



Comparação de características de membranas e géis poliméricos adesivos desenvolvidos para aplicação em mucosas

Aline M. S. Yamakado, Paula de F. R. Remiro e Ângela M. Moraes

Departamento de Engenharia de Materiais e de Bioprocessos
Faculdade de Engenharia Química
Universidade Estadual de Campinas

Resumo

Nos últimos anos, grande destaque tem sido dado para o uso de materiais poliméricos em diversas áreas. Estes materiais podem ser empregados na produção de suportes para o crescimento celular e na síntese de sistemas mucoadesivos de liberação de fármacos, os quais podem promover o direcionamento da liberação de forma mais apropriada do ponto de vista cinético. Dentre os polímeros naturais que podem ser utilizados para estas finalidades estão a quitosana, o alginato, a goma xantana, a metilcelulose e a carboximetil quitosana, compostos de uso comum na produção de membranas e matrizes tridimensionais. Os biomateriais produzidos devem apresentar características específicas, tais como resistência mecânica apropriada para a finalidade, baixa toxicidade, porosidade, biocompatibilidade e adesão adequada ao tecido no qual será implantado. Neste contexto, este trabalho teve por objetivo comparar diferentes biomateriais poliméricos na forma de membranas (à base de quitosana e alginato) e hidrogéis (um à base de alginato e goma xantana e o outro à base de metilcelulose, goma xantana e carboximetil quitosana) para aplicação em mucosa, bem como avaliar a mucoadesividade e estabilidade destas matrizes em fluidos corpóreos sintéticos, além de outras de suas características físico-químicas.

Introdução

Os hidrogéis e membranas biopoliméricas configuram-se em redes tridimensionais e, por isso, possuem características bastante interessantes. Podem apresentar permeabilidade apropriada para o transporte de fluidos e nutrientes, o que faz com que sejam adequados para a utilização em diferentes aplicações na área de engenharia de tecidos. Dependendo de sua composição, são capazes de se manter estáveis em soluções aquosas devido aos diversos tipos de interações que os estabilizam estruturalmente (como a reticulação iônica) e apresentam, muitas vezes, considerável resistência mecânica, especialmente quando se trata de membranas. Uma característica também desejável é a adesão destes materiais a tecidos lesados. A mucoadesividade tem elevada importância, pois sua ausência pode se constituir em fator limitante da capacidade de disponibilização do fármaco. Assim, quanto maior a adesão entre a mucosa e o dispositivo contendo o fármaco, maiores serão as chances de se ter a liberação do fármaco requerido na concentração de interesse.

Diferentes polímeros de origem natural podem ser utilizados para a produção das matrizes. A quitosana é um polissacarídeo proveniente da desacetilação da quitina e suas propriedades não tóxicas, biocompatíveis, antibacterianas e biodegradáveis conduziram a aplicações significativas nos campos biomédicos e farmacêuticos^[1]. Uma das modificações que podem ser realizadas para o aumento da solubilidade deste polissacarídeo em água é a adição de grupos carboximetil à sua estrutura, resultando na carboximetil quitosana (CMQ), que apresenta maior solubilidade em soluções aquosas que a molécula não modificada. Alginatos são polissacarídeos aniônicos que ocorrem naturalmente nas paredes celulares de algas marrons, incluindo *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum*, e várias cepas de bactérias (*Azotobacter*, *Pseudomonas*)^[2]. A goma xantana, é solúvel em água e apresenta boa biocompatibilidade^[3]. A metilcelulose (MC) é um dos éteres de celulose comerciais mais importantes e tem sido usada em muitas aplicações industriais. Soluções aquosas deste polímero têm comportamento térmico singular: a viscosidade da solução diminui ligeiramente quando a temperatura aumenta abaixo de um ponto crítico (29 ± 2 °C). O aumento progressivo da temperatura resulta em aumento da viscosidade, conduzindo à formação de um gel termorreversível^[4].

Neste trabalho propôs-se produzir membranas constituídas de quitosana e alginato, dois hidrogéis, um de alginato e goma xantana e o outro à base de metilcelulose, goma xantana e carboximetil quitosana, visando sua utilização como matrizes para a liberação de fármacos em mucosa. Características relevantes dos materiais para a finalidade proposta foram analisadas.



Metodologia

Preparo e caracterização das membranas

As membranas foram preparadas em tanque agitado na proporção de 1:1 de quitosana (Q) e alginato (A). A solução de Q preparada em solução de ácido acético a 1% (v/v), foi filtrada e misturada à solução aquosa de alginato na vazão de 6 mL/min sob agitação constante a 500 rpm. O pH da mistura foi corrigido para 7 com solução de NaOH a 2 mol/L. Foi realizada uma primeira reticulação iônica com solução aquosa de CaCl_2 a 0,5%(m/v), seguida de uma etapa de desaeração e posterior moldagem em placas. As membranas foram secas em estufa por 24 h a 37°C , submetidas à reticulação secundária por imersão em solução de CaCl_2 a 1%(m/v) por 30 min, lavadas com água deionizada (Milli-Q Academic, Millipore) por mais 30 minutos e secas à temperatura ambiente^{[5],[6]}.

Diâmetro e espessura das membranas

Os diâmetros das membranas foram obtidos com o auxílio de uma régua enquanto as espessuras foram medidas com micrômetro Digimess. Foram analisadas 4 amostras independentes por formulação, sendo feitas 10 medições para o diâmetro em posições diferentes e 20 para a espessura. Os valores médios e seus respectivos desvio-padrão foram calculados.

Ângulo de contato das membranas

O ângulo de contato foi medido com um goniômetro (TANTEC). A análise foi realizada gotejando-se aproximadamente 0,05 ml de água destilada à temperatura ambiente sobre uma amostra de membrana que foi previamente cortada e colada em uma placa para facilitar a observação da gota. Os valores médios e seus respectivos desvio-padrão foram calculados.

Aspecto e morfologia da superfície das membranas

A morfologia das membranas foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram congeladas com N_2 líquido, fraturadas, fixadas em suportes adequados e metalizadas com ouro.

Capacidade de absorção de soluções fisiológicas e perda de massa das membranas

A capacidade de absorção das membranas foi testada utilizando-se três diferentes soluções: 1) solução de saliva simulada composta de 0,8 g/L de NaCl, 1,2 g/L de KCl, 0,19 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,11 g/L de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, e 0,35 g/L de K_2HPO_4 com pH ajustado para 6,8^[7]; 2) solução salina tamponada composta de 2,38 g/L de Na_2HPO_4 , 0,19 g/L de KH_2HPO_4 e 8,0 g/L de NaCl, com pH ajustado para 7,0^{[8],[9]}; 3) tampão acetato a 100 mmol/L e pH 4,0. As amostras foram colocadas em um dessecador contendo cloreto de lítio (LiCl , 11% de UR) por pelo menos 24 h antes do ensaio. As membranas foram imersas em tubos Falcon contendo 10 ml das referidas soluções em uma estufa a 37°C , por diferentes períodos (8 h, 1 dia, 3 dias e 6 dias). Após cada período, o excesso de fluido foi retirado cuidadosamente e as amostras foram pesadas novamente ($m_{\text{úmida}}$). Para cada fluido e cada período, foram utilizadas triplicatas de amostras de 6 cm x 1 cm com massa inicial (m_{inicial}) pré-determinada em balança analítica.

A perda de massa das formulações foi analisada após sua exposição às mesmas soluções por 7 dias a 37°C , quando as amostras foram retiradas das soluções e secas até apresentarem massa final constante (m_{final}).

A capacidade de absorção de soluções fisiológicas (Abi) foi calculada através da **Equação 1** em gramas de solução por gramas de membrana seca. Já a perda de massa (Pi), foi obtida através da **Equação 2**, expressa em termos da fração da massa inicial (%).

$$Abi = \frac{m_{\text{úmida}} - m_{\text{inicial}}}{m_{\text{inicial}}} \quad (\text{equação 1})$$

$$Pi = \frac{(m_{\text{inicial}} - m_{\text{final}})}{m_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (\text{equação 2})$$



Preparo dos hidrogéis

Foram preparadas duas formulações de hidrogéis. A primeira consistiu de 10% (m/v) de metilcelulose (MC), 0,5% (m/v) de goma xantana (X) e 0,5% (m/v) de carboximetil quitosana (CMQ)^[10]. O hidrogel foi reticulado termicamente em banho, sob temperaturas maiores que 28°C (temperatura de gelificação do gel). O segundo hidrogel era constituído de 1 % de alginato (A) e 2,5% de goma xantana e foi reticulado por imersão em solução aquosa de CaCl₂ a 2% por 10 minutos.

Avaliação da mucoadesividade dos hidrogéis

Para os ensaios de mucoadesividade foram utilizadas porções de mucosa suína, as quais foram selecionadas por apresentarem grande similaridade com o tecido humano^[11]. As mucosas frescas de porcos machos recém-abatidos foram imersas em tampão fosfato a pH 7,4, até o momento da análise. Em seguida, foram recortadas porções de retalhos da mucosa bucal, com áreas superiores a 1 cm². Cada amostra de hidrogel foi colocada no texturômetro TA.XT plus (Stable Micro Systems SMD, Inglaterra) depois colocada em contato com a porção de mucosa. Estes ensaios foram realizados na Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP, com o apoio da equipe da Profa.Dra. Michele F. M. B. Leite.

Para a realização deste ensaio, a mucosa hidratada foi fixada na extremidade inferior da sonda analítica (10 mm de diâmetro) com um anel de borracha, em seguida, acondicionou-se as formulações em pequenos recipientes de vidro na base do equipamento. Posteriormente aproximou-se as duas superfícies até que elas se tocassem. Em seguida, a sonda foi deslocada verticalmente na velocidade de 1 mm/s até que as duas superfícies se separassem, registrando-se a força e o trabalho requeridos para tal.

Resultados e Discussão

Diâmetro, espessura, ângulo de contato e morfologia das membranas

As membranas apresentaram diâmetro médio de (12,7±0,4) cm e espessura de (0,10±0,01) mm. A espessura obtida é considerada fina, e provavelmente o uso *in vivo* do biomaterial não seria desconfortável. O ângulo de contato médio foi de (45±4) °, o que indica, por serem menores do que 90°, que as membranas apresentam caráter hidrofílico^[12].

A análise por microscopia eletrônica de varredura (**Figura 1**) indicou que as membranas de QA não apresentam poros, mas possuem irregularidades na superfície que podem estar relacionadas com a distribuição heterogênea do complexo polieletrólito formado. Analisando os cortes transversais (**Figura 1 a, c**) também é possível notar a estrutura lamelar nas membranas. As membranas imersas em tampão acetato apresentaram grande capacidade de absorção do fluido, provavelmente devido ao fato da solução tampão acetato ser capaz de solubilizar a quitosana devido a seu pH de 4,0 e a esta ser solúvel em soluções ácidas. Quando a quitosana está combinada com o alginato, há a formação do PEC, com aumento na estabilidade, impedindo que a membrana seja totalmente solubilizada, mas ocorre uma expressiva absorção de fluido.

Capacidade de absorção de soluções fisiológicas e perda de massa das membranas

Os resultados alcançados para a capacidade de absorção estão indicados na **Tabela 1**. Observa-se que a membrana apresenta aumento paulatino da absorção com o tempo na solução salina e em tampão acetato, com valores muito mais pronunciados para a segunda solução. O biomaterial não se mostrou estável na solução salina tamponada, sofrendo dissolução já durante as primeiras 8 h de exposição, possivelmente em razão da alta concentração de íons fosfato em sua formulação, que são capazes de quelatar íons cálcio utilizados na reticulação do alginato presente na membrana, desestruturando-a.

Os resultados do ensaio de perda de massa (**Tabela 2**) comprovam os dados de absorção, visto que a membrana que absorve muito fluido tende a se desestruturar e sofrer erosão durante o período de análise ou ainda durante o período de secagem. As membranas imersas em tampão acetato apresentaram pronunciada perda de massa, novamente devido ao elevado volume de solução absorvido, que provavelmente solubilizou parte da estrutura.

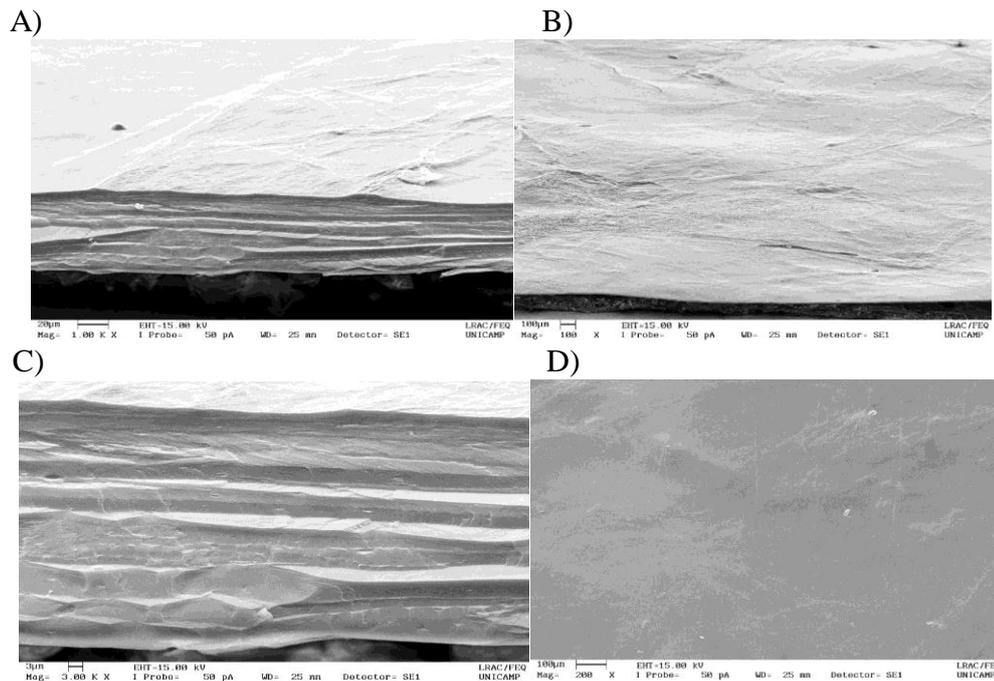


Figura 1- Cortes transversais (A,B,C) da membrana de quitosana e alginato 1:1 e visão de sua superfície (D).

Tabela 1- Capacidade de absorção de membranas feitas com alginato e quitosana (1:1).

Soluções	Capacidade de absorção (g/g)			
	8h	1 Dia	3 Dias	6 Dias
Saliva simulada	4,09±0,20	4,59±0,19	5,05±0,31	5,25±0,14
Salina tamponada	Degradação	Degradação	Degradação	Degradação
Tampão Acetato	37,96±2,34	44,86±2,73	52,20±0,90	54,57±2,93

Tabela 2 - Perda de massa das membranas quando expostas a soluções aquosas por 7 dias a 37°C.

Soluções	Perda de massa (%)
Saliva simulada	4,56±0,88
Salina tamponada	Degradação
Tampão acetato	18,43±0,94

Mucoadesividade dos biomateriais desenvolvidos

Os resultados alcançados na análise da mucoadesividade dos hidrogéis estão mostrados na Tabela 3, e estes foram comparados a dados obtidos anteriormente pela equipe da Profa. Dra. Michele F. M. B. Leite, da FOP/UNICAMP, para uma pomada bucal conhecida mucoadesiva, a OMCILON A ORABASE®, utilizada em lesões inflamatórias orais e lesões ulcerativas resultantes de trauma.

Tabela 5 – Força máxima e trabalho mucoadesivo das diferentes formulações de hidrogéis.

Formulação de hidrogel	Força de adesão (N)	Trabalho de adesão (N.mm)
A(1%),X(2,5%) Reticulado	0,0533±0,0052	0,021±0,003
A(1%),X(2,5%) Não reticulado	0,0767±0,0137	0,133±0,008
MC(10%),X(0,5%), MQ(0,5%) Reticulado	0,1038±0,0283	0,248±0,040
MC(10%),X(0,5%), MQ(0,5%) Não reticulado	0,0617±0,0040	0,155±0,020

MC- Metilcelulose, X- Goma xantana, CMQ-Carboximetil quitosana, A – Alginato

Nota-se que o comportamento da amostra de hidrogel reticulado com formulação de 10% de metilcelulose, 0,5% de xantana e 0,5% de carboximetil quitosana é o que mais se aproxima do observado para a pomada bucal analisada no que se refere à força de adesão. No caso das membranas, a reticulação promoveu uma diminuição no trabalho de adesão, o que significa que seria mais fácil a sua remoção do local de aplicação.



Este fato está relacionado com a diminuição de grupos funcionais que possivelmente interagiriam com a mucina. Para a OMCILON A ORABASE[®] foi observado que a força máxima de adesão é de 0,0938 N e o trabalho de adesão é de 3,49 N.mm em condições onde o ensaio de força foi de 0,5 N, por 30 s e velocidade de 1 mm/s, ou seja, diretamente comparáveis às utilizadas no presente trabalho. Entretanto, o trabalho de adesão, para todas as formulações, é inferior ao da pomada comercial, o que indica que o tempo requerido para o destacamento do material, uma vez aderido, é muito menor. Ainda assim, a formulação MC (10%), X (0,5%), MQ (0,5%) foi a que mostrou melhor desempenho também neste quesito.

Conclusão

Com este trabalho foi possível concluir que as membranas A+Q (1:1) apresentaram caráter hidrofílico com superfície lisa e estrutura lamelar, não se mostrando estáveis na presença de solução salina tamponada. Estas membranas apresentaram maior absorção perda de massa em tampão acetato. Também foi possível observar que dentre as formulações de hidrogel testadas, a formulação MC(10%), X(0,5%), MQ(0,5%) mostrou melhor desempenho tanto na força quanto no trabalho de adesão.

Agradecimentos

As autoras agradecem o apoio Financeiro concedido pelos órgãos de Fomento CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

Referências Bibliográficas

- [1] ZARGAR, V.; ASGHARI, M.; DASHTI, A. A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. *ChemBioEng Rev.*, 3, 204-226, 2015.
- [2] SZEKALSKA, M.; PUCIBOWSKA, A.; SZYMANSKA, E.; CIOSEK, P.; WINNICKA, K. Alginate: Current Use and Future Perspectives in Pharmaceutical and Biomedical Applications. *International Journal of Polymer Science*, 2016, 1-17, 2016.
- [3] KUMAR, A.; RAO, K. M.; HAN, S. S. Application of xanthan gum as polysaccharide in tissue engineering: A review. *Carbohydrate Polymers*, 180, 1-69, 2018.
- [4] NASSATO, P. L.; PIGNON, F.; SILVEIRA, J. L.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; RINAUDO, M. Methylcellulose, a Cellulose Derivative with Original Physical Properties and Extended Applications. *Polymers*, 7, 777-803, 2015.
- [5] WANG, L.; KHOR, E.; WEE, A.; LIM, L. Y. Chitosan-alginate PEC membrane as wound dressing: Assessment of incisional wound healing. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 63, p. 610-618, 2002.
- [6] YAN, X.; KHOR, E.; LIM, L. Y. PEC films prepared from chitosan-alginate coacervates. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 48, n. 7, p. 941-946, 2000.
- [7] DESAI, K. G. H.; MALLERY, S. R.; HOLPUCH, A. S.; SCHWENDEMAN, S. P. Development and in vitro-in vivo evaluation of fenretinide-loaded oral mucoadhesive patches for site-specific chemoprevention of oral cancer. *Pharmaceutical Research*, v. 10, p. 2599-2609, 2011.
- [8] CUBAYACHI, C.; COUTO, R. O.; GAITANI, C. M.; PEDRAZZI, V.; FREITAS, O.; LOPEZ, R. F. V. Needle-free buccal anesthesia using iontophoresis and amino amide salts combined in a mucoadhesive formulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 136, p. 1193-1201, 2015.
- [9] SANKALIA, M. G.; MASHRU, R. C.; SANKALIA, J. M.; SUTARIYA, V. B. Reversed chitosan-alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: Optimization and physicochemical characterization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 65, p. 215-232, 2007.
- [10] WESTIN, C. B.; NAGAHARA, M. H. T.; DECARLI, M. C.; KELLY, D. J.; MORAES, A. M. Development and characterization of carbohydrate-based thermosensitive hydrogels for cartilage tissue engineering. Submetido para publicação no *European Polymer Journal*.
- [11] ABRUZZO, A.; BIGUCCI, F.; CERCHIARA, T.; CRUCIANI, F.; VITALI, B.; LUPPI, B. Mucoadhesive chitosan/gelatin films for buccal delivery of propranolol hydrochloride. *Carbohydrate Polymers*, v. 87, n. 1, p. 581-588, 2012.
- [12] FÖRCH, R.; SCHÖNHERR, H.; JENKINS, T. A. *Surface design: Applications in bioscience and nanotechnology*. 1a ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2009.