

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQ

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE FILMES
POLIMÉRICOS DE QUITOSANA PARA APLICAÇÃO COSMÉTICA**

ILLEN CANANI LIBIO

Tese de Doutorado

Porto Alegre, 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQ

ILLEN CANANI LIBIO

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE FILMES
POLIMÉRICOS DE QUITOSANA PARA APLICAÇÃO COSMÉTICA**

**Tese apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de
Doutora em Química**

**Profª. Drª. Nádyá Pesce da Silveira
Orientadora**

Porto Alegre, junho/2016

A presente tese foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações que serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre 12/2011 e 06/2016, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação da Professora Doutora Nádyá Pesce da Silveira. A tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutora em Química pela seguinte banca examinadora:

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Nádyá Pesce da Silveira

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Fabiano Vargas Pereira
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof^ª Dr^ª Maria Madalena Camargo Forte
Escola de Engenharia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. João Henrique Zimnoch dos Santos
Instituto de Química – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^ª Dr^ª Irene Teresinha Santos Garcia
Instituto de Química – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Ilgen Canani Libio

*À minha mãe Vera e minha irmã Thais (in memoriam),
com muito amor e carinho.*

AGRADECIMENTOS

- À Deus, por esta conquista;
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de Doutorado;
- Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PPGQ/UFRGS), e em especial ao Prof. Dr. Paulo H. Schneider, pela disponibilização de recursos financeiros para realização de meu projeto de Doutorado;
- À Prof^a Dr^a Nádyá P. da Silveira (PPGQ/UFRGS), pela orientação durante o período deste curso;
- À Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), especialmente ao Comitê de Ética e Pesquisa em Animais, pela oportunidade de preparação dos segmentos de pele de orelha de porco para realização dos ensaios de liberação *in vitro*;
- Ao Sr. Fabiano F. da Silveira (Frigorífico Borrússia) pelo fornecimento das orelhas de porcos necessárias para realização dos ensaios de liberação *in vitro*;
- Ao Prof. Dr. Marco F. Ferrão (PPGQ/UFRGS) e à Dr^a Fabiana N. Grosser (Central Analítica da UFRGS – CA/UFRGS), pelo auxílio e aprendizado quanto à utilização do Espectrofotômetro no Infravermelho;
- Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS (CME/UFRGS) em especial, à técnica Raquel, pelo apoio e instruções para o uso do Equipamento de Ponto Crítico;
- Ao Laboratório Multiusuário de Análise Técnica da UFRGS (LAMAT/UFRGS) pela contribuição prestada quanto à realização das análises técnicas;
- À minha mãe Vera, não só pelo amor, paciência e compreensão uma vez que aceitou se privar de minha companhia por tantas horas, mas também pelo incentivo permanente para persistir na busca dos meus sonhos;
- À Prof^a Dr^a Maria I. Z. Lionzo (UFCSPA), pela colaboração, acompanhamento e aprendizado durante o período de doutoramento;
- Ao meu grande amigo Dr. Renan Demori pela amizade, companheirismo, carinho e, acima de tudo, pela paciência além das críticas;
- E, por fim, à Prof^a Dr^a Adriana R. Pohlmann (PPGQ/UFRGS), pelas sugestões referentes à elaboração do artigo.

**ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO
EM PERIÓDICO CIENTÍFICO**

LIBIO, I. C.; DEMORI, R.; FERRÃO, M. F.; LIONZO, M. I. Z.; DA SILVEIRA, N. P. Films based on neutralized chitosan citrate as innovative composition for cosmetic application. *Materials Science and Engineering C*, v. 67, p. 115-124, 2016.

SUMÁRIO

Artigos Aceitos para Publicação em Periódico Científico.....	vi
Sumário.....	vii
Lista de Figuras.....	x
Lista de Tabelas.....	xv
Lista de Equações.....	xxi
Resumo.....	xxii
Abstract.....	xxiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. JUSTIFICATIVA E INOVAÇÃO.....	5
3. OBJETIVOS.....	7
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
4.1. A PELE HUMANA	8
4.1.1. Histologia da Pele	8
4.1.1.1. Epiderme.....	9
4.1.1.1.1. Estrato córneo.....	9
4.1.1.1.2. Epiderme viável.....	12
4.1.1.2. Derme	14
4.1.1.3. Hipoderme	15
4.1.2. Função Barreira e a Permeabilidade Cutânea	15
4.2. ENVELHECIMENTO HUMANO	19
4.2.1. O Envelhecimento Populacional	19
4.2.2. Envelhecimento Cutâneo	21
4.3. HIDRATAÇÃO CUTÂNEA	23
4.3.1. Hidratação Fisiológica da Pele.....	23
4.3.2. Hidratação Cosmética da Pele.....	26
4.4. ÁCIDO HIALURÔNICO	29
4.4.1. Estrutura Química e Propriedades Físico-Químicas	29
4.4.2. Funções Biológicas.....	32
4.4.3. Fontes de Obtenção	32
4.4.4. Aplicações.....	33
4.4.4.1. O Ácido Hialurônico na Dermatologia e Cosmetologia	34

4.5. QUITOSANA.....	36
4.5.1. <i>Estrutura Química e Propriedades Físico-Químicas</i>	36
4.5.2. <i>Fontes de Obtenção</i>	37
4.5.3. <i>Aplicações</i>	38
4.5.3.1. Filmes porosos de quitosana como sistema matricial para liberação de ativos cosméticos.....	39
5. PARTE EXPERIMENTAL.....	45
5.1. PREPARAÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANA.....	45
5.1.1. <i>Materiais</i>	45
5.1.2. <i>Métodos</i>	45
5.1.2.1. Preparação dos filmes de quitosana em solução aquosa de ácido acético ou ácido cítrico, NaOH:Na ₂ CO _{3(aq)} como agente neutralizante e glicerol como plastificante.....	45
5.1.2.2. Preparação dos filmes de quitosana em solução aquosa de ácido acético ou ácido cítrico, Na ₂ CO _{3(aq)} como agente neutralizante e glicerol como plastificante.....	47
5.1.2.3. Preparação dos filmes de quitosana em solução aquosa de ácido acético ou ácido cítrico e solução tampão como agente neutralizante e glicerol como plastificante.....	49
5.2. ENSAIOS DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	50
5.2.1. <i>Materiais</i>	51
5.2.2. <i>Métodos</i>	51
5.2.2.1. Preparação dos segmentos de pele a partir de orelha de porco	51
5.2.2.2. Condições experimentais para os ensaios de liberação in vitro.....	52
5.3. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	52
5.3.1. <i>Caracterização dos Filmes de Quitosana Pré-Ensaio de Liberação in vitro</i>	52
5.3.1.1. Testes de porosidade	53
5.3.1.2. Testes de intumescimento.....	53
5.3.1.3. Testes de solubilização em meio ácido e em meio alcalino.....	54
5.3.1.4. Medidas de espessura.....	54
5.3.1.5. Determinação do conteúdo de umidade	55
5.3.1.6. Análise térmica simultânea (SDT)	55
5.3.1.7. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	55
5.3.2. <i>Caracterização dos Filmes de Quitosana e Segmentos de Pele Pós-Ensaio de Liberação in vitro</i>	56
5.3.2.1. Espectroscopia de infravermelho com refletância atenuada (FTIR-ATR).....	56
5.3.2.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	57
5.4. DESCARTE DE RESÍDUOS	58
5.4.1. <i>Descarte de Resíduos Químicos</i>	58
5.4.2. <i>Descarte de Resíduos Biológicos</i>	58
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
6.1. FILMES DE QUITOSANA PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO _(aq) OU ÁCIDO CÍTRICO _(aq) , NaOH:Na ₂ CO _{3(aq)} COMO AGENTE NEUTRALIZANTE E GLICEROL COMO PLASTIFICANTE	60

6.1.1. Avaliação Estatística dos Efeitos dos Fatores Concentração de Quitosana, Agente Neutralizante, Período de Neutralização, Percentual de Plastificante e Meio Dispersante no Percentual de Porosidade dos Filmes de Quitosana	61
6.1.2. Avaliação Estatística dos Efeitos dos Fatores Percentual de Plastificante, Agente Neutralizante e Meio Dispersante no Grau de Intumescimento dos Filmes de Quitosana	82
6.2. FILMES DE QUITOSANA PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) OU ÁCIDO CÍTRICO_(aq), NA₂CO_{3(aq)} COMO AGENTE NEUTRALIZANTE E GLICEROL COMO PLASTIFICANTE.....	91
6.2.1. Avaliação Estatística dos Efeitos dos Fatores Percentual de Plastificante, Agente Neutralizante e Meio Dispersante no Percentual de Porosidade dos Filmes de Quitosana.....	92
6.2.2. Avaliação Estatística dos Efeitos dos Fatores Percentual de Plastificante, Agente Neutralizante e Meio Dispersante no Grau de Intumescimento dos Filmes de Quitosana	102
6.2.3. Avaliação do Percentual de Solubilização em Meio Ácido e em Meio Alcalino dos Filmes de Quitosana	110
6.3. FILMES DE QUITOSANA PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) OU ÁCIDO CÍTRICO_(aq), SOLUÇÃO TAMPÃO COMO AGENTE NEUTRALIZANTE E GLICEROL COMO PLASTIFICANTE	111
6.3.1. Avaliação Estatística dos Efeitos dos Fatores Percentual de Plastificante e Agente Neutralizante no Grau de Intumescimento dos Filmes de Quitosana	111
6.3.2. Avaliação Estatística do Efeito do Fator Percentual de Plastificante no Percentual de Solubilização em Meio Ácido e em Meio Alcalino dos Filmes de Quitosana	117
6.3.3. Avaliação Estatística dos Efeitos dos Fatores Percentual de Plastificante e Meio Dispersante na Espessura dos Filmes de Quitosana	120
6.3.4. Avaliação Estatística dos Efeitos dos Fatores Percentual de Plastificante e Meio Dispersante no Conteúdo de Umidade dos Filmes de Quitosana	124
6.3.5. Análise Térmica Simultânea	128
6.3.6. Calorimetria Exploratória Diferencial	132
6.4. CARACTERIZAÇÃO DOS SEGMENTOS DE PELE E FILMES DE QUITOSANA PÓS-ENSAIOS DE LIBERAÇÃO IN VITRO	134
6.4.1. Espectroscopia de Infravermelho com Refletância Atenuada	135
6.4.2. Microscopia Eletrônica de Varredura	137
7. CONCLUSÕES	143
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145
ANEXOS	157

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 4.1 – DESENHO ESQUEMÁTICO DA ANATOMIA DA PELE HUMANA.....	8
FIGURA 4.2 – DESENHO QUEMÁTICO DO ESTRATO CÓRNEO E DE UM CORNEÓCITO COM OS ENVELOPES LIPÍDICO E PROTEICO	10
FIGURA 4.3 – DESENHO ESQUEMÁTICO DAS BICAMADAS LIPÍDICAS DO ESTRATO CÓRNEO.....	11
FIGURA 4.4 – DESENHO ESQUEMÁTICO DA CAMADA CÓRNEA E SUAS REGIÕES: <i>STRATUM COMPACTUM</i> E <i>STRATUM DISJUNCTION</i>	12
FIGURA 4.5 – DESENHO ESQUEMÁTICO DA ANATOMIA DA EPIDERMIS HUMANA: (A) DIVISÃO POR CAMADAS (ESTRATOS) E (B) JUNÇÕES INTERCELULARES. AS SETAS INDICAM A LOCALIZAÇÃO DAS JUNÇÕES INTERCELULARES NAS CAMADAS CORRESPONDENTES.....	14
FIGURA 4.6 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DAS FASES LAMELARES CRISTALINAS DA MATRIZ LIPÍDICA CONSTITUINTE DO ESTRATO CÓRNEO.....	16
FIGURA 4.7 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DA ORGANIZAÇÃO LATERAL DA MATRIZ LIPÍDICA CONSTITUINTE DO ESTRATO CÓRNEO.....	17
FIGURA 4.8 – DESENHO ESQUEMÁTICO DAS VIAS DE PERMEAÇÃO DE ATIVOS COSMÉTICOS ATRAVÉS DA PELE.....	19
FIGURA 4.9 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA DISTRIBUIÇÃO ETÁRIA DO BRASIL EM 2015 E 2030. EM LARANJA: ANO DE 2015. EM AZUL ESCURO: ANO DE 2030.....	20
FIGURA 4.10 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA DISTRIBUIÇÃO ETÁRIA NO MUNDO EM 2015 E 2030. EM ROSA: ANO DE 2015. EM AZUL CLARO: ANO DE 2030	21
FIGURA 4.11 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO NMF	24
FIGURA 4.12 – DESENHO ILUSTRATIVO DO PROCESSO DE DESCAMAÇÃO DO ESTRATO CÓRNEO: (A) NATURAL E (B) INDUZIDO PELA DRÁSTICA REDUÇÃO NA UMIDADE RELATIVA DO AR.....	25
FIGURA 4.13 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO DE HIDRATAÇÃO DA PELE POR OCLUSÃO	27
FIGURA 4.14 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO DE HIDRATAÇÃO DA PELE POR UMECTAÇÃO.....	28
FIGURA 4.15 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO DE HIDRATAÇÃO DA PELE POR UMECTAÇÃO ATIVA.....	28
FIGURA 4.16 – FÓRMULA ESTRUTURAL DO ÁCIDO HIALURÔNICO: (A) ESTRUTURA PRIMÁRIA; (B) E (C) ESTRUTURA SECUNDÁRIA: (B) MODELO EM SOLUÇÃO DE DIMETILSULFÓXIDO (DMSO) E (C) MODELO EM SOLUÇÃO AQUOSA	30
FIGURA 4.17 – FÓRMULA ESTRUTURAL DO ÁCIDO HIALURÔNICO: (A) REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL CONTENDO ÁTOMOS DE HIDROGÊNIO AXIAIS (H) RESPONSÁVEIS PELA FORMAÇÃO DOS CENTROS HIDROFÓBICOS DA MACROMOLÉCULA; (B) E (C) ESTRUTURA TERCIÁRIA DO ÁCIDO HIALURÔNICO EM SOLUÇÃO AQUOSA: (B) REPRESENTAÇÃO DAS INTERAÇÕES INTERMOLECULARES ENTRE OS CENTROS HIDROFÓBICOS (MANCHAS EM CINZA) E DE LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO INTERMOLECULARES (INDICADO PELAS SETAS) ENVOLVENDO AS MOLÉCULAS DE ÁGUA E OS GRUPOS <i>N</i> -ACETILA E CARBOXILATO, E (C) ESTRUTURA DE <i>FITA TORCIDA</i>	31

- FIGURA 4.18** – FÓRMULA ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS: (A) QUITINA E (B) QUITOSANA 36
- FIGURA 4.19** – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS PROCESSOS DE PREPARAÇÃO DE FILMES POROSOS DE QUITOSANA: (A) SEPARAÇÃO DE FASES POR INDUÇÃO TÉRMICA E (B) SEPARAÇÃO DE FASES POR CASTING DE UMA SOLUÇÃO POLIMÉRICA 42
- FIGURA 4.20** – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS PROCESSOS DE PREPARAÇÃO DE FILMES POROSOS DE QUITOSANA: (C) SEPARAÇÃO DE FASES POR PRECIPITAÇÃO DE POLÍMERO DE UMA FASE VAPOR E (D) SEPARAÇÃO DE FASES POR IMERSÃO-PRECIPITAÇÃO 43
- FIGURA 5.1** – DIAGRAMA EM BLOCOS REFERENTE À PREPARAÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANA EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) COM NaOH:Na₂CO_{3(aq)} COMO AGENTE NEUTRALIZANTE: FA₁, FA₅ E FA₇: FILMES DE QUITOSANA A 1,1; 1,5 E 1,7% (m/v) PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) (FILMES NÃO NEUTRALIZADOS); N₁₁ E N₁₅: AGENTE NEUTRALIZANTE NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,01) E (1:0,05) M, RESPECTIVAMENTE; 24 E 48: PERÍODO DE IMERSÃO (h) DOS FILMES NÃO NEUTRALIZADOS NO AGENTE NEUTRALIZANTE 46
- FIGURA 5.2** – DIAGRAMA EM BLOCOS REFERENTE À PREPARAÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANA EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) OU ÁCIDO CÍTRICO_(aq) COM NaOH:Na₂CO_{3(aq)} COMO AGENTE NEUTRALIZANTE E GLICEROL COMO PLASTIFICANTE: FA₁ E FC₁: FILMES DE QUITOSANA A 1,1% (m/v) PREPARADOS, RESPECTIVAMENTE, EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) E ÁCIDO CÍTRICO_(aq); FA₁P₁ E FC₁P₁: FILMES DE QUITOSANA A 1,1% (m/v) PREPARADOS, RESPECTIVAMENTE, EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) E ÁCIDO CÍTRICO_(aq) CONTENDO GLICEROL COMO PLASTIFICANTE (13% m/m); FA₁P₃ E FC₁P₃: FILMES DE QUITOSANA A 1,1% (m/v) PREPARADOS, RESPECTIVAMENTE, EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) E ÁCIDO CÍTRICO_(aq) CONTENDO GLICEROL COMO PLASTIFICANTE (33% m/m). ESSAS FORMULAÇÕES CORRESPONDEM AOS FILMES NÃO NEUTRALIZADOS; N₁₁ E N₁₅: AGENTE NEUTRALIZANTE NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,01) E (1:0,05) M, RESPECTIVAMENTE; 24: PERÍODO DE IMERSÃO (h) DOS FILMES NO AGENTE NEUTRALIZANTE.....47
- FIGURA 5.3** – DIAGRAMA EM BLOCOS REFERENTE À PREPARAÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANA EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) OU ÁCIDO CÍTRICO_(aq) COM Na₂CO_{3(aq)} COMO AGENTE NEUTRALIZANTE E GLICEROL COMO PLASTIFICANTE: FA₁ E FC₁: FILMES DE QUITOSANA A 1,1% (m/v) PREPARADOS, RESPECTIVAMENTE, EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) E ÁCIDO CÍTRICO_(aq); FA₁P₁ E FC₁P₁: FILMES DE QUITOSANA A 1,1% (m/v) PREPARADOS, RESPECTIVAMENTE, EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) E ÁCIDO CÍTRICO_(aq) CONTENDO GLICEROL COMO PLASTIFICANTE (13% m/m); FA₁P₃ E FC₁P₃: FILMES DE QUITOSANA A 1,1% (m/v) PREPARADOS, RESPECTIVAMENTE, EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) E ÁCIDO CÍTRICO_(aq) CONTENDO GLICEROL COMO PLASTIFICANTE (33% m/m). ESSAS FORMULAÇÕES CORRESPONDEM AOS FILMES NÃO NEUTRALIZADOS; N₁ E N₅: AGENTE NEUTRALIZANTE Na₂CO_{3(aq)} (0,01 E 0,05 M COM pH AJUSTADO A 5,7 COM ÁCIDO CÍTRICO_(aq), RESPECTIVAMENTE); 24: PERÍODO DE IMERSÃO (h) DOS FILMES NO AGENTE NEUTRALIZANTE 48
- FIGURA 5.4** – DIAGRAMA EM BLOCOS REFERENTE À PREPARAÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANA EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) OU ÁCIDO CÍTRICO_(aq) COM SOLUÇÃO TAMPÃO COMO AGENTE NEUTRALIZANTE E GLICEROL COMO PLASTIFICANTE: FA₁ E FC₁: FILMES DE QUITOSANA A 1,1% (m/v) PREPARADOS, RESPECTIVAMENTE, EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) E ÁCIDO CÍTRICO_(aq); FA₁P₁ E FC₁P₁: FILMES DE QUITOSANA A 1,1% (m/v) PREPARADOS, RESPECTIVAMENTE, EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) E ÁCIDO CÍTRICO_(aq) CONTENDO GLICEROL COMO PLASTIFICANTE (13% m/m); FA₁P₃ E FC₁P₃: FILMES DE QUITOSANA A 1,1% (m/v) PREPARADOS, RESPECTIVAMENTE, EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) E ÁCIDO CÍTRICO_(aq) CONTENDO GLICEROL COMO PLASTIFICANTE (33% m/m). ESSAS FORMULAÇÕES

CORRESPONDEM AOS FILMES NÃO NEUTRALIZADOS; TA₅₀ E TA₅₇: AGENTE NEUTRALIZANTE SOLUÇÃO TAMPÃO ÁCIDO ACÉTICO/ACETATO DE SÓDIO pH 5,0 E 5,7, RESPECTIVAMENTE; TC₅₀ E TC₅₇: AGENTE NEUTRALIZANTE SOLUÇÃO TAMPÃO ÁCIDO CÍTRICO/CITRATO DE SÓDIO pH 5,0 E 5,7, RESPECTIVAMENTE; 24: PERÍODO DE IMERSÃO (h) DOS FILMES NO AGENTE NEUTRALIZANTE..... 50

FIGURA 6.1 – PERCENTUAL DE POROSIDADE (%P) EM 4 h A T = 25 °C DOS FILMES DE QUITOSANA PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) E NaOH:Na₂CO_{3(aq)} COMO AGENTE NEUTRALIZANTE: FA₁, FA₅ E FA₇: FILMES DE QUITOSANA A 1,1; 1,5 E 1,7% (m/v) PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq); N₁₁ E N₁₅: AGENTE NEUTRALIZANTE NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,01) E (1:0,05) M, RESPECTIVAMENTE; 24 E 48: PERÍODO DE IMERSÃO (h) DOS FILMES NÃO NEUTRALIZADOS NO AGENTE NEUTRALIZANTE 62

FIGURA 6.2 – PERCENTUAL DE POROSIDADE (%P) EM 4 h A T = 25 °C DOS FILMES DE QUITOSANA PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) OU ÁCIDO CÍTRICO_(aq), NaOH:Na₂CO_{3(aq)} COMO AGENTE NEUTRALIZANTE E GLICEROL COMO PLASTIFICANTE: FA₁ E FC₁: FILMES DE QUITOSANA A 1,1% (m/v) PREPARADOS, RESPECTIVAMENTE, EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) E ÁCIDO CÍTRICO_(aq); P₁ E P₃: PLASTIFICANTE GLICEROL (13 E 33% m/m, RESPECTIVAMENTE); N₁₁ E N₁₅: AGENTE NEUTRALIZANTE NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,01) E (1:0,05) M, RESPECTIVAMENTE; 24: PERÍODO DE IMERSÃO (h) DOS FILMES NO AGENTE NEUTRALIZANTE 73

FIGURA 6.3 – GRAU DE INTUMESCIMENTO (G_I) EM 24 h, A T = 25 °C DOS FILMES DE QUITOSANA PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) OU ÁCIDO CÍTRICO_(aq), NaOH:Na₂CO_{3(aq)} COMO AGENTE NEUTRALIZANTE E GLICEROL COMO PLASTIFICANTE: FA₁ E FC₁: FILMES DE QUITOSANA A 1,1% (m/v) PREPARADOS, RESPECTIVAMENTE, EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) E ÁCIDO CÍTRICO_(aq); P₁ E P₃: PLASTIFICANTE GLICEROL (13 E 33% m/m, RESPECTIVAMENTE); N₁₁ E N₁₅: AGENTE NEUTRALIZANTE NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,01) E (1:0,05) M, RESPECTIVAMENTE; 24: PERÍODO DE IMERSÃO (h) DOS FILMES NO AGENTE NEUTRALIZANTE 82

FIGURA 6.4 – PERCENTUAL DE POROSIDADE (%P) EM 4 h A T = 25 °C DOS FILMES DE QUITOSANA PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) OU ÁCIDO CÍTRICO_(aq), Na₂CO_{3(aq)} COMO AGENTE NEUTRALIZANTE E GLICEROL COMO PLASTIFICANTE: FA₁ E FC₁: FILMES DE QUITOSANA A 1,1% (m/v) PREPARADOS, RESPECTIVAMENTE, EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) E ÁCIDO CÍTRICO_(aq); P₁ E P₃: PLASTIFICANTE GLICEROL (13 E 33% m/m, RESPECTIVAMENTE); N₁ E N₅: AGENTE NEUTRALIZANTE Na₂CO_{3(aq)} (0,01 E 0,05 M COM pH AJUSTADO A 5,7 COM ÁCIDO CÍTRICO_(aq), RESPECTIVAMENTE); 24: PERÍODO DE IMERSÃO (h) DOS FILMES NO AGENTE NEUTRALIZANTE..... 92

FIGURA 6.5 – ESPESSURA (mm) DOS FILMES DE QUITOSANA PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) OU ÁCIDO CÍTRICO_(aq), RESPECTIVAMENTE, SOLUÇÃO TAMPÃO ÁCIDO ACÉTICO/ACETATO DE SÓDIO OU ÁCIDO CÍTRICO/CITRATO DE SÓDIO, pH 5,0, COMO AGENTES NEUTRALIZANTES E GLICEROL COMO PLASTIFICANTE: FA₁ E FC₁: FILMES DE QUITOSANA A 1,1% (m/v) PREPARADOS, RESPECTIVAMENTE, EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) E ÁCIDO CÍTRICO_(aq); P₃: PLASTIFICANTE GLICEROL (33% m/m); TA₅₀ E TC₅₀: AGENTE NEUTRALIZANTE SOLUÇÃO TAMPÃO ÁCIDO ACÉTICO/ACETATO DE SÓDIO E ÁCIDO CÍTRICO/CITRATO DE SÓDIO pH 5,0, RESPECTIVAMENTE; 24: PERÍODO DE IMERSÃO (h) DOS FILMES NO AGENTE NEUTRALIZANTE..... 120

FIGURA 6.6 – CONTEÚDO DE UMIDADE (%U) DOS FILMES DE QUITOSANA PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) OU ÁCIDO CÍTRICO_(aq), RESPECTIVAMENTE, SOLUÇÃO TAMPÃO ÁCIDO ACÉTICO/ACETATO DE SÓDIO OU ÁCIDO CÍTRICO/CITRATO DE SÓDIO, pH 5,0, COMO AGENTES NEUTRALIZANTES E GLICEROL COMO PLASTIFICANTE: FA₁ E FC₁: FILMES DE QUITOSANA A 1,1% (m/v) PREPARADOS, RESPECTIVAMENTE, EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) E ÁCIDO CÍTRICO_(aq); P₃:

PLASTIFICANTE GLICEROL (33% m/m); TA₅₀ E TC₅₀: AGENTE NEUTRALIZANTE SOLUÇÃO TAMPÃO ÁCIDO ACÉTICO/ACETATO DE SÓDIO E ÁCIDO CÍTRICO/CITRATO DE SÓDIO pH 5,0, RESPECTIVAMENTE; 24: PERÍODO DE IMERSÃO (h) DOS FILMES NO AGENTE NEUTRALIZANTE.... 124

FIGURA 6.7 – CURVAS DE TGA DOS FILMES DE QUITOSANA PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) OU ÁCIDO CÍTRICO_(aq), RESPECTIVAMENTE, SOLUÇÃO TAMPÃO ÁCIDO ACÉTICO/ACETATO DE SÓDIO OU ÁCIDO CÍTRICO/CITRATO DE SÓDIO, pH 5,0, COMO AGENTES NEUTRALIZANTES E GLICEROL COMO PLASTIFICANTE: FA₁ E FC₁: FILMES DE QUITOSANA A 1,1% (m/v) PREPARADOS, RESPECTIVAMENTE, EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) E ÁCIDO CÍTRICO_(aq); P₃: PLASTIFICANTE GLICEROL (33% m/m); TA₅₀ E TC₅₀: AGENTE NEUTRALIZANTE SOLUÇÃO TAMPÃO ÁCIDO ACÉTICO/ACETATO DE SÓDIO E ÁCIDO CÍTRICO/CITRATO DE SÓDIO pH 5,0, RESPECTIVAMENTE; 24: PERÍODO DE IMERSÃO (h) DOS FILMES NO AGENTE NEUTRALIZANTE..... 128

FIGURA 6.8 – CURVAS DE D_rTGA DOS FILMES DE QUITOSANA PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) OU ÁCIDO CÍTRICO_(aq), RESPECTIVAMENTE, SOLUÇÃO TAMPÃO ÁCIDO ACÉTICO/ACETATO DE SÓDIO OU ÁCIDO CÍTRICO/CITRATO DE SÓDIO, pH 5,0, COMO AGENTES NEUTRALIZANTES E GLICEROL COMO PLASTIFICANTE: FA₁ E FC₁: FILMES DE QUITOSANA A 1,1% (m/v) PREPARADOS, RESPECTIVAMENTE, EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) E ÁCIDO CÍTRICO_(aq); P₃: PLASTIFICANTE GLICEROL (33% m/m); TA₅₀ E TC₅₀: AGENTE NEUTRALIZANTE SOLUÇÃO TAMPÃO ÁCIDO ACÉTICO/ACETATO DE SÓDIO E ÁCIDO CÍTRICO/CITRATO DE SÓDIO pH 5,0, RESPECTIVAMENTE; 24: PERÍODO DE IMERSÃO (h) DOS FILMES NO AGENTE NEUTRALIZANTE..... 130

FIGURA 6.9 – CURVAS DE DTA DOS FILMES DE QUITOSANA PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) OU ÁCIDO CÍTRICO_(aq), RESPECTIVAMENTE, SOLUÇÃO TAMPÃO ÁCIDO ACÉTICO/ACETATO DE SÓDIO OU ÁCIDO CÍTRICO/CITRATO DE SÓDIO, pH 5,0, COMO AGENTES NEUTRALIZANTES E GLICEROL COMO PLASTIFICANTE: FA₁ E FC₁: FILMES DE QUITOSANA A 1,1% (m/v) PREPARADOS, RESPECTIVAMENTE, EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) E ÁCIDO CÍTRICO_(aq); P₃: PLASTIFICANTE GLICEROL (33% m/m); TA₅₀ E TC₅₀: AGENTE NEUTRALIZANTE SOLUÇÃO TAMPÃO ÁCIDO ACÉTICO/ACETATO DE SÓDIO E ÁCIDO CÍTRICO/CITRATO DE SÓDIO pH 5,0, RESPECTIVAMENTE; 24: PERÍODO DE IMERSÃO (h) DOS FILMES NO AGENTE NEUTRALIZANTE..... 131

FIGURA 6.10 – CURVAS DE DSC DOS FILMES DE QUITOSANA PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) OU ÁCIDO CÍTRICO_(aq), RESPECTIVAMENTE, SOLUÇÃO TAMPÃO ÁCIDO ACÉTICO/ACETATO DE SÓDIO OU ÁCIDO CÍTRICO/CITRATO DE SÓDIO, pH 5,0, COMO AGENTES NEUTRALIZANTES E GLICEROL COMO PLASTIFICANTE. EM PRETO: PRIMEIRA CURVA DE AQUECIMENTO (DSC CONVENCIONAL). EM AZUL: SEGUNDA CURVA DE AQUECIMENTO (DSC MODULADO): FA₁ E FC₁: FILMES DE QUITOSANA A 1,1% (m/v) PREPARADOS, RESPECTIVAMENTE, EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) E ÁCIDO CÍTRICO_(aq); P₃: PLASTIFICANTE GLICEROL (33% m/m); TA₅₀ E TC₅₀: AGENTE NEUTRALIZANTE SOLUÇÃO TAMPÃO ÁCIDO ACÉTICO/ACETATO DE SÓDIO E ÁCIDO CÍTRICO/CITRATO DE SÓDIO pH 5,0, RESPECTIVAMENTE; 24: PERÍODO DE IMERSÃO (h) DOS FILMES NO AGENTE NEUTRALIZANTE 132

FIGURA 6.11 – FOTOGRAFIAS DOS FILMES FC₁TC₅₀24 ANTES DOS ENSAIOS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*. À ESQUERDA: FILMES TESTADOS APÓS 1 SEMANA DE PREPARAÇÃO. À DIREITA: FILMES TESTADOS APÓS 32 SEMANAS DE PREPARAÇÃO 134

FIGURA 6.12 – ESPECTROS DE FTIR-ATR DOS SEGMENTOS DE PELE DE ORELHA DE PORCO PARA OS FILMES TESTADOS APÓS 1 SEMANA DE PREPARAÇÃO 136

- FIGURA 6.13** – MICROGRAFIAS DE MEV DAS SUPERFÍCIES DE PELE DE PORCO PÓS-ENSAIOS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*: (A) E (A') PELE SEM TRATAMENTO; (B) E (B') PELE COM TRATAMENTO POR FILMES FC₁TC₅₀24 SEM AH_(aq); (C) E (C') PELE COM TRATAMENTO POR FILMES FC₁TC₅₀24 COM AH_(aq). TODOS OS FILMES FORAM TESTADOS APÓS 1 SEMANA DE PREPARAÇÃO..... 139
- FIGURA 6.14** – MICROGRAFIAS DE MEV DAS SUPERFÍCIES DE PELE DE PORCO PÓS-ENSAIOS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*: (A) E (A') PELE COM TRATAMENTO POR FILMES FC₁TC₅₀24 SEM AH_(aq); (B) E (B') PELE COM TRATAMENTO POR FILMES FC₁TC₅₀24 COM AH_(aq); (C) E (C') PELE COM TRATAMENTO POR GEL DE CARBOPOL® CONTENDO AH. TODOS OS FILMES FORAM TESTADOS APÓS 32 SEMANAS DE PREPARAÇÃO..... 140
- FIGURA 6.15** – MICROGRAFIAS DE MEV DAS SUPERFÍCIES DOS FILMES DE QUITOSANA: (A) FILMES FC₁TC₅₀24 ANTES DOS ENSAIOS DE LIBERAÇÃO; (B) FILMES FC₁TC₅₀24 APÓS OS ENSAIOS DE LIBERAÇÃO SEM AH_(aq) E (C) FILMES FC₁TC₅₀24 APÓS OS ENSAIOS DE LIBERAÇÃO COM O AH_(aq). TODOS OS FILMES FORAM TESTADOS APÓS 1 SEMANA DE PREPARAÇÃO..... 141
- FIGURA 6.16** – MICROGRAFIAS DE MEV DAS SUPERFÍCIES DOS FILMES DE QUITOSANA: (A) FILMES FC₁TC₅₀24 ANTES DOS ENSAIOS DE LIBERAÇÃO; (B) FILMES FC₁TC₅₀24 APÓS OS ENSAIOS DE LIBERAÇÃO SEM AH_(aq) E (C) FILMES FC₁TC₅₀24 APÓS OS ENSAIOS DE LIBERAÇÃO COM O AH_(aq). TODOS OS FILMES FORAM TESTADOS APÓS 32 SEMANAS DE PREPARAÇÃO..... 142

LISTA DE TABELAS

- TABELA 6.1** – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE FATOR ÚNICO [CONCENTRAÇÃO DE QUITOSANA, % (m/v)] PARA COMPARAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS [PERCENTUAIS DE POROSIDADE (%P) DOS FILMES DE QUITOSANA PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE QUITOSANA, 1,1; 1,5 E 1,7% (m/v) E NEUTRALIZADOS EM NaOH:Na₂CO_{3(aq)} EM DIFERENTES PERÍODOS DE NEUTRALIZAÇÃO] E DAS VARIAÇÕES INTERNAS AOS GRUPOS. NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA: $P < 0,05$ 63
- TABELA 6.2** – TESTE DE TUKEY PARA O MÓDULO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS [PERCENTUAIS DE POROSIDADE (%P) DOS FILMES DE QUITOSANA PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE QUITOSANA, 1,1; 1,5 E 1,7% (m/v) E NEUTRALIZADOS EM NaOH:Na₂CO_{3(aq)} EM DIFERENTES PERÍODOS DE NEUTRALIZAÇÃO] 66
- TABELA 6.3** – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE FATOR ÚNICO [AGENTE NEUTRALIZANTE, NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (M:M)] PARA COMPARAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS [PERCENTUAIS DE POROSIDADE (%P) DOS FILMES DE QUITOSANA PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq), EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE QUITOSANA, E NEUTRALIZADOS EM NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,01) E (1:0,05) M, RESPECTIVAMENTE, DURANTE 24 h] E DAS VARIAÇÕES INTERNAS AOS GRUPOS. NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA: $P < 0,05$ 67
- TABELA 6.4** – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE FATOR ÚNICO [AGENTE NEUTRALIZANTE, NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (M:M)] PARA COMPARAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS [PERCENTUAIS DE POROSIDADE (%P) DOS FILMES DE QUITOSANA PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq), EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE QUITOSANA, E NEUTRALIZADOS EM NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,01) E (1:0,05) M, RESPECTIVAMENTE, DURANTE 48 h] E DAS VARIAÇÕES INTERNAS AOS GRUPOS. NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA: $P < 0,05$ 68
- TABELA 6.5** – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE FATOR ÚNICO [PERÍODO DE NEUTRALIZAÇÃO, (h)] PARA COMPARAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS [PERCENTUAIS DE POROSIDADE (%P) DOS FILMES DE QUITOSANA PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq), EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE QUITOSANA, E NEUTRALIZADOS EM NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,01) M DURANTE 24 E 48 h] E DAS VARIAÇÕES INTERNAS AOS GRUPOS. NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA: $P < 0,05$ 70
- TABELA 6.6** – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE FATOR ÚNICO [PERÍODO DE NEUTRALIZAÇÃO, (h)] PARA COMPARAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS [PERCENTUAIS DE POROSIDADE (%P) DOS FILMES DE QUITOSANA PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq), EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE QUITOSANA, E NEUTRALIZADOS EM NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,05) M DURANTE 24 E 48 h] E DAS VARIAÇÕES INTERNAS AOS GRUPOS. NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA: $P < 0,05$ 72
- TABELA 6.7** – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE FATOR ÚNICO [PERCENTUAL DE PLASTIFICANTE, % (m/m)] PARA COMPARAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS [PERCENTUAIS DE POROSIDADE (%P) DOS FILMES DE QUITOSANA, CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) COM PLASTIFICANTE NOS PERCENTUAIS DE 0, 13 E 33% (m/m) E NEUTRALIZADOS EM NaOH:Na₂CO_{3(aq)} DURANTE 24 h] E DAS VARIAÇÕES INTERNAS AOS GRUPOS. NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA: $P < 0,05$ 74

- TABELA 6.8** – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE FATOR ÚNICO [PERCENTUAL DE PLASTIFICANTE, % (m/m)] PARA COMPARAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS [PERCENTUAIS DE POROSIDADE (%P) DOS FILMES DE QUITOSANA, CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO CÍTRICO_(aq) COM PLASTIFICANTE NOS PERCENTUAIS DE 0, 13 E 33% (m/m) E NEUTRALIZADOS EM NaOH:Na₂CO_{3(aq)} DURANTE 24 h] E DAS VARIAÇÕES INTERNAS AOS GRUPOS. NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA: $P < 0,05$ 75
- TABELA 6.9** – TESTE DE TUKEY PARA O MÓDULO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS [PERCENTUAIS DE POROSIDADE (%P) DOS FILMES DE QUITOSANA, CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) OU ÁCIDO CÍTRICO_(aq) COM PLASTIFICANTE NOS PERCENTUAIS DE 0, 13 E 33% (m/m) E NEUTRALIZADOS EM NaOH:Na₂CO_{3(aq)} DURANTE 24 h]..... 77
- TABELA 6.10** – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE FATOR ÚNICO [AGENTE NEUTRALIZANTE, NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (M:M)] PARA COMPARAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS [PERCENTUAIS DE POROSIDADE (%P) DOS FILMES DE QUITOSANA, CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq), COM E SEM PLASTIFICANTE, E NEUTRALIZADOS EM NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,01) E (1:0,05) M, RESPECTIVAMENTE, DURANTE 24 h] E DAS VARIAÇÕES INTERNAS AOS GRUPOS. NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA: $P < 0,05$ 78
- TABELA 6.11** – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE FATOR ÚNICO [AGENTE NEUTRALIZANTE, NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (M:M)] PARA COMPARAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS [PERCENTUAIS DE POROSIDADE (%P) DOS FILMES DE QUITOSANA, CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO CÍTRICO_(aq), COM E SEM PLASTIFICANTE, E NEUTRALIZADOS EM NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,01) E (1:0,05) M, RESPECTIVAMENTE, DURANTE 24 h] E DAS VARIAÇÕES INTERNAS AOS GRUPOS. NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA: $P < 0,05$ 79
- TABELA 6.12** – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE FATOR ÚNICO (MEIO DISPERSANTE) PARA COMPARAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS [PERCENTUAIS DE POROSIDADE (%P) DOS FILMES DE QUITOSANA, CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) E ÁCIDO CÍTRICO_(aq), COM E SEM PLASTIFICANTE, E NEUTRALIZADOS EM NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,01) M DURANTE 24 h] E DAS VARIAÇÕES INTERNAS AOS GRUPOS. NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA: $P < 0,05$ 80
- TABELA 6.13** – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE FATOR ÚNICO (MEIO DISPERSANTE) PARA COMPARAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS [PERCENTUAIS DE POROSIDADE (%P) DOS FILMES DE QUITOSANA, CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) E ÁCIDO CÍTRICO_(aq), COM E SEM PLASTIFICANTE, E NEUTRALIZADOS EM NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,05) M DURANTE 24 h] E DAS VARIAÇÕES INTERNAS AOS GRUPOS. NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA: $P < 0,05$ 81
- TABELA 6.14** – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE FATOR ÚNICO [PERCENTUAL DE PLASTIFICANTE, % (m/m)] PARA COMPARAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS [GRAU DE INTUMESCIMENTO (G) DOS FILMES DE QUITOSANA, CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) COM PLASTIFICANTE NOS PERCENTUAIS DE 0, 13 E 33% (m/m) E NEUTRALIZADOS EM NaOH:Na₂CO_{3(aq)} DURANTE 24 h] E DAS VARIAÇÕES INTERNAS AOS GRUPOS. NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA: $P < 0,05$ 83
- TABELA 6.15** – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE FATOR ÚNICO [PERCENTUAL DE PLASTIFICANTE, % (m/m)] PARA COMPARAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS [GRAU DE INTUMESCIMENTO (G) DOS FILMES DE QUITOSANA, CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO CÍTRICO_(aq) COM PLASTIFICANTE NOS PERCENTUAIS DE 0, 13 E 33% (m/m) E

NEUTRALIZADOS EM NaOH:Na ₂ CO _{3(aq)} DURANTE 24 h] E DAS VARIAÇÕES INTERNAS AOS GRUPOS. NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA: $P < 0,05$	84
TABELA 6.16 – TESTE DE TUKEY PARA O MÓDULO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS [GRAU DE INTUMESCIMENTO (<i>G</i>) DOS FILMES DE QUITOSANA, CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO _(aq) OU ÁCIDO CÍTRICO _(aq) COM PLASTIFICANTE NOS PERCENTUAIS DE 0, 13 E 33% (m/m) E NEUTRALIZADOS EM NaOH:Na ₂ CO _{3(aq)} DURANTE 24 h].	85
TABELA 6.17 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE FATOR ÚNICO [AGENTE NEUTRALIZANTE, NaOH:Na ₂ CO _{3(aq)} (M:M)] PARA COMPARAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS [GRAU DE INTUMESCIMENTO (<i>G</i>) DOS FILMES DE QUITOSANA, CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO _(aq) , COM E SEM PLASTIFICANTE, E NEUTRALIZADOS EM NaOH:Na ₂ CO _{3(aq)} (1:0,01) E (1:0,05) M, RESPECTIVAMENTE, DURANTE 24 h] E DAS VARIAÇÕES INTERNAS AOS GRUPOS. NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA: $P < 0,05$	86
TABELA 6.18 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE FATOR ÚNICO [AGENTE NEUTRALIZANTE, NaOH:Na ₂ CO _{3(aq)} (M:M)] PARA COMPARAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS [GRAU DE INTUMESCIMENTO (<i>G</i>) DOS FILMES DE QUITOSANA, CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO CÍTRICO _(aq) , COM E SEM PLASTIFICANTE, E NEUTRALIZADOS EM NaOH:Na ₂ CO _{3(aq)} (1:0,01) E (1:0,05) M, RESPECTIVAMENTE, DURANTE 24 h] E DAS VARIAÇÕES INTERNAS AOS GRUPOS. NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA: $P < 0,05$	87
TABELA 6.19 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE FATOR ÚNICO (MEIO DISPERSANTE) PARA COMPARAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS [GRAU DE INTUMESCIMENTO (<i>G</i>) DOS FILMES DE QUITOSANA, CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO _(aq) E ÁCIDO CÍTRICO _(aq) , COM E SEM PLASTIFICANTE, E NEUTRALIZADOS EM NaOH:Na ₂ CO _{3(aq)} (1:0,01) M DURANTE 24 h] E DAS VARIAÇÕES INTERNAS AOS GRUPOS. NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA: $P < 0,05$	88
TABELA 6.20 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE FATOR ÚNICO (MEIO DISPERSANTE) PARA COMPARAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS [GRAU DE INTUMESCIMENTO (<i>G</i>) DOS FILMES DE QUITOSANA, CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO _(aq) E ÁCIDO CÍTRICO _(aq) , COM E SEM PLASTIFICANTE, E NEUTRALIZADOS EM NaOH:Na ₂ CO _{3(aq)} (1:0,05) M DURANTE 24 h] E DAS VARIAÇÕES INTERNAS AOS GRUPOS. NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA: $P < 0,05$	90
TABELA 6.21 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE FATOR ÚNICO [PERCENTUAL DE PLASTIFICANTE, % (m/m)] PARA COMPARAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS [PERCENTUAIS DE POROSIDADE (% <i>P</i>) DOS FILMES DE QUITOSANA, CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO _(aq) COM PLASTIFICANTE NOS PERCENTUAIS DE 0, 13 E 33% (m/m) E NEUTRALIZADOS EM Na ₂ CO _{3(aq)} COM pH AJUSTADO A 5,7 COM ÁCIDO CÍTRICO _(aq) , DURANTE 24 h] E DAS VARIAÇÕES INTERNAS AOS GRUPOS. NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA: $P < 0,05$	93
TABELA 6.22 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE FATOR ÚNICO [PERCENTUAL DE PLASTIFICANTE, % (m/m)] PARA COMPARAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS [PERCENTUAIS DE POROSIDADE (% <i>P</i>) DOS FILMES DE QUITOSANA, CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO CÍTRICO _(aq) COM PLASTIFICANTE NOS PERCENTUAIS DE 0, 13 E 33% (m/m) E NEUTRALIZADOS EM Na ₂ CO _{3(aq)} COM pH AJUSTADO A 5,7 COM ÁCIDO CÍTRICO _(aq) , DURANTE 24 h] E DAS VARIAÇÕES INTERNAS AOS GRUPOS. NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA: $P < 0,05$	94
TABELA 6.23 – TESTE DE TUKEY PARA O MÓDULO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS [PERCENTUAIS DE POROSIDADE (% <i>P</i>) DOS FILMES DE QUITOSANA, CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO _(aq) OU ÁCIDO CÍTRICO _(aq) COM PLASTIFICANTE NOS PERCENTUAIS DE 0, 13 E 33%	

(m/m) E NEUTRALIZADOS EM $\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{aq})$ COM pH AJUSTADO A 5,7 COM ÁCIDO CÍTRICO $_{(\text{aq})}$, DURANTE 24 h].....	96
TABELA 6.24 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE FATOR ÚNICO [AGENTE NEUTRALIZANTE, $\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{aq})$ (M)] PARA COMPARAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS [PERCENTUAIS DE POROSIDADE (%P) DOS FILMES DE QUITOSANA, CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO $_{(\text{aq})}$, COM E SEM PLASTIFICANTE, E NEUTRALIZADOS EM $\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{aq})$ (0,01 E 0,05 M) COM pH AJUSTADO A 5,7 COM ÁCIDO CÍTRICO $_{(\text{aq})}$, DURANTE 24 h] E DAS VARIAÇÕES INTERNAS AOS GRUPOS. NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA: $P < 0,05$	97
TABELA 6.25 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE FATOR ÚNICO [AGENTE NEUTRALIZANTE, $\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{aq})$ (M)] PARA COMPARAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS [PERCENTUAIS DE POROSIDADE (%P) DOS FILMES DE QUITOSANA, CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO CÍTRICO $_{(\text{aq})}$, COM E SEM PLASTIFICANTE, E NEUTRALIZADOS EM $\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{aq})$ (0,01 E 0,05 M) COM pH AJUSTADO A 5,7 COM ÁCIDO CÍTRICO $_{(\text{aq})}$, DURANTE 24 h] E DAS VARIAÇÕES INTERNAS AOS GRUPOS. NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA: $P < 0,05$	99
TABELA 6.26 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE FATOR ÚNICO (MEIO DISPERSANTE) PARA COMPARAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS [PERCENTUAIS DE POROSIDADE (%P) DOS FILMES DE QUITOSANA, CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO $_{(\text{aq})}$ E ÁCIDO CÍTRICO $_{(\text{aq})}$, COM E SEM PLASTIFICANTE, E NEUTRALIZADOS EM $\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{aq})$ (0,01 M) COM pH AJUSTADO A 5,7 COM ÁCIDO CÍTRICO $_{(\text{aq})}$, DURANTE 24 h] E DAS VARIAÇÕES INTERNAS AOS GRUPOS. NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA: $P < 0,05$	100
TABELA 6.27 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE FATOR ÚNICO (MEIO DISPERSANTE) PARA COMPARAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS [PERCENTUAIS DE POROSIDADE (%P) DOS FILMES DE QUITOSANA, CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO $_{(\text{aq})}$ E ÁCIDO CÍTRICO $_{(\text{aq})}$, COM E SEM PLASTIFICANTE, E NEUTRALIZADOS EM $\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{aq})$ (0,05 M) COM pH AJUSTADO A 5,7 COM ÁCIDO CÍTRICO $_{(\text{aq})}$, DURANTE 24 h] E DAS VARIAÇÕES INTERNAS AOS GRUPOS. NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA: $P < 0,05$	101
TABELA 6.28 – GRAU DE INTUMESCIMENTO (G) EM 24 h, A $T = 25$ °C DOS FILMES DE QUITOSANA OBTIDOS EM ÁCIDO ACÉTICO $_{(\text{aq})}$ OU ÁCIDO CÍTRICO $_{(\text{aq})}$, $\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{aq})$ COMO AGENTE NEUTRALIZANTE E GLICEROL COMO PLASTIFICANTE.	103
TABELA 6.29 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE FATOR ÚNICO [PERCENTUAL DE PLASTIFICANTE, % (m/m)] PARA COMPARAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS [GRAU DE INTUMESCIMENTO (G) DOS FILMES DE QUITOSANA, CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO $_{(\text{aq})}$ COM PLASTIFICANTE NOS PERCENTUAIS DE 0, 13 E 33% (m/m) E NEUTRALIZADOS EM $\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{aq})$ COM pH AJUSTADO A 5,7 COM ÁCIDO CÍTRICO $_{(\text{aq})}$, DURANTE 24 h] E DAS VARIAÇÕES INTERNAS AOS GRUPOS. NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA: $P < 0,05$	104
TABELA 6.30 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE FATOR ÚNICO [PERCENTUAL DE PLASTIFICANTE, % (m/m)] PARA COMPARAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS [GRAU DE INTUMESCIMENTO (G) DOS FILMES DE QUITOSANA, CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO CÍTRICO $_{(\text{aq})}$ COM PLASTIFICANTE NOS PERCENTUAIS DE 13 E 33% (m/m) E NEUTRALIZADOS EM $\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{aq})$ COM pH AJUSTADO A 5,7 COM ÁCIDO CÍTRICO $_{(\text{aq})}$, DURANTE 24 h] E DAS VARIAÇÕES INTERNAS AOS GRUPOS. NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA: $P < 0,05$	105
TABELA 6.31 – TESTE DE TUKEY PARA O MÓDULO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS [GRAU DE INTUMESCIMENTO (G) DOS FILMES DE QUITOSANA, CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO $_{(\text{aq})}$ COM PLASTIFICANTE NOS PERCENTUAIS DE 0, 13 E 33% (m/m) E	

NEUTRALIZADOS EM $\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{aq})$ COM pH AJUSTADO A 5,7 COM ÁCIDO CÍTRICO $_{(\text{aq})}$, DURANTE 24 h].	106
TABELA 6.32 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE FATOR ÚNICO [AGENTE NEUTRALIZANTE, $\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{aq})$ (M)] PARA COMPARAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS [GRAU DE INTUMESCIMENTO (G)] DOS FILMES DE QUITOSANA, CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO $_{(\text{aq})}$, COM E SEM PLASTIFICANTE, E NEUTRALIZADOS EM $\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{aq})$ (0,01 E 0,05 M) COM pH AJUSTADO A 5,7 COM ÁCIDO CÍTRICO $_{(\text{aq})}$, DURANTE 24 h] E DAS VARIAÇÕES INTERNAS AOS GRUPOS. NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA: $P < 0,05$	107
TABELA 6.33 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE FATOR ÚNICO (MEIO DISPERSANTE) PARA COMPARAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS [GRAU DE INTUMESCIMENTO (G)] DOS FILMES DE QUITOSANA, CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO $_{(\text{aq})}$ E ÁCIDO CÍTRICO $_{(\text{aq})}$, COM PLASTIFICANTE EM DIFERENTES PERCENTUAIS, E NEUTRALIZADOS EM $\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{aq})$ (0,05 M) COM pH AJUSTADO A 5,7 COM ÁCIDO CÍTRICO $_{(\text{aq})}$, DURANTE 24 h] E DAS VARIAÇÕES INTERNAS AOS GRUPOS. NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA: $P < 0,05$	109
TABELA 6.34 – GRAU DE INTUMESCIMENTO (G) EM 24 h, A $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$ DOS FILMES DE QUITOSANA OBTIDOS EM SOLUÇÃO TAMPÃO COMO AGENTE NEUTRALIZANTE E GLICEROL COMO PLASTIFICANTE. ..	112
TABELA 6.35 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE FATOR ÚNICO [PERCENTUAL DE PLASTIFICANTE, % (m/m)] PARA COMPARAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS [GRAU DE INTUMESCIMENTO (G)] DOS FILMES DE QUITOSANA, CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO CÍTRICO $_{(\text{aq})}$, COM PLASTIFICANTE NOS PERCENTUAIS DE 0, 13 E 33% (m/m) E NEUTRALIZADOS EM SOLUÇÃO TAMPÃO TAMPÃO ÁCIDO CÍTRICO/CITRATO DE SÓDIO EM pH DISTINTOS, DURANTE 24 h] E DAS VARIAÇÕES INTERNAS AOS GRUPOS. NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA: $P < 0,05$	114
TABELA 6.36 – TESTE DE TUKEY PARA O MÓDULO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS [GRAU DE INTUMESCIMENTO (G)] DOS FILMES DE QUITOSANA, CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO CÍTRICO $_{(\text{aq})}$ COM PLASTIFICANTE NOS PERCENTUAIS DE 0, 13 E 33% (m/m) E NEUTRALIZADOS EM SOLUÇÃO TAMPÃO ÁCIDO CÍTRICO/CITRATO DE SÓDIO, EM pH DISTINTOS, DURANTE 24 H].....	115
TABELA 6.37 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE FATOR ÚNICO (AGENTE NEUTRALIZANTE, SOLUÇÃO TAMPÃO ÁCIDO CÍTRICO/CITRATO DE SÓDIO) PARA COMPARAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS [GRAU DE INTUMESCIMENTO (G)] DOS FILMES DE QUITOSANA, CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO CÍTRICO $_{(\text{aq})}$, COM E SEM PLASTIFICANTE, E NEUTRALIZADOS EM SOLUÇÃO TAMPÃO ÁCIDO CÍTRICO/CITRATO DE SÓDIO, pH 5,0 E 5,7, DURANTE 24 h] E DAS VARIAÇÕES INTERNAS AOS GRUPOS. NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA: $P < 0,05$. ..	116
TABELA 6.38 – PERCENTUAL DE SOLUBILIZAÇÃO EM MEIO ÁCIDO (% S_{AC}) E EM MEIO ALCALINO (% S_{AL}) EM 7 DIAS, A $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$ DOS FILMES DE QUITOSANA OBTIDOS EM ÁCIDO CÍTRICO $_{(\text{aq})}$ E SOLUÇÃO TAMPÃO ÁCIDO CÍTRICO/CITRATO DE SÓDIO, pH 5,0 E pH 5,7 COMO AGENTE NEUTRALIZANTE E GLICEROL COMO PLASTIFICANTE.	117
TABELA 6.39 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE FATOR ÚNICO [PERCENTUAL DE PLASTIFICANTE, % (m/m)] PARA COMPARAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS [PERCENTUAL DE SOLUBILIZAÇÃO EM MEIO ÁCIDO (% S_{AC}) E EM MEIO ALCALINO(% S_{AL}) DOS FILMES DE QUITOSANA, CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO CÍTRICO $_{(\text{aq})}$, COM PLASTIFICANTE NOS PERCENTUAIS DE 0, 13 E 33% (m/m) E NEUTRALIZADOS EM SOLUÇÃO TAMPÃO TAMPÃO ÁCIDO	

- CÍTRICO/CITRATO DE SÓDIO EM pH 5,0, DURANTE 24 h] E DAS VARIAÇÕES INTERNAS AOS GRUPOS. NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA: $P < 0,05$ 118
- TABELA 6.40** – TESTE DE TUKEY PARA O MÓDULO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS [PERCENTUAL DE SOLUBILIZAÇÃO EM MEIO ÁCIDO (% S_{Ac}) E EM MEIO ALCALINO (% S_{Al}) DOS FILMES DE QUITOSANA, CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO CÍTRICO_(aq) COM PLASTIFICANTE NOS PERCENTUAIS DE 0, 13 E 33% (m/m) E NEUTRALIZADOS EM SOLUÇÃO TAMPÃO ÁCIDO CÍTRICO/CITRATO DE SÓDIO, EM pH 5,0, DURANTE 24 h]. 119
- TABELA 6.41** – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE FATOR ÚNICO [PERCENTUAL DE PLASTIFICANTE, % (m/m)] PARA COMPARAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS [ESPESSURA (mm) DOS FILMES DE QUITOSANA, CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) OU ÁCIDO CÍTRICO_(aq), COM PLASTIFICANTE NOS PERCENTUAIS DE 0 E 33% (m/m) E NEUTRALIZADOS EM SOLUÇÃO TAMPÃO ÁCIDO ACÉTICO/ACETATO DE SÓDIO OU TAMPÃO ÁCIDO CÍTRICO/CITRATO DE SÓDIO, pH 5,0, DURANTE 24 h] E DAS VARIAÇÕES INTERNAS AOS GRUPOS. NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA: $P < 0,05$ 121
- TABELA 6.42** – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE FATOR ÚNICO (MEIO DISPERSANTE) PARA COMPARAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS [ESPESSURA (mm) DOS FILMES DE QUITOSANA, CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) E ÁCIDO CÍTRICO_(aq), COM E SEM PLASTIFICANTE, E NEUTRALIZADOS EM SOLUÇÃO TAMPÃO ÁCIDO ACÉTICO/ACETATO DE SÓDIO E TAMPÃO ÁCIDO CÍTRICO/CITRATO DE SÓDIO, pH 5,0, DURANTE 24 h] E DAS VARIAÇÕES INTERNAS AOS GRUPOS. NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA: $P < 0,05$ 123
- TABELA 6.43** – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE FATOR ÚNICO [PERCENTUAL DE PLASTIFICANTE, % (m/m)] PARA COMPARAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS [CONTEÚDO DE UMIDADE (% U) DOS FILMES DE QUITOSANA, CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) OU ÁCIDO CÍTRICO_(aq), COM PLASTIFICANTE NOS PERCENTUAIS DE 0 E 33% (m/m) E NEUTRALIZADOS EM SOLUÇÃO TAMPÃO ÁCIDO ACÉTICO/ACETATO DE SÓDIO OU TAMPÃO ÁCIDO CÍTRICO/CITRATO DE SÓDIO, pH 5,0, DURANTE 24 h] E DAS VARIAÇÕES INTERNAS AOS GRUPOS. NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA: $P < 0,05$ 125
- TABELA 6.44** – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE FATOR ÚNICO (MEIO DISPERSANTE) PARA COMPARAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS [CONTEÚDO DE UMIDADE (% U) DOS FILMES DE QUITOSANA, CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) E ÁCIDO CÍTRICO_(aq), COM E SEM PLASTIFICANTE, E NEUTRALIZADOS EM SOLUÇÃO TAMPÃO ÁCIDO ACÉTICO/ACETATO DE SÓDIO E TAMPÃO ÁCIDO CÍTRICO/CITRATO DE SÓDIO, pH 5,0, DURANTE 24 h] E DAS VARIAÇÕES INTERNAS AOS GRUPOS. NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA: $P < 0,05$. . 127
- TABELA 6.45** – PARÂMETROS TERMOGRAVIMÉTRICOS OBTIDOS PARA OS FILMES DE QUITOSANA, A CONCENTRAÇÃO DE 1,1% (m/v), PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) OU ÁCIDO CÍTRICO_(aq), COM PLASTIFICANTE NOS PERCENTUAIS DE 0 E 33% (m/m) E NEUTRALIZADOS EM SOLUÇÃO TAMPÃO ÁCIDO ACÉTICO/ACETATO DE SÓDIO OU TAMPÃO ÁCIDO CÍTRICO/CITRATO DE SÓDIO, pH 5,0, DURANTE 24 h. 128
- TABELA 6.46** – GRAU DE HIDRATAÇÃO (GH) DA PELE DE ORELHA DE PORCO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE PREPARAÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANA. 135

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 4.1: 2ª Lei de Fick para difusão em sistemas matriciais.....	39
Equação 4.2: Relação entre o coeficiente de difusão do soluto no filme e no solvente puro para matrizes de hidrogel não porosas	40
Equação 4.3: Relação entre o coeficiente de difusão do soluto no filme e no solvente puro para matrizes de hidrogel microporosas.....	40
Equação 4.4: Coeficiente de difusão efetiva do soluto em matrizes de hidrogel macroporosas	40
Equação 5.1: Percentual de volume de poros ou percentual de porosidade dos filmes de quitosana neutralizados.....	53
Equação 5.2: Grau de intumescimento dos filmes de quitosana neutralizados.....	54
Equação 5.3: Percentual de degradação em meio ácido e em meio alcalino dos filmes de quitosana neutralizados.....	54
Equação 5.4: Conteúdo de umidade dos filmes de quitosana neutralizados.....	55
Equação 5.5: Grau de hidratação dos segmentos de pele de orelha de porco.....	56
Equação 6.1: Reação de hidrólise total do íon carbonato.....	59

RESUMO

Neste trabalho foram preparados filmes de quitosana para uso como matrizes na liberação tópica de ácido hialurônico tendo em vista ação cosmética através da hidratação da pele. Neste caso, a integridade física dos filmes e biocompatibilidade com a pele foram requisitos fundamentais para aplicação cosmética. Uma vez que a quitosana requer um meio ácido para ser processada, a seleção do tipo de ácido e agente neutralizante é necessária para preparação de filmes com tais características. Soluções aquosas de ácido acético e ácido cítrico foram sugeridas como meio dispersante aos filmes; concomitantemente, soluções aquosas de hidróxido de sódio:carbonato de sódio pH 9,0, carbonato de sódio pH 5,7 e tampões acetato ou citrato pH 5,0 e 5,7 foram propostas como neutralizantes. Para seleção da composição filmogênica apropriada a este estudo, foram efetuadas avaliações estatísticas dos efeitos dos fatores de preparação do filme nas propriedades físico-químicas do filme. Adicionalmente, análise térmica simultânea e calorimetria exploratória diferencial foram realizadas. A neutralização em tampão citrato pH 5,0, sem glicerol, originou filmes biocompatíveis com melhor integridade física para uso na liberação de ácido hialurônico utilizando um modelo de pele de porco. A composição filmogênica contendo solução aquosa de ácido cítrico como meio dispersante apresentou maior integridade física, resultado de melhores propriedades físico-químicas como menor grau de intumescimento (retenção de água, sem dissolução do filme), conteúdo de umidade e de percentual de solubilização em meio ácido ou alcalino. O efeito do meio dispersante foi significativo na avaliação destas propriedades. De acordo com as análises térmicas, estes filmes apresentaram maior interação com água, característica importante para a aplicação proposta. Segmentos de pele tratados por filmes com ou sem ácido hialurônico, mostraram hidratação em 10 min e descamação do estrato córneo. Com o tratamento por gel de Carbopol® contendo o ativo, hidratação foi superior, sem esfoliação. Os resultados revelaram que os filmes de quitosana preparados em solução aquosa de ácido cítrico, sem glicerol e neutralizados em tampão citrato pH 5,0, devido à maior integridade física, biocompatibilidade e efeito esfoliante da quitosana e ácido cítrico, possuem potencial de aplicação para utilização como matrizes e promover efeito cosmético através da esfoliação da pele.

ABSTRACT

In this work were prepared chitosan films for use as matrices in topical release of hyaluronic acid aiming cosmetic action by skin hydration. In this case, the physical integrity of films and its skin biocompatibility were fundamental requirements for cosmetic application. Because chitosan demands an acid medium to be processed, the choice of acid and neutralizer is necessary for the preparation of films with such characteristics. Aqueous solutions of acetic acid and citric acid were suggested as dispersing medium for films; simultaneously, aqueous solutions of sodium hydroxide:sodium carbonate pH 9.0, sodium carbonate pH 5.7 and acetate or citrate buffers pH 5.0 and 5.7 were proposed as neutralizers. To choose the appropriate film composition for this study, were made statistical evaluations of the effects of film's preparation factors on physicochemical properties of the films. Additionally, simultaneous thermal analysis and differential scanning calorimetry were performed. The neutralization in citrate buffer pH 5.0 without glycerol, originated biocompatible films with more physical integrity for use in hyaluronic acid release using a pig skin model. The film composition containing aqueous solution of citric acid as dispersing medium showed greater physical integrity resulted from better physicochemical properties as lower degree of swelling (water retention, without dissolution of the film), moisture content and percentage of solubilization in acid or alkaline media. The effect of dispersing medium was significant in evaluation of these properties. According to the thermal analyses, these films showed greater interaction with water, an important feature for the proposed application. Skins treated for films with or without hyaluronic acid showed hydration within 10 min and stratum corneum desquamation. With treatment for Carbopol® gel containing the active, there hydration was superior, without exfoliation. The results revealed that chitosan films prepared in aqueous solution of citric acid, without glycerol and neutralized in citrate buffer pH 5.0, because to greater physical integrity, biocompatibility and exfoliating effect of chitosan and citric acid, have a potential application for use as matrices and to promote cosmetic effect by skin exfoliation.

“Seja quem você for, qualquer posição que você tenha na vida (nível altíssimo ou mais baixo), tenha sempre como meta muita força, muita determinação e, sempre, faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.”

Ayrton Senna da Silva

1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento facial é definido como um conjunto de alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas que ocorrem progressivamente na pele com o decorrer do nosso tempo de vida¹. É o resultado das interações entre fatores intrínsecos (cronológicos ou naturais) e extrínsecos (fotoenvelhecimento) que ocorrem durante nosso período de existência². Neste caso, tais interações são consequências de um processo contínuo cujos danos ambientais em áreas expostas sobrepõem-se ao envelhecimento natural e, como efeito, há a aparência da pele^{3,4}.

No processo de fotoenvelhecimento, os radicais livres gerados promovem reações de despolimerização dos componentes biopoliméricos essenciais da pele, tais como colágeno, elastina e glucosaminoglicanos do estrato basal epidérmico e da matriz extracelular da derme^{5,6}. O fotoenvelhecimento reduz a quantidade desses componentes essenciais o que conduz à redução da elasticidade natural da pele. Por sua vez, a pele torna-se mais rígida e menos hidratada, com aparência seca (xerose), o que pode propiciar o surgimento de rugas finas ou hiperpigmentação⁷.

Em princípio, a reposição desses componentes requer métodos invasivos através da injeção destes biopolímeros na pele^{8,9}. A utilização de preenchedores dérmicos como o colágeno em procedimentos cirúrgicos para a correção dos sinais do envelhecimento cutâneo e a aplicação de toxina botulínica origina reação inflamatória decorrente do trauma da injeção (trauma mecânico) e/ou da resposta do organismo à substância, com consequente formação de edema, eritema, calor e dor localizada¹⁰. Além disso, o desconforto, a necessidade de recuperação e a possibilidade de infecção são obstáculos a este procedimento.

Devido à estrutura da epiderme, a pele constitui uma barreira à penetração de ativos cosméticos. Para que um ativo seja absorvido pela pele, este deve romper a barreira imposta pelo estrato córneo epidérmico e as camadas subjacentes para atingir a derme. Segundo Gomes e Gabriel¹¹ a penetração de ativos cosméticos está relacionada às características físico-químicas da substância difusora, tais como massa molar, hidrofília, lipofília, carga elétrica e concentração. Neste caso, para que as moléculas do ativo sejam permeáveis no estrato córneo, estas devem ter, preferencialmente, um caráter apolar¹².

Assim, a utilização tópica de permeação facial de ativos cosméticos contendo glucosaminoglicanos como o ácido hialurônico surge como uma alternativa para minimizar os efeitos do envelhecimento. O ácido hialurônico é um glucosaminoglicano não sulfatado que consiste em unidades repetidas de ácido *D*-glucorônico e *N*-acetilglucosamina unidas entre si por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 3) e β (1 \rightarrow 4)¹³. De acordo com a literatura, mais do que 50% do total de ácido hialurônico encontrado no corpo humano está localizado no tecido epitelial¹⁴⁻¹⁶.

Apesar da elevada massa molar e hidrofiliçidade do ácido hialurônico, o que seria esperado para limitar sua permeabilidade no estrato córneo, tal ativo cosmético pode ser absorvido pela pele humana^{17,18}. Brown e colaboradores¹⁷ apresentaram a possibilidade de penetração e/ou permeação do ativo quando aplicado na pele na forma de gel, encontrando-o na camada basal da epiderme, derme e endotélio linfático após a aplicação tópica. Neste contexto, é conhecido que a penetração e/ou permeação do ácido hialurônico é decorrente da presença de domínios hidrofóbicos na cadeia polimérica devido ao caráter lipofílico da macromolécula ou da existência de receptores de ácido hialurônico distribuídos por todo o tecido epitelial. Tais fatores podem, respectivamente, aumentar a permeabilidade do ativo cosmético na pele através da afinidade da molécula do ativo com a camada lipídica superficial do estrato córneo¹⁹ ou facilitar a localização do ativo cosmético na pele^{20,21}.

Neste cenário, Pavicic e colaboradores²² demonstraram que o ácido hialurônico de baixa massa molar ($M_w = 50.000 \text{ g mol}^{-1}$) pode penetrar na camada córnea, o que confere propriedades hidratantes por retenção de água no estrato córneo e, como consequência, há a redução na profundidade das rugas. Isto ocorre devido à natureza hidrofílica^{23,24} do ácido hialurônico, o qual permite a hidratação da camada córnea.

O desenvolvimento de estratégias que aumentem a eficácia das formulações cosméticas tendo em vista a penetração e/ou permeação cutânea de ativos, vem sendo estudado²³. Para tal finalidade, a alteração da função barreira da pele é imprescindível. Neste caso, esta modificação pode ser realizada através da hidratação do estrato córneo²³⁻²⁵. A hidratação é essencial para a execução correta dos processos fisiológicos, bioquímicos e biofísicos da pele²⁶, pois a água atua, a nível celular, como plastificante para proteínas das células da camada córnea²⁷.

Atualmente, a indústria farmacêutica tem interesse em relação ao papel dos excipientes nestas formulações cosméticas. Dessa forma, o desenvolvimento de formulações

que contêm um excipiente capaz de promover efeito cosmético além de aprimorar o efeito dos ativos, é necessário²⁸. A utilização da quitosana como excipiente para a preparação de filmes poliméricos é uma possibilidade promissora. Quitosana é um polissacarídeo constituído por unidades de *D*-glucosamina e *N*-acetilglucosamina ligadas entre si através de ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4). Em soluções aquosas ácidas, este polissacarídeo origina hidrogéis, os quais podem ser processados na forma de filmes²⁹. Uma propriedade interessante da quitosana, sob a forma solúvel em água, é a bioadesão³⁰ que ocorre devido à interação da rede polimérica catiônica originada com os grupos carregados negativamente na superfície da pele. Em razão desta propriedade, a quitosana pode ser utilizada em cosméticos e produtos de higiene pessoal como hidratante da pele e máscara reguladora de tom³¹.

No entanto, a baixa estabilidade de filmes compostos por quitosana restringe a sua aplicação³², e a manutenção da integridade da estrutura física destes filmes durante a preparação, é um desafio significativo. Em solução aquosa de ácidos inorgânicos ou orgânicos diluídos, a quitosana é carregada positivamente devido à protonação dos grupos amino. Como consequência, há a dissolução dos filmes quando estes estão imersos em água ou em meio ácido. Portanto, uma etapa de neutralização é necessária para melhorar a estabilidade destes filmes.

Após a neutralização, os filmes de quitosana apresentam rigidez, característica indesejável, uma vez que a aplicação de filmes sobre a pele requer fácil manuseio do material. A adição de glicerol, substância com propriedade plastificante, reduz a rigidez e melhora o manuseamento dos filmes. No campo farmacêutico, o glicerol é considerado um umectante, pois é uma molécula polar com propriedades higroscópicas. É utilizado para o tratamento da pele seca devido à capacidade de propiciar maior suavidade e maleabilidade ao estrato córneo³³.

De acordo com Ali e colaboradores³⁴, o pH do meio afeta a integridade, a coesão e a descamação do estrato córneo. Como a maior parte dos produtos para o cuidado da pele alteram o seu pH, é necessário o estudo de formulações cosméticas que apresentem um pH mais compatível com o da pele visando minimizar o risco de irritação cutânea. Para aumentar a permeação cutânea, recomenda-se o uso de formulações com um pH próximo ao pH fisiológico da pele (pH entre 4,5-6,5). Como alternativa, podem ser utilizadas soluções tampão que atuam como agentes neutralizantes para os filmes de quitosana.

Assim, nesse trabalho foi proposto o desenvolvimento de filmes de quitosana para liberação de ácido hialurônico, substância ativa hidratante para uso tópico.

2. JUSTIFICATIVA E INOVAÇÃO

Atualmente, existe um elevado grau de preocupação na população em geral com relação ao cuidado estético da pele. A busca por um padrão ideal de beleza através da preservação da aparência saudável da pele (uma pele hidratada, sem rugas e manchas) tem sido generalizada. Assim, com o aumento da longevidade e da concorrência no mercado de trabalho, surgiu uma nova categoria de usuários de produtos cosméticos interessada em corrigir as alterações resultantes do processo de envelhecimento da pele³⁵⁻³⁸.

A aplicação de biopolímeros em formulações cosméticas vem crescendo à medida que a cosmetologia ganha espaço como ciência³⁹. A maior parte das formulações cosméticas tradicionais existentes no mercado apresenta-se na forma farmacêutica de emulsões (cremes e géis), sistemas termodinamicamente instáveis, que tendem à separação de fases quando mantidos em repouso sem agitação. Além disso, ambas formulações causam um efeito oleoso em peles suscetíveis. Em relação à forma farmacêutica gel, as desvantagens são a incompatibilidade com algumas substâncias ativas e a tendência para a dessecação⁴⁰. Ademais, as formulações cosméticas tradicionais apresentam um tempo de contato curto entre os ativos hidratantes e a pele, o que reduz a penetração e/ou permeação na camada córnea.

Por outro lado, formulações cosméticas inovadoras como *patches* (adesivos) têm sido propostas para melhorar a eficácia dos ativos cosméticos⁴¹⁻⁴³. A utilização de filmes poliméricos como matrizes para liberação cutânea de ácido hialurônico tendo em vista ação hidratante é uma tentativa de melhorar a penetração e/ou permeação do ativo no estrato córneo, e de eliminar, não só os aspectos negativos referentes às formas farmacêuticas comercializadas atualmente, mas também dos efeitos colaterais dos métodos invasivos. Dentre as vantagens de desenvolver matrizes para liberação tópica de ativos hidratantes, há a estabilidade física e microbiológica superior; maior umectação (aumento na retenção de água pela matriz, ocasionada pelo seu intumescimento); a diminuição de reações entre ativos e excipiente; menor reação da pele frente à forma farmacêutica utilizada, que é removida após a ação do produto e a maior intensidade de contato entre os ativos e a pele. Adicionalmente, a aplicação de uma matriz sobre a pele requer um momento de cuidado pessoal, conferindo sensação de bem-estar.

O emprego desta tecnologia inovadora representa um importante avanço na área de Cosmetologia, uma vez que proporciona grande incremento na permeação de ativos na pele, potencializando, dessa forma, a eficácia das formulações hidratantes.

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo a preparação de filmes de quitosana com melhor integridade na estrutura física e biocompatibilidade com a pele humana para utilização como matrizes para aplicação na liberação de ácido hialurônico através de um modelo *in vitro* de pele de orelha de porco tendo em vista ação cosmética.

Para atingir esse objetivo, foram realizadas as seguintes atividades:

- ✓ Preparação de filmes de quitosana com a variação dos parâmetros, concentração de quitosana, percentual de plastificante, agente neutralizante, tempo de neutralização e meio dispersante;
- ✓ Avaliação das propriedades físico-químicas, percentual de porosidade, grau de intumescimento, percentual de degradação em meio ácido e em meio alcalino, espessura, conteúdo de umidade, percentual de perda de massa e transição de fase, respectivamente, por Testes de Porosidade, Testes de Intumescimento, Testes de Solubilização em Meio Ácido e Meio Alcalino, Medidas de Espessura, Determinação do Conteúdo de Umidade, Análise Térmica Simultânea e Calorimetria Exploratória Diferencial;
- ✓ Avaliações estatísticas dos efeitos dos parâmetros de preparação dos filmes nas propriedades físico-químicas dos filmes;
- ✓ Determinação e avaliação do grau de hidratação dos segmentos de pele após tratamento cosmético - com o filme que apresentou melhor integridade na estrutura física e biocompatibilidade ou com o gel - contendo ácido hialurônico através de Espectroscopia de Infravermelho com Refletância Atenuada;
- ✓ Análise da superfície dos filmes e segmentos de pele por Microscopia Eletrônica de Varredura.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. A PELE HUMANA

A pele é o maior órgão do corpo humano, correspondendo a aproximadamente 16% da massa corporal⁴⁴. É um órgão multifuncional cujas funções principais são de revestimento e proteção do corpo. Adicionalmente, a pele exerce funções vitais, tais como; metabólicas, de termorregulação, imunitárias e de recepção de estímulos sensoriais (táteis)⁴⁵. Como consequência da multifuncionalidade da pele, há a adaptação do organismo às mudanças ambientais. Anatomicamente, a pele é um órgão de revestimento heterogêneo composta por camadas interdependentes, ou seja, funcionalmente, estas camadas possuem uma relação mútua.

4.1.1. Histologia da Pele

A pele é composta por duas camadas de tecidos principais (da superfície para o interior): a epiderme, de origem ectodérmica; e a derme e seus anexos, de origem mesodérmica. Abaixo da derme, há a hipoderme (tecido adiposo ou tecido subcutâneo)^{46,47}. A estrutura da pele está representada na Figura 4.1.

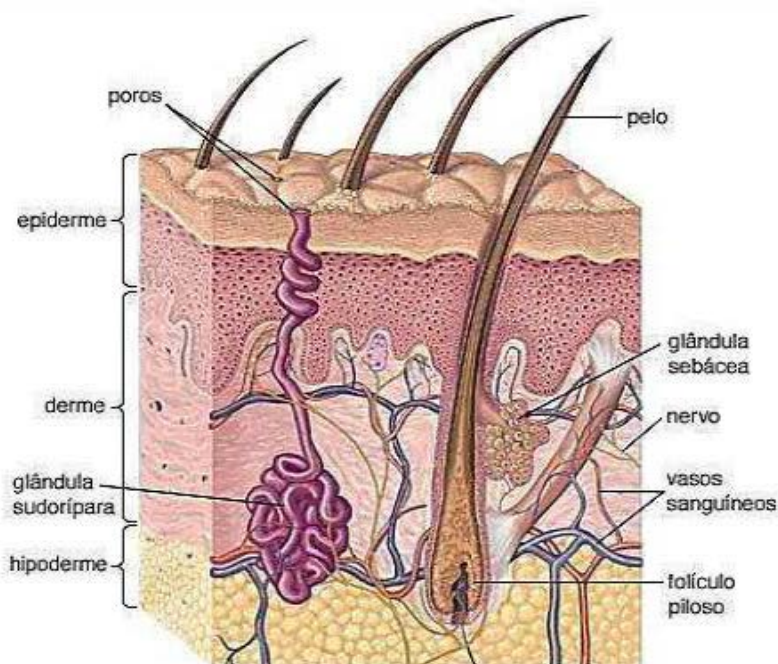


Figura 4.1 – Desenho Esquemático da Anatomia da Pele Humana⁴⁸.

4.1.1.1. Epiderme

A epiderme é um tecido epitelial pavimentoso (apresenta maior quantidade de células achatadas), estratificado (contém várias camadas de células), queratinizado e avascular. Possui espessura entre 0,07 e 1,4 mm e, é formada por duas camadas de tecidos: o estrato córneo e a epiderme viável⁴⁹.

O epitélio consiste em uma complexa estrutura formada por quatro tipos de células: melanócitos, células de Langerhans, células de Merckel e queratinócitos. Em relação ao percentual de células componentes, 90% são compostas por queratinócitos, e os 10% restantes, constituídos por melanócitos, células de Langerhans e de Merkel. Os melanócitos localizam-se no estrato basal da epiderme viável e são responsáveis pela síntese de melanina, substância fotoprotetora que atua na pigmentação da pele; as células de Langerhans encontram-se no estrato basal e desempenham papel na imunovigilância cutânea; as células de Merkel são receptores sensoriais da pele que se dispõem entre os queratinócitos. E por fim, há os queratinócitos, células constituintes da epiderme viável, as quais durante o processo de diferenciação originam células na superfície cutânea que contém queratina, uma proteína com alto teor de enxofre e impermeável à água^{50,51}.

A diferenciação celular é um processo gradual pelo qual a célula altera sua forma para que possa executar uma determinada função. Neste caso, há uma especialização progressiva das células no organismo. O grau de diferenciação da célula está associado à capacidade de proliferação. Quanto menor a diferenciação da célula, maior a possibilidade de proliferação ou vice-versa⁵².

4.1.1.1.1. Estrato córneo

O estrato córneo, camada mais externa da epiderme, possui espessura entre 10 e 15 μm e é composto por cerca de 15 subcamadas de células anucleadas e queratinizadas. Cada subcamada está disposta na forma de lamelas com espessura entre 220 e 440 nm^{49,53,54}.

A estrutura do estrato córneo é descrita segundo o modelo “tijolo e argamassa” ou *brick & mortar* no qual as células queratinizadas da camada córnea (“tijolo” ou *brick*) estão envoltas em uma matriz lipídica (“argamassa” ou *mortar*) composta por ácidos graxos e

lipídeos (ceramidas e colesterol)⁵⁵. Esta matriz é organizada em bicamadas lipídicas repetitivas dispostas na forma de estruturas lamelares e preenchem os espaços extracelulares^{56,57}. As células da camada córnea são preenchidas por proteínas estruturais como os filamentos de queratina e estão envoltas por um “envelope” lipídico composto por ω -hidroxiceramidas e por um envelope proteico formado pela proteína involucrina. Esta proteína contém resíduos glutamato que, através de ligações ésteres, unem-se covalentemente às ω -hidroxiceramidas as quais ancoram o envelope lipídico às bicamadas lipídicas oriundas da camada granulosa da epiderme viável⁵⁸. A representação da camada córnea e dos corneócitos constituintes estão dispostos na Figura 4.2.

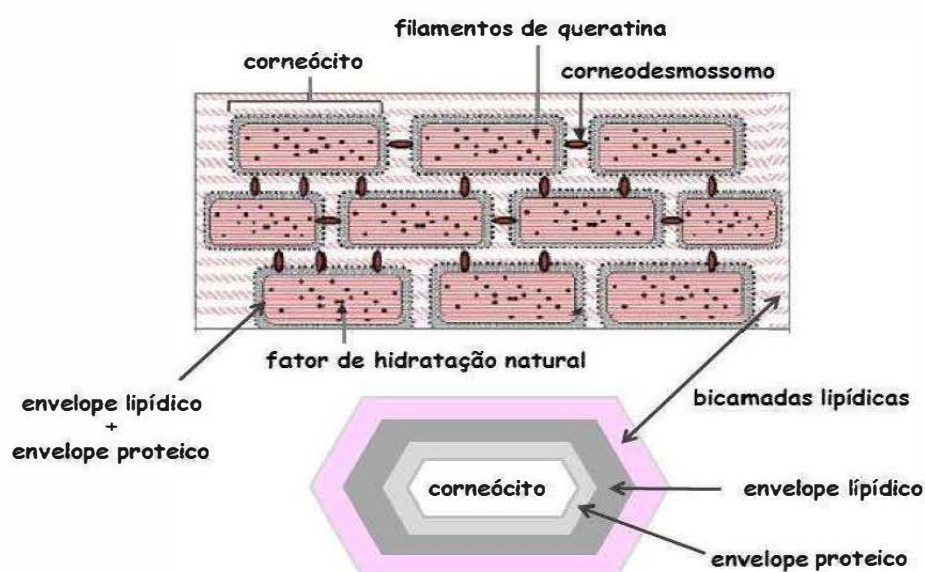


Figura 4.2 – Desenho Esquemático do Estrato Córneo e de um Corneócito com os Envelopes Lipídico e Proteico (adaptado de Harding, 2004)⁵⁹.

A composição do estrato córneo é de, aproximadamente, 70% de proteínas, 15% de lipídeos e ácidos graxos e 15% de água em relação à massa total da camada córnea. Por sua vez, a matriz lipídica é composta por 50% ceramidas, 25% colesterol, 15% ácidos graxos e 10% ésteres de colesterol e sulfato de colesterol⁶⁰. Com relação à polaridade dos compostos integrantes da matriz, são formados por moléculas anfifílicas que possuem duas regiões: uma região hidrofílica ou polar denominada “cabeça hidrofílica” e uma região hidrofóbica ou lipofílica denominada “cauda hidrofóbica” (Figura 4.3).

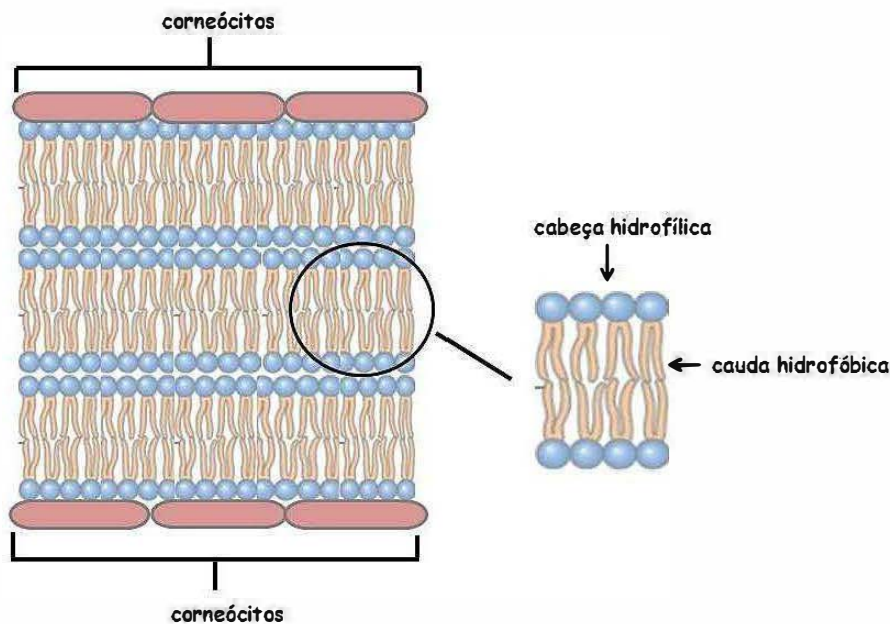


Figura 4.3 – Desenho Esquemático das Bicamadas Lipídicas do Estrato Córneo (adaptado de Caussin, 2009)⁶¹.

As células da camada córnea estão unidas entre si através de junções celulares, as *anchoring junctions* (junções proteicas intercelulares de ancoramento) constituídas pelos corneodesmossomas^{62,63}. Essas junções proteicas são responsáveis pela coesão entre as células adjacentes dessa camada. A presença dos corneodesmossomas e o elevado grau de organização da matriz lipídica são fatores que impedem a entrada de água e agentes químicos pela camada córnea. Desta forma, há contribuição conjunta para a manutenção da integridade do estrato córneo o que o torna responsável pela função “barreira” da pele à penetração de substâncias.

O estrato córneo é composto por duas regiões: o *stratum compactum* e o *stratum disjunction* (Figura 4.4). O *stratum compactum* corresponde às camadas profunda e média do estrato córneo e cada camada compreende um conjunto de subcamadas. As células constituintes destas subcamadas são denominadas células córneas e estão ligadas entre si pelos corneodesmossomas. Nesta região, as células córneas iniciam a diferenciação celular, logo, a atividade enzimática local é intensa. Neste estágio inicial de diferenciação, há redução na polaridade dos lipídeos através do desaparecimento da porção fosfolipídica e diminuição da coesão das células córneas o que facilita a transferência destas células para o *stratum disjunction*. O *stratum disjunction* corresponde à camada externa da pele (superfície cutânea) e é constituída por um conjunto de subcamadas. Nesta região, as células córneas concluem o

processo de diferenciação celular. Neste último estágio, há o término do processo de queratinização e início de um processo contínuo de descamação celular. Durante a descamação, há perda dos *cornodesmosomas* e desprendimento das células superficiais da pele. Como consequência, há a formação de células removíveis, denominadas *escamosas* ou *cornócitos*^{64,65}.

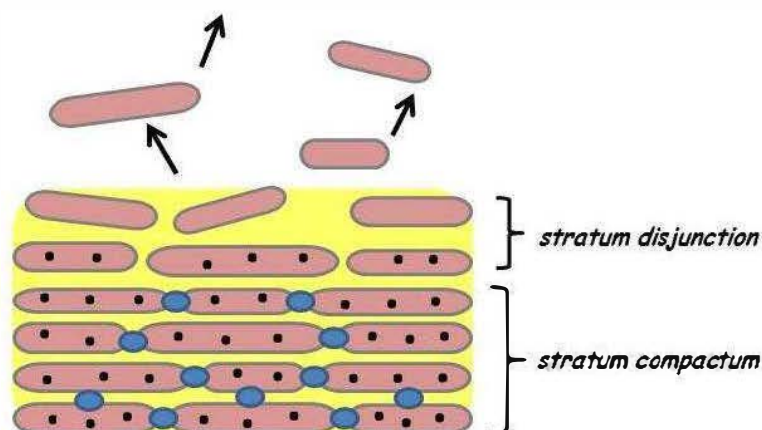


Figura 4.4 – Desenho Esquemático da Camada Córnea e suas Regiões: *stratum compactum* e *stratum disjunction* (adaptado de Dasgupta *et al.*, 2014)⁶⁶.

4.1.1.1.2. Epiderme viável

A epiderme viável, camada subjacente do estrato córneo, possui espessura entre 50 e 100 μm e é dividida em quatro camadas ou estratos: basal, espinhoso, granuloso e lúcido⁶⁷ (Figura 4.5).

O estrato basal ou germinativo é camada mais profunda da epiderme. Nesta camada, encontram-se células cilíndricas em intenso processo de divisão. A diferenciação dos queratinócitos do estrato basal permite que essa camada origine as demais camadas que compõem a epiderme. Neste processo, os queratinócitos sofrem modificações bioquímicas e morfológicas durante a migração em direção às camadas superiores da epiderme. O resultado final deste processo de diferenciação é o surgimento do estrato córneo. Na região de separação entre a epiderme e a derme, há a membrana basal ou lâmina basal. Sobre esta membrana, os queratinócitos basais estão fixados à derme através das *anchoring junctions*, formadas pelos *hemidesmosomas*^{62,63,68}.

O estrato espinhoso ou filamentososo está localizado acima do estrato basal e é composto por três ou quatro camadas de queratinócitos. Nesse caso, as células constituintes dessa camada encontram-se coesas entre si através das *anchoring junctions*, constituídas pelos desmossomas. Estas junções possuem a mesma função dos corneodesmossomas do estrato córneo. Adicionalmente, há as *gap junctions* (junções proteicas intercelulares de comunicação) as quais exercem o papel de mediadores para transferência de nutrientes (íons inorgânicos e pequenas moléculas solúveis em água) e sinais elétricos através de canais localizados entre as células adjacentes^{63,69}.

O estrato granuloso situa-se acima do estrato espinhoso e é composto por três camadas de queratinócitos. Tais células possuem aspecto granuloso devido à presença de grânulos de querato-hialina, precursor da filagrina, proteína responsável por agregar os filamentos de queratina e outras proteínas nas camadas mais superficiais da epiderme para a formação do estrato córneo⁷⁰. Esta região da epiderme origina as bicamadas lipídicas do estrato córneo. Os queratinócitos constituintes desta camada estão unidos entre si por meio de junções celulares, as *tight junctions* (junções proteicas intercelulares de oclusão). Estas junções são responsáveis pelo contato direto entre as células adjacentes, formação e manutenção da função barreira da pele para prevenção da perda de água cutânea^{63,71}.

O estrato lúcido ou claro localiza-se entre o estrato granuloso e córneo e é formado por uma ou duas camadas de células translúcidas e anucleadas. É encontrado nas regiões do corpo que não apresentam pelo, como na região da palma das mãos e sola dos pés. O estrato lúcido contém a eleidina, substância lipoproteica, que auxilia o estrato granuloso na prevenção da desidratação da derme⁷².

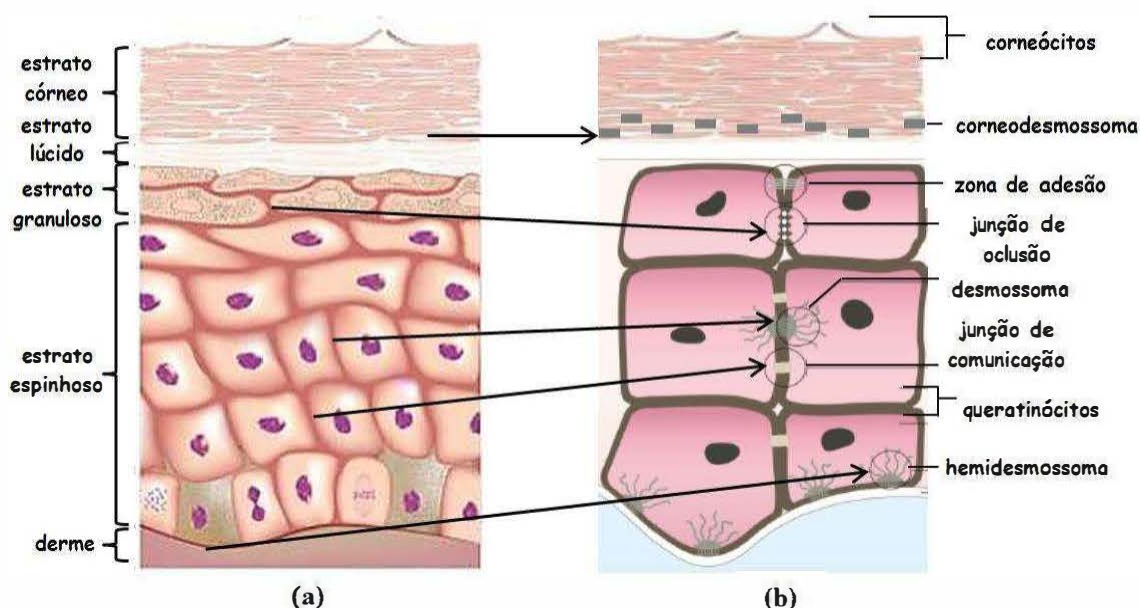


Figura 4.5 – Desenho Esquemático da Anatomia da Epiderme Humana: (a) divisão por camadas (estratos) e (b) junções intercelulares. As setas indicam a localização das junções intercelulares nas camadas correspondentes (adaptado de Brasil Escola, 2015)⁷³.

4.1.1.2. Derme

A derme é o elemento de nutrição e sustentação da pele, pois confere a ela suporte mecânico e elasticidade⁷⁴. É um tecido conjuntivo localizado entre a epiderme e a hipoderme com espessura entre 3 e 5 mm e é constituída por uma estrutura de fibras proteicas (colágeno e elastina), células de natureza conjuntiva e sanguínea (fibroblastos, macrófagos, mastócitos e hemácias), plexos sanguíneos e linfáticos (conjunto de vasos sanguíneos e linfáticos), anexos cutâneos e terminações nervosas. Todo esse conjunto está inserido em uma matriz extracelular amorfa composta por água, sais minerais e mucopolissacarídeos tais como glucosaminoglicanos (ácido hialurônico, sulfato de condroitina entre outros) e proteoglicanos.

A derme é formada por duas camadas de tecidos: a derme reticular ou profunda e a derme papilar ou superficial⁷⁵. A derme reticular ou profunda é a camada que está em contato direto com a hipoderme e representa 80% da espessura da derme. A partir desta camada reticular emergem os apêndices cutâneos como as glândulas sudoríparas e a unidade pilossebácea (conjunto formado por folículo piloso, pelo, músculo eretor do pelo e glândula

sebácea). A derme papilar ou superficial é a camada que se encontra em contato direto com a epiderme viável através do estrato basal.

4.1.1.3. Hipoderme

A hipoderme é um tecido conjuntivo adiposo localizado abaixo da derme. O tecido subcutâneo é constituído por duas camadas de tecidos, a lamelar e areolar, separadas por uma lâmina fibrosa⁷⁶. A camada lamelar, a mais interior, é composta por adipócitos (células que contêm reservas de lipídeos) dispostos horizontalmente, fibroblastos e vasos sanguíneos de maior tamanho. Com o aumento da massa corporal de um indivíduo, a camada lamelar aumenta de espessura devido ao aumento no volume dos adipócitos. Portanto, a presença de tecido adiposo está relacionada diretamente ao estado nutricional do indivíduo. Já a camada areolar, a mais superficial, possui adipócitos globulares dispostos em posição vertical, fibroblastos, e vasos sanguíneos de menor tamanho.

A hipoderme tem um papel importante no organismo, como isolamento térmico, amortecedor mecânico contra pressões externas, reserva de lipídeos provenientes do fígado e intestino e lipólise (metabolização dos lipídeos a ácidos graxos)⁷⁷.

4.1.2. Função Barreira e a Permeabilidade Cutânea

A pele humana, como órgão multifuncional, possui a capacidade de não só constituir uma barreira à perda de água e eletrólitos, mas também de impedir a entrada de substâncias exógenas prejudiciais. Estas características são atribuídas à histologia da pele, pois o estrato córneo apresenta baixo teor hídrico, quando comparado com as camadas mais profundas, e uma quantidade elevada de lipídeos e proteínas, as quais conferem a impermeabilidade atribuída^{78,79}.

Em relação à estrutura lipídica da pele, os lipídeos do estrato córneo são organizados em camadas múltiplas as quais formam lamelas em paralelo às paredes celulares dos corneócitos. Estas camadas se sobrepõem o que originam uma rede lipídica com uma organização em um padrão repetitivo. Tal rede é composta basicamente por duas fases lamelares cristalinas que são diferenciadas pelo período de repetição, conforme a Figura 4.6.

A primeira fase representa um curto período ou *short periodicity phase (SPP)* cuja distância d é igual a 6 nm. Por outro lado, a segunda fase consiste em um longo período ou *long periodicity phase (LPP)* com d igual a 13 nm^{80,81}.

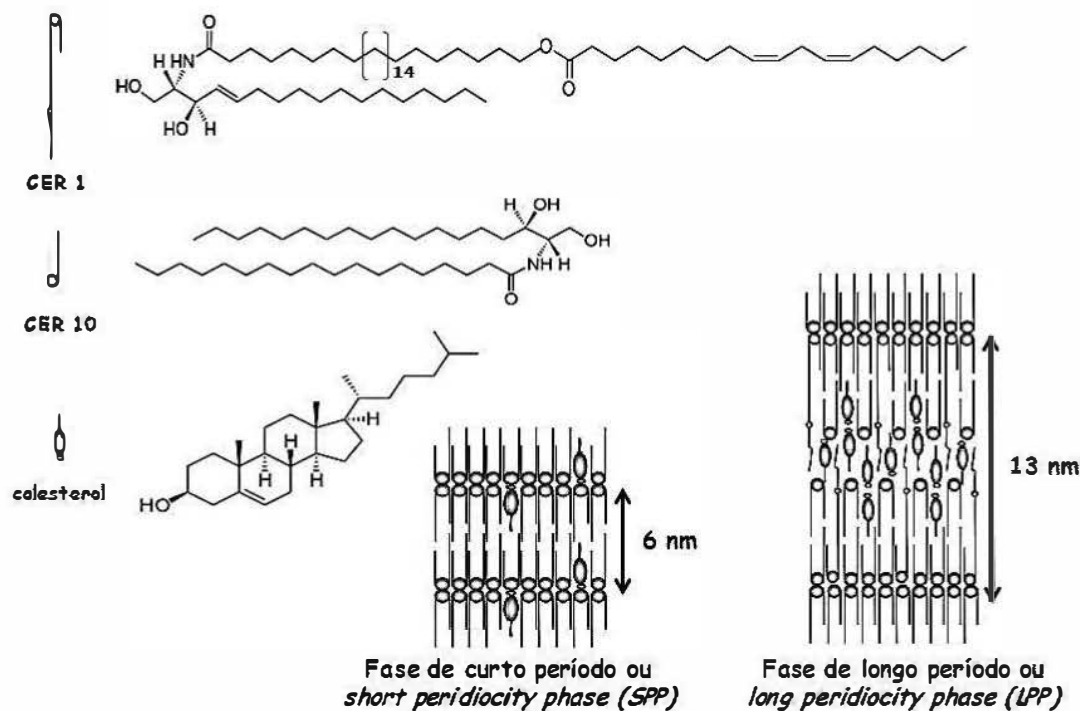


Figura 4.6 – Representação Estrutural das Fases Lamelares Cristalinas da Matriz Lipídica Constituinte do Estrato Córneo (adaptado de Bouwstra *et al.* 1998, 2001)^{82,83}.

Além do ordenamento lamelar, os lipídeos constituintes do estrato córneo apresentam uma organização lateral resultante do empacotamento lateral de suas caudas hidrofóbicas (Figura 4.7). Por sua vez, quanto menor a distância entre as caudas, mais densa, logo, menos permeável é a camada lipídica. Entre as três estruturas ou formas de organização lateral do estrato córneo humano (da maior a menor permeabilidade) há a líquido-cristalina, a hexagonal e a ortorrômbica⁸⁴. Esta forma é a predominante para o exercício da função de barreira da pele. Neste caso, estudos demonstraram que, na temperatura do corpo humano (~ 37 °C), a maioria das caudas hidrofóbicas dos lipídeos são dispostas na forma ortorrômbica. Com o aumento da temperatura, tal estrutura é convertida nas outras formas anteriormente descritas.

Atualmente, não há consenso entre os pesquisadores a respeito do padrão ideal de organização dos lipídios na camada córnea⁸⁵. Assim, o conhecimento da estrutura da pele é

essencial para a compreensão da função barreira e de seus mecanismos de ruptura, os quais ocasionados pela aplicação tópica de formulações contendo ativos cosméticos.

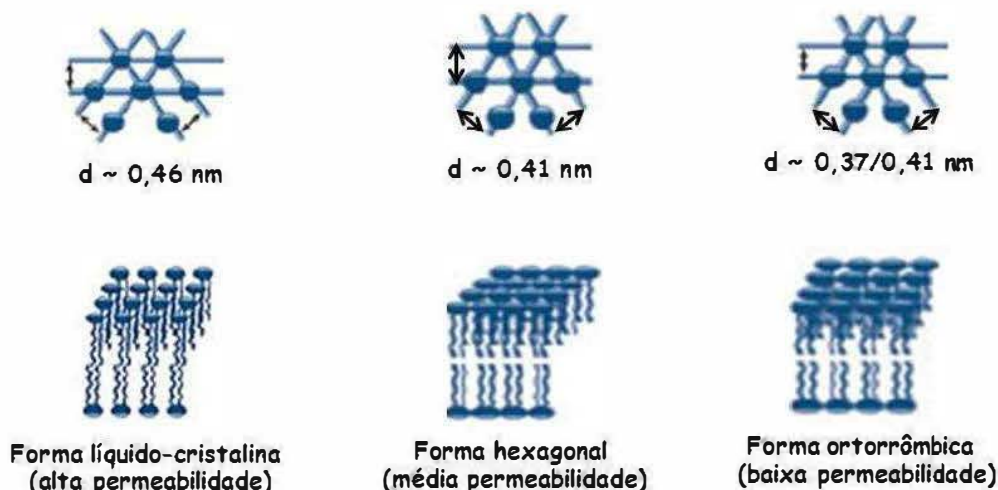


Figura 4.7 – Representação Estrutural da Organização Lateral da Matriz Lipídica Constituinte do Estrato Córneo⁸⁵.

Existem vários fatores que podem comprometer a permeação de ativos cosméticos para aplicação tópica e, conseqüentemente, a sua biodisponibilidade. Tais fatores podem estar relacionados à estrutura lipídica (conforme mencionado nesta seção), ao pH, ao grau de hidratação ou à presença de promotores de penetração no estrato córneo⁸⁶(mais detalhes vide seções 4.3. e 4.4.), entre outros.

O estrato córneo é o principal obstáculo para a penetração de substâncias através da pele. A superfície cutânea possui um pH fisiológico que varia de 4,5 a 6,5 originando um “manto ácido” o que proporciona a manutenção da integridade e da função barreira da pele. Em geral, quanto menor o valor de pK_a de uma substância, maior a acidez⁸⁷. Substâncias com acidez idêntica à da pele são mais absorvidas, uma vez que estão menos ionizadas (mais biodisponíveis) para absorção pela pele.

De acordo com Fluhr e colaboradores⁸⁸, o pH da superfície cutânea é um sistema tampão cuja finalidade é a manutenção de um pH estável na pele tendo em vista o controle da homeostase da barreira epidérmica. Com o controle da homeostase da barreira, há a preservação da superfície ácida na pele, o que proporciona a descamação natural do estrato

córneo, controle nos mecanismos de secreção de lipídeos desta camada e de defesa contra agressões exógenas como a ação microbiana⁸⁹.

O estrato córneo da pele possui permeabilidade seletiva à penetração de substâncias de caráter hidrofóbico uma vez que a natureza lipídica desta camada permite tal comportamento. Quanto menor a hidrofobicidade da substância, ou seja, maior a hidrofiliabilidade, maior a dificuldade de penetração no estrato córneo. Neste caso, a polaridade do ativo cosmético é um fator limitante para a penetração através da pele⁹⁰.

Um ativo cosmético pode penetrar através do estrato córneo por meio de três vias de permeação: a intercelular, a intracelular e a transapêndice (Figura 4.8).

a) via intercelular: considerada como rota predominante, nesta via, os ativos cosméticos, preferencialmente de natureza hidrofóbica, passam entre os corneócitos através da matriz lipídica que preenche os espaços extracelulares⁹¹;

b) via intracelular: comumente designada como *via polar*, nesta via, os ativos cosméticos penetram no meio intracelular (citoplasma) dos corneócitos através das membranas lipídicas. No entanto, nesta via observa-se que a penetração de substâncias hidrofóbicas é dificultada devido à presença de estruturas hidrofílicas das camadas hidratadas de queratina^{91,92};

c) via transapêndice: considerada como rota de menor extensão⁹¹⁻⁹³, nesta via, a penetração de ativos cosméticos ocorre através dos folículos pilossebáceos ou glândulas sudoríparas. Embora a via intercelular seja a mais comum para a permeação cutânea, a via transapêndice desempenha um papel importante, visto que os apêndices cutâneos representam uma pequena área da superfície total do órgão (apenas 0,1% da superfície da pele). Por outro lado, podem atuar como reservatório para diversas substâncias⁹¹⁻⁹⁴. A remoção do conteúdo do folículo pilossebáceo (sebo, restos de células e bactérias) favorece a penetração de substâncias pelo canal do folículo piloso.

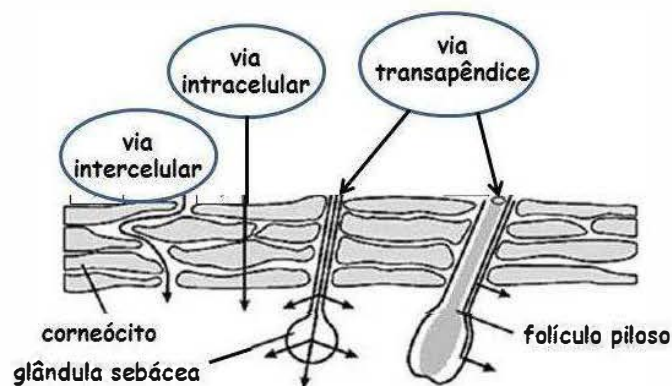


Figura 4.8– Desenho Esquemático das Vias de Permeação de Ativos Cosméticos através da Pele (adaptado de Trommer, 2006)⁹².

4.2. ENVELHECIMENTO HUMANO

4.2.1. O Envelhecimento Populacional

Conforme os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)⁹⁵, em 2015 o Brasil possuía uma população de 89,5 milhões de adultos. De acordo com a Figura 4.9, o percentual de homens ou de mulheres nesta idade foi inferior a 22,5% da população total. Neste cenário, o número total de pessoas idosas foi de 16 milhões e o percentual de homens ou de mulheres foi inferior a 4,5% da população total. Em 2030, estima-se um aumento da população em ambas faixas etárias citadas: Entre 30 e 64 anos, são previstas 107 milhões de pessoas, o que corresponderá a um acréscimo de 20% na população nesta faixa etária. Neste caso, o percentual de homens ou de mulheres será superior a 23,5% da população total. Para a população com idade superior a 65 anos, estimam-se 30 milhões de pessoas, o que representará um aumento de 88% na população nesta faixa etária. O percentual de homens ou de mulheres será superior a 5,5% da população total.

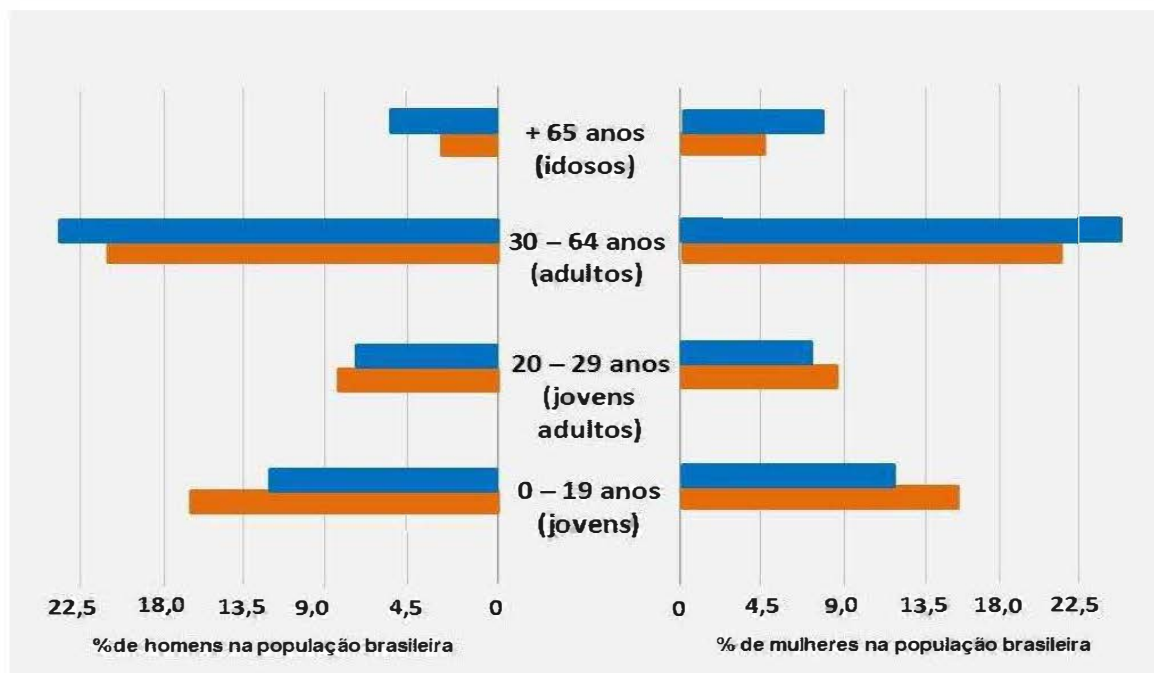


Figura 4.9 – Representação Gráfica da Distribuição Etária do Brasil em 2015 e 2030.
Em laranja: ano de 2015. Em azul escuro: ano de 2030 (adaptado de IBGE, 2016)⁹⁵.

Em 2015, a população mundial contabilizou 3,0 bilhões de pessoas com idade entre 30 e 64 anos e o percentual de homens ou de mulheres foi de 20,5% da população total (Figura 4.10). Concomitantemente, o número de pessoas com idade superior a 65 anos foi de 610 milhões e percentual de homens ou de mulheres, maior que 4,0% da população total. Em 2030, estima-se um aumento da população para 3,6 bilhões de adultos, um acréscimo de 63% na população nesta faixa etária. O percentual de homens ou de mulheres corresponderá a 21,5% da população total. Para a população idosa, são estimadas 995 milhões de pessoas, um acréscimo de 63% na população nesta faixa etária. O percentual de homens ou de mulheres será superior a 5,0% da população total⁹⁶.

Como se pode observar nas Figuras 4.9 e 4.10 a tendência de crescimento na população adulta e idosa e redução no número de jovens em geral é observada não só no Brasil, mas também na maioria dos demais países no mundo. Com o aumento da longevidade, o impacto do envelhecimento sobre a aparência da pele é um tema de interesse crescente entre os pesquisadores⁹⁷.

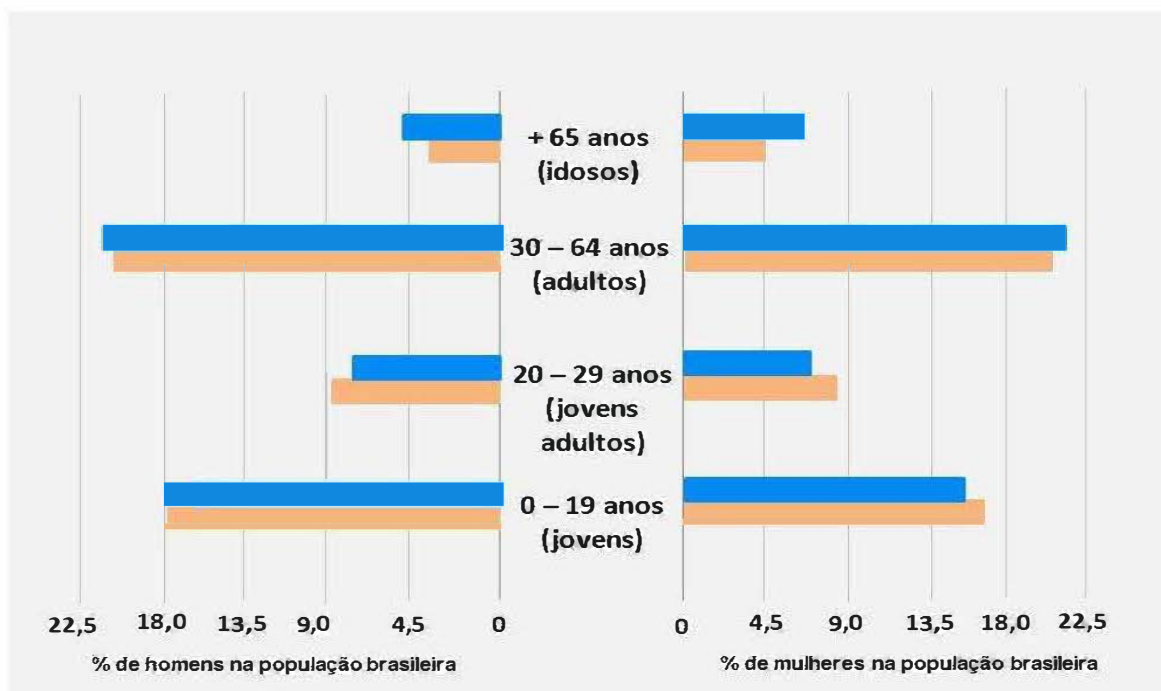


Figura 4.10 – Representação Gráfica da Distribuição Etária no Mundo em 2015 e 2030. Em rosa: ano de 2015. Em azul claro: ano de 2030 (adaptado de populationpyramid, 2016)⁹⁶.

4.2.2. Envelhecimento Cutâneo

De acordo com Oriá e colaboradores⁹⁸, todos os seres humanos, a partir do nascimento, iniciam uma fase regressiva de seu ciclo vital a qual se manifesta por modificações anátomo-fisiológicas em seu organismo. Como resultado dessas modificações, com o decorrer do tempo de vida do ser humano, há alterações progressivas na aparência da pele que são desfavoráveis no ponto de vista estético. A partir dos 30 anos de idade, o envelhecimento cutâneo torna-se visível, pois, desde esta fase, são observadas na pele, aumento da atrofia (redução na espessura da epiderme e na quantidade de melanócitos presentes o que ocasiona as manchas de hiperpigmentação), perda progressiva da elasticidade (diminuição do número de fibroblastos responsáveis pela biossíntese das fibras de colágeno e elastina, alterações na junção derme-epidérmica o que resultam no surgimento da flacidez, aumento das linhas de expressão e rugas na pele) e entre outras⁹⁹.

Segundo Farage e colaboradores¹⁰⁰, há duas formas de classificação do envelhecimento cutâneo: intrínseco ou cronológico e extrínseco ou fotoenvelhecimento.

O envelhecimento intrínseco ou cronológico resulta de um declínio natural e irreversível nas funções fisiológicas da pele cujo decréscimo é programado geneticamente¹⁰¹. Portanto, está relacionado diretamente com a idade do indivíduo. Entre as modificações anátomo-fisiológicas observadas, há as alterações na epiderme¹⁰² e no tecido conjuntivo da derme¹⁰³. O envelhecimento extrínseco ou fotoenvelhecimento é resultado de um processo biológico complexo ocasionado pela exposição solar crônica do indivíduo à radiação não ionizante ultravioleta (UV) e infravermelha (IV)¹⁰⁴.

No decorrer do processo de fotoenvelhecimento, a incidência de radiação UV na pele promove a formação de radicais livres, cujas espécies químicas reativas (ER), de natureza oxidante, possuem um elétron desemparelhado nos átomos de oxigênio (ERO) ou de nitrogênio (ERN)¹⁰⁵. As principais ERO distribuem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxila (HO[•]), superóxido (O₂^{•-}), peroxila (ROO[•]) e alcoxila (RO[•]); e os não radicalares: oxigênio (O₂), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e ácido hipocloroso (HClO). Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico (NO[•]), óxido nitroso (N₂O₃), ácido nitroso (HNO₂), nitritos (NO₂⁻), nitratos (NO₃⁻) e peroxinitritos (ONOO⁻)¹⁰⁶. Esses radicais livres podem reagir com os lipídeos de membranas celulares ou aminoácidos de proteínas promovendo a destruição e inativação das funções de tais compostos na pele. A consequência é o agravamento das alterações cutâneas obtidas durante o envelhecimento cronológico (aprofundamento das rugas, espessamento da pele, aumento na quantidade de manchas pigmentares, entre outras).

É conhecido que fatores como a cor da pele¹⁰⁷ e estilo de vida¹⁰⁸ também interferem no processo de envelhecimento cutâneo, neste caso, são considerados uma categoria à parte em relação ao estudo do envelhecimento.

Uma vez que não há, até então, um consenso da comunidade científica a respeito dos mecanismos bioquímicos que determinam as mudanças anátomo-fisiológicas observadas durante o envelhecimento da pele, o conhecimento sobre o processo de envelhecimento celular permanece hipotético¹⁰⁹. Devido à diversidade de teorias biológicas existentes na literatura que tentam elucidar tal conhecimento, estas foram classificadas em duas grandes categorias: a genético-desenvolvimentista ou sistêmica e a estocástica¹¹⁰. A primeira categoria apresenta as teorias que descrevem os eventos sequenciais e coordenados que constituem o desenvolvimento dos organismos envolvendo o controle genético. Dentre elas, destacam-se a Teoria da Velocidade de Vida, Teoria do Envelhecimento Celular, Teoria dos Telômeros e a Teoria Imunológica. A segunda categoria apresenta as teorias que demonstram a hipótese do

acúmulo de erros e danos decorrente da atuação conjunta dos fatores intrínsecos e extrínsecos. Dentre elas, destacam-se a Teoria das Mutações Somáticas, Teoria do Erro-Catástrofe, Teoria da Reparação do DNA, Teoria da Glicosilação e a Teoria do Estresse Oxidativo, esta última a mais aceita pelos pesquisadores^{111,112}.

A Teoria do Estresse Oxidativo¹¹³ sugere que, durante o processo de envelhecimento celular, ocorre o acúmulo no organismo de produtos de oxidação de proteínas, do DNA e de lipídios gerados pela ação de radicais livres. Este acúmulo de produtos é ocasionado pela ineficiência (erro) dos agentes antioxidantes no combate aos radicais livres das células. Neste caso, há um desequilíbrio na proporção entre radicais livres e antioxidantes. Assim, um erro pode gerar tais produtos indejáveis às células que, em acúmulo, podem promover um dano oxidativo ao tecido epitelial propriamente dito. Logo, o dano oxidativo pode ser considerado um fator relevante para o envelhecimento da pele. Como exemplo, há redução da elasticidade e hidratação da pele (danos) devido às reações de despolimerização do colágeno e do ácido hialurônico que ocorrem no local.

4.3. HIDRATAÇÃO CUTÂNEA

4.3.1. Hidratação Fisiológica da Pele

Hidratação cutânea é um termo que engloba diversos significados e interpretações dependentes da aparência macroscópica da pele, isto é, da sua textura e suavidade ao toque. A pele hidratada apresenta tais características devido à existência e, principalmente, à manutenção do conteúdo hídrico da pele.

Segundo Nicander e colaboradores¹¹⁴, hidratação cutânea é a “presença de água na camada mais externa da pele, o estrato córneo”. A água constitui cerca de 60% da massa corporal e é essencial para a manutenção de uma pele saudável¹¹⁵. Na epiderme viável, o teor de água corresponde entre 60 e 70% da massa seca da camada, porém, à medida que se ascende para o estrato córneo, há redução no teor de água. Neste caso, o conteúdo hídrico do estrato córneo resulta em valores entre 20 e 35% da massa seca do estrato córneo¹¹⁶. Assim, a diferença em relação ao teor de água existente entre as duas camadas citadas contribui para a manutenção do conteúdo hídrico e de solutos na epiderme viável¹¹⁷.

Outra definição proposta para hidratação cutânea “é o processo de reposição de água na pele com a finalidade de manter o seu conteúdo hídrico”. Para preservação da elasticidade e/ou flexibilidade na pele, propriedades dependentes do estado de hidratação do estrato córneo, é necessário um mínimo de 10% de água nessa camada (hidratação mínima do estrato córneo)^{116,118}.

A perda de água da pele é regulada fisiologicamente, em vista disso, a hidratação fisiológica da pele é ocasionada pela retenção de água no estrato córneo. Este fenômeno é ocasionado, essencialmente, por dois fatores:

a) presença de agentes higroscópicos naturais no interior das células da camada córnea: O Fator Natural de Hidratação (*FNH*) ou *Natural Moisturizing Factor (NMF)* é uma mistura complexa de compostos hidrossolúveis e de baixa massa molar tais como os ácidos orgânicos (ácido 2-pirrolidona-5-carboxílico, ácido láctico e ácido urocânico), sais orgânicos (lactatos citratos e formatos) e inorgânicos (cloretos e fosfatos), cátions sódio e potássio, ureia e aminoácidos. É formado no interior das células córneas do *stratum compactum* pela proteólise da filagrina. As substâncias componentes do *NMF* estão presentes no estrato córneo e, por serem hidrosfólicas, estão relacionadas com a retenção de água nessa camada. Para tanto, tais substâncias são consideradas agentes com propriedades hidratantes¹¹⁹. A composição química do *NMF* é representada na Figura 4.11.

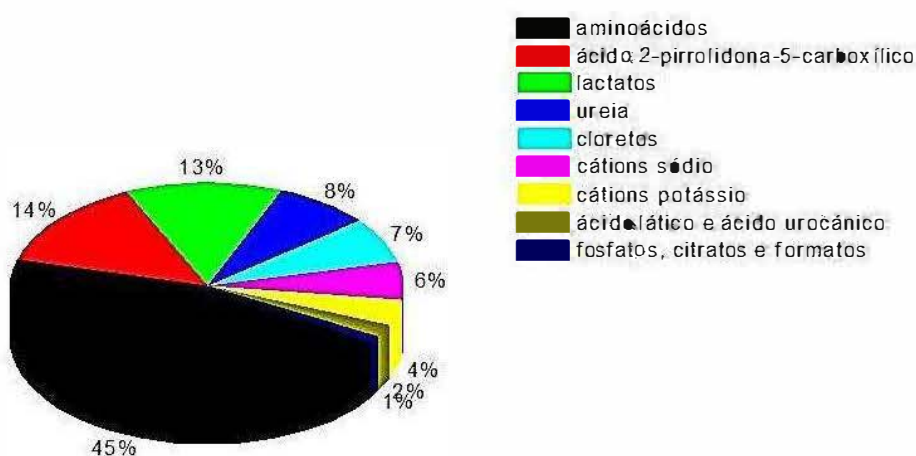


Figura 4.11 – Representação Gráfica da Composição Química do *NMF* (em % mol, adaptado de Barata, 2002)¹²⁰.

Uma vez que a derme possui um alto conteúdo de água e a camada córnea, uma quantidade de água dependente da umidade relativa do ar, para a preservação da homeostasia hídrica da pele ou manutenção do equilíbrio hídrico da pele, há necessidade do estrato córneo manter uma quantidade adequada de água contra o gradiente de difusão gerado pela redução drástica da umidade relativa do ar. Neste caso, a reposição fisiológica da água no estrato córneo ocorre por processo de difusão onde a água é transportada da derme para a superfície cutânea. Um valor menor que 10% na umidade relativa do ar, diminui o conteúdo hídrico do estrato córneo; conseqüentemente, há redução na produção do *NMF*. Dessa forma, há comprometimento na função das enzimas hidrolíticas para a proteólise da filagrina e formação de aminoácidos componentes do *NMF*. Portanto, há uma redução intensa na hidratação da pele o que conduz à secura e descamação celular na superfície^{117,120} (Figura 4.12).

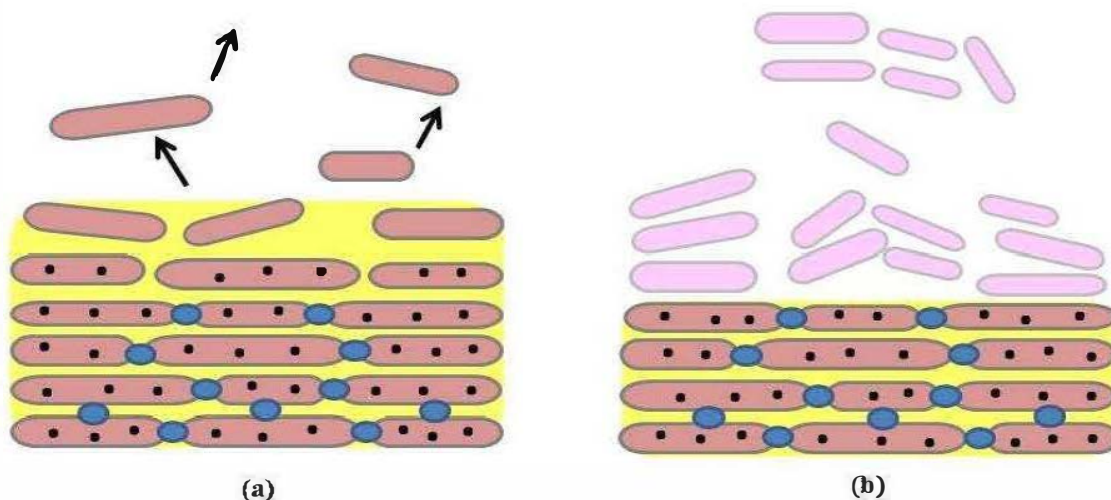


Figura 4.12 – Desenho Ilustrativo do Processo de Descamação do Estrato Córneo: (a) natural e (b) induzido pela drástica redução na umidade relativa do ar (adaptado de Dasgupta *et al.*, 2014)⁶⁶.

b) existência de lipídeos intercelulares organizados para formar uma barreira contra a perda de água: A preservação e o desempenho apropriado dos componentes constituintes da barreira epidérmica asseguram a homeostasia hídrica da pele. Para isso, a presença de uma barreira epidérmica intacta é necessária¹²¹. Satisfeita esta condição, tem-se como resultado a integridade da pele. O sinal homeostático relacionado com a manutenção e reparo da função barreira da pele é conhecido por Perda Transepidérmica de Água (*PTA*) ou

Transepidermal Water Loss (TEWL). Portanto, *TEWL* pode ser definida como a quantidade total de água perdida pela pele desconsiderando a perda hídrica pela glândula sudorípara¹²².

Quando há aumento na *TEWL*, um sinal fisiológico inicia o reparo da barreira por meio da regulação da síntese de lipídeos e ácidos graxos. Distúrbios na permeabilidade da barreira induzem uma resposta fisiológica para a restauração da função barreira e a normalização ocorre num período de horas ou dias. Esse período de restauração varia, em princípio, conforme a extensão de agressão da pele, a idade e estado de saúde do indivíduo^{123,124}.

TEWL possui uma relação inversamente proporcional com a hidratação¹²⁵. Valores menores que 10 % no conteúdo de água no estrato córneo há comprometimento da função barreira devido a alterações no metabolismo referente à síntese dos seus componentes. Como consequência, são observadas alterações xeróticas da pele (*secura*, aspereza, fissuras). Isso resulta na redução no grau de hidratação da pele logo, há um aumento da *TEWL*. No entanto, a hidratação excessiva ocasiona ruptura das bicamadas lipídicas e modificação em sua organização estrutural. De acordo com Bernengo e De Rigal¹²⁶, a inserção de água na pele promove aumento na interação da água com os grupamentos hidrofílicos ou polares dos componentes da pele. A maior afinidade das moléculas de água com esses grupamentos polares diminui as forças de atração entre as partes hidrofóbicas das cadeias dos lipídeos. Por fim, há diminuição na coesão do estrato córneo.

4.3.2. Hidratação Cosmética da Pele

A hidratação cosmética da pele visa principalmente, à restauração da barreira lipídica e/ou à reposição do *NMF*, uma vez que a aplicação frequente de produtos cosméticos permite reter, por um tempo maior, a água no estrato córneo. As formulações cosméticas existentes no mercado atuam mediante três mecanismos diferentes: oclusão, umectação e umectação ativa ou hidratação ativa¹²⁷ (Figuras 4.13, 4.14 e 4.15, respectivamente).

a) Hidratação por oclusão: neste mecanismo, a formulação contém um ou mais componentes lipofílicos que, por meio de forças de Van der Waals, espalham-se sobre a superfície da pele formando um filme lipofílico que impede a evaporação superficial da água, logo, há uma redução da *TEWL*. Nesse caso, há um aumento da retenção hídrica na superfície

cutânea por fixação de água endógena. Óleos minerais (hidrocarbonetos, tais como vaselina e parafina), vegetais (óleo de amêndoas e óleo de argan) e animais (óleo de avestruz), emulsões cremosas à base destes óleos, gorduras animais, ceras e álcoois graxos são exemplos de substâncias utilizadas para esse fim.

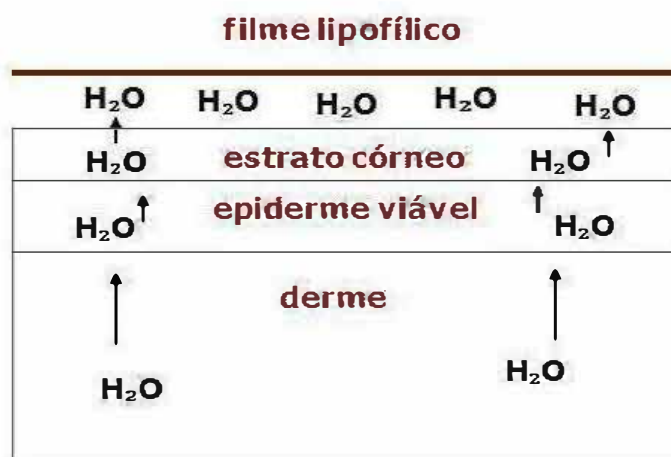


Figura 4.13 – Representação Esquemática do Mecanismo de Hidratação da Pele por Oclusão (adaptado de Ribeiro *et al*, 2006)¹²⁸.

b) Hidratação por umectação: neste mecanismo, a formulação contém um ou mais componentes (uma ou mais substâncias hidratantes) que, por meio de ligações de hidrogênio, espalham-se sobre a superfície da pele formando um filme hidrofílico. Este filme tem as funções de fixar a água perdida por evaporação superficial e a água proveniente da atmosfera além de absorver água da formulação. O (s) componente (s), nesse caso, não permeia (m) o estrato córneo. Há um aumento da retenção hídrica na superfície cutânea por fixação de água exógena e maior redução da *TEWL*. Os exemplos mais comuns são: mel, hidrolisados de proteínas vegetais, polióis hidrossolúveis (glicerol, sorbitol, propilenoglicol e polietilenoglicol), ácido hialurônico de alta massa molar e seus sais, sulfato de condroitina, entre outros.

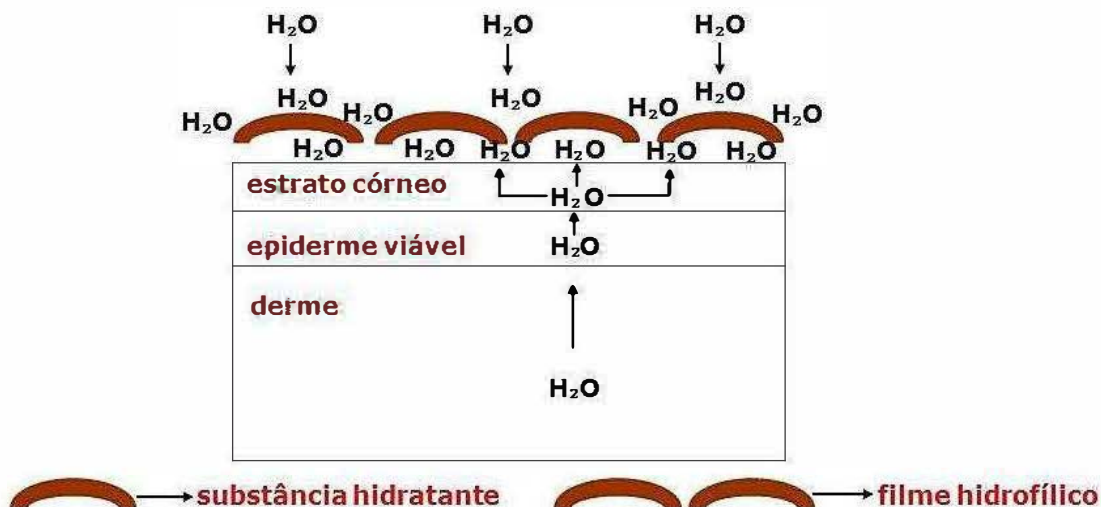


Figura 4.14 – Representação Esquemática do Mecanismo de Hidratação da Pele por Umectação (adaptado de Ribeiro *et al*, 2006)¹²⁸.

c) Hidratação por umectação ativa (ou hidratação ativa): neste mecanismo, o (s) hidratante (s) permeia (m) o estrato córneo, ligando-se a moléculas de água nesta região. O (s) hidratante (s) é (são) veiculado (s) de forma a se obter a máxima penetração na pele para que atue na manutenção do seu conteúdo hídrico. Os exemplos mais comuns são os componentes do *NMF* e ácido hialurônico de média e baixa massa molar.

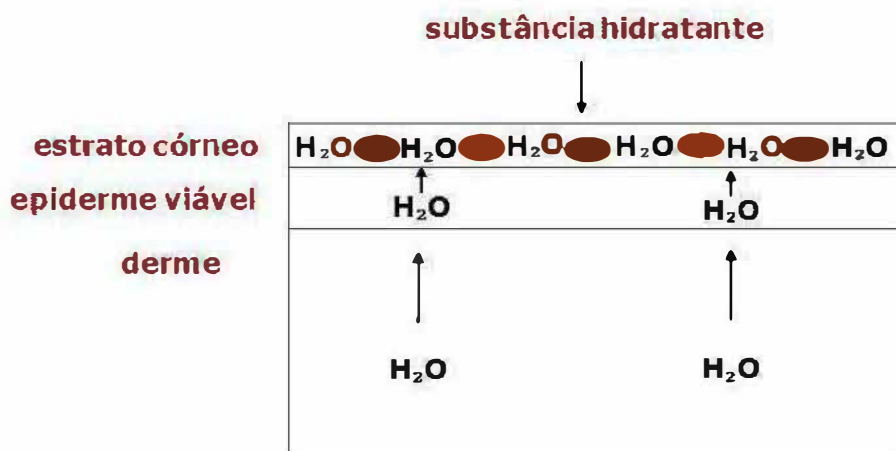


Figura 4.15 – Representação Esquemática do Mecanismo de Hidratação da Pele por Umectação Ativa (adaptado de Ribeiro *et al*, 2006)¹²⁸.

4.4. ÁCIDO HIALURÔNICO

4.4.1. Estrutura Química e Propriedades Físico-Químicas

O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo linear não ramificado pertencente à família dos glucosaminoglicanos (GAGs) não sulfatados (não possui em sua estrutura o ânion SO_3^{-2}) e não faz ligações covalentes com proteínas. Em condições fisiológicas, essa macromolécula comporta-se como um polieletrólito aniônico. O valor de pK_a do AH é igual a 2,9. Quimicamente, é um copolímero alternado composto por unidades dissacarídicas repetidas de ácido *D*-glucurônico (GlcA) e *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) unidas entre si por ligações glicosídicas β (1→3) e β (1→4)¹²⁹.

A descrição molecular da estrutura tridimensional do AH em solução fisiológica é fundamental para a compreensão de suas funções biológicas. Dessa forma, os modelos existentes para a descrição da estrutura química do AH procuram mimetizar seu comportamento em solução aquosa. Nesses últimos 50 anos, técnicas físicas como medidas de viscosidade, espalhamento de luz e microscopia eletrônica foram utilizadas para tal fim. Ademais, com a utilização das técnicas de cristalografia de raios X, espectroscopias de ressonância magnética nuclear (RMN) e Raman, além dos métodos computacionais como simulações de dinâmica molecular, numerosas investigações a respeito das estruturas apresentadas pelo ácido hialurônico em solução aquosa estão sendo mais bem elucidadas^{13,130}.

De acordo com a literatura, o AH possui três diferentes arranjos estruturais semelhantes aos das proteínas: arranjo primário (estrutura primária), arranjo secundário (estrutura secundária) e arranjo terciário (estrutura terciária), conforme representado nas Figuras 4.16 e 4.17.

A estrutura primária (Figura 4.16a) do polissacarídeo compreende as ligações glicosídicas β (1→3) e β (1→4) entre as unidades dissacarídicas GlcA e GlcNAc¹³¹. Para a descrição da estrutura secundária do AH em solução (Figuras 4.16b e 4.16c), três modelos são propostos^{132,133}:

i) modelo em solução de dimetilsulfóxido (DMSO): envolve as ligações de hidrogênio intramoleculares entre os grupos *N*-acetila e carboxilato adjacentes na cadeia polimérica. Este modelo serviu de base para a elaboração dos modelos seguintes.

ii) modelo em solução aquosa: nesta situação, as ligações de hidrogênio intramoleculares entre os grupos *N*-acetila e carboxilato adjacentes na cadeia do AH são substituídas pelas ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e os grupos citados.

iii) o modelo que envolve simulações de dinâmica molecular: para este modelo é sugerido que várias conformações sofrem rápidas flutuações ocasionadas pelo intercâmbio (troca) de fracas e transientes (de curta duração) ligações de hidrogênio intramoleculares envolvendo moléculas de água e os grupos *N*-acetila e carboxilato.

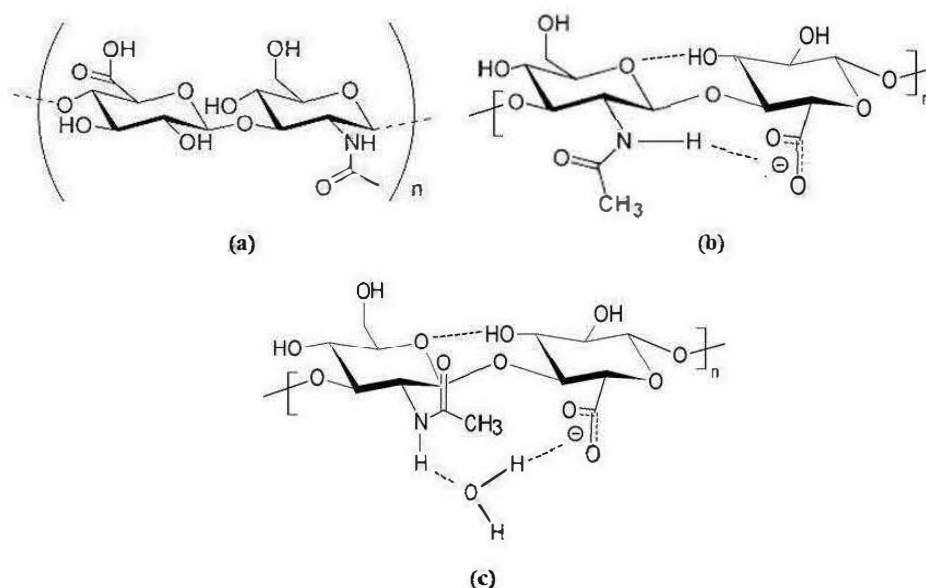


Figura 4.16 – Fórmula Estrutural do Ácido Hialurônico: (a) estrutura primária; (b) e (c) estrutura secundária: (b) modelo em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) e (c) modelo em solução aquosa (adaptado de Scott, 1984 e Heatley, 1988)^{132,133}.

A estrutura terciária do AH (Figura 4.17), é fortemente dependente do meio (nível de hidratação, ambiente iônico e temperatura) o que conduz a diferentes conformações com pequenas diferenças de energia livre. Portanto, a hipótese mais aceita para o arranjo terciário em solução aquosa é a da agregação intermolecular^{129,134,135}. Neste caso, as cadeias de AH interagem (agregam-se) entre si através de fracas interações intermoleculares envolvendo os seus centros hidrofóbicos (átomos de hidrogênios axiais) e de ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e os grupos *N*-acetila e carboxilato. Assim, a estrutura tridimensional do AH, representada pela estrutura terciária, é formada por duas cadeias antiparalelas que se enovelam originando uma estrutura de *fita torcida*^{134,135}. A presença das ligações de

hidrogênio intermoleculares permite a estabilização da estrutura. Como resultado desta agregação intermolecular, há a formação de redes poliméricas de AH.

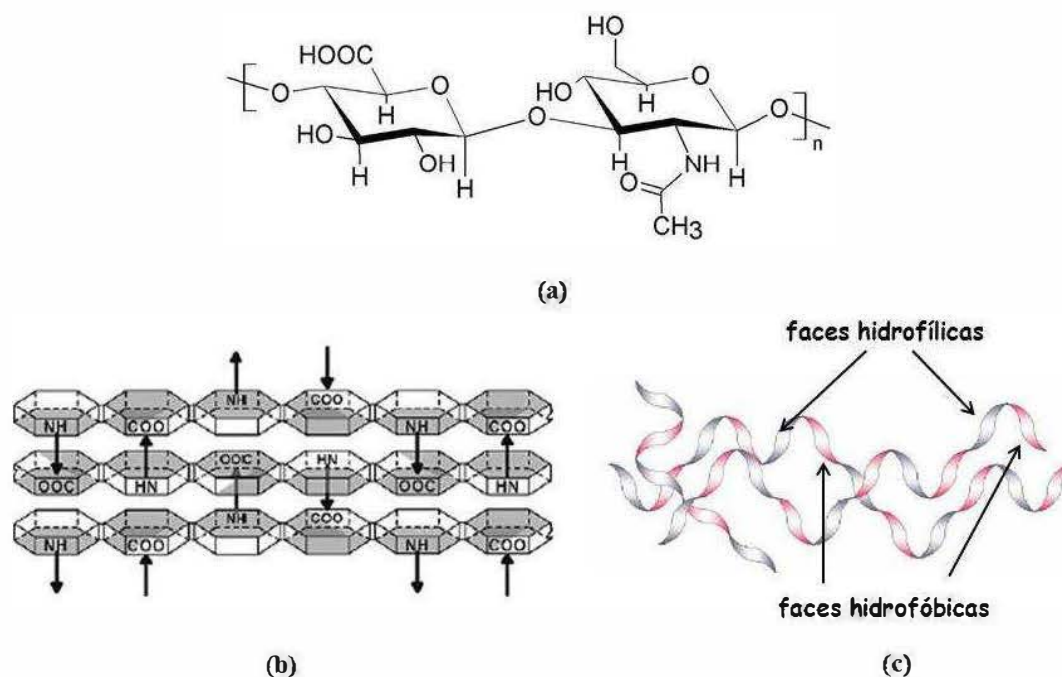


Figura 4.17– Fórmula Estrutural do Ácido Hialurônico: (a) representação estrutural contendo átomos de hidrogênios axiais (H) responsáveis pela formação dos centros hidrofóbicos da macromolécula; (b) e (c) estrutura terciária do ácido hialurônico em solução aquosa: (b) representação das interações intermoleculares entre os centros hidrofóbicos (manchas em cinza) e de ligações de hidrogênio intermoleculares (indicado pelas setas) envolvendo as moléculas de água e os grupos *N*-acetila e carboxilato, e (c) estrutura de *fita torcida* (adaptado de Scott, 2002 e Kablic, 2009)^{134,135}.

Em relação às propriedades físico-químicas, o AH em solução aquosa possui um comportamento *não ideal*. O biopolímero, segundo o modelo *random coil*, comporta-se como um novelo aleatório o qual é constituído por segmentos rígidos emaranhados e segmentos conectados. Em soluções diluídas, os segmentos conectados atuam em oposição ao enrijecimento da cadeia de AH devido à geração de domínios moleculares de AH hidratados cujo efeito é o aumento na flexibilidade da cadeia polimérica e no grau de hidratação do biopolímero. Logo, quanto maior a hidratação, maior a expansão e volume hidrodinâmico da cadeia polimérica. Em soluções concentradas, os segmentos rígidos emaranhados encontram-se interligados formando soluções viscoelásticas. Concomitantemente, os segmentos

conectados podem conduzir à formação de uma rede polimérica tridimensional e, como consequência, à de géis¹³⁶.

4.4.2. Funções Biológicas

Segundo Cowman¹³⁷ e Boeriu¹³⁸ as funções biológicas do ácido hialurônico são fortemente dependentes da estrutura terciária do biopolímero e massa molar. O AH de alta massa molar ($M_w > 500.000 \text{ g mol}^{-1}$) por possuir alta viscoelasticidade, é um componente fundamental para preenchimento de volume e lubrificação das cartilagens e tendões o que contribui para a manutenção da elasticidade e resistência dos órgãos às tensões externas. Além disso, neste tamanho de cadeia, o biopolímero é antiangiogênico e imunossupressor. O AH de média massa molar ($M_w \sim 20.000-100.000 \text{ g mol}^{-1}$) está envolvido nos processos de ovulação, embriogênese e reparo de feridas. Por outro lado, o AH de baixa massa molar ($M_w \sim 6.000-20.000 \text{ g mol}^{-1}$) é um agente imunoestimulante, angiogênico enquanto oligômeros com $M_w \sim 400-4.000 \text{ g mol}^{-1}$ são anti-apoptóticos e indutores de choque térmico em proteínas.

Na pele, o ácido hialurônico está distribuído na epiderme (camada basal) e matriz extracelular da derme (entre as fibras colágenas e a elastina). Desempenha as funções de hidratação do estrato córneo¹³⁹, pois atua na função de barreira da epiderme onde estimula a expressão das proteínas componentes das junções intercelulares, minimizando a *TEWL*; citoestimulação celular^{140,141}, onde através das interações com receptores de membrana específicos, como o CD44, promove sinalização com consequente proliferação dos queratinócitos, o que resulta na renovação celular e epidérmica; hidratação da derme¹⁴², pois a macromolécula faz interações iônicas e ligações de hidrogênio com moléculas de água onde preenche os espaços intercelulares da derme atuando como reservatório aquoso; e aumento da firmeza e elasticidade da pele uma vez que o AH estimula a síntese de colágeno I¹⁴³.

4.4.3. Fontes de Obtenção

A primeira evidência referente à existência do ácido hialurônico em organismos vivos data de 1880, quando Portes, um químico francês, observou diferenças no comportamento da mucina do humor vítreo humano em comparação ao da córnea e cartilagem. Em 1934, o

glucosaminoglicano foi extraído a primeira vez do humor vítreo bovino pelos farmacêuticos alemães Meyer e Palmer. Posteriormente, tal composto foi denominado “*ácido hialurônico*”. O nome derivou de hialóide (vitreous) + ácido urônico¹⁴⁴.

Visto que é um componente universal da matriz extracelular dos vertebrados, altas concentrações de ácido hialurônico são encontradas na crista de frango, cordão umbilical, fluido sinovial e humor vítreo ocular¹⁴⁵. Na espécie humana, a nível celular, o ácido hialurônico é sintetizado na membrana plasmática de queratinócitos da epiderme, fibroblastos da derme, ovócitos e células sinoviais apresentando biocompatibilidade com diferentes espécies uma vez que sua estrutura química é invariável. Ele é encontrado no líquido sinovial das articulações (3.500 mg/mL), humor vítreo ocular (200 mg/mL) e nos tecidos cartilaginoso (1.200 mg/kg), pulmonar (150 mg/kg) e cutâneo (200 mg/kg).

Nos microorganismos, está presente nas cápsulas de cepas de bactérias do gênero *Streptococcus*, mas ausente em fungos, plantas e insetos. Industrialmente, é produzido por extração de tecidos proveniente do humor vítreo bovino, da crista de frango¹⁴⁶ e por avançadas metodologias biotecnológicas, tais como a fermentação bacteriana e a síntese controlada (*in vitro*) via catálise enzimática^{138,147}. Dentre as vantagens da obtenção do ácido puro por extração de tecidos, temos o baixo custo e a alta massa molar que é produzida. Dentre as desvantagens, temos o baixo rendimento e a necessidade de purificação laboriosa, uma vez que esse produto encontra-se misturado com mucopolissacarídeos, proteínas e vírus. Em contrapartida, a produção industrial de ácido hialurônico por fermentação bacteriana ou catálise enzimática tem o benefício de um maior controle das características do biopolímero produzido, o que ocasiona a obtenção de rendimentos superiores de material formado, massas molares de menor tamanho de cadeia; e, principalmente, a redução dos riscos de contaminação do organismo humano por microorganismos, vírus e/ou substâncias patogênicas.

4.4.4. Aplicações

Por apresentar biocompatibilidade e propriedades não imunogênicas, o ácido hialurônico proveniente de bactérias é utilizado na oftalmologia¹⁴⁸, onde atua como um substituto para o humor vítreo perdido durante os procedimentos cirúrgicos da catarata ou implante de lentes de contato; na ortopedia¹⁴⁹, onde propicia redução dos sintomas da

osteoartrite devido a capacidade de lubrificação, preenchimento e preservação das articulações; otorrinolaringologia¹⁵⁰, onde proporciona a manutenção e integridade das ações vibratórias das cordas vocais durante a fonação, pois tem a propriedade de absorção de choque; e na farmacologia¹⁵¹, onde atua na formação de microcápsulas para encapsulamento e liberação de ativos farmacêuticos específicos, neste caso, o ácido puro pode ser utilizado como veículo (carreador) de fármacos.

4.4.4.1. O Ácido Hialurônico na Dermatologia e Cosmetologia

Segundo o FDA (*Food and Drug Administration*), a partir de 1996, o AH foi reconhecido como substância absorvível e recomendado para uso dermatológico e cosmético¹⁵². Na Dermatologia, o AH pode ser aplicado topicamente para o tratamento de cicatrização de feridas na pele. Hidrogéis de alginato/ácido hialurônico foram preparados em diferentes proporções para uso como curativos tendo vista a reparação de ferimentos da derme. A atividade *in vitro* dos curativos foi avaliada em uma linhagem celular de queratinócitos. Neste caso, observou-se que os hidrogéis de alginato contendo ácido hialurônico promoveram significativamente o fechamento do *gap*, em comparação com os hidrogéis sem o ácido hialurônico ($p < 0,001$). Estudos *in vivo* foram realizados em um modelo de rato onde a ferida foi excisada. Após 5 dias, os hidrogéis com ácido hialurônico conduziram significativamente ao fechamento da ferida, em comparação com aqueles sem o ácido hialurônico ($p < 0,001$)¹⁵³.

De acordo com a literatura, existem alguns métodos invasivos para aplicação de ácido hialurônico injetável na pele com a finalidade de retardar os efeitos do envelhecimento¹⁵⁴. Nestes métodos são utilizados os preenchedores faciais de AH, géis de AH injetáveis que preenchem os sulcos existentes na face, o que confere a ela maciez, elasticidade, tonicidade além da minimização das linhas de expressão, rugas e cicatrizes. Dentre as vantagens para a utilização do AH em relação ao colágeno, há a praticidade da aplicação do gel sem a necessidade de teste cutâneo e resistência à degradação por enzimas ou radicais livres.

Hylaform® produzido pela Genzyme é um exemplo de gel de AH injetável de origem animal encontrado no mercado. Apresenta um mínimo risco de reações alérgicas, porém com curta duração de efeito. Para o gel apresentar biocompatibilidade e risco mínimo de degradação com os tecidos humanos, o AH deve ser produzido com tecnologia que minimize

a presença de hialuronidasas, endotoxinas e proteínas bacterianas no produto final. As quantidades máximas de endotoxinas e proteínas permitidas pela farmacopéia européia devem ser, respectivamente, 12,5 EU/g e 5 µg/g. Contudo, os valores de endotoxinas bacterianas a serem utilizados devem ser baixos (< 0,2 EU/g). Diante disso, a Medicis Pharmaceutical Corporation produziu o Restylane®, primeiro gel injetável de origem não animal¹⁵²⁻¹⁵⁵.

Na Cosmetologia, géis para aplicação tópica são utilizados no tratamento cosmético da pele envelhecida. Como exemplo, há o Hyaxel® produzido pela Exsymol Sam¹⁵⁶. É um composto de baixa massa molar vetorizado pelo Silício Orgânico, elemento encontrado no tecido conjuntivo humano que atua como “vetor biológico” cuja função é estimular a produção de colágeno. Dentre as atribuições deste produto, têm-se a renovação epidérmica e hidratação.

No campo científico, a preparação de formulações que otimizam a penetração de ácido hialurônico através da pele estão sendo estudados. Soluções aquosas contendo AH reticulado ($M_w \sim 1.000-200.0000 \text{ g mol}^{-1}$)¹⁵⁷ foram solubilizadas em mistura de diferentes solventes em água (etilenoglicol 400, propileno ou butilenoglicol em água e acetato de isopropila ou acetato de alquila de cadeia curta em água), Tween 20, ácidos biliares, glicerol e EDTA e posteriormente encapsuladas em micelas de fosfolipídeos como a esfingosina. O objetivo foi a aquisição de uma formulação tópica estável e cosmeticamente eficaz para os cuidados da pele envelhecida. Tal formulação consistiu em um novo sistema de liberação tópica composto por uma agregação de micelas mistas com tamanhos de partícula entre 1 e 10 nm (para partículas menores) e maior que 100 nm (para partículas maiores). Para a aquisição de uma penetração mais eficiente das macromoléculas de AH encapsuladas através dos poros da pele, preparou-se micelas mistas com tamanhos de partícula menores que o tamanho dos poros cutâneos. Neste caso, foram utilizadas as micelas mistas com tamanhos de partícula descritas acima. Assim, as formulações preparadas ofereceram aumento da biodisponibilidade do ativo através da pele.

Shokri e colaboradores¹⁵⁸ prepararam formulações de AH para uso tópico utilizando os solventes, água deionizada, álcool isopropílico, propilenoglicol, acetato de etilo, tetraidrofurano, dimetilsulfóxido ou parafina líquida e agentes tensoativos convencionais laurilsulfato de sódio, Tween 80, glicina ou albumina como promotores de penetração dérmica do glucosaminoglicano. Os experimentos de liberação *in vitro* de HA foram realizados em uma célula de difusão a 32 °C contendo pele de frango como modelo. O

período de análise quantitativa das amostras contendo AH foi de 1,5 ou 12 h. Entre os promotores usados, o solvente glicerol e o agente tensoativo Tween 80 foram mais eficazes para penetração do AH. Após 1,5 e 12 horas, a quantidade máxima de HA liberado nas formulações com glicerol foi de 57,3 e 70,6 mg, respectivamente.

4.5. QUITOSANA

4.5.1. Estrutura Química e Propriedades Físico-Químicas

A quitina é um polissacarídeo linear não ramificado encontrado no exoesqueleto de crustáceos (camarões, caranguejos, lagostas entre outros), artrópodes (insetos) e alguns fungos¹⁵⁹. Quimicamente, é um homopolímero constituído por unidades de *N*-acetilglucosamina unidas por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4) (Figura 4.18a). Após a celulose, é considerado o segundo biopolímero natural mais abundante no mundo.

O produto da reação de desacetilação alcalina total ou parcial da quitina origina a quitosana, um copolímero de cadeia linear composto por unidades de *N*-acetilglucosamina e *D*-glucosamina unidas por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4) (Figura 4.18b). Neste caso, a composição da quitosana varia em função do Grau de Acetilação (GA) e o parâmetro utilizado para definição do GA é o conteúdo médio de unidades de *N*-acetilglucosamina presentes na quitina. Assim, a quitina com $GA \leq 50\%$ é denominada quitosana^{160,161}.

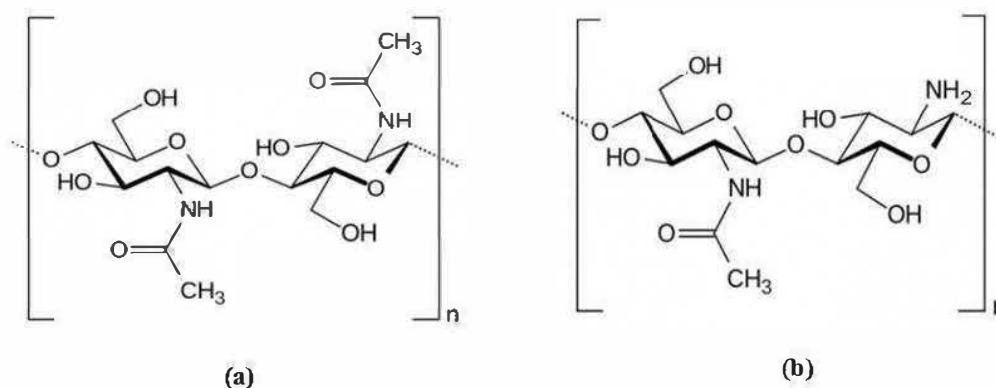


Figura 4.18 – Fórmula Estrutural dos Polissacarídeos: (a) quitina e (b) quitosana (adaptado de Quitina: a molécula da semana, 2015)¹⁶².

A quitosana é um hidrocoloide insolúvel em água, solventes orgânicos e bases, mas é solúvel na maioria das soluções aquosas de ácidos orgânicos e inorgânicos com pH inferior a 6,0. Neste meio ácido, o biopolímero comporta-se como um polieletrólito catiônico e o valor de pK_a varia de 6,3 a 7,2 dependendo do GA^{163,164}. Dessa forma, pode-se afirmar que as propriedades físico-químicas da quitosana em solução aquosa são fortemente dependentes do grau de acetilação^{165,166} e da massa molar¹⁶⁷ do biopolímero. Estes parâmetros podem variar segundo a fonte de aquisição e procedimento de preparação do polissacarídeo. Neste caso, a massa molar da quitosana pode ser classificada em biopolímero de baixa massa molar ($M_w \sim 80.000-110.000 \text{ g mol}^{-1}$), média massa molar ($M_w \sim 120.000-150.000 \text{ g mol}^{-1}$) e alta massa molar ($M_w > 150.000 \text{ g mol}^{-1}$)¹⁶⁸. Comercialmente, encontra-se quitosana com GA entre 5 e 30%¹⁶⁹ e massa molar na faixa de $100.000-1.000.000 \text{ g mol}^{-1}$.

Em pH fisiológico, apresenta carga global positiva, isto é, carga positiva atribuída à presença de grupos amino na cadeia polimérica enquanto a maioria dos hidrocoloides, nas mesmas condições, possui carga global negativa, atribuída à presença de grupos negativamente carregados. Como polication, a quitosana pode formar complexos através de interações eletrostáticas com grupos negativamente carregados como ânions e poliânions. Ademais, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas tais como forças de Van der Waals podem ser realizadas com proteínas e fármacos diversos¹⁷⁰.

A quitosana, assim como a maioria dos polissacarídeos, possui alta reatividade química que é atribuída à presença dos grupos hidroxila e amino em sua estrutura. Estes grupos são capazes de promover modificações químicas na estrutura do biopolímero, com objetivo de aumentar as potencialidades da quitosana como biomateriais. Entre as reações mais utilizadas para tal fim, há a acilação¹⁷¹, alquilação¹⁷², carboxialquilação¹⁷³, entre outras.

4.5.2. Fontes de Obtenção

A quitosana foi obtida pela primeira vez em 1859 por Rouget, através do tratamento da quitina com uma solução de KOH. Ao contrário da quitina, o produto obtido deste tratamento era solúvel em ácidos orgânicos. Assim, este novo produto foi denominado *quitina modificada* por Rouget. Em 1894, a *quitina modificada* foi reconhecida como *quitosana* por Hoppe - Seyler.

Industrialmente, a quitosana é obtida a partir da desacetilação total ou parcial da quitina através de hidrólise alcalina, geralmente com NaOH (40 - 50% m/m) a 110 - 115°C ou enzimática na presença da enzima quitina desacetilase. Para um GA de 40%, há a solubilização do biopolímero em soluções ácidas diluídas¹⁷⁴.

Atualmente, há uma grande tendência de reaproveitamento dos rejeitos da indústria pesqueira tais como, carapaça de caranguejos, camarões, lagostas e *krills* para a produção comercial da quitina e quitosana. O descarte inadequado destes rejeitos é um dos principais fatores de poluição das zonas costeiras, portanto a reutilização destes resíduos é um alternativa para contribuição na resolução dos impactos ambientais decorrentes do uso inapropriado das sobras industriais^{175,176}.

4.5.3. Aplicações

A quitosana é um polímero de origem natural e não tóxico cujas características possibilitam a biocompatibilidade do biopolímero com os diferentes organismos. Neste cenário, a quitosana apresenta propriedades atrativas para uso como biomaterial, pois pode ser processada em diversas formas físicas, tais como, esferas¹⁷⁷ fibras¹⁷⁸ e filmes¹⁷⁹ devido à solubilidade do polissacarídeo em solução aquosa ácida. Essas diferentes formas apresentadas pela quitosana, conhecidas por hidrogéis, permitem a utilização do biopolímero em inúmeras áreas de aplicação: na agricultura, como micro- ou nanoesferas contendo fungicida para o controle de doenças das plantas¹⁸⁰; na indústria de alimentos, como filmes para revestimento de sementes e alimentos¹⁸¹; no tratamento de água, como filmes com propriedades adsorventes de íons metálicos para remoção de metais pesados¹⁸²; na biotecnologia, como nanofibras para inibição do crescimento das células bacterianas¹⁸³ e anticoagulação do sangue¹⁸⁴; na engenharia de tecidos, como filmes curativos para cicatrização de feridas¹⁸⁵ e pele artificial¹⁸⁶; na cosmetologia, como matéria-prima na preparação de xampus e condicionadores para tratamento de cabelos¹⁸⁷.

4.5.3.1. Filmes porosos de quitosana como sistema matricial para liberação de ativos cosméticos

Teoricamente, em filmes porosos¹⁸⁸ de quitosana dispostos na forma farmacêutica de matriz (forma física onde o ativo é dissolvido ou disperso uniformemente), parâmetros físico-químicos como porosidade e tamanho de poros dos filmes determinam a extensão do grau de intumescimento e taxa de liberação do ativo a partir de tal. Após a exposição de uma matriz polimérica ao meio biológico, há absorção e retenção de fluidos biológicos pelo filme devido ao aumento na distância entre as cadeias poliméricas. Como consequência, há o intumescimento da matriz e liberação do ativo em direção ao meio biológico. Adicionalmente, os sistemas matriciais dependem do processo de dissolução (degradação) das cadeias poliméricas do filme para a ocorrência da liberação¹⁹⁰. Em tais sistemas, a difusão é o processo predominante no que concerne aos estudos de intumescimento e liberação de ativos farmacêuticos de uma matriz polimérica. Neste caso, a distribuição da concentração de soluto (ativo) no filme (C_s) tem dependência temporal (t) e espacial (x) e é descrita conforme a 2ª Lei de Fick¹⁸⁹⁻¹⁹¹:

$$\frac{\partial C_s}{\partial t} = D_s \frac{\partial^2 C_s}{\partial x^2} \quad (\text{eq. 4.1})$$

onde D_s é equivalente ao coeficiente de difusão do soluto no filme. Em outras palavras, a 2ª Lei de Fick enuncia que a liberação de solutos dos dispositivos de liberação matricial é dependente do tempo.

Neste contexto, os filmes de quitosana, assim como as matrizes de hidrogel em geral, podem ser classificados em quatro classes: não porosos, microporosos, macroporosos e superporosos. De acordo com Lowman¹⁹² e Peppas¹⁹³, matrizes de hidrogel não porosas têm diâmetro de poros (d_p) igual ao comprimento de correlação macromolecular, ζ (10-100 Å). As cadeias poliméricas são densamente compactadas e o transporte do soluto é determinado por difusão através do volume livre do polímero. Por conseguinte, a relação entre o coeficiente de difusão do soluto no filme ($D_{2,13}$) e o coeficiente de difusão do soluto no solvente puro ($D_{2,1}$) está relacionada com o grau de intumescimento do filme (H) segundo a equação abaixo:

$$\frac{D_{2,13}}{D_{2,1}} = \varphi(q_s) \exp \left[-B \left(\frac{q_s}{V_f} \right) \left(\frac{1}{H} - 1 \right) \right] \quad (\text{eq. 4.2})$$

onde os subscritos 1, 2 e 3 representam, respectivamente, a água, soluto e o polímero; V_f , o volume livre; λ , o fator de peneiramento o qual fornece o tamanho da rede que impede a passagem de soluto através de uma determinada área de seção transversal q_s ; e B , um parâmetro característico do polímero.

Nas matrizes de hidrogel microporosas, o d_p é próximo ao diâmetro do soluto, d_h (100-1000 Å)^{192,193}. Neste caso, o intumescimento e liberação do ativo da matriz polimérica, são decorrentes de processos combinados que envolvem o transporte do soluto e água dentro dos poros, tais como a difusão e convecção. A razão entre o coeficiente de difusão do soluto no filme e no solvente puro (D_{ip}/D_{iw}) é definida segundo a equação a seguir:

$$\frac{D_{ip}}{D_{iw}} = (1 - \lambda^2) (1 - 2,104 \lambda + 2,09 \lambda^3 - 0,95 \lambda^5) \quad (\text{eq. 4.3})$$

onde λ é a razão entre d_h e d_p .

Matrizes de hidrogel macroporosas possuem valores de d_p superiores a d_h e que variam de 0,1 a 1,0 μm ^{192,193}. O intumescimento e liberação do ativo da matriz polimérica é resultado de processo de difusão de água dentro dos poros. Diante disso, o coeficiente de difusão efetiva do soluto no filme (D_{eff}) está relacionado com D_{iw} , de acordo com a equação abaixo:

$$D_{eff} = D_{iw} \frac{\kappa_p}{\tau} \varepsilon \quad (\text{eq. 4.4})$$

onde κ_p , ε e τ são, respectivamente, o coeficiente de equilíbrio de partição do soluto, a porosidade da rede polimérica (medida do volume dos poros) e a sinuosidade (geometria dos poros).

Por sua vez, nas matrizes de hidrogel superporosas, os valores de d_p são superiores a 1,0 μm ¹⁹³. A maior parte dos poros são esféricos e interligados o que originam uma estrutura aberta conhecida por capilar¹⁹⁴. Devido à capilaridade dos poros, há uma maior absorção de

água na estrutura porosa da matriz polimérica, o que resulta em maior intumescimento e liberação do ativo contida em tal.

Em princípio, a preparação de filmes porosos de quitosana ocorre através de processo de separação de fases na solução polimérica^{195,196}. Entre os diferentes métodos de separação de fases, há a separação de fases por indução térmica, por *casting* de uma solução polimérica, por precipitação de polímero de uma fase vapor e por imersão-precipitação (Figuras 4.19 e 4.20).

a) separação de fases por indução térmica: este método fundamenta-se no princípio físico-químico de que a solubilidade de um solvente em uma solução diminui com a redução da temperatura. Neste caso, o solvente pode ser removido por processos de extração, evaporação ou liofilização. No processo de liofilização, matrizes porosas poliméricas são obtidas de modo que a porosidade e distribuição do tamanho dos poros nos filmes são dependentes, respectivamente, da concentração e temperatura de resfriamento da solução polimérica. Inicialmente, a solução é resfriada até a temperatura em que todos os seus componentes encontrem-se no estado sólido. Em seguida, os cristais de gelo oriundos da cristalização do solvente induzem à agregação das cadeias poliméricas nos espaços intersticiais das matrizes. Posteriormente, o solvente é removido por sublimação o que origina um filme com estrutura porosa interligada.

b) separação de fases por casting de uma solução polimérica: neste processo, o polímero é dissolvido em uma mistura de um solvente volátil e de um não solvente menos volátil. A separação de fases e formação de poros ocorre durante a evaporação do solvente. No processo de *casting* com lixiviação de partículas de sal, a solução polimérica é dispersa uniformemente em um molde (placa de Petri) contendo partículas de sal (agente de porosidade) de um diâmetro específico. O solvente é evaporado o que resulta em uma matriz polimérica com partículas de sal inserida em seus interstícios. Em seguida, o filme é imerso em água, e o agente de porosidade é lixiviado o que resulta em um filme de estrutura porosa.

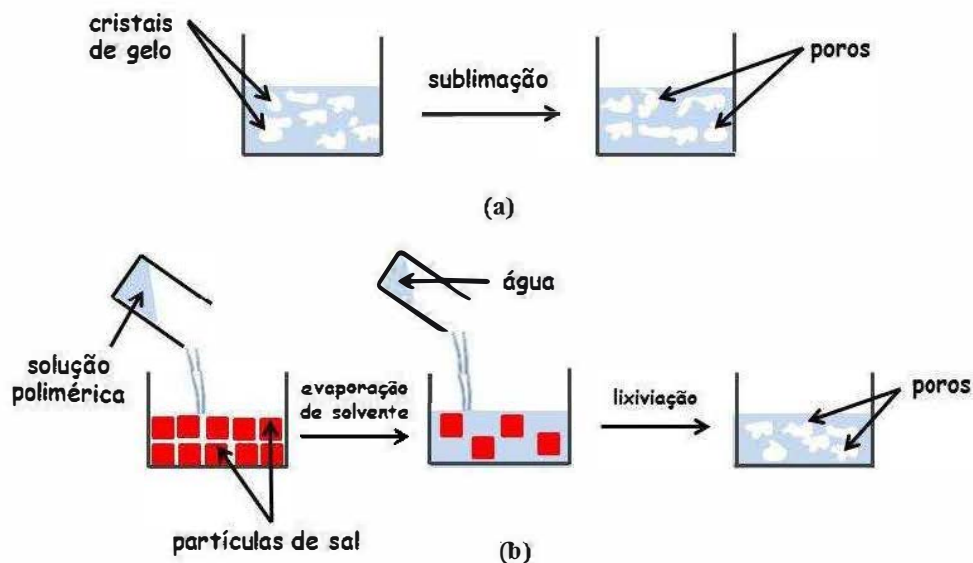


Figura 4.19 – Representação Esquemática dos Processos de Preparação de Filmes Porosos de Quitosana: (a) separação de fases por indução térmica e (b) separação de fases por *casting* de uma solução polimérica (adaptado de Puppi *et al*, 2010)¹⁹⁷.

c) separação de fases por precipitação de polímero de uma fase vapor: neste processo, a separação de fases e geração de poros na solução polimérica é induzida pela penetração de vapor de não solvente em tal meio. O mecanismo de formação de poros a partir da geração de bolhas de gás consiste em três etapas: (1) formação de solução polímero/gás, (2) nucleação dos poros, e (3) crescimento dos poros e redução da densidade do polímero. A solução polímero/gás é oriunda da saturação da solução polimérica com $\text{CO}_{2(g)}$ de alta pressão (800 psi). Com a redução da pressão do gás até à temperatura ambiente, há origem de uma instabilidade termodinâmica cujo efeito é a nucleação e crescimento dos poros o que ocasiona a separação de fases na solução polimérica com a precipitação do polímero. Por sua vez, o crescimento dos poros reduz a densidade do polímero. Este método possui a vantagem de ser um processo isento de solvente orgânico, porém a desvantagem é a formação, na maior parte, de filmes com poros não ligados e superfície externa não porosa.

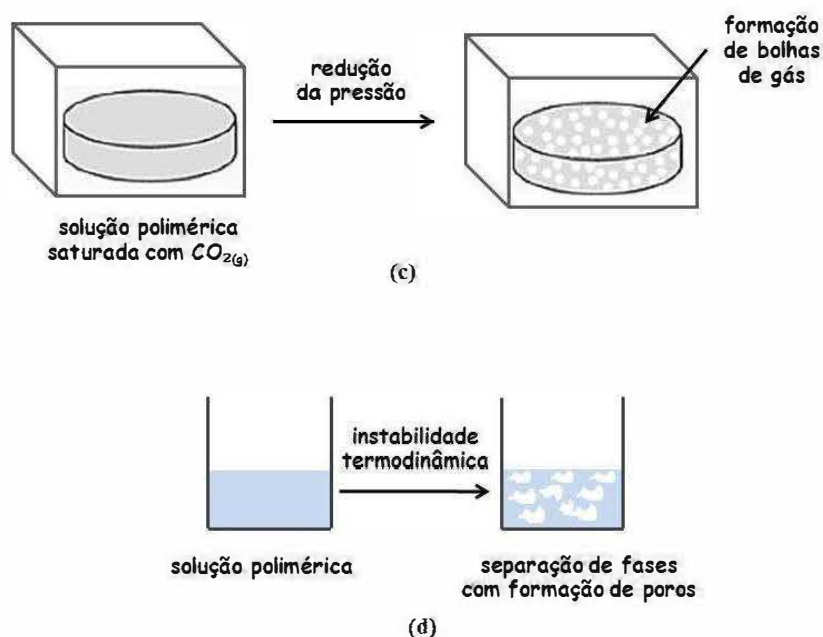


Figura 4.20 – Representação Esquemática dos Processos de Preparação de Filmes Porosos de Quitosana: (c) separação de fases por precipitação de polímero de uma fase vapor e (d) separação de fases por imersão-precipitação (adaptado de Puppi *et al*, 2010)¹⁹⁷.

d) separação de fases por imersão-precipitação: semelhante ao processo anterior, a separação de fases e geração de poros é resultado de uma instabilidade termodinâmica induzida em uma solução polimérica. No método de separação de fases por imersão-precipitação, a solução polimérica é dispersa uniformemente em um molde e subsequentemente imersa em um não solvente até a ocorrência da separação das fases com a precipitação do polímero. Durante esse processo, uma separação de fase líquido-líquido ocorre à medida que o bom solvente na solução polimérica é substituído pelo não solvente. Neste caso, há formação de uma fase rica em polímero e uma fase pobre em polímero, que é removida originando os poros nos filmes.

Biopatches porosos de quitosana-prata¹⁹⁸ foram preparados por liofilização com o objetivo de obter um sistema de liberação transdérmica de fármacos com propriedades físico-químicas, morfologia, resistência mecânica, hidrofiliabilidade e eficiência na liberação de fármacos (rodamina B), otimizadas em comparação aos *biopatches* de quitosana tradicionais. Para isso, foram preparadas soluções de quitosana em diferentes concentrações de nitrato de prata contendo borohidreto de sódio a 0,003% (m/v). Estas soluções originaram os filmes porosos de quitosana-prata. Verificou-se que a composição com 3% (m/v) de nitrato de prata e 0,003% (m/v) de borohidreto de sódio resultou em filmes de quitosana com maior

hidrofilicidade e resistência mecânica. Morfologicamente, os *biopatches* apresentaram poros de menor diâmetro e estrutura aberta o que corrobora com o valor superior referente à velocidade de liberação de rodamina B.

Biopatches medicinais de quitosana e hidroxipropilmetilcelulose contendo plastificante glicerol foram preparados por *casting* com a finalidade de avaliar as propriedades físico-químicas, conteúdo de umidade, razão de inchamento e porosidade¹⁹⁹. Adicionalmente, foram realizados ensaios de permeação *in vitro* do composto ativo do óleo de *Zingiber cassumunar*, *E-4-(3',4' dimetóxifenil)-but-3-en-1-ol*, através de um modelo de pele de porco. A adição do óleo de *Zingiber cassumunar* nas misturas de quitosana/hidroxipropilmetilcelulose/glicerol não promoveu alterações significativas nos valores de conteúdo de umidade, razão de inchamento e porosidade. Entretanto, observou-se que tais propriedades tiveram efeito significativo no perfil de liberação do composto ativo. Tal fato é confirmado pela presença do fármaco na pele de porco recém-nascido.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. PREPARAÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANA

O procedimento utilizado para preparação dos filmes de quitosana foi a técnica de *casting* (evaporação de solvente, sendo este a água) e o detalhamento da preparação de cada amostra estão apresentados a seguir. Todos os filmes preparados, após a evaporação de solvente, foram acondicionados para posterior caracterização físico-química.

5.1.1. Materiais

Para a preparação dos filmes de quitosana, foram utilizados os materiais a seguir: quitosana em pó de alta massa molar ($M_w = 340.000 \text{ g mol}^{-1}$) com grau de acetilação (GA = 25%) (Aldrich S. A); ácido acético ($M = 60,04 \text{ g mol}^{-1}$), massa específica ($\rho = 1,05 \text{ g cm}^{-3}$) (Nuclear); hidróxido de sódio ($M = 40 \text{ g mol}^{-1}$, $\rho = 2,13 \text{ g cm}^{-3}$) (Nuclear); carbonato de sódio ($M = 106 \text{ g mol}^{-1}$, $\rho = 2,54 \text{ g cm}^{-3}$) (Nuclear); ácido cítrico ($M = 192,12 \text{ g mol}^{-1}$, $\rho = 1,66 \text{ g cm}^{-3}$) (Farmaquímica); acetato de sódio ($M = 82,03 \text{ g mol}^{-1}$, $\rho = 1,53 \text{ g cm}^{-3}$) (Fmaia); citrato de sódio ($M = 258,03 \text{ g mol}^{-1}$, $\rho = 1,76 \text{ g cm}^{-3}$) (Synth) e glicerol ($M = 92,09 \text{ g mol}^{-1}$, $\rho = 1,26 \text{ g cm}^{-3}$) (Synth). Para as técnicas de caracterização, foi utilizado heptano ($M = 150 \text{ g mol}^{-1}$, $\rho = 1,68 \text{ g cm}^{-3}$) (Nuclear). Todos os reagentes obtidos foram utilizados conforme recebidos sem purificação posterior. Para todos os procedimentos foi empregada água deionizada.

5.1.2. Métodos

5.1.2.1. Preparação dos filmes de quitosana em solução aquosa de ácido acético ou ácido cítrico, NaOH:Na₂CO_{3(aq)} como agente neutralizante e glicerol como plastificante

Inicialmente, soluções de quitosana a 1,1; 1,5 e 1,7% (m/v) foram preparadas em ácido acético_(aq) 0,09 M e mantidas em agitação magnética durante 48 h. Após este período, alíquotas de 20 mL de cada solução filmogênica formada foram vertidas em placas de Petri (85 mm de diâmetro) e submetidas à secagem em estufa a 50 °C por 3 h e secagem em

condições ambientais ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa, $UR = 60\%$) até os filmes desprenderem-se da superfície da placa. Estas amostras constituíram os filmes não neutralizados. Cada uma destas amostras foram imersas em solução de $\text{NaOH}:\text{Na}_2\text{CO}_3$ (1:0,01) e (1:0,05) M, pH 9,0 por 24 h e 48 h para obtenção de filmes neutralizados. Em seguida, os filmes neutralizados foram lavados com água deionizada por 3 vezes e secos a $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$. O esquema utilizado para a preparação dos filmes está representado na Figura 5.1.

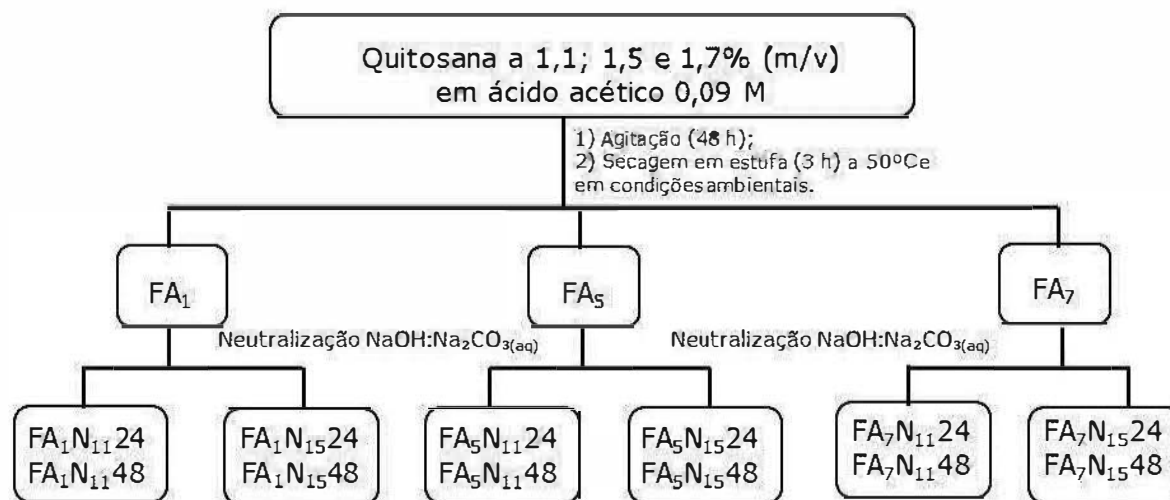


Figura 5.1 – Diagrama em Blocos referente à Preparação dos Filmes de Quitosana em Ácido Acético(aq) com $\text{NaOH}:\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{aq})$ como Agente Neutralizante: FA₁, FA₅ e FA₇; filmes de quitosana a 1,1; 1,5 e 1,7% (m/v) preparados em ácido acético(aq) (filmes não neutralizados); N₁₁ e N₁₅: agente neutralizante $\text{NaOH}:\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{aq})$ (1:0,01) e (1:0,05) M, respectivamente; 24 e 48: período de imersão (h) dos filmes não neutralizados no agente neutralizante.

Posteriormente, soluções de quitosana a 1,1% (m/v) foram preparadas em ácido acético(aq) 0,09 M com a adição de plastificante glicerol na concentração de 130 e 330 mg de plastificante/g de polímero, resultando assim, em filmes contendo, respectivamente, 13 e 33% (m/m) de glicerol em massa para cada filme. As soluções filmogênicas foram mantidas em agitação por 48 h e, após sua homogeneização, alíquotas de 20 mL de cada solução foram vertidas em placas de Petri (85 mm de diâmetro) e submetidas à secagem por 3 h em estufa a 50 °C e secagem em condições ambientais ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $UR = 60\%$) até os filmes desprenderem-se da superfície da placa. O objetivo foi a obtenção de filmes não neutralizados.

Amostras de filmes contendo glicerol a 13 e 33% (m/m) não neutralizadas preparadas na etapa anterior, foram imersas em solução de $\text{NaOH}:\text{Na}_2\text{CO}_3$ (1:0,01) e (1:0,05) M, pH 9,0

por 24 h, e, logo após, foram lavadas em água deionizada por 3 vezes e secas a $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para comparação, filmes neutralizados sem glicerol foram elaborados.

Adicionalmente, foram preparados filmes, tal como descrito acima, porém com a utilização como meio dispersante, uma solução de ácido cítrico 0,04 M no lugar do ácido acético(aq) 0,09 M (Figura 5.2).

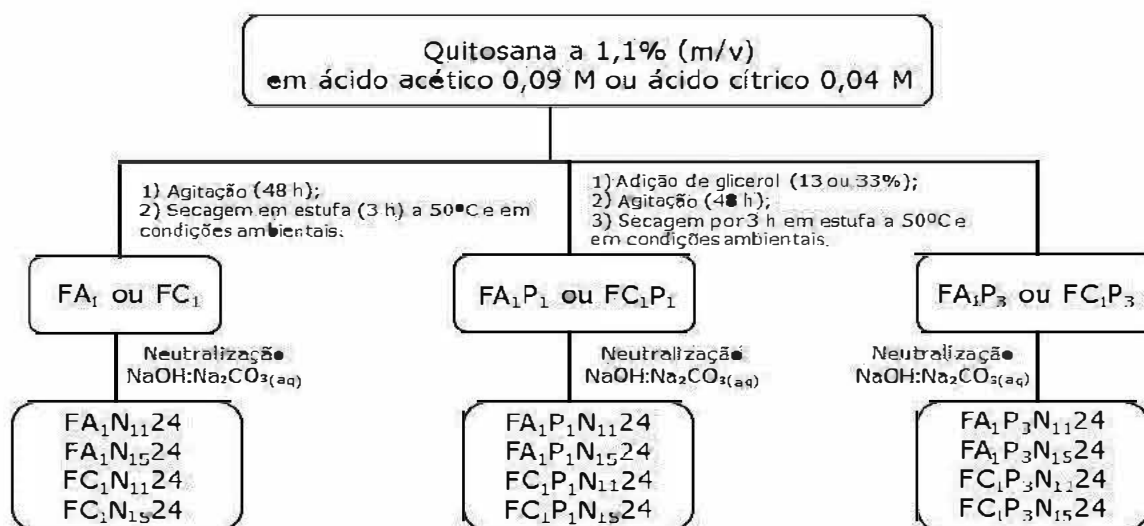


Figura 5.2 – Diagrama em Blocos referente à Preparação dos Filmes de Quitosana em Ácido Acético(aq) ou Ácido Cítrico(aq) com $NaOH:Na_2CO_3(aq)$ como Agente Neutralizante e Glicerol como Plastificante: FA_1 e FC_1 : filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados, respectivamente, em ácido acético(aq) e ácido cítrico(aq); FA_1P_1 e FC_1P_1 : filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados, respectivamente, em ácido acético(aq) e ácido cítrico(aq) contendo glicerol como plastificante (13% m/m); FA_1P_3 e FC_1P_3 : filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados, respectivamente, em ácido acético(aq) e ácido cítrico(aq) contendo glicerol como plastificante (33% m/m). Essas formulações correspondem aos filmes não neutralizados; N_{11} e N_{15} : agente neutralizante $NaOH:Na_2CO_3(aq)$ (1:0,01) e (1:0,05) M, respectivamente; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

5.1.2.2. Preparação dos filmes de quitosana em solução aquosa de ácido acético ou ácido cítrico, $Na_2CO_3(aq)$ como agente neutralizante e glicerol como plastificante

Soluções de quitosana a 1,1% (m/v) foram feitas em ácido acético(aq) 0,09 M com a adição de glicerol nos percentuais de 13 e 33% (m/m). Subsequentemente, alíquotas de 20 mL de cada solução foram vertidas em placas de Petri (85 mm de diâmetro) e submetidas à secagem por 3 h em estufa a 50 °C e secagem em condições ambientais ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e UR =

60%) até os filmes desprenderem-se da superfície da placa. O propósito foi a obtenção de filmes não neutralizados.

Amostras de filmes contendo glicerol a 13% e 33% (m/m) não neutralizadas preparadas na etapa anterior, foram imersas em solução de carbonato de sódio 0,01 e 0,05 M com pH ajustado a 5,7 com ácido cítrico 0,04 M por 24 h e, em seguida, foram lavadas em água deionizada por 3 vezes e secas a $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para comparação, filmes neutralizados sem glicerol foram preparados (Figura 5.3).

Adicionalmente, foram preparados filmes, tal como descrito acima, porém com a utilização como meio dispersante, uma solução de ácido cítrico 0,04 M no lugar do ácido acético(aq) 0,09 M.

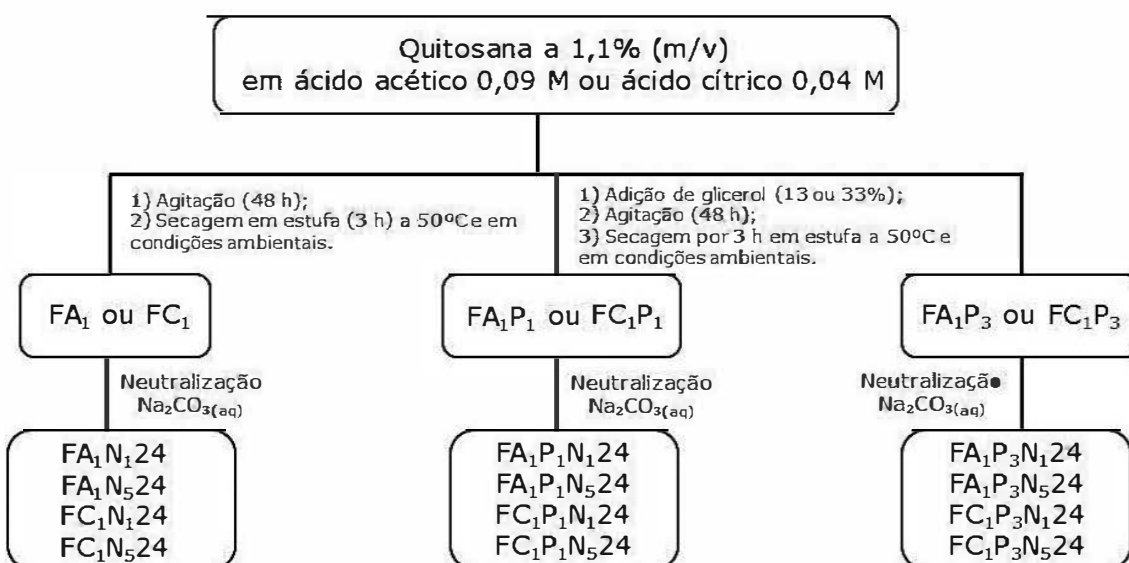


Figura 5.3 – Diagrama em Blocos referente à Preparação dos Filmes de Quitosana em Ácido Acético(aq) ou Ácido Cítrico(aq) com Na₂CO_{3(aq)} como Agente Neutralizante e Glicerol como Plastificante: FA₁ e FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados, respectivamente, em ácido acético(aq) e ácido cítrico(aq); FA₁P₁ e FC₁P₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados, respectivamente, em ácido acético(aq) e ácido cítrico(aq) contendo glicerol como plastificante (13% m/m); FA₁P₃ e FC₁P₃: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados, respectivamente, em ácido acético(aq) e ácido cítrico(aq) contendo glicerol como plastificante (33% m/m). Essas formulações correspondem aos filmes não neutralizados; N₁ e N₅: agente neutralizante Na₂CO_{3(aq)} (0,01 e 0,05 M com pH ajustado a 5,7 com ácido cítrico(aq), respectivamente); 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

5.1.2.3. Preparação dos filmes de quitosana em solução aquosa de ácido acético ou ácido cítrico e solução tampão como agente neutralizante e glicerol como plastificante

Soluções de quitosana a 1,1% (m/v) foram feitas em ácido acético_(aq) 0,09 M com adição de glicerol nos percentuais de 13 e 33% (m/m) e mantidas em agitação por 48 h. Aliquotas de 20 mL de cada solução foram vertidas em placas de Petri (85 mm de diâmetro) e submetidas à secagem por 3 h em estufa a 50 °C até os filmes desprenderem-se da superfície da placa com a finalidade de obtenção de filmes não neutralizados. A condição de umidade relativa para preparação destes filmes foi de 60%.

Amostras destes filmes contendo glicerol a 13% e 33% (m/m) não neutralizadas preparadas na etapa anterior, foram imersas em solução tampão ácido acético/acetato de sódio 0,2 M, pH 5,0 e pH 5,7 por 24 h e, logo após, foram lavadas em água deionizada por 3 vezes e secas em dessecador. Para comparação, filmes neutralizados sem glicerol foram feitos.

Adicionalmente, foram preparados filmes, tal como descrito acima, porém com o uso como meio dispersante, solução de ácido cítrico 0,04 M, tampão ácido cítrico/citrato de sódio como agente neutralizante e glicerol como plastificante (Figura 5.4).

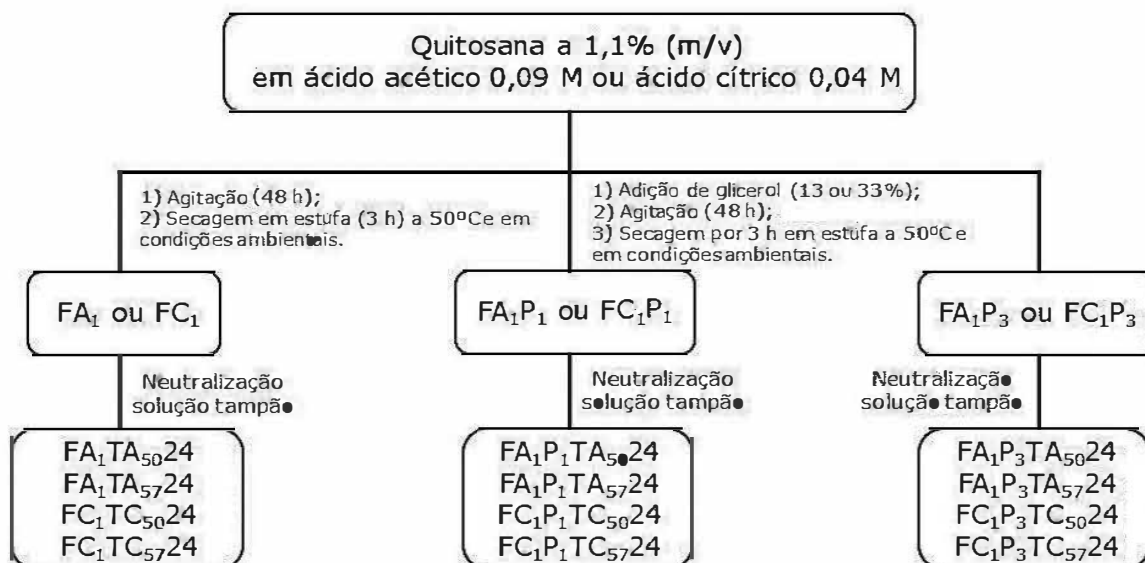


Figura 5.4 – Diagrama em Blocos referente à Preparação dos Filmes de Quitosana em Ácido Acético_(aq) ou Ácido Cítrico_(aq) com Solução Tampão como Agente Neutralizante e Glicerol como Plastificante: FA₁ e FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados, respectivamente, em ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq); FA₁P₁ e FC₁P₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados, respectivamente, em ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq) contendo glicerol como plastificante (13% m/m); FA₁P₃ e FC₁P₃: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados, respectivamente, em ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq) contendo glicerol como plastificante (33% m/m). Essas formulações correspondem aos filmes não neutralizados; TA₅₀ e TA₅₇: agente neutralizante solução tampão ácido acético/acetato de sódio pH 5,0 e 5,7, respectivamente; TC₅₀ e TC₅₇: agente neutralizante solução tampão ácido cítrico/citrato de sódio pH 5,0 e 5,7, respectivamente; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

5.2. ENSAIOS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Para os ensaios a seguir, utilizaram-se filmes neutralizados em solução tampão ácido cítrico/citrato de sódio, pH 5,0, preparados em ácido cítrico_(aq) sem glicerol (seção 5.1.2.3.), com ou sem AH_(aq). Estes filmes foram submetidos aos ensaios após 1 ou 32 semanas de preparação para aplicação sobre segmentos de pele.

5.2.1. Materiais

Para os ensaios de liberação *in vitro*, foram adquiridos: orelhas de porcos recém-abatidos, espécie: *Sus domesticus*, sexo: feminino, idade: 5 meses, a partir do Frigorífico Borrússia, em tempos diferentes; hialuronato de sódio proveniente da *Streptococcus equi* ($M \sim 15.000-30.000 \text{ g mol}^{-1}$) (Aldrich, S. A.) e gel de Carbopol® com ácido hialurônico em concentração de 1,67% (m/m) (Farmatec). Para as técnicas de caracterização, foram adquiridos: acetona ($M = 58,08 \text{ g mol}^{-1}$, $\rho = 0,79 \text{ g cm}^{-3}$) (Química Moderna) e glutaraldeído em solução 25% (m/v) para Microscopia ($M = 100,12 \text{ g mol}^{-1}$, $\rho = 1,06 \text{ g cm}^{-3}$) (Merck). Os sais fosfato de sódio monobásico monohidratado ($M = 137,98 \text{ g mol}^{-1}$, $\rho = 2,04 \text{ g cm}^{-3}$) (Nuclear) e fosfato de sódio dibásico dodecahidratado ($M = 358,14 \text{ g mol}^{-1}$, $\rho = 1,52 \text{ g cm}^{-3}$) (Nuclear) foram utilizados em ambos os ensaios de liberação *in vitro* e caracterização. Para todos os procedimentos foi empregada água deionizada.

5.2.2. Métodos

5.2.2.1. Preparação dos segmentos de pele a partir de orelha de porco

Após a aquisição de orelhas de porcos pelo frigorífico Borrússia, tais orelhas foram lavadas em água corrente, secas e dissecadas com o auxílio de um bisturi para a extração da epiderme. Conseqüentemente, houve descarte da derme e tecido cartilaginoso. Em seguida, foram cortados segmentos quadrados de pele de dimensões de, aproximadamente, 3,5 x 3,5 cm. Esta medida foi escolhida para garantir uma área de contato com a solução receptora, nos ensaios subseqüentes, de 4,9 cm². A extração dos pelos presentes nesses segmentos de pele foi feita por meio de tesoura. Esses segmentos foram acondicionados em papel alumínio e congelados a -20 °C até o momento do experimento. Na véspera da realização dos ensaios de liberação, as peles congeladas foram transferidas para o refrigerador para o descongelamento gradual. O período máximo de congelamento desses segmentos de pele foi de três meses. A preparação dos segmentos de pele para os ensaios de liberação *in vitro* foi conduzida no Laboratório de Farmacotécnica e Cosmetologia da UFCSPA após submissão e aprovação do projeto intitulado *Avaliação in vitro da Liberação de Ácido Hialurônico de Filmes de Quitosana* pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Parecer nº 196/2013.

5.2.2.2. Condições experimentais para os ensaios de liberação *in vitro*

Para o estudo de liberação *in vitro* do ácido hialurônico em pele de orelha de porco, utilizou-se um sistema de difusão (modelo adaptado) que consistiu de um compartimento receptor preenchido com uma solução tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4 com volume de 17 mL. Este sistema esteve acoplado a um banho-maria termostatizado com circulação externa para a manutenção da temperatura a $37 \pm 0,5$ °C, sob agitação constante em agitador magnético a 100 rpm. Sobre esse compartimento, preso a ele, colocou-se um segmento de pele de orelha de porco, com uma área difusional de $1,0 \text{ cm}^2$ disponível para o estudo de liberação. Sobre a extremidade do segmento de pele, com a papila dérmica voltada para a solução receptora (tampão fosfato), foram colocados os filmes com área difusional de $1,0 \text{ cm}^2$ contendo 50 μl (1 gota) da solução aquosa de ácido hialurônico 1,67% (m/v). Para fins de comparação, foram aplicados sobre a superfície da pele, filmes de quitosana sem o ativo, onde 1 gota de água foi utilizada como controle. Com o objetivo de comparar o efeito do tratamento por filmes (com ou sem ácido hialurônico), 62 mg de gel de Carbopol® contendo ácido hialurônico a 1,67% (m/v), foi depositado sobre segmentos de pele. O período de contato do segmento de pele com os filmes ou com gel contendo o ativo foi de 10 min. Logo após, os segmentos de pele foram cindidos em dimensões $1,0 \times 1,0 \text{ cm}$ com o auxílio de uma lâmina cortante para obtenção de segmentos menores tendo em vista a caracterização físico-química (item 5.3.2.) destes materiais.

5.3. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

5.3.1. Caracterização dos Filmes de Quitosana Pré-Ensaio de Liberação *in vitro*

Para a caracterização físico-química dos filmes visando à seleção do filme com melhor integridade em sua estrutura física e biocompatibilidade com a pele para a realização de ensaios de liberação *in vitro* de ácido hialurônico, fez-se uso de testes de porosidade, intumescimento, degradação em meio ácido e em meio alcalino, medidas de espessura, determinação do conteúdo de umidade, análise térmica simultânea e calorimetria exploratória diferencial. A avaliação estatística dos resultados foi realizada através da Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey com nível significância, $p < 0,05$ [vide Anexo A – Análise de Variância (ANOVA) de Fator Único] em software Origin®, v8E Origin Lab Corporation.

5.3.1.1. Testes de porosidade

Peças retangulares dos filmes, com dimensões de 1,5 x 1,0 cm, preparadas conforme os itens 5.1.2.1. e 5.1.2.2., foram imersas em 15 mL de heptano até o ponto máximo de inchamento (4 h). Antes das medidas de inchamento, as peças foram secas em estufa a 50 °C até massa constante. Os valores de W_{hep} (massa de heptano intumescida na peça de filme) e W_{fil} (massa da peça de filme seco), (equação 5.1), foram determinados em microbalança da marca ATI CAHN, modelo C-35, com precisão de 10^{-3} mg. Para o cálculo de W_{fil}/ρ_{fil} (volume da peça de filme seco, onde ρ_{fil} corresponde à massa específica do filme), foi realizada medida da espessura média de cada peça de filme seco em 5 pontos distintos, tomados aleatoriamente, com paquímetro digital da marca Fischer Scientific com precisão de 0,01 mm. O valor de ρ_{hep} (massa específica do heptano) foi de $0,68 \text{ g cm}^{-3}$. O princípio da determinação da porosidade em filmes poliméricos de quitosana encontra-se no Anexo B (*vide Anexo B – Avaliação da Porosidade em Filmes Poliméricos de Quitosana*).

O Percentual de Volume dos Poros ($\%V_p$) ou Percentual de Porosidade do filme ($\%P$) foi calculado, segundo:

$$\%V_p \text{ ou } \%P = \frac{\frac{W_{hep}}{\rho_{hep}}}{\frac{W_{hep}}{\rho_{hep}} + \frac{W_{fil}}{\rho_{fil}}} \times 100 \quad (\text{eq. 5.1})$$

onde o numerador e o denominador representam, respectivamente, o volume de heptano intumescido na peça de filme e o volume da peça de filme intumescido (volume total da peça de filme).

5.3.1.2. Testes de intumescimento

Peças retangulares dos filmes, com dimensões de 1,5 x 1,0 cm, preparadas conforme os itens 5.1.2.1. (filmes neutralizados em NaOH:Na₂CO_{3(aq)} preparados com 1,1% de quitosana em solução aquosa de ácido acético ou ácido cítrico, com glicerol nos percentuais de 0, 13 e 33%), 5.1.2.2. e 5.1.2.3., foram imersas em 80 mL de água deionizada durante 24 h.

Antes das medidas de intumescimento, as peças foram secas em estufa a 50 °C até massa constante. Os valores de W_t (massa da peça de filme intumescido após a imersão) e W_o (massa da peça de filme seco antes da imersão), (equação 5.2), foram determinados em balança analítica da marca Shimadzu, modelo AY 220, com precisão de 0,1 mg.

O Grau de Intumescimento (GI) foi calculado, segundo:

$$GI = \frac{W_t - W_o}{W_o} \times 100 \quad (\text{eq. 5.2})$$

5.3.1.3. Testes de solubilização em meio ácido e em meio alcalino

Peças retangulares dos filmes, com dimensões de 1,5 x 1,0 cm, preparadas conforme os itens 5.1.2.2. e 5.1.2.3. foram imersas em 15 mL de solução de ácido acético 0,1 M durante sete dias, a temperatura ambiente. Outro conjunto de peças foram imersas em 15 mL de solução de hidróxido de sódio 1,0 M por 7 dias. Antes dos testes, as peças foram secas em estufa a 50 °C até massa constante. Os valores de W_t (massa da peça de filme após a imersão em meio ácido ou alcalino) e W_o (massa da peça de filme seco antes da imersão em meio ácido ou alcalino), (equação 5.3), foram determinados em balança analítica conforme descrita no item 5.3.1.2.

O Percentual de Solubilização em Meio Ácido ($\% S_{ac}$) e em Meio Alcalino ($\% S_{al}$) foram calculados, segundo:

$$\%S_{ac} \text{ e } \%S_{al} = \frac{W_o - W_t}{W_o} \times 100 \quad (\text{eq. 5.3})$$

5.3.1.4. Medidas de espessura

A espessura média dos filmes neutralizados em soluções tampão ácido acético/acetato de sódio ou ácido cítrico/citrato de sódio, pH 5,0, preparados, respectivamente, em ácido acético_(aq) ou ácido cítrico_(aq) com glicerol nos percentuais de 0 e 33% (m/m), (item 5.1.2.3.), foi realizada em 5 pontos distintos, tomados aleatoriamente, com micrômetro digital da marca Mitutoyo, modelo PK - 0505, com precisão de 0,01 mm.

5.3.1.5. Determinação do conteúdo de umidade

Após a realização das medidas de espessura dos filmes (seção anterior), para a determinação do conteúdo de umidade, peças retangulares dos filmes com dimensões de 1,5 x 1,0 cm, foram secas a 50 °C até massa constante. Os valores de U_w (massa da peça de filme com conteúdo de água livre) e U_0 (massa da peça de filme seco), (equação 5.4), foram determinados em microbalança da marca ATI CAHN, modelo C-35, com precisão de 10^{-3} mg. O Conteúdo de Umidade (%U) foi calculado, segundo:

$$\%U = \frac{U_w - U_0}{U_w} \times 100 \quad (\text{eq. 5.4})$$

5.3.1.6. Análise térmica simultânea (SDT)

Para determinação do percentual de perda de massa dos filmes, foram realizadas análises termogravimétricas (TGA) e termogravimétricas diferenciais (DrTGA) dos filmes submetidos às medidas de espessura (seção 5.3.1.4). Informações adicionais foram obtidas a partir de análises térmicas diferenciais (DTA). As análises térmicas foram realizadas em um Analisador Térmico Simultâneo, SDT (TGA/DrTGA-DTA), marca TA Instruments®, modelo SDT Q600, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio ultrapuro com vazão de 100 mL min^{-1} . 10 mg de cada amostra (filme) foram acondicionadas em cápsulas de alumínio e aquecidas de 25 °C a 600 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1} .

5.3.1.7. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A identificação e avaliação das transições de fase dos filmes submetidos às medidas de espessura (seção 5.3.1.4.) foram realizadas em um calorímetro da marca TA Instruments®, modelo DSC Q2000. Utilizou-se como atmosfera dinâmica, nitrogênio ultrapuro, com vazão de 50 mL min^{-1} . Cerca de 5,0 mg de cada filme foram aquecidos e resfriados, em modo convencional, no intervalo de -20 a 200 °C sob taxa de aquecimento e resfriamento de 10 °C min^{-1} . Na faixa de aquecimento de -20 °C a 200 °C, os filmes sofreram aquecimento

modulado a uma taxa de $3\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, com período de modulação de 60 s e amplitude de modulação de $0,32\text{ }^{\circ}\text{C}$. Todas as amostras foram acondicionadas em cápsulas herméticas de alumínio.

5.3.2. Caracterização dos Filmes de Quitosana e Segmentos de Pele Pós-Ensaio de Liberação *in vitro*

Para caracterização dos filmes selecionados conforme descrito na seção 5.2. e dos segmentos de pele após a realização dos ensaios de liberação *in vitro* do ácido hialurônico_(aq), foram utilizadas as técnicas de espectroscopia de infravermelho com refletância atenuada e microscopia eletrônica de varredura.

5.3.2.1. Espectroscopia de infravermelho com refletância atenuada (FTIR-ATR)

As medidas de hidratação cutânea foram efetuadas através do método biofísico não invasivo FTIR-ATR, com a utilização do espectrômetro de infravermelho contendo acessório ATR com cristal seleneto de zinco (ZnSe), da marca Varian, modelo 640-IR. Os espectros foram coletados à temperatura de $16 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, na faixa de $4.000\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$, em 32 *scans* e resolução de 2 cm^{-1} . As leituras foram realizadas em absorbância para estimar as posições e intensidade dos picos relacionados às bandas de amida I e II. Os dados foram processados pelo *software* Essential FTIR™, v3.10.016 Operant LLC.

Para a determinação do Grau de Hidratação (*GH*), arbitrou-se para a hidratação basal da pele um valor de 100%. Neste caso, *GH* foi calculado em relação a tal valor, de acordo com a equação abaixo:

$$GH(\%) = \frac{R_f}{R_i} \times 100 \quad (\text{eq. 5.5})$$

onde R_f e R_i representam, respectivamente, a razão entre a intensidade dos picos equivalentes às bandas de amida I e II para os segmentos de pele com tratamento (por filmes ou por gel) e segmentos de pele sem tratamento.

Para cada conjunto de ensaios, foram utilizadas 12 amostras e, dentre as 12 amostras analisadas, foram empregadas: 3 segmentos de pele sem tratamento (controle), 3 segmentos de pele com tratamento por filmes contendo ácido hialurônico_(aq) (amostra teste), 3 segmentos de pele com tratamento por filmes sem o ácido hialurônico_(aq) (para avaliação da eficiência do ativo) e 3 segmentos de pele com tratamento por gel de Carbopol® contendo ácido hialurônico (para avaliação da eficiência do filme). Todos os ensaios foram efetuados em duplicata (n = 24). Após o período de aplicação dos filmes e gel e preparação dos segmentos de pele para caracterização (seção 5.2.2.2.), os segmentos de pele menores obtidos foram acondicionados em placas de Petri envoltas em filme de PVC até as análises em FTIR-ATR. Tais análises foram realizadas 2 h após a aplicação do tratamento na pele. Para a obtenção dos espectros, a região-teste foi posicionada sobre o cristal do equipamento de modo que foram coletados dois espectros para cada amostra de pele, em pontos diferentes.

5.3.2.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para avaliação da superfície dos segmentos de pele após os ensaios de liberação *in vitro* e da superfície dos filmes antes e após os ensaios de liberação, micrografias de MEV foram realizadas em microscópio eletrônico JEOL 5800 e 6060 do Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS (CME/UFRGS).

Após os ensaios, segmentos de pele sem e com tratamento por filmes ou gel contendo AH foram submetidos às análises de MEV conforme o protocolo de preparação de amostras biológicas para MEV (vide *Anexo C - Protocolo Básico para Preparação de Amostras Biológicas para MEV*). As superfícies das amostras de pele foram analisadas em aumentos de 100 e 300 x após serem recobertas com uma mistura de ouro/carbono. Tal como descrito anteriormente na seção 5.3.2.1., dentre as 12 amostras analisadas, foram empregadas: 3 segmentos de pele sem tratamento (controle), 3 segmentos de pele com tratamento por filmes contendo ácido hialurônico_(aq) (amostra teste), 3 segmentos de pele com tratamento por filmes sem ácido hialurônico_(aq) (para avaliação da eficiência do ácido hialurônico) e 3 segmentos de pele com tratamento por gel de Carbopol® contendo ácido hialurônico (para avaliação da eficiência do filme). Todos os ensaios foram realizados em duplicata (n = 24).

Adicionalmente, a superfície dos filmes foi analisada em aumento de 3000 x, após recobrimento da superfície com ouro.

5.4. DESCARTE DE RESÍDUOS

5.4.1. Descarte de Resíduos Químicos

O descarte dos resíduos sólidos contaminados (filmes de quitosana pós-testes de porosidade, solubilização e pós-tratamento no MEV) e não contaminados (filmes de quitosana pós-testes de intumescimento, determinação do conteúdo de umidade e pós-tratamento térmico no SDT e DSC); resíduos de solvente orgânico e de soluções aquosas (ácidas, básicas e tampões) gerados seguiu procedimento padrão realizado pelo Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos (CGTRQ) do Instituto de Química da UFRGS:

- ✓ Disposição final dos resíduos sólidos contaminados: acondicionamento em sacos plásticos devidamente rotulados para *Resíduos Sólidos Contaminados* e entrega ao CGTRQ;
- ✓ Disposição final dos resíduos sólidos não contaminados: cesto de lixo orgânico do Laboratório de Instrumentação e Dinâmica Molecular (para os filmes de quitosana pós-testes de intumescimento e determinação do conteúdo de umidade) e pelo LAMAT (para os filmes de quitosana pós-tratamento térmico no SDT e DSC);
- ✓ Disposição final dos resíduos de solvente orgânico e de soluções aquosas: acondicionamento em recipientes próprios rotulados (dispostos no Laboratório de Instrumentação e Dinâmica Molecular) para cada classe de solvente e soluções destes - resíduos de solvente orgânico: em *Resíduos de Solvente Orgânico Não Halogenado* e resíduos de soluções aquosas: em *Resíduos de Solvente Aquoso* e entrega ao CGTRQ.

Salienta-se que após o recebimento do material pelo CGTRQ foram realizados os procedimentos adequados de descarte dos resíduos químicos.

5.4.2. Descarte de Resíduos Biológicos

O descarte dos resíduos de natureza biológica não contaminados (orelhas de porcos e amostras de pele pós-caracterização no FTIR-ATR) e contaminados (amostras de pele pós-tratamento no MEV) gerados seguiu o sistema adotado pela UFCSPA e Instituto de Química da UFRGS:

- ✓ Disposição final dos resíduos de natureza biológica não contaminados - orelhas de porcos: sacos especiais para descarte de lixo de risco biológico da UFCSPA (tratamento de resíduos realizados pela empresa Ambientus) e amostras de pele pós-caracterização no FTIR-ATR: cesto de lixo orgânico do Laboratório de Instrumentação e Dinâmica Molecular do Instituto de Química da UFRGS;
- ✓ Disposição final dos resíduos de natureza biológica contaminados: CGTRQ da UFRGS.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados a seguir referem-se a filmes poliméricos preparados por *casting*, técnica utilizada na obtenção de filmes formados pela evaporação de solvente (água) e precipitação do polímero disperso em um molde, neste caso, uma placa de Petri. Para os filmes preparados neste trabalho, uma etapa de neutralização foi necessária para garantir a integridade da sua estrutura física durante a utilização na pele. Com o intuito de melhorar a estabilidade física dos filmes, a adição de agentes neutralizantes e plastificante foi testada. A estabilidade foi avaliada por meio das propriedades físico-químicas percentual de porosidade, grau de intumescimento, espessura, conteúdo de umidade e percentual de solubilização. Adicionalmente, caracterização físico-química por análises térmicas como análise térmica simultânea e calorimetria exploratória diferencial, foi realizada. Os filmes preparados neste trabalho foram compostos por quitosana com: (a) meios dispersantes: solução aquosa de ácido acético ou de ácido cítrico; (b) agentes neutralizantes: NaOH:Na₂CO_{3(aq)}, Na₂CO₃ em meio ácido ou solução tampão de ácido acético/acetato de sódio ou ácido cítrico/citrato de sódio; e (c) plastificante: glicerol. A seguir, são apresentados os diferentes filmes e as propriedades avaliadas com o intuito de selecionar uma formulação para os estudos subsequentes de aplicação em pele.

6.1. FILMES DE QUITOSANA PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) OU ÁCIDO CÍTRICO_(aq), NaOH:Na₂CO_{3(aq)} COMO AGENTE NEUTRALIZANTE E GLICEROL COMO PLASTIFICANTE

Inicialmente foram preparados filmes de quitosana a partir de soluções de quitosana em diferentes concentrações. Para isso, fez-se uso de ácido acético_(aq) e NaOH:Na₂CO_{3(aq)} como meio dispersante e agente neutralizante, respectivamente, de modo a avaliar o percentual de porosidade dos filmes obtidos. A preparação de filmes em diferentes concentrações de quitosana teve por objetivo selecionar a formulação que melhor atendesse à propriedade em estudo. Após a seleção da composição filmogênica, foram preparados filmes com e sem plastificante glicerol utilizando-se ácido acético_(aq) ou ácido cítrico_(aq) como meio dispersante e NaOH:Na₂CO_{3(aq)} como agente neutralizante com o intuito de avaliar o percentual de porosidade e grau de intumescimento dos filmes elaborados. A adição do

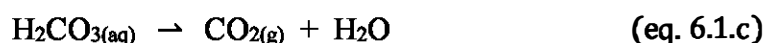
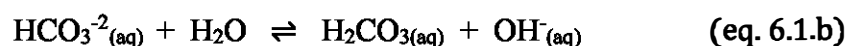
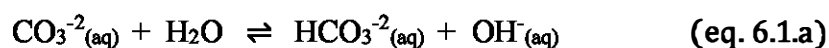
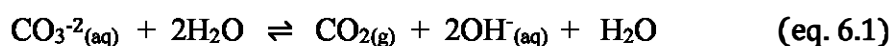
plastificante glicerol foi testada para melhorar a aparência dos filmes e facilitar seu manuseio durante a aplicação. A seguir, foi feita avaliação estatística dos efeitos dos parâmetros de preparação dos filmes nas propriedades físico-químicas obtidas.

6.1.1. Avaliação Estatística dos Efeitos dos Fatores Concentração de Quitosana, Agente Neutralizante, Período de Neutralização, Percentual de Plastificante e Meio Dispersante no Percentual de Porosidade dos Filmes de Quitosana

A avaliação da porosidade de uma forma farmacêutica composta pelo excipiente biopolimérico quitosana, disposto na forma de filme, é de suma importância para a determinação da liberação de uma substância ativa incorporada. Dependendo das condições de incorporação, o ativo pode encontrar-se dissolvido ou disperso uniformemente em toda a área do filme que estará em contato com o organismo. Cabe salientar que, posteriormente, pretende-se aplicar tais filmes na liberação de ácido hialurônico sobre a pele.

Para a aplicação de filmes sobre a pele, um dos parâmetros que necessita controle é o pH. Para tanto, agentes neutralizantes foram empregados na elaboração dos filmes. Neste trabalho, foi proposta inicialmente a utilização do agente de neutralização hidróxido de sódio: carbonato de sódio, NaOH:Na₂CO_{3(aq)}. Além de neutralizante, esta solução pode ter função como agente de porosidade²⁰⁰.

O Na₂CO₃ possui em sua fórmula química, o ânion carbonato, CO₃^{-2(aq)}, que, ao sofrer reações de hidrólise, (eqs. 6.1.a, 6.1.b e 6.1.c.), produz como uns dos produtos finais, dióxido de carbono gasoso, CO_{2(g)}, conforme a equação abaixo (eq. 6.1):



O $\text{CO}_{2(g)}$ resultante da decomposição do ácido carbônico, $\text{H}_2\text{CO}_{3(aq)}$, obtido das reações de hidrólise juntamente com o NaOH, colaboram na formação dos poros nos filmes neutralizados. A seguir (Figura 6.1) estão apresentados os percentuais de porosidade dos filmes de quitosana.

A partir da análise visual e tátil dos filmes preparados, em princípio, as formulações com 1,1, 1,5 e 1,7% de quitosana, independente da concentração de agente de porosidade e tempo de imersão utilizado, mostraram-se com superfícies brilhantes e sem características adesivas.

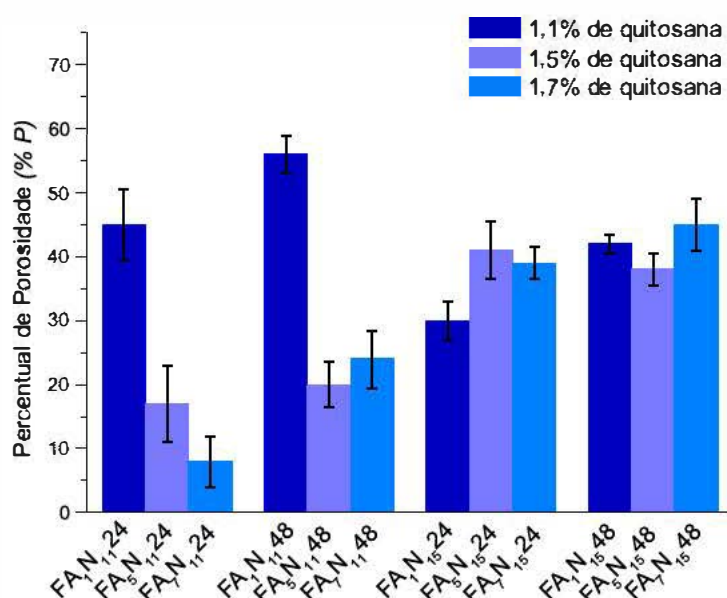


Figura 6.1 - Percentual de Porosidade (%P) em 4 h a $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ dos Filmes de Quitosana preparados em Ácido Acético_(aq) e NaOH:Na₂CO_{3(aq)} como Agente Neutralizante: FA₁, FA₅ e FA₇: filmes de quitosana a 1,1; 1,5 e 1,7% (m/v) preparados em ácido acético_(aq); N₁₁ e N₁₅: agente neutralizante NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,01) e (1:0,05) M, respectivamente; 24 e 48: período de imersão (h) dos filmes não neutralizados no agente neutralizante.

Em relação à Figura 6.1, observou-se que os filmes preparados em diferentes concentrações de quitosana e neutralizados com NaOH:Na₂CO_{3(aq)} em menor concentração de Na₂CO₃ (FA₁N₁₁24, FA₅N₁₁24, FA₇N₁₁24 e FA₁N₁₁48, FA₅N₁₁48, FA₇N₁₁48) apresentaram valores diferenciados de percentual de poros se comparados aos filmes preparados com maior concentração deste agente de neutralização (FA₁N₁₅24, FA₅N₁₅24, FA₇N₁₅24 e FA₁N₁₅48, FA₅N₁₅48, FA₇N₁₅48). Para os filmes preparados com neutralizante que contém a menor

concentração de Na_2CO_3 , os percentuais de porosidade tiveram uma tendência de redução com o aumento das concentrações de quitosana, sendo que os maiores percentuais de poros foram para os filmes $\text{FA}_1\text{N}_{11}24$ e $\text{FA}_1\text{N}_{11}48$. Comportamento oposto foi observado para os filmes preparados com a maior concentração de Na_2CO_3 .

Tabela 6.1 – Análise de Variância (ANOVA) de Fator Único [concentração de quitosana, % (m/v)] para Comparação da Diferença entre as Médias dos Grupos [percentuais de porosidade (%P) dos filmes de quitosana preparados em ácido acético_(aq) em diferentes concentrações de quitosana, 1,1; 1,5 e 1,7% (m/v) e neutralizados em $\text{NaOH}:\text{Na}_2\text{CO}_3$ _(aq) em diferentes períodos de neutralização] e das Variações Internas aos Grupos. Nível de significância: $p < 0,05$.

Conjunto	Graus de Liberdade (GL)	Fonte da Variação			F_{obs}
		Entre os Grupos (efeito do fator)	Nos Grupos (erro)	Total	
		2	15	17	
%P_{FA1N1124}	Soma Quadrática (SQ)	3980,53	244,54	4225,07	122
%P_{FA5N1124}	Média Quadrática (MQ)	1990,26	16,30	-	
%P_{FA7N1124}	Média Quadrática (MQ)	1990,26	16,30	-	
%P_{FA1N1148}	Soma Quadrática (SQ)	4628,63	119,64	4748,27	290
%P_{FA5N1148}	Média Quadrática (MQ)	2314,32	7,97	-	
%P_{FA7N1148}	Média Quadrática (MQ)	2314,32	7,97	-	
%P_{FA1N1524}	Soma Quadrática (SQ)	403,44	105,83	509,27	28
%P_{FA5N1524}	Média Quadrática (MQ)	201,72	7,06	-	
%P_{FA7N1524}	Média Quadrática (MQ)	201,72	7,06	-	
%P_{FA1N1548}	Soma Quadrática (SQ)	129	74,50	203,50	13
%P_{FA5N1548}	Média Quadrática (MQ)	64,50	4,97	-	
%P_{FA7N1548}	Média Quadrática (MQ)	64,50	4,97	-	

$F_{15}^2 = 3,68$. FA_1 , FA_5 e FA_7 : filmes de quitosana a 1,1; 1,5 e 1,7% (m/v) preparados em ácido acético_(aq); N_{11} e N_{15} : agente neutralizante $\text{NaOH}:\text{Na}_2\text{CO}_3$ _(aq) (1:0,01) e (1:0,05) M, respectivamente; 24 e 48: período de imersão (h) dos filmes não neutralizados no agente neutralizante.

A partir da análise de ANOVA apresentada na Tabela 6.1, todos os valores observados na estatística de teste F para cada conjunto de formulações preparadas foram maiores que o valor crítico ($F_{obs} > 3,68$). Logo, os percentuais de porosidade de cada conjunto são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Comparando-se os valores de F_{obs} dos conjuntos de filmes neutralizados com a menor concentração de Na_2CO_3 com os dos conjuntos neutralizados com a maior concentração de Na_2CO_3 (Tabela 6.1), observou-se que o efeito da concentração de quitosana para a geração de poros foi diferenciado. Para os conjuntos neutralizados com a menor concentração de Na_2CO_3 , esses valores foram expressivos, ou seja, superiores.

Segundo a Tabela 6.1, o conjunto de filmes preparados com a menor concentração de Na_2CO_3 e tempo de neutralização de 48 h ($\text{FA}_1\text{N}_{1148}$, $\text{FA}_5\text{N}_{1148}$ e $\text{FA}_7\text{N}_{1148}$) apresentou valor de F_{obs} superior ($290 > 122$) e variação nos grupos inferior ($7,97 < 16,30$) ao conjunto preparado com menor concentração de Na_2CO_3 e tempo de neutralização de 24 h ($\text{FA}_1\text{N}_{1124}$, $\text{FA}_5\text{N}_{1124}$ e $\text{FA}_7\text{N}_{1124}$). De fato, um maior valor de F_{obs} , neste caso, indicou que o efeito da concentração de quitosana para os percentuais de porosidade dos filmes preparados com a menor concentração de Na_2CO_3 e tempo de neutralização de 48 h foi mais significativo que o dos filmes neutralizados por um período de neutralização de 24 h. Por sua vez, o menor erro aleatório apresentado pelos filmes neutralizados em tempo de neutralização de 48 h, revelou uma menor intensidade das interações entre concentração de quitosana e tempo de neutralização.

Em relação aos filmes $\text{FA}_1\text{N}_{1124}$ e $\text{FA}_1\text{N}_{1148}$ (Figura 6.1), verificou-se que, por possuírem menor concentração de polímero, a densidade superficial de massa (razão entre a quantidade de massa de quitosana e a sua área de distribuição, que neste caso, é a área da base referente à placa de Petri) foi menor que a dos filmes com as concentrações de 1,5 e 1,7% de quitosana. Logo, a menor densidade superficial de massa foi consequência da maior formação de poros resultante, em parte, das interações supracitadas.

O ácido acético, por ser um ácido fraco, em solução aquosa é fracamente solúvel em água e volátil. Devido a esta propriedade, soluções de quitosana obtidas através de um meio dispersante como uma solução aquosa de ácido acético, formam um polieletrólito e, possuem volatilização do componente aquoso. Com a evaporação de água e ácido acético das soluções, o equilíbrio $-\text{NH}_2/-\text{NH}_3^+$ (protonação/deprotonação) existente nas cadeias do polieletrólito é deslocado para o sentido da formação dos grupos amino ($-\text{NH}_2$), ou seja, da deprotonação. Há redução na densidade de carga nas cadeias do polieletrólito (diminuição de cadeias contendo grupos $-\text{NH}_3^+$)^{201,202}. Quanto maior a volatilização, menor o tempo para a formação do hidrogel não neutralizado, isto é, do filme não neutralizado. Antes da neutralização, os filmes em estudo ($\text{FA}_1\text{N}_{1124}$ e $\text{FA}_1\text{N}_{1148}$) foram preparados a partir de soluções de quitosana com a menor concentração (1,1%). Quanto menor a concentração das soluções filmogênicas, menor

a volatilização, portanto, maior o tempo para a formação do filme. Sendo assim, se houve geração de poros, apresentaram-se em maior quantidade. No fim, a densidade superficial de massa foi a menor para esses filmes com 1,1% de quitosana.

Entretanto, como tal filme nesta condição não apresentou estabilidade, através da neutralização do filme com $\text{NaOH}:\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{aq})$, ela foi atingida. Durante esta etapa, o $\text{CO}_2(\text{g})$ gerado das reações de hidrólise do íon $\text{CO}_3^{2-}(\text{aq})$, propiciou à geração de poros e, quanto maior o período de neutralização, maior a formação de poros (Figura 6.1). Dessa forma, os maiores percentuais de poros para os filmes $\text{FA}_1\text{N}_{11}24$ e $\text{FA}_1\text{N}_{11}48$ foram devido, em parte, à contribuição conjunta dos efeitos da concentração de quitosana e tempo de neutralização.

Comportamento inverso foi observado em relação ao F_{obs} para o conjunto de filmes neutralizados com a maior concentração de Na_2CO_3 (Tabela 6.1). No tempo de neutralização de 48 h, o conjunto de formulações ($\text{FA}_1\text{N}_{15}48$, $\text{FA}_5\text{N}_{15}48$ e $\text{FA}_7\text{N}_{15}48$), teve valor de F_{obs} menor ($13 < 28$) ao preparado com maior concentração de Na_2CO_3 e tempo de neutralização de 24 h ($\text{FA}_1\text{N}_{15}24$, $\text{FA}_5\text{N}_{15}24$ e $\text{FA}_7\text{N}_{15}24$). Isso indicou que os valores de percentuais de porosidade dos filmes preparados com a maior concentração de Na_2CO_3 e tempo de neutralização de 48 h foram menos significativos que os dos filmes neutralizados durante o período de imersão de 24 h. Além disso, a variação nos grupos foi menor ($4,97 < 7,06$).

Tabela 6.2 – Teste de Tukey para o Módulo da Diferença entre as Médias [percentuais de porosidade (%P) dos filmes de quitosana preparados em ácido acético_(aq) em diferentes concentrações de quitosana, 1,1; 1,5 e 1,7% (m/v) e neutralizados em NaOH:Na₂CO_{3(aq)} em diferentes períodos de neutralização].

	Módulo da Diferença entre as Médias	Diferença Menos Significativa (DMS)	Significância
%P _{FA5N1124} - %P _{FA1N1124}	+18		sim
%P _{FA7N1124} - %P _{FA1N1124}	+37	6,05	sim
%P _{FA7N1124} - %P _{FA5N1124}	+19		sim
%P _{FA5N1148} - %P _{FA1N1148}	+36		sim
%P _{FA7N1148} - %P _{FA1N1148}	+32	4,01	sim
%P _{FA7N1148} - %P _{FA5N1148}	+4		sim
%P _{FA5N1524} - %P _{FA1N1524}	+11		sim
%P _{FA7N1524} - %P _{FA1N1524}	+9	3,98	sim
%P _{FA7N1524} - %P _{FA5N1524}	+2		não
%P _{FA5N1548} - %P _{FA1N1548}	+4		sim
%P _{FA7N1548} - %P _{FA1N1548}	+3	3,01	sim
%P _{FA7N1548} - %P _{FA5N1548}	+7		sim

FA₁, FA₅ e FA₇: filmes de quitosana a 1,1; 1,5 e 1,7% (m/v) preparados em ácido acético_(aq); N₁₁ e N₁₅: agente neutralizante NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,01) e (1:0,05) M, respectivamente; 24 e 48: período de imersão (h) dos filmes não neutralizados no agente neutralizante.

Analisando-se o Teste de Tukey para o módulo da diferença entre os valores de percentual de porosidade dos filmes em estudo (Tabela 6.2), verificou-se que, para os filmes neutralizados com a menor concentração de Na₂CO₃, esses valores foram iguais ou superiores a DMS, logo, os percentuais de poros diferiram significativamente. Para os filmes neutralizados em 24 h, a DMS foi superior aos neutralizados em 48 h.

Em relação ao módulo da diferença entre os valores de porosidade dos filmes preparados com a maior concentração de Na₂CO₃, no tempo de neutralização de 24 h, para as formulações contendo 1,5 e 1,7% de quitosana (FA₅N₁₅24 e FA₇N₁₅24), esse valor foi menor que DMS, portanto, os percentuais de porosidade destes filmes não diferiram significativamente. Comportamento similar aos filmes preparados em menor concentração de Na₂CO₃ e tempo de neutralização de 24 h, foi verificado para o valor da DMS.

Diante dos resultados apresentados pelo Teste de Tukey, pode-se afirmar que os percentuais de porosidade dos filmes neutralizados com a menor concentração de Na_2CO_3 tiveram uma redução com o aumento das concentrações de quitosana (Figura 6.1). Entretanto devido a não significância, ou seja, igualdade, entre os valores de percentual de porosidade para os filmes neutralizados com maior concentração de Na_2CO_3 nas concentrações de 1,5 e 1,7% de quitosana, conclui-se que não houve correlação²⁰³ entre concentração de quitosana e percentual de poros nestas condições.

Tabela 6.3 – Análise de Variância (ANOVA) de Fator Único [agente neutralizante, $\text{NaOH}:\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{aq})$ (M:M)] para Comparação da Diferença entre as Médias dos Grupos [percentuais de porosidade (%P) dos filmes de quitosana preparados em ácido acético(aq), em diferentes concentrações de quitosana, e neutralizados em $\text{NaOH}:\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{aq})$ (1:0,01) e (1:0,05) M, respectivamente, durante 24 h] e das Variações Internas aos Grupos. Nível de significância: $p < 0,05$.

Conjunto	Graus de Liberdade (GL)	Fonte da Variação			F_{obs}
		Entre os Grupos (efeito do fator)	Nos Grupos (erro)	Total	
		1	10	11	
%P_{FA1N1124}	Soma Quadrática (SQ)	645,33	119,83	765,16	54
%P_{FA1N1524}	Média Quadrática (MQ)	645,33	11,98	-	
%P_{FA5N1124}	Soma Quadrática (SQ)	560,34	162,16	722,5	34
%P_{FA5N1524}	Média Quadrática (MQ)	560,34	16,21	-	
%P_{FA7N1124}	Soma Quadrática (SQ)	2836,68	68,37	2905,05	415
%P_{FA7N1524}	Média Quadrática (MQ)	2836,68	6,83	-	

$F_{10}^1 = 4,96$. FA₁, FA₅ e FA₇: filmes de quitosana a 1,1; 1,5 e 1,7% (m/v) preparados em ácido acético(aq); N₁₁ e N₁₅: agente neutralizante $\text{NaOH}:\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{aq})$ (1:0,01) e (1:0,05) M, respectivamente; 24: período de imersão (h) dos filmes não neutralizados no agente neutralizante.

Conforme as Tabelas 6.3 e 6.4, os conjuntos de filmes preparados em diferentes concentrações Na_2CO_3 e tempo de neutralização de 24 h, (FA₁N₁₁24 e FA₁N₁₅24), (FA₅N₁₁24 e FA₅N₁₅24) e (FA₇N₁₁24 e FA₇N₁₅24) apresentaram valores diferenciados de F_{obs} se comparados aos conjuntos neutralizados em um período de 48 h (FA₁N₁₁48 e FA₁N₁₅48),

(FA₅N₁₁48 e FA₅N₁₅48) e (FA₇N₁₁48 e FA₇N₁₅48). Todos os valores de F_{obs} para cada conjunto de filmes foram maiores que o valor crítico ($F_{obs} > 4,96$). Portanto, os percentuais de porosidade são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Analisando-se a Tabela 6.3, o conjunto preparado com concentração de 1,7% de quitosana e tempo de neutralização de 24 h (FA₇N₁₁24 e FA₇N₁₅24) apresentou valor de F_{obs} maior ($F_{obs} = 415$) que os dos conjuntos preparados com 1,1% ($F_{obs} = 54$) e 1,5% ($F_{obs} = 34$) de quitosana. Por fim, a variação interna aos grupos foi inferior (MQ = 6,83). Diante disso, pode-se dizer que os percentuais de porosidade dos filmes obtidos com concentração de 1,7% e tempo de neutralização de 24 h foram mais significativos que os dos filmes preparados com 1,1 e 1,5% de quitosana. O efeito da concentração de Na₂CO₃ foi relevante para a formação de poros nos filmes com a maior concentração de quitosana durante o período de 24 h.

Tabela 6.4 - Análise de Variância (ANOVA) de Fator Único [agente neutralizante, NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (M:M)] para Comparação da Diferença entre as Médias dos Grupos [percentuais de porosidade (%P) dos filmes de quitosana preparados em ácido acético_(aq), em diferentes concentrações de quitosana, e neutralizados em NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,01) e (1:0,05) M, respectivamente, durante 48 h] e das Variações Internas aos Grupos. Nível de significância: $p < 0,05$.

Conjunto	Graus de Liberdade (GL)	Fonte da Variação			F_{obs}
		Entre os Grupos (efeito do fator)	Nos Grupos (erro)	Total	
		1	10	11	
%P _{FA1N1148} %P _{FA1N1548}	Soma Quadrática (SQ)	574,08	29,33	603,41	196
	Média Quadrática (MQ)	574,08	2,93	-	
%P _{FA5N1148} %P _{FA5N1548}	Soma Quadrática (SQ)	972	53	1025	183
	Média Quadrática (MQ)	972	5,30	-	
%P _{FA7N1148} %P _{FA7N1548}	Soma Quadrática (SQ)	1262,80	111,80	1374,6	113
	Média Quadrática (MQ)	1262,80	11,18	-	

$F_{10}^1 = 4,96$. FA₁, FA₅ e FA₇: filmes de quitosana a 1,1; 1,5 e 1,7% (m/v) preparados em ácido acético_(aq); N₁₁ e N₁₅: agente neutralizante NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,01) e (1:0,05) M, respectivamente; 48: período de imersão (h) dos filmes não neutralizados no agente neutralizante.

Em comparação ao conjunto de filmes analisados na Tabela 6.3, pôde-se constatar que o efeito da concentração da concentração de Na_2CO_3 para a formação de poros nos filmes neutralizados durante o período de 48 h não apresentaram variações expressivas. Neste caso, o valor de F_{obs} foi um pouco maior ($F_{obs} = 196$) que o do conjunto preparado com 1,5% ($F_{obs} = 183$) e 1,7% ($F_{obs} = 113$) de quitosana. Para os filmes com concentração de 1,1%, a variação nos grupos foi reduzida ($\text{MQ} = 2,93$). Frente a isso, pode-se afirmar que os percentuais de porosidade dos filmes obtidos com concentração de 1,1% e tempo de neutralização de 48 h, foram mais significativos que os dos filmes preparados com 1,5 e 1,7% de quitosana. Sendo assim, diante dos resultados apresentados nas Tabelas 6.3 e 6.4, o efeito da concentração de Na_2CO_3 nos filmes mostrou-se expressivo para a diferenciação dos valores de percentual de poros para os filmes preparados com a menor (1,1%) e maior (1,7%) concentração de quitosana no tempo de neutralização de 24 h.

Correlacionando-se os resultados das Tabelas 6.3 e 6.4 com os dos percentuais de porosidade (Figura 6.1), para os filmes $\text{FA}_7\text{N}_{11}24$ e $\text{FA}_7\text{N}_{15}24$, o aumento na concentração de Na_2CO_3 propiciou aumento nos volumes de poros. Devido ao maior valor de F_{obs} para o conjunto destes filmes (Tabela 6.3), maior a contribuição do agente neutralizante para a formação de poros. Em comparação com os filmes $\text{FA}_1\text{N}_{11}24$ e $\text{FA}_1\text{N}_{15}24$, a contribuição do agente de neutralização para a geração dos poros foi menor. Entretanto, para os filmes $\text{FA}_1\text{N}_{11}48$ e $\text{FA}_1\text{N}_{15}48$, embora o valor de F_{obs} para o conjunto destes filmes tenha sido superior (Tabela 6.4), não se diferenciou dos demais. Em razão disso, pode-se afirmar que houve diferenças na atuação dos componentes NaOH e Na_2CO_3 durante a neutralização e geração de poros²⁰⁴.

Estudos referentes à influência da concentração de agente neutralizante na preparação e caracterização de filmes de quitosana densos e porosos foram feitos por Beppu e colaboradores²⁰⁵. Soluções de quitosana a 2,5% (m/m) foram preparadas em ácido acético_(aq) por meio de *casting total* (filmes densos) e *parcial* (filmes porosos) e, em seguida, neutralizadas em $\text{NaOH}_{(aq)}$ em diferentes concentrações. Para os filmes porosos, a identificação da presença dos poros foi realizada através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e, para os filmes densos, através de Microscopia de Força Atômica (MFA). Os filmes preparados por *casting total* mostraram uma superfície muito plana, conforme MFA. Contudo, os filmes preparados por *casting parcial*, segundo as micrografias de MEV, a concentração de agente neutralizante na solução permitiu o controle da porosidade nos filmes

porosos: quanto maior concentração de agente neutralizante, maior a quantidade de poros originados.

Tabela 6.5 - Análise de Variância (ANOVA) de Fator Único [período de neutralização, (h)] para Comparação da Diferença entre as Médias dos Grupos [percentuais de porosidade (%P) dos filmes de quitosana preparados em ácido acético_(aq), em diferentes concentrações de quitosana, e neutralizados em NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,01) M durante 24 e 48 h] e das Variações Internas aos Grupos. Nível de significância: $p < 0,05$.

Conjunto	Graus de Liberdade (GL)	Fonte da Variação			F_{obs}
		Entre os Grupos (efeito do fator)	Nos Grupos (erro)	Total	
		1	10	11	
%P _{FA1N1124}	Soma Quadrática (SQ)	374,10	116,60	490,70	32
%P _{FA1N1148}	Média Quadrática (MQ)	374,10	11,66		
%P _{FA5N1124}	Soma Quadrática (SQ)	154,08	129,33	283,41	12
%P _{FA5N1148}	Média Quadrática (MQ)	154,08	12,93	-	
%P _{FA7N1124}	Soma Quadrática (SQ)	742,61	118,18	860,79	63
%P _{FA7N1148}	Média Quadrática (MQ)	742,61	11,81	-	

$F_{10}^1 = 4,96$. FA₁, FA₅ e FA₇: filmes de quitosana a 1,1; 1,5 e 1,7% (m/v) preparados em ácido acético_(aq); N₁₁: agente neutralizante NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,01) M; 24 e 48: período de imersão (h) dos filmes não neutralizados no agente neutralizante.

Analisando-se as Tabelas 6.5 e 6.6, os conjuntos de filmes neutralizados com concentração de 0,01 M de Na₂CO₃ em tempos de neutralização de 24 e 48 h (FA₁N₁₁24 e FA₁N₁₁48), (FA₅N₁₁24 e FA₅N₁₁48) e (FA₇N₁₁24 e FA₇N₁₁48) apresentaram valores diferenciados de F_{obs} se comparados aos conjuntos neutralizados com concentração de 0,05 M de Na₂CO₃ (FA₁N₁₅24 e FA₁N₁₅48), (FA₅N₁₅24 e FA₅N₁₅48) e (FA₇N₁₅24 e FA₇N₁₅48). Todos os valores de F_{obs} para cada conjunto (exceto os grupos de filmes com concentrações de 1,5% de quitosana e 0,05 M de Na₂CO₃) foram maiores que o valor crítico ($F_{obs} > 4,96$). Portanto, os percentuais de porosidade de cada conjunto são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Comparando-se os filmes neutralizados em menor concentração de Na_2CO_3 ($\text{FA}_1\text{N}_{11}24$, $\text{FA}_1\text{N}_{11}48$, $\text{FA}_5\text{N}_{11}24$, $\text{FA}_5\text{N}_{11}48$ e $\text{FA}_7\text{N}_{11}24$, $\text{FA}_7\text{N}_{11}48$) com os filmes neutralizados em maior concentração de Na_2CO_3 ($\text{FA}_1\text{N}_{15}24$, $\text{FA}_1\text{N}_{15}48$, $\text{FA}_5\text{N}_{15}24$, $\text{FA}_5\text{N}_{15}48$ e $\text{FA}_7\text{N}_{15}24$, $\text{FA}_7\text{N}_{15}48$) (Figura 6.1), os primeiros demonstraram, em geral, um aumento na porosidade dos filmes com o aumento do tempo de neutralização. Os filmes preparados com a menor concentração de quitosana apresentaram os maiores valores de porosidade. Estes resultados confirmam os dados discutidos em relação à Tabela 6.1. A atuação conjunta entre os efeitos concentração de quitosana e tempo de neutralização pôde ser constatada nos valores superiores referentes à variação nos grupos (Tabela 6.5). Por outro lado, esta tendência de aumento no volume dos poros não foi evidenciada para os filmes preparados com maior concentração de sal carbonato de sódio. Correlacionando essas observações com os resultados de ANOVA, concluiu-se que, para o conjunto de filmes ($\text{FA}_5\text{N}_{15}24$ e $\text{FA}_5\text{N}_{15}48$), a não evidência de aumento dos percentuais de poros com o aumento do tempo de neutralização está relacionada com o efeito do tempo de neutralização na porosidade dos filmes cujo valor foi não significativo ($p > 0,05$ sendo $2,80 < 4,96$).

De acordo com a Tabela 6.5, o conjunto preparado com concentração de 1,7% de quitosana e 0,01 M de Na_2CO_3 apresentou valor de F_{obs} superior ($F_{obs} = 63$) ao dos conjuntos preparados com 1,1% ($F_{obs} = 32$) e 1,5% ($F_{obs} = 12$) de quitosana. Os percentuais de porosidade dos filmes preparados com concentração de 1,7% e 0,01 M de Na_2CO_3 foram mais significativos que os dos filmes preparados com 1,1 e 1,5% de quitosana. Em vista disso, o efeito do fator tempo de neutralização foi relevante para a formação de poros nesses filmes.

Analogamente, para conjunto preparado com concentração de 1,1% de quitosana e 0,05 M de Na_2CO_3 (Tabela 6.6), o valor de F_{obs} foi maior ($F_{obs} = 133$) que os dos conjuntos preparados com 1,5% ($F_{obs} = 2,80$) e 1,7% ($F_{obs} = 15$) de quitosana. Logo, os percentuais de porosidade dos filmes preparados com concentração de 1,1% e 0,05 M de Na_2CO_3 foram mais significativos que os dos filmes preparados com 1,5 e 1,7% de quitosana. O efeito do fator tempo de neutralização foi expressivo para a geração de poros.

Tabela 6.6 - Análise de Variância (ANOVA) de Fator Único [período de neutralização, (h)] para Comparação da Diferença entre as Médias dos Grupos [percentuais de porosidade (%P) dos filmes de quitosana preparados em ácido acético_(aq), em diferentes concentrações de quitosana, e neutralizados em NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,05) M durante 24 e 48 h] e das Variações Internas aos Grupos. Nível de significância: $p < 0,05$.

Conjunto	Graus de Liberdade (GL)	Fonte da Variação			F_{obs}
		Entre os Grupos (efeito do fator)	Nos Grupos (erro)	Total	
		1	10	11	
%P _{FA1N1524}	Soma Quadrática (SQ)	432	32,5	464,50	133
%P _{FA1N1548}	Média Quadrática (MQ)	432	3,25	-	
%P _{FA5N1524}	Soma Quadrática (SQ)	24,08	85,83	109,91	2,80
%P _{FA5N1548}	Média Quadrática (MQ)	24,08	8,58	-	
%P _{FA7N1524}	Soma Quadrática (SQ)	90,75	62	152,75	15
%P _{FA7N1548}	Média Quadrática (MQ)	90,75	6,20	-	

$F_{10}^1 = 4,96$. FA₁, FA₅ e FA₇: filmes de quitosana a 1,1; 1,5 e 1,7% (m/v) preparados em ácido acético_(aq); N₁₅: agente neutralizante NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,05) M; 24 e 48: período de imersão (h) dos filmes não neutralizados no agente neutralizante.

Os resultados da Figura 6.2 se referem ao percentual de porosidade dos filmes de quitosana preparados em ácido acético_(aq) ou ácido cítrico_(aq), fazendo uso de glicerol como plastificante e de NaOH:Na₂CO_{3(aq)} como neutralizante.

Uma vez que os filmes com concentrações de 1,1 e 1,7% de quitosana apresentaram percentuais de porosidade significativamente diferentes com volume de poros maiores para as formulações contendo 1,1% de quitosana e, devido ao efeito da concentração de Na₂CO₃ ter sido relevante à geração de poros para um período de neutralização de 24 h, selecionou-se, para estudos subsequentes de percentual de porosidade e grau de intumescimento dos filmes, a concentração de quitosana, 1,1% e tempo de neutralização de 24 h.

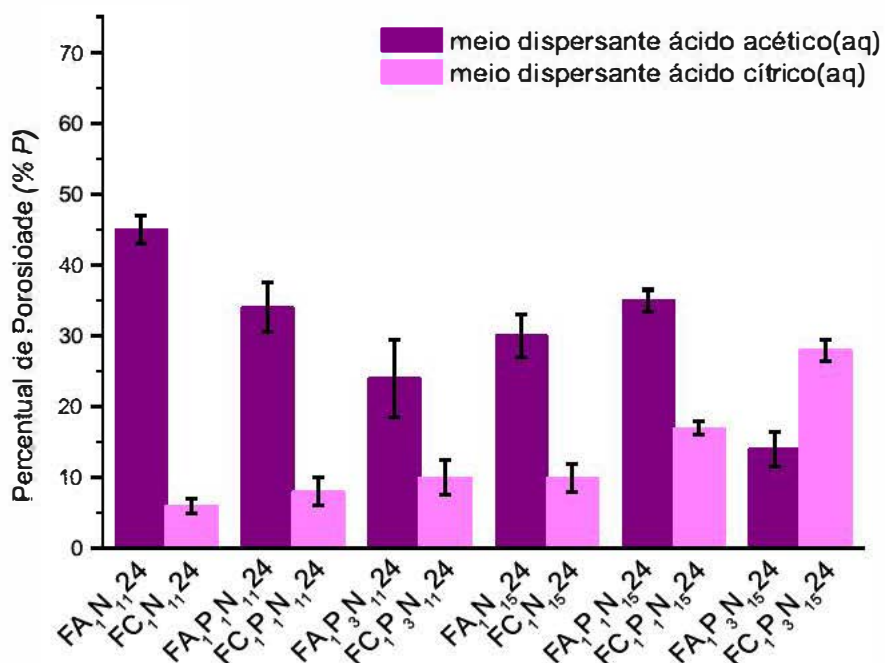


Figura 6.2 - Percentual de Porosidade (%P) em 4 h a $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ dos Filmes de Quitosana preparados em Ácido Acético_(aq) ou Ácido Cítrico_(aq), NaOH:Na₂CO_{3(aq)} como Agente Neutralizante e Glicerol como Plastificante: FA₁ e FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados, respectivamente, em ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq); P₁ e P₃: plastificante glicerol (13 e 33% m/m, respectivamente); N₁₁ e N₁₅: agente neutralizante NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,01) e (1:0,05) M, respectivamente; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

A partir da análise visual e tátil dos filmes preparados, filmes de quitosana neutralizados e não plastificados preparados em ácido acético_(aq) apresentaram-se com superfícies brilhantes e sem características adesivas. Na comparação com os filmes plastificados, os últimos mostraram-se com características semelhantes.

Os filmes neutralizados e não plastificados preparados em ácido cítrico_(aq), apresentaram-se opacos e ligeiramente adesivos. Na comparação com os filmes plastificados, os últimos mostraram-se menos opacos e ligeiramente adesivos. Essas características foram observadas para ambos os filmes preparados com 13 e 33% de glicerol independentemente do meio dispersante utilizado na confecção dos filmes.

Conforme se pôde observar na Figura 6.2, em princípio, os filmes neutralizados preparados em ácido acético_(aq) (FA₁N₁₁24, FA₁P₁N₁₁24, FA₁P₃N₁₁24 e FA₁N₁₅24, FA₁P₁N₁₅24, FA₁P₃N₁₅24) apresentaram valores diferenciados de percentual de poros se comparados aos filmes preparados em ácido cítrico_(aq) (FC₁N₁₁24, FC₁P₁N₁₁24, FC₁P₃N₁₁24 e

FC₁N₁₅24, FC₁P₁N₁₅24, FC₁P₃N₁₅24). Os valores referentes aos percentuais de porosidade para os filmes neutralizados preparados em ácido acético_(aq) foram superiores aos preparados em ácido cítrico_(aq). O ácido cítrico por ser um ácido orgânico tricarbóxico, ocorre maior interação entre esse ácido e a quitosana formando filmes de estruturas mais compactas²⁰⁶. Consequentemente, quanto maior a compactação da estrutura da matriz polimérica gerada, maior a tendência à redução nos volumes de poros.

Em relação às Tabelas 6.7 e 6.8, todos os valores de F_{obs} , de um modo geral, para cada conjunto de filmes preparados foram maiores que o valor crítico ($F_{obs} > 3,68$). Sendo assim, os percentuais de porosidade de cada conjunto são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Comparando-se os valores de F_{obs} dos conjuntos de filmes preparados com ácido acético_(aq) (Tabela 6.7) com os dos conjuntos preparados com ácido cítrico_(aq) (Tabela 6.8), observou-se que, para todos os conjuntos de filmes preparados em ácido acético_(aq), o efeito da concentração de plastificante para a formação de poros foi expressivo. Para os grupos de filmes neutralizados contendo 0,05 M de Na₂CO₃, o valor foi superior aos dos grupos de filmes neutralizados contendo 0,01 M de Na₂CO₃.

Tabela 6.7 – Análise de Variância (ANOVA) de Fator Único [percentual de plastificante, % (m/m)] para Comparação da Diferença entre as Médias dos Grupos [percentuais de porosidade (%P) dos filmes de quitosana, concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido acético_(aq) com plastificante nos percentuais de 0, 13 e 33% (m/m) e neutralizados em NaOH:Na₂CO_{3(aq)} durante 24 h] e das Variações Internas aos Grupos. Nível de significância: $p < 0,05$.

Conjunto	Graus de Liberdade (GL)	Fonte da Variação			F_{obs}
		Entre os Grupos (efeito do fator)	Nos Grupos (erro)	Total	
		2	15	17	
%P _{FA1N1124}	Soma Quadrática (SQ)	1344,11	121,66	1465,77	83
%P _{FA1P1N1124}	Média Quadrática (MQ)	672,05	8,11	-	
%P _{FA1P3N1124}					
%P _{FA1N1524}	Soma Quadrática (SQ)	1371	45	1416	228
%P _{FA1P1N1524}	Média Quadrática (MQ)	685,5	3	-	
%P _{FA1P3N1524}					

$F_{15}^2 = 3,68$. FA₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados em ácido acético_(aq); P₁ e P₃: plastificante glicerol (13 e 33% m/m, respectivamente); N₁₁ e N₁₅: agente neutralizante NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,01) e (1:0,05) M, respectivamente; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

De acordo com a Tabela 6.8, o conjunto de filmes neutralizados contendo 0,01 M de Na_2CO_3 e preparados em ácido cítrico_(aq) apresentou valor de F_{obs} muito inferior ($F_{obs} = 5,81$) ao do conjunto de filmes neutralizados contendo 0,05 M de Na_2CO_3 ($F_{obs} = 389$). Pelo fato deste valor ter sido mais intenso que o primeiro, neste caso, considerou-se que os filmes neutralizados contendo 0,01 M de Na_2CO_3 e preparados em ácido cítrico_(aq) não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$). Diante disso, pode-se afirmar, que dentre os conjuntos de filmes preparados em ácido cítrico_(aq), o efeito da adição de plastificante nos percentuais de porosidade dos filmes neutralizados contendo 0,05 M de Na_2CO_3 foram, na verdade, significativos.

Tabela 6.8 – Análise de Variância (ANOVA) de Fator Único [percentual de plastificante, % (m/m)] para Comparação da Diferença entre as Médias dos Grupos [percentuais de porosidade (%P) dos filmes de quitosana, concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido cítrico_(aq) com plastificante nos percentuais de 0, 13 e 33% (m/m) e neutralizados em $\text{NaOH}:\text{Na}_2\text{CO}_3$ _(aq) durante 24 h] e das Variações Internas aos Grupos. Nível de significância: $p < 0,05$.

Conjunto	Graus de Liberdade (GL)	Fonte da Variação			F_{obs}
		Entre os Grupos (efeito do fator)	Nos Grupos (erro)	Total	
		2	15	17	
%P _{FC1N1124}	Soma Quadrática (SQ)	48,80	63	111,80	5,81
%P _{FC1P1N1124}	Média Quadrática (MQ)	24,40	4,20	-	
%P _{FC1P3N1124}					
%P _{FC1N1524}	Soma Quadrática (SQ)	988	19	1007	389
%P _{FC1P1N1524}	Média Quadrática (MQ)	494	1,27	-	
%P _{FC1P3N1524}					

$F_{15}^2 = 3,68$. FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados em ácido cítrico_(aq); P₁ e P₃: plastificante glicerol (13 e 33% m/m, respectivamente); N₁₁ e N₁₅: agente neutralizante $\text{NaOH}:\text{Na}_2\text{CO}_3$ _(aq) (1:0,01) e (1:0,05) M, respectivamente; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

Correlacionando-se os resultados da Figura 6.2 com os das Tabelas 6.7 e 6.8, pôde-se observar que a adição de glicerol nos filmes neutralizados com a menor concentração de Na_2CO_3 (FA₁P₁N₁₁24, FC₁P₁N₁₁24 e FA₁P₃N₁₁24, FC₁P₃N₁₁24) exerceu influência na redução dos percentuais de poros para os filmes obtidos em ácido acético_(aq), porém, para os filmes preparados em ácido cítrico_(aq), tal comportamento não foi observado. A adição do

plastificante não proporcionou mudanças significativas ($p > 0,05$) nos volumes de poros. Contudo, a adição de glicerol nos filmes neutralizados com a maior concentração de Na_2CO_3 ($\text{FA}_1\text{P}_1\text{N}_{15}24$, $\text{FC}_1\text{P}_1\text{N}_{15}24$ e $\text{FA}_1\text{P}_3\text{N}_{15}24$, $\text{FC}_1\text{P}_3\text{N}_{15}24$) propiciou mudanças nos resultados para ambos os filmes preparados nos diferentes meios dispersantes utilizados nesses experimentos ($p < 0,05$). Em comparação com os filmes neutralizados contendo 0,01 M de Na_2CO_3 , os percentuais de poros foram maiores para os filmes neutralizados contendo 0,05 M de Na_2CO_3 , obtidos em ácido cítrico_(aq) e menores para os filmes neutralizados nesta concentração de sal e preparados em ácido acético_(aq).

De acordo com a literatura^{207,208}, a formação de hidrogéis físicos de quitosana (sais de quitosana) é dependente de fatores que atuam na modificação do balanço hidrofóbico/hidrofílico das soluções salinas. Por sua vez, um desses fatores é a densidade de carga, a qual está relacionada à constante dielétrica do meio. Sabe-se que a adição de álcoois a uma mistura de solvente (água) e ácido, origina um meio dispersante com constante dielétrica inferior a da mistura água + ácido. Uma redução na constante dielétrica do meio desfavorece a geração de sítios catiônicos $-\text{NH}_3^+$ nas cadeias de quitosana, o que diminui a densidade de carga aparente nas cadeias do polímero, propiciando à formação de uma rede polimérica através de interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio entre as cadeias. Quanto maior essas interações, possivelmente, menor a tendência de formação de poros no material. Portanto, para os filmes neutralizados contendo 0,01 M de Na_2CO_3 e preparados em ácido acético_(aq), o efeito da adição de plastificante proporcionou o aumento nas interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio entre as cadeias de quitosana do hidrogel, resultando no decréscimo do volume de poros do filme.

Tabela 6.9 – Teste de Tukey para o Módulo da Diferença entre as Médias [percentuais de porosidade (%P) dos filmes de quitosana, concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido acético_(aq) ou ácido cítrico_(aq) com plastificante nos percentuais de 0, 13 e 33% (m/m) e neutralizados em NaOH:Na₂CO_{3(aq)} durante 24 h].

	Módulo da Diferença entre as Médias	Diferença Menos Significativa (DMS)	Significância
$ \%P_{FA1P1N1124} - \%P_{FA1N1124} $	+11		sim
$ \%P_{FA1P3N1124} - \%P_{FA1N1124} $	+21	4,27	sim
$ \%P_{FA1P3N1124} - \%P_{FA1P1N1124} $	+10		sim
$ \%P_{FA1P1N1524} - \%P_{FA1N1524} $	+5		sim
$ \%P_{FA1P3N1524} - \%P_{FA1N1524} $	+16	2,60	sim
$ \%P_{FA1P3N1524} - \%P_{FA1P1N1524} $	+21		sim
$ \%P_{FC1P1N1124} - \%P_{FC1N1124} $	+2		não
$ \%P_{FC1P3N1124} - \%P_{FC1N1124} $	+4	3,07	sim
$ \%P_{FC1P3N1124} - \%P_{FC1P1N1124} $	+2		não
$ \%P_{FC1P1N1524} - \%P_{FC1N1524} $	+7		sim
$ \%P_{FC1P3N1524} - \%P_{FC1N1524} $	+18	1,69	sim
$ \%P_{FC1P3N1524} - \%P_{FC1P1N1524} $	+11		sim

FA₁ e FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados, respectivamente, em ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq); P₁ e P₃: plastificante glicerol (13 e 33% m/m, respectivamente); N₁₁ e N₁₅: agente neutralizante NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,01) e (1:0,05) M, respectivamente; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

A partir do Teste de Tukey para o módulo da diferença entre os valores de percentual de porosidade dos filmes em questão (Tabela 6.9), constatou-se que o módulo da diferença entre os valores de porosidade dos filmes neutralizados preparados em ácido acético_(aq) foram maiores que DMS, assim, esses valores diferiram significativamente.

Em relação ao módulo da diferença entre os valores de porosidade dos filmes neutralizados preparados em ácido cítrico_(aq), para os filmes neutralizados contendo maior concentração de Na₂CO₃, esses valores foram superiores a DMS, portanto, diferiram significativamente. Contudo, para os filmes neutralizados contendo menor concentração de Na₂CO₃, o módulo da diferença foi menor que DMS, exceto para o módulo da diferença entre $|\%P_{FC1P3N1124} - \%P_{FC1N1124}|$. Os valores de percentual de porosidade desses filmes não diferiram significativamente.

Pode-se concluir a partir do Teste de Tukey, que diante da igualdade entre os percentuais de porosidade dos filmes neutralizados contendo 0,01 M de Na_2CO_3 e preparados com ácido cítrico_(aq) que a adição de plastificante glicerol não proporcionou correlação entre percentual de plastificante e percentual de poros nestas condições.

Analisando-se as Tabelas 6.10 e 6.11, os conjuntos de filmes neutralizados com diferentes concentrações Na_2CO_3 ($\text{FA}_1\text{N}_{1124}$ e $\text{FA}_1\text{N}_{1524}$), ($\text{FA}_1\text{P}_1\text{N}_{1124}$ e $\text{FA}_1\text{P}_1\text{N}_{1524}$) e ($\text{FA}_1\text{P}_3\text{N}_{1124}$ e $\text{FA}_1\text{P}_3\text{N}_{1524}$) apresentaram valores diferenciados de F_{obs} se comparados aos conjuntos de filmes neutralizados com diferentes concentrações de Na_2CO_3 ($\text{FC}_1\text{N}_{1124}$ e $\text{FC}_1\text{N}_{1524}$), ($\text{FC}_1\text{P}_1\text{N}_{1124}$ e $\text{FC}_1\text{P}_1\text{N}_{1524}$), ($\text{FC}_1\text{P}_3\text{N}_{1124}$ e $\text{FC}_1\text{P}_3\text{N}_{1524}$). Todos os valores de F_{obs} para cada conjunto (exceto os grupos de filmes $\text{FA}_1\text{P}_1\text{N}_{1124}$ e $\text{FA}_1\text{P}_1\text{N}_{1524}$) foram maiores que o valor crítico ($F_{obs} > 4,96$). Portanto, os percentuais de porosidade são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Tabela 6.10 - Análise de Variância (ANOVA) de Fator Único [agente neutralizante, $\text{NaOH}:\text{Na}_2\text{CO}_3$ _(aq) (M:M)] para Comparação da Diferença entre as Médias dos Grupos [percentuais de porosidade (%P) dos filmes de quitosana, concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido acético_(aq), com e sem plastificante, e neutralizados em $\text{NaOH}:\text{Na}_2\text{CO}_3$ _(aq) (1:0,01) e (1:0,05) M, respectivamente, durante 24 h] e das Variações Internas aos Grupos. Nível de significância: $p < 0,05$.

Conjunto	Graus de Liberdade (GL)	Fonte da Variação			F_{obs}
		Entre os Grupos (efeito do fator)	Nos Grupos (erro)	Total	
		1	10	11	
$\%P_{\text{FA}_1\text{N}_{1124}}$	Soma Quadrática (SQ)	675	36	711	188
$\%P_{\text{FA}_1\text{N}_{1524}}$	Média Quadrática (MQ)	675	3,60	-	
$\%P_{\text{FA}_1\text{P}_1\text{N}_{1124}}$	Soma Quadrática (SQ)	1,33	32,83	34,16	0,40
$\%P_{\text{FA}_1\text{P}_1\text{N}_{1524}}$	Média Quadrática (MQ)	1,33	3,28	-	
$\%P_{\text{FA}_1\text{P}_3\text{N}_{1124}}$	Soma Quadrática (SQ)	261,33	97,83	359,16	27
$\%P_{\text{FA}_1\text{P}_3\text{N}_{1524}}$	Média Quadrática (MQ)	261,33	9,78	-	

$F_{10}^1 = 4,96$. FA_1 : filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados em ácido acético_(aq); P_1 e P_3 : plastificante glicerol (13 e 33% m/m, respectivamente); N_{11} e N_{15} : agente neutralizante $\text{NaOH}:\text{Na}_2\text{CO}_3$ _(aq) (1:0,01) e (1:0,05) M, respectivamente; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

Em relação aos resultados de ANOVA apresentados na Tabela 6.10, verificou-se que os valores de F_{obs} para os conjuntos de filmes neutralizados com e sem plastificante preparados em ácido acético_(aq), sofreram uma redução. Neste caso, o efeito da concentração de Na₂CO₃ foi reduzido com a adição de 33% de glicerol, o que ocasionou menor valor de volume de poros para o filme FA₁P₃N₁₅24 (Figura 6.2).

Tabela 6.11 - Análise de Variância (ANOVA) de Fator Único [agente neutralizante, NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (M:M)] para Comparação da Diferença entre as Médias dos Grupos [percentuais de porosidade (%P) dos filmes de quitosana, concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido cítrico_(aq), com e sem plastificante, e neutralizados em NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,01) e (1:0,05) M, respectivamente, durante 24 h] e das Variações Internas aos Grupos. Nível de significância: $p < 0,05$.

Conjunto	Graus de Liberdade (GL)	Fonte da Variação			F_{obs}
		Entre os Grupos (efeito do fator)	Nos Grupos (erro)	Total	
		1	10	11	
%P _{FC1N1124}	Soma Quadrática (SQ)	48,80	12,51	61,31	39
%P _{FC1N1524}	Média Quadrática (MQ)	48,80	1,25	-	
%P _{FC1P1N1124}	Soma Quadrática (SQ)	243	42,50	285,5	57
%P _{FC1P1N1524}	Média Quadrática (MQ)	243	4,25	-	
%P _{FC1P3N1124}	Soma Quadrática (SQ)	972	27	999	360
%P _{FC1P3N1524}	Média Quadrática (MQ)	972	2,70	-	

$F_{10}^1 = 4,96$. FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados em ácido cítrico_(aq); P₁ e P₃: plastificante glicerol (13 e 33% m/m, respectivamente); N₁₁ e N₁₅: agente neutralizante NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,01) e (1:0,05) M, respectivamente; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

Em contrapartida, comportamento inverso ocorreu para os conjuntos preparados em ácido cítrico_(aq) (Tabela 6.11), ou seja, verificou-se um aumento nos valores de F_{obs} . Para estes conjuntos de filmes, houve um crescimento do efeito da concentração de Na₂CO₃ com a adição de glicerol. O aumento na concentração de glicerol propiciou redução das interações entre o ácido cítrico e a quitosana, assim, um aumento da intensidade do efeito do Na₂CO₃ quanto à produção de CO_{2(g)} foi observado. O CO_{2(g)}, produto das reações de hidrólise do

ânion $\text{CO}_3^{2-}(\text{aq})$, permitiu a diminuição da compactação desses filmes promovendo maior formação de poros nos filmes preparados em ácido cítrico $_{(\text{aq})}$.

Tabela 6.12 - Análise de Variância (ANOVA) de Fator Único (meio dispersante) para Comparação da Diferença entre as Médias dos Grupos [percentuais de porosidade ($\%P$) dos filmes de quitosana, concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido acético $_{(\text{aq})}$ e ácido cítrico $_{(\text{aq})}$, com e sem plastificante, e neutralizados em $\text{NaOH}:\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{aq})$ (1:0,01) M durante 24 h] e das Variações Internas aos Grupos. Nível de significância: $p < 0,05$.

Conjunto	Graus de Liberdade (GL)	Fonte da Variação			F_{obs}
		Entre os Grupos (efeito do fator)	Nos Grupos (erro)	Total	
		1	10	11	
$\%P_{\text{FA}_1\text{N}_{11}24}$	Soma Quadrática (SQ)	4570,80	12,51	4583,31	3657
$\%P_{\text{FC}_1\text{N}_{11}24}$	Média Quadrática (MQ)	4570,80	1,25	-	
$\%P_{\text{FA}_1\text{P}_1\text{N}_{11}24}$	Soma Quadrática (SQ)	2080,33	66,33	2146,66	314
$\%P_{\text{FC}_1\text{P}_1\text{N}_{11}24}$	Média Quadrática (MQ)	2080,33	6,63	-	
$\%P_{\text{FA}_1\text{P}_3\text{N}_{11}24}$	Soma Quadrática (SQ)	574,08	105,83	679,91	54
$\%P_{\text{FC}_1\text{P}_3\text{N}_{11}24}$	Média Quadrática (MQ)	574,08	10,58	-	

$F_{10}^1 = 4,96$. FA_1 e FC_1 : filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados, respectivamente, em ácido acético $_{(\text{aq})}$ e ácido cítrico $_{(\text{aq})}$; P_1 e P_3 : plastificante glicerol (13 e 33% m/m, respectivamente); N_{11} : agente neutralizante $\text{NaOH}:\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{aq})$ (1:0,01) M; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

Os resultados apresentados nas Tabelas 6.12 e 6.13 permitiram inferir que os conjuntos de filmes neutralizados contendo 0,01 M de Na_2CO_3 preparados em diferentes meios dispersantes ($\text{FA}_1\text{N}_{11}24$ e $\text{FC}_1\text{N}_{11}24$), ($\text{FA}_1\text{P}_1\text{N}_{11}24$ e $\text{FC}_1\text{P}_1\text{N}_{11}24$) e ($\text{FA}_1\text{P}_3\text{N}_{11}24$ e $\text{FC}_1\text{P}_3\text{N}_{11}24$) tiveram valores diferenciados de F_{obs} se comparados aos conjuntos preparados em concentração de 0,05 M de Na_2CO_3 ($\text{FA}_1\text{N}_{15}24$ e $\text{FC}_1\text{N}_{15}24$), ($\text{FA}_1\text{P}_1\text{N}_{15}24$ e $\text{FC}_1\text{P}_1\text{N}_{15}24$) e ($\text{FA}_1\text{P}_3\text{N}_{15}24$ e $\text{FC}_1\text{P}_3\text{N}_{15}24$). Todos os valores de F_{obs} para cada conjunto foram maiores que o valor crítico ($F_{obs} > 4,96$). Em vista disso, os percentuais de porosidade de cada conjunto são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Em relação aos resultados de ANOVA referente às Tabelas 6.12 e 6.13, pode-se afirmar que, em princípio, o meio dispersante exerceu influência nos resultados de percentual

de porosidade dos filmes. Pôde-se constatar que a influência do meio dispersante foi diferente para os filmes neutralizados contendo 0,01 M de carbonato de sódio. À vista disso, constatou-se que o conjunto de filmes FA₁N₁₁24 e FC₁N₁₁24 apresentou valor de F_{obs} superior aos demais conjuntos (FA₁P₁N₁₁24 e FC₁P₁N₁₁24) e (FA₁P₃N₁₁24 e FC₁P₃N₁₁24). Este maior valor de F_{obs} , segundo a ANOVA, correspondeu à redução significativa do percentual de poros com a mudança do meio dispersante. Por sua vez, a adição de glicerol nos filmes propiciou um decréscimo nos valores de F_{obs} , isto é, um decréscimo do efeito do meio dispersante na formação de poros foi constatado.

Tabela 6.13 - Análise de Variância (ANOVA) de Fator Único (meio dispersante) para Comparação da Diferença entre as Médias dos Grupos [percentuais de porosidade (%P) dos filmes de quitosana, concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq), com e sem plastificante, e neutralizados em NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,05) M durante 24 h] e das Variações Internas aos Grupos. Nível de significância: $p < 0,05$.

Conjunto	Graus de Liberdade (GL)	Fonte da Variação			F_{obs}
		Entre os Grupos (efeito do fator)	Nos Grupos (erro)	Total	
		1	10	11	
%P _{FA1N1524}	Soma Quadrática (SQ)	1200	36	1236	333
%P _{FC1N1524}	Média Quadrática (MQ)	1200	3,60	-	
%P _{FA1P1N1524}	Soma Quadrática (SQ)	972	9	981	1080
%P _{FC1P1N1524}	Média Quadrática (MQ)	972	0,90	-	
%P _{FA1P3N1524}	Soma Quadrática (SQ)	546,75	19	565,75	288
%P _{FC1P3N1524}	Média Quadrática (MQ)	546,75	1,90	-	

$F_{10}^1 = 4,96$. FA₁ e FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados, respectivamente, em ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq); P₁ e P₃: plastificante glicerol (13 e 33% m/m, respectivamente); N₁₅: agente neutralizante NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,05) M; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

De acordo com a Tabela 6.13, para os filmes obtidos a partir da maior concentração de Na₂CO₃, pôde-se verificar um comportamento inverso aos filmes neutralizados com 0,01 M de Na₂CO₃: a adição de plastificante propiciou aumento no efeito do meio dispersante para a porosidade dos filmes. Exceção foi constatada para os conjuntos de filmes FA₁P₃N₁₅24 e

FC₁P₃N₁₅24. Neste caso, a influência do meio dispersante para a geração de poros foi reduzida, pois interações de outra natureza podem ter ocorrido. O maior valor referente à variação nos grupos (MQ = 1,90) se comparado aos filmes preparados com a menor concentração de plastificante (FA₁P₁N₁₅24 e FC₁P₁N₁₅24; MQ = 0,90) confirmou essa hipótese.

6.1.2. Avaliação Estatística dos Efeitos dos Fatores Percentual de Plastificante, Agente Neutralizante e Meio Dispersante no Grau de Intumescimento dos Filmes de Quitosana

De acordo com a Figura 6.3, verificou-se que os valores de grau de intumescimento dos filmes neutralizados preparados em ácido acético_(aq) (FA₁N₁₁24, FA₁P₁N₁₁24, FA₁P₃N₁₁24, FA₁N₁₅24, FA₁P₁N₁₅24 e FA₁P₃N₁₅24) foram diferenciados se comparados aos filmes preparados em ácido cítrico_(aq) (FC₁N₁₁24, FC₁P₁N₁₁24, FC₁P₃N₁₁24, FC₁N₁₅24, FC₁P₁N₁₅24 e FC₁P₃N₁₅24). Todos os filmes preparados em ácido cítrico_(aq), fazendo uso ou não do plastificante, obtiveram os maiores valores de grau de intumescimento.

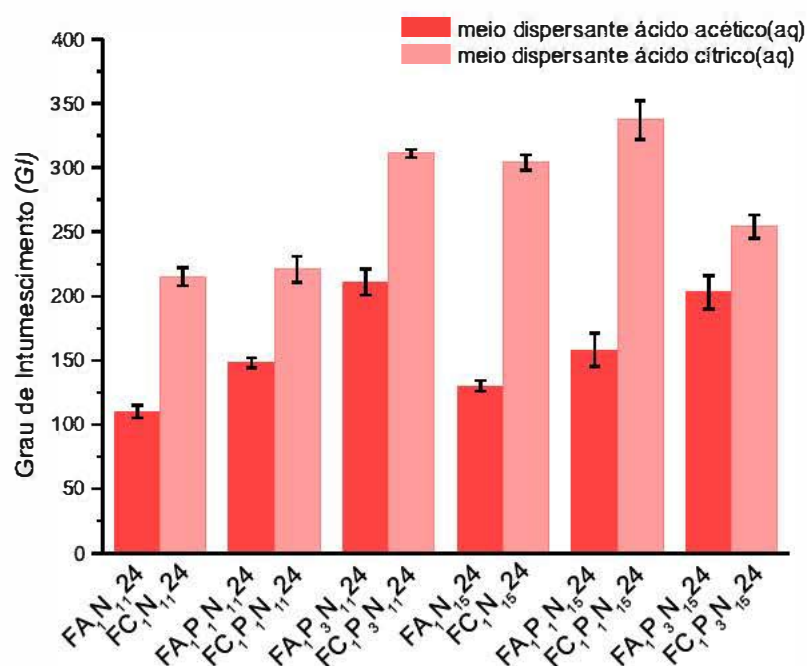


Figura 6.3 - Grau de Intumescimento (GI) em 24 h, a T = 25 °C dos Filmes de Quitosana preparados em Ácido Acético_(aq) ou Ácido Cítrico_(aq), NaOH:Na₂CO_{3(aq)} como Agente Neutralizante e Glicerol como Plastificante: FA₁ e FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados, respectivamente, em ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq); P₁ e P₃: plastificante glicerol (13 e 33% m/m, respectivamente); N₁₁ e N₁₅: agente neutralizante NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,01) e (1:0,05) M, respectivamente; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

Tabela 6.14 - Análise de Variância (ANOVA) de Fator Único [percentual de plastificante, % (m/m)] para Comparação da Diferença entre as Médias dos Grupos [grau de intumescimento (*GI*) dos filmes de quitosana, concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido acético_(aq) com plastificante nos percentuais de 0, 13 e 33% (m/m) e neutralizados em NaOH:Na₂CO_{3(aq)} durante 24 h] e das Variações Internas aos Grupos. Nível de significância: $p < 0,05$.

Conjunto	Graus de Liberdade (GL)	Fonte da Variação			F_{obs}
		Entre os Grupos (efeito do fator)	Nos Grupos (erro)	Total	
		2	15	17	
GI_{FA1N1124}	Soma Quadrática (SQ)	31118,77	332,83	21451,60	701
GI_{FA1P1N1124}	Média Quadrática (MQ)	15553,05	22,18	-	
GI_{FA1P3N1124}					
GI_{FA1N1524}	Soma Quadrática (SQ)	16880,77	927,50	17808,27	136
GI_{FA1P1N1524}	Média Quadrática (MQ)	8439,80	61,83	-	
GI_{FA1P3N1524}					

$F_{15}^2 = 3,68$. FA₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados em ácido acético_(aq); P₁ e P₃: plastificante glicérol (13 e 33% m/m, respectivamente); N₁₁ e N₁₅: agente neutralizante NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,01) e (1:0,05) M, respectivamente; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

Analisando-se o efeito da adição de plastificante aos filmes, de um modo geral, houve aumento do grau de intumescimento devido ao caráter hidrofílico do plastificante^{209,210}. Essas observações são confirmadas a partir dos resultados de ANOVA (Tabelas 6.14 e 6.15). Em princípio, verificou-se que os valores de F_{obs} para cada conjunto de filmes preparados foram maiores que o valor crítico ($F_{obs} > 3,68$). Em vista disso, pode-se afirmar que os valores de grau de intumescimento são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Tabela 6.15 - Análise de Variância (ANOVA) de Fator Único [percentual de plastificante, % (m/m)] para Comparação da Diferença entre as Médias dos Grupos [grau de intumescimento (*GI*) dos filmes de quitosana, concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido cítrico_(aq) com plastificante nos percentuais de 0, 13 e 33% (m/m) e neutralizados em NaOH:Na₂CO_{3(aq)} durante 24 h] e das Variações Internas aos Grupos. Nível de significância: $p < 0,05$.

Conjunto	Graus de Liberdade (GL)	Fonte da Variação			F_{obs}
		Entre os Grupos (efeito do fator)	Nos Grupos (erro)	Total	
		2	15	17	
GI_{FC1N1124}	Soma Quadrática (SQ)	34940,77	488,83	35429,60	641
GI_{FC1P1N1124}	Média Quadrática (MQ)	17470,38	27,26	-	
GI_{FC1P3N1124}					
GI_{FC1N1524}	Soma Quadrática (SQ)	20790,30	369,66	21159,96	422
GI_{FC1P1N1524}	Média Quadrática (MQ)	10393,15	24,64	-	
GI_{FC1P3N1524}					

$F_{15}^2 = 3,68$. FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados em ácido cítrico_(aq); P₁ e P₃: plastificante glicérol (13 e 33% m/m, respectivamente); N₁₁ e N₁₅: agente neutralizante NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,01) e (1:0,05) M, respectivamente; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

O conjunto de filmes neutralizados contendo 0,05 M de carbonato de sódio e preparados em ácido cítrico_(aq) (Tabela 6.15) apresentou valor de F_{obs} superior ($422 > 136$) ao conjunto de filmes neutralizados contendo 0,05 M de Na₂CO₃ e preparados em ácido acético_(aq) (Tabela 6.14). Esta observação está de acordo com os resultados referentes ao grau de intumescimento dos filmes (Figura 6.3). Os filmes neutralizados contendo 0,05 M de carbonato de sódio e preparados em ácido cítrico_(aq) obtiveram valores de grau de intumescimento superiores aos filmes neutralizados nas mesmas condições e preparados em ácido acético_(aq). Diante disso, constatou-se que o efeito da adição de glicérol foi relevante para os conjuntos de filmes neutralizados contendo 0,05 M Na₂CO₃ e obtidos em ácido cítrico_(aq).

Tabela 6.16 – Teste de Tukey para o Módulo da Diferença entre as Médias [grau de intumescimento (*GI*) dos filmes de quitosana, concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido acético_(aq) ou ácido cítrico_(aq) com plastificante nos percentuais de 0, 13 e 33% (m/m) e neutralizados em NaOH:Na₂CO_{3(aq)} durante 24 h].

	Módulo da Diferença entre as Médias	Diferença Menos Significativa (DMS)	Significância
GI _{FA1P1N1124} - GI _{FA1N1124}	+38		sim
GI _{FA1P3N1124} - GI _{FA1N1124}	+11	7,06	sim
GI _{FA1P3N1124} - GI _{FA1P1N1124}	+63		sim
GI _{FA1P1N1524} - GI _{FA1N1524}	+28		sim
GI _{FA1P3N1524} - GI _{FA1N1524}	+73	11,78	sim
GI _{FA1P3N1524} - GI _{FA1P1N1524}	+45		sim
GI _{FC1P1N1124} - GI _{FC1N1124}	+6		não
GI _{FC1P3N1124} - GI _{FC1N1124}	+96	7,82	sim
GI _{FC1P3N1124} - GI _{FC1P1N1124}	+93		sim
GI _{FC1P1N1524} - GI _{FC1N1524}	+33		sim
GI _{FC1P3N1524} - GI _{FC1N1524}	+50	7,44	sim
GI _{FC1P3N1524} - GI _{FC1P1N1524}	+83		sim

FA₁ e FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados, respectivamente em ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq); P₁ e P₃: plastificante glicerol (13 e 33% m/m, respectivamente); N₁₁ e N₁₅: agente neutralizante NaOH:Na₂CO_{3(aq)} [(1:0,01) e (1:0,05) M, respectivamente]; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

Conforme o teste de Tukey para o módulo da diferença entre os valores de grau de intumescimento dos filmes (Tabela 6.16), constatou-se que o módulo da diferença entre valores de grau de intumescimento dos filmes neutralizados preparados em ácido acético_(aq) foram maiores que DMS, portanto, esses valores diferiram significativamente.

Analisando-se o módulo da diferença entre os valores de grau de intumescimento dos filmes neutralizados preparados em ácido cítrico_(aq), para os filmes neutralizados com maior concentração de Na₂CO₃, esses valores foram superiores a DMS, logo, diferiram significativamente. Por outro lado, para os filmes neutralizados contendo menor concentração de Na₂CO₃, o módulo da diferença foi menor que DMS somente para os filmes FC₁N₁₁24 e FC₁P₁N₁₁24. Os valores de grau de intumescimento não diferiram significativamente.

Diante dos resultados apresentados pelo Teste de Tukey, pode-se afirmar que, devido a não significância entre os resultados de grau de intumescimento dos filmes FC₁N₁₁24 e FC₁P₁N₁₁24, que esses valores não tiveram correlação entre concentração de plastificante e grau de intumescimento nestas condições. Porém, ao contrário do teste de Tukey para a diferença entre os percentuais de porosidade dos filmes (Tabela 6.9), o aumento da concentração de plastificante glicerol de 13 para 33% nos filmes com menor concentração de Na₂CO₃ foi significativo para a diferença entre os valores de grau de intumescimento dos filmes FC₁P₁N₁₁24 e FC₁P₃N₁₁24. O efeito do glicerol foi expressivo para o intumescimento do filme com a maior concentração de glicerol, FC₁P₃N₁₁24.

Tabela 6.17 - Análise de Variância (ANOVA) de Fator Único [agente neutralizante, NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (M:M)] para Comparação da Diferença entre as Médias dos Grupos [grau de intumescimento (*GI*) dos filmes de quitosana, concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido acético_(aq), com e sem plastificante, e neutralizados em NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,01) e (1:0,05) M, respectivamente, durante 24 h] e das Variações Internas aos Grupos. Nível de significância: $p < 0,05$.

Conjunto	Graus de Liberdade (GL)	Fonte da Variação			F_{obs}
		Entre os Grupos (efeito do fator)	Nos Grupos (erro)	Total	
		1	10	11	
GI_{FA1N1124}	Soma Quadrática (SQ)	1045,33	171,33	1216,66	61
GI_{FA1N1524}	Média Quadrática (MQ)	1045,33	17,13	-	
GI_{FA1P1N1124}	Soma Quadrática (SQ)	320,33	451,33	771,66	7,10
GI_{FA1P1N1524}	Média Quadrática (MQ)	320,33	45,13	-	
GI_{FA1P3N1124}	Soma Quadrática (SQ)	176,34	637,66	814	2,76
GI_{FA1P3N1524}	Média Quadrática (MQ)	176,34	63,76	-	

$F_{10}^1 = 4,96$. FA₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados em ácido acético_(aq); P₁ e P₃: plastificante glicerol (13 e 33% m/m, respectivamente); N₁₁ e N₁₅: agente neutralizante NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,01) e (1:0,05) M, respectivamente; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

Em relação aos resultados de ANOVA da Tabela 6.17, verificou-se que os valores de F_{obs} para cada conjunto de filmes preparados, exceto para o conjunto (FA₁P₃N₁₁24 e FA₁P₃N₁₅24), foram maiores que o valor crítico ($F_{obs} > 4,96$), logo, se pode afirmar que os valores de grau de intumescimento de cada conjunto são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Contudo, devido à relevância do valor de F_{obs} para o conjunto de filmes (FA₁N₁₁24 e FA₁N₁₅24), considerou-se que somente este conjunto obteve valores de grau de intumescimento significativamente diferentes ($p < 0,05$). Assim, para estes grupos de filmes, o efeito da concentração de Na₂CO₃ foi fundamental.

Tabela 6.18 - Análise de Variância (ANOVA) de Fator Único [agente neutralizante, NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (M:M)] para Comparação da Diferença entre as Médias dos Grupos [grau de intumescimento (G_I) dos filmes de quitosana, concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido cítrico_(aq), com e sem plastificante, e neutralizados em NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,01) e (1:0,05) M, respectivamente, durante 24 h] e das Variações Internas aos Grupos. Nível de significância: $p < 0,05$.

Conjunto	Graus de Liberdade (GL)	Fonte da Variação			F_{obs}
		Entre os Grupos (efeito do fator)	Nos Grupos (erro)	Total	
		1	10	11	
G_IFC₁N₁₁24	Soma Quadrática (SQ)	24300	206,66	24506,66	1176
G_IFC₁N₁₅24	Média Quadrática (MQ)	24300	20,66	-	
G_IFC₁P₁N₁₁24	Soma Quadrática (SQ)	41184,08	324,83	41508,91	1268
G_IFC₁P₁N₁₅24	Média Quadrática (MQ)	41184,08	32,48	-	
G_IFC₁P₃N₁₁24	Soma Quadrática (SQ)	9408	247	9655	381
G_IFC₁P₃N₁₅24	Média Quadrática (MQ)	9408	24,70	-	

$F_{10}^1 = 4,96$. FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados em ácido cítrico_(aq); P₁ e P₃: plastificante glicerol (13 e 33% m/m, respectivamente); N₁₁ e N₁₅: agente neutralizante NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,01) e (1:0,05) M, respectivamente; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

De acordo com a Tabela 6.18, todos os valores de F_{obs} , para cada conjunto de filmes preparados foram maiores que o valor crítico ($F_{obs} > 4,96$), logo, se pode afirmar que os valores de grau de intumescimento de cada conjunto são significativamente diferentes ($p <$

0,05). Comparando-se esses resultados com os da Tabela 6.17, os valores de F_{obs} para os conjuntos de filmes preparados em ácido cítrico_(aq) foram superiores aos dos conjuntos preparados com ácido acético_(aq). Diante disso, constatou-se que o efeito da variação da concentração de Na₂CO₃ nos filmes preparados em ácido cítrico_(aq) foi superior ao dos filmes obtidos em ácido acético_(aq).

Analisando-se os resultados da Tabela 6.18, com a adição de 13% de glicerol nos filmes, verificou-se um aumento nos valores de F_{obs} , ou seja, o aumento na concentração de carbonato de sódio conduziu a um acréscimo no efeito da concentração de Na₂CO₃. Em contrapartida, para os filmes com 33% de glicerol, houve redução do efeito do Na₂CO₃ para o intumescimento dos filmes. Acredita-se que, neste caso, a maior concentração de glicerol propiciou uma perturbação no sistema.

Tabela 6.19 - Análise de Variância (ANOVA) de Fator Único (meio dispersante) para Comparação da Diferença entre as Médias dos Grupos [grau de intumescimento (GI) dos filmes de quitosana, concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq), com e sem plastificante, e neutralizados em NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,01) M durante 24 h] e das Variações Internas aos Grupos. Nível de significância: $p < 0,05$.

Conjunto	Graus de Liberdade (GL)	Fonte da Variação			F_{obs}
		Entre os Grupos (efeito do fator)	Nos Grupos (erro)	Total	
		1	10	11	
GI_{FA1N1124}	Soma Quadrática (SQ)	32656	193,33	32849,33	1689
GI_{FC1N1124}	Média Quadrática (MQ)	32656	19,33	-	
GI_{FA1P1N1124}	Soma Quadrática (SQ)	1552	302	1854	51
GI_{FC1P1N1124}	Média Quadrática (MQ)	1552	30,20	-	
GI_{FA1P3N1124}	Soma Quadrática (SQ)	29800	246,33	30046,33	1210
GI_{FC1P3N1124}	Média Quadrática (MQ)	29800	24,63	-	

$F_{10}^1 = 4,96$. FA₁ e FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados, respectivamente em ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq); P₁ e P₃: plastificante glicerol (13 e 33% m/m, respectivamente); N₁₁: agente neutralizante NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,01) M; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

De acordo com os resultados de ANOVA referentes às Tabelas 6.19 e 6.20, todos os valores de F_{obs} , para cada conjunto de filmes preparados foram maiores que o valor crítico ($F_{obs} > 4,96$), portanto, se pode afirmar que os valores de grau de intumescimento de cada conjunto são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Os conjuntos de filmes neutralizados com a maior concentração de Na_2CO_3 apresentaram, de um modo geral, valores de F_{obs} superiores aos conjuntos de filmes com a menor concentração de Na_2CO_3 . Dessa forma, pode-se dizer que o efeito do meio dispersante para o intumescimento foi relevante para os filmes preparados com a maior concentração de carbonato de sódio.

Em relação aos conjuntos de filmes neutralizados contendo 0,01 M de Na_2CO_3 (Tabela 6.19), pôde-se observar que o efeito do meio dispersante foi muito significativo para os conjuntos de filmes sem plastificante ($F_{obs} = 1689$) e com 33% de plastificante ($F_{obs} = 1210$). Esses resultados foram confirmados a partir da análise do grau de intumescimento dos filmes (Figura 6.3). Comparando-se os resultados de grau de intumescimento dos filmes neutralizados sem plastificante ($\text{FA}_1\text{N}_{1124}$ e $\text{FC}_1\text{N}_{1124}$) com os neutralizados contendo plastificante ($\text{FA}_1\text{P}_1\text{N}_{1124}$, $\text{FC}_1\text{P}_1\text{N}_{1124}$ e $\text{FA}_1\text{P}_3\text{N}_{1124}$, $\text{FC}_1\text{P}_3\text{N}_{1124}$) a adição de plastificante aos filmes proporcionou aumento do grau de intumescimento para os filmes obtidos em ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq), porém, para este último, o efeito do meio dispersante nos conjuntos de filmes obtidos somente foi expressivo com a adição de 33% de glicerol nas soluções filmogênicas.

Comportamento semelhante foi verificado para os conjuntos de filmes neutralizados contendo 0,05 M de Na_2CO_3 (Tabela 6.20): o efeito do meio dispersante foi muito significativo para os conjuntos de filmes sem plastificante ($F_{obs} = 7735$). Porém, ao contrário dos conjuntos preparados contendo 0,01 M de Na_2CO_3 , os conjuntos de filmes preparados com 13% de plastificante ($F_{obs} = 2024$) apresentaram o maior valor de F_{obs} . Neste caso, o efeito do meio dispersante teve relevância com a adição de 13% de glicerol nas soluções filmogênicas.

De acordo com a Figura 6.3, a adição de plastificante aos filmes neutralizados contendo a maior concentração de Na_2CO_3 ($\text{FA}_1\text{P}_1\text{N}_{1524}$, $\text{FC}_1\text{P}_1\text{N}_{1524}$ e $\text{FA}_1\text{P}_3\text{N}_{1524}$, $\text{FC}_1\text{P}_3\text{N}_{1524}$), proporcionou aumento nos valores de intumescimento para ambos os filmes obtidos nos diferentes meios dispersantes, pois o plastificante, nas condições em estudo, contribuiu para a redução do efeito do meio dispersante. Esse comportamento foi confirmado a partir da análise da Tabela 6.20. O conjunto de filmes ($\text{FA}_1\text{P}_3\text{N}_{1524}$ e $\text{FC}_1\text{P}_3\text{N}_{1524}$)

apresentou valor de F_{obs} muito inferior ($F_{obs} = 124$) ao do conjunto de filmes (FA₁P₁N₁₅24 e FC₁P₁N₁₅24) onde, $F_{obs} = 2024$.

Tabela 6.20 - Análise de Variância (ANOVA) de Fator Único (meio dispersante) para Comparação da Diferença entre as Médias dos Grupos [grau de intumescimento (GI) dos filmes de quitosana, concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq), com e sem plastificante, e neutralizados em NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,05) M durante 24 h] e das Variações Internas aos Grupos. Nível de significância: $p < 0,05$.

Conjunto	Graus de Liberdade (GL)	Fonte da Variação			F_{obs}
		Entre os Grupos (efeito do fator)	Nos Grupos (erro)	Total	
		1	10	11	
GI_{FA1N1524}	Soma Quadrática (SQ)	91350,75	118,17	91468,92	7735
GI_{FC1N1524}	Média Quadrática (MQ)	91350,75	11,81	-	
GI_{FA1P1N1524}	Soma Quadrática (SQ)	95944,08	474,16	96418,16	2024
GI_{FC1P1N1524}	Média Quadrática (MQ)	95944,08	47,41	-	
GI_{FA1P3N1524}	Soma Quadrática (SQ)	7905,33	638,33	8543,66	124
GI_{FC1P3N1524}	Média Quadrática (MQ)	7905,33	63,83	-	

$F_{10}^1 = 4,96$. FA₁ e FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados, respectivamente em ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq); P₁ e P₃: plastificante glicerol (13 e 33% m/m, respectivamente); N₁₅: agente neutralizante NaOH:Na₂CO_{3(aq)} (1:0,05) M; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

Correlacionando-se os valores de porosidade (Figura 6.2) e grau de intumescimento (Figura 6.3) dos filmes em estudo, verificou-se que embora os valores de porosidade para os filmes neutralizados contendo 0,01 M de carbonato de sódio e preparados em ácido cítrico_(aq), tenham sido significativamente iguais ($p > 0,05$), um aumento no grau de intumescimento desses filmes foi constatado. Para os filmes neutralizados contendo 0,05 M de carbonato de sódio, o aumento significativo ($p < 0,05$) na quantidade de poros propiciou a um aumento no intumescimento dos filmes, o que foi esperado. Neste caso, o aumento na concentração de glicerol promoveu redução das interações entre esse ácido e a quitosana, assim, a neutralização do filme com uma maior quantidade de Na₂CO₃ produziu maior concentração de CO_{2(g)} através da hidrólise do íon carbonato. Como resultado, houve maior redução na

compactação desses filmes o que proporcionou o aumento na quantidade de poros (Figura 6.2) e intumescimento.

Segundo Chen e colaboradores²¹¹, a utilização de ácidos carboxílicos com mais de um grupo funcional carboxílico na molécula (di-, tri-) com percentuais de porosidade iguais ($p > 0,05$) para a preparação de membranas porosas de quitosana promove diferenças nos valores de grau de intumescimento (capacidade de retenção de água). Verifica-se que há outros fatores, além do preenchimento dos poros, que podem proporcionar o intumescimento das membranas. Neste estudo, a retenção de água pelos filmes não foi decorrente do preenchimento dos poros, mas foi devido à capacidade de interação das moléculas de água com a membrana. Em vista disso, membranas porosas de quitosana preparadas com ácido dicarboxílico formam estruturas reticuladas resultantes da interação entre os grupos carboxílicos do ácido e grupos amino da quitosana. Essas estruturas proporcionam espaço para a ligação das moléculas de água ao material, conduzindo, assim, à retenção de água pela membrana. Além disso, tanto os grupos carboxílico e hidroxila são grupos funcionais hidrofílicos, o que pode aumentar a capacidade de interação da água com as membranas de quitosana.

6.2. FILMES DE QUITOSANA PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) OU ÁCIDO CÍTRICO_(aq), Na₂CO_{3(aq)} COMO AGENTE NEUTRALIZANTE E GLICEROL COMO PLASTIFICANTE

Neste estudo foram preparados filmes de quitosana com e sem plastificante glicerol fazendo uso de ácido acético_(aq) ou ácido cítrico_(aq) como meio dispersante. A fim empregar um meio de neutralização compatível com o pH da pele, testou-se, como agente neutralizante, uma solução aquosa de Na₂CO₃ (pH ajustado para 5,7) de modo a avaliar a porosidade e grau de intumescimento. Adicionalmente, o percentual de solubilização dos filmes obtidos tanto em meio ácido quanto em meio alcalino, foi realizado.

6.2.1. Avaliação Estatística dos Efeitos dos Fatores Percentual de Plastificante, Agente Neutralizante e Meio Dispersante no Percentual de Porosidade dos Filmes de Quitosana

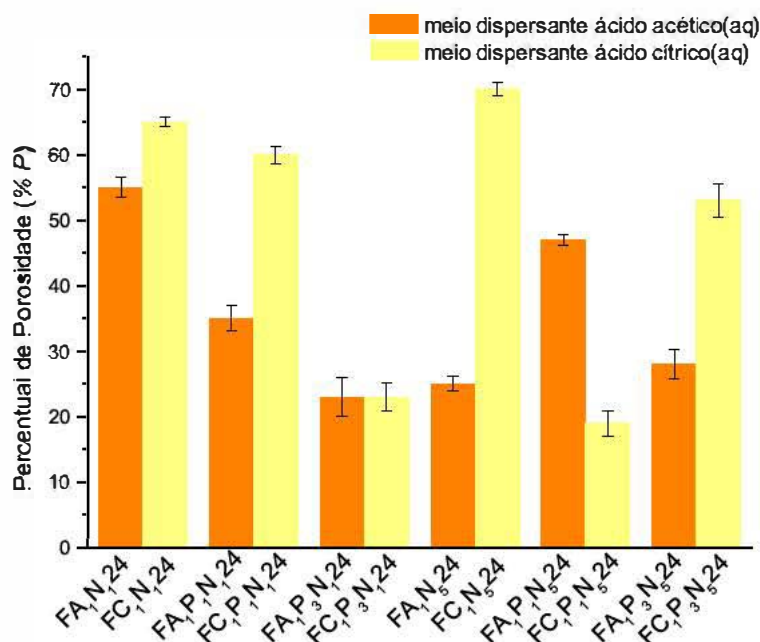


Figura 6.4 - Percentual de Porosidade (%P) em 4 h a $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ dos Filmes de Quitosana preparados em Ácido Acético_(aq) ou Ácido Cítrico_(aq), Na_2CO_3 _(aq) como Agente Neutralizante e Glicerol como Plastificante: FA₁ e FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados, respectivamente, em ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq); P₁ e P₃: plastificante glicerol (13 e 33% m/m, respectivamente); N₁ e N₅: agente neutralizante Na_2CO_3 _(aq) (0,01 e 0,05 M com pH ajustado a 5,7 com ácido cítrico_(aq), respectivamente); 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

A partir da análise visual e tátil, os filmes de quitosana neutralizados e não plastificados preparados em ácido acético_(aq) apresentaram-se com coloração levemente amarelada e sem características adesivas. Na comparação com os filmes plastificados, os últimos mostraram-se com coloração amarelada e sem características adesivas.

Os filmes neutralizados e não plastificados preparados em ácido cítrico_(aq), apresentaram-se com coloração amarelada, opacos, e ligeiramente adesivos. Na comparação com os filmes plastificados, mostraram-se com coloração amarelada, menos opacos e ligeiramente adesivos. Essas características foram observadas para ambos os filmes preparados com 13 e 33% de glicerol independente do meio dispersante utilizado na elaboração dos filmes.

Conforme se pôde observar na Figura 6.4, os filmes neutralizados preparados em ácido acético_(aq) (FA₁N₁24, FA₁P₁N₁24, FA₁P₃N₁24 e FA₁N₅24, FA₁P₁N₅24, FA₁P₃N₅24) apresentaram valores diferenciados de percentual de poros se comparados aos filmes preparados em ácido cítrico_(aq) (FC₁N₁24, FC₁P₁N₁24, FC₁P₃N₁24 e FC₁N₅24, FC₁P₁N₅24, FC₁P₃N₅24). Os percentuais de poros foram maiores para os filmes neutralizados obtidos em ácido cítrico_(aq).

Tabela 6.21 - Análise de Variância (ANOVA) de Fator Único [percentual de plastificante, % (m/m)] para Comparação da Diferença entre as Médias dos Grupos [percentuais de porosidade (%P) dos filmes de quitosana, concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido acético_(aq) com plastificante nos percentuais de 0, 13 e 33% (m/m) e neutralizados em Na₂CO_{3(aq)} com pH ajustado a 5,7 com ácido cítrico_(aq), durante 24 h] e das Variações Internas aos Grupos. Nível de significância: $p < 0,05$.

		Fonte da Variação			F_{obs}
		Entre os Grupos (efeito do fator)	Nos Grupos (erro)	Total	
Conjunto	Graus de Liberdade (GL)	2	15	17	
%PFA₁N₁24	Soma Quadrática (SQ)	3171,03	50,27	3221,3	473
%PFA₁P₁N₁24	Média Quadrática (MQ)	1585,52	3,35	-	
%PFA₁P₃N₁24	Média Quadrática (MQ)				
%PFA₁N₅24	Soma Quadrática (SQ)	1606,36	33,68	1640,04	358
%PFA₁P₁N₅24	Média Quadrática (MQ)	803,18	2,24	-	
%PFA₁P₃N₅24	Média Quadrática (MQ)				

$F_{15}^2 = 3,68$. FA₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados em ácido acético_(aq); P₁ e P₃: plastificante glicerol (13 e 33% m/m, respectivamente); N₁ e N₅: agente neutralizante Na₂CO_{3(aq)} (0,01 e 0,05 M com pH ajustado a 5,7 com ácido cítrico_(aq), respectivamente); 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

Analisando-se às Tabelas 6.21 e 6.22, verificou-se que todos os valores de F_{obs} para cada conjunto de filmes preparados foram maiores que o valor crítico ($F_{obs} > 3,68$). Diante disso, os percentuais de porosidade de cada conjunto são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Comparando-se os valores de F_{obs} dos conjuntos de filmes preparados com ácido acético_(aq) (Tabela 6.21) com os dos conjuntos preparados com ácido cítrico_(aq) (Tabela 6.22), observou-se que, para o primeiro, os valores de F_{obs} foram inferiores ao segundo, logo, o

efeito da concentração de plastificante para a formação de poros foi maior para os filmes preparados a partir de ácido cítrico_(aq).

Tabela 6.22 - Análise de Variância (ANOVA) de Fator Único [percentual de plastificante, % (m/m)] para Comparação da Diferença entre as Médias dos Grupos [percentuais de porosidade (%P) dos filmes de quitosana, concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido cítrico_(aq) com plastificante nos percentuais de 0, 13 e 33% (m/m) e neutralizados em Na₂CO_{3(aq)} com pH ajustado a 5,7 com ácido cítrico_(aq), durante 24 h] e das Variações Internas aos Grupos. Nível de significância: $p < 0,05$.

Conjunto	Graus de Liberdade (GL)	Fonte da Variação			F_{obs}
		Entre os Grupos (efeito do fator)	Nos Grupos (erro)	Total	
		2	15	17	
%P _{FC1N124}	Soma Quadrática (SQ)	6346,64	55,58	6402,22	858
%P _{FC1P1N124}	Média Quadrática (MQ)	3173,32	3,70	-	
%P _{FC1P3N124}					
%P _{FC1N524}	Soma Quadrática (SQ)	8111,34	55,58	8166,92	1096
%P _{FC1P1N524}	Média Quadrática (MQ)	4055,67	3,70	-	
%P _{FC1P3N524}					

$F_{15}^2 = 3,68$. FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados em ácido cítrico_(aq); P₁ e P₃: plastificante glicerol (13 e 33% m/m, respectivamente); N₁ e N₅: agente neutralizante Na₂CO_{3(aq)} (0,01 e 0,05 M com pH ajustado a 5,7 com ácido cítrico_(aq), respectivamente); 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

Em relação ao efeito da adição de plastificante nos filmes de quitosana (Figura 6.4), para os filmes neutralizados com 0,01 M de Na₂CO₃ (FA₁N₁24, FA₁P₁N₁24, FA₁P₃N₁24 e FC₁N₁24, FC₁P₁N₁24, FC₁P₃N₁24), independente do meio de dispersão empregado para elaboração dos filmes, a adição de glicerol propiciou mudanças nos resultados de percentuais de poros. Uma redução nos percentuais de poros foi observada. Contudo, tal comportamento não foi observado para os filmes neutralizados com 0,05 M de Na₂CO₃ (FA₁N₅24, FA₁P₁N₅24, FA₁P₃N₅24 e FC₁N₅24, FC₁P₁N₅24, FC₁P₃N₅24). Verificou-se que os filmes neutralizados com a maior concentração de carbonato de sódio apresentaram resultados de percentuais de porosidade conflitantes.

Comparando-se o efeito da adição de glicerol nos filmes fazendo uso dos diferentes agentes neutralizantes (NaOH:Na₂CO_{3(aq)}, pH 9,0 e Na₂CO_{3(aq)}, pH 5,7), para os filmes

neutralizados com 0,01 M de NaOH:Na₂CO_{3(aq)}, pH 9,0 e preparados em ácido acético_(aq), (Tabela 6.7), o acréscimo da concentração de plastificante propiciou uma redução significativa ($F_{obs} = 83$) dos percentuais de poros. No entanto, para os filmes neutralizados com 0,01 M de NaOH:Na₂CO_{3(aq)}, pH 9,0 e obtidos em ácido cítrico_(aq) (Tabela 6.8), os valores de percentuais de poros foram menores que os dos filmes preparados em ácido acético_(aq). Constatou-se um pequeno aumento não significativo ($F_{obs} = 5,81$) desses percentuais de poros com o acréscimo de glicerol. Para os filmes neutralizados com 0,01 M de Na₂CO_{3(aq)}, pH 5,7 e preparados em ácido acético_(aq) (Tabela 6.21), foi observado uma redução mais significativa ($F_{obs} = 473$) do volume de poros com aumento da quantidade de glicerol. Porém, utilizando-se o ácido cítrico_(aq) como meio dispersante (Tabela 6.22), os valores de percentuais de poros foram maiores que os dos filmes preparados em ácido acético_(aq). O aumento da concentração de plastificante exerceu influência para uma redução ($F_{obs} = 858$) nos percentuais de poros.

Tabela 6.23 - Teste de Tukey para o Módulo da Diferença entre as Médias [percentuais de porosidade (%P) dos filmes de quitosana, concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido acético_(aq) ou ácido cítrico_(aq) com plastificante nos percentuais de 0, 13 e 33% (m/m) e neutralizados em Na₂CO_{3(aq)} com pH ajustado a 5,7 com ácido cítrico_(aq), durante 24 h].

	Módulo da Diferença entre as Médias	Diferença Menos Significativa (DMS)	Significância
$ \%P_{FA1P1N124} - \%P_{FA1N124} $	+20		sim
$ \%P_{FA1P3N124} - \%P_{FA1N124} $	+32	2,74	sim
$ \%P_{FA1P3N124} - \%P_{FA1P1N124} $	+12		sim
$ \%P_{FA1P1N524} - \%P_{FA1N524} $	+21		sim
$ \%P_{FA1P3N524} - \%P_{FA1N524} $	+3	2,24	sim
$ \%P_{FA1P3N524} - \%P_{FA1P1N524} $	+19		sim
$ \%P_{FC1P1N124} - \%P_{FC1N524} $	+5		sim
$ \%P_{FC1P3N524} - \%P_{FC1N524} $	+42	2,88	sim
$ \%P_{FC1P3N524} - \%P_{FC1P1N124} $	+37		sim
$ \%P_{FC1P1N524} - \%P_{FC1N524} $	+51		sim
$ \%P_{FC1P3N524} - \%P_{FC1N524} $	+17	2,88	sim
$ \%P_{FC1P3N524} - \%P_{FC1P1N524} $	+34		sim

FA₁ e FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados, respectivamente em ácido acético e ácido cítrico_(aq); P₁ e P₃: plastificante glicerol (13 e 33% m/m, respectivamente); N₁ e N₅: agente neutralizante Na₂CO_{3(aq)} (0,01 e 0,05 M com pH ajustado a 5,7 com ácido cítrico_(aq), respectivamente); 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

Analisando-se o teste de Tukey para o módulo da diferença entre os valores de percentual de porosidade dos filmes (Tabela 6.23), constatou-se que o módulo da diferença entre valores de percentual de porosidade dos filmes neutralizados com Na₂CO_{3(aq)} (0,01 e 0,05 M) preparados em ácido acético_(aq) ou ácido cítrico_(aq) foram maiores que DMS, portanto, esses valores diferiram significativamente.

Diante dos resultados apresentados pelo Teste de Tukey, pode-se afirmar que, devido à significância entre os percentuais de porosidade para ambos os filmes preparados nos diferentes meios dispersantes, conclui-se que houve correlação entre concentração de plastificante e percentual de poros nestas condições.

Tabela 6.24 - Análise de Variância (ANOVA) de Fator Único [agente neutralizante, $\text{Na}_2\text{CO}_{3(\text{aq})}$ (M)] para Comparação da Diferença entre as Médias dos Grupos [percentuais de porosidade (%P) dos filmes de quitosana, concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido acético_(aq), com e sem plastificante, e neutralizados em $\text{Na}_2\text{CO}_{3(\text{aq})}$ (0,01 e 0,05 M) com pH ajustado a 5,7 com ácido cítrico_(aq), durante 24 h] e das Variações Internas aos Grupos. Nível de significância: $p < 0,05$.

Conjunto	Graus de Liberdade (GL)	Fonte da Variação			F_{obs}
		Entre os Grupos (efeito do fator)	Nos Grupos (erro)	Total	
		1	10	11	
%P _{FA1N124}	Soma Quadrática (SQ)	2508,52	17,70	2526,22	1417
%P _{FA1N524}	Média Quadrática (MQ)	2508,52	1,77	-	
%P _{FA1P1N124}	Soma Quadrática (SQ)	444,08	20,30	464,38	219
%P _{FA1P1N524}	Média Quadrática (MQ)	444,08	2,03	-	
%P _{FA1P3N124}	Soma Quadrática (SQ)	85,86	45,94	131,80	19
%P _{FA1P3N524}	Média Quadrática (MQ)	85,86	4,59	-	

$F_{10}^1 = 4,96$. FA₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados em ácido acético_(aq); P₁ e P₃: plastificante glicerol (13 e 33% m/m, respectivamente); N₁ e N₅: agente neutralizante $\text{Na}_2\text{CO}_{3(\text{aq})}$ (0,01 e 0,05 M com pH ajustado a 5,7 com ácido cítrico_(aq), respectivamente); 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

A partir da análise das Tabelas 6.24 e 6.25, os grupos de filmes neutralizados com $\text{Na}_2\text{CO}_{3(\text{aq})}$, pH ajustado a 5,7 com ácido cítrico e preparados em diferentes concentrações (FA₁N₁24 e FA₁N₅24), (FA₁P₁N₁24 e FA₁P₁N₅24) e (FA₁P₃N₁24 e FA₁P₃N₅24) apresentaram valores diferenciados de F_{obs} se comparados aos conjuntos de filmes neutralizados contendo diferentes concentrações de $\text{Na}_2\text{CO}_{3(\text{aq})}$ (FC₁N₁24 e FC₁N₅24), (FC₁P₁N₁24 e FC₁P₁N₅24), (FC₁P₃N₁24 e FC₁P₃N₅24). Todos os valores de F_{obs} para cada conjunto foram maiores que o valor crítico ($F_{obs} > 4,96$). Dessa forma, os percentuais de porosidade de cada conjunto são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Em relação aos resultados de ANOVA apresentados (Tabelas 6.24 e 6.25), para ambos os conjuntos de filmes obtidos em ácido acético_(aq) ou ácido cítrico_(aq), o efeito do agente neutralizante foi fundamental para o volume de poros. A adição de glicerol nos conjuntos de filmes neutralizados e preparados em ácido acético_(aq) fez com que o efeito do agente

neutralizante nos conjuntos tivesse uma redução, isto é, redução do efeito do carbonato de sódio, o que foi verificado nos valores de F_{obs} . Neste caso, houve predominância gradual do efeito do plastificante em relação ao do neutralizante. Uma vez que este contém ácido cítrico na composição, o aumento na concentração de glicerol proporcionou diminuição das interações entre o ácido cítrico e a quitosana, sendo assim, o efeito do $\text{CO}_{2(g)}$ (produto das reações de hidrólise do ânion $\text{CO}_3^{2-}(\text{aq})$) para a diminuição da compactação dos filmes, foi reduzido. Face ao exposto, foi constatado volume de poros maiores para os filmes neutralizados com plastificante (Figura 6.4).

De acordo com a Tabela 6.25 e os resultados de percentual de porosidade apresentados na Figura 6.4, o efeito do Na_2CO_3 com relação à geração de poros nos filmes neutralizados sem plastificante (FC_1N_124 e FC_1N_524) foi positiva (predominante), pois o aumento da concentração de carbonato de sódio na composição do agente neutralizante promoveu maior formação de poros. Para os filmes com 33% de glicerol ($\text{FC}_1\text{P}_3\text{N}_124$ e $\text{FC}_1\text{P}_3\text{N}_524$), observou-se uma redução da contribuição do plastificante para a formação de poros. Nesta situação, o efeito do carbonato de sódio foi superior para a descompactação das cadeias de quitosana do filme. Houve aumento na quantidade de poros para os filmes neutralizados com a maior concentração de Na_2CO_3 .

Tabela 6.25 - Análise de Variância (ANOVA) de Fator Único [agente neutralizante, $\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{aq})$ (M)] para Comparação da Diferença entre as Médias dos Grupos [percentuais de porosidade (%P) dos filmes de quitosana, concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido cítrico_(aq), com e sem plastificante, e neutralizados em $\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{aq})$ (0,01 e 0,05 M) com pH ajustado a 5,7 com ácido cítrico_(aq), durante 24 h] e das Variações Internas aos Grupos. Nível de significância: $p < 0,05$.

Conjunto	Graus de Liberdade (GL)	Fonte da Variação			F_{obs}
		Entre os Grupos (efeito do fator)	Nos Grupos (erro)	Total	
		1	10	11	
%P _{FC1N124}	Soma Quadrática (SQ)	70,08	8,14	78,22	86
%P _{FC1N524}	Média Quadrática (MQ)	70,08	0,81	-	
%P _{FC1P1N124}	Soma Quadrática (SQ)	5100,56	26,78	5127,34	1910
%P _{FC1P1N524}	Média Quadrática (MQ)	5100,56	2,67	-	
%P _{FC1P3N124}	Soma Quadrática (SQ)	2706	76,23	2782,23	355
%P _{FC1P3N524}	Média Quadrática (MQ)	2706	7,62	-	

$F_{10}^1 = 4,96$. FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados em ácido cítrico_(aq); P₁ e P₃: plastificante glicerol (13 e 33% m/m, respectivamente); N₁ e N₅: agente neutralizante $\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{aq})$ (0,01 e 0,05 M com pH ajustado a 5,7 com ácido cítrico_(aq), respectivamente); 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

Comparando-se os resultados referentes ao efeito da adição de plastificante na atuação do agente neutralizante $\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{aq})$, pH ajustado a 5,7 com ácido cítrico (Tabelas 6.24 e 6.25) com o efeito da adição de glicerol aos filmes neutralizados em $\text{NaOH}:\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{aq})$, pH 9,0 (Tabelas 6.10 e 6.11), pôde-se ver que fazendo uso, como meio dispersante, de ácido acético_(aq), para ambos filmes neutralizados nos diferentes agentes neutralizantes, houve redução do efeito do agente neutralizante com a adição de plastificante. Para os filmes preparados em ácido cítrico_(aq), nos diferentes agentes neutralizantes, foi observado aumento do efeito da concentração de carbonato de sódio com relação ao percentual de poros formados. Comportamento semelhante foi observado para os conjuntos de filmes das Tabelas 6.24 e 6.25.

Tabela 6.26 - Análise de Variância (ANOVA) de Fator Único (meio dispersante) para Comparação da Diferença entre as Médias dos Grupos [percentuais de porosidade (%*P*) dos filmes de quitosana, concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq), com e sem plastificante, e neutralizados em Na₂CO_{3(aq)} (0,01 M) com pH ajustado a 5,7 com ácido cítrico_(aq), durante 24 h] e das Variações Internas aos Grupos. Nível de significância: $p < 0,05$.

Conjunto	Graus de Liberdade (GL)	Fonte da Variação			F_{obs}
		Entre os Grupos (efeito do fator)	Nos Grupos (erro)	Total	
		1	10	11	
%P _{FA1N124}	Soma Quadrática (SQ)	308,05	13,84	321,89	223
%P _{FC1N124}	Média Quadrática (MQ)	308,05	1,38	-	
%P _{FA1P1N124}	Soma Quadrática (SQ)	1912,68	26,54	1939,22	722
%P _{FC1P1N124}	Média Quadrática (MQ)	1912,68	2,65	-	
%P _{FA1P3N124}	Soma Quadrática (SQ)	0,16	65,46	65,62	0,024
%P _{FC1P3N124}	Média Quadrática (MQ)	0,16	6,54	-	

$F_{10}^1 = 4,96$. FA₁ e FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados, respectivamente, em ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq); P₁ e P₃: plastificante glicerol (13 e 33% m/m, respectivamente); N₁: agente neutralizante Na₂CO_{3(aq)} (0,01 M) com pH ajustado a 5,7 com ácido cítrico_(aq); 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

Os resultados apresentados nas Tabelas 6.26 e 6.27 demonstraram que os conjuntos de filmes neutralizados com 0,01 M de Na₂CO₃ preparados em diferentes meios dispersantes (FA₁N₁₁24 e FC₁N₁₁24), (FA₁P₁N₁₁24 e FC₁P₁N₁₁24) e (FA₁P₃N₁₁24 e FC₁P₃N₁₁24) tiveram valores diferenciados de F_{obs} se comparados aos conjuntos de filmes neutralizados contendo 0,05 M de Na₂CO₃ (FA₁N₁₅24 e FC₁N₁₅24), (FA₁P₁N₁₅24 e FC₁P₁N₁₅24) e (FA₁P₃N₁₅24 e FC₁P₃N₁₅24). Todos os valores de F_{obs} para cada conjunto (exceto para o conjunto FA₁P₃N₁₁24 e FC₁P₃N₁₁24) foram maiores que o valor crítico ($F_{obs} > 4,96$). Em vista disso, os percentuais de porosidade são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Em relação aos resultados de ANOVA referente às Tabelas 6.26 e 6.27, pode-se inferir que o meio dispersante exerceu influência no volume de poros originados nos filmes. Os conjuntos de filmes neutralizados com a menor concentração de Na₂CO₃ apresentaram valores de F_{obs} inferiores aos dos conjuntos de filmes neutralizados com a maior concentração de

Na_2CO_3 . Neste caso, a neutralização dos filmes em uma concentração maior de carbonato de sódio foi relevante na contribuição para o aumento do percentual de poros utilizando-se ácido cítrico_(aq) no lugar de ácido acético_(aq). Para os conjuntos de filmes neutralizados com 0,01 M de Na_2CO_3 , a adição de 13% de plastificante propiciou acréscimo no valor de F_{obs} de 223 para 722, isto é, um aumento no efeito do meio dispersante para a formação de poros foi constatado. Segundo os resultados estatísticos, a adição de plastificante nos filmes preparados em ácido acético_(aq) ou ácido cítrico_(aq) contribuiu para redução significativa do percentual de poros (Figura 6.4) dos filmes.

Para os conjuntos de filmes neutralizados com 0,05 M de Na_2CO_3 , a adição de plastificante proporcionou diminuição dos valores de F_{obs} ($4814 < 1160 < 328$), ou seja, observou-se, uma redução no efeito do meio dispersante com o aumento da quantidade de glicerol nos filmes.

Tabela 6.27 - Análise de Variância (ANOVA) de Fator Único (meio dispersante) para Comparação da Diferença entre as Médias dos Grupos [percentuais de porosidade (%P) dos filmes de quitosana, concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq), com e sem plastificante, e neutralizados em Na_2CO_3 _(aq) (0,05 M) com pH ajustado a 5,7 com ácido cítrico_(aq), durante 24 h] e das Variações Internas aos Grupos. Nível de significância: $p < 0,05$.

Conjunto	Graus de Liberdade (GL)	Fonte da Variação			F_{obs}
		Entre os Grupos (efeito do fator)	Nos Grupos (erro)	Total	
		1	10	11	
%P _{FA1N524}	Soma Quadrática (SQ)	5777,24	12	5789,24	4814
%P _{FC1N524}	Média Quadrática (MQ)	5777,24	1,2	-	
%P _{FA1P1N524}	Soma Quadrática (SQ)	2377,26	20,56	2397,82	1160
%P _{FC1P1N524}	Média Quadrática (MQ)	2377,26	2,05	-	
%P _{FA1P3N524}	Soma Quadrática (SQ)	1862,52	56,70	1919,22	328
%P _{FC1P3N524}	Média Quadrática (MQ)	1862,52	5,67	-	

$F_{10}^1 = 4,96$. FA₁ e FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados, respectivamente, em ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq); P₁ e P₃: plastificante glicerol (13 e 33% m/m, respectivamente); N₅: agente neutralizante Na_2CO_3 _(aq) (0,05 M) com pH ajustado a 5,7 com ácido cítrico_(aq); 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

Comparando-se os resultados referentes ao efeito da adição de glicerol na atuação do meio dispersante ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq), para os filmes neutralizados em Na₂CO_{3(aq)}, pH ajustado a 5,7 com ácido cítrico (Tabelas 6.26 e 6.27) com o efeito da adição de glicerol aos filmes neutralizados em NaOH:Na₂CO_{3(aq)}, pH 9,0 (Tabelas 6.12 e 6.13), pôde-se constatar que, para os filmes neutralizados em Na₂CO_{3(aq)}, pH ácido, a adição de glicerol ocasionou modificação no comportamento do meio dispersante durante a preparação dos filmes: Para os filmes neutralizados com 0,01 M de carbonato de sódio, foi observado um aumento do efeito do meio dispersante com a adição de glicerol e, para os filmes neutralizados com 0,05 M de carbonato de sódio, uma redução nesse efeito foi constatada. Por outro lado, para os filmes neutralizados em NaOH:Na₂CO_{3(aq)}, pH básico, a adição de glicerol aos filmes neutralizados contendo 0,01 M de Na₂CO₃ proporcionou redução do efeito do meio dispersante.

6.2.2. Avaliação Estatística dos Efeitos dos Fatores Percentual de Plastificante, Agente Neutralizante e Meio Dispersante no Grau de Intumescimento dos Filmes de Quitosana

De acordo com a Tabela 6.28, todos os filmes preparados em ácido acético_(aq), fazendo uso ou não do plastificante não apresentaram dissolução.

Comparando-se os resultados de grau de intumescimento dos filmes neutralizados sem plastificante com os neutralizados contendo plastificante preparados em ácido acético_(aq), a adição de plastificante aos filmes neutralizados contendo a menor concentração de agente neutralizante, proporcionou maior aumento dos valores de grau de intumescimento. Nos filmes com maior concentração de agente neutralizante, por conter ácido cítrico na sua composição, o efeito da presença de ácido cítrico ocasionou dissolução parcial dos filmes, o que resultou no menor valor do grau de intumescimento para os filmes FA₁P₃N₅24.

Tabela 6.28 - Grau de Intumescimento (*GI*) em 24 h, a $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ dos Filmes de Quitosana obtidos em Ácido Acético_(aq) ou Ácido Cítrico_(aq), $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{(aq)}$ como Agente Neutralizante e Glicerol como Plastificante.

Código das amostras de filme	Grau de Intumescimento (<i>GI</i>)
FA₁N₁24	210 ± 30
FA₁P₁N₁24	239 ± 36
FA₁P₃N₁24	442 ± 36
FA₁N₅24	220 ± 15
FA₁P₁N₅24	294 ± 21
FA₁P₃N₅24	254 ± 10
FC₁N₁24	dissolveu-se
FC₁P₁N₁24	dissolveu-se
FC₁P₃N₁24	dissolveu-se
FC₁N₅24	dissolveu-se
FC₁P₁N₅24	135 ± 5
FC₁P₃N₅24	143 ± 10

FA₁ e FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados, respectivamente, em ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq); P₁ e P₃: plastificante glicerol (13 e 33% m/m, respectivamente); N₁ e N₅: agente neutralizante $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{(aq)}$ (0,01 e 0,05 M com pH ajustado a 5,7 com ácido cítrico_(aq), respectivamente); 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

Comparando-se os resultados obtidos de grau de intumescimento para os filmes preparados com meio dispersante ácido cítrico_(aq), observou-se a dissolução de alguns deles (FC₁N₁24, FC₁P₁N₁24, FC₁P₃N₁24 e FC₁N₅24) em especial aqueles com menor concentração de agente de porosidade. O aumento na quantidade de agente de porosidade, que também tem função neutralizante, auxiliou na manutenção da integridade dos filmes neutralizados com 0,05 M de $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{(aq)}$. Porém, o grau de intumescimento destes filmes foi inferior aos dos filmes neutralizados com maior concentração de $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{(aq)}$ e preparados com ácido acético_(aq). Provavelmente houve perda de massa durante o teste.

Tabela 6.29 - Análise de Variância (ANOVA) de Fator Único [percentual de plastificante, % (m/m)] para Comparação da Diferença entre as Médias dos Grupos [grau de intumescimento (*GI*) dos filmes de quitosana, concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido acético_(aq) com plastificante nos percentuais de 0, 13 e 33% (m/m) e neutralizados em Na₂CO_{3(aq)} com pH ajustado a 5,7 com ácido cítrico_(aq), durante 24 h] e das Variações Internas aos Grupos. Nível de significância: $p < 0,05$.

Conjunto	Graus de Liberdade (GL)	Fonte da Variação			F_{obs}
		Entre os Grupos (efeito do fator)	Nos Grupos (erro)	Total	
		2	15	17	
GI_{FA1N124}	Soma Quadrática (SQ)	187250,70	9891,50	197142,20	142
GI_{FA1P1N124}	Média Quadrática (MQ)	93625,38	659,43	-	
GI_{FA1P3N124}					
GI_{FA1N524}	Soma Quadrática (SQ)	15783,44	2002,83	17786,27	59
GI_{FA1P1N524}	Média Quadrática (MQ)	7891,72	133,52	-	
GI_{FA1P3N524}					

$F_{15}^2 = 3,68$. FA₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados em ácido acético_(aq); P₁ e P₃: plastificante glicerol (13 e 33% m/m, respectivamente); N₁ e N₅: agente neutralizante Na₂CO_{3(aq)} (0,01 e 0,05 M com pH ajustado a 5,7 com ácido cítrico_(aq), respectivamente); 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

Analisando-se a Tabela 6.29, verificou-se que todos os valores de F_{obs} para cada conjunto de filmes preparados foram maiores que o valor crítico ($F_{obs} > 3,68$). Diante disso, os valores de grau de intumescimento de cada conjunto são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Para o conjunto de filmes neutralizados com 0,01 M de Na₂CO₃ (FA₁N₁24, FA₁P₁N₁24, FA₁P₃N₁24), a adição de glicerol promoveu mudanças no grau de inchamento nos filmes. O valor de F_{obs} foi superior (142 > 59) ao do conjunto de filmes neutralizados com 0,05 M de Na₂CO₃ (FA₁N₅24, FA₁P₁N₅24, FA₁P₃N₅24), o que está de acordo com o resultado referente ao maior aumento observado para os valores de grau de intumescimento dos filmes neutralizados com 0,01 M de Na₂CO₃ (Tabela 6.28).

Comparando-se os resultados do efeito da adição de glicerol nos filmes neutralizados em Na₂CO_{3(aq)}, pH ajustado a 5,7 com ácido cítrico (Tabela 6.29) com o efeito da adição de glicerol aos filmes neutralizados em NaOH:Na₂CO_{3(aq)}, pH 9,0 (Tabelas 6.14), pode-se dizer que, para os filmes preparados em ácido acético_(aq), fazendo uso de pH 5,7 no lugar de pH 9,0,

o efeito da adição de glicerol no intumescimento dos filmes foi reduzido. Neste caso, os valores de F_{obs} foram maiores (mais significativos) quanto ao aumento do grau de intumescimento, para os filmes neutralizados em pH básico.

Tabela 6.30 - Análise de Variância (ANOVA) de Fator Único [percentual de plastificante, % (m/m)] para Comparação da Diferença entre as Médias dos Grupos [grau de intumescimento (GI) dos filmes de quitosana, concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido cítrico_(aq) com plastificante nos percentuais de 13 e 33% (m/m) e neutralizados em Na₂CO_{3(aq)} com pH ajustado a 5,7 com ácido cítrico_(aq), durante 24 h] e das Variações Internas aos Grupos. Nível de significância: $p < 0,05$.

		Fonte da Variação			F_{obs}
		Entre os Grupos (efeito do fator)	Nos Grupos (erro)	Total	
Conjunto	Graus de Liberdade (GL)	1	10	11	
GI_{FC1P1N524}	Soma Quadrática (SQ)	225,33	320,33	545,66	7,03
GI_{FC1P3N524}	Média Quadrática (MQ)	225,33	32,03	-	

$F_{10}^1 = 4,96$. FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados em ácido cítrico_(aq); P₁ e P₃: plastificante glicerol (13 e 33% m/m, respectivamente); N₅: agente neutralizante Na₂CO_{3(aq)} (0,05 M) com pH ajustado a 5,7 com ácido cítrico_(aq); 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

De acordo com resultados de ANOVA (Tabela 6.30), o valor de F_{obs} para o conjunto de filmes (FC₁P₁N₅24 e FC₁P₃N₅24) foi maior que o valor crítico ($F_{obs} > 4,96$). Dessa forma, o grau de intumescimento dos filmes é significativamente diferente ($p < 0,05$). Contudo, diante da não relevância do resultado, pode-se afirmar que os valores de grau de intumescimento dos filmes neutralizados contendo plastificante e preparados em ácido cítrico_(aq) não são estatisticamente diferentes, isto é, são iguais ($p > 0,05$). Este resultado confirma a observação referente à perda de massa dos filmes durante o teste.

Tabela 6.31 - Teste de Tukey para o Módulo da Diferença entre as Médias [grau de intumescimento (*GI*) dos filmes de quitosana, concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido acético_(aq) com plastificante nos percentuais de 0, 13 e 33% (m/m) e neutralizados em Na₂CO_{3(aq)} com pH ajustado a 5,7 com ácido cítrico_(aq), durante 24 h].

	Módulo da Diferença entre as Médias	Diferença Menos Significativa (DMS)	Significância
 GI_{FA1P1N124} - GI_{FA1N124} 	+29		não
 GI_{FA1P3N124} - GI_{FA1N124} 	+232	38,47	sim
 GI_{FA1P3N124} - GI_{FA1P1N124} 	+203		sim
 GI_{FA1P1N524} - GI_{FA1N524} 	+74		sim
 GI_{FA1P3N524} - GI_{FA1N524} 	+34	17,31	sim
 GI_{FA1P3N524} - GI_{FA1P1N524} 	+40		sim

FA₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados em ácido acético_(aq); P₁ e P₃: plastificante glicerol (13 e 33% m/m, respectivamente); N₁ e N₅: agente neutralizante Na₂CO_{3(aq)} (0,01 e 0,05 M com pH ajustado a 5,7 com ácido cítrico_(aq), respectivamente); 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

Em relação ao teste de Tukey para o módulo da diferença entre os valores de grau de intumescimento dos filmes (Tabela 6.31), constatou-se que o módulo da diferença entre o grau de intumescimento dos filmes neutralizados com Na₂CO_{3(aq)} (0,01 e 0,05 M) preparados em ácido acético_(aq) foram maiores que DMS, sendo assim, esses valores diferiram significativamente. Entretanto, para o conjunto de filmes (FA₁N₁24 e FA₁P₁N₁24), o módulo da diferença foi menor que DMS, portanto, o grau de intumescimento dos filmes não diferiu significativamente.

Tabela 6.32 - Análise de Variância (ANOVA) de Fator Único [agente neutralizante, $\text{Na}_2\text{CO}_{3(\text{aq})}$ (M)] para Comparação da Diferença entre as Médias dos Grupos [grau de intumescimento (*GI*) dos filmes de quitosana, concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido acético_(aq), com e sem plastificante, e neutralizados em $\text{Na}_2\text{CO}_{3(\text{aq})}$ (0,01 e 0,05 M) com pH ajustado a 5,7 com ácido cítrico_(aq), durante 24 h] e das Variações Internas aos Grupos. Nível de significância: $p < 0,05$.

Conjunto	Graus de Liberdade (GL)	Fonte da Variação			F_{obs}
		Entre os Grupos (efeito do fator)	Nos Grupos (erro)	Total	
		1	10	11	
GI_{FA1N124} GI_{FA1N524}	Soma Quadrática (SQ)	408,33	2933,30	3341,63	1,40
	Média Quadrática (MQ)	408,33	293,33	-	
GI_{FA1P1N124} GI_{FA1P1N524}	Soma Quadrática (SQ)	9185,33	5138,33	14323,66	18
	Média Quadrática (MQ)	9185,33	513,83	-	
GI_{FA1P3N124} GI_{FA1P3N524}	Soma Quadrática (SQ)	10083,30	3822,66	13905,96	26
	Média Quadrática (MQ)	10083,30	382,26	-	

$F_{10}^1 = 4,96$. FA₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados em ácido acético_(aq); P₁ e P₃: plastificante glicerol (13 e 33% m/m, respectivamente); N₁ e N₅: agente neutralizante $\text{Na}_2\text{CO}_{3(\text{aq})}$ (0,01 e 0,05 M com pH ajustado a 5,7 com ácido cítrico_(aq), respectivamente); 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

A partir da análise da Tabela 6.32, observou-se que todos os valores de F_{obs} para cada conjunto de filmes preparados, à exceção do conjunto de filmes (FA₁N₁24 e FA₁N₅24), foram maiores que o valor crítico ($F_{obs} > 4,96$). Assim, os valores de grau de intumescimento de cada conjunto são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Com base nos resultados acima, pôde-se verificar que fazendo uso de ácido acético_(aq) como meio dispersante, houve um acréscimo no efeito do agente neutralizante para o intumescimento dos filmes. Nessa situação, o aumento do efeito do ácido cítrico, um dos componentes do agente neutralizante, foi constatado. Adicionalmente, pôde-se observar a contribuição do plastificante para o aumento do efeito do neutralizante. Esses resultados vão ao encontro dos dados discutidos da Tabela 6.28.

Comparando-se os resultados referentes à contribuição do plastificante no aumento do efeito do agente de neutralização para os filmes neutralizados em $\text{Na}_2\text{CO}_{3(\text{aq})}$ pH ajustado a 5,7

com ácido cítrico (Tabela 6.32) e em NaOH:Na₂CO_{3(aq)}, pH 9,0 (Tabela 6.17), observou-se que, os grupos (conjunto) de filmes neutralizados em Na₂CO_{3(aq)}, pH 5,7 (FA₁N₁24 e FA₁N₅24), (FA₁P₁N₁24 e FA₁P₁N₅24) e (FA₁P₃N₁24 e FA₁P₃N₅24) apresentaram comportamento inverso ao conjunto de filmes neutralizados em NaOH:Na₂CO_{3(aq)}, pH 9,0 (FA₁N₁₁24 e FA₁N₁₅24), (FA₁P₁N₁₁24 e FA₁P₁N₁₅24) e (FA₁P₃N₁₁24 e FA₁P₃N₁₅24). Para o conjunto de filmes neutralizados em pH 5,7 sem plastificante (FA₁N₁24 e FA₁N₅24), o grau de intumescimento não teve significância estatística ($F_{obs} < 4,96$), no entanto, para o conjunto de filmes neutralizados em pH 9,0 sem plastificante (FA₁N₁₁24 e FA₁N₁₅24), os valores de intumescimento foram significativos ($F_{obs} > 4,96$). Já a adição de 13 e 33% de plastificante nos conjuntos filmes neutralizados em pH ácido (FA₁P₁N₁24 e FA₁P₁N₅24) e (FA₁P₃N₁24 e FA₁P₃N₅24) em comparação aos conjuntos de filmes neutralizados em pH básico (FA₁P₁N₁₁24 e FA₁P₁N₁₅24) e (FA₁P₃N₁₁24 e FA₁P₃N₁₅24), permitiu que, para os conjuntos de filmes neutralizados em pH 5,7, os valores de grau de intumescimento fossem significativamente diferentes e maiores com o aumento de 13 para 33% no percentual de glicerol das soluções filmogênicas.

Diante do exposto, os resultados discutidos nas Tabelas 6.29 a 6.32, permitiram inferir que a redução do pH (de 9,0 para 5,7) alterou os valores grau de intumescimento dos filmes de um modo geral, em especial para as composições preparadas com ácido cítrico_(aq) como meio dispersante. Para tais filmes, houve dissolução de suas matrizes. Essas observações estão de acordo com Berger e colaboradores²¹², onde discutem a influência do pH no grau de intumescimento e liberação de ativo (droga) de hidrogéis de quitosana reticulados. Para os hidrogéis reticulados ionicamente, o grau de inchamento é influenciado pelas interações iônicas entre as cadeias de quitosana e a densidade de reticulação, a qual é modificada dependendo das condições externas, como pH. A redução brusca do pH dos hidrogéis, ocasiona maior redução na densidade de carga do reticulante (diminuição da densidade de reticulação) e maior protonação de grupos amino livres o que pode proporcionar dissociação total das ligações iônicas, resultando em dissolução destes hidrogéis.

Tabela 6.33 - Análise de Variância (ANOVA) de Fator Único (meio dispersante) para Comparação da Diferença entre as Médias dos Grupos [grau de intumescimento (*GI*) dos filmes de quitosana, concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq), com plastificante em diferentes percentuais, e neutralizados em Na₂CO_{3(aq)} (0,05 M) com pH ajustado a 5,7 com ácido cítrico_(aq), durante 24 h] e das Variações Internas aos Grupos. Nível de significância: $p < 0,05$.

Conjunto	Graus de Liberdade (GL)	Fonte da Variação			F_{obs}
		Entre os Grupos (efeito do fator)	Nos Grupos (erro)	Total	
		1	10	11	
GI_{FA1P1N524}	Soma Quadrática (SQ)	74576,30	1164,33	75740,63	641
GI_{FC1P1N524}	Média Quadrática (MQ)	74576,30	116,43	-	
GI_{FA1P3N524}	Soma Quadrática (SQ)	36852,08	508,83	37360,91	724
GI_{FC1P3N524}	Média Quadrática (MQ)	36852,08	50,88	-	

$F_{10}^1 = 4,96$. FA₁ e FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados, respectivamente, em ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq); P₁ e P₃: plastificante glicerol (13 e 33% m/m, respectivamente); N₅: agente neutralizante Na₂CO_{3(aq)} (0,05 M) com pH ajustado a 5,7 com ácido cítrico_(aq); 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

Segundo a Tabela 6.33, verificou-se que os valores de F_{obs} para cada conjunto de filmes preparados foram maiores que o valor crítico ($F_{obs} > 4,96$). Neste caso, os valores de grau de intumescimento dos conjuntos de filmes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

De acordo com os resultados apresentados na tabela acima, verificou-se que houve aumento no efeito do meio dispersante para o intumescimento dos filmes. Para os conjuntos de filmes neutralizados com 0,05 M de Na₂CO₃ preparados com 13% de glicerol, o valor de F_{obs} foi inferior ($F_{obs} = 641$) ao conjunto de filmes preparados com 33% de glicerol ($F_{obs} = 724$). Isso demonstrou que o aumento no percentual de plastificante nos filmes preparados nos diferentes meios dispersantes contribuiu para o acréscimo nos valores de grau de intumescimento dos filmes preparados em ácido acético_(aq). Essas observações corroboram com os resultados de intumescimento da Tabela 6.28.

Comparando-se os resultados do efeito da adição de glicerol nos filmes neutralizados em Na₂CO_{3(aq)}, pH ajustado a 5,7 com ácido cítrico (Tabela 6.33) com o efeito da adição de glicerol aos filmes neutralizados em NaOH:Na₂CO_{3(aq)}, pH 9,0 (Tabela 6.20), pôde-se

constatar que, para o conjunto de filmes neutralizados com 0,05 M de carbonato de sódio, pH 5,7 preparados com 33% de glicerol, o efeito do meio dispersante foi maior ($F_{obs} = 724$) que os dos conjuntos de filmes neutralizados em NaOH:Na₂CO_{3(aq)}, pH 9,0 com iguais concentração de carbonato de sódio e glicerol ($F_{obs} = 124$).

Correlacionando-se os valores de porosidade (Figura 6.4) e grau de intumescimento dos filmes neutralizados em Na₂CO_{3(aq)}, pH ajustado a 5,7 com ácido cítrico (Tabela 6.28), observou-se que, os filmes neutralizados com a menor concentração de agente neutralizante (ou de porosidade) obtidos a partir de ácido cítrico_(aq), apresentaram, de um modo geral, maior percentual de poros e dissolução em suas matrizes. Devido ao fato desses filmes terem sido neutralizados com uma menor concentração de agente de porosidade, ou seja, com maior concentração de ácido cítrico na composição do neutralizante, houve maior formação de poros o que gerou uma maior instabilidade quanto à manutenção da integridade da estrutura física dos filmes. Dessa forma, o ácido cítrico contribuiu instantaneamente para o intumescimento dos filmes, sendo que, logo após, houve dissolução destas. Comportamento diferente foi observado para os filmes neutralizados em NaOH:Na₂CO_{3(aq)}, (0,01M de carbonato de sódio), pH 9,0 preparados em ácido cítrico_(aq): a formação de poros (Figura 6.2) não foi o fator que ocasionou o intumescimento (Figura 6.3) dos filmes, conforme discutido na seção 6.1.2., Tabela 6.20.

Comportamento oposto foi observado para os filmes neutralizados em pH ácido e preparados em ácido acético_(aq): independente da concentração de agente de porosidade utilizada, os percentuais de poros foram menores e o intumescimento dos filmes foi constatado.

6.2.3. Avaliação do Percentual de Solubilização em Meio Ácido e em Meio Alcalino dos Filmes de Quitosana

Considerando-se que os filmes serão aplicados na pele com o ativo ácido hialurônico, foram realizados testes de solubilização em meio ácido (solução de ácido acético 0,1 M). Para fins de comparação, o teste em meio alcalino (solução de hidróxido de sódio 1,0 M) foi efetuado. Depois de transcorrido o período de sete dias de contato dos filmes com o meio de imersão, constatou-se que todos se dissolveram em ambos os meios. Diante disso, concluiu-se

que os filmes neutralizados em $\text{Na}_2\text{CO}_{3(\text{aq})}$, pH ajustado a 5,7 com ácido cítrico, não apresentaram estabilidade em meio ácido ou alcalino.

6.3. FILMES DE QUITOSANA PREPARADOS EM ÁCIDO ACÉTICO_(aq) OU ÁCIDO CÍTRICO_(aq), SOLUÇÃO TAMPÃO COMO AGENTE NEUTRALIZANTE E GLICEROL COMO PLASTIFICANTE

Considerando não só a incongruência dos resultados de porosidade (itens 6.1.1. e 6.2.1.) e intumescimento (itens 6.1.2. e 6.2.2.) apresentados pelos filmes neutralizados contendo $\text{Na}_2\text{CO}_{3(\text{aq})}$, mas também a dissolução dos filmes preparados no item 6.2.3., optou-se por utilizar solução tampão como agente neutralizante para atender aos requisitos de formulação de produtos de aplicação cosmética. Nessa situação, foram preparados filmes de quitosana com e sem plastificante fazendo uso de ácido acético_(aq) ou ácido cítrico_(aq) como meio dispersante, respectivamente, e soluções tampão ácido acético/acetato e sódio e ácido cítrico/citrato de sódio, pH 5,0 e 5,7 como agentes neutralizantes. Para avaliação da estabilidade física dos filmes, foi realizada caracterização físico-química dos filmes preparados por meio de grau de intumescimento, percentual de solubilização em meio ácido e em meio alcalino, espessura, conteúdo de umidade, análise térmica simultânea e calorimetria exploratória diferencial.

6.3.1. Avaliação Estatística dos Efeitos dos Fatores Percentual de Plastificante e Agente Neutralizante no Grau de Intumescimento dos Filmes de Quitosana

A partir da análise visual e tátil dos filmes preparados, filmes de quitosana neutralizados e não plastificados preparados em ácido acético_(aq) apresentaram-se pouco flexíveis, com coloração levemente amarelada, sem características adesivas. Na comparação com os filmes plastificados, os últimos mostraram-se mais flexíveis e transparentes.

Para os filmes neutralizados e não plastificados preparados em ácido cítrico_(aq), apresentaram-se mais flexíveis, ligeiramente quebradiços, com coloração levemente amarelada e ligeiramente adesivos. Na comparação com os filmes plastificados, os últimos

mostraram-se mais flexíveis, menos quebradiços e ligeiramente adesivos. Essas características foram observadas para ambos os filmes preparados com 13 e 33% de glicerol independente do meio dispersante utilizado na confecção dos filmes. A seguir (Tabela 6.34) estão apresentados os dados de intumescimento para os filmes.

Tabela 6.34 - Grau de Intumescimento (*GI*) em 24 h, a T = 25 °C dos Filmes de Quitosana obtidos em Solução Tampão como Agente Neutralizante e Glicerol como Plastificante.

Código das amostras de filme	Grau de Intumescimento (<i>GI</i>)
FA₁TA₅₀24	dissolveu-se
FA₁P₁TA₅₀24	dissolveu-se
FA₁P₃TA₅₀24	dissolveu-se
FA₁TA₅₇24	dissolveu-se
FA₁P₁TA₅₇24	dissolveu-se
FA₁P₃TA₅₇24	dissolveu-se
FC₁TC₅₀24	96 ± 10
FC₁P₁TC₅₀24	112 ± 2
FC₁P₃TC₅₀24	148 ± 4
FC₁TC₅₇24	56 ± 5
FC₁P₁TC₅₇24	66 ± 7
FC₁P₃TC₅₇24	55 ± 9

FA₁ e FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados, respectivamente, em ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq); P₁ e P₃: plastificante glicerol (13 e 33% m/m, respectivamente); TA₅₀ e TA₅₇: agente neutralizante solução tampão ácido acético/acetato de sódio pH 5,0 e 5,7, respectivamente; TC₅₀ e TC₅₇: agente neutralizante solução tampão ácido cítrico/citrato de sódio pH 5,0 e 5,7, respectivamente; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

De acordo com a Tabela 6.34, todos os filmes neutralizados em tampão ácido acético/acetato de sódio pH 5,0 e pH 5,7 apresentaram dissolução em água. Inicialmente, estes filmes exibiram um ligeiro inchaço seguido pelo amolecimento, o que ocasionou, por fim, a dissolução de suas matrizes. Por outro lado, observou-se que os filmes neutralizados em tampão ácido cítrico/citrato de sódio, pH 5,0 e pH 5,7 não se dissolveram em água. Em todos os resultados, uma retenção de água foi observada. Neste caso, pode-se afirmar que o ácido cítrico originou redes poliméricas de estrutura compacta resultantes da sua interação com a

quitosana²¹³. Portanto, o tipo de ácido utilizado na preparação dos filmes neutralizados resultou em diferenças significativas ($p < 0,05$).

Comportamento semelhante foi constatado por Shu e colaboradores²⁰⁶ em relação à utilização de ácido cítrico na preparação de filmes de quitosana. Filmes de quitosana reticulados por citrato de sódio foram preparados por imersão do filme (sal acetato de quitosana) na solução de citrato em diferentes pHs (5, 6 e 7). Neste contexto, foram avaliados a razão de intumescimento dos filmes e os perfis de liberação controlada de fármacos como a riboflavina. Para os filmes reticulados em solução de citrato de sódio a 5,0% (m /v) e pH 5,0, ocorreu um menor intumescimento em água, sem dissolução posterior, e liberação mais lenta do fármaco. Neste pH, a maioria dos grupos amino da quitosana são ionizados, logo, maior a formação de interações iônicas entre esses grupos e os íons citrato. Como resultado deste aumento nas interações, há a formação de uma rede polimérica reticulada ionicamente, com menor conteúdo de água absorvida, portanto, sem a ocorrência de dissolução dos filmes.

No entanto, foi observado um comportamento diferente por Ritthidej e colaboradores²¹⁴. Filmes de quitosana preparados em ácidos tricarbóxicos, como o ácido cítrico e, subsequentemente, submetidos a um tratamento térmico, mostraram maior intumescimento e dissolução em água se comparados aos filmes preparados com ácidos monocarbóxicos como o ácido acético. Neste caso, o grau de intumescimento e a probabilidade de dissolução em água dos filmes foram dependentes do tipo de ácido carbóxico utilizado na preparação destes materiais.

Tabela 6.35 - Análise de Variância (ANOVA) de Fator Único [percentual de plastificante, % (m/m)] para Comparação da Diferença entre as Médias dos Grupos [grau de intumescimento (*GI*) dos filmes de quitosana, concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido cítrico_(aq), com plastificante nos percentuais de 0, 13 e 33% (m/m) e neutralizados em solução tampão tampão ácido cítrico/citrato de sódio em pH distintos, durante 24 h] e das Variações Internas aos Grupos. Nível de significância: $p < 0,05$.

Conjunto	Graus de Liberdade (GL)	Fonte da Variação			F_{obs}
		Entre os Grupos (efeito do fator)	Nos Grupos (erro)	Total	
		2	15	17	
GI_{FC1TC5024}	Soma Quadrática (SQ)	8408,33	52,16	8460,49	1208
GI_{FC1P1TC5024}	Média Quadrática (MQ)	4204,16	3,48		
GI_{FC1P3TC5024}					
GI_{FC1TC5724}	Soma Quadrática (SQ)	450,11	615,50	1065,61	5,48
GI_{FC1P1TC5724}	Média Quadrática (MQ)	225,05	41,03	-	
GI_{FC1P3TC5724}					

$F_{15}^2 = 3,68$. FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados em ácido cítrico_(aq); P₁ e P₃: plastificante glicerol (13 e 33% m/m, respectivamente); TC₅₀ e TC₅₇: agente neutralizante solução tampão ácido cítrico/citrato de sódio pH 5,0 e 5,7, respectivamente; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

Analisando-se a Tabela 6.35, verificou-se que todos os valores de F_{obs} para cada conjunto de filmes preparados foram maiores que o valor crítico ($F_{obs} > 3,68$). Diante disso, os valores de grau de intumescimento de cada conjunto são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Contudo, diante da não relevância do resultado, pode-se afirmar que os valores de grau de intumescimento dos filmes neutralizados em tampão citrato pH 5,7 e preparados em ácido cítrico_(aq) não são estatisticamente diferentes, isto é, são iguais ($p > 0,05$).

Comparando-se os resultados obtidos de grau de intumescimento para os filmes neutralizados em pH 5,0 ou pH 5,7 sem plastificante (Tabela 6.3), para os filmes neutralizados em pH 5,0 foi constatado um valor superior do grau de intumescimento em relação ao filmes neutralizados preparados em pH 5,7.

Avaliando-se os resultados de grau de intumescimento dos filmes neutralizados em pH 5,0 sem plastificante com os filmes contendo plastificante, a adição de glicerol aos filmes proporcionou aumento do grau de intumescimento ($p < 0,05$). Há relatos na literatura sobre o efeito de plastificantes no intumescimento de filmes de quitosana²¹⁵. Em nosso estudo, observou-se que o período de imersão de filmes em água ($t = 24$ h) foi relevante para o

desempenho do papel do glicerol como plastificante. Esse desempenho se refletiu na descompactação da rede polimérica dos filmes resultante da redução das interações entre as cadeias de quitosana, o que permitiu maior retenção de água pelos filmes. Adicionalmente, o caráter hidrofílico do plastificante contribuiu para o aumento no grau de intumescimento uma vez que a hidroflicidade das soluções filmogênicas foi superior na presença de glicerol.

Analogamente, comparando-se os resultados obtidos para os filmes neutralizados em pH 5,7 sem plastificante com os filmes contendo plastificante, a adição de glicerol aos filmes neutralizados em pH 5,7 proporcionou, em contrapartida, um pequeno aumento do grau de intumescimento, não significativo ($p > 0,05$). Para os filmes com 33% de plastificante, nenhuma variação no grau de intumescimento foi verificada.

Tabela 6.36 - Teste de Tukey para o Módulo da Diferença entre as Médias [grau de intumescimento (G_I) dos filmes de quitosana, concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido cítrico_(aq) com plastificante nos percentuais de 0, 13 e 33% (m/m) e neutralizados em solução tampão ácido cítrico/citrato de sódio, em pH distintos, durante 24 h].

	Módulo da Diferença entre as Médias	Diferença Menos Significativa (DMS)	Significância
$ G_{FC1P1TC5024} - G_{FC1TC5024} $	+16		sim
$ G_{FC1P3TC5024} - G_{FC1TC5024} $	+52	2,79	sim
$ G_{FC1P3TC5024} - G_{FC1P1TC5024} $	+36		sim
$ G_{FC1P1TC5724} - G_{FC1TC5724} $	+10		sim
$ G_{FC1P3TC5724} - G_{FC1TC5724} $	+1	9,60	não
$ G_{FC1P3TC5724} - G_{FC1P1TC5724} $	+11		sim

FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados em ácido cítrico_(aq); P₁ e P₃: plastificante glicerol (13 e 33% m/m, respectivamente); TC₅₀ e TC₅₇: agente neutralizante solução tampão ácido cítrico/citrato de sódio pH 5,0 e 5,7, respectivamente; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

Analisando-se o teste de Tukey para o módulo da diferença entre os valores de grau de intumescimento dos filmes (Tabela 6.36), constatou-se que o módulo da diferença entre os valores de grau de intumescimento dos filmes neutralizados em tampão citrato, pH 5,0 e 5,7, exceto para o conjunto de filmes (FC₁TC₅₇24 e FC₁P₃TC₅₇24), foram maiores que DMS, portanto, diferiram significativamente. Esses resultados corroboram com os apresentados na

Tabela 6.35. Pode-se dizer que, em virtude da significância destes valores, houve correlação entre concentração de plastificante e grau de intumescimento dos filmes.

Tabela 6.37 - Análise de Variância (ANOVA) de Fator Único (agente neutralizante, solução tampão ácido cítrico/citrato de sódio) para Comparação da Diferença entre as Médias dos Grupos [grau de intumescimento (*GI*) dos filmes de quitosana, concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido cítrico_(aq), com e sem plastificante, e neutralizados em solução tampão ácido cítrico/citrato de sódio, pH 5,0 e 5,7, durante 24 h] e das Variações Internas aos Grupos. Nível de significância: $p < 0,05$.

Conjunto	Graus de Liberdade (GL)	Fonte da Variação			F_{obs}
		Entre os Grupos (efeito do fator)	Nos Grupos (erro)	Total	
		1	10	11	
GI_{FC1TC5024} GI_{FC1TC5724}	Soma Quadrática (SQ)	4840,08	80,16	4920,24	604
	Média Quadrática (MQ)	4840,08	8,01	-	
GI_{FCIP1TC5024} GI_{FCIP1TC5724}	Soma Quadrática (SQ)	6302,08	184,16	6486,24	342
	Média Quadrática (MQ)	6302,08	18,41	-	
GI_{FCIP3TC5024} GI_{FCIP3TC5724}	Soma Quadrática (SQ)	25761,30	403,33	2614,63	639
	Média Quadrática (MQ)	25761,30	40,33		

$F_{10}^1 = 4,96$. FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados em ácido cítrico_(aq); P₁ e P₃: plastificante glicerol (13 e 33% m/m, respectivamente); TC₅₀ e TC₅₇: agente neutralizante solução tampão ácido cítrico/citrato de sódio pH 5,0 e 5,7, respectivamente; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

Os resultados apresentados na Tabela 6.37 demonstraram que os conjuntos de filmes neutralizados com tampão citrato sem plastificante em diferentes pHs (FC₁TC₅₀24 e FC₁TC₅₇24) tiveram valores diferenciados de F_{obs} se comparados aos conjuntos de filmes neutralizados contendo plastificante (FC₁P₁TC₅₀24 e FC₁P₁TC₅₇24) e (FC₁P₃TC₅₀24 e FC₁P₃TC₅₇24). Todos os valores de F_{obs} para cada conjunto foram maiores que o valor crítico ($F_{obs} > 4,96$). Em vista disso, o grau de intumescimento dos filmes é significativamente diferente ($p < 0,05$).

Em relação ao efeito do pH para o intumescimento dos filmes, constatou-se que houve um aumento deste efeito para as formulações (FC₁P₃TC₅₀24 e FC₁P₃TC₅₇24). Porém, maior variação nos grupos (interações secundárias) foi observada, o que não foi esperada. Neste caso, a adição de 33% glicerol nos filmes foi relevante para estas interações.

6.3.2. Avaliação Estatística do Efeito do Fator Percentual de Plastificante no Percentual de Solubilização em Meio Ácido e em Meio Alcalino dos Filmes de Quitosana

Com o intuito de avaliar o percentual de solubilização dos filmes, as amostras foram submetidas a ensaios em meio ácido e em meio alcalino. Os resultados estão expressos na Tabela 6.38.

Tabela 6.38 - Percentual de Solubilização em Meio Ácido (%*S_{ac}*) e em Meio Alcalino (%*S_{al}*) em 7 dias, a T = 25 °C dos Filmes de Quitosana obtidos em Ácido Cítrico_(aq) e Solução Tampão Ácido Cítrico/Citrato de Sódio, pH 5,0 e pH 5,7 como Agente Neutralizante e Glicerol como Plastificante.

Código das amostras de filme	Percentual de Solubilização em meio ácido (%<i>S_{ac}</i>)	Percentual de Solubilização em meio alcalino (%<i>S_{al}</i>)
FA₁TA₅₀24	dissolveu-se	dissolveu-se
FA₁P₁TA₅₀24	dissolveu-se	dissolveu-se
FA₁P₃TA₅₀24	dissolveu-se	dissolveu-se
FA₁TA₅₇24	dissolveu-se	dissolveu-se
FA₁P₁TA₅₇24	dissolveu-se	dissolveu-se
FA₁P₃TA₅₇24	dissolveu-se	dissolveu-se
FC₁TC₅₀24	3,0 ± 0,5	5,0 ± 0,8
FC₁P₁TC₅₀24	8,0 ± 0,4	6,0 ± 1
FC₁P₃TC₅₀24	33 ± 0,6	7,5 ± 0,3
FC₁TC₅₇24	dissolveu-se	dissolveu-se
FC₁P₁TC₅₇24	dissolveu-se	dissolveu-se
FC₁P₃TC₅₇24	dissolveu-se	dissolveu-se

FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados em ácido cítrico_(aq); P₁ e P₃: plastificante glicerol (13 e 33% m/m, respectivamente); TC₅₀ e TC₅₇: agente neutralizante solução tampão ácido cítrico/citrato de sódio pH 5,0 e 5,7, respectivamente; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

De acordo com os resultados de % S_{ac} e % S_{al} das amostras em estudo, observou-se que os filmes neutralizados em tampão acetato pH 5,0 ou pH 5,7 com ou sem plastificante, apresentaram uma elevada solubilidade e dissolução em meio ácido e alcalino. Devido a este fator, o percentual de solubilização em ambos os meios não pôde ser avaliado quantitativamente. Comportamento semelhante foi verificado para os filmes neutralizados em tampão citrato pH 5,7.

No entanto, para os filmes neutralizados em tampão citrato pH 5,0, com ou sem plastificante, a solubilidade pôde ser determinada. Na comparação com os valores de % S_{ac} , o % S_{al} das amostras foram menores, o que foi esperado, devido ao meio de solubilização ser de caráter básico, o que contribuiu na manutenção da integridade do filme.

Neste caso, concluiu-se que o tipo de ácido utilizado na preparação dos filmes exerceu influência nos resultados de % S_{ac} e % S_{al} . Devido à maior integridade da rede polimérica de filmes de quitosana preparados em ácido cítrico_(aq)^{206,213}, a dissolução dos filmes neutralizados em tampão citrato foi dificultada. Consequentemente, a solubilidade pode ser mensurada.

Tabela 6.39 - Análise de Variância (ANOVA) de Fator Único [percentual de plastificante, % (m/m)] para Comparação da Diferença entre as Médias dos Grupos [percentual de solubilização em meio ácido (% S_{ac}) e em meio alcalino (% S_{al}) dos filmes de quitosana, concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido cítrico_(aq), com plastificante nos percentuais de 0, 13 e 33% (m/m) e neutralizados em solução tampão tampão ácido cítrico/citrato de sódio em pH 5,0, durante 24 h] e das Variações Internas aos Grupos. Nível de significância: $p < 0,05$.

Conjunto	Graus de Liberdade (GL)	Fonte da Variação			F_{obs}
		Entre os Grupos (efeito do fator)	Nos Grupos (erro)	Total	
		2	15	17	
% $S_{acFC1TC5024}$	Soma Quadrática (SQ)	3091,34	3,83	3095,17	5949
% $S_{acFC1P1TC5024}$	Média Quadrática (MQ)	1545,67	0,26	-	
% $S_{acFC1P3TC5024}$					
% $S_{alFC1TC5024}$	Soma Quadrática (SQ)	20,08	6,56	26,64	23
% $S_{alFC1P1TC5024}$	Média Quadrática (MQ)	10,04	0,44		
% $S_{alFC1P3TC5024}$					

$F_{15}^2 = 3,68$. FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados em ácido cítrico_(aq); P₁ e P₃: plastificante glicerol (13 e 33% m/m, respectivamente); TC₅₀: agente neutralizante solução tampão ácido cítrico/citrato de sódio pH 5,0; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

A partir da análise da Tabela 6.39, observou-se que todos os valores de F_{obs} para cada conjunto de filmes preparados, foram maiores que o valor crítico ($F_{obs} > 3,68$). Assim, os valores de percentual de solubilização em meio ácido e em meio alcalino de cada conjunto são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Neste cenário, constatou-se que a adição de glicerol promoveu diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) no $\%S_{ac}$ e $\%S_{al}$ dos filmes, com relevância para os filmes submetidos à solubilização em meio ácido ($F_{obs} = 5949$). A atuação do glicerol como plastificante na descompactação da rede polimérica dos filmes plastificados favoreceu a uma maior penetração da solução ácida nos filmes, o que ocasionou a um aumento nos valores de percentual de solubilização em meio ácido (Tabela 6.38).

Tabela 6.40 - Teste de Tukey para o Módulo da Diferença entre as Médias [percentual de solubilização em meio ácido ($\%S_{ac}$) e em meio alcalino ($\%S_{al}$) dos filmes de quitosana, concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido cítrico_(aq) com plastificante nos percentuais de 0, 13 e 33% (m/m) e neutralizados em solução tampão ácido cítrico/citrato de sódio, em pH 5,0, durante 24 h].

	Módulo da Diferença entre as Médias	Diferença Menos Significativa (DMS)	Significância
$ \%S_{acFC1P1TC5024} - \%S_{acFC1TC5024} $	+5		sim
$ \%S_{acFC1P3TC5024} - \%S_{acFC1TC5024} $	+30	0,76	sim
$ \%S_{acFC1P3TC5024} - \%S_{acFC1P1TC5024} $	+25		sim
$ \%S_{alFC1P1TC5024} - \%S_{alFC1TC5024} $	+1		sim
$ \%S_{alFC1P3TC5024} - \%S_{alFC1TC5024} $	+2,5	0,99	sim
$ \%S_{alFC1P3TC5024} - \%S_{alFC1P1TC5024} $	+1,5		sim

FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados em ácido cítrico_(aq); P₁ e P₃: plastificante glicerol (13 e 33% m/m, respectivamente); TC₅₀: agente neutralizante solução tampão ácido cítrico/citrato de sódio pH 5,0; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

De acordo com o teste de Tukey para o módulo da diferença entre os percentuais de solubilização em meio ácido e meio alcalino dos filmes (Tabela 6.40), constatou-se que o módulo da diferença dos percentuais de solubilização em meio ácido dos filmes neutralizados em tampão citrato, pH 5,0, foram maiores que DMS, logo, esses valores diferiram significativamente.

Diante dos resultados apresentados pelo Teste de Tukey, pode-se afirmar que, devido à significância dos resultados demonstrados, conclui-se que houve correlação entre concentração de plastificante e percentual de solubilização dos filmes nestas condições.

6.3.3. Avaliação Estatística dos Efeitos dos Fatores Percentual de Plastificante e Meio Dispersante na Espessura dos Filmes de Quitosana

A fim de avaliar as propriedades físico-químicas dos filmes neutralizados em tampão acetato e citrato pH 5,0 com glicerol nos percentuais de 0 e 33%, caracterização por medidas de espessura foi realizada. Além disso, determinação do conteúdo de umidade, análise térmica simultânea e calorimetria exploratória diferencial foi efetuada.

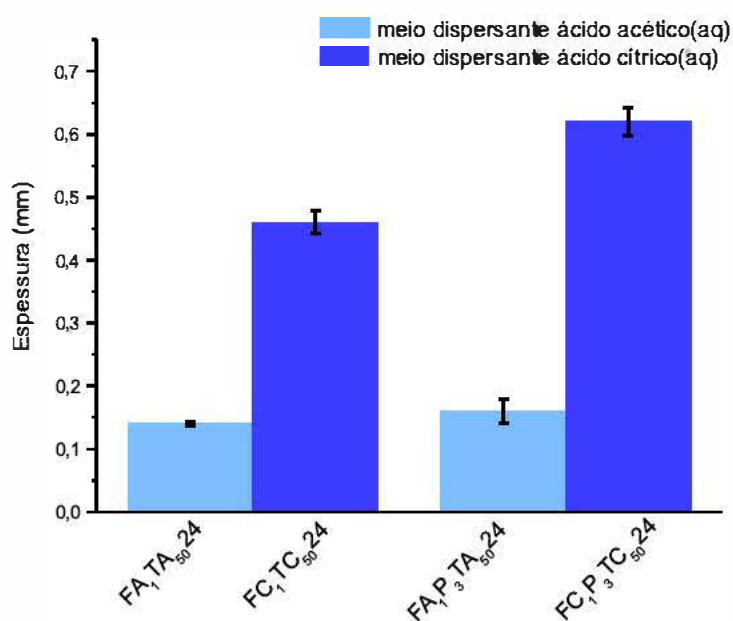


Figura 6.5 - Espessura (mm) dos Filmes de Quitosana preparados em Ácido Acético_(aq) ou Ácido Cítrico_(aq), respectivamente, Solução Tampão Ácido Acético/Acetato de Sódio ou Ácido Cítrico/Citrato de Sódio, pH 5,0, como Agentes Neutralizantes e Glicerol como Plastificante: FA₁ e FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados, respectivamente, em ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq); P₃: plastificante glicerol (33% m/m); TA₅₀ e TC₅₀: agente neutralizante solução tampão ácido acético/acetato de sódio e ácido cítrico/citrato de sódio pH 5,0, respectivamente; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

De acordo com os resultados da Figura 6.5, observou-se que os filmes neutralizados em tampão acetato pH 5,0 com 0 ou 33% de plastificante, apresentaram menores valores de espessura.

Em nosso estudo, soluções de quitosana foram preparadas em meio de dispersão, solução aquosa de ácido cítrico. Estas soluções formaram uma rede polimérica composta, na maior parte, por ligações cruzadas entre seus componentes (cátion e ânion), ou seja, tal rede é constituída por fortes interações iônicas entre os ânions citrato do ácido e policátions gerados a partir de protonação dos grupos amino da quitosana. Dessa forma, as soluções exibiram um pH < 5,0 e originaram, inicialmente, filmes não neutralizados. Com a finalidade de controlar a formação da rede polimérica do filme, através da manutenção do pH a um valor constante de 5,0, tais filmes foram neutralizados em tampão citrato pH 5,0. Assim, a neutralização promoveu o aumento da quantidade de grupos amino livres e redução das interações iônicas (reticulação iônica) acima mencionadas. Neste caso, há a permanência, em parte, de ânion citrato nos filmes. Isto resultou em filmes mais espessos para as formulações neutralizadas em tampão de citrato.

Tabela 6.41 - Análise de Variância (ANOVA) de Fator Único [percentual de plastificante, % (m/m)] para Comparação da Diferença entre as Médias dos Grupos [espessura (mm) dos filmes de quitosana, concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido acético_(aq) ou ácido cítrico_(aq), com plastificante nos percentuais de 0 e 33% (m/m) e neutralizados em solução tampão ácido acético/acetato de sódio ou tampão ácido cítrico/citrato de sódio, pH 5,0, durante 24 h] e das Variações Internas aos Grupos. Nível de significância: $p < 0,05$.

Conjunto	Graus de Liberdade (GL)	Fonte da Variação			F_{obs}
		Entre os Grupos (efeito do fator)	Nos Grupos (erro)	Total	
		1	10	11	
EFA1TA5024	Soma Quadrática (SQ)	0,0014	0,0044	0,0058	3,17
EFA1P3TA5024	Média Quadrática (MQ)	0,0014	$4,42 \times 10^{-4}$	-	
EFC1TC5024	Soma Quadrática (SQ)	0,000724	0,0024	0,0748	3,01
EFC1P3TC5024	Média Quadrática (MQ)	0,000724	$2,4 \times 10^{-4}$	-	

$F_{10}^1 = 4,96$. FA₁ e FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados, respectivamente, em ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq); P₃: plastificante glicerol (33% m/m); TA₅₀ e TC₅₀: agente neutralizante, soluções tampão ácido acético/acetato de sódio e ácido cítrico/citrato de sódio pH 5,0, respectivamente; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

Segundo os resultados de ANOVA da Tabela 6.41, verificou-se que os valores de F_{obs} para cada conjunto de filmes preparados, (FA₁TA₅₀24 e FA₁P₃TA₅₀24) e (FC₁TC₅₀24 e FC₁P₃TC₅₀24), foram menores que o valor crítico ($F_{obs} < 4,96$). Logo, se pode afirmar que os valores de espessura dos filmes não são significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Em relação ao efeito da presença de plastificante na preparação de ambos os filmes neutralizados em tampão citrato ou acetato pH 5,0, observou-se um aumento com ligeira melhoria na espessura dos filmes. Estas observações confirmam os resultados da avaliação estatística anteriormente mencionada ($p > 0,05$). Comportamento semelhante foi encontrado por Fundo e colaboradores²¹⁶. De acordo com o autor, a espessura dos filmes de quitosana preparados em meio ácido (ácido láctico) só foi significativamente afetada pelo conteúdo de quitosana na solução e, possíveis mudanças estruturais devido à plastificação, como o aumento do volume livre, não refletiu sobre essa propriedade. A teoria de gel postula que a rigidez da rede de polimérica é consequência de sua estrutura tridimensional e o plastificante tem a função de quebrar as interações polímero-polímero (por exemplo, ligação de hidrogênio, de van der Waals ou forças iônicas), o que aumenta o volume livre do polímero^{217,218}. Assim, o efeito da adição de glicerol na espessura dos filmes neutralizados em tampão citrato ou acetato pH 5,0, teria um aumento significativo ($p < 0,05$) nesta propriedade. Em nosso caso, acredita-se que o pequeno aumento na espessura ocasionado pela plastificação com glicerol, foi resultado da cisão das ligações de hidrogênio na cadeia polimérica, o que resultou no aumento não significativo ($p > 0,05$) dos valores de espessura para os filmes independentes do meio de neutralização.

Tabela 6.42 - Análise de Variância (ANOVA) de Fator Único (meio dispersante) para Comparação da Diferença entre as Médias dos Grupos [espessura (mm) dos filmes de quitosana, concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq), com e sem plastificante, e neutralizados em solução tampão ácido acético/acetato de sódio e tampão ácido cítrico/citrato de sódio, pH 5,0, durante 24 h] e das Variações Internas aos Grupos. Nível de significância: $p < 0,05$.

Conjunto	Graus de Liberdade (GL)	Fonte da Variação			F_{obs}
		Entre os Grupos (efeito do fator)	Nos Grupos (erro)	Total	
		1	10	11	
EFA1TA5024	Soma Quadrática (SQ)	0,3117	0,0044	0,3161	708
EFC1TC5024	Média Quadrática (MQ)	0,3117	$4,4 \times 10^{-4}$	-	
EFA1P3TA5024	Soma Quadrática (SQ)	0,6234	0,0023	0,6257	2676
EFC1P3TC5024	Média Quadrática (MQ)	0,6234	$2,33 \times 10^{-4}$	-	

$F_{10}^1 = 4,96$. FA₁ e FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados, respectivamente, em ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq); P₃: plastificante glicerol (33% m/m); TA₅₀ e TC₅₀: agente neutralizante, soluções tampão ácido acético/acetato de sódio e ácido cítrico/citrato de sódio pH 5,0, respectivamente; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

Analisando-se a Tabela 6.42, observou-se que os valores de F_{obs} para cada conjunto de filmes preparados foram maiores que o valor crítico ($F_{obs} > 4,96$). Neste caso, os valores de espessura dos filmes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 6.42, constatou-se o efeito do meio dispersante para a espessura dos filmes em estudo. Apesar da menor quantidade de ácido cítrico utilizado para preparar os filmes, em comparação com o ácido acético, os filmes neutralizados em tampão citrato pH 5,0 com 0 ou 33% de glicerol, foram mais espessos do que os filmes neutralizados em tampão acetato. Diante disso, comprovou-se o efeito significativo do meio dispersante na espessura dos filmes ($p < 0,05$). Neste caso, a espessura dos filmes foi influenciada pelo tipo de ácido utilizado na preparação de tais materiais. De acordo com Bégin e colaboradores²¹⁹ a espessura de um filme é dependente do volume molecular do contra-íon do ácido utilizado para preparar a solução polimérica. Uma vez que os filmes preparados em ácido cítrico possuem um volume molecular superior ao do ácido acético, o valor da espessura do primeiro (76,6 μm) foi maior do que a do segundo (20 μm).

Nadarajah²² também relatou a influência do contra-íon do ácido na preparação de soluções de quitosana em ácido acético e ácido cítrico. A espessura dos filmes originados a partir das soluções de quitosana sofreu alteração com a substituição do ácido utilizado na elaboração dos filmes. Houve variação de 20 μm (filmes preparados em ácido acético) a 60 μm (filmes preparados em ácido cítrico). Portanto, concluiu-se que o efeito do ácido cítrico foi significativo ($p < 0,05$) para o aumento na espessura dos filmes, em comparação com o efeito do ácido acético.

6.3.4. Avaliação Estatística dos Efeitos dos Fatores Percentual de Plastificante e Meio Dispersante no Conteúdo de Umidade dos Filmes de Quitosana

Em relação aos resultados da Figura 6.6, pôde-se observar que os filmes neutralizados em tampão acetato pH 5,0 com 0 ou 33% de plastificante, apresentaram maiores valores de conteúdo de umidade. Comportamento inverso foi verificado para os filmes neutralizados em tampão citrato pH 5,0 com 0 ou 33% de plastificante.

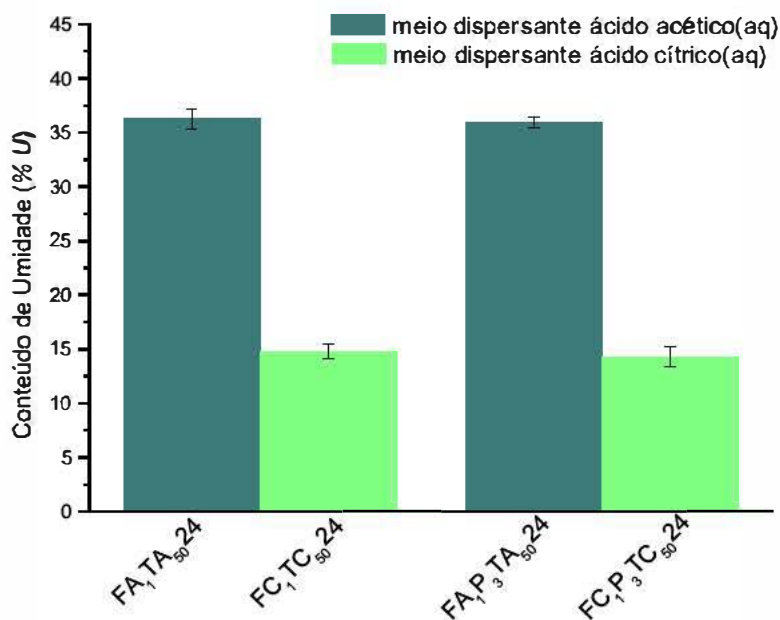


Figura 6.6 - Conteúdo de Umidade (%U) dos Filmes de Quitosana preparados em Ácido Acético_(aq) ou Ácido Cítrico_(aq), respectivamente, Solução Tampão Ácido Acético/Acetato de Sódio ou Ácido Cítrico/Citrato de Sódio, pH 5,0, como Agentes Neutralizantes e Glicerol como Plastificante: FA₁ e FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados, respectivamente, em ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq); P₃: plastificante glicerol (33% m/m); TA₅₀ e TC₅₀: agente neutralizante solução tampão ácido acético/acetato de sódio e ácido cítrico/citrato de sódio pH 5,0, respectivamente; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

Conforme os resultados de ANOVA da Tabela 6.43, constatou-se que os valores de F_{obs} para cada conjunto de filmes preparados, (FA₁TA₅₀24 e FA₁P₃TA₅₀24) e (FC₁TC₅₀24 e FC₁P₃TC₅₀24), foram menores que o valor crítico ($F_{obs} < 4,96$). Logo, se pode inferir que os valores de conteúdo de umidade dos filmes não são significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Tabela 6.43 - Análise de Variância (ANOVA) de Fator Único [percentual de plastificante, % (m/m)] para Comparação da Diferença entre as Médias dos Grupos [conteúdo de umidade (%U) dos filmes de quitosana, concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido acético_(aq) ou ácido cítrico_(aq), com plastificante nos percentuais de 0 e 33% (m/m) e neutralizados em solução tampão ácido acético/acetato de sódio ou tampão ácido cítrico/citrato de sódio, pH 5,0, durante 24 h] e das Variações Internas aos Grupos. Nível de significância: $p < 0,05$.

Conjunto	Graus de Liberdade (GL)	Fonte da Variação			F_{obs}
		Entre os Grupos (efeito do fator)	Nos Grupos (erro)	Total	
		1	10	11	
%U _{FA1TA5024}	Soma Quadrática (SQ)	0,6075	2,95	3,5580	2,09
%U _{FA1P3TA5024}	Média Quadrática (MQ)	0,6075	0,29	-	
%U _{FC1TC5024}	Soma Quadrática (SQ)	0,4760	3,66	4,1360	1,32
%U _{FC1P3TC5024}	Média Quadrática (MQ)	0,4760	0,36	-	

$F_{10}^1 = 4,96$. FA₁ e FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados, respectivamente, em ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq); P₃: plastificante glicerol (33% m/m); TA₅₀ e TC₅₀: agente neutralizante, soluções tampão ácido acético/acetato de sódio e ácido cítrico/citrato de sódio pH 5,0, respectivamente; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

Analisando-se o efeito da adição de glicerol nos filmes neutralizados em tampão acetato ou citrato pH 5,0, verificou-se que, a presença de glicerol reduziu os valores do conteúdo de umidade nos filmes, independente do meio de neutralização. No entanto, o efeito do glicerol no conteúdo de umidade não foi estatisticamente significativo ($p > 0,05$). Segundo a literatura, os plastificantes são responsáveis por modificações nas propriedades físico-químicas dos biopolímeros^{221,222}. O glicerol, como plastificante, tem a propriedade de modificar a rede polimérica o que origina regiões com maior distância intercadeias e, conseqüentemente, maior mobilidade, o que promove a adsorção de água. Isto é devido à natureza hidrofílica do glicerol que adsorve moléculas de água através da formação de

ligações de hidrogênio com o plastificante. Estas moléculas de água adsorvidas são denominadas água livre²²³, ou seja, elas estão livres na matriz (filme) para se mover e interagir com o plastificante, pois os sítios de ligação do polímero (quitosana) estão ocupados com glicerol²²⁴. A adsorção de moléculas de água pelo filme é dependente do conteúdo de glicerol presente em tal, portanto, quanto maior é esse conteúdo, maior a quantidade de sítios ocupados com o plastificante. Assim, quantidades elevadas de glicerol no filme dão preferência às interações quitosana-glicerol no lugar das interações quitosana-água. Como consequência, maior o conteúdo de umidade para o filme.

Contudo, em nosso estudo, observou-se que a adição de 33% de glicerol nos filmes neutralizados em acetato ou citrato não foi suficiente para promover o aumento do conteúdo de umidade. Então, este aumento estaria relacionado às interações quitosana-água presentes nos filmes. Como se constatou uma redução no conteúdo de umidade para os filmes plastificados, conclui-se que esta diferença sutil entre os valores de conteúdo de umidade obtidos pelos filmes neutralizados em acetato ou citrato com 0 ou 33% de plastificante, pode ser devido às interações dos grupos hidroxila do glicerol com os grupos hidroxila e amino da quitosana, o que diminuiu a combinação entre os grupos amino do polímero e moléculas de água através das ligações de hidrogênio²²⁵. Este comportamento está de acordo com os valores da espessura dos filmes neutralizados em tampão acetato ou citrato (Tabela 6.41) cujos resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) com a adição de glicerol.

Tabela 6.44 - Análise de Variância (ANOVA) de Fator Único (meio dispersante) para Comparação da Diferença entre as Médias dos Grupos [conteúdo de umidade (%U) dos filmes de quitosana, concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq), com e sem plastificante, e neutralizados em solução tampão ácido acético/acetato de sódio e tampão ácido cítrico/citrato de sódio, pH 5,0, durante 24 h] e das Variações Internas aos Grupos. Nível de significância: $p < 0,05$.

Conjunto	Graus de Liberdade (GL)	Fonte da Variação			F_{obs}
		Entre os Grupos (efeito do fator)	Nos Grupos (erro)	Total	
		1	10	11	
%U _{FA1TA5024}	Soma Quadrática (SQ)	1398,89	3,91	1402,80	3587
%U _{FC1TC5024}	Média Quadrática (MQ)	1398,89	0,39	-	
%U _{FA1P3TA5024}	Soma Quadrática (SQ)	1393	2,70	1395,70	5159
%U _{FC1P3TC5024}	Média Quadrática (MQ)	1393	0,27	-	

$F_{10}^1 = 4,96$. FA₁ e FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados, respectivamente, em ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq); P₃: plastificante glicerol (33% m/m); TA₅₀ e TC₅₀: agente neutralizante, soluções tampão ácido acético/acetato de sódio e ácido cítrico/citrato de sódio pH 5,0, respectivamente; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

A partir da análise da Tabela 6.44, pôde-se verificar que, tal como para os valores de espessura dos filmes, o efeito do meio dispersante foi significativo ($p < 0,05$) para o conteúdo de umidade dos materiais. Os valores de F_{obs} foram todos menores que o valor crítico ($F_{obs} < 4,96$). Neste caso, o efeito do tipo de ácido utilizado na preparação dos filmes conduziu a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os valores de conteúdo de umidade. Pode-se afirmar que as interações entre os ânions citrato com grupos amino protonados da quitosana são mais intensas do que as interações com ânion acetato. Por conseguinte, em comparação com filmes neutralizados em tampão acetato, filmes neutralizados em tampão citrato originaram redes poliméricas mais compactas²¹³ com menor conteúdo de umidade.

6.3.5. Análise Térmica Simultânea

Tabela 6.45 - Parâmetros termogravimétricos obtidos para os filmes de quitosana, a concentração de 1,1% (m/v), preparados em ácido acético_(aq) ou ácido cítrico_(aq), com plastificante nos percentuais de 0 e 33% (m/m) e neutralizados em solução tampão ácido acético/acetato de sódio ou tampão ácido cítrico/citrato de sódio, pH 5,0, durante 24 h.

Código das amostras de filme	Estágio 1		Estágio 2			Estágio 3		Massa Residual (%) ^c
	P ₁ ^a	T _{p1} ^b	P ₂ ^a	T _{p2} ^b	T _{p2} ^{b'}	P ₃ ^a	T _{p3} ^b	
FA ₁ TA ₅₀ 24	38	78	18	267	-	13	465	31
FA ₁ P ₃ TA ₅₀ 24	36	76	23	250	-	11	462	30
FC ₁ TC ₅₀ 24	9	160	18	200	240	41	280	32
FC ₁ P ₃ TC ₅₀ 24	10	147	19	204	230	37	280	34

^aPercentual de perda de massa em cada estágio (%), ^{b,b'}Temperatura de máxima perda de massa (°C) e ^cMassa residual a 600 °C. FA₁ e FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados, respectivamente, em ácido acético_(aq) ou ácido cítrico_(aq); P₃: plastificante glicerol (33% m/m); TA₅₀ e TC₅₀: agente neutralizante soluções tampão ácido acético/acetato de sódio e ácido cítrico/citrato de sódio pH 5,0, respectivamente; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

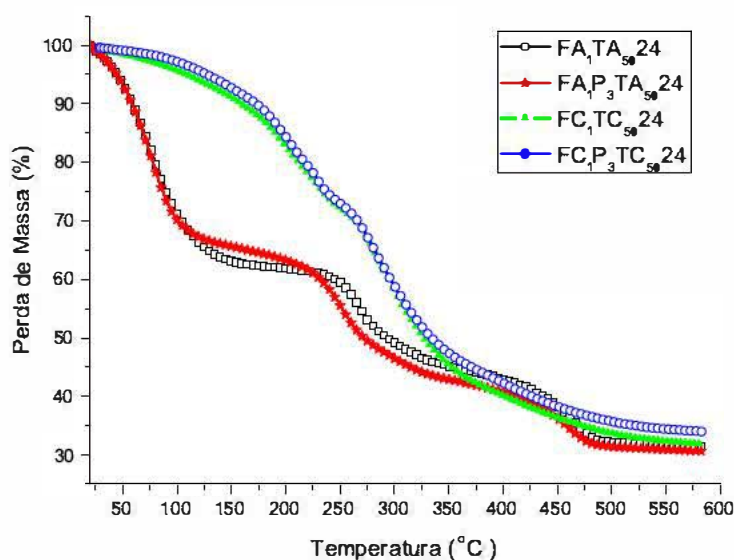


Figura 6.7 – Curvas de TGA dos Filmes de Quitosana preparados em Ácido Acético_(aq) ou Ácido Cítrico_(aq), respectivamente, Solução Tampão Ácido Acético/Acetato de Sódio ou Ácido Cítrico/Citrato de Sódio, pH 5,0, como Agentes Neutralizantes e Glicerol como Plastificante: FA₁ e FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados, respectivamente, em ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq); P₃: plastificante glicerol (33% m/m); TA₅₀ e TC₅₀: agente neutralizante solução tampão ácido acético/acetato de sódio e ácido cítrico/citrato de sódio pH 5,0, respectivamente; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

A Figura 6.7 mostra os resultados de TGA dos filmes FA₁TA₅₀24, FA₁P₃TA₅₀24, FC₁TC₅₀24 e FC₁P₃TC₅₀24. Adicionalmente, a Figura 6.8 exibe a T_p de cada evento térmico através de DrTGA. A partir da análise dos termogramas de TGA e da Tabela 6.45, pôde-se observar que, os filmes FA₁TA₅₀24 e FA₁P₃TA₅₀24 apresentaram perfis de degradação térmica em três estágios de perda de massa definidos. A análise térmica mostrou que os filmes FA₁TA₅₀24 iniciaram o primeiro estágio do processo de degradação através de desidratação, com P₁ = 38% e T_{p1} = 78 °C. Este evento indicou que os filmes continham água residual (água livre) fisicamente adsorvida e que sofreu evaporação a T < 100 °C²²⁶. Segundo a literatura, a desidratação²²⁷ é um fenômeno característico de polissacarídeos devido à natureza hidrofílica e, este resultado corrobora com os valores encontrados de conteúdo de umidade para os filmes neutralizados em tampão acetato sem plastificante. O segundo estágio exibiu P₂ = 18% e T_{p2} = 267 °C. Neste caso, o pico a 267 °C está relacionado à volatilização do glicerol²²⁸ e depolimerização das unidades acetiladas e desacetiladas das cadeias de quitosana^{229,230}. Para os filmes FA₁P₃TA₅₀24, a presença do glicerol deslocou a temperatura de degradação de quitosana a uma temperatura menor (de 267 a 250 °C). Este resultado está de acordo com Suyatma e colaboradores²³¹, o que demonstrou que a adição de plastificante glicerol (GLY), etilenoglicol (EG), poli(etilenoglicol) (PEG) ou propilenoglicol (PG), diminuiu a temperatura de degradação (T_{deg}) de filmes de quitosana. Comparando-se a atuação dos plastificantes PEG e GLY com EG e PG, os autores concluíram que PEG e GLY possuem ação plastificante superior. Dessa forma, constatou-se que a plastificação promove a cisão das interações polímero-polímero, as quais são previstas na teoria de plastificação de gel. Em seguida, o terceiro e último estágio de perda de massa apresentou valores de P₃ = 13% e T_{p3} = 465 °C, o que foi consequência da formação de ligações intercadeias (ligações cruzadas entre as cadeias de quitosana) durante os processos de depolimerização²³⁰.

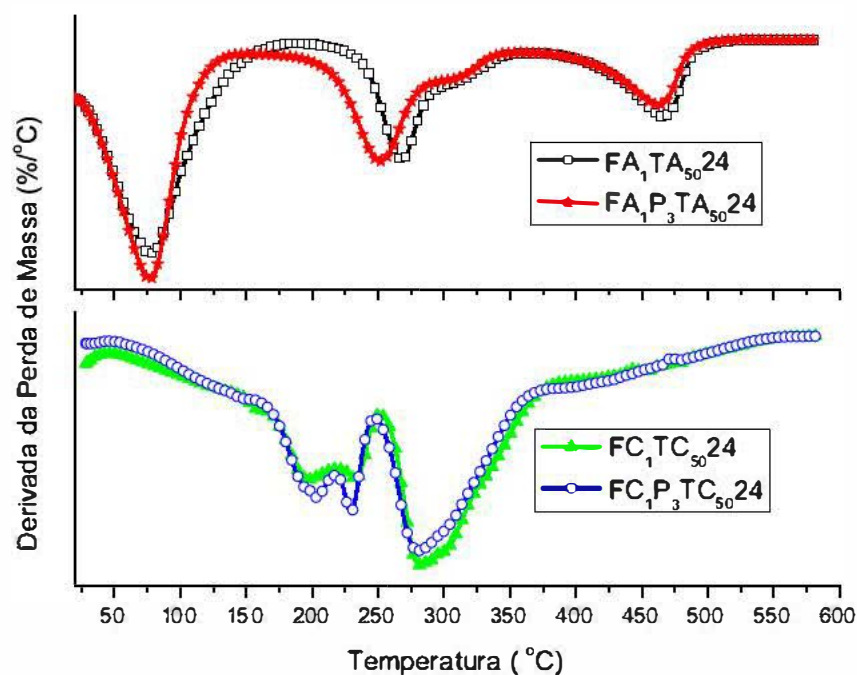


Figura 6.8 – Curvas de DrTGA dos Filmes de Quitosana preparados em Ácido Acético_(aq) ou Ácido Cítrico_(aq), respectivamente, Solução Tampão Ácido Acético/Acetato de Sódio ou Ácido Cítrico/Citrato de Sódio, pH 5,0, como Agentes Neutralizantes e Glicerol como Plastificante: FA₁ e FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados, respectivamente, em ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq); P₃: plastificante glicerol (33% m/m); TA₅₀ e TC₅₀: agente neutralizante solução tampão ácido acético/acetato de sódio e ácido cítrico/citrato de sódio pH 5,0, respectivamente; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

Os filmes FC₁TC₅₀24 e FC₁P₃TC₅₀24, em comparação com os filmes FA₁TA₅₀24, FA₁P₃TA₅₀24, apresentaram três estágios de perda de massa, porém menos definidos. Para os filmes FC₁TC₅₀24, o primeiro estágio mostrou P₁ = 9% e T_{p1} = 160 °C, o que foi atribuído à perda de água de cristalização. No segundo estágio, P₂ = 18% e T_{p2} = 200 °C e 240 °C. Este resultado pode estar associado, respectivamente, à evaporação da água fortemente ligada à quitosana por ligações de hidrogênio e início da decomposição de quitosana, onde a estrutura cristalina do material foi contraída²³². Comportamento semelhante aos filmes FA₁P₃TA₅₀24 foi verificado para os filmes FC₁P₃TC₅₀24 no que concerne à perda de glicerol. Neste caso, a temperatura de volatilização do glicerol foi menor (T_{p2} ≈ 204 °C) e ocasionou ligeira modificação na temperatura de decomposição da fase amorfa da quitosana (de 240 a 230 °C). E, por fim, o último estágio de degradação, com uma intensidade superior, apresentou P₃ = 41% e T_{p3} = 280 °C. Os resultados permitiram inferir a ocorrência de processos como a

desidratação, depolimerização e decomposição pirolítica do esqueleto polissacarídico, como tal observado nos filmes $FA_1TA_{50}24$ e $FA_1P_3TA_{50}24$. Ademais, observou-se a degradação de sal citrato de sódio.

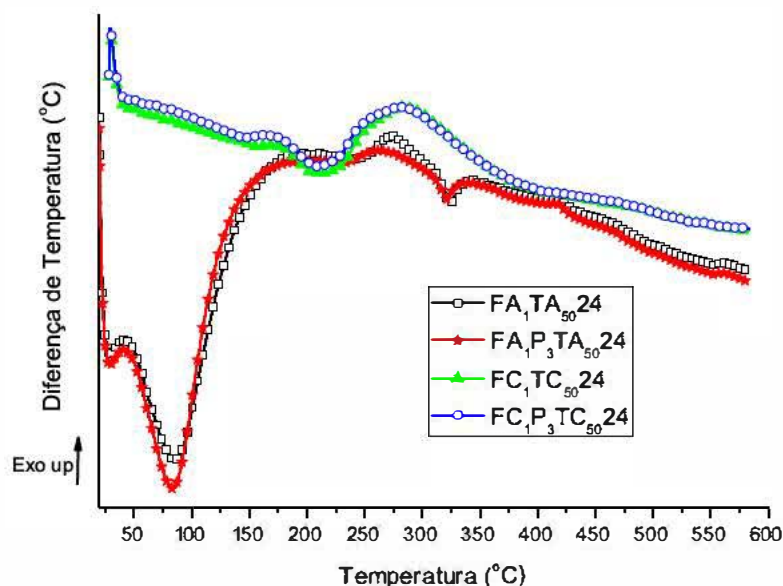


Figura 6.9 – Curvas de DTA dos Filmes de Quitosana preparados em Ácido Acético_(aq) ou Ácido Cítrico_(aq), respectivamente, Solução Tampão Ácido Acético/Acetato de Sódio ou Ácido Cítrico/Citrato de Sódio, pH 5,0, como Agentes Neutralizantes e Glicerol como Plastificante: FA_1 e FC_1 : filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados, respectivamente, em ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq); P_3 : plastificante glicerol (33% m/m); TA_{50} e TC_{50} : agente neutralizante solução tampão ácido acético/acetato de sódio e ácido cítrico/citrato de sódio pH 5,0, respectivamente; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

Em relação às curvas de DTA (Figura 6.9), para os filmes $FA_1TA_{50}24$ e $FA_1P_3TA_{50}24$, foram observados, no total, três eventos, dois endotérmicos e um exotérmico. Perfil semelhante foi encontrado por Balau e colaboradores²³³. Os eventos endotérmicos corresponderam à evaporação da água residual dos filmes ($T = 78\text{ °C}$) e fusão do sal acetato de sódio ($T = 325\text{ °C}$). O evento exotérmico correspondeu à decomposição térmica da quitosana ($T = 267\text{ °C}$). Entretanto, para os filmes $FC_1TC_{50}24$ e $FC_1P_3TC_{50}24$, foram constatados dois eventos, um endotérmico e um exotérmico. O evento endotérmico a $T \approx 212\text{ °C}$, correspondeu ao ponto de fusão dos filmes e, o evento exotérmico a $T = 280\text{ °C}$, à decomposição térmica da quitosana.

6.3.6. Calorimetria Exploratória Diferencial

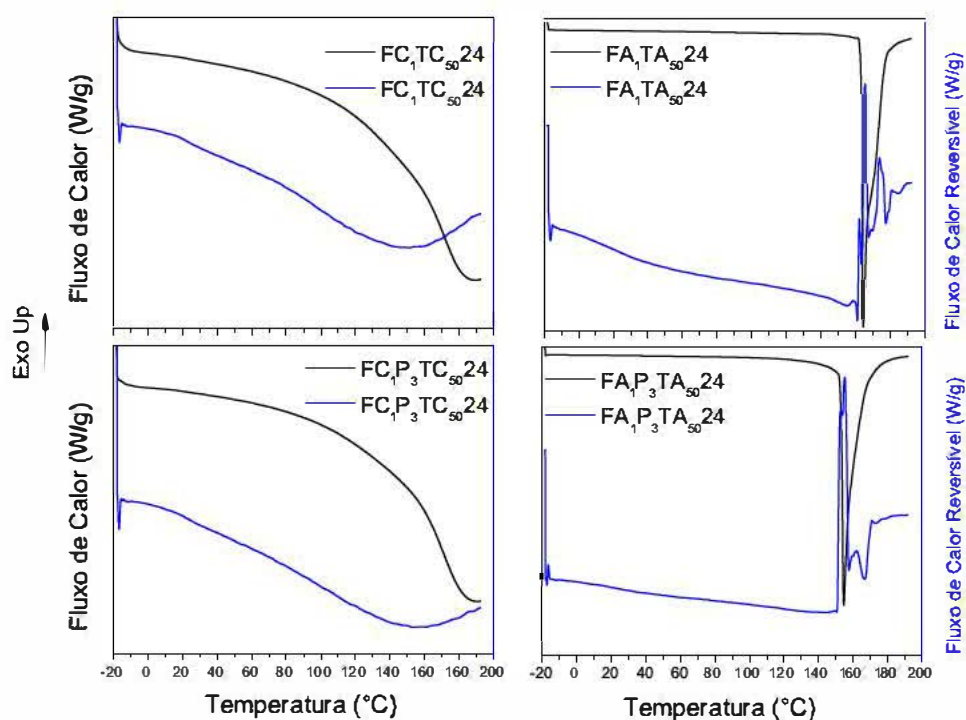


Figura 6.10 – Curvas de DSC dos Filmes de Quitosana preparados em Ácido Acético_(aq) ou Ácido Cítrico_(aq), respectivamente, Solução Tampão Ácido Acético/Acetato de Sódio ou Ácido Cítrico/Citrato de Sódio, pH 5,0, como Agentes Neutralizantes e Glicerol como Plastificante. Em preto: primeira curva de aquecimento (DSC convencional). Em azul: segunda curva de aquecimento (DSC modulado): FA₁ e FC₁: filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados, respectivamente, em ácido acético_(aq) e ácido cítrico_(aq); P₃: plastificante glicerol (33% m/m); TA₅₀ e TC₅₀: agente neutralizante solução tampão ácido acético/acetato de sódio e ácido cítrico/citrato de sódio pH 5,0, respectivamente; 24: período de imersão (h) dos filmes no agente neutralizante.

A Figura 6.10 apresenta os termogramas de DSC dos filmes FA₁TA₅₀24, FA₁P₃TA₅₀24, FC₁TC₅₀24 e FC₁P₃TC₅₀24. De acordo com os resultados de DSC convencional (primeira curva de aquecimento) dos filmes FA₁TA₅₀24 e FA₁P₃TA₅₀24, para ambos, observou-se apenas um pico correspondente à temperatura de fusão (T_m) dos filmes. A existência deste pico de fusão²³⁴ reforçou, segundo relatado na literatura, a tendência de que filmes de quitosana preparados em ácido acético formam estruturas cristalinas^{235,236}. Para os filmes FA₁TA₅₀24, a T_m foi de 164 °C e a entalpia de fusão (ΔH), 200 de J g⁻¹. Por outro lado, os filmes FA₁P₃TA₅₀24 mostraram valores de ΔH e T_m de, aproximadamente, 155 °C e de 180 J

g^{-1} , respectivamente. Neste caso, observou-se que os filmes com 33% de glicerol exibiram um decréscimo nos valores de ΔH e T_m , com um deslocamento para a esquerda da temperatura de fusão. Diante disso, os resultados indicaram que o ΔH e T_m podem estar associados à cristalinidade dos filmes logo, quanto maiores os valores de ΔH , maior a cristalinidade de tais materiais. No presente estudo, o menor valor de ΔH foi possivelmente resultante da redução da cristalinidade dos filmes FA₁P₃TA₅₀24, pois a quantidade de glicerol adicionada à solução de quitosana durante a preparação dos filmes diminuiu o número de domínios cristalinos nestes filmes. Isto corrobora com os resultados de conteúdo de umidade (seção 6.3.4.). A redução do conteúdo de umidade nos filmes com glicerol pode ter ocasionado a diminuição da cristalinidade dos filmes. Em geral, o conteúdo de umidade nos filmes é diretamente proporcional à cristalinidade²³⁷.

Em relação aos termogramas de calorimetria exploratória diferencial modulada (MDSC, que correspondeu à segunda curva de aquecimento) dos filmes FA₁TA₅₀24 e FA₁P₃TA₅₀24, não foi possível identificar a transição vítrea. Existe uma controvérsia na comunidade científica quanto à identificação da transição vítrea na quitosana. Dong²³⁸ e Kittur²³⁹ não identificou a transição vítrea através de DSC, no entanto, há alguns relatos na literatura que mostram uma variabilidade de valores relacionados à temperatura de transição vítrea (T_g) da quitosana. Esta variabilidade é dependente de vários fatores, tais como o tipo de ácido utilizado no processo de preparação, a presença de plastificantes ou conteúdo de água²⁴⁰⁻²⁴². Portanto, não foi possível avaliar a presença de T_g nas análises de DSC.

De acordo com os resultados de DSC convencional para os filmes FC₁TC₅₀24 e FC₁P₃TC₅₀24, não foi possível evidenciar qualquer transição de fase. A partir das curvas de fluxo de calor reversível (curvas de MDSC) para ambos os filmes em estudo, não foi identificada a T_g . Identificaram-se somente amplas transições endotérmicas no intervalo de temperatura entre 100 e 200 °C, relacionadas à perda de água de cristalização. Adicionalmente, estas transições endotérmicas podem estar relacionadas à fusão dos filmes ou transição de fase (forma cristalina para amorfa)^{213,214}. Estas observações estão de acordo com os resultados apresentados de TGA /DTA-DrTGA (Figuras 6.7, 6.8 e 6.9).

6.4. CARACTERIZAÇÃO DOS SEGMENTOS DE PELE E FILMES DE QUITOSANA PÓS-ENSAIOS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Após a avaliação das propriedades físico-químicas dos filmes (grau de intumescimento, percentual de solubilização em meio ácido e em meio alcalino, espessura, conteúdo de umidade, percentual de perda de massa e mudança de fase), foi selecionada a composição do filme com melhor integridade na estrutura física com o propósito de utilização nos ensaios de liberação *in vitro*. Devido aos menores valores de percentual de solubilização e grau de intumescimento apresentados, a formulação FC₁TC₅₀24 foi escolhida para os ensaios subsequentes. Pretendeu-se determinar o grau de hidratação da pele através do uso do ácido hialurônico - AH_(aq). Neste caso, foi avaliada a eficiência do ativo (do AH_(aq) no filme) e do filme de quitosana (em comparação com a formulação de gel de Carbopol® com AH_(aq)), mediante a caracterização dos segmentos de pele por Espectroscopia de Infravermelho com Refletância Atenuada (FTIR-ATR) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Além disso, foram realizadas análises das superfícies de peles sem tratamento.

Os resultados a seguir referem-se à aplicação de filmes FC₁TC₅₀24 com tempos de preparação de 1 ou 32 semanas com ou sem AH_(aq). As imagens dos filmes antes dos ensaios de liberação estão expostas abaixo (Figura 6.11). Para avaliação da interação ativo-matriz, foram realizadas análises de MEV das superfícies dos filmes supracitados.

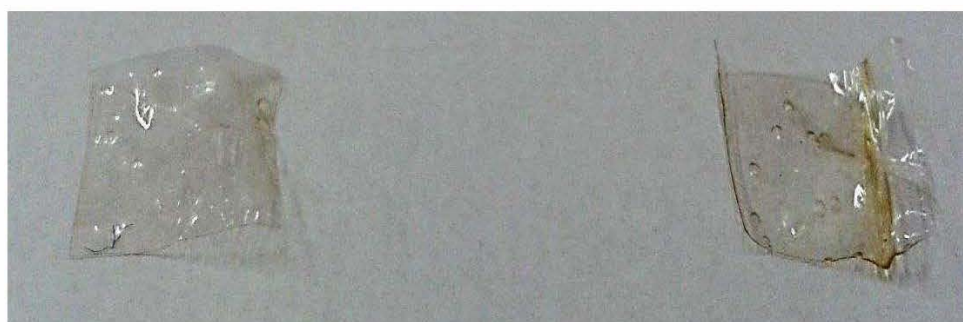


Figura 6.11 - Fotografias dos Filmes FC₁TC₅₀24 antes dos Ensaios de Liberação *in vitro*. À esquerda: filmes testados após 1 semana de preparação. À direita: filmes testados após 32 semanas de preparação.

6.4.1. Espectroscopia de Infravermelho com Refletância Atenuada

Na Tabela 6.46 são apresentados os resultados de Grau de Hidratação (*GH*) dos segmentos de pele de orelha de porco em função do tempo de preparação dos filmes de quitosana.

Tabela 6.46 - Grau de Hidratação (*GH*) da Pele de Orelha de Porco em função do Tempo de Preparação dos Filmes de Quitosana.

Meio de hidratação da pele	Grau de Hidratação (<i>GH</i>)	
	Tempo de preparação	
	1 semana ^a	32 semanas ^b
Filme de quitosana sem AH _(aq)	100,50 ± 0,01	101,20 ± 0,05
Filme de quitosana com AH _(aq)	100,50 ± 0,02	100,00 ± 0,00

a, b: valores de *GH* são expressos em média ± desvio-padrão. Nível de significância: $p < 0,05$; *GH* dos segmentos de pele sem tratamento (valor da hidratação basal da pele): 100,00 ± 0,00; *GH* dos segmentos de pele após o tratamento por gel de Carbopol® com AH_(aq): 106,80 ± 0,07.

Os valores de *GH* dos segmentos de pele após o tratamento por filmes FC₁TC₅₀24 (tempo de preparação de 1 semana) com ou sem AH_(aq), são apresentados na Tabela 6.46. Comparando-se o *GH* dos segmentos de pele com tratamento por filmes (contendo ou não o ativo) com os das peles sem tratamento, verificou-se que, considerando o período curto de contato do segmento de pele com o filme ($t = 10$ min), ambas as peles tratadas por filmes demonstraram um aumento no *GH* ($p < 0,05$). Neste caso, a presença do ácido hialurônico no filme não alterou os valores de grau de hidratação da pele, ou seja, o *GH* dos segmentos de pele com e sem tratamento com AH_(aq), foram iguais. Analisando-se o *GH* das peles com tratamento por gel contendo o ativo, em comparação com as peles sem tratamento, houve um maior valor para a formulação gel ($p < 0,05$). Estes resultados confirmam os apresentados por FTIR-ATR (Figura 6.12). De acordo com Prash e colaboradores²⁴³, a hidratação da pele pode ser identificada pela relação entre a absorvância das bandas de amida I e II. Quanto maior a razão, maior a hidratação da pele. Neste caso, para as peles com tratamento por filmes (com ou sem ácido hialurônico) ou por gel contendo o ativo, houve um aumento no valor da razão entre a intensidade das bandas de amida I e II para as peles com tratamento (R_f) em relação à

razão entre a intensidade das bandas para as peles sem tratamento (R_i). Tais bandas de amida I e II foram encontradas nos números de onda de 1645 e 1547 cm^{-1} , e correspondeu, respectivamente, às vibrações de estiramento do grupo funcional carbonila da amida, $\nu(-\text{C}=\text{O})$ e de flexão da amina primária, $\nu(-\text{NH})$.

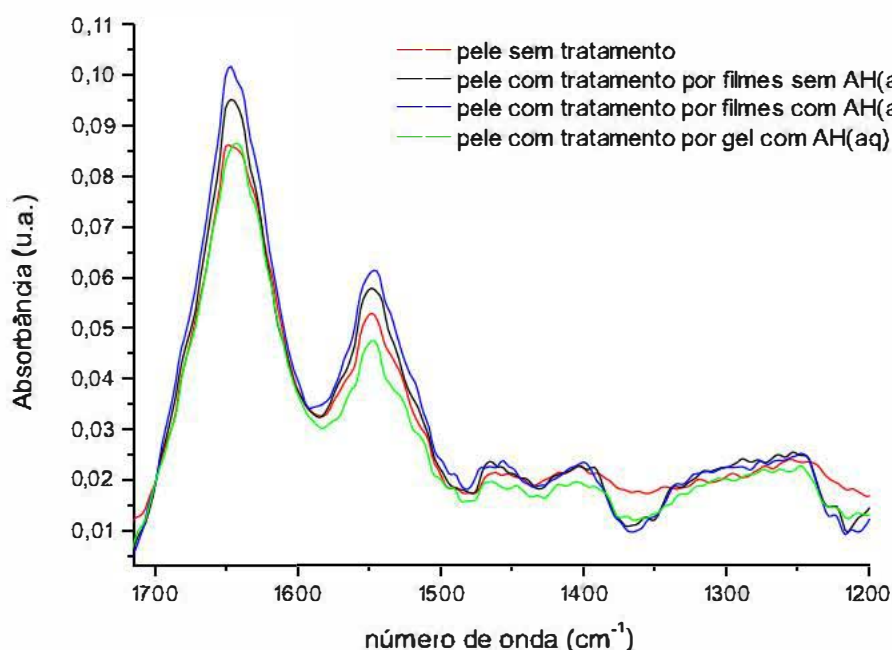


Figura 6.12 - Espectros de FTIR-ATR dos Segmentos de Pele de Orelha de Porco para os Filmes Testados após 1 Semana de Preparação.

Em razão da semelhança entre os espectros de FTIR-ATR dos segmentos de pele para os filmes testados após o tempo de preparação de 1 semana com os espectros para os filmes testados após o tempo de preparação de 32 semanas, não foi demonstrado tal resultado. Com relação à Tabela 6.46, observou-se que os segmentos de pele após tratamento por filmes (tempo de preparação de 32 semanas) sem $\text{AH}_{(\text{aq})}$, apresentaram aumento no grau de hidratação da pele ($p < 0,05$). No entanto, para as peles com tratamento por filmes com $\text{AH}_{(\text{aq})}$, não foi constatada a hidratação dos segmentos de pele.

6.4.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

Para avaliação da morfologia da pele de orelha de porco pós-ensaios de liberação *in vitro*, foram realizadas micrografias de MEV da superfície dos segmentos de pele após o tratamento por filmes (tempos de preparação de 1 ou 32 semanas, com ou sem ácido hialurônico) ou por gel de Carbopol® contendo o ativo (Figuras 6.13 e 6.14).

Em princípio, observou-se que os segmentos de pele após o tratamento por filmes, independente do tempo de preparação, com ou sem $AH_{(aq)}$, apresentaram uma superfície com pelo e células em descamação resultante do processo de esfoliação química supostamente ocasionada pela quitosana, devido a sua propriedade bioadesiva, ou pelo ácido cítrico, um dos componentes da solução tampão neutralizante. O mecanismo de ação pelo qual os α -hidroxiácidos²⁴⁴ atuam como agentes esfoliantes não está completamente compreendido^{245,246}. Segundo a literatura^{247,248}, é sugerido que o ácido cítrico através de quelação remova os íons cálcio das moléculas de caderina, componentes dos desmossomas. A redução da concentração dos íons cálcio na epiderme promove diminuição na coesão dos desmossomas, com consequente desprendimento das células, o que resulta em descamação. A esfoliação é conhecida por ser benéfica para o envelhecimento da pele, pois induz à proliferação celular e renovação da camada córnea, que exerce a função barreira da pele. Como resultado, há a normalização da coesão do estrato córneo.

Comparando-se as imagens das Figuras 6.13a com 6.13b e 6.14a, acredita-se que os valores de *GH* das peles (Tabela 6.46) promovidos pelos filmes (tempos de preparação de 1 ou 32 semanas) sem $AH_{(aq)}$, foram devido à atuação da quitosana como promotora de penetração de moléculas de tamanho pequeno através da pele. Entre as consequências, há o aumento da permeabilidade do estrato córneo devido ao efeito nas *tight junctions* localizadas entre as células epiteliais^{249,250}. Neste caso, a hidratação das peles apresentadas nas Figuras 6.13b e 6.14a foi ocasionada pelos filmes de quitosana, que promoveu maior abertura das *tight junctions* as quais conduziram à difusão de água através do estrato córneo. Assim, houve penetração de água através desta camada com aumento nos valores de *GH*. Logo, o mecanismo de hidratação é umectação ativa.

Em relação às imagens das Figuras 6.13b e 6.13c, verificou-se que a superfície de pele tratada com filmes contendo $AH_{(aq)}$ não sofreu alterações significativas em sua morfologia, o que era esperado, uma vez que tal segmento de pele apresentou *GH* igual ao da pele tratada

com filmes sem $AH_{(aq)}$ (Tabela 6.46). Neste cenário, a superfície de pele mostrou apenas esfoliação. Acredita-se que os íons hialuronato, que possui pequena massa molar e comprimento de cadeia, encontram-se aprisionados na rede polimérica do filme. É consequência das fortes interações eletrostáticas entre os sítios aniônicos de hialuronato ($-COO^-$) e catiônicos da quitosana ($-NH_3^+$), as quais podem ocorrer em todas as direções²⁵¹ e que mantém as moléculas de água presas no filme. Dessa forma, há redução da disponibilidade do ácido hialurônico para hidratar o estrato córneo da pele.

Comparando-se as imagens das Figuras 6.13a e 6.14b observou-se pequena diferença na morfologia da superfície da pele da Figura 6.14b, com alguma descamação celular. Provavelmente, ocorreu um comprometimento das propriedades do filme testado após 32 semanas de preparação, já que o *GH* dos segmentos de pele (Tabela 6.46) não apresentou modificação. Neste caso, a adição de ácido hialurônico não mostrou igual desempenho no processo de hidratação da pele tal qual observado para os filmes recém-preparados (Figura 6.13c). Em relação às imagens das Figuras 6.14a e 6.14b, verificou-se uma redução significativa na esfoliação da pele.

Analisando-se as imagens das Figuras 6.13a e 6.14c, para a superfície do segmento de pele após tratamento com gel de Carbopol® contendo o ativo, não foi possível evidenciar a esfoliação. Apenas foi observado um revestimento desta superfície, proporcionado, provavelmente, pela formulação gel. Ademais, as micrografias mostraram uma redução no tamanho de seus sulcos devida à hidratação da pele. Portanto, o mecanismo de hidratação é umectação somado ao de umectação ativa.

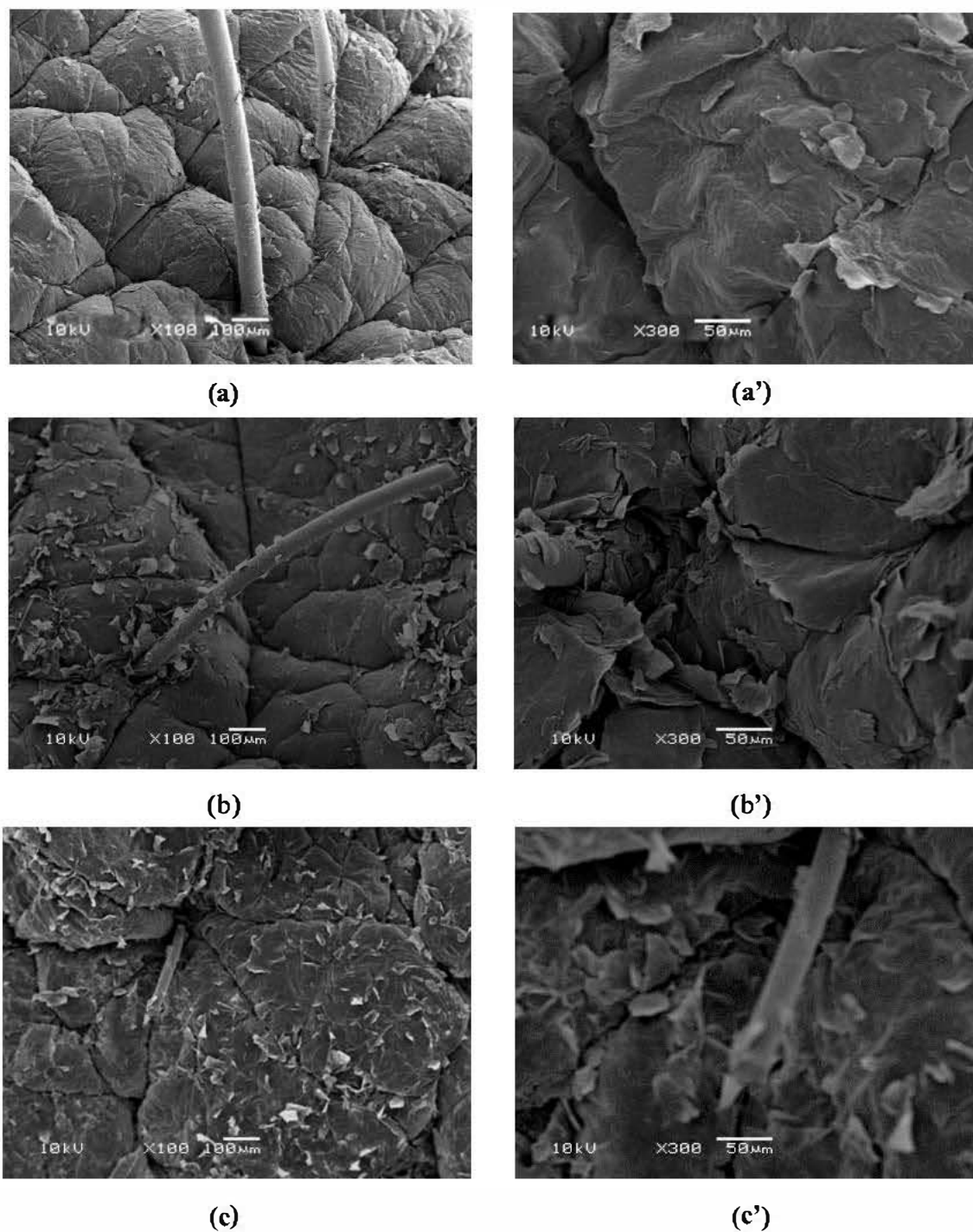


Figura 6.13 - Micrografias de MEV das Superfícies de Pele de Porco Pós-Ensaio de Liberação *in vitro*: (a) e (a') pele sem tratamento; (b) e (b') pele com tratamento por filmes FC₁TC₅₀24 sem AH_(aq); (c) e (c') pele com tratamento por filmes FC₁TC₅₀24 com AH_(aq). Todos os filmes foram testados após 1 semana de preparação.

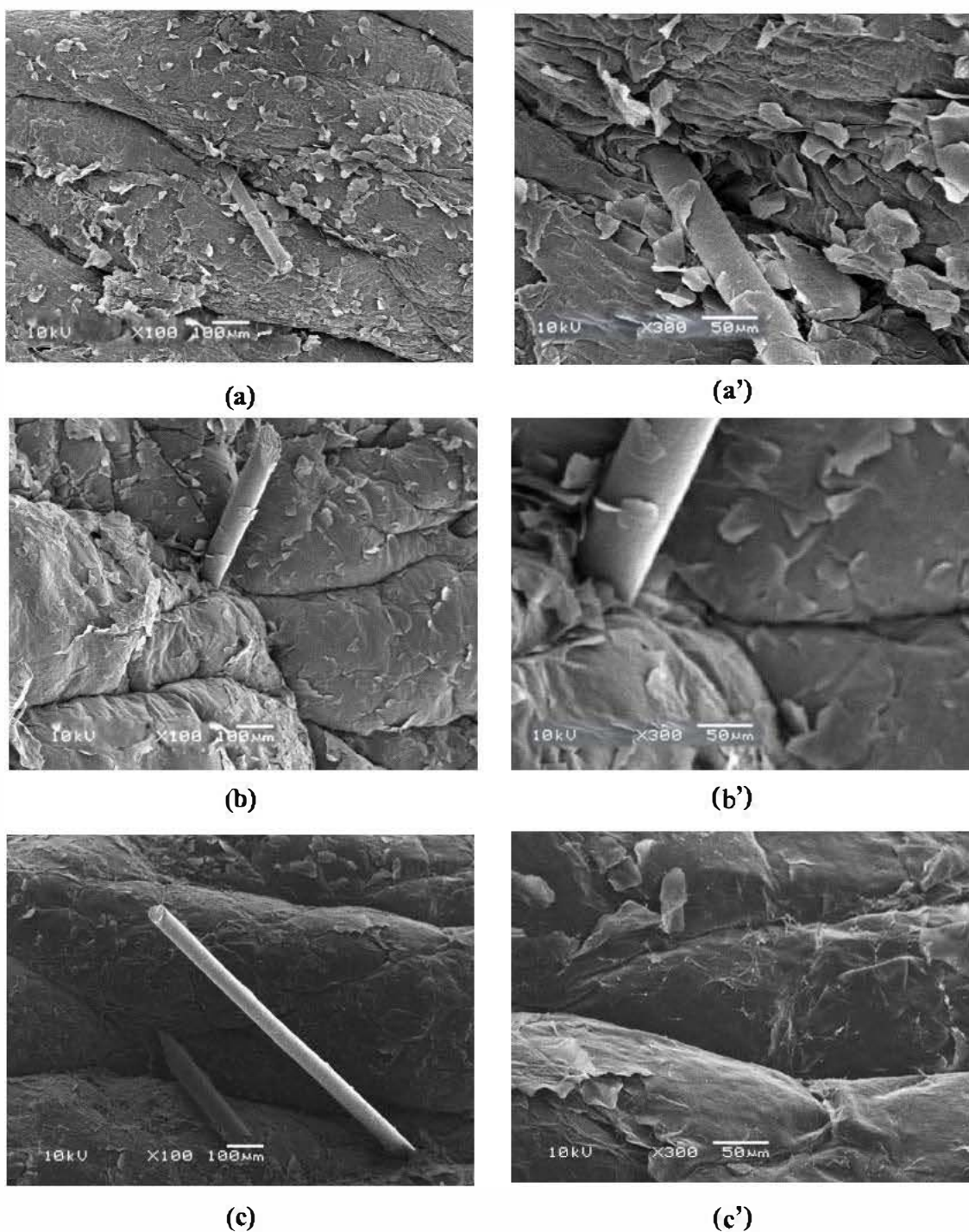
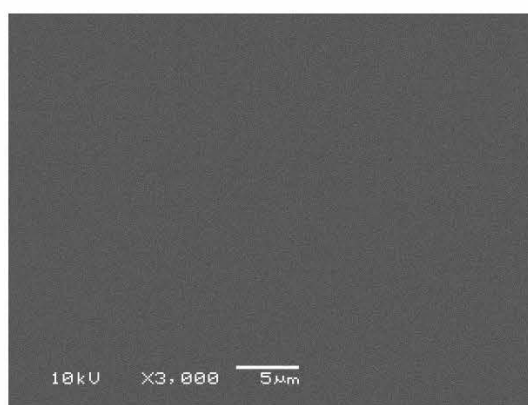
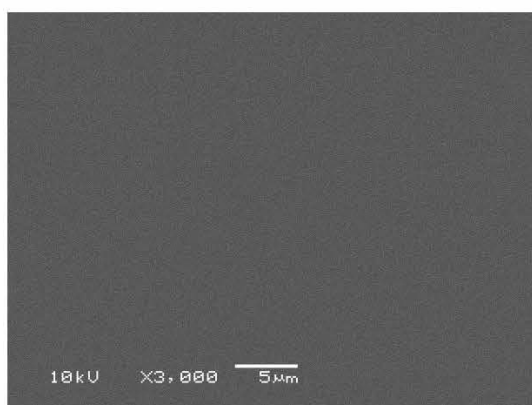


Figura 6.14 - Micrografias de MEV das Superfícies de Pele de Porco Pós-Ensaíos de Liberação *in vitro*: (a) e (a') pele com tratamento por filmes $FC_1TC_{50}24$ sem $AH_{(aq)}$; (b) e (b') pele com tratamento por filmes $FC_1TC_{50}24$ com $AH_{(aq)}$; (c) e (c') pele com tratamento por gel de Carbopol® contendo AH. Todos os filmes foram testados após 32 semanas de preparação.

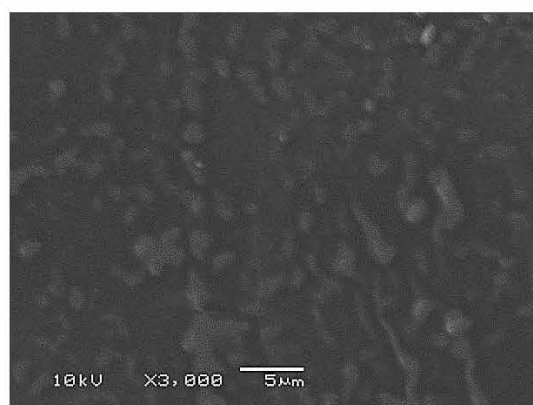
A partir da análise das micrografias das Figuras 6.15a e 6.15b observou-se que os filmes testados após 1 semana de preparação, sem o ácido hialurônico, caracterizados antes e após os ensaios de liberação, mostraram superfície lisa, homogênea e compacta, com uma estrutura densa, o que confirmou uma boa agregação das macromoléculas. A imagem referente à Figura 6.15c, apresentou na superfície a presença de domínios, possivelmente as cadeias poliméricas do íon hialuronato aprisionadas no filme, o que corroborou com os resultados de *GH* (Tabela 6.46) e MEV (Figura 6.13) dos segmentos de pele.



(a) ampliação 3000 x



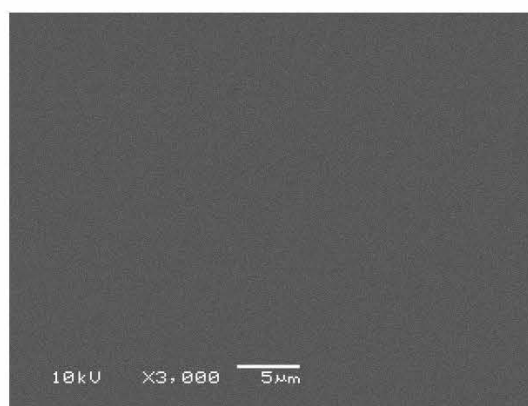
(b) ampliação 3000 x



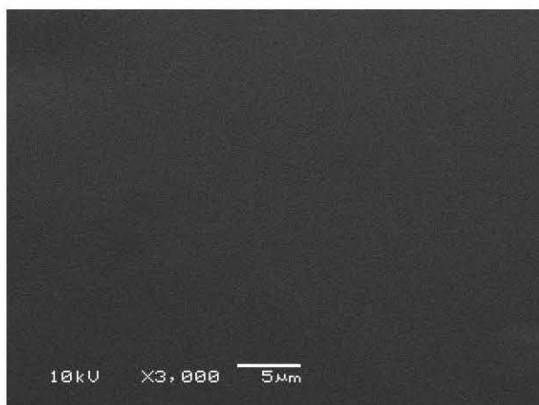
(c) ampliação 3000 x

Figura 6.15 - Micrografias de MEV das Superfícies dos Filmes de Quitosana: (a) filmes FC₁TC₅₀24 antes dos ensaios de liberação; (b) filmes FC₁TC₅₀24 após os ensaios de liberação sem AH_(aq) e (c) filmes FC₁TC₅₀24 após os ensaios de liberação com o AH_(aq). Todos os filmes foram testados após 1 semana de preparação.

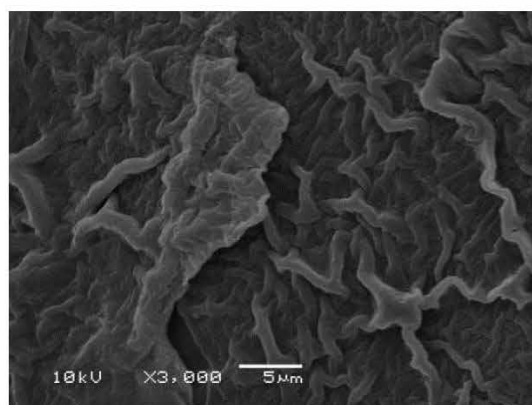
As micrografias das Figuras 6.16a e 6.16b mostraram que não só os filmes testados após 1 semana de preparação, sem o ácido hialurônico, caracterizados antes e após os ensaios de liberação, mas também os filmes testados após 32 semanas de preparação, apresentaram superfície lisa, homogênea e compacta, com uma estrutura densa, o que confirmou uma boa agregação das macromoléculas. Em relação à imagem da Figura 6.16c, observou-se na superfície, maior separação de fases e desagregação, possivelmente decorrente da maior interação entre os sítios catiônicos da quitosana e os íons hialuronato do ativo que se desprenderam da superfície do filme. Logo, estes resultados estão de acordo com os valores de *GH* (Tabela 6.46) e MEV (Figura 6.14) dos segmentos de pele.



(a) ampliação 3000 x



(b) ampliação 3000 x



(c) ampliação 3000 x

Figura 6.16 - Micrografias de MEV das Superfícies dos Filmes de Quitosana: (a) filmes $FC_1TC_{50}24$ antes dos ensaios de liberação; (b) filmes $FC_1TC_{50}24$ após os ensaios de liberação sem $AH_{(aq)}$ e (c) filmes $FC_1TC_{50}24$ após os ensaios de liberação com o $AH_{(aq)}$. Todos os filmes foram testados após 32 semanas de preparação.

7. CONCLUSÕES

Os resultados desta tese mostraram que os filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados em solução aquosa de ácido cítrico, sem glicerol, neutralizados em tampão citrato pH 5,0 durante 24 h e testados após 1 semana de preparação, apresentaram melhor biocompatibilidade com a pele humana e integridade em sua estrutura física para utilização como matrizes para aplicação na liberação de ácido hialurônico através de um modelo *in vitro* de pele de orelha de porco. Neste caso, o efeito do meio dispersante foi fundamental para avaliação da estabilidade física desses filmes. Estas formulações apresentaram menor valor de grau de intumescimento e de percentual de degradação em meio ácido e alcalino. O intumescimento - capacidade de retenção de água - foi resultado da alta compactação da rede polimérica do filme e o menor valor de percentual de solubilização em meio ácido e alcalino foi decorrente da presença de ácido cítrico na composição do filme, o qual originou interações iônicas entre os componentes negativamente e positivamente carregados da quitosana, o que dificultou a dissolução do filme.

Filmes neutralizados em tampão citrato pH 5,0 e preparados sem glicerol, segundo resultados de calorimetria exploratória diferencial, apresentaram transições endotérmicas amplas no intervalo de temperatura 100-200°C referentes à perda de água de cristalização. De acordo com os resultados de análise termogravimétrica, tais filmes apresentaram três estágios menos definidos de perda de massa. O primeiro estágio mostrou um percentual de perda de massa de ~9%, o que indicou uma elevada interação com água, característica importante para a aplicação cosmética.

Técnicas de espectroscopia de infravermelho com refletância atenuada e microscopia eletrônica de varredura foram aplicadas para investigar o efeito do filme sobre um modelo de pele de porco. Segundo tais técnicas, segmentos de pele tratados com filmes neutralizados em tampão citrato pH 5,0 e preparados sem glicerol, contendo ou não ácido hialurônico, mostrou um aumento significativo no grau de hidratação, em comparação com segmentos de pele sem tratamento. Logo, o tempo de preparação foi um fator positivo neste resultado. Ambas as amostras de pele mostraram descamação do estrato córneo resultante do processo de quimioesfoliação e hidratação dentro de 10 min. A quimioesfoliação ocorreu devido às propriedades bioadesivas dos filmes de quitosana e pela presença de ácido cítrico,

componente da solução tampão neutralizante. Na presença do ácido hialurônico, não foi observado nenhum efeito de hidratação.

No entanto, o gel de Carbopol® contendo ácido hialurônico mostrou hidratação muito superior aos filmes, provavelmente devido ao maior teor de água transferida para a pele e à propriedade filmogênica dos géis. Neste cenário, o ácido hialurônico interagiu menos com o componente aniônico do gel de Carbopol®, portanto o ativo tornou-se mais disponível para promover a hidratação dos segmentos de pele e a redução dos sulcos conforme observados nas micrografias. Assim, a adição de ativos como o ácido hialurônico em excipientes aniônicos foi mais apropriada para favorecer a interação do ativo com a pele, em comparação com excipientes catiônicos, como a quitosana.

Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície dos filmes evidenciaram a presença de domínios de separação de fase decorrentes das interações entre quitosana e ácido hialurônico. Com o aumento do tempo de preparação dos filmes, esta segregação foi mais acentuada.

Assim, pode-se afirmar que os filmes de quitosana a 1,1% (m/v) preparados em solução aquosa de ácido cítrico, sem glicerol, neutralizados em tampão citrato pH 5,0 durante 24 h e testados após 1 semana de preparação, devido à maior integridade física, biocompatibilidade e efeito esfoliante da quitosana e ácido cítrico, possuem um potencial de aplicação para utilização como filmes para esfoliação da pele humana.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Ribeiro, C. J.; Gonçalves, S. M. F. In *Cosmetologia Aplicada à Dermoestética*; Ribeiro, C. J.; Gonçalves, S. M. F. (Edts.); Pharmabooks: São Paulo, 2006, p. 149.
- 2 Griffiths, C. E. *Clin. Exp. Dermatol.* **1999**, *24*, 329.
- 3 Batistela, M. A.; Chorilli, M.; Leonardi, G. R. *Rev. Bras. Farm.* **2007**, *88*, 59.
- 4 Wulf, H. C.; Sandby-Moller, J.; Kobayasi, T.; Gniadecki, R. *Micron* **2004**, *35*, 185.
- 5 Stern, R. In *Textbook of Aging Skin*; Farage, M. A.; Miller, K. W.; Maibach, H. I. (Edts.); Springer-Verlag: Berlin, 2010, p. 225.
- 6 Sakai, S.; Yasuda, R.; Sayo, T. *J Invest Dermatol* **2000**, *114*, 1184.
- 7 Roy, A.; Sahu, R. K.; Matlam, M.; Deshmukh, V. K.; Dwivedi, J.; Jha, A.K. *Pharmacogn. Rev.* **2013**, *14*, 97.
- 8 Tran, C.; Carraux, P.; Micheels, P.; Kaya, G. *Dermatology* **2014**, *228*, 47.
- 9 Arruda, L. H. F.; Costa, A. *J. Clin. Exp. Dermatol. Res.* **2013**, *4*, 1.
- 10 Dastoor, S. F.; Misch, C. E.; Wang, H. L. *J. Oral Implantol.* **2007**, *33*, 164.
- 11 Gomes, R. K.; Gabriel, M. In *Cosmetologia: Descomplicando os Princípios Ativos*; Gomes, R. K.; Gabriel, M. (Edts.); Livraria Médica Paulista: São Paulo, 2009, p. 402.
- 12 Prista, L. N.; Alves, A. C.; Morgado, R.; Lobo, J. S. In *Tecnologia Farmacêutica*; Prista, L. N.; Alves, A. C.; Morgado, R.; Lobo, J. S. (Edts.); Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, 2012, p. 1402.
- 13 Hargittai, I.; Hargittai, M. *Struct. Chem.* **2008**, *19*, 69.
- 14 Laurent, T. C.; Fraser, J. R. *Faseb J.* **1992**, *6*, 2397.
- 15 Oh, E. J.; Park, K.; Kim, K. S.; Kim, J.; Yang, J. A.; Kong, J. H.; Lee, M. Y.; Hoffman, A. S.; Hahn, S. K. *J. Control. Release* **2010**, *141*, 2.
- 16 Juhlin, L. *J. Intern. Med.* **1997**, *242*, 61.
- 17 Brown, T. J.; Alcorn, D.; Fraser, J. R. E. *J. Invest. Dermatol.* **1999**, *113*, 740.
- 18 Brown, M. B.; Jones, S. A. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.* **2005**, *19*, 308.
- 19 Zazulak, K.; Zancan, L. R.; Gutierrez, S. S. *Cosmet. Toiletries* **2006**, *18*, 72.
- 20 Tammi, R.; Saamanen, A. M.; Maibach, H. I.; Tammi, M. *J. Invest. Dermatol.* **1991**, *97*, 126.
- 21 Bourguignon, L.Y.; Ramez, M.; Gilad, E.; Singleton, P. A.; Man, M. Q.; Crumrine, D. A.; Elias, P. M.; Feingold, K. R. *J. Invest. Dermatol.* **2006**, *126*, 1356.
- 22 Pavicic, T.; Gauglitz, G. G.; Lersch, P.; Schwach-Abdellaoui, K.; Malle, B.; Korting, H. C.; Farwick, M. *J. Drugs Dermatol.* **2011**, *10*, 990.

- 23 Förster M.; Bolzinger, M. A.; Fessi, H.; Briançon, S. *Eur. J. Dermatology* **2009**, *19*, 309.
- 24 Potts, R. O.; Guy, R. H. *Pharm. Res.* **1992**, *9*, 663.
- 25 Benson, H. A. *Curr. Drug Deliv.* **2005**, *2*, 23.
- 26 Fluhr, J. W.; Darlenski, R.; Surber, C. *Br. J. Dermatol.* **2008**, *159*, 23.
- 27 Rawlings, A. V. In *Skin Barrier*; Elias, P. M.; Feingold, K. R. (Edts.); Taylor & Francis Group: New York, 2006, p. 399.
- 28 Lintner, K.; Mas-Chamberlin, C.; Mondon, P.; Peschard, O.; Lamy, L. *Clin. Dermatol.* **2009**, *27*, 461.
- 29 Thakur, G.; Singh, A.; Singh, I. *Int. J. Pharm. Investig.* **2016**, *6*, 23.
- 30 Contri, R. V.; Katzer, T.; Ourique, A. F.; da Silva, A. L. M.; Beck, R. C. R.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2014**, *10*, 820.
- 31 Rinaudo, M. *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31*, 603.
- 32 Szymańska, E.; Winnicka, K. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 1819.
- 33 Choi, E. H.; Man, M. Q.; Wang, F. S.; Zhang, X. J.; Brown, B. E.; Feingold, K. R.; Elias, P. M. *J. Invest. Dermatol.* **2005**, *125*, 288.
- 34 Ali, S. M.; Yosipovitch, G. *Acta Derm-Venereol.* **2013**, *93*, 261.
- 35 Deccache, D. S. *Formulação dermocosmética contendo DMAE glicolato e filtros solares: desenvolvimento de metodologia analítica, estudo de estabilidade e ensaio de biometria cutânea*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRJ, 2006.
- 36 Cotterill, J. A. In *Textbook of Cosmetic Dermatology*; Baran, R.; Maibach, H. I. (Edts.); Martin Dunitz: London, 1998, p.749.
- 37 Koblenzer, C. S. *Clin. Dermatol.* **1996**, *14*, 171.
- 38 Pruniéras, M. In *Manual de Cosmetologia Dermatológica*; Pruniéras, M. (Edt.); Organização Andrei: São Paulo, 1994, p. 390.
- 39 Mitarotonda, A.; Benetti, A. Paganelli, F.; Galante, Y. M. *Cosmet Toiletries* **2007**, *122*, 61.
- 40 De Oliveira, A. Z. M. *Desenvolvimento de formulações cosméticas com ácido hialurônico*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Farmacêutica, Universidade do Porto, 2009.
- 41 Aubrun- Sonneville, A. O. *Soluble patch*. US007811953B2, Jul, 9, 2008.
- 42 Gueret, Jean-Louis. H. *Treatment device and methods of using the same*. US7419677B2, Sep, 2, 2008.

- 43 Villanova, J. C. O.; Oréface, R. L.; Cunha, A. S. *Polimeros* **2010**, *20*, 51.
- 44 Venus, M.; Waterman, J.; McNab, I. *Surgery* **2011**, *29*, 471.
- 45 Wysocki, A. B. *Nurs. Clin. N. Am.* **1999**, *34*, 777.
- 46 Junqueira, L. C.; Carneiro, J. In *Histologia Básica*; Junqueira, L. C.; Carneiro, J. (Edts.); Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1999, p. 303.
- 47 Harris, M. I. N. de C. In *Pele: Estrutura, Propriedades e Envelhecimento*; Harris, M. I. N. de C. (Edt.); Senac: São Paulo, 2003, p. 17.
- 48 Escola Britannica Online. *Pele: Ilustração Colorida*. Disponível em: <http://escola.britannica.com.br/assembly/135568/A-pele-humana-tem-três-camadas-a-epiderme-e-a-derme>. Acesso em: 2014, oct 15.
- 49 Schäfer-Korting, M.; Mehnert, W. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2007**, *59*, 427.
- 50 Matoltsy, A. G. *J. Invest. Dermatol.* **1976**, *67*, 20.
- 51 Shetty S.; Gokul S. *Oman Med J.* **2012**, *27*, 348.
- 52 Gschwandtner, M.; Mildner, M.; Mlitz, V.; Gruber, F.; Eckhart, L.; Tschachler, T.; Gschwandtner, R.; Werfel, P. M.; Gutzmer, E.; Elias, E.; Tschachler, E. *Allergy* **2013**, *68*, 37.
- 53 Martini, M. C. In *Introducción a la Dermofacia y la Cosmetología*; Martini, M. C. (Edt.); Acribia: Zaragoza, 2005.
- 54 Arda, O.; Göksügür, N.; Tüzün, Y. *Clin. Dermatol.* **2014**, *32*, 3.
- 55 Elias, P. M. *J. Invest. Dermatol.* **2004**, *122*, 36.
- 56 Jacobi, U.; Tassopoulos, T.; Surber, C.; Lademann, J. *Arch. Dermatol. Res.* **2006**, *297*, 303.
- 57 Agache, P. In *Measuring the Skin: Non-Invasive Investigations, Physiology, Normal Constants*; Agache, P.; Humbert, P. (Edts.); Springer: Berlin, 2004, p. 95.
- 58 Wertz, P. W.; Madison, K. C.; Downing, D. T. *J. Invest. Dermatol.* **1989**, *92*, 109.
- 59 Harding, C. R. *Dermatol Ther.* **2004**, *17*, 6.
- 60 Ananthapadmanabhan, K. P.; Mukherjee, S.; Chandar, P. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2013**, *35*, 337.
- 61 Caussin, J. *Stratum corneum hydration: mode of action of moisturizers on a molecular level*. Tese de doutorado, Leiden University, 2009.
- 62 Lodish, H.; Berk, A.; Matsudaira, P. Kaiser, C. A.; Krieger, M.; Scott, M. P.; Zipursky, S. L.; Darnell, J. In *Biologie Moleculaire de la Cellule*; Lodish, H.; Berk, A.; Matsudaira, P. Kaiser, C. A.; Krieger, M.; Scott, M. P.; Zipursky, S. L.; Darnell, J. (Edts.); De Boeck & Lacier s.a: Brussels, 2005, p. 209.

- 63 Tortora, G. J.; Derrickson, B. In *Principles of Anatomy and Physiology*; Roesch, B. (Edt.); John Wiley & Sons: Hoboken, 2009, p. 110.
- 64 Da Silva, A. P.; Da Silva, E. A.; Blazquez, F. J. H. *Rev. Saúde e Pesq.* **2008**, *1*, 201.
- 65 Mundstock, A.; Abdayem, R.; Pirot, F.; Haftek, M. *Open Dermatol. J.* **2014**, *8*, 72.
- 66 Dasgupta, B. R.; Bajor, J.; Mazzatti, D. J.; Misra, M. In *Cosmeceuticals: Procedures in Cosmetic Dermatology Series*; Draeos, Z. D. (Edt.); Elsevier Saunders: Oxford, 2014, p. 8.
- 67 Strauss, J. S.; Matoltsy, A. G. In *Histologia*; Weiss, L.; Greep, R. O. (Edts.); Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1981, p. 486.
- 68 Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. In *Biologia Molecular da Célula*; Renard, G.; Chies, J. M. (Edts.); Artmed: Porto Alegre, 2004, p. 1132.
- 69 Goodenough, D. A.; Paul, D. L. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2009**, *1*, 1.
- 70 Tsai, K. Valente, N. Y.; Nico, M. M. *Pediatr. Dermatol.* **2006**, *23*, 488.
- 71 Brandner, J. M. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2007**, *29*, 413.
- 72 Zirra, A. M. *Morphol. Embryol. (Bucur)*. **1976**, *22*, 9.
- 73 Brasil Escola. *Camadas da Pele*. Disponível em:
<http://brasilecola.uol.com.br/biologia/pele.htm>. Acesso em: 2015, dec 26.
- 74 Mc Grath J. A.; Eady, R. A. J. In *Rook's Textbook of Dermatology*; Bums, T.; Breathnach, S.; Cox, N.; Griffith, C. (Edts.); Blackwell: Oxford, 2004, p. 3.1
- 75 Gartner, L. P.; Hiatt, J. L. In *Tratado de Histologia em Cores*; Gartner, L. P.; Hiatt, J. L. (Edts.); Elsevier Brasil: São Paulo, 2011, p. 340.
- 76 Azulay, D. R. In *Dermatologia*; Azulay, D. R. (Edt.); Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1999, p. 516.
- 77 Sampaio, S. A. P.; Rivitti, E. A. In *Dermatologia*; Sampaio, S. A. P.; Rivitti, E. A. (Edts.); Artmed: São Paulo, 2001, p. 1156.
- 78 Rosado, C.; Ferreira, J.; Pinto, P. C.; Rodrigues, L. M. *Biomed Biopharm Res.* **2012**, *9*, 183.
- 79 Karadzovska, D.; Brooks, J. D.; Monteiro-Riviere, N. A.; Riviere, J. E. *Adv. Drug. Deliver. Rev.* **2013**, *65*, 265.
- 80 Bouwstra, J.; Gooris, G.; Cheng, K.; Weerheim, A.; Bras, W.; Ponc, M. *J. Lipid Res.* **1996**, *37*, 999.
- 81 Bouwstra, J. A.; Honeywell-Nguyen, P. L.; Gooris, G. S.; Ponc, M. *Prog. Lipid Res.* **2003**, *42*, 1.
- 82 Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; Dubbelaar, F. E.; Ponc, M. *J. Lipid Res.* **2001**, *42*, 1759.

- 83 Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; Dubbelaar, F. E.; Weerheim, A. M.; Ijzerman, A. P.; Ponc, M. J. *Lipid Res.* **1998**, *39*, 186.
- 84 Suhonen, T. M.; Bouwstra, J. A.; Urtti, A. *J. Control. Release* **1999**, *59*, 149.
- 85 Ananthapadmanabhan, K. P.; Mukherjee, S. Chandar, P. *Int. J. Cosmetic Sci.* **2013**, *35*, 337.
- 86 Silva, J. A.; Apolinário, A. C.; Souza, M. S. R.; Damasceno, B. P. G. L.; Medeiros, A. C. D. *J. Basic Appl. Pharm. Sci.* **2010**, *31*, 125.
- 87 Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. In *Fundamentos de Química Analítica*; Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. (Edts.); Editora Thomson: São Paulo, 2005, 214.
- 88 Fluhr, J.; Bankova, L.; Dikstein, S. In *Handbook of Non-Invasive Methods and the Skin*; Serup, J.; Jemec, G. B. E.; Grove, G. L (Edts.); Taylor & Francis Group: New York, 2006, p. 411.
- 89 Agache, P. In *Measuring the Skin: Non-Invasive Investigations, Physiology, Normal Constants*; Agache, P.; Humbert, P. (Edts.); Springer: Berlim, 2004, p. 21.
- 90 Guy, R. H. *J. Pharm. Res.* **1988**, *5*, 753.
- 91 Figueroa, M. J. A. *Promoción de la penetración transdérmica de Metotrexato*, Tese de Doutorado, Faculdade de Farmácia, Universidade de Santiago de Compostela, 2001.
- 92 Trommer, H. N. R. *Ski. Pharmacol. Physiol.* **2006**, *19*, 106.
- 93 EPA. 1992. In *Dermal Exposure Assessment*; Office of Health and Environmental Assessment, E. A. G. (Edts.); Environmental Protection Agency U. S: Washington, p. 2.
- 94 Hadgraft, J. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* **2001**, *14*, 72.
- 95 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). *Projeção da População do Brasil e das Unidades da Federação*. Disponível em: <https://ibge.gov.br/apps/projecao>. Acesso em: 2015, dec 30.
- 96 Populationpyramid. *Projeção da População Mundial*. Disponível em: <https://populationpyramid.net>. Acesso em 2015, dec 30.
- 97 Tosato, M.; Zamboni, V.; Ferrini, A.; Cesari, M. *Clin. Interv. Aging.* **2007**, *2*, 401.
- 98 Oriá, R. B.; Santana, E. N.; Fernandes, M. R.; Ferreira, F. V. A.; Brito G. A. C. *An. Bras. Dermatol.* **2003**, *78*, 425.
- 99 Leveque, J. L.; Corcuff, P.; Rigal, J. D.; Agache, P. *Int. J. Dermatol.* **1984**, *23*, 322.
- 100 Farage, M. A.; Miller, K. W.; Elsner, P.; Maibach, H. I. *Int. J. Cosmetic Sci.* **2008**, *30*, 87.
- 101 Hirata, L. L.; Sato, M. E. O.; Santos, C. A. D. M. *Acta Farm. Bonaer.* **2004**, *23*, 418.

- 102 Dos Santos, M.; Metral, E.; Boher, A.; Rousselle, P.; Thepot, A.; Damour, O. *Matrix Biol.* **2015**, *47*, 85.
- 103 Gragnani, A.; Cornick, S. M.; Chominski, V.; De Noronha, S. M. R.; De Noronha, S. A. A. C.; Ferreira, L. M. *Adv. Aging Res.* **2014**, *3*, 265.
- 104 Fisher, G. J.; Kang, S.; Varani, J.; Bata-Csorgo, Z.; Wan, Y.; Datta, S.; Voorhees, J. J. *Arch. Dermatol.* **2002**, *138*, 1462.
- 105 Finkel, T.; Holbrook, N. J. *Nature* **2000**, *408*, 239.
- 106 Chatgialloglu, C.; O'Neill, P. *Exp. Gerontol.* **2001**, *36*, 1459.
- 107 Alchorne, M. M. A.; De Abreu, M. A. M. M. *An. Bras. Dermatol.* **2008**, *83*, 7.
- 108 Moronkeji, K.; Akhtar, R. In *Mechanical Properties of Aging Soft Tissues*; Derby, B.; Akhtar, R. (Edts.); Springer: New York, 2015, p. 237.
- 109 Teixeira, I. N. D. A. O.; Guariento, M. E. *Cienc. Saude Colet.* **2010**, *15*, 2845.
- 110 Farinatti, P. T. V. *Rev. Bras. Med. Esporte* **2002**, *8*, 129.
- 111 Mota, M. P.; Figueiredo, P. A.; Duarte, J. A. *Rev. Port. Cienc. Desporto* **2004**, *4*, 81.
- 112 Jett, F. K. In *Ebersole & Hess' Toward Healthy Aging: Human Needs And Nursing Response*; Touhy, T. A.; Jett, F. K. (Edts.); Elsevier: Saint Louis, 2016, p. 31.
- 113 Harman, D. *Antioxid. Redox Signal.* **2003**, *5*, 557.
- 114 Nicander, I.; Aberg, P.; Ollmar, S. In *Handbook of Non-Invasive Methods and the Skin*; Serup, J.; Jemec, G. B. E.; Grove, G. L. (Edts.); Taylor & Francis Group: New York, 2006, p. 345.
- 115 Bernstein, J. E. *Clin Dermatol.* **1996**, *14*, 567.
- 116 Haroun, M. T. *Geriatr. Aging* **2003**, *6*, 41.
- 117 Verdier-Sévrain, S.; Bonté, F. *J. Cosmet. Dermatol.* **2007**, *6*, 75.
- 118 Gournay, A.; Navarro, S. *Cosmet Toiletries* **2003**, *15*, 70.
- 119 Voegeli, D. *Nurs. Stand.* **2007**, *22*, 62.
- 120 Barata, E. A. F. In *Cosméticos: Arte e Ciência*; Barata, E. A. F. (Edt.); Lidel: Lisboa, 2002.
- 121 Loden, M. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2003**, *4*, 771.
- 122 Kezic, S.; Nielsen, J. B. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **2009**, *82*, 677.
- 123 Grubauer G.; Elias, P. M.; Feingold, K. R. *J. Lipid Res.* **1989**, *30*, 323.
- 124 Machado, M.; Salgado, T. M.; Hadgraft, J.; Lane, M. E. *Int. J. Pharm.* **2010**, *384*, 73.
- 125 Hon, K. L.; Wong, K. Y.; Leung, T. F.; Chow, C. M.; Ng, P. C. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2008**, *9*, 45.

- 126 Bemengo, J. C.; De Rigal, J. In *Measuring the Skin: Non-Invasive Investigations, Physiology, Normal Constants*; Agache, P.; Humbert, P. (Edts.); Springer: Berlim, 2004, p. 112.
- 127 Rossi, A. B.; Verganini, A. L. *Cosmet. Toiletries* **1997**, *9*, 33.
- 128 Ribeiro, C. J.; Gonçalves, S. M. F. In *Cosmetologia aplicada à Dermoestética*; Ribeiro, C. J.; Gonçalves, S. M. F. (Edts.); Pharmabooks: São Paulo, 2006, p. 62.
- 129 Hascall, V. C.; Laurent, T. C. *Hyaluronan: Structure and Physical Properties*. Disponível em: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>. Acesso em: 2014, sept 25.
- 130 Cowman, M. K.; Li, M.; Balazs, E. A. *Biophys. J.* **1998**, *75*, 2030.
- 131 Nusgens, B. V. *Ann. Dermatol. Venereol.* **2010**, *137*, Suppl 1: S3-8.
- 132 Scott, J. E.; Heatley, F.; Hull, W. E. *Biochem. J.* **1984**, *220*, 197.
- 133 Heatley, F.; Scott, J. E. *Biochem. J.* **1988**, *254*, 489.
- 134 Scott, J. E.; Heatley, F. *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 547.
- 135 Kabolic, J.; Monheit, G. D.; Yu, L.; Chang, G. *Dermatol. Surg.* **2009**, *35*, 302.
- 136 Hardingham, T. In *Chemistry and Biology of Hyaluronan*; Garg, H. G.; Hales, C. A. (Edts.); Elsevier: Oxford, 2004, p. 1.
- 137 Cowman, M. K.; Matsuoka, S. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 791.
- 138 Boeriu, C. G.; Springer, J.; Kooy, F. K.; Van den Broek, L. A. M.; Eggink, G. *Int. J. Carbohydr. Chem.* **2013**, *2013*, 1
- 139 Kuroda, S.; Kurasawa, M.; Mizukoshi, K.; Maeda, T.; Yamamoto, Oba, T. A.; Sasaki, H. *Int. J. Cosmetic Sci.* **2010**, *32*, 84.
- 140 Hedtrich, S.; Wolfgang, F. In *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement*; Dragicevic, N.; Maibach, H. I. (Edts.); Springer Berlin Heidelberg: Berlim, 2015, p. 1.
- 141 Laugier, J-P.; Huster, S.; Rosdy, M.; Csóka, A. B.; Stern, R.; Maibach, H. I. *Brit. J. Dermatol.* **2000**, *142*, 226.
- 142 John, H. E.; Prince, R. D. *Patient Prefer. Adherence* **2009**, *3*, 225.
- 143 Zhang, J.; Ma, X.; Fan, D.; Zhu, C.; Deng, J.; Hui, J.; Ma, P. *Mat. Sci. Eng. C-Bio. S.* **2014**, *43*, 547.
- 144 Yamada, T.; Kawasaki, T. *J. Biosci. Bioeng.* **2005**, *99*, 521.
- 145 Kogan, J.; Soltés, L.; Stern, R.; Gemeiner, P. *Biotechnol. Lett.* **2007**, *29*, 17.
- 146 Romagnoli, M.; Belmontesi, M. *Clin. Dermatol.* **2008**, *26*, 123.

- 147 Rosa, C. S. *Estudo do ácido hialurônico proveniente da crista de frango: extração, purificação, caracterização e atividade antioxidante*. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, UFSC, 2008.
- 148 De Figueiredo, E. S.; de Macedo, A. C.; De Figueiredo, P. F. R.; De Figueiredo, R. S. *Arq. Bras. Oftalmol.* **2010**, *73*, 92.
- 149 Ayhan, E.; Kesmezacar, H.; Akgun, I. *World J. Orthop.* **2014**, *5*, 351.
- 150 Chan, R. W.; Gray, S. D.; Titze, I. R. *Otolaryng. Head Neck* **2001**, *124*, 607.
- 151 Manca, M. L.; Castangia, I.; Zaru, M.; Nácher, A.; Valenti, D.; Fernández Busquets, X.; Fadda, A. M.; Manconi, M. *Biomaterials* **2015**, *71*, 100.
- 152 Monteiro, E. O.; Parada, M. O. B. *Rev. Bras. Med.* **2010**, *67*, 6.
- 153 Catanzano, O.; D'Esposito, V.; Acierno, S.; Ambrosio, M. R.; De Caro, C.; Avagliano, C.; Russo, P.; Russo, R.; Miro A.; Ungaro, F.; Calignano, A.; Formisano, P.; Quaglia, F. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *131*, 407.
- 154 Erazo, V. J.; Regazzini, D. V.; De Carvalho, A. C. O. In *Procedimentos Estéticos Minimamente Invasivos: I Annual Meeting of Aesthetic Procedures*; Yamaguchi, C. (Edt.); Editora Santos: São Paulo, 2005, p. 285.
- 155 Walden, J. L.; Lampeter, W. In *Aesthetic Plastic Surgery*; Aston, S. J.; Steinbrech, D. S.; Walden, J. L. (Edts.); Elsevier Saunders: Oxford, 2009, p. 865.
- 156 Hyaxel®. *Silício Orgânico Hidrossolúvel: Patente Mundial Exsymol*. Disponível em: <https://dermomanipulacoes.com.br/wp-content/uploads/Hyaxel.pdf>. Acesso em 2015, dec 20.
- 157 Modi, P. *Stabilized dermatological delivery system for active ingredient compositions for topical administration to the skin*. USPTO 20150283080, Oct, 15, 2015.
- 158 Shokri, N.; Javar, H. A.; Ghadermazi, R. *Avicenna J. Med. Biochem.* **2014**, *2*, 1.
- 159 Silva, H. S. R.; Dos Santos, K. S. C. R.; Ferreira, E. *Quim Nova* **2006**, *29*, 776.
- 160 Roberts, G. A. F. In *Chitin Chemistry*; Roberts, G. A. F. (Edt.); The Macmillan Education UK: London, 1992, p. 1.
- 161 Campana-Filho, S. P.; De Britto D.; Curti, E.; Abreu, F. R.; Cardoso, M. B.; Battisti, M. V.; Sim, P. C.; Goy, R. C.; Signini, R.; Lavall, R. L. *Quim Nova* **2007**, *3*, 644.
- 162 Quitina: A Molécula da Semana. *Representação Estrutural da Quitina*. Disponível em: <http://fciencias.com/2014/05/15/quitina-molecula-da-semana/>. Acesso em 2015, dec 21.
- 163 Damian, C.; Beirão, L. H.; Francisco, A.; Espírito Santo, M. L. P.; Teixeira, E. *Braz. J. Food Nutr.* **2005**, *16*, 195.
- 164 Gonsalves, A. A.; Araújo, C. R. M.; Soares, N. A.; Goulart, M. O. F.; De Abreu, F. C. *Quim. Nova* **2011**, *34*, 1215.

- 165 Rinaudo, M. *Polym. Int.* **2008**, *57*, 397.
- 166 Rinaudo, M.; Milas, M.; Le Dung, P. *Int. J. Biol. Macromol.* **1993**, *15*, 281.
- 167 Dos Santos, J. E.; Soares, J. D. P.; Dockal, E. R.; Campana-Filho, S. P.; Cavalheiro, E. T. G. *Polimeros* **2003**, *13*, 242.
- 168 Chien, P.-J.; Sheu, F.; Huang, W.-T.; Su, M.-S. *Food Chem.* **2007**, *102*, 1192.
- 169 Rasmussen, R. S.; Morrissey, M. T. In *Marine Nutraceuticals and Functional Foods*; Barrow, C.; Shahidi, F. (Edts.); Taylor & Francis Group: New York, 2007, p. 158.
- 170 Zhang, M.; Li, X. H.; Gong, Y. D.; Zhao, N. M.; Zhang, X. F. *Biomaterials* **2002**, *23*, 2641.
- 171 Nakamatsu, J.; Rodríguez, N. In *Quitina y Quitosano*; Pastor, A. (Edt.); Pontificia Universidad Católica del Perú: Lima, 2004, p.75.
- 172 Borsagli, F. G. M.; Mansur, A. A.; Chagas, P.; Oliveira, L. C.; Mansur, H. S. *React. Funct. Polym.* **2015**, *97*, 37.
- 173 Lee, Y. M.; Shin, E. M.; Noh, S. T. *Angew. Makromol. Chem.* **1991**, *192*, 169.
- 174 Campana-Filho, S. P.; Signini, R. *Polimeros* **2001**, *11*, 169.
- 175 Hajjia, S.; Younesa, I.; Ghorbel-Bellaaja, O.; Hajjib, R.; Rinaudo, M.; Nasria, M.; Jellouli, K. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *65*, 298.
- 176 Vázquez, J. A.; Rodríguez-Amado, I.; Montemayor, M. I.; Fraguas, J.; González, M. D. P.; Murado, M. A. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 747.
- 177 Lionzo, M. I. Z.; Dressler, A. C.; Mertins, O.; Pohlmann, A. R.; da Silveira, N. P. In *Nanocosmetics and Nanomedicines*; Beck, R. C. R.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. (Edts.); Springer-Verlag: Berlin, 2011, p. 163.
- 178 Elsabee, M. Z.; Naguib, H.F.; Morsi, R. E. *Mat. Sci. Eng. C-Bio. S.* **2012**, *32*, 1711.
- 179 Ma, Q.; Zhang, Y.; Critzer, F.; Davidson, P. M.; Zivanovic, S.; Zhong, Q. *Food Hydrocolloid.* **2016**, *52*, 533.
- 180 Corradini, E.; De Moura, M. R.; Mattoso, L. H. C. *Express Polym. Lett.* **2010**, *4*, 509.
- 181 Da Silva, J. F. M.; Prado, G.; Madeira, J. E. G. C.; Oliveira, M. S.; Faraco, A. A. G.; Malta, C. M.; Nicoli, J. R.; Pimenta, R. S. *Bragantia* **2015**, *74*, 467.
- 182 Carvalho, T. V. *Biomateriais à base de quitosana de camarão e bactérias para remoção de metais traços e petróleo*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, UFCE, 2006.
- 183 Abdelgawad, A. M.; Hudson, S. M.; Rojas, O. J. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *100*, 166.
- 184 Wang, T.; Ji, X.; Jin, L.; Feng, Z.; Wu, J.; Zheng, J.; Wang, H.; Xu, Z.-W.; Guo, L.; He, N. *ACS Appl. Mater. Inter.* **2013**, *5*, 375.

- 185 Chandika, P.; Ko, S-C.; Jung, W-K. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *77*, 24.
- 186 Pervez, S.; Rahman, M. M.; Khan, M.A.; Khan, A.; Islam, J. M. M.; Ahmed, M.; Rahman, M. F.; Ahmed, B. *Polym. Bull.* **2012**, *69*, 715.
- 187 Senevirathne, M.; Ahn, C-B.; Kim, S-K.; Je, J-Y. In *Marine Cosmeceuticals: Trends and Prospects*; Kim, S-K. (Edt.); Taylor & Francis Group: New York, 2012, p. 172.
- 188 Batich, C.; Leamy, P. In *Standard Handbook of Biomedical Engineering and Design*; Kutz, M. (Edt.); McGraw Hill: New York, 2003, p. 11.3.
- 189 Ginty, P. J.; Howdle, M.; Rose, F. R. A. J.; Shakesheff, K. M. In *Polymers in Drug Delivery*; Uchegbu, I. F.; Schätzlein, A. G. (Edts.); Taylor & Francis Group: New York, 2006, p. 63.
- 190 Shalaby, W. S.; Burg, K. In *Absorbable Biodegradable Polymers*; Shalaby, W. S.; Burg, K (Edts.); CRC Press: London, 2005, p. 3.
- 191 Lin, C-C.; Metters, A. T. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2006**, *58*, 1379.
- 192 *Smart Pharmaceuticals*. Disponível em:
<http://gateway.vpr.drexel.edu/files/NewEH/htmls/Lowman.pdf>. Acesso em 2015, dec 23.
- 193 Peppas, N. A.; Bures, P.; Leobandung, W.; Ichikawa, H. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *50*, 27.
- 194 Gemeinhart, R. A.; Park, H.; Park, K. *Polym. Adv. Technol.* **2000**, *11*, 617.
- 195 Van de Witte, P.; Dijkstra, P. J.; Van den Berg, J. W. A.; Feijen, J. *J. Membrane Sci.* **1996**, *117*, 1.
- 196 Zhu, N.; Chen, X. In *Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications*; Pignatello, R. (Edt.); Intech: Rijeka, 2013, p. 315.
- 197 Puppi, D.; Chiellini, F.; Piras, A. M.; Chiellini, E. *Progr. Polym. Sci.* **2010**, *35*, 403.
- 198 Kim, J. H.; Kim, S. I.; Kwon, I-B.; Kim, M. H.; Lim, J. I. *Mater. Lett.* **2013**, *95*, 48.
- 199 Suksaeree, J.; Monton, C.; Madaka, F.; Chusut, T.; Saingam, W.; Pichayakorn, W.; Boonme, P. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **2015**, *16*, 171.
- 200 Mi, F-L.; Shyu, S-S.; Wu, Y-B.; Lee, S-T.; Shyong, J-Y.; Huang, R-N. *Biomaterials* **2001**, *22*, 165.
- 201 Ladet, S.; David, L.; Domard, A. *Nature* **2008**, *452*, 76.
- 202 Montembault, A.; Viton, C.; Domard, A. *Biomaterials* **2005**, *26*, 933.
- 203 Assis, O. B. G.; da Silva, V. L. *Polimeros* **2003**, *13*, 223.
- 204 Harris, L. D.; Kim, B-S.; Mooney, D. J. *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *42*, 396.
- 205 Beppu, M. M.; Arruda, E. J.; Santana, C. C. *Polimeros* **1999**, *9*, 163.
- 206 Shu, X. Z.; Zhu, K. Song, W. *Int. J. Pharm.* **2001**, *212*, 19.

- 207 Akerlöf, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1932**, *54*, 4125.
- 208 Boucard, N.; Viton, C.; Domard, A. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 3227.
- 209 Okor, R. S. *Int. J. Pharm.* **1982**, *11*, 1.
- 210 Suksaeree, J.; Monton, C.; Madaka, F.; Sakunpak, A.; Pichayakorn, W.; Boonme, P. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2014**, *6*, 253.
- 211 Chen, P-H.; Kuo, T-Y.; Liu, F-H.; Hwang, Y-H.; Ho, M-H.; Wang, D-M.; Lai, J-Y.; Hsieh, H-J. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 9015.
- 212 Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Peppas, N. A.; Gurny, R. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *57*, 19.
- 213 Phaechamud, T.; Koizumi, T.; Ritthidej, G. C. *Int. J. Pharm.* **2000**, *198*, 97.
- 214 Ritthidej, G. C.; Phaechamud, T.; Koizumi, T. *Int. J. Pharm.* **2002**, *232*, 11.
- 215 Zen-aldeen, E. A.; Hussein, A. K.; Ibrahim, M. A.; Amin, M. A. *Bull. Pharm. Sci. Assiut University*, **2008**, *31*, 229.
- 216 Fundo, J. F.; Galvis-Sanchez, A. C.; Delgadillo, I.; Silva, C. L. M.; Quintas, M. A. C. *Food Biophys.* **2015**, *10*, 324.
- 217 Sears, J. K.; Darby, J. R. In *The Technology of Plasticizers*; Sears, J. K.; Darby, J. R. (Edts.); John Wiley & Sons: New York, 1982, p. 35.
- 218 Santosa, F. X. B.; Padua, G. W. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 2070.
- 219 Bégin, A.; Van Calsteren, M. R. *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, *26*, 63.
- 220 Nadarajah, K. *Development and characterization of antimicrobial edible films from crawfish chitosan*. Dissertação de Mestrado, Louisiana State University, 2005.
- 221 Vieira, M. G. A.; da Silva, M. A.; dos Santos, L. O.; Beppu, M. M. *Eur. Polym. J.* **2011**, *47*, 254.
- 222 Rodríguez-Núñez, J. R.; Madera-Santana, T. J.; Sánchez-Machado, D. I.; López-Cervantes, J.; Valdez, H. S. *J. Polym. Environ.* **2014**, *22*, 41.
- 223 Agrawal, A. M.; Manek, R. V.; Kolling, W. M.; Neau, S. H. *J. Pharm. Sci.* **2004**, *93*, 1766.
- 224 Fundo, J. F.; Fernandes, R.; Almeida, P. M.; Carvalho, A.; Feio, G.; Silva Cristina, L. M. Quintas, M. A. C. *Food Chem.* **2014**, *144*, 2.
- 225 Liu, M.; Zhou, Y.; Zhang, Y.; Yu, C.; Cao, S. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *70*, 340.
- 226 Zawadzki, J.; Kaczmarek, H. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *80*, 394.
- 227 Alves, A.; Caridade, S. G.; Mano, J. F.; Sousa, R. A.; Reis, R. L. *Carbohydr. Res.* **2010**, *345*, 2194.

- 228 Leceta, I.; Peñalba, M.; Arana, P.; Guerrero, P.; de la Caba, N. K. *Eur. Polym. J.* **2015**, *66*, 170.
- 229 Zohuriaan, M. J.; Shokrolahi, F. *Polym. Test.* **2004**, *23*, 575.
- 230 Mucha, M.; Pawlak, A. *Polimery-W* **2002**, *47*, 509.
- 231 Suyatma, N. E.; Tighzert, L.; Copinet, A. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 3950.
- 232 Cervera, M. F.; Heinämäki, J.; de la Paz, N.; López, O.; Maunu, S. L.; Virtanen, T.; Hatanpää, T.; Antikainen, O.; Nogueira, A.; Fundora, J.; Yliruusi, J. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **2011**, *12*, 637.
- 233 Balau, L.; Lisa, G.; Popa, M. I.; Tura, V.; Melnig, V. *Cent. Eur. J. Chem.* **2004**, *2*, 638.
- 234 Xu, Y.; Ren, X.; Hanna, M. A. *J. Appl. Polym. Sci.* **2006**, *99*, 1684.
- 235 Tanigawa, J.; Miyoshi, N.; Sakurai, K. *J. Appl. Polym. Sci.* **2008**, *110*, 608.
- 236 Ogawaa, K.; Yuiab, T.; Miyaac, M. *Biosci. Biotech. Bioch.* **1992**, *56*, 858.
- 237 Chen, J.; Liu, C.; Chen, Y.; Chen, Y.; Chang, P. R. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *74*, 946.
- 238 Dong, Y. Ruan, Y. Wang, H.; Zhao, Y.; Bi, D. *J. Appl. Polym. Sci.* **2004**, *93*, 1553.
- 239 Kittur, F. S. Harish, K. V. P.; Udaya, K. S.; Tharanathan, R.N. *Carbohydr. Polym.* **2002**, *49*, 185.
- 240 Ghosh, A.; Ali, M. A. *J. Mater. Sci.* **2012**, *47*, 1196.
- 241 Lionzo, M. I. Z.; Lorenzini, G. C.; Tomedi, J.; Pranke, P.; da Silveira, N. P. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2012**, *8*, 337.
- 242 Tsai, H-S.; Wang, Y-Z.; Lin, J-J.; Lien, W-F. *J. Appl. Polym. Sci.* **2010**, *116*, 1686.
- 243 Prasch, T-H.; Knübel, G.; Schmidt-Fonk, K.; Ortanderl, S.; Nieveler, S.; Förster, T-H. *Int. J. Cosmetic. Sci.* **2000**, *22*, 371.
- 244 Rizza, L.; Frasca, G.; Bonina, C.; Puglia, C. *J. Cosmetic Sci.* **2010**, *61*, 247.
- 245 Ditre, C. M. In *Cosmeceuticals*; Draeos, Z. D. (Edt.); Elsevier Saunders: Oxford, 2005, p.111.
- 246 Green, B.; Yu, R. J.; Van Scott, E. J. *Clin. Dermatol.* **2009**, *27*, 495.
- 247 Ramos e Silva, M.; Celem, L. R.; Ramos e Silva, S.; Fucci-da-Costa, A.P. *Clin. Dermatol.* **2013**, *31*, 750.
- 248 Clark, C. P. *Clin. Plast. Surg.* **1996**, *23*, 49.
- 249 Valenta, C.; Auner, B. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *58*, 279.
- 250 Smith, J.; Wood, E.; Dornish, M. *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 43.
- 251 Rusu- Balaita, L.; Desbrières, J.; Rinaudo, M. *Polym. Bull.* **2003**, *50*, 91.

ANEXOS

ANEXO A – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DE FATOR ÚNICO

A Análise de Variância (ANOVA) é um teste estatístico utilizado para verificar a existência de diferença entre as médias de duas ou mais populações^{1,2}. Neste caso, as diferenças entre as médias populacionais são avaliadas através da comparação das variâncias. Em relação à ANOVA de fator único, há a comparação da variabilidade das observações entre os diferentes níveis (grupos) de um fator com aquelas dentro dos níveis do fator. Neste trabalho, um exemplo de fator estudado para avaliação da porosidade dos filmes de quitosana, foi o percentual de plastificante (% m/m) adicionado às soluções filmogênicas. Como níveis deste fator, são citados os diferentes valores absolutos de percentual de plastificante, 0, 13 ou 33% (m/m), adicionados a tais soluções. Por sua vez, cada avaliação estatística realizada constituiu um conjunto.

O teste estatístico utilizado pela ANOVA é o teste F com valor calculado de acordo com a equação 1:

$$F = \frac{MQF}{MQE} \quad (1)$$

onde MQF e MQE correspondem, respectivamente, ao valor médio quadrático da diferença entre as médias devido aos níveis do fator e ao erro aleatório. Tais valores são obtidos a partir das equações 2 e 3:

$$MQF = \frac{SQF}{I - 1} \quad (2)$$

onde SQF é o valor equivalente à soma dos quadrados devido ao fator; $I - 1 = I - 1$, o número de graus de liberdade considerando os I níveis do fator analisado.

$$MQE = \frac{SQE}{N - I} \quad (3)$$

1. Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. In *Fundamentos de Química Analítica*; Skoog, D. A. (Ed.); Pioneira Thomson Learning: São Paulo, 2005, p. 148.

2. De Muth, J. E. In *Basic Statistics and Pharmaceutical Statistical Applications*; De Muth, J. E. (Ed.); Taylor & Francis: New York, 2014, p. 201.

onde SQE corresponde à soma dos quadrados devido ao erro; $N - I = 2$, o número de graus de liberdade considerando um total de N observações para os I níveis do fator.

Para o cálculo de SQF e SQE , são utilizadas as equações 4 e 6 a seguir:

$$SQF = n_1(\bar{X}_1 - \bar{X}_G)^2 + n_2(\bar{X}_2 - \bar{X}_G)^2 + n_3(\bar{X}_3 - \bar{X}_G)^2 + \dots + n_I(\bar{X}_I - \bar{X}_G)^2 \quad (4)$$

com n_1, n_2, n_3, n_I : valor referente ao tamanho (número de repetições) em cada nível;

$\bar{X}_1, \bar{X}_2, \bar{X}_3, \bar{X}_I$: valor correspondente à média amostral (estimador da média populacional);

\bar{X}_G : valor equivalente à média global. É obtido a partir da equação 5:

$$\bar{X}_G = \frac{n_1(\bar{X}_1)^2 + n_2(\bar{X}_2)^2 + n_3(\bar{X}_3)^2 + \dots + n_I(\bar{X}_I)^2}{N} \quad (5)$$

$$SQE = (n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2 + (n_3 - 1)s_3^2 + \dots + (n_I - 1)s_I^2 \quad (6)$$

onde s^2 refere-se à variância da amostra para cada nível analisado.

Para um dado conjunto de resultados obtidos através de um tratamento experimental, considera-se que tal conjunto apresenta significância estatística (rejeição à hipótese nula H_0) com $\alpha = 0,05$, se $F_{v_2}^{v_1} > F_{v_2}^{v_1}(1 - \alpha)$, ou seja, se $F_{observado}(F_{obs}) > F_{crítico}$. Alternativamente, é possível considerar a significância estatística de um conjunto de resultados ao nível α se o p -valor $< 0,05$.

Teste para Comparação entre Duas Médias – Teste de Tukey: Após a aplicação do Teste F e a constatação da existência de significância estatística em um dado conjunto de resultados, utiliza-se o Teste de Tukey³ para determinar, exatamente, quais médias são diferentes. Neste caso, inicialmente é calculada uma diferença denominada diferença menos significativa (DMS). Em seguida, é avaliada a diferença entre cada par de médias e comparada com a DMS . Se o valor absoluto da diferença entre cada par for igual ou maior que a DMS , pode-se afirmar que as duas médias são estatisticamente diferentes. O valor de DMS é calculado segundo a equação 7:

3. Vieira, S.; Hoffmann, R. In *Estatística Experimental*; Vieira, S.; Hoffmann, R. (Edts.); Atlas: São Paulo, 1989, p. 175.

$$DMS = q \sqrt{\frac{MQE}{n_I}} \quad (7)$$

onde q é o valor da amplitude total “studentizada” (*studentized range*) tabelada por Tukey. É função do número total de níveis (I) e dos graus de liberdade devido ao erro aleatório (ν).

ANEXO B – AVALIAÇÃO DA POROSIDADE EM FILMES POLIMÉRICOS DE QUITOSANA

A porosidade de um material foi definida pela relação entre o volume ocupado por poros (espaço vazio) e o volume total. O princípio do Teste de Porosidade foi determinar o espaço vazio existente no interior do filme através da sua imersão em um mau solvente para as macromoléculas que o compõem¹.

Assumindo-se que não existe miscibilidade entre polímero e solvente, o ganho de massa foi unicamente decorrente do preenchimento dos poros. Dessa forma, o heptano foi escolhido para a realização dos testes, pois as interações intermoleculares predominantes no sistema binário quitosana-heptano (forças de Van der Waals) apresentam intensidade inferior ao sistema quitosana-quitosana ou heptano-heptano (o parâmetro de Flory-Huggins², é maior que 0,5 para o sistema quitosana-heptano, o que representa a imiscibilidade de hidrocarbonetos com biopolímeros como a quitosana).

Neste trabalho, o Percentual de Volume dos Poros ($\%V_p$) ou Percentual de Porosidade do filme ($\%P$) foi calculado conforme a equação abaixo:

$$\%V_p \text{ ou } \%P = \frac{\frac{W_{hep}}{\rho_{hep}}}{\frac{W_{hep}}{\rho_{hep}} + \frac{W_{fil}}{\rho_{fil}}} \times 100 \quad (1)$$

onde: W_{hep} é o valor correspondente à massa de heptano contida nos poros da peça de filme; ρ_{hep} , a massa específica do heptano; W_{fil} , o valor referente à massa da peça de filme seco (sem preenchimento dos poros com heptano) e ρ_{fil} , a massa específica do filme. O denominador representa o volume total da peça de filme (volume dos poros, representado por W_{hep}/ρ_{hep} + volume do filme desconsiderando os poros, representado por W_{fil}/ρ_{fil}).

1. Tomedi, J. *Desenvolvimento de matriz extracelular temporária para gênese de mucosa urotelial*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, UFRGS, 2011.

2. Flory, P. J.; In *Principles of Polymer Chemistry*; Flory, P. J. (Ed.); Cornell University Press: Ithaca, 1953, p. 497.

ANEXO C - PROTOCOLO BÁSICO PARA PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS PARA MEV:

ETAPA 1 – FIXAÇÃO

A primeira etapa do processo de preparação de amostras biológicas para MEV (Fixação) é considerada a mais importante já que é nesta etapa que o material biológico, sob o efeito do fixador, mantém as características da forma viva, além de deixar o tecido mais rígido livre de quaisquer processos de degradação bioquímica¹⁻⁴. A rigidez tecidual é essencial na integridade da superfície do material biológico a qual deve ser preservada durante a utilização do Equipamento de Ponto Crítico e do Microscópio Eletrônico de Varredura. Dentre os fixadores utilizados para MEV, o ideal é o glutaraldeído em solução 25% (m/v).

A fixação dos materiais biológicos (segmentos de pele suína) foi realizada pelo método de imersão, imediatamente após os ensaios de liberação *in vitro*. Estes materiais foram acondicionados em geladeira por um período de 15 dias (tempo necessário para a ocorrência da fixação).

A composição da solução fixadora está descrita abaixo:

Glutaraldeído em solução 25% (m/v) -----	1,2 mL
Solução tampão fosfato (0,2 M), pH 7,4 -----	5,0 mL
Água deionizada -----	3,8 mL

ETAPA 2 – LAVAGEM

Após a fixação, os materiais foram lavados em solução diluída de tampão fosfato para retirar o excesso de fixador e acondicionados em caixa com sílica até a etapa seguinte, conforme descrita abaixo:

Solução tampão fosfato (0,2 M) + água deionizada -----	proporção 1:1 (v/v)
Quantidade e intervalo de tempo de cada lavagem -----	3 x (30 min/lavagem)

1. Migneault, I.; Dartiguenave, C.; Bertrand, M. J.; Waldron, K. C. *Behavior in Aqueous Solution, Reaction with Proteins and Application to Enzyme Crosslinking. Biotechniques* **2004**, *37*, 790.

2. Nimmi, M. E. *Glutaraldehyde Fixation Revisited. J. Long-Term Eff. Med.* **2001**, *11*, 151.

3. Hopwood, D. *Theoretical and Practical Aspects of Glutaraldehyde Fixation. Histochem. J.* **1972**, *4*, 267.

4. Fischer, E. R.; Hansen, B. T.; Nair, V.; Hoyt, F. H.; Dorward, D. W. *Curr. Protoc. Microbiol.* **2012**, DOI: 10.1002/9780471729259.

ETAPA 3 – DESIDRATAÇÃO

Durante esta etapa, os materiais foram desidratados de forma lenta e gradual em soluções aquosas de acetona. A composição destas soluções e o período de desidratação dos materiais estão descritos abaixo:

Acetona 30%	-----	10 min
Acetona 50%	-----	10 min
Acetona 70%	-----	10 min
Acetona 90%	-----	10 min
Acetona 90%	-----	20 min
Acetona 100%	-----	10 min
Acetona 100%	-----	20 min

ETAPA 4 – DESSECAÇÃO

Após a completa desidratação dos materiais (pós-desidratação em acetona 100%), estes foram dessecados no Equipamento de Ponto Crítico, Critical Point Dryer da marca Balzers, modelo CPD 030. A dessecação foi efetuada em dióxido de carbono⁵.

ETAPA 5 – METALIZAÇÃO

Logo após a dessecação dos materiais, estes foram colocados em *stubs* para a etapa final de metalização. O recobrimento da superfície foi feito com mistura ouro/carbono. A metalização foi realizada no equipamento Sputter Coater da marca Balzers, modelo SCD 050 por um técnico responsável do CME/UFRGS.

5. Gruber, D. *Sample Preparation Critical Point Drying*. Disponível em: http://www.leica.microsystems.com/fileadmin/academy/2013/WF_Critical_Point_Drying_07_13.pdf. Acesso em: 2015, sept 18.