



ESTUDOS PRELIMINARES DA INCORPORAÇÃO DE INDOMETACINA EM MATRIZ DE ESPONJOSA DE QUITOSANA PARA APLICAÇÃO EM LESÕES TEGUMENTARES

Wesley Castro da Silva (1); Cristina Kelly Toscano Gaião (2); Demis Ferreira de Melo (3);
Laryssa Mirelle da Silva (4); Rosemary Sousa Cunha Lima (5)
(*Universidade Estadual da Paraíba*, wesleycastros@hotmail.com (1); criistiinakelly@hotmail.com (2);
demiscz@gmail.com (3); lary.msilva@hotmail.com (4); rosaysousa1@hotmail.com (5))

Resumo: Inúmeras lesões cutâneas causadas por danos físicos, mecânicos e térmicos podem também afetar as funções de outros tecidos, gerando desordens fisiológicas. Alguns dispositivos podem ser desenvolvidos para o tratamento dessas lesões, a partir de vários tipos de polímeros, sendo a quitosana um dos mais estudados. A mesma tem recebido atenção especial por ser biodegradável, biocompatível, praticamente atóxico e, entre várias propriedades, permitir a liberação controlada de fármacos, como por exemplo a indometacina. Esse fármaco tem mostrado bons resultados quando incorporado em dispositivos de quitosana e tem bom potencial de aplicação no tratamento de lesões de pele. Entretanto, ainda não se tem uma definição da sua eficácia da aplicação com a quitosana de maneira isolada e nem na metodologia proposta por este trabalho. Assim, esse estudo teve como objetivo o desenvolvimento de matrizes esponjosas de quitosana e quitosana-indometacina e sua caracterização buscando indícios preliminares da incorporação do fármaco na matriz. Foram preparadas soluções de quitosana 1% e incorporada indometacina, previamente dissolvida em etanol absoluto, numa concentração de 250mg a cada 100mL de solução. A obtenção das esponjas foi feita a partir da liofilização das soluções congeladas a temperatura de -80°C . As amostras com e sem fármaco foram submetidas a análise macroscópica, teste de perda por dessecação, verificando a diferença de massa da amostra antes e após secagem em estufa a 105°C até peso constante, resistência química, a partir do repouso durante 24 horas em 250 mL da solução de HCl a $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ e grau de desacetilação, verificada por titulação potenciométrica, após dissolução das matrizes em solução de HCl a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. Os resultados mostraram diferenças macroscópicas nas esponjas, com modificações mecânicas após incorporação de indometacina. Tais modificações, embora não favoráveis à forma de aplicação podem ser modificáveis por outros excipientes, ainda a serem estudados. O teste de perda por dessecação não mostrou diferenças significativas entre as amostras, estando ambas abaixo de 20% de umidade, indicando um ambiente pouco favorável à incidência de microorganismos. O teste de resistência química mostrou que as esponjas de quitosana não resistiram ao meio ácido, dissolvendo-se, enquanto que as esponjas de quitosana-indometacina perderam a forma de feixes fibrosos e formaram depósitos de partículas de formato variável no fundo do recipiente. Esse resultado sugere a liberação controlada de indometacina pela quitosana, já que o depósito é possivelmente a indometacina, por sua insolubilidade em água. A verificação do grau de desacetilação mostrou diferenças entre as porcentagens de grupos amino livres, havendo mais grupos livres (73%) na amostra sem fármaco do que na amostra com fármaco (42,11%). Essa diferença é sugestiva da ocupação dos grupos amino por ligações com indometacina, o que indica incorporação do fármaco à matriz. Por fim, conclui-se que a caracterização indicou o desenvolvimento de matrizes propícias ao uso tópico e com a incorporação do fármaco. Entretanto, pelo caráter preliminar da pesquisa, são necessárias caracterizações mais aprofundadas que identifiquem e quantifiquem a presença do fármaco, além dos testes em meio biológico.

Palavras-chave: Quitosana, Esponja, Inflamação, Indometacina.

Introdução

A queimadura é uma das lesões da pele que afeta também outros tecidos orgânicos, cuja incidência é de 265.000 mortes por ano. Em



2008, mais de 410.000 queimaduras ocorreram nos Estados Unidos da América, sendo que cerca de 40.000 necessitaram de hospitalização (WHO, 2016). No Brasil ocorrem cerca de 1.000.000 de acidentes por queimaduras por ano (TAKEJIMA et al., 2011). As lesões tegumentares da queimadura são acompanhadas de muita dor causada pela inflamação local. Existem ainda inúmeras outras lesões cutâneas, as quais além de causarem danos físicos, mecânicos e térmicos, podem também afetar as funções de outros tecidos, gerando desordens fisiológicas (VEIGA, 2012).

O desenvolvimento de dispositivos de liberação controlada de fármacos tem promovido crescente interesse nas últimas décadas, contribuindo para o tratamento de vários tipos de lesões (LOPES, VEIGA, MORAIS, 2015). Os dispositivos desenvolvidos para o tratamento de lesões de pele podem ser constituídos por vários tipos de polímeros, sendo a quitosana um dos mais estudados (VEIGA, 2012; MOGOSANU, GRUMEZESCU, 2014). A quitosana é um polissacarídeo linear constituído por unidades de β -(1-4)-D-glucosamina ligadas e N-acetil-D-glucosamina. Comercialmente, é produzido pela desacetilação da quitina, um elemento estrutural no exoesqueleto de crustáceos e insetos (MESQUITA et al., 2013). Esse polissacarídeo tem sido tradicionalmente usado nos países orientais para o tratamento de queimaduras e cicatrização de feridas (CHANDY, SHARMA, 1993), assim como pescadores japoneses e o exército dos EUA já utilizavam como cicatrizante e agente hemostático (MACÊDO, 2009).

Além disso, em experimentos com modelos animais, a quitosana mostrou ter influência em todos os estágios de cicatrização do tecido (MUZZARELLI, 2009), mostrando-se um excelente polímero mucoadesivo e que permite boa adesão em tecidos epiteliais e nos tecidos de revestimento nas superfícies das mucosas (DASH et al., 2011). A mesma tem recebido atenção especial por ser biodegradável, ser biocompatível, ser praticamente atóxico, ter propriedades antimicrobianas e antifúngicas, ser hemostática, ter baixa imunogenicidade além de possuir função analgésica (DAI et al., 2008; FERNANDES, 2009; FRANCO, 2014; KIM et al., 2008; LARANJEIRA, FÁVERE, 2009; MONTEIRO, 2008; SANTOS, 2014).

Considerada um excelente biopolímero, a quitosana tem sido a escolha potencial para diversas aplicações em liberação controlada de fármacos, *scaffolds* para engenharia de tecidos, membranas para a cicatrização de feridas, devido às suas propriedades físicas, químicas e biológicas que podem ser facilmente controladas. Dentre suas utilizações, a cicatrização de feridas tem se destacado, devido à sua



importância no tratamento de queimaduras e na cicatrização de lesões cirúrgicas relacionadas ou não a área cosmética. (TOAN, TAM, 2010). Um dos fármacos que vem sendo estudado para lesões tópicas é a indometacina.

A indometacina é um fármaco de ação anti-inflamatória, antipirética e analgésica, sendo praticamente insolúvel em água e pouco solúvel em meio ácido. Esse fármaco tem mostrado bons resultados quando incorporado em dispositivos de quitosana e tem bom potencial de aplicação no tratamento de lesões de pele e em tecidos moles, como cartilagens (FLOREY, 1984; LOPES, VEIGA, MORAIS, 2015). Entretanto, ainda não se tem uma definição da eficácia da aplicação deste fármaco com a quitosana de maneira isolada e nem na metodologia de liofilização. Com a finalidade de reduzir o perfil dos efeitos adversos da indometacina, tem sido proposta a esterificação ou amidação de seu grupamento ácido (BONINA et al., 1997; KALGUTKAR et al., 2000).

Tendo em vista o contexto explicitado, esse estudo teve como objetivo o desenvolvimento de matrizes esponjosas de quitosana, quitosana-indometacina e sua caracterização buscando indícios preliminares da incorporação do fármaco na matriz, a fim de sugerir a eficácia do método para aplicação em lesões tegumentares com liberação controlada deste medicamento anti-inflamatório.

Metodologia

Desenvolvimento da solução de quitosana e quitosana-indometacina: Inicialmente foram preparadas soluções de quitosana 1% (P/V) a partir da dissolução do pó de quitosana (Sigma Aldrich®) em solução aquosa levemente ácida de ácido acético 1% (V/V) e foram mantidas sob agitação mecânica por 24 horas. Posteriormente, adaptou-se a técnica de incorporação da indometacina proposta por Lopes, Veiga e Moraes (2014) e adicionaram-se 250 mg de indometacina para cada 100 mL da solução anterior, a qual fora previamente solubilizada em etanol absoluto, por dispersão através de agitação mecânica durante 3 horas. Finalmente, foram transferidos 25 mL da preparação para o recipiente que seria conduzido à liofilização. O ensaio foi realizado em duplicata.

Obtenção das esponjas de quitosana e quitosana-indometacina: O material obtido anteriormente foi levado ao freezer por 24 horas a



-80°C e, após este período, submetido à secagem a frio por liofilização durante 24 horas (ARAÚJO, 2009) no Liofilizador L108 - LIOTOP® - Brasil, localizado no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste - Certbio da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG.

Teste de perda por dessecação: O teor de água foi verificado pela diferença de massa da amostra antes e após secagem em estufa a 105°C até peso constante, através da Equação 1.

Equação 1. Equação para determinação do teor de água da amostra.

$$\%U = [(P_a - P_s) \div P_a] * 100$$

Onde U% é o teor de água, P_a o peso da amostra antes da secagem e P_s é o peso da amostra seca

Resistência química: Foi avaliada a resistência química das esponjas a partir do repouso durante 24 horas em 250 mL da solução de HCl a 0,2 mol.L⁻¹ (TORRES et al., 2005). Os ensaios foram realizados em duplicata e a dissolução foi avaliada visualmente após esse período.

Grau de desacetilação: Para avaliar o grau de desacetilação pelo método da titulação potenciométrica. A amostra foi dissolvida em solução de HCl a 0,1 mol.L⁻¹ sob agitação mecânica constante durante 2 horas até completa homogeneização. A determinação da quantidade de grupos aminos protonáveis da amostra foi realizada por titulação potenciométrica, utilizando-se uma solução de NaOH a 0,02 mol.L⁻¹ como titulante e para as medidas de pH utilizou-se um pHmetro de bancada (TORRES et al., 2005; SOUZA, ZAMORA, ZAWADSKI, 2010)

Em seguida, foi elaborada a curva de titulação e a partir desta foram feitos os gráficos de primeira e segunda derivada. Os pontos de inflexão da segunda derivada permitiram determinar o percentual de grupos amino livres, conforme a Equação 2.

Equação 2. Determinação da porcentagem de grupamentos desacetilados

$$\%NH_2 = [MNaOH * (V_2 - V_1) * 161 * 100] / m$$

Onde, “M” é a concentração da solução de NaOH, “V₁” (primeiro ponto de inflexão) e “V₂” (segundo ponto de inflexão) os volumes necessários para neutralizar o excesso de HCl da amostra e a amostra protonada de quitosana, respectivamente; 161 é a massa molar da unidade monomérica da quitosana e “m” a massa da amostra da esponja de quitosana-indometacina, em gramas. O 100 torna o valor uma porcentagem.

Resultados e discussão

Para verificar a qualidade da amostra de maneira preliminar, foram realizadas a análise macroscópica e o teste de perda por dessecação. Na análise macroscópica dos materiais liofilizados, verificou-se que as esponjas de quitosana sem incorporação do fármaco mostraram-se diferentes das em que havia incorporação de indometacina. As esponjas de quitosana apresentaram coloração branco-amarelada, aparência fibrosa, mas flexível e macia, e com baixo comportamento elástico à deformação por dobramento. Também não mostraram adesão ao recipiente. O diâmetro das esponjas foi de aproximadamente 7 cm e espessura foi menor que 1 mm (Figura 1).

Figura 1: Esponja de quitosana



Fonte: Arquivo da pesquisa

Já as esponjas de quitosana-indometacina apresentaram a mesma coloração, mas diferenças na consistência. A rede fibrosa não se mostrou tão coesa, havendo maior fragilidade. Mostrou flexibilidade, mas com tendência à deformação plástica ao dobramento. Além disso, apresentou tendência a adesão à parede do recipiente.

Figura 2: Esponja de quitosana-indometacina



Fonte: Arquivo da pesquisa

As diferenças mecânicas observadas na manipulação das esponjas são importantes na aplicação tópica e podem ser modificadas com utilização de excipientes aglutinantes para melhorar a consistência das esponjas e excipientes lubrificantes (anti-aderentes) para impedir a agregação ao recipiente. Essas modificações são sugeridas para otimização da aplicação do biomaterial.

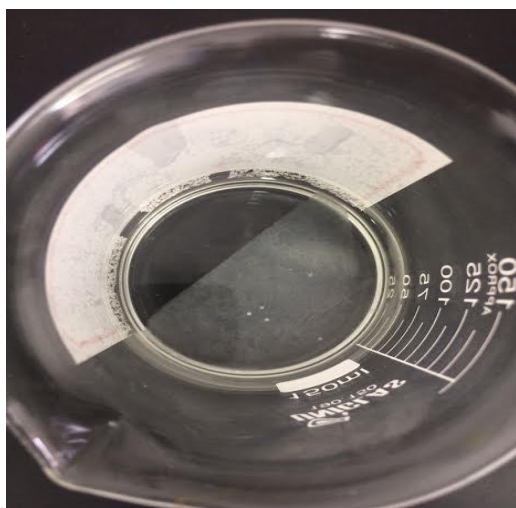
Outra observação foi quanto ao diâmetro e formato das esponjas, com e sem indometacina, os quais eram dependentes do formato do recipiente em que as soluções eram depositadas para a liofilização, já a espessura é dependente do volume e concentração dos constituintes da solução. Com isso, pode-se considerar a capacidade moldável do biomaterial, de acordo com a necessidade da aplicação.

A determinação da perda por dessecação também foi realizada para avaliar conteúdo aquoso nas amostras. As amostras apenas de quitosana apresentaram, em média, um teor de água de 12,92%, enquanto que as amostras de quitosana-indometacina apresentaram teor de 16,87%. Percebe-se também que não houve diferença

significativa nos teores, ainda que a amostra com o fármaco tenha tido maior perda por dessecação. Pode-se justificar esse fato à utilização de álcool etílico na solubilização da indometacina, o qual pode estar presente de maneira residual nas amostras de quitosana-indometacina e ter sido volatilizado apenas na dessecação em estufa. O teste mostrou, portanto, baixa composição de água nas amostras. Uma composição baixa de água infere em uma maior estabilidade frente à ação de microorganismos, sendo nesse sentido um biomaterial adequado a sua aplicação.

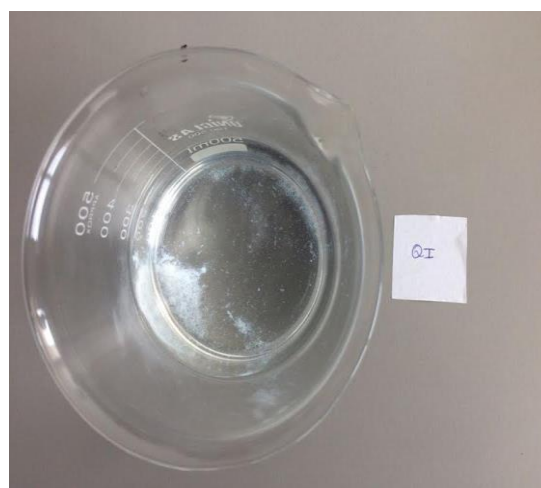
Para avaliar de maneira preliminar a presença de indometacina nas amostras desenvolvidas foram realizados o teste de resistência química e a quantificação do grau de desacetilação. As amostras de quitosana mergulhadas em meio ácido não resistiram ao pH ácido e se dissolveram no meio, o que era esperado, já que a quitosana é solúvel em meio de levemente ácido, conforme verifica-se na Figura 3. Entretanto, as amostras de quitosana-indometacina não resistiram e tiveram apresentação peculiar. As esponjas com indometacina incorporada se desagregaram no meio ácido e formaram precipitados na forma de partículas de formato variável, conforme mostrado na Figura 4.

Figura 3: Teste de resistência química de esponja de quitosana



Verifica-se ausência de depósito e limpidez da amostra. **Fonte:** Arquivo da pesquisa.

Figura 4: Teste de resistência química de esponja de quitosana-indometacina.



Verifica-se presença de depósito na forma de partículas de formato variado.

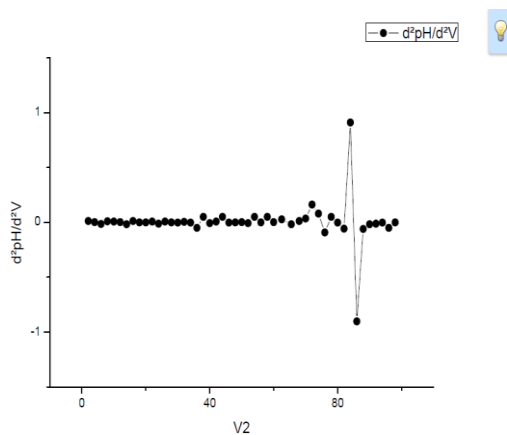
Fonte: Arquivo da pesquisa.



Pode-se sugerir que a liberação da indometacina pode ocorrer em meio ácido já que a quitosana não resiste ao pH ácido do meio, conforme mostrado no teste apenas com quitosana, e ocorreu formação de um precipitado de cor similar ao pó da indometacina. O depósito, provavelmente, é composto por indometacina, já que este fármaco é caracterizado por sua insolubilidade em água.

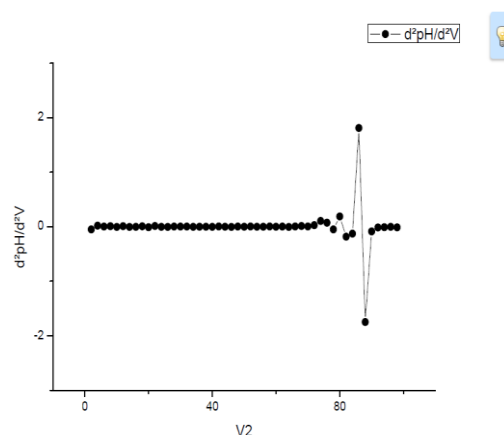
As titulações potenciométricas foram realizadas com as amostras com e sem fármaco. Com os valores de pH para cada volume de titulante foram desenvolvidas as curvas de titulação. Para encontrar os pontos de inflexão necessários ao cálculo do grau de desacetilação, o método da segunda derivada foi realizado. As Figuras 5 e 6 mostram, respectivamente, os gráficos da segunda derivada pelo volume de uma das amostras de quitosana e de uma amostra de quitosana e indometacina.

Figura 5: Gráfico da segunda derivada da titulação potenciométrica da esponja de quitosana



Fonte: Arquivo da pesquisa.

Figura 6: Gráfico da segunda derivada da titulação potenciométrica da esponja de quitosana-indometacina



Fonte: Arquivo da pesquisa

Os resultados das titulações potenciométricas concordaram com o que já havia sido verificado no teste de resistência química. O teste quantificou os grupamentos amino livres, o que se chama de grau de desacetilação e mostrou diferença nas amostras de quitosana e quitosana-indometacina. O grau de desacetilação das esponjas de quitosana foi, em média, 73%, enquanto que o grau de desacetilação das



esponjas quitosana-indometacina foi, em média, 42,11%. Quanto maior o grau de desacetilação, mais grupos amino livres, o oposto também é real. Como o grau de desacetilação da amostra quitosana-indometacina reduziu-se consideravelmente, existe o indicativo de que houve ocupação dos grupamentos amino pelo fármaco, diminuindo a quantidade desses grupos livres e assim diminuindo o grau de desacetilação. Há, portanto, uma indicação da presença de fármaco na amostra e está interagindo com os grupamentos amino livres do polímero.

De modo geral, as análises macroscópicas e o teste de perda por dessecação mostraram de maneira preliminar que as amostras desenvolvidas estão dentro da qualidade desejada, embora alguns ajustes possam ser feitos para melhorar as características mecânicas do dispositivo. Já os testes preliminares para identificação da presença de indometacina mostraram que muito possivelmente o fármaco está se ligando à quitosana, conforme sugerido pela verificação do grau de desacetilação, sendo de maneira estável, envolvendo a indometacina, conforme mostrado pela deposição de partículas no teste de resistência, indicando uma possível uma liberação controlada em meios biológicos.

Conclusão

Os testes preliminares indicaram aparência, formato e características mecânicas favoráveis à utilização como dispositivo tópico para lesões tegumentares. Além disso, sugerem, em ambos os testes preliminares de identificação da indometacina, a presença do fármaco na matriz esponjosa de quitosana, sendo possível uma liberação controlada do mesmo pelo polímero no local da lesão. Entretanto, a pesquisa teve caráter preliminar, sendo necessárias, portanto, caracterizações mais aprofundadas que identifiquem e quantifiquem a presença do fármaco, além dos testes em meio biológico.

Referências

ARAÚJO, R.S. Desenvolvimento, Caracterização e Liofilização de Nanopartículas e Encapsulamento de Antibiótico de uso Veterinário. Universidade Federal de Rio preto. Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. **Dissertação**. Ouro Preto, MG, 2009. 131f.

BONINA, F. et al. f-ethylazacycloalkan-2one indomethacin esters as new oral prodrugs – chemical stability, enzymatic hydrolysis, anti-inflammatory activity and gastrointestinal



toxicity. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 156, p. 245-250.1997.

CHANDY, T.; SHARMA, C. P. Chitosan matrix for oral sustained delivery of ampicilin. **Biomaterial**, v. 12, n. 12, p. 65- 70, 1993.

DAI, T. et al. Chitosan acetate bandage as a topical antimicrobial dressing for infected burns. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 2, p. 393-400, 2008.

DASH, M. et al. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in polymer science**, v.36, n. 8, p. 981-1014, 2011.

FERNANDES, L.L. **Produção e caracterização de membranas de quitosana e quitosana com sulfato de condroitina para aplicações biomédicas**. Dissertação - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

FRANCO, P. B. **Desenvolvimento e caracterização de membranas de quitosana e casca de banana verde para cicatrização de feridas cutâneas**. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2014.

FLOREY, K. Analytical profiles of drug substances, v. 13, p. 211-235, 1984.

KALGUTKAR, A.S.; MARNETT, A.B.; CREWS, B.C.; REMMEL, R.P.; MARNETT, L.J. Ester and amide derivatives of the nonsteroidal antiinflammatory drug, indomethacin, as selective cyclooxygenase-2 inhibitors. **J. Med. Chem.**, v. 43, p. 2860–2870, 2000.

KIM, I-Y. et al. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. **Biotechnology Advances**, v.26, p. 1-21, 2008.

LARANJEIRA, M.C.M.; FÁVERE, V.T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, v. 32, n.3, p. 672-678, 2009.

LOPES, S.A.; VEIGA, I.G.; MORAES, A.M. Desenvolvimento de Dispositivo de Quitosana e Xantana para a Liberação Tópica ou em Tecidos Moles de Indometacina. **XX Congresso Brasileiro de engenharia Química**. 19 a 22 de outubro de 2014. Florianópolis- SC.

MACEDO, M.O.C. **Modificação de membranas de quitosana por plasma para uso**



biológico. Dissertação – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

MESQUITA, A.K.F. et al. Quitosana na composição de formas mucoadesivas de liberação de fármacos: uma prospecção tecnológica. **GEINTEC**, v. 3, n. 3, p. 146-154, 2013.

MOGOSANU, G.D.; GRUMEZESCU, A.M. Natural and synthetic polymers for wounds and burn dressing. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 463, p. 127-136, 2014.

MONTEIRO, N.S. **Caracterização de matrizes de Quitosano para a regeneração de tecidos produzidas pela técnica de TIPS.** Dissertação – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2008.

MUZZARELLI, R.A.A. et al. Chitin and chitosan hydrogels. **Handbook of hydrocolloids**, p. 849-888, 2009.

SANTOS, I.M.R. **Desenvolvimento e avaliação preliminar de um sistema de libertação de antibiótico de quitosano para utilização em infeções oculares superficiais.** Dissertação - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, 2014.

SOUZA, K.V.; ZAMORA, P.G.P.; ZAWADSKI, S.F. Esferas de Quitosana/Fe na Degradação do Corante Azul QR-19 por Processos Foto-Fenton Utilizando Luz Artificial ou Solar. **Polímeros**, v. 20, n. 3, p. 210-214, 2010.

TAKEJIMA, M. L., et al. Prevenção de queimaduras: avaliação do conhecimento sobre prevenção de queimaduras em usuários das unidades de saúde de Curitiba. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v.10, n.3, p. 85-88, 2011.

TOAN, N.V.; TAM,N.D. **Application of shrimp chitosan solution as additive and supplementing ingredient in culturing 3T3 Fibroblast cells.** School Proceedings of the 3rd International Conference on the Development of BME in Vietnam, 11-14th Jan 2010.

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.

VEIGA, I. G. **Produção e caracterização de membranas de quitosana associada com outros biopolímeros para liberação controlada de anti-inflamatórios.** 2012. 145 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP.



II CONBRACIS
II Congresso Brasileiro de Ciências da Saúde

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Burns. Disponível em:

<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs365/en/>>. Acesso em 28/04/2017.

