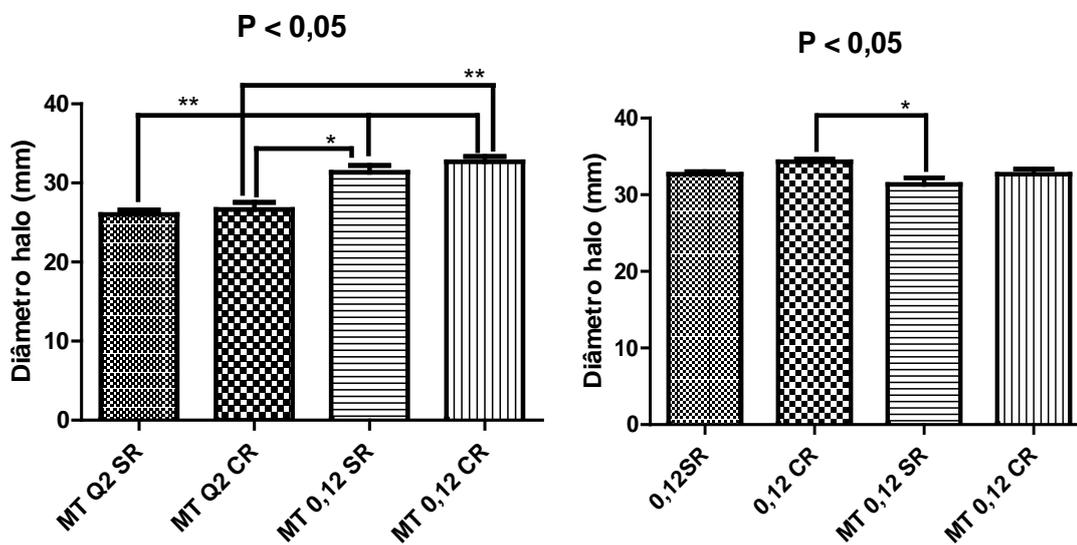


FIGURA 5.23 Comparação entre o tamanho dos halos formados para cada amostra (membrana tripla) com reticulação (CR) e sem reticulação (SR) e em relação às amostras simples para P.g.

Analisando de uma forma global os resultados dos testes “*in vitro*” para avaliar a atividade antimicrobiana do fármaco, observou-se que a clorexidina permaneceu ativa após a sua incorporação ao filme de quitosana para os três microorganismos avaliados. A clorexidina foi eficaz nas três concentrações estudadas, mesmo com a variação do tipo de filme de quitosana, simples ou triplos, com e sem reticulação.

## 6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados neste trabalho pelas análises de FTIR, MEV e EDS podemos inferir que é possível incorporar o digluconato de clorexidina, em concentrações variadas, aos filmes de quitosana pura e nos reticulados com glutaraldeído.

O experimento realizado para avaliar a liberação semi-quantitativa da clorexidina mostrou que houve liberação durante 8 horas, contudo outras metodologias devem ser empregadas em trabalhos futuros, tentando simular mais fielmente o ambiente da cavidade oral.

Comparando os tipos de membranas confeccionadas neste estudo, a membrana tripla reticulada mostrou ser a mais viável para a aplicação clínica, pois reduziu a liberação de clorexidina nos tempos iniciais e não apresentou alto grau de intumescimento.

A partir dos testes de difusão em ágar foi possível determinar *in vitro* que a clorexidina permaneceu ativa após a sua incorporação ao filme polimérico, frente aos microorganismos *C.a*, *A.a* e *P.g*, os quais estão associados à etiologia de patologias orais, como a doença periodontal, a halitose e a mucosite oral.

Portanto, podemos deduzir que este sistema tem potencial para ser aplicado como um dispositivo de liberação controlada de fármacos para cavidade oral, porém mais estudos são necessários para embasar esta afirmativa.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akaki, E. *Avaliação da incorporação de agentes antibacterianos a cimentos resinosos*. Belo Horizonte: Escola de Engenharia da UFMG, 2005.166p. (Tese, Doutorado em Engenharia Metalúrgica).

Amaral, F. J. S. Halitose contemporânea, um problema complexo e multifatorial. *Rev. Conduas Terapêuticas em Gastro*, São Paulo, v.12, 25-38, 2008.

Amwt, V. D. B.; Feenstra, L.; Baat, C.D. A review of the current literature on management of halitosis. *Oral Diseases*. v. 14: 30-9, 2008.

Andrews, G. P.; Laverty, T. P.; Jones, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71:505–518, 2009.

Asane, G. S.; Nirmal, S. A.; Rasal, K. B.; Naik, A. A. *et al. Drug Dev. Ind. Pharm.*, 34, p.1246, 2008.

Assis, O. B. G.; Vieira, D. C.; Vasques, R. A. Formed in-place chitosan-carboxymethylcellulose supported microfiltration membranes for water purification". in: Proceedings of the 4th ISNAPOL. *Natural Polymers and Composites IV*, p. 341, S. Pedro – SP, 2003.

Baby, A. R.; Ferrarini, M. Influência do Kollidon® 90F e do Polyox® WSR301NF na Força de Adesão de Comprimidos Bucais de Clorexidin. *Lat. Am. J. Pharm.* 26 (4): 541-7, 2007.

Bahrami, S. B. *et al.* Poly (vinyl alcohol) – chitosan blends: preparation, mechanical and physical properties. *Iranian Polymer Journal*, v.12, p.139-146, 2003.

Baker, P. J.; Coburnj, R. A.; Genco, R. J.; Evans, R. T. Alkyl-bisguanidades *in vitro* inhibitors of bacterial growth and dental plaque formation. *J Periodontol*, 14:352-60, 1979.

Berger, J; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O. Structure and interaction in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.57, p.35-52, 2004 a.

Biron, P., Sebban C., Gourmet, R., Chvetzoff, G. Research controversies in management of oral mucositis. *Support Care Cancer*, 8; 68-71, 2000.

Bonan, P. R. F.; Lopes, M. A.; Alves, F. A.; Almeida, O.P. Clinical, biological, histological features and treatment of oral mucositis induced by radiation therapy: a literature review. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 51(3): 235-242, 2005.

Bonesvoll, P.; Gjermo, P. A comparison between chlorhexidine and some quaternary ammonium compounds with regard to retention, salivary concentration and plaque inhibition effect in the human mouth after mouth rinse. *Arch Oral Biol*, 23:289-94, 1978.

Bruschi, M.L.; Panzeri, H.; Freitas, O. Sistemas de liberação de fármaco intrabolsa periodontal. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 29 – 47, 2006.

Chen, R. H., Hwa, H. D. Effect of molecular weight of chitosan with the same degree of deacetylation on the thermal, mechanical, and permeability properties of the prepared membrane. *Carbohydrate Polymers*, v.29.,p.353-358, 1996.

Ciancio, S.G. Medication as risk factors for periodontal disease. *J. Periodontol.*, v. 67, p. 1055-1059, 1996.

Clapper, J. D., Skeie, J. M., Mullins, R. F., Guymon, C. A. Development and Characterization of Photopolymerizable Biodegradable Materials from PEG-PLA-PEG Block Macromonomers, *Polymer*, v.48, p.6554-6564, 2007.

Clark, G.L., Smith, A.F. X-Ray Diffraction Studies of Chitin, Chitosan, and Derivatives, *J. Phys. Chem.*, v.40, p.863-879, 1936.

Conceição, M.D.; Marocchio, L.S.; Tárzia, O. Avaliação de um novo enxaguatório na formação de cáseos amigdalianos. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, V. 74, p. 61-67; 2008.

Costa, P.; Sousa Lobo, J. M. Formas farmacêuticas de libertação modificada. *Rev. Port. Farm.*, Lisboa, v. 59, n.4, p. 181-190, 1999.

Costa Júnior, E. S. Desenvolvimento de matriz de Quitosana/PVA, quimicamente reticulada para aplicação potencial em engenharia de tecido epitelial. Belo Horizonte: Escola de Engenharia da UFMG, 2008. 151p. (Tese, Doutorado em Ciência e engenharia de Materiais).

Deasy, P. B., Collins, A. E.; Mac Carthy, D. J.; Russel, R. J. Use of strips containing tetracycline hydrochloride or metronidazole for treatment of advanced periodontal disease. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 41, p. 694-699, 1989.

Deng, C. M. et al. Biological properties of the chitosan-gelatin sponge wound dressing. *Carbohydrate Polymers*, v.69, p.583-589, 2007.

Scully, C.; Greemman, J. Halitosis (breath odor). *Periodontology 2000*; v. 48: 66-75, 2008.

Fakhry *et al.* Chitosan supports the initial attachment and spreading of osteoblasts preferentially over fibroblasts. *Biomaterials*, v.25, p.2075-2079, 2004.

Figueiras, A.; Carvalho, R.; Veiga, F. Mucoadhesive drug delivery systems in the oral cavity: Mucoadhesive mechanism and mucoadhesive polymers. *Rev. Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde*, v.4, n.2:216-233, 2007.

França, C. M.; Núñez, S. C.; Prates, R. A.; Noborikawa, E.; Faria, M. R.; Ribeiro, M. S. Low-intensity red laser on the prevention and treatment of induced-oral mucositis in hamsters. *J Photochem Photobiol B.*, 94:25-31, 2009.

Friedman, M.; Golomb, G. New sustained release dosage form of chlorhexidine for dental use. I- development and kinetics of release. *J. Periodontal Res.*, v. 17, n. 3, p. 323-328, 1982.

Friedman, M.; Steinberg, D. Sustained release delivery systems for treatment of dental diseases. *Pharm. Res.*, v. 7, n. 4, p. 313-317, 1990.

Gabarra, F. R. *Dispositivo mimetizador de bolsa periodontal para estudos in vitro de liberação de fármaco.* Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2002, 197 f. Tese de Doutorado.

Gjeramo, P. Chlorhexidine and related compounds. *Journal Dental Research*, 68 (Special Issue): 1602-8, 1989.

Gupta, K.C., Jabrail, F.H. Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. *Carbohydrate Polymers*, v.66, p.43-54, 2006.

He, P. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan Microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, 166:75–88, 1998.

Helldéan, L. B.; Listgarten, M. A.; Lindhe, J. The effect of tetracycline and/or scaling on human periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, v. 6, p. 222-230, 1979.

Hsu, S. et al. Chitosan as scaffold materials: effects of molecular weight and degree of deacetylation. *Journal of Polymer Research*, v.11, p.141-147, 2004.

Huang, Y. et al. In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, v.26, p.7616-7627, 2005.

Hugo, W. B.; Longworth, A. R. Some aspects of the mode of action of Chlorhexidine. *Journal Pharmaceutics Pharmacology*, 16:655-62, 1964.

Inkinci, G.; Senel, S.; Akincibay, H. Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *International Journal of Pharmaceutics*, 235: 121–127, 2001.

Jewetz, E. *Princípios da ação medicamentosa antimicrobiana*. In: KATZUNG, B. G. *Farmacologia: básica e clínica*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. Cap. 42, p. 463 – 469.

Kalachandra, S.; Lin, D.; Offenbacher, S. Controlled drug release for oral condition by a novel device based on ethylene vinyl acetate (EVA) copolymer. *Journal of Materials Science: Materials in medicine*, v.13: 53-58, 2002.

Kalachandra, S.; Takamata, T.; Lin, D. M. Stability and release of antiviral drugs from ethylene vinyl acetate (EVA) copolymer. *J Mater Sci: Mater Med*, v. 17: 1227-1236, 2006.

Kinane, D. F. Local antimicrobial therapies in periodontal disease. *Ann. R. Australas. Coll. Dent. Surg.*, v. 15, p. 57-60, 2000.

Kockisch, S. Mucoadhesive, triclosan-loaded polymer microspheres for application to the oral cavity: preparation and controlled release characteristics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 59:207-16, 2005.

Köstler, W. J.; Hejna, M.; Nenzel, C.; Zielinski, C. C. Oral mucositis complicating chemotherapy and/or radiotherapy: options for prevention and treatment. *CA Cancer J Clin.*, 51(5):290-315, 2001.

Krajewska, B. Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, v.35, p.126–139, 2004.

Kumar, M. N. V. R.; DOMB, A. J. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical Reviews*, v.104, n.12, p.6017-6084, 2004.

Lang, N. P.; Brex, M. C. Chlorhexidine digluconate an agent for chemical plaque control and prevention of gingival inflammation; *J Periodontal Res*, 10:74-86, 1986.

Langer R. New methods of drugs delivery. *Science*, 249:1527-33, 1990.

Lara, E. H. G.; Garcia A.L.; Panzeri, H. Estudo de sistemas acrílicos bioadesivos para liberação sustentada in vitro de fluoreto. *Rev. Odontol Univ São Paulo, São Paulo*, v.12, n.3, July 1998.

Laranjeira, M. C. M. Chitosan: functional byopolymer with biomedical industrial potential. *Quím. Nova*, vol.32, n.3, 2009.

Lee, J.W.; Park, J.H.; Robinson, J.R. Bioadhesive-based dosage forms: The next generation. *J. Pharm. Sci.*, v.89, p.850-866, 2000.

Li, J., Du, Y., Liang, H. Influence of molecular parameters on the degradation of chitosan by a commercial enzyme. *Polymer degradation and Stability*, v.92, p.515-524, 2007.

Lima, I. S. Quitosanas e quitosanas química e morfológicamente modificadas com anidrido succínico – propriedades, adsorção e termoquímica. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2005. 145f. (Tese, Doutorado em Química Inorgânica).

- Lin D, M.; Kalachandra, S.; Valiyaparambil, J.; Offenbacher, S. A polymeric device for delivery of anti-microbial and anti-fungal drugs in the oral environment: effect of temperature and medium on the rate of drug release. *Dental Materials*, v. 19: 589-596, 2003.
- Lindhe, J.; Nyman, S. Long-term maintenance of patients treated for advanced periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, v. 11, p. 504-514, 1984.
- Listgarten, M. A. Pathogenesis of periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, v. 13, p. 418-425, 1986.
- Liu, Z., et al. Chitosan-alginate scaffolds for *in vitro* bone tissue regeneration. *Materials research society*, v.873E, p.K8.2.1-K8.2.6, 2005.
- Lopes, C. M.; Sousa Lobo, J. M.; Costa, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 41, n. 2, P. 143-154, 2005.
- Martin, M. V.; Nind D. Use of chlorhexidine gluconate for pre-operative disinfection of apicectomy sites. *Oral Hygiene*, June; 162(6):459-61, 1987.
- Martini, A., Bonadeo, D., Bottoni, G., Caramella, C., Esposito, P., Gazzaniga, A., Merlo, M., Muggetti, L., R. Orlandi & S. Rossi. *Boll. Chim. Farm.* 134: 595-603, 1995.
- McCloskey, J. C, Bulechek, G. M. Classificação das intervenções de enfermagem (NIC). 3a ed. Porto Alegre: Artmed; 2004.
- Medlicott, N. J.; Rathbone, M. J.; Tocker, I. G.; Holborow, D. W. Delivery systems for the administration of drugs to the periodontal pocket. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 13, p. 181-203, 1994.
- Mingyu, C. et al. Surface modification and characterization of chitosan film blends with poly-L-lysine. *Journal of Biomaterials Application*, v.19, p.59-75, 2004.
- Monbelli, A. Periodontitis as an infectious disease: specific features and their implications. *Oral Dis.*, v. 9, sup. 1, p. 6-10, 2003.

Moraes, C. R.; Amaral, F.J.S. Halitose. In: MUNIZ, J. *O Dia-a-dia na gastroenterologia*, 1ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2008. Cap. 1, 7-18.

Neamark, A. et al. *In vitro* biocompatibility of electrospun hexanoyl chitosan fibrous scaffolds towards human keratinocytes and fibroblasts. *European Polymer Journal*, v.44, p.2060-2067, 2008.

Netuschil, L.; Hoffmann, T.; Brex, M. How to select the right mouthrinses in periodontal prevention and therapy. Part I. Test systems and clinical investigations. *Int J Dent Hyg*, 1(3):143-50, 2003.

Noronha, A. Z.T.; Plepis, A. M. G. Development of a bioadhesive patch collagen based for delivery of hypericin to the oral mucosa for photoinactivation of *candida albicans*, COLAOB, 2010.

Perioli, L.; Ambrogi, V.; Rubini, D.; Giovagnoli, S.; Ricci, M.; Blasi, P.; Rossi, C. Novel mucoadhesive buccal formulation containing metronidazole for the treatment of periodontal disease. *J. Control. Rel.*, v. 95, p. 521-533, 2004.

Pico, J. L., Avila-Garavito, A., Naccache, P. Mucositis: its occurrence, consequences, and treatment in the oncology setting. *Oncologist*.; 3(6):446-51, 1998.

Prober, C. Princípios de antibioticoterapia. In: KALANT, H., ROSCHLAU, W.H.E. *Princípios de farmacologia médica*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. Cap. 52, p. 437 – 441.

Ranadive, K. S.; Bhat, K. M. Local antimicrobial delivery in periodontal therapy. *Indian J. Dent. Res.*, v. 9, n. 4, p. 124-131, 1998.

Rao, P. S. et al. Pervaporative Separation of ethylene glycol/water mixtures by using cross-linked chitosan membranes. *Ind. Eng. Chem. Res.*, v.46, p.2155-2163, 2007.

Rinaudo, M. Chitin and chitosan: properties and application. *Prog. Polym. Sci.*, v.31, p.603-632, 2006.

Rodas, A. C. D., Desenvolvimento de membranas como compostos dermo-epidérmicos, São Paulo: Instituto de Pesquisa Energética e Nucleares Autarquia

associada à Universidade de São Paulo, 2004. 149p. (Tese, Doutorado em Ciências, Tecnologia Nuclear-Aplicações).

Rodrigues, L.B. In Vitro release and characterization of chitosan films as dexamethasone carrier. *International Journal of Pharmaceutics*, 368: 1-6, 2009.

Roldán, S.; Herrera, D.; O'connor, A.; González, I.; Sanz, M. A combined therapeutic approach to manage oral halitosis: 3-month prospective case series. *J Periodont*, V. 76: 1025-33, 2005.

Santos, José E. Preparação, caracterização e estudos termoanalíticos de bases de Schiff biopoliméricas e seus complexos de cobre. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2004. 112f. (Tese, Doutorado em Química analítica).

Santos, C. et al. Acetylation and molecular mass effects on barrier and mechanical properties of shortfin squid chitosan membranes. *European Polymer Journal*, v.42, p.3277-3285, 2006.

Sarasam, A. R. Antibacterial activity of chitosan-based matrices on oral pathogens. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, v.19, p.1083-1090, 2008.

Scully, C. Porter S. *Oral cancer*. *West J Med.*, 174(5):348-51, 2001.

Scully, C.; Epstein, J.; Sonis, S. Oral mucositis: a challenging complication of radiotherapy, chemotherapy, and radiochemotherapy: part 1, pathogenesis and prophylaxis of mucositis. *Head Neck*, 25(12):1057-70, 2003.

Senel, S.; G.; Ikinç, S.; Kas, A. Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 193: 197–203, 2000.

Seo, H., Shoji, A., Itoh, Y., Kawamura, M., Sakagami, Y. Antibacterial fiber blended with chitosan. In: Karnicki, Z.S., Brzeski, M.M., Bykowski, P.J., Wojtasz-Pajak, A. (Eds.), *Chitin World*. Wirtschaftsverlag NV-Verlag fur neue Wissenschaft GmbH, Germany, pp. 623–63, 1994.

Shirosaki, *et al.* In vitro cytocompatibility of MG63 cells on chitosan-organosiloxane hybrid membranes. *Biomaterials*, v.26, p.485-493, 2005.

Shirosaki, *et al.* Synthesis and cytocompatibility of porous chitosan–silicate hybrids for tissue engineering scaffold application. *Chemical Engineering Journal*, v.137, p. 122-128, 2008.

Slots, J. Subgingival microflora and periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, v. 6, p. 351-382, 1979.

Smith et al. Effect of Chitosan on Epithelial Cell Tight Junctions. *Pharmaceutical research*, v.21, n.1, p.43-49, 2004.

Sonis, S. T. Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. *Oral Oncol.*; 34(1):39-43, 1998.

Spielberg, R., Stiff, P., Bensinger. W. et al. Palifermin for oral mucositis after intensive therapy for hematologic cancers. *N Engl J Med*, 351 (25): 2590 - 598, 2004.

Stone, R., Fliedner, M. C., Smiet A. C. M. Management of oral mucositis in patients with cancer. *Eur J Oncol Nurs*, 9:524-32, 2005.

Sutherland, S.E., Browman, G. P. Prophylaxis of oral mucositis in irradiated head and neck cancer patients: a proposed classification scheme of interventions and meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phy*, 49(4):917-30, 2001.

Suzuki, D. et al. Comparison of various mixtures of *b*-chitin and chitosan as a scaffold for three-dimensional culture of rabbit chondrocytes, *J Mater Sci: Mater Med*, v.19, p.1307–1315, 2008.

Ta et al. Injectable chitosan hydrogels for localized cancer therapy. *Journal of Controlled Release*, v.126, p.205-216, 2008.

Tabary, N. Functionalization of PVDF membranes with carbohydrate derivates for the controlled delivery of chlorhexidin. *Biomolecular Engineering*, 24: 472–476, 2007.

Takahashi, T. Imai, M. Suzuki, I. Water permeability of chitosan membrane involved in deacetylation degree control. *Biochemical Engineering Journal*, v.36 , p.43–48, 2007.

Tan, S. C. et al. The degree of deacetylation of quitosana: advocating the fist derivative UV-spectrophotometry method of determination. *Talanta*, v. 45, p. 713-719, 1998.

Tárzia, O. *Halitose: um desafio que tem cura*. São Paulo: Epub, 2003.

Tarzia, O.; Calil, C. M., Marcondes, F. K. What causes bad breath? *Rev Odontol UNESP*, 35 (3): 185-190, 2006.

Teixeira, K. I. R. Estudo das alterações da membrana celular de microrganismos por compostos de inclusão de Clorexidina: beta-ciclodextrina em diferentes proporções molares usando Microscopia de Força Atômica e Microscopia Eletrônica de Varredura. Belo Horizonte: Faculdade de Odontologia da UFMG, 2008. (Dissertação, Mestrado em Clínica Odontológica).

Ten Cate, A. R. '*Histologia Bucal: Desenvolvimento, Estrutura e Função*', Ed., Guanabara, São Paulo, Cap.3, Págs. 35-46, 1985.

Tenovuo, J. O. *Human saliva: clinical chemistry and microbiology*, CRC Press, Boca Raton, Vol. I., 1989.

Thylstrup, A., fejerskov, O. *Cariologia clínica*. 2.ed. são Paulo: Santos, 421p., 2001.

Tinoco, E. M. B.; Beldi, M. I.; Campedelli, F.; Lana, M.; Loureiro, C. A.; Clinical and microbiological effects of adjunctive antibiotics in treatment of localized juvenile periodontitis. A controlled clinical trial. *J. Periodontol.*, v. 69, n. 12, p. 1355-1363, 1998.

Tolaimate, A. et al. On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin. *Polymer*, v.41, p.2463–2469, 2000.

Torres, M. A. et al. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.15, n.4, p.306-312, 2005.

Trung, T. S. Functional characteristics of shrimp chitosan and its membranes as affected by the degree of deacetylation. *Bioresource Technology*, v.97, p.659–663, 2006.

Van der Ouderaa, F. J. G. Anti-plaque agents. Rationale and prospects for prevention of gingivitis and periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, v. 18, p. 447-454, 1991.

Veiga, F. J. B. Medicamentos orais de liberação controlada: comprimidos matriciais hidrofílicos. *Bol. Fac. Farm. Coimbra*, v.12, n.2, p.17-87, 1998.

Velez, I., Tamara, L. A., Mintz, S. Management of oral mucositis induced by chemotherapy and radiotherapy: an update. *Quintessence Int.*, 35(2):129-36, 2004.

Villanova, Janaina C. O. ; Orefice, R. L.; Cunha, A. S. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. Polímeros (São Carlos. Impresso), v. 20, p. 51-64, 2010.

Wang, T, *et al.* Selected properties of pH-sensitive, biodegradable quitosana-poly(vinyl alcohol) hydrogel. *Polymer International*, v.53, p.911-918, 2004.

Wenling, *et al.* Effects of the degree of deacetylation on the physicochemical properties and schwann cell affinity of chitosan films. *Journal of Biomaterials Applications*, v.20, p.157-177, 2005.

Winkel, E. G.; Roldán S.; Winkelhoff, A. J. V.; Herrera, D.; Sanz, M. Clinical effects of a new mouthrinse containing chlorhexidine, cetylpyridinium chloride and zinc-lactate on oral halitosis. A dual-center, double-blind placebo-controlled study. *J Clin Periodonto*, v. 30, 300-6, 2003.

Wu, T., Zivanovic, S. Determination of the degree of acetylation (DA) of chitin and chitosan by an improved first derivative UV method. *Carbohydrate Polymers*, v.73, p.248–253, 2008.

Zhang, H., Neau S. H. In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials*, v.22, p.1653-1658, 2001.