



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



**ARCABOUÇOS DE QUITOSANA/AGENTE ANTINEOPLÁSICO:
SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO.**

Jackson Borba da Cruz

CAMPINA GRANDE - PB

MAIO/ 2015



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



**ARCABOUÇOS DE QUITOSANA/AGENTE ANTINEOPLÁSICO:
SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO.**

Jackson Borba da Cruz

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito para à obtenção do título de Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. MARCUS VINÍCIUS LIA FOOK

CAMPINA GRANDE - PB
MAIO/ 2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

C957a Cruz, Jackson Borba da.
Arcabouços de quitosana/agente antineoplásico : síntese, caracterização e aplicação / Jackson Borba da Cruz. – Campina Grande, 2015.
114 f. : il. color.

Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materias) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2015.

"Orientação: Prof^o. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook".
Referências.

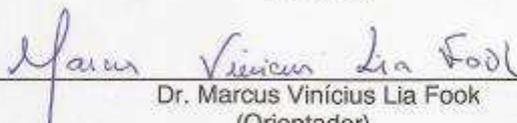
1. Quitosana. 2. Neoplasia. 3. Arcabouços. 4. Naftoquinona.
I. Fook, Marcos Vinicius Lia . II. Título.

CDU 677.473(043)

ARCABOUÇOS DE QUITOSANA/AGENTE ANTINEOPLASICO: SÍNTESE
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO

JACKSON BORBA DA CRUZ

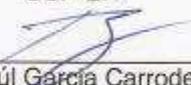
Tese Aprovada em 22/05/2015 pela banca examinadora constituída dos seguintes membros:



Dr. Marcus Vinícius Lia Fook
(Orientador)
UAEMA/UFCG



Dr.^a Eliana Cristina da Silva Rigo
(Examinadora externa)
USP-SP



Dr. Raúl García Carrodeguas
(Examinador Externo)
UFCG



Dr.^a Carmem Dolores de Sá Cartão
(Examinadora Externa)
CCBS/UFCG



Dr. Rosemberg Cardoso Barbosa
(Examinador Externo)
UFCG

DEDICATÓRIA

À minha família, Alina Olivia Gomes de Menezes Cruz, Áthina Gomes de Menezes Cruz, Igor Gomes de Menezes Cruz, Renata Rodrigues de Lima Silva, Arley Jackson Gomes de Meneses Cruz, Rita de Cássia e Guilherme Alves Leal Gomes Cruz, pelo apoio recebido durante o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por me permitir desfrutar de saúde e paz, e por me conduzir por todas as etapas da minha vida.

À minha família **Alina Olívia Gomes de Meneses Cruz, Arley Jackson Gomes de Meneses Cruz, Igor Gomes de Meneses Cruz, Áthina Gomes de Meneses Cruz, Rita de Cássia Alves Leal Cruz, Renata e Guilherme Alves Leal Gomes Cruz** (meu neto), pela compreensão nos momentos mais estressantes. A todos os meus familiares que sempre torceram por minhas conquistas.

Ao Prof. Dr. **Marcus Vinícius Lia Fook** pela orientação, compreensão e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. **Rossemberg Cardoso Barbosa** por estar sempre disponível para esclarecimento das inúmeras dúvidas surgidas ao longo do trabalho e pela sua amizade incondicional.

Ao Dr. **Thiago Fidélis** pelas contribuições ao trabalho em tela.

À Profa. **Dra. Carmem Dolores de Sá Catão** pelo incentivo e colaboração na conclusão do doutorado.

As minhas colegas de doutorado, especialmente a **Rosana Araújo Rosendo** e **Luana Abílio** pelas diversas discussões proveitosas ao longo de todo o doutorado.

Aos amigos do Grupo de Biomateriais da UFCG, pela convivência, carinho e incentivo. E pela contribuição direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

A todos os funcionários do CERTBIO, especialmente ao **Sr. Sérgio Pereira Neto, Josilene Rodrigues da Silva, Bartolomeu Jorge e Valdenise Marques** pela amizade e colaboração ao longo do trabalho.

A todos os operadores dos equipamentos do CERTBIO por viabilizarem a realização dos diversos ensaios.

Aos funcionários da UAEMA, especialmente **Márcia Lima**, pelo atendimento cordial sempre que foi necessário.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais e ao corpo docente do Curso Engenharia de Materiais, em especial aos

professores **Marcus Vinicius, Jeferson, Laura Cardoso, Walman, Heber, Crislene** e **professora Suédna** pelos ensinamentos transmitidos.

Aos professores (**Dra. Eliana Cristina da Silva Rigo, Dr. Raul Garcia Carrodegua, Dra. Carmem Dolores de Sá Catão e Dr. Rossemberg Cardoso Barbosa**), membros da banca examinadora, pela gentileza e contribuições fundamentais para o presente trabalho.

Aos meus colegas da Unidade Acadêmica de Medicina: **Prof. Anunciado Alves de Melo, Ronaldo Romero Lira, Patrício Marques de Souza, Carmem Dolores de Sá Catão e Paulo Alberto de Lima Ramos** pelo incentivo à realização do doutorado e pelo apoio nos momentos mais difíceis.

*“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original”.*

Albert Einstein

RESUMO

As neoplasias constituem um conjunto de doenças que se caracterizam por uma massa anormal de tecido com crescimento descontrolado e excessivo em relação aos demais tecidos normais. De acordo com o comportamento biológico, elas podem ser classificadas em benignas ou malignas (câncer). Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), são esperados 576 mil casos novos de câncer para 2014 e 2015 no Brasil. O combate ao câncer é feito com medidas preventivas, diagnóstico precoce e tratamento. O sistema de liberação controlada de fármacos através da utilização de biomateriais poliméricos associados a compostos com ação antineoplásica pode ser empregado como alternativa de tratamento para esta patologia. Desta forma, este trabalho tem como objetivo a síntese e caracterização de arcabouços de quitosana utilizados como carreadores da droga antitumoral (1,4- Naftoquinona), cuja taxa de liberação poderá ser controlada pela utilização de um agente reticulante como o tripolifosfato de sódio (TPP), com a perspectiva da confecção de um sistema de liberação controlada de fármacos antitumorais. O método consiste na solubilização da quitosana em ácido acético, adição do fármaco, congelamento, liofilização e reticulação com TPP. Todas as amostras foram caracterizadas por Difração de Raios X (DRX), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDS), Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Biodegradação Enzimática. A microscopia (MEV) evidenciou a formação de arcabouços porosos de quitosana (Q), quitosana com TPP (QT), quitosana com 1,4 – Naftoquinona (QN) e quitosana com TPP e 1,4 – Naftoquinona (QNT). Já no EDS foi observada a presença de elementos químicos como sódio, fósforo, nitrogênio, carbono e oxigênio. A reticulação dos arcabouços, comprovada pelo FTIR, DRX, Termogravimetria, Grau de Intumescimento e EDS, aumentou a taxa de degradação dos mesmos demonstrada pelo ensaio de Biodegradação Enzimática. A incorporação do fármaco foi confirmada por DRX, FTIR, Grau de Intumescimento e Termogravimetria. Desta forma, pode-se concluir que houve à formação de arcabouços reticulados e não reticulados porosos, com propriedades morfológicas e físico-químicas que podem contribuir para carrear fármacos antineoplásicos, sendo possível controlar a taxa de degradação dos mesmos e conseqüentemente a liberação do fármaco.

Palavras-chave: quitosana, neoplasia, arcabouços, naftoquinona

ABSTRACT

The neoplasias are a group of disorders characterized by an abnormal mass of tissue which has uncontrolled and excessive growth when compared to normal tissue. According to their biological behavior, they can be classified as benign or malignant (cancer). According to the National Cancer Institute (NCI), it is expected that there will be 576,000 new cancer cases in Brazil during 2014 and 2015. The fight against cancer is done with preventive measures, early diagnosis and treatment. The controlled release system of drugs through the use of polymeric biomaterials associated with the compounds that have an antineoplastic action can be used as an alternative treatment for this disease. Thus, this work has as the objective, the synthesis and characterization of chitosan scaffolds used as carriers for antitumor drugs (1,4 Naftoquinona), whose release rate can be controlled by using a crosslinking agent such as sodium tripolyphosphate (TPP), with the prospect of making a controlled release system for antitumor drugs. The method comprises in the solubility of chitosan in acetic acid, drug addition, freezing the material, lyophilization and crosslinking with TPP. All samples were characterized by X-Ray Diffraction (XRD), Scanning Electron Microscopy (SEM), Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), and Enzymatic Biodegradation. The Microscopy (SEM) showed the formation of porous scaffolds of chitosan (Q), chitosan with TPP (CT), chitosan with 1.4 - Naftoquinona (QN) and chitosan with TPP and 1.4 - Naftoquinona (QNT). EDS showed the presence of chemical elements such as sodium, phosphorus, nitrogen, carbon and oxygen. The crosslinking of the scaffolds, proven by FTIR, XRD, Thermogravimetry, Degree of Swelling and EDS, increased its rate of degradation thereof, as demonstrated by the Enzymatic Biodegradation test. The incorporation of the drug was confirmed by XRD, FTIR, Degree of Swelling and Thermogravimetry. Thus, it can be concluded that there was the formation of crosslinked and non-crosslinked porous scaffolds, with morphological and physicochemical properties that can contribute to the carrying of antineoplastic drugs, being possible to control their degradation rate and consequently drug release.

Keywords: Chitosan, neoplasia, scaffold, naphthoquinone

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Comparação entre um Leiomioma (tumor benigno do Miométrio) e leiomiossarcoma (tumor maligno de mesma origem).	24
Figura 2 - Desenvolvimento do ovo ao embrião tridérmico e os diferentes tecidos derivados do mesmo.	25
Figura 3 - Distribuição proporcional dos 10 tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014/2015 por sexo, exceto pele não melanoma, no Brasil....	27
Figura 4 - Taxa de Fecundidade (a) e Expectativa de Vida (b) no Brasil.	29
Figura 5 - Fluxograma resumido da base molecular do câncer.....	31
Figura 6 - Ciclo celular e suas diferentes fases.	32
Figura 7 - Modelo bola-e-bastão (a) e estrutural (b) da 1,4 – Naftoquinona....	34
Figura 8 - Comparação dos perfis de liberação de fármacos em dose única (----), dose fracionada (- - -) e através de um sistema de liberação controlada de fármacos (- - -).....	35
Figura 9 - Sistema de liberação controlada de fármacos pulsátil.	36
Figura 10 - Estrutura química da quitina e quitosana.	39
Figura 11 - Quebra da ligação β (1-4) entre NAM e NAG catalisada pela lisozima.	40
Figura 12 - Ligações dissulfeto na molécula de lisozima (a) e perspectiva tridimensional da enzima com seu sitio ativo e substrato (b).	41
Figura 13 - Estrutura química do Tripolifosfato de sódio e a reticulação das cadeias de quitosana pelo composto.	42
Figura 14 - Confeção e caracterização dos arcabouços de quitosana reticulados e não reticulados.	45
Figura 15 - Confeção e caracterização dos arcabouços de quitosana / 1,4 – naftoquinona reticulados e não reticulados.	46
Figura 16 - Preparação da solução de quitosana sob agitação mecânica.	47
Figura 17 - Solução de quitosana com 1,4 - Naftoquinona (a) e quitosana (b). 48	
Figura 18 - Processo de neutralização parcial dos arcabouços de quitosana.. 50	
Figura 19 - Arcabouços de quitosana em solução de tripolifosfato de sódio.... 51	
Figura 20 - Arcabouços de quitosana com 1.4 Naftoquinona..... 52	

Figura 21 - Arcabouços de quitosana com 1,4 – Naftoquinona imersos na solução de tripolifosfato de sódio.....	53
Figura 22 - Arcabouços de quitosana com 1,4 Naftoquinona com camadas invertidas após liofilização. Vista superior e Vista lateral.	54
Figura 23 - Incidência de raios X em planos cristalinos vizinhos. Dedução da lei de Bragg.....	55
Figura 24 - Tipos de sinais resultantes da interação do feixe de elétrons com a amostra num microscópio eletrônico de varredura.....	56
Figura 25 - Espectro eletromagnético.....	57
Figura 26 - Deformações axiais simétricas (a), assimétricas (b), angulares simétricas (c) e assimétricas (d) no plano e fora do plano (e,f). Os sinais X e ● indicam movimentos para dentro e para fora do plano do papel, respectivamente.	58
Figura 27 - Arcabouços de quitosana (a), quitosana/1,4 – Naftoquinona (b). ..	64
Figura 28 - Arcabouço de quitosana/tripolifosfato (a) e quitosana /tripolifosfato/ 1,4 - Naftoquinona (b).....	65
Figura 29 - Arcabouços de quitosana com 1,4 - Naftoquinona com camadas invertidas.....	65
Figura 30 -Medidas dos diâmetros dos arcabouços de Q (a), QT (b), QN (c) e QNT (d).	66
Figura 31 - Difratoograma da quitosana em pó.	68
Figura 32 - Difratoograma da Naftoquinona em pó.	68
Figura 33 - Difratoograma TPP em pó.....	69
Figura 34 - Difratoograma do arcabouço Q.....	70
Figura 35 - Difratoograma do arcabouço QT.....	70
Figura 36 - Difratoograma do arcabouço QN.	71
Figura 37 - Difratoograma do arcabouço QTN.	71
Figura 38 - Micrografia Eletrônica da Superfície (a), Corte (b) e EDS do Arcabouço de Quitosana.....	72
Figura 39 - Micrografia Eletrônica da Superfície (a), Corte (b) e EDS do Arcabouço de Quitosana com Tripolifosfato de Sódio.....	73
Figura 40 - Micrografia Eletrônica da Superfície (a), Corte (b) e EDS do Arcabouço de Quitosana com 1,4 – Naftoquinona.....	73

Figura 41 - Micrografia Eletrônica da Superfície (a), Corte (b) e EDS do Arcabouço de Quitosana com 1,4 – Naftoquinona e Tripolifosfato de Sódio....	74
Figura 42 - FTIR da quitosana (pó).	76
Figura 43 - FTIR do arcabouço de quitosana.	76
Figura 44 - FTIR do tripolifosfato em pó.	77
Figura 45 - FTIR do arcabouço de quitosana + TPP.	78
Figura 46 - FTIR de 1,4 Naftoquinona em pó.	78
Figura 47 - FTIR do arcabouço de quitosana + 1,4 – Naftoquinona.....	79
Figura 48 - FTIR do arcabouço de quitosana + TPP + 1,4 – Naftoquinona.....	80
Figura 49 - Curva termogravimétrica e DTG da 1,4 – Naftoquinona.	81
Figura 50 - Curva termogravimétrica e DTG do arcabouço de quitosana.	82
Figura 51 - Curva termogravimétrica e DTG do arcabouço de quitosana + TPP.	83
Figura 52 - Curva termogravimétrica e DTG do arcabouço quitosana + 1,4 – Naftoquinona.	84
Figura 53 - Curva termogravimétrica e DTG do arcabouço de quitosana + TPP + 1,4 - Naftoquinona.	84
Figura 54 - Grau de intumescimento dos arcabouços de Q, QT, QN e QNT. .	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais diferenças entre tumores benignos e malignos.	23
Tabela 2 - Origem, classificação e nomenclatura dos tumores.	26
Tabela 3 - Identificação dos arcabouços confeccionados.	49
Tabela 4 - Classificação das Técnicas Termoanalíticas.....	59
Tabela 5 – Grupos de amostras para degradação enzimática <i>in vitro</i>	62
Tabela 6 - Densidade dos arcabouços.....	67
Tabela 7 - Valores médios e respectivos desvios padrão das massas secas e intumescidas dos arcabouços de Q, QT, QN e QNT.....	86
Tabela 8 - Biodegradação em solução de PBS e PBS/lisozima dos arcabouços Q, QT, QN, QNT nos intervalos 7, 14, 21 dias	88

LISTA DE FÓRMULAS, SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
TPP	Tripolifosfato de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
KCl	Cloreto de Potássio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato Mono-Hidrogênio de Sódio
KH ₂ PO ₄	Fosfato Mono-Hidrogênio de Potássio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato Di-Hidrogênio de Sódio
O	Oxigênio
P	Fósforo
N	Nitrogênio
C	Carbono
Na	Sódio
pH	Potencial de Hidrogênio Iônico
kDa	Kilodalton
ASTM	American Society for Testing and Materials
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INCA	Instituto Nacional do Câncer
DRX	Difração de Raios X
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
EDS	Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X
FTIR	Espectroscopia na Região do Infravermelho com transformada de Fourier
GI%	Grau de Intumescimento em Percentagem
DTG	Derivada Primeira da Curva Termogravimétrica
TG	Termogravimetria
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
OMS	Organização Mundial da Saúde
SUS	Sistema Único de Saúde
ATP	Trifosfato de Adenosina
Q	Quitosana
QT	Quitosana com Tripolifosfato de Sódio

QN	Quitosana com 1,4 Naftoquinona
QNT	Quitosana, 1,4 Naftoquinona e Tripolifosfato de Sódio
QNI	Quitosana + 1,4 – Naftoquinona com camadas invertidas
PMMA	Poli Metacrilato de Metila
GlcNAc	2- acetamido – 2 – desoxi – D – glicopiranosose
GlcN	2 – amino – 2 – desoxi – D – glicopiranosose
GA	Grau de Acetilação
GD	Grau de Desacetilação
PM%	Perda de Massa em Percentagem
NAM	Ácido N – acetilmurâmico
NAG	N – acetilglicosamina
Asp	Ácido aspártico
Glu	Ácido glutâmico
V	Volume
D	Densidade
M	Molar
CERTBIO	Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
UAEMa	Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL.....	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	REVISÃO DA LITERATURA	22
3.1	NEOPLASIA	22
3.1.1	A Base Molecular do Câncer.....	30
3.1.2	Tratamento do Câncer	32
3.2	BIOMATERIAIS	36
3.2.1	BIOPOLIMEROS.....	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1	LOCAL DA PESQUISA	44
4.2	REAGENTES	44
4.3.1	ETAPAS DE DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA	44
4.3.2	Preparação da solução de Quitosana.....	47
4.3.3	Preparação da solução de Quitosana com 1,4 Naftoquinona.	47
4.3.4	Preparação da solução de Tripolifosfato de Sódio.....	48
4.3.5	Preparação da solução de Hidróxido de Sódio 1M.	48
4.3.6	Confecção dos arcabouços	48
4.3.7	Técnicas de caracterização	54
4.3.8	Análise de dados	62
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1	Caracterização dos Arcabouços de Quitosana (Q), Quitosana/Tripolifosfato (QT), Quitosana/1,4 – Naftoquinona (QN) e Quitosana/Tripolifosfato/1,4 – Naftoquinona (QNT)	64
5.1.1	Aspecto Macroscópico	64
5.1.2	Difração de Raios X	67
5.1.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e EDS.....	72

5.1.4	Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	75
5.1.5	Análise térmica.....	80
5.1.6	Grau de Intumescimento	85
5.1.7	Biodegradação Enzimática.....	87
6	CONCLUSÕES.....	90
7	PROPOSIÇÕES FUTURAS.....	92
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
9	ANEXOS.....	108

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO



Grupo de Biomateriais
UFCG | UAEMa

1 INTRODUÇÃO

Neoplasia (neo = novo + plasia = formação), também conhecida como tumor, designa uma proliferação anormal de células sem um objetivo definido (crescimento, reposição de células necrosadas ou mortas por apoptose) sem controle fisiológico (tornam-se autônomas e independente de estímulos fisiológicos), persistente e com efeitos agressivos ao organismo. Decorre de alterações genéticas nos genes que controlam o crescimento, a diferenciação, reparação do DNA e apoptose (morte celular programada). As células neoplásicas apresentam diferenciação variável e, no caso das malignas, podem determinar a formação de tumores à distância independentes e descontínuos em relação ao tumor primário. Há basicamente dois tipos de tumores: benignos e malignos (câncer) (KUMAR *et al.*, 2010).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2014), aproximadamente 140 mil pessoas morrem de câncer todos os anos no Brasil, correspondendo a um percentual de 17,3% das mortes registradas no país, ficando apenas atrás das doenças circulatórias com um percentual de 27,9% do total de mortes.

A expectativa de vida ao nascer vem aumentando na população de vários países do mundo. No Brasil, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014), a expectativa de vida ao nascer da população de ambos os sexos passou de 70,5 anos em 2000 para 75,6 anos em 2014. Assim, a elevação da expectativa de vida, associada a menor taxa de fecundidade, que passou, em média, de 6,16 filhos em 1940 para 1,74 em 2014 tem como resultado o crescimento da população de idosos no país. Este aumento progressivo de longevidade, associado aos traumas decorrentes de acidentes (trânsito, domiciliares, violência, etc.), tem aumentado a demanda por novos produtos e tecnologias fornecidos pelos órgãos responsáveis pela saúde da população.

Outro fato importante e, associado à longevidade em virtude de fenômenos relacionados, dentre outros fatores ao decaimento das funções dos diversos órgãos, é a maior frequência de neoplasias malignas em idosos. Assim,

o aumento da expectativa de vida e o envelhecimento da população ampliarão o número de casos de câncer, doença cuja terapêutica (quimioterapia, radioterapia, cirurgia ou uma combinação destes tratamentos) demanda um elevado volume de recursos, atingindo R\$ 1,8 bilhões em 2010 (INCA, 2012).

Desta forma, torna-se imprescindível o estudo e desenvolvimento de alternativas terapêuticas de combate ao câncer, seja no campo preventivo, bem como no diagnóstico e tratamento precoces. Assim, neste trabalho, foram desenvolvidos arcabouços tridimensionais (*scaffolds*) de quitosana associados a 1,4 Naftoquinona (molécula bioativa com ação antitumoral) e avaliados quanto às características físico-químicas e biodegradação, buscando o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de futuros fármacos para o combate ao câncer, possibilitando relevantes benefícios à população acometida com a referida patologia.

A Ciência dos Materiais procura investigar e estabelecer relações entre a estrutura, em seus diversos níveis (subatômico, atômico, microscópico e macroscópico), as propriedades (mecânica, elétrica, térmica, magnética, óptica e deteriorativa) e os fenômenos relacionados dos materiais. A Engenharia de Materiais utiliza a correlação estrutura-propriedade para aprimorar os materiais já existentes ou desenvolver novos materiais com um determinado conjunto de propriedades. Um dos ramos de crescente interesse da referida engenharia é o campo dos Biomateriais. Este procura desenvolver e aplicar diversos materiais que possam interagir com o meio biológico e, assim, ser aplicado na área da saúde, sendo um importante aliado da medicina na busca de tratamento cada vez mais eficiente nas várias especialidades médicas como a cardiologia, traumatologia e ortopedia (CALLISTER, 2007).

O desenvolvimento de materiais poliméricos associado a medicamentos podem ser utilizados como sistema de liberação controlada de fármacos, trazendo importantes vantagens quando comparados às vias de administração convencionais das drogas nas diferentes áreas da medicina como, por exemplo, a oncologia, que é o ramo da medicina especializada no diagnóstico, prevenção

e tratamento das neoplasias, Endocrinologia, Traumatologia etc. (HOLANDA, 2012; MARTINS, 2013; PINTO *et al.*, 2007).

CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS



Grupo de Biomateriais
UFCG | UAEMa

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver arcabouços de quitosana/1,4 - Naftoquinona como carreadores para liberação controlada de fármaco antitumoral.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer variáveis de processamento para obtenção de arcabouços de quitosana sem e com 1,4 - Naftoquinona;
- Estudar as características físico-química e estrutural dos arcabouços;
- Avaliar a biodegradabilidade dos arcabouços reticulados e não reticulados;
- Avaliar o efeito da incorporação do reticulante Tripolifosfato de Sódio nos arcabouços com e sem 1,4 – Naftoquinona.

CAPÍTULO 3 – REVISÃO DA LITERATURA



Grupo de Biomateriais
UFCG | UAEMa

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 NEOPLASIA

Considera-se neoplasia uma massa anormal de tecido com crescimento descontrolado (autônomo e independente do controle fisiológico, embora ainda dependa do suporte nutricional do hospedeiro) e excessivo em relação aos demais tecidos normais, que persiste mesmo depois de cessado o estímulo desencadeante. Esta persistência é decorrente de alterações genéticas ocorridas na célula neoplásica que são transmitidas as demais células que delas derivam. O termo TUMOR, que anteriormente referia-se ao edema presente nos processos inflamatórios, é considerado sinônimo de neoplasia. Assim, atualmente utiliza-se o termo tumor benigno quando se refere à neoplasia benigna e tumor maligno para neoplasia maligna (KUMAR *et al.*, 2010; RUBIN *et al.*, 2006).

A oncologia (originada da palavra grega oncos = tumor + logia = estudo) é a especialidade médica dedicada ao estudo das neoplasias. A classificação das neoplasias está baseada em dois critérios: comportamento biológico e histogênese. Quanto ao comportamento biológico, as neoplasias podem ser classificadas em benignas e malignas. As benignas caracterizam-se pela formação de uma cápsula fibrosa, crescimento expansivo e lento (quando comparado às malignas) e ausência de metástases (crescimento de uma nova neoplasia à distância, sem continuidade e dependência do foco primário). Já as neoplasias malignas apresentam crescimento rápido com capacidade invasivo-destrutiva, produção de metástases e sem formação de cápsula. As metástases podem ocorrer por via linfática, onde o transporte das células tumorais ocorre através dos vasos linfáticos e, neste caso, os linfonodos envolvidos seguem a rota natural da drenagem linfática (mais frequente nos carcinomas), via hematogênica, acometendo mais frequentemente os órgãos que recebem maior fluxo sanguíneo como o fígado e o pulmão que recebe todo sangue das veias cavas após passarem pelo átrio e ventrículo direitos (mais comuns nos casos dos sarcomas) e por implantes em cavidades e superfícies corporais como

cavidade peritoneal, pleural, pericárdica, etc. (KUMAR *et al.*, 2010; FILHO, 2011).

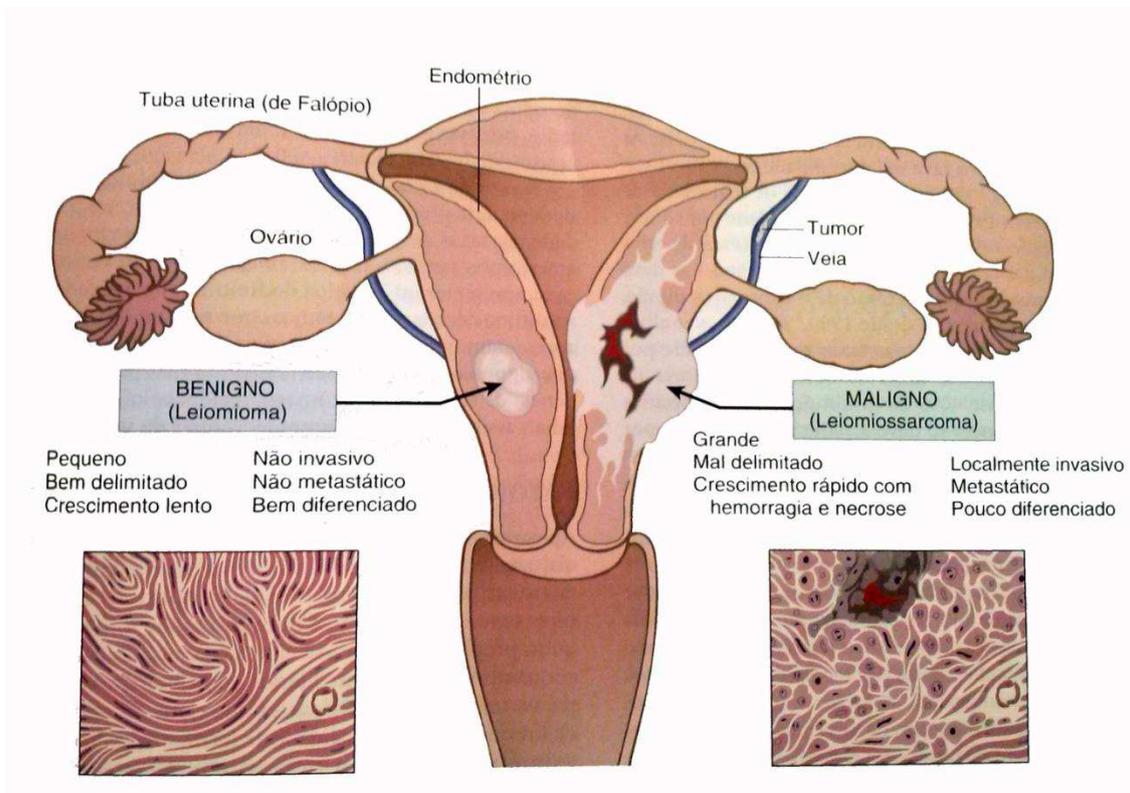
Na Tabela 1 observa-se as principais diferenças entre os tumores malignos e benignos segundo alguns critérios.

Tabela 1 - Principais diferenças entre tumores benignos e malignos.

Critério	Tumor Benigno	Tumor Maligno
Diferenciação e Anaplasia	Células bem diferenciadas	Varição da diferenciação Células bem diferenciadas – Indiferenciadas (T. anaplásicos)
Morfologia	Reproduz o aspecto do tecido de origem	Caracteres diferentes do tecido de origem
Mitoses	Limitadas, raras e típicas	Frequentes e atípicas
Crescimento	Lento, expansivo e bem delimitado	Rápido, infiltrativo com delimitação imprecisa
Encapsulação	Presença frequente	Geralmente ausente
Invasão local	Localizada no seu local de origem	Infiltra, invade ou metastatiza para lugares distantes
Metástases	Não ocorrem	Frequentes
Antigenicidade	Ausente	Presente
Relação núcleo/citoplasma	Próximo do normal	Aumentada, poliploidia e aneuploidia
Necrose, hemorragia	Raras	Frequentes

Fonte: KUMAR *et al.*(2010).

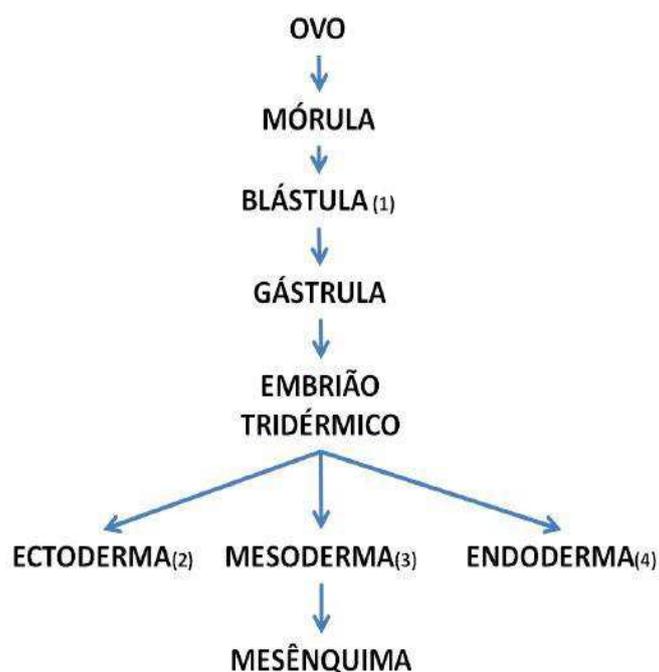
Figura 1 - Comparação entre um Leiomioma (tumor benigno do Miométrio) e leiomiossarcoma (tumor maligno de mesma origem).



Fonte: KUMAR *et al.* (2010).

A Figura 1 evidencia a diferença entre os tumores benignos e malignos originados a partir do músculo liso. Todos os tumores são formados por um parênquima constituído por células neoplásicas que determinam o seu comportamento biológico e é o elemento do qual o tumor tem o seu nome derivado e um estroma não neoplásico, constituído por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e células normais (macrófagos, linfócitos). O estroma é essencial para o crescimento do tumor, proporcionando suprimento sanguíneo e suporte para o crescimento das células parenquimatosas. A nomenclatura, assim como o comportamento biológico dos tumores, depende do seu componente parenquimatoso (KUMAR *et al.*, 2010; RUBIN *et al.*, 2006). A Figura 2 representa o desenvolvimento do ovo até o embrião tridérmico, do qual são originados todos os tecidos do corpo humano.

Figura 2 - Desenvolvimento do ovo ao embrião tridérmico e os diferentes tecidos derivados do mesmo.



(1) Células blásticas, residuais, são daqui derivadas.

(2) O ectoderma dá origem ao epitélio de revestimento externo, o epitélio glandular e o tecido nervoso.

(3) O mesoderma diferencia-se em diversos tecidos, entre os quais os tecidos ósseo, muscular, vascular, seroso, cartilaginoso e hematopoético.

(4) O endoderma dá origem ao epitélio de revestimento interno e de glândulas.

Fonte: INCA – Manual de Bases Técnicas da Oncologia – SAI/SUS - Sistema de Informações Ambulatoriais (2013).

Como regra geral, os tumores benignos recebem o sufixo “oma” ao tecido de origem. Assim, um tumor benigno do tecido adiposo chama-se lipoma, de tecido cartilaginoso recebe o nome de condroma e assim sucessivamente. Com relação aos tumores malignos é preciso levar em consideração a origem embrionária dos tecidos de origem. Caso o tecido seja epitelial de revestimento interno e externo, a terminologia utilizada é carcinoma. Se a origem for de tecido glandular, a designação utilizada é adenocarcinoma. Quando a origem do tumor for dos tecidos conjuntivos ou mesenquimais receberão o termo sarcoma acrescido ao tecido de origem. Já os tumores com origem em células blásticas, com maior incidência na infância, acrescenta-se o termo blastoma ao nome do tecido de origem (INCA, 2013).

Na Tabela 2 observa-se, de forma mais abrangente, a origem, classificação e nomenclatura dos tumores.

Tabela 2 - Origem, classificação e nomenclatura dos tumores.

ORIGEM	BENIGNOS	MALIGNOS
Tecido Epitelial		
Revestimento	Papiloma	Carcinoma
Glandular	Adenoma	Adenocarcinoma
Tecido Conjuntivo		
Fibroso	Fibroma	Fibrossarcoma
Mixóide	Mixoma	Mixossarcoma
Adiposo	Lipoma	Lipossarcoma
Cartilagem	Condroma	Condrossarcoma
Vasos sanguíneos	Hemangioma	Hemangiossarcoma
Glómus	Giomangioma	-
Pericitos	Hemangiopericitoma	Hemangiopericitoma Maligno
Vasos Linfáticos	Linfangioma	Lifangiossarcoma
Mesotélio	-	Mesotélioma maligno
Meninge	Meningioma	Meningioma maligno
Tecido Hemolinfopoético		
Mielóide	-	Leucemia (vários tipos)
Linfóide	-	Leucemia linfocítica
-	-	Linfoma
-	-	Plasmocitoma
-	-	Doença de Hodgkin
Células de Langerhans	-	Histiocitose X
Tecido Muscular		
Liso	Leiomioma	Leiomiossarcoma

Estriado	Rabdomioma	Rabdomiossarcoma
	Tecido Nervoso	
Neuroblasto e/ou	Ganglioneuroma	Ganglioneuroblastoma
Neurônio	-	Neuroblastoma

Fonte: INCA, (2013).

Os tumores malignos são responsáveis por um número expressivo e crescente de pacientes em todo mundo, e representam a segunda causa de morte da população mundial (SRIVASTAVA *et al.*, 2005). No Brasil estima-se em 576 mil, o número de casos novos de câncer para os anos de 2014 e 2015, sendo os tipos mais incidentes no sexo masculino os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon, reto e estômago, já nas mulheres os cânceres mais frequentes são o de pele não melanoma, mama, colo uterino, cólon, reto e glândula tireoide (Figura 3), e uma mortalidade que deverá atingir mais de 250 mil portadores de câncer (INCA, 2014). Para o mundo, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que em 2030 existam 27 milhões de casos incidentes de câncer com 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas, portadoras da doença, anualmente com o maior número de casos em países de baixa e média renda (INCA, 2014).

Figura 3 - Distribuição proporcional dos 10 tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014/2015 por sexo, exceto pele não melanoma, no Brasil.

Localização primária	casos	%			Localização primária	casos	%
Próstata	68.800	22,8%	Homens 	Mulheres	Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%			Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%			Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%			Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%			Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%			Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%			Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%			Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%			Leucemias	4.320	1,6%

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Fonte: INCA (2014).

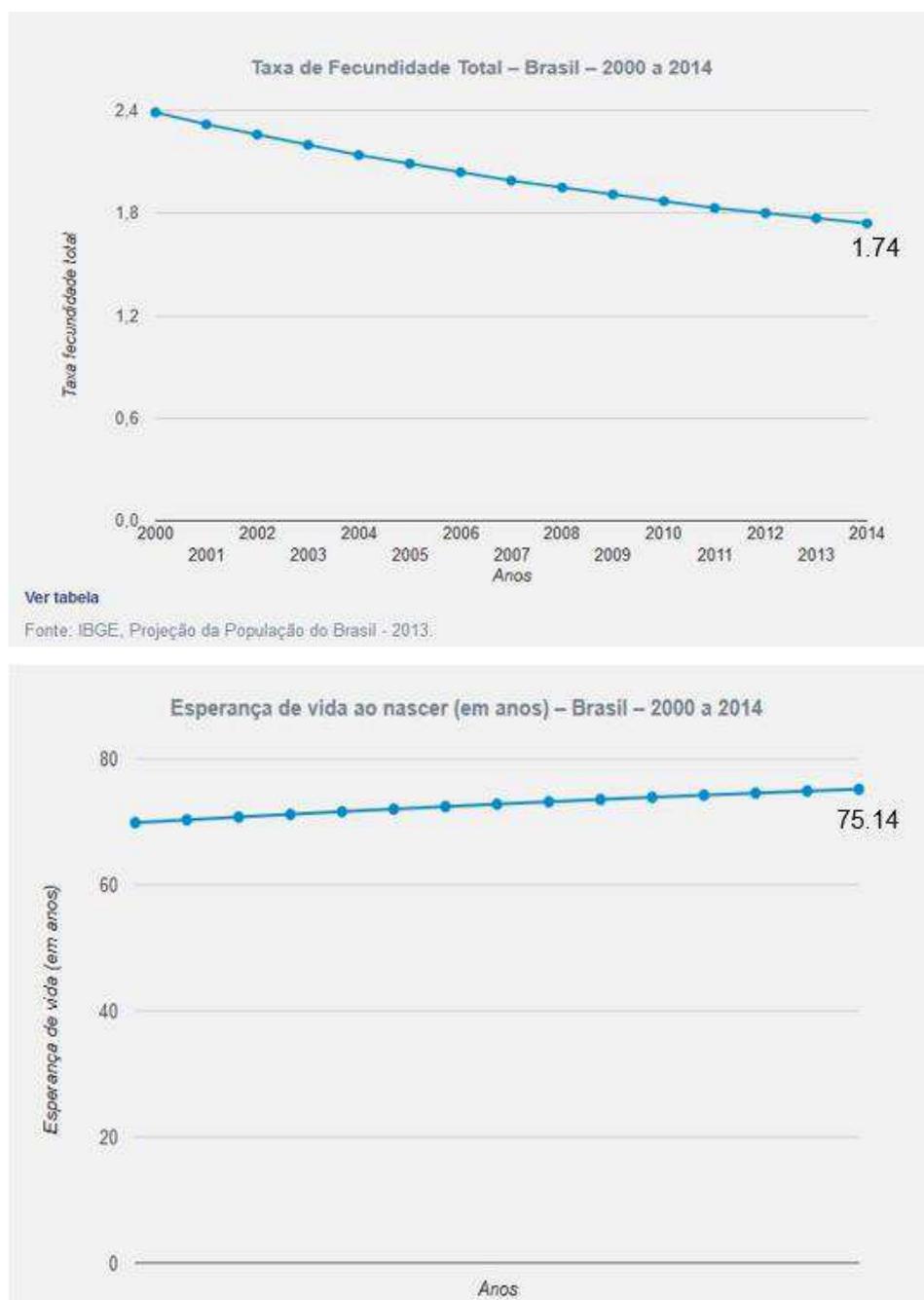
Os tumores malignos compreendem um conjunto de doenças caracterizadas pela presença de células com crescimento contínuo e

descontrolado com propriedades invasivo-destrutiva local e produção de metástases. Essas propriedades normalmente são ocasionadas por mutações nos proto-oncogenes promotores de crescimento, genes supressores do crescimento, genes reparadores de DNA e genes reguladores da apoptose (FOSTER, 2008; KUMAR *et al.*, 2010).

Tanto fatores genéticos como ambientais (agentes químicos, físicos ou biológicos com capacidade de causar dano ao genoma celular) tem participação na patogenia do câncer, embora os fatores ambientais pareçam ser os contribuintes mais significativos para os casos de câncer mais esporádicos comuns. Algumas formas de câncer são mais comuns em determinadas regiões do mundo, apresentando, inclusive, maior taxa de mortalidade nestas localidades. Como exemplo, pode-se citar a taxa de mortalidade de carcinoma de estômago (tanto em homens como em mulheres) cerca de oito vezes maior no Japão do que nos Estados Unidos, enquanto a mesma taxa é cerca de duas vezes maior nos Estados Unidos quando se trata de carcinoma de pulmão. Embora estes dados não possam excluir o fator racial, acredita-se que os fatores ambientais sejam mais influentes (KUMAR *et al.*, 2010; CARNEIRO; JUNQUEIRA, 2012).

Outro fator epidemiológico relevante é a idade. Os carcinomas são mais frequentes em indivíduos maiores de 55 anos, sendo o câncer a principal causa de morte entre as mulheres entre 40 e 79 anos e entre os homens com 60 e 79 anos. A queda da incidência em indivíduos com idade igual ou superior aos 80 anos, provavelmente decorre do menor percentual de pessoas que atingem esta idade. Segundo o IBGE (2014), a proporção de idosos (idade igual ou superior a 60 anos) vem crescendo no Brasil em decorrência da queda na taxa de fecundidade total e aumento da expectativa de vida (Figura 4) o que tenderá a aumentar o número de casos de neoplasias malignas no País.

Figura 4 - Taxa de Fecundidade (a) e Expectativa de Vida (b) no Brasil.



Fonte: IBGE (2014)

A provável causa do aumento da incidência de câncer em indivíduos com idade mais avançada pode estar condicionada ao maior acúmulo de mutações somáticas durante este tempo e a provável redução da imunocompetência que acompanha o envelhecimento (INCA, 2013).

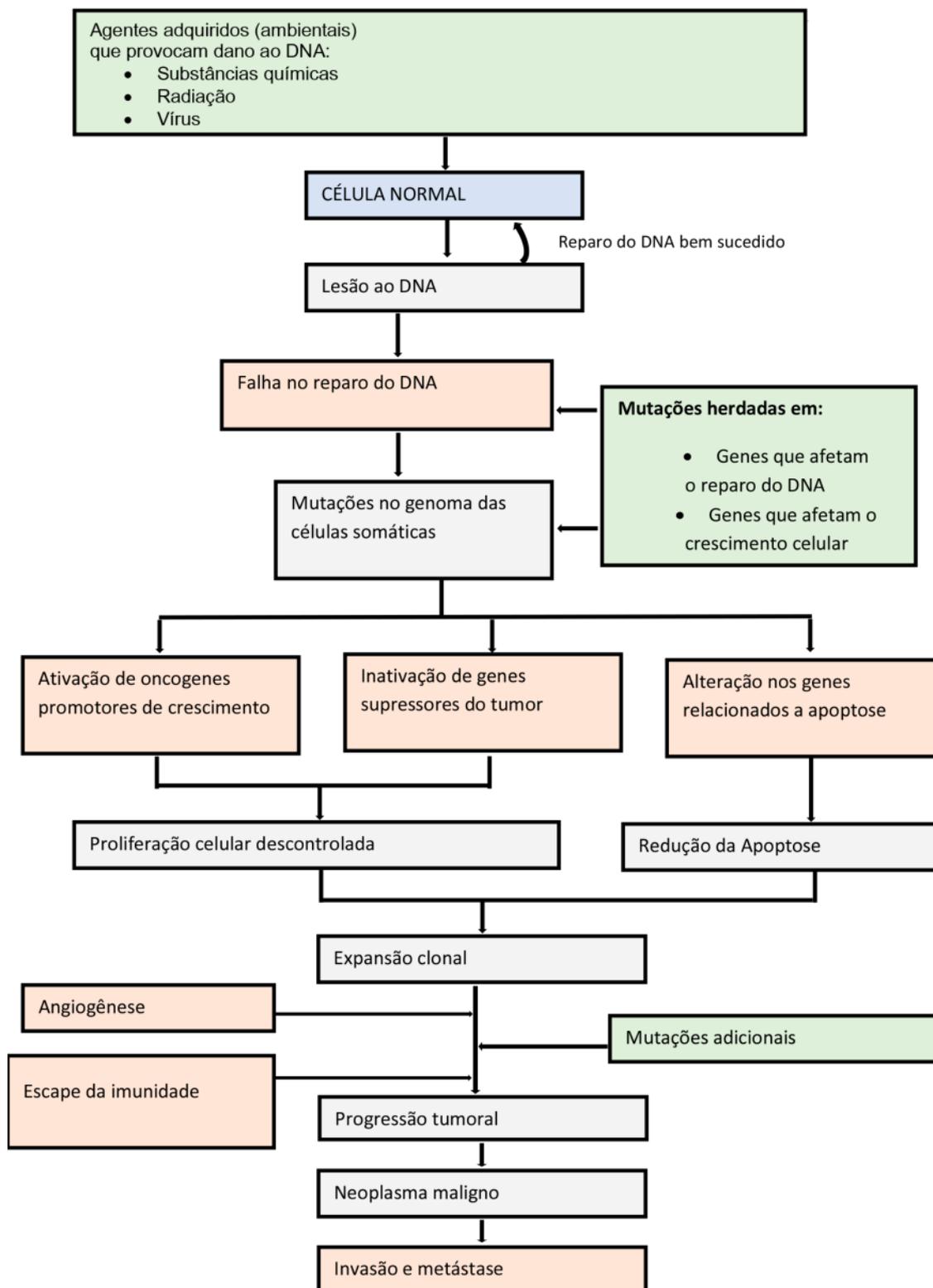
3.1.1 A Base Molecular do Câncer

O entendimento da base molecular do câncer vem crescendo nos últimos anos, contribuindo para o desenvolvimento de novas estratégias cada vez mais eficientes no combate à doença. Um ponto fundamental no câncer é o dano genético não letal a um grupo de genes que irão promover modificações no funcionamento celular provocando a sua transformação maligna (KUMAR *et al.*, 2010; MONTENEGRO *et al.*, 2015).

O dano genético pode ter origem exógena (agentes físicos, químico, ou biológicos denominados de carcinógenos), endógena a partir de produtos do metabolismo do organismo, estocástico ou herdados na linhagem germinativa. Outro fato importante é que o câncer tem início em uma única célula (monoclonal), cujo material genético foi danificado, propiciando sua expansão clonal. Geralmente quatro grupos de genes são afetados: proto-oncogenes (genes promotores de crescimento), genes inibidores de crescimento, genes envolvidos no processo de apoptose e genes relacionados ao reparo do DNA. O resultado deste conjunto de danos ao material genético são alterações na fisiologia celular que resultarão no desenvolvimento da neoplasia maligna (KUMAR *et al.*, 2010).

As principais modificações no funcionamento celular são as seguintes: potencial replicativo ilimitado; reprodução independente de estímulos externos (autossuficiência), insensibilidade a sinais inibitórios de crescimento, capacidade de invadir os tecidos vizinhos e originar metástase, redução da apoptose, indução a neovascularização e defeitos no reparo do DNA (RUBIN, 2006). O fluxograma apresentado na Figura 5 resume os eventos mencionados acima.

Figura 5 - Fluxograma resumido da base molecular do câncer.



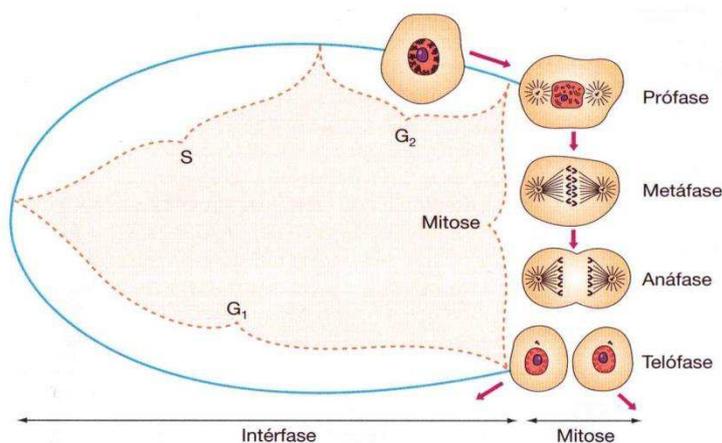
Fonte: Adaptado de Kumar *et al.* (2010)

3.1.2 Tratamento do Câncer

A terapia do câncer consiste, normalmente, na associação de quimioterapia, radioterapia, imunoterapia, ressecção cirúrgica (quando indicada) e transplante de medula óssea. Entretanto, muitos cânceres se mostram resistentes a esta associação. Assim, torna-se imperativo a necessidade de pesquisar, desenvolver e introduzir modalidades terapêuticas mais eficientes, que possam oferecer ao número crescente de pacientes com doenças malignas disseminadas, oportunidades reais de controle loco-regional e a distância das células neoplásicas (INCA, 2014).

O mecanismo de ação da maioria dos quimioterápicos utilizados é através da inibição da proliferação celular, ou seja, atuam geralmente no ciclo celular (Figura 6). Desta forma, os quimioterápicos podem ser: ciclos inespecíficos – corresponde às drogas que podem ou não atuar no ciclo proliferativo; ciclos específicos – só agem nas células que se encontram no ciclo proliferativo; fases específicas – são as drogas que atuam numa determinada fase do ciclo celular (RANG *et al.*, 2003; DE ALMEIDA *et al.*, 2005; BRUNTON *et al.*, 2012LAZO; PARQUER, 2006; INCA, 2013).

Figura 6 - Ciclo celular e suas diferentes fases.



Fonte: CARNEIRO; JUNQUEIRA, (2012).

Uma vez que os quimioterápicos consomem uma significativa parcela dos recursos destinados ao Sistema Único de Saúde (SUS), torna-se importante e

estratégico para o país que novas moléculas, selecionadas na biodiversidade brasileira, ou de origem sintética, com comprovado potencial antitumoral, alcancem o mercado consumidor o mais breve possível, minimizando os custos e otimizando a qualidade de vida dos portadores de câncer, com a implantação de novas modalidades terapêuticas através do emprego de biomateriais utilizados para liberação controlada de fármacos (INCA, 2014; BRUNTON *et al.*, 2012).

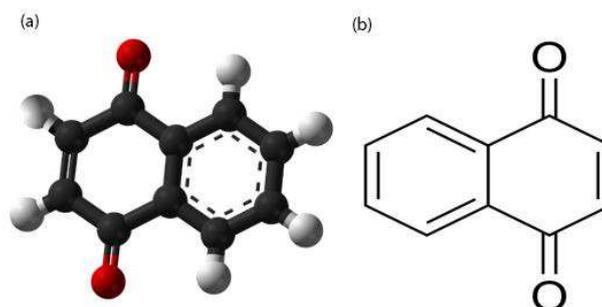
As quinonas consistem num grupo de substâncias com ampla distribuição natural que apresentam importantes funções em processos vitais tais como a participação da ubiquinona na cadeia transportadora de elétrons (fundamental na síntese eficiente de ATP) e a plastoquinona na fotossíntese. Outros compostos como a vitamina K₁ (filoquinona, presentes nos vegetais) , K₂ (menaquinona, sintetizada por bactérias no trato intestinal humano) e K₃ (origem sintética) são de extrema importância no processo de coagulação sanguínea, atuando como cofatores para enzima carboxilase hepática que catalisa a formação dos fatores II (protrombina), VII (acelerador da conversão sérica da protrombina), IX (componente da tromboplastina plasmática), X (fator *Stuart*) que são pró-enzimas fundamentais no processo de coagulação do sangue. São também importantes na formação da matriz óssea por participarem na formação da osteocalcina, proteína não-colagenosa predominante na matriz óssea (KLACK, 2006; GUYTON, 2011; NELSON *et al.*, 2014; STRYER, 2008).

Na esfera farmacológica, as quinonas apresentam diversos efeitos tais como bactericidas, viruscidas, antiparasitária e antitumoral. Com relação à atividade antitumoral, diversas substância desta classe tem apresentado resultados promissores. Entre elas estão a 1,4 - Naftoquinona, 2-butanoil-1,4-Naftoquinona, 2-propanoilamina-1,4-Naftoquinona, β -lapachona, lapachol, lausona, biflorina, etc. (BRANDÃO *et al.*, 2010; BEZERRA *et al.*, 2007; ÁREAS, 2007; SILVA *et al.*, 2003).

3.1.2.1 1,4-Naftoquinona

A 1,4-Naftoquinona ($C_{10}H_6O_2$, massa molar de 158,15 g/mol, densidade de 1,42 g/cm³) tem apresentado efeitos antitumorais em diversas culturas celulares contendo células tumorais, tais como: células de câncer pulmonar, leucêmicas, de câncer gástrico, carcinoma de colón e células de melanoma (KAYASHIMA *et al.*, 2009). Diversos mecanismos de ação têm sido propostos para seus efeitos antitumorais: estresse oxidativo (por estimular a formação de espécies reativas de oxigênio), inibição da angiogênese, inibição da topoisomerase e indução de apoptose (KAYASHIMA *et al.*, 2009; KUMAR *et al.*, 2009). A Figura 7 ilustra o modelo estrutural e pau e bola da 1,4-Naftoquinona.

Figura 7 - Modelo bola-e-bastão (a) e estrutural (b) da 1,4 – Naftoquinona.

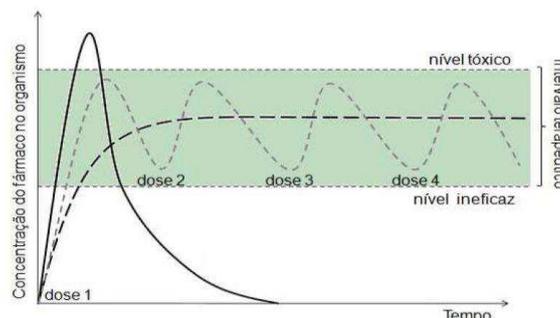


Este fármaco poderá ser utilizado em associação com outros quimioterápicos e/ou associado a outras formas de tratamento (Cirurgia, Radioterapia, etc.)

3.1.2.2 Liberação Controlada de Fármacos

A tecnologia de sistemas poliméricos de liberação controlada de fármacos tem sido estudada em detalhes nos últimos 30 anos. Apresenta a vantagem de manter o fármaco por mais tempo dentro da janela terapêutica (Figura 8) reduzindo a possibilidade de níveis tóxicos ou subterapêuticos. Desta forma, minimiza os efeitos colaterais dos quimioterápicos e diminui o número de doses requeridas quando os mesmos são administrados de forma convencional na prática médica (SOUZA, 2006).

Figura 8 - Comparação dos perfis de liberação de fármacos em dose única (----), dose fracionada (- - -) e através de um sistema de liberação controlada de fármacos (- - -).



Fonte: Adaptado de LIMA, (2010).

No sistema de liberação controlado, o fármaco deve interagir de forma física ou química com os materiais biocompatíveis de tal forma que ao ser administrado *in vivo* possam controlar, de forma previsível, a taxa de liberação do fármaco e/ou conduzir o mesmo ao sítio específico de sua atuação (COIMBRA, 2010).

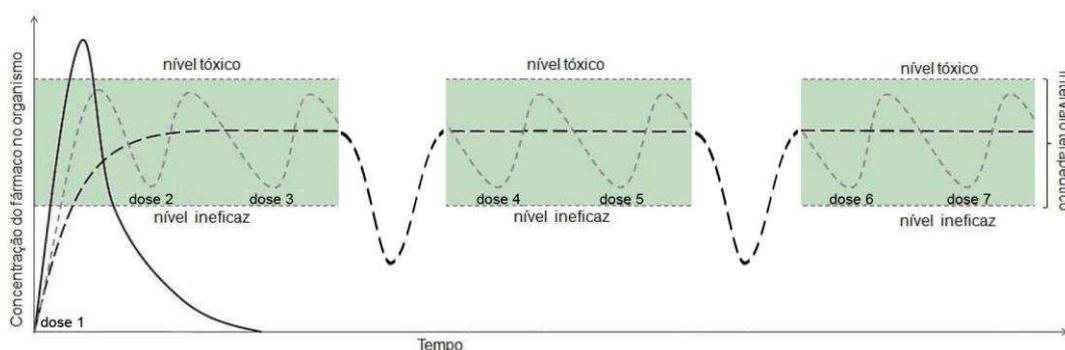
A literatura evidencia que microesferas de quitosana enxertadas com poliacrilamida e reticuladas com glutaraldeído foram usadas para encapsular indometacina, um fármaco anti-inflamatório não esteróide, empregado no tratamento da artrite, e também para encapsular nifedipina, um bloqueador de canais de cálcio, no tratamento anti-hipertensivo (KUMBAR *et al.*, 2003). Matriz de N-laurilcarboximetilquitosana contendo grupos hidrofóbicos e hidrofílicos foi estudada na liberação de taxol para tratamento de tecidos cancerosos (YOSHIOKA *et al.*, 1995).

A quitosana é considerada um apropriado sistema de liberação de fármacos na cavidade bucal, visto que sua atividade antibacteriana pode ser devida às interações eletrostáticas entre grupos amino e grupos aniônicos nas paredes celulares das bactérias provenientes de resíduos de ácidos carboxílicos e fosfolipídios (SEO *et al.*, 1994). Sistema de liberação bucal mucoadesivos desenvolvidos por hidrogéis de quitosana parecem ser apropriados para prolongar o tempo de residência da forma farmacêutica, melhorando o efeito terapêutico no tratamento de infecções localizadas, tais como doença periodontal e estomatite, com clorexidina (GIUNCHED *et al.*, 2002).

Biomateriais de quitosana (microesferas, lipossomos e géis) utilizado como sistema de liberação controlada de fármacos tem demonstrado possuir adequadas características bioadesivas e podem intumescer facilmente quando em contato com a mucosa nasal. Vários sais de quitosana (lactato, aspartato, glutamato e cloridrato de quitosana) mostraram liberação sustentada nasal do fármaco cloridrato de vincomicina (CEREHIARA *et al.*, 2003).

Na utilização de fármacos antineoplásicos não seletivos (fármacos que não afetam apenas as células neoplásicas, mas também células normais do organismo, principalmente com alta taxa de proliferação como as da medula óssea vermelha, por exemplo) faz-se necessário o desenvolvimento de um sistema pulsátil em que a droga seja liberada durante um determinado período, agindo sobre as células malignas e, durante um intervalo de tempo, reduza a níveis ineficazes para que as células normais que foram lesadas possam ser substituídas por outras, permitindo a recuperação do paciente (Figura 9). Por este motivo, a quimioterapia é aplicada em ciclos periódicos com periodicidade dependente do tipo do tumor, do estágio da doença, das condições físicas do paciente e do tipo de quimioterápico utilizado (INCA, 2013).

Figura 9 - Sistema de liberação controlada de fármacos pulsátil.



Fonte – Adaptado de Lima, (2010).

3.2 BIOMATERIAIS

São materiais processados para interagir com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do

organismo. Podem ser de natureza metálica, cerâmica, polimérica ou uma composição das três classes citadas (compósito) (RATNER *et al.*, 2004).

Apresentam diversas aplicações na medicina, odontologia e outras áreas da saúde. Na área médica, diversas especialidades utilizam produtos fabricados com biomateriais, como aponta Soares (2005):

- Cardiologia: próteses endovasculares (stents com ou sem recobrimento com fármacos), válvulas cardíacas, etc.
- Ortopedia: próteses de quadril, joelho e ombro; parafusos; cimentos ortopédicos; etc.
- Oftalmologia: lentes intraoculares, etc.
- Otorrinolaringologia: próteses auditivas.
- Cirurgia plástica: próteses mamárias de silicone, etc.

No uso de biomateriais é importante levar em consideração não só as propriedades: mecânicas, elétricas, térmicas, magnéticas e ópticas, mas também as características relacionadas às interações biológicas, como: não serem trombogênicos, mutagênicos, carcinogênicos ou antigênicos e atóxicos quando em contato com os fluidos corporais (FERNANDES, 2009).

Os principais avanços no campo dos biomateriais têm ocorrido principalmente devido ao aumento crescente de pacientes, em função do aumento da população e da expectativa de vida, que necessitam obter melhoria na qualidade de vida (CARVALHO *et al.*, 2010; RODRIGUES, 2013).

O uso de polímeros como biomateriais teve início na década de 1940 durante a Segunda Guerra Mundial e uma das primeiras tentativas foi o uso do polímero sintético poli metacrilato de metila (PMMA) como uma córnea artificial. Encorajados pelos sucessos iniciais, os cirurgiões começaram a usar uma variedade de polímeros para diversas aplicações, tais como dispositivos intravenosos para contato com sangue, substituições de articulação de quadril e como lentes intraoculares (NAIR; LAURENCIN, 2006).

Os biomateriais à base de quitosana são uma realidade na área da saúde, e sua aplicação vem sendo estudada em vários campos, desde a liberação controlada de fármaco até a engenharia tecidual (SPIN-NETO *et al.*, 2008).

3.2.1 BIOPOLÍMEROS

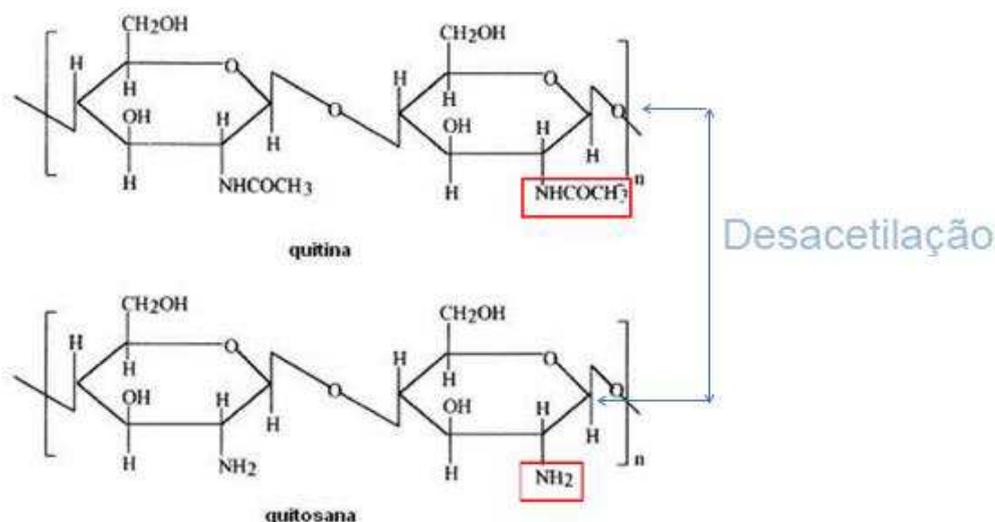
São polímeros naturais produzidos por seres vivos (plantas e animais). Incluem o látex, algodão, seda, couro, lã etc. Além destes, as proteínas (colágeno, elastina), polissacarídeos (amido, celulose, quitina, quitosana (derivado da quitina), enzimas (principalmente proteínas com função catalítica), ácidos nucleicos são fundamentais na bioquímica e fisiologia dos seres vivos. As proteínas, polissacarídeos e ácidos nucleicos são formados a partir de aminoácidos, oses (e seus derivados) e nucleotídeos, respectivamente (CALLISTER, 2007; MARZZOCO; TORRES, 2007; STRYER, 2008; CHAMPE *et al.*, 2012).

3.2.1.1 QUITINA E QUITOSANA

A quitina (Figura 10) é um polissacarídeo, sendo o segundo mais abundante na natureza só ficando atrás da celulose (AZEVEDO *et al.*, 2007), é formado pela polimerização de N-acetilglicosamina ligados por ligação $\beta 1 \rightarrow 4$ onde a hidroxila no carbono 2 é substituída por um grupo amina acetilado. Apresenta-se sobre a forma de fibras semelhantes às fibras de colágeno e é o principal componente dos exoesqueletos duros de artrópodes como insetos, lagostas, caranguejos etc. (NELSON *et al.*, 2014). Apresenta uso limitado em decorrência da sua baixa solubilidade em solventes aquosos e em grande parte dos solventes orgânicos convencionais (AZEVEDO *et al.*, 2007).

A quitosana é um polissacarídeo derivado da desacetilação parcial da quitina. Quimicamente, quitina e quitosana estão proximamente relacionadas onde ambas são polissacarídeos lineares contendo as unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcNAc) e 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcN) unidas por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1 \rightarrow 4)$. A diferença entre elas está no grau de acetilação (GA), que corresponde a proporção de unidades GlcNAc em relação às de GlcN, e na solubilidade em meio ácido. A quitina possui um $GA > 0,5$ e é insolúvel em meio ácido. A quitosana é solúvel em meio ácido e possui $GA \leq 0,5$ (GUINESI *et al.*, 2007).

Figura 10 - Estrutura química da quitina e quitosana.



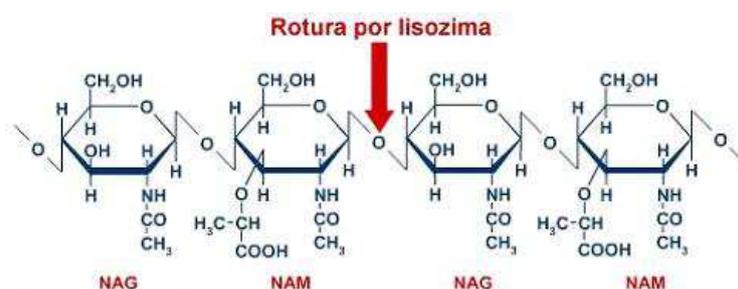
Fonte: Adaptado AZEVEDO *et al.* (2007).

A quitosana é considerada um material funcional apropriado para aplicações biomédicas por sua alta biocompatibilidade, biodegradabilidade, não antigenicidade e propriedades de adsorção. Reações inflamatórias ou alérgicas não têm sido observadas em humanos sujeitos a aplicação local, implantação, injeção e ingestão. Além disso, a estrutura química da quitosana é similar aos glicosaminoglicanos que constitui o maior componente da matriz extracelular do osso e cartilagem. Outras vantagens dos suportes porosos de quitosana para a engenharia de tecido ósseo incluem a formação de suportes altamente poroso com poros interconectados, osteocondutividade e habilidade de intensificar a formação óssea *in vitro* e *in vivo* (THEIN-HAN; MISRA, 2009). Outra característica da quitosana é que ela atua como uma base fraca, apresentando pKa dos grupos amino nas unidades de GlcN em torno de 7,2 (GONSALVES, 2001)

Nos seres vivos, a quitosana é degradada pela ação catalítica da lisozima, enzima da classe das hidrolases que catalisa a quebra da ligação glicosídica β(1→4) entre as unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcNAc) e 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcN) da quitosana e quitina. É assim chamada por ter a capacidade de provocar lise da parede bacteriana, catalisando a quebra

da mesma ligação mencionada acima entre resíduos de dois derivados de oses denominados ácido N- acetilmurâmico (NAM) e N- acetilglicosamina (NAG) (Figura 11) presentes nos peptidoglicanos constituintes da parede bacteriana (NELSON *et al.*, 2011).

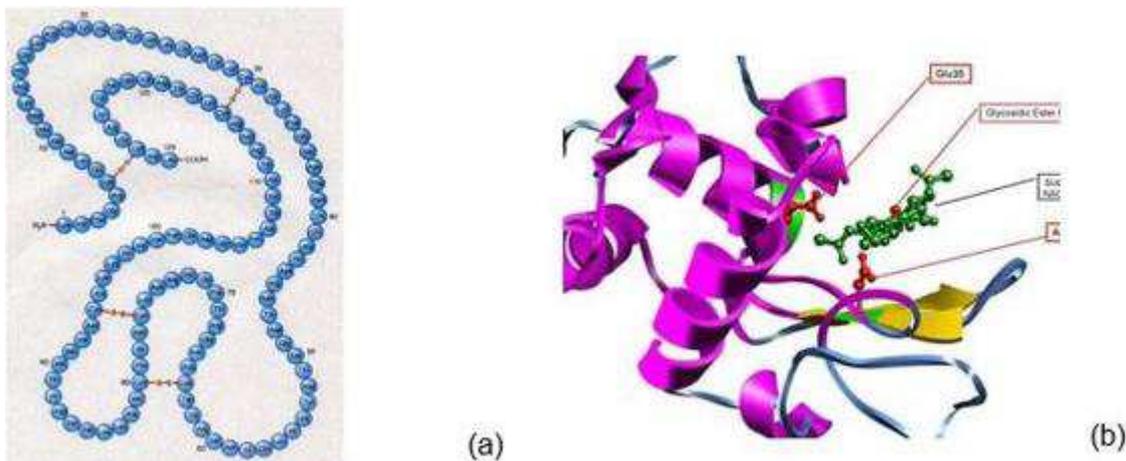
Figura 11 - Quebra da ligação β (1-4) entre NAM e NAG catalisada pela lisozima.



Fonte: <http://gmein.uib.es/otros/enzimas/Jmoldesarrollo/lisozimajmol/lisozimajmol.html>

A lisozima apresenta uma cadeia polipeptídica com 129 resíduos de aminoácidos (14,6 kDa e 04 ligações dissulfeto – Figura 12) em que os resíduos Glu³⁵ e Asp⁵², presentes no sítio ativo da enzima, são fundamentais para sua atividade. É encontrada em várias secreções humanas (lágrima, saliva, leite materno, etc.), plasma, clara do ovo e algumas células de defesa do organismo como os neutrófilos (KLÍSSIA *et al.* 2010; GRASSI *et al.* 2011).

Figura 12 - Ligações dissulfeto na molécula de lisozima (a) e perspectiva tridimensional da enzima com seu sítio ativo e substrato (b).



Fonte - http://www.crq4.org.br/a_quimica_dos_peptideos e <http://www.cerdos-swinedigital.com/midiav2/2014/07/lysozyme-alternative>

A quitosana tem sido utilizada com compostos de fosfato de cálcio granular, produzindo um arcabouço moldável e autoendurecido. Apresenta, ainda, diversas propriedades biológicas, tais como atividade antimicrobiana, efeito coagulante e analgésico e aceleração da cicatrização (CHOW, 2009). Contudo, algumas propriedades dos biomateriais de quitosana devem ser modificados para atingir as propriedades desejadas, como é o caso do emprego da reticulação química ou física das cadeias poliméricas.

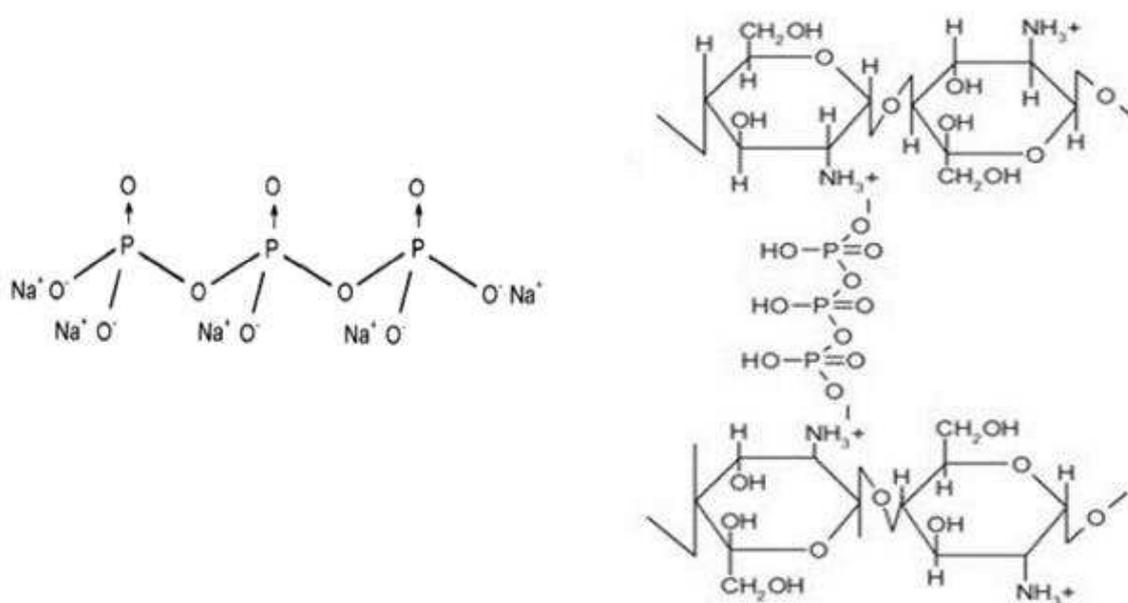
3.2.1.2 Aspectos teóricos sobre reticulação

A reticulação consiste na ligação cruzada entre cadeias poliméricas que são provocadas por agentes reticulantes que possuam, no mínimo, dois grupos funcionais. O processo de reticulação pode ser físico ou químico (HOLANDA, 2011).

A reticulação química ocorre entre as diversas cadeias poliméricas e se dá por ligações químicas ocasionadas por reações químicas entre os grupos funcionais presentes nas cadeias poliméricas ou entre estas e outros compostos químicos. Como, por exemplo, a vulcanização da borracha com a utilização de enxofre. Já a reticulação física ocorre quando o processo de reticulação se dá sem a formação de ligações químicas primárias entre as cadeias poliméricas

(FERNANDA, 2009). A Figura 13 representa a estrutura química do Tripolifosfato de Sódio (TPP) e a reticulação das cadeias de quitosana pelo composto. O TPP foi escolhido como agente reticulante devido a sua baixa toxicidade para o organismo (GOULART, 2006; HOLANDA, 2011).

Figura 13 - Estrutura química do Tripolifosfato de sódio e a reticulação das cadeias de quitosana pelo composto.



Fonte: Adaptado AZEVEDO *et al.*(2011).

CAPÍTULO 4 – MATERIAIS E MÉTODOS



Grupo de Biomateriais
UFCG | UAEMa

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LOCAL DA PESQUISA

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO) – UFCG/UAEMa.

4.2 REAGENTES

- Ácido Acético Glacial - Vetec[®] Química Fina Ltda com grau analítico;
- Hidróxido de Sódio - Vetec[®] química Fina Ltda com grau analítico;
- Tripolifosfato de sódio - Sigma Aldrich[®];
- *Phosphate Buffered Saline* (PBS) - Sigma Aldrich[®], pH = 7,4;
- Quitosana de médio peso molecular - Sigma Aldrich[®] - Grau de desacetilação de 75-85%
- 1,4 - Naftoquinona - Sigma Aldrich[®];
- Lisozima – Sigma Aldrich[®].

4.3 METODOLOGIA

4.3.1 ETAPAS DE DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA

As diversas etapas de desenvolvimento da pesquisa desde a preparação das soluções, confecção dos arcabouços reticulados e não reticulados, com e sem fármaco e técnicas de caracterização estão representadas nos fluxogramas das Figuras 14 e 15

Figura 14 - Confeção e caracterização dos arcabouços de quitosana reticulados e não reticulados.

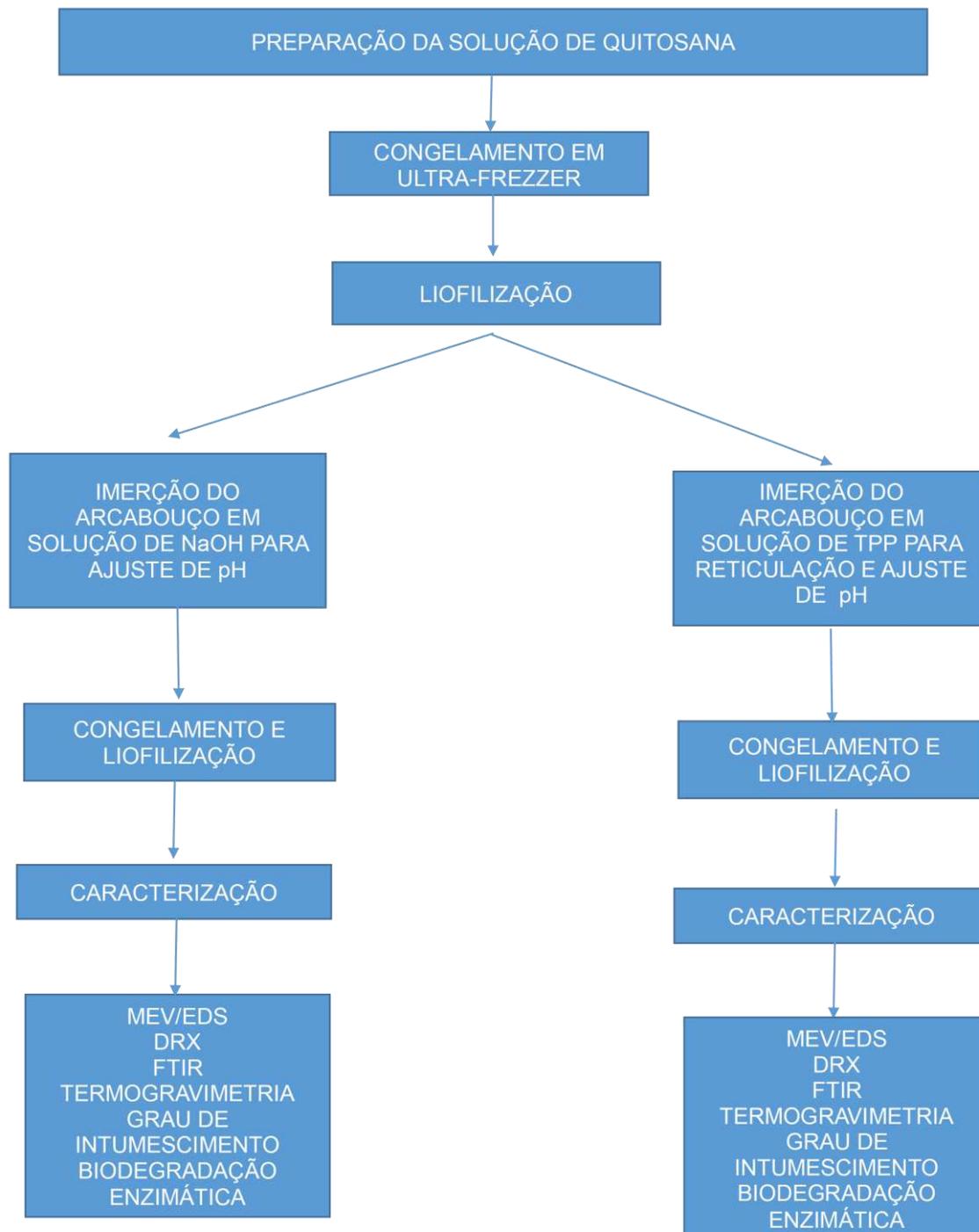
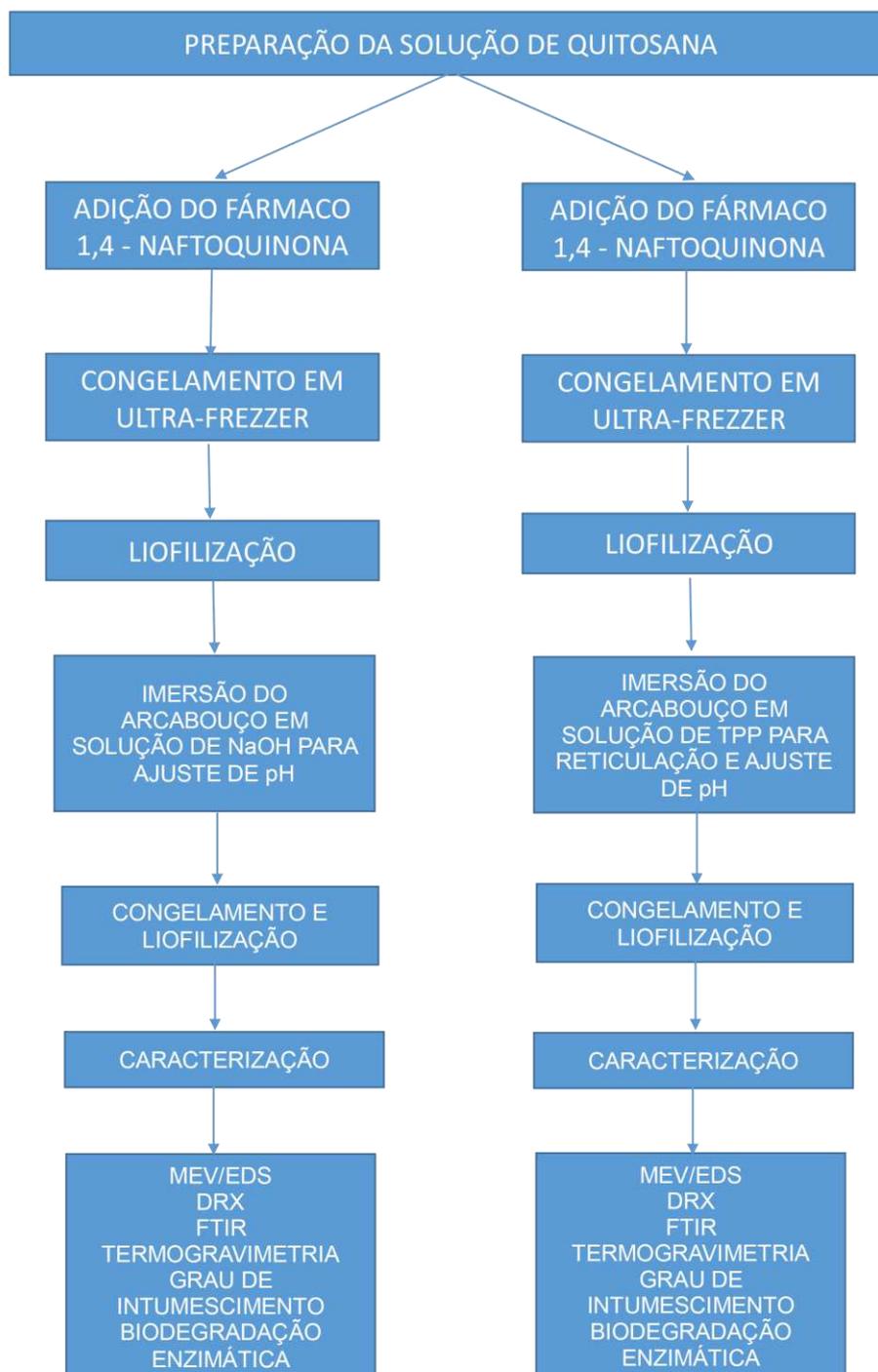


Figura 15 - Confeção e caracterização dos arcabouços de quitosana / 1,4 – naftoquinona reticulados e não reticulados.



4.3.2 Preparação da solução de Quitosana

A solução de quitosana 2% (m/v) foi preparada através da dissolução do polímero em ácido acético a 1% (v/v), sob agitação mecânica durante 24 h a 410 rpm (Figura 16). A partir da solução, com pH 4,7, foram adicionados 30 ml em placas de Petri em acrílico com 57,47 mm de diâmetro, 13,42 mm de altura e, em seguida, acondicionados no ultra-freezer (-70°C) por 24 horas para congelamento.

Figura 16 - Preparação da solução de quitosana sob agitação mecânica.



Fonte: Do Autor.

4.3.3 Preparação da solução de Quitosana com 1,4 Naftoquinona.

Foi adicionado à solução de quitosana 0,047g do fármaco a fim de obter uma solução com concentração final de 300 µM de 1,4 Naftoquinona. Da mesma forma do item 4.2.1, a solução foi mantida em agitação por 24 horas, adicionadas em placas de Petri e congeladas no ultra-freezer por 24 horas. Na Figura 17 pode ser observado o aspecto final da solução de quitosana com 1,4 – Naftoquinona e quitosana.

Figura 17 - Solução de quitosana com 1,4 - Naftoquinona (a) e quitosana (b).



Fonte: Do Autor.

4.3.4 Preparação da solução de Tripolifosfato de Sódio.

A solução de tripolifosfato de sódio 2% (m/v) foi preparada dissolvendo-se 20 gramas do sal em 500 ml de água destilada e, em seguida, aumentando o volume para 1000 ml com o mesmo solvente.

4.3.5 Preparação da solução de Hidróxido de Sódio 1M.

Para esta solução, foram dissolvidos 40 gramas da base em 500 ml de água destilada e posteriormente adicionado o mesmo solvente até o volume final de 1000 ml.

4.3.6 Confeção dos arcabouços

Foram confeccionados 04 tipos de arcabouços cujas identificações adotadas estão descritas na tabela 3.

4.3.6.1 Arcabouço de Quitosana

Os arcabouços de quitosana foram confeccionados por liofilização, processo em que a água passa diretamente do estado sólido para gasoso (sublimação). Para tanto, as placas de Petri de acrílico preenchidas com solução

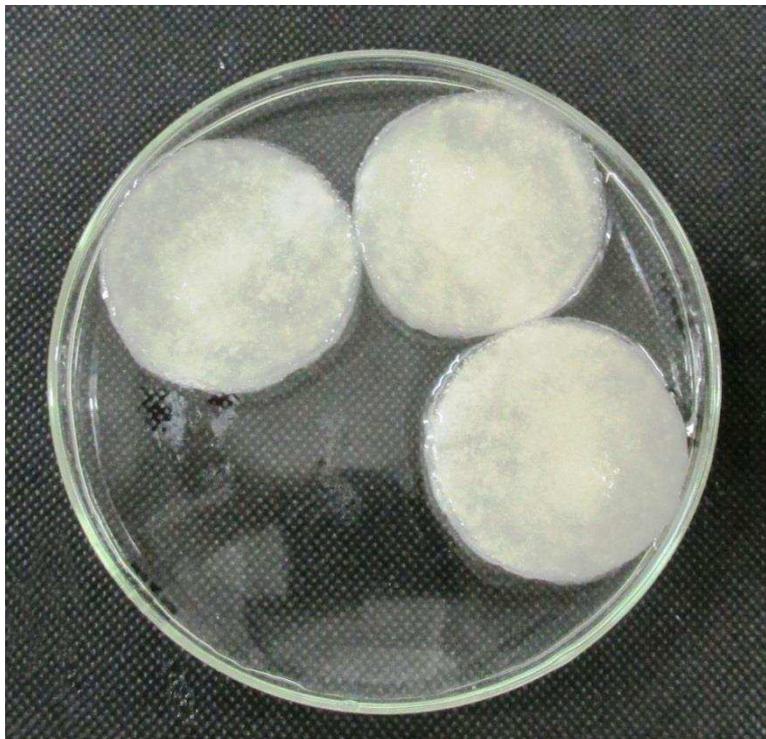
de quitosana foram acondicionadas no ultra-freezer por 24 horas e, posteriormente, transferidas para o liofilizador onde permaneceram por um período de 72 horas. O objetivo foi à formação de arcabouços porosos com poros interconectados.

Após a liofilização, os arcabouços foram imersos em solução de hidróxido de sódio 1 M (pH 14) durante 30 minutos, seguida de sucessivas lavagens com água destilada até atingir o pH entre 6 e 6,5 (Figura 18) a fim de manter um maior número de grupos NH_2 protonados, já que o pKa dos grupos amino nas unidades GlcN está em torno de 7,2. O acompanhamento do pH foi realizado com pHmetro digital marca Quimis® previamente calibrado com soluções padrão (pH 4,01; 7,00 e 10,00). Após o ajuste do pH, os arcabouços foram novamente congelados e liofilizados.

Tabela 3 - Identificação dos arcabouços confeccionados.

Arcabouço	Identificação
Quitosana	Q
Quitosana + Tripolifosfato	QT
Quitosana + 1,4 - Naftoquinona	QN
Quitosana + 1,4 – Naftoquinona + Tripolifosfato de Sódio	QNT

Figura 18 - Processo de neutralização parcial dos arcabouços de quitosana.



Fonte: Do Autor.

4.3.6.2 Arcabouço de Quitosana com Tripolifosfato de Sódio.

Neste caso, os arcabouços de quitosana foram colocados numa placa de Petri de vidro contendo solução de tripolifosfato de sódio 2% (m/v), pH 8,5, por um período de 30 minutos (Figura 19). Em seguida, foram realizadas diversas lavagens com água destilada a fim de ajustar o pH entre 6,0 a 6,5. As medidas do pH foram realizadas em um pHmetro digital previamente calibrado com as soluções padrão. Uma vez ajustado o pH, os moldes (placas de Petri com volume de 30 ml) tinham os espaços remanescentes, entre a placa e o arcabouço, preenchidos com água destilada e acondicionados no ultra-freezer com temperatura de -70°C por 24 horas. Após este período, as placas foram colocadas no liofilizador por 72 horas.

Figura 19 - Arcabouços de quitosana em solução de tripolifosfato de sódio.

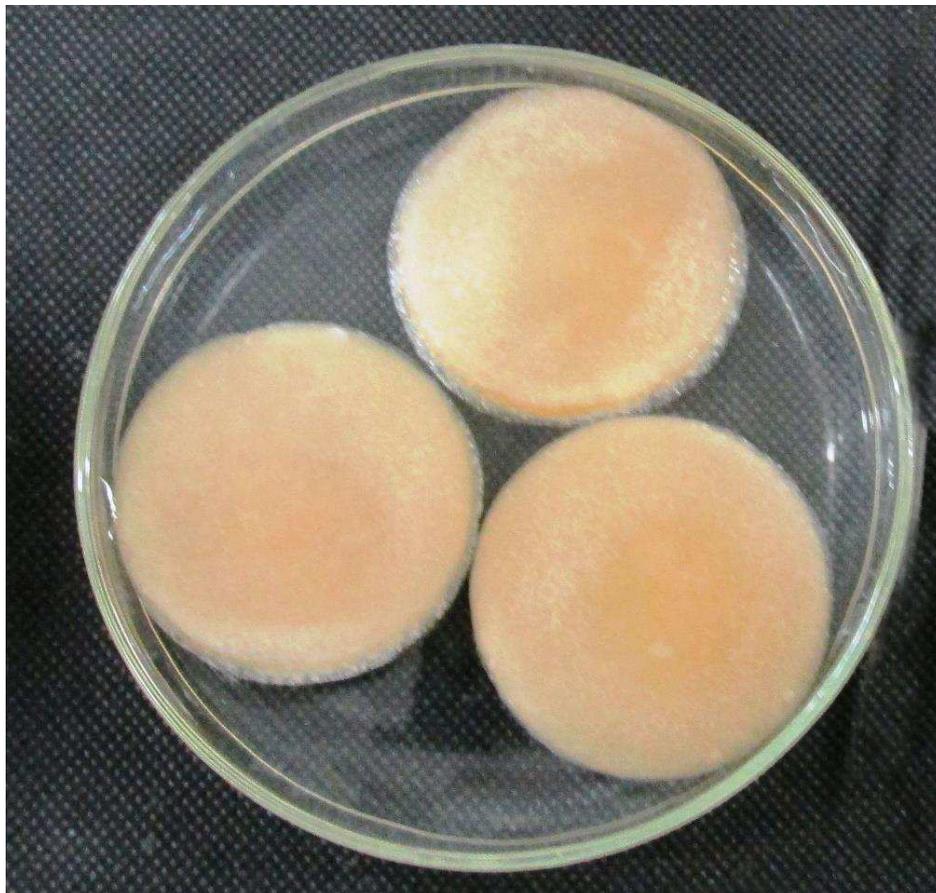


Fonte: Do Autor.

4.3.6.3 Arcabouço de Quitosana com 1,4 Naftoquinona.

Os arcabouços com fármaco foram construídos em 03 camadas (Figura 20): a 1ª continha apenas quitosana; a 2ª, quitosana com fármaco e a 3ª só quitosana. O objetivo foi construir um sistema que possa promover a liberação pulsátil do fármaco de tal forma que inicialmente só ocorrerá à liberação de quitosana, seguida da liberação de quitosana e fármaco e, finalmente, só quitosana. Para tal fim, inicialmente foi depositada 10 ml da solução de quitosana na placa de Petri, seguida pelo congelamento em ultra-freezer a -70°C por 24 horas e, em sequência, foram adicionadas as demais camadas com mesmo volume separadas pelo mesmo tempo de congelamento. Por fim, o material foi colocado no liofilizador por 72 horas. Após a liofilização, o procedimento foi análogo ao descrito no item 4.3.6.1.

Figura 20 - Arcabouços de quitosana com 1.4 Naftoquinona.

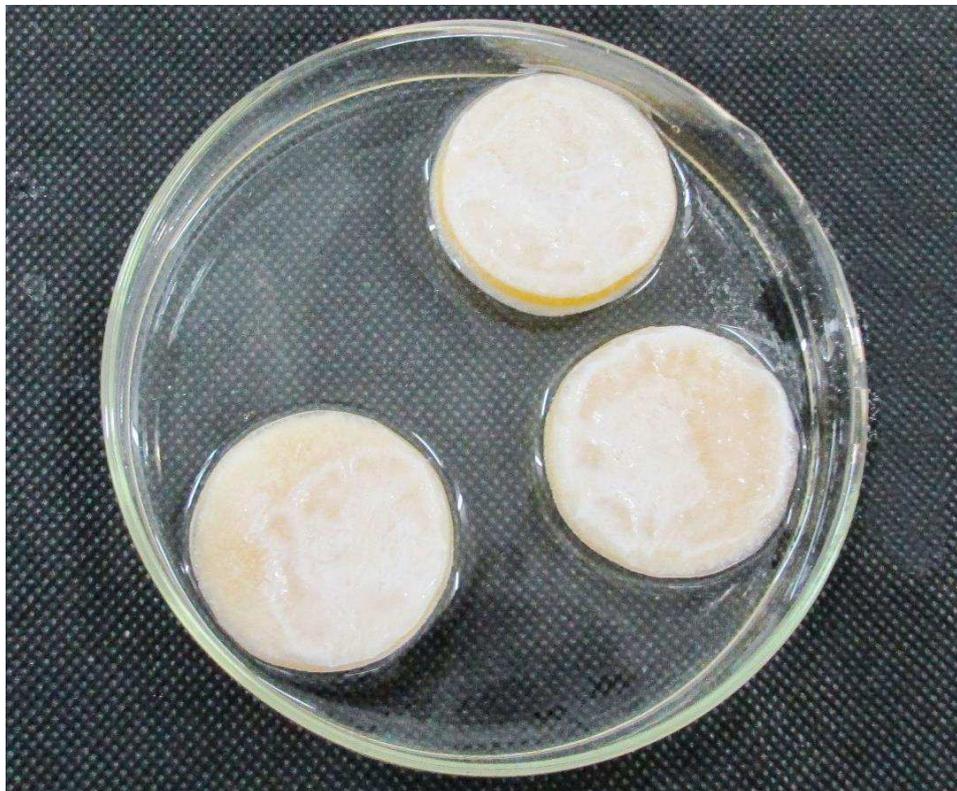


Fonte: Do Autor.

4.3.6.4 Reticulação dos arcabouços de quitosana com 1,4 Naftoquinona.

O procedimento nesta etapa foi semelhante ao descrito no item 4.3.6.2. Portanto, foi utilizado tripolifosfato de sódio na concentração de 2% (m/v) como agente reticulante dos arcabouços, com posterior congelamento por 24 horas e liofilização por 72 horas (Figura 21).

Figura 21 - Arcabouços de quitosana com 1,4 – Naftoquinona imersos na solução de tripolifosfato de sódio.



Fonte: Do Autor.

4.3.6.5 Arcabouço de quitosana com 1,4 Naftoquinona com inversão de camadas.

Para este tipo de arcabouço, o processo foi semelhante ao descrito no item 4.3.6.1, mas invertendo a ordem de deposição das camadas (Figura 22). Assim, é possível construir um sistema que inicialmente promova a liberação do fármaco e quitosana seguidas da liberação só de quitosana e, posteriormente, quitosana e fármaco. Este tipo de arcabouço foi idealizado após a elaboração dos outros arcabouços objetivos deste trabalho, sendo, portanto um estudo piloto e, desta forma, não serão apresentados dados relacionados ao processamento e as caracterizações, que serão apresentadas em trabalhos futuros.

Figura 22 - Arcabouços de quitosana com 1,4 Naftoquinona com camadas invertidas após liofilização. Vista superior e Vista lateral.



Fonte: Do Autor.

4.3.7 Técnicas de caracterização

4.3.7.1 Difração de Raios X (DRX)

A difração pode ser definida como a propriedade de uma onda contornar um obstáculo cuja dimensão é da mesma ordem de grandeza do seu comprimento de onda. Assim, numa rede cristalina, a distância entre os planos cristalinos (menor que 1nm) é da ordem do comprimento de onda dos raios-X (0,005 a 14 nm). Logo, a incidência de raios X numa estrutura cristalina provocará a difração ou espalhamento dos raios que poderão interferir construtivamente, levando à formação dos picos característicos do difratograma (ALBERS *et al.*, 2002).

Entretanto, para que ocorra interferência construtiva, é necessário que o caminho óptico percorrido pelos raios X seja o mesmo. Assim, quando dois raios incidem em planos vizinhos, a diferença do caminho óptico, para que ocorra a referida interferência, deve ser igual a um múltiplo inteiro de comprimentos de onda do raio incidente (Figura 23). Essa afirmação pode ser expressa pela equação abaixo conhecida como lei de Bragg (ALBERS *et al.*, 2002).

$$n\lambda = 2*d*\text{sen}\theta \quad (1)$$

onde:

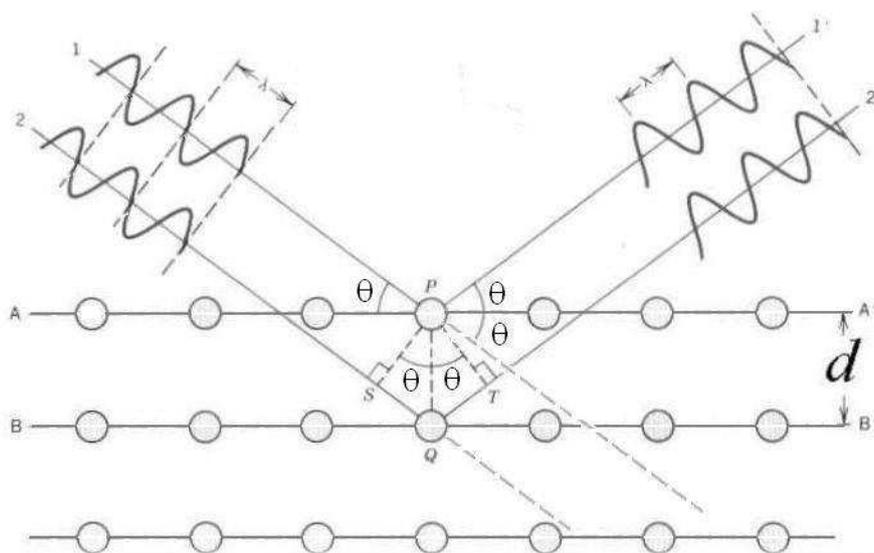
n – número inteiro

λ – comprimento de onda

d – distância interplanar

θ – ângulo entre o raio incidente e o plano

Figura 23 - Incidência de raios X em planos cristalinos vizinhos. Dedução da lei de Bragg.



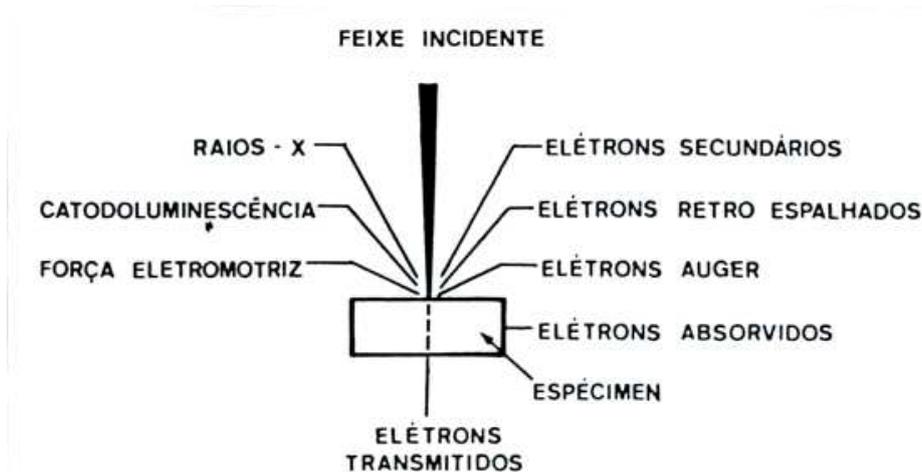
Fonte: SANTOS, (1992).

O material na forma de pó, quitosana, 1,4 Naftoquinona, tripolifosfato e amostras dos arcabouços foram submetidas à análise por difração de raios X num difratômetro SHIMADZU (modelo XRD 6000) com varredura angular de 5° a 40° com passo de 1°/min, na montagem de Bragg-Brentano, sistema θ -2 θ , utilizando radiação $CuK\alpha$ na tensão de 40KV e corrente de 30mA. O objetivo da utilização do DRX foi avaliar o grau de cristalinidade do arcabouço de quitosana e a possível influência na presença do fármaco e agente reticulante (TPP) utilizado.

4.3.7.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Esta técnica teve como objetivo fornecer informações morfológicas e topográficas sobre as superfícies e secções transversais dos arcaouços. Para realização das análises de microscopia eletrônica de varredura foram retirados fragmentos de aproximadamente 0,5 cm² de cada amostra. O equipamento utilizado foi um microscópio eletrônico de varredura de bancada, modelo TM-1000, marca Hitachi, com aumentos de 80 e 180x, profundidade de foco de 1mm, resolução de 30nm, 15KV, baixo vácuo, sem recobrimento metálico, mesmo em amostras não condutoras (BARBOSA, 2011; FOOK, 2012). O equipamento encontra-se no Laboratório de Desenvolvimento e Avaliação de Biomateriais – CERTBIO. Os sinais gerados pela interação do feixe de elétrons incidente sobre a amostra estão apresentados na Figura 24

Figura 24 - Tipos de sinais resultantes da interação do feixe de elétrons com a amostra num microscópio eletrônico de varredura.



Fonte: Adaptado de Padilha (2004).

4.3.7.3 Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS)

A partir dos raios x característicos originados pela incidência do feixe de elétrons sobre a amostra e um detector de Estado Sólido de Energia Dispersiva foi feita a análise pontual, de linha, coluna, área selecionada ou área total (conforme foi necessário) de elementos químicos presentes na amostra. O detector está acoplado ao MEV de bancada, modelo TM-1000 da marca Hitachi.

A base para determinação da composição dos elementos químicos presentes é a lei de Moseley, equação 2, em homenagem ao físico inglês Henry Gwyn Jeffreys Moseley.

$$\sqrt{f} = k_1 \cdot (Z - k_2) \quad (2)$$

onde:

f - é a frequência de emissão da linha $K\alpha$

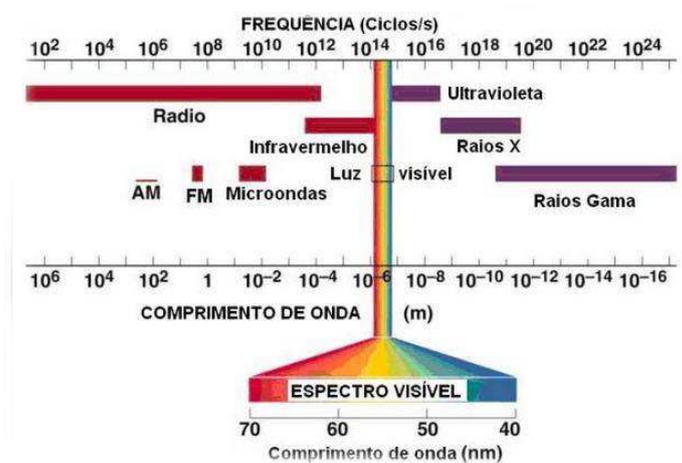
k_1 e k_2 - são constantes que dependem do tipo de linha

Z - número atômico do elemento.

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

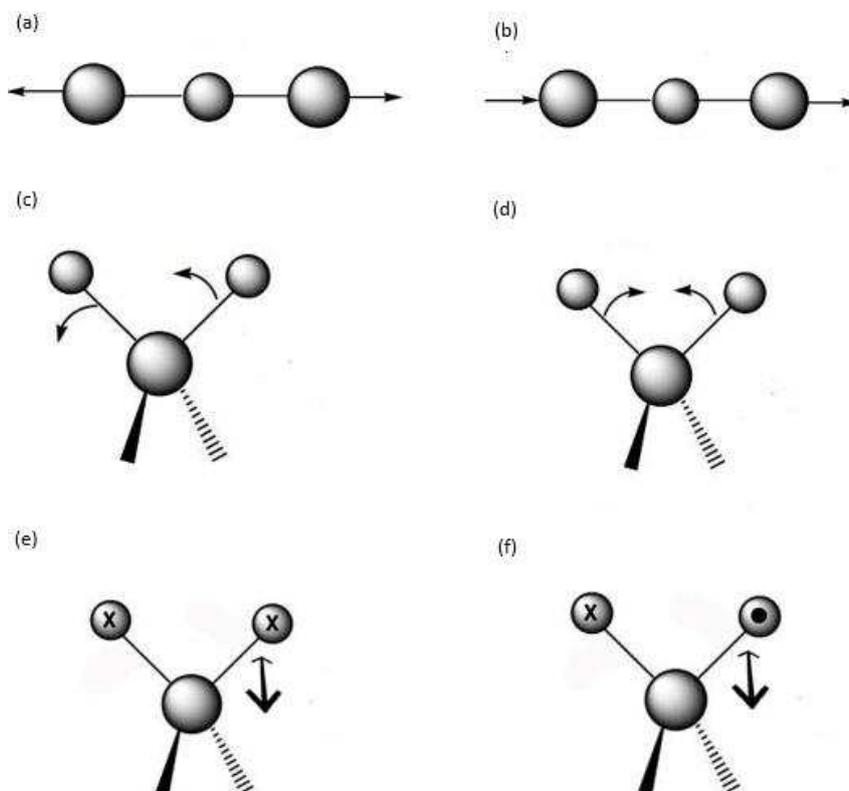
O espectro eletromagnético compreende o intervalo completo de ondas eletromagnéticas que vão desde os raios cósmicos até as ondas de rádio. (Figura 25). Estas ondas são formadas por campos elétricos e magnéticos oscilantes e perpendiculares entre si e também perpendiculares à direção em que a onda se propaga, além de ser capazes de se propagarem no vácuo. Os vários tipos de ondas do espectro diferenciam-se no seu comprimento e conseqüentemente na frequência e energia (TIPLER, 2009).

Figura 25 - Espectro eletromagnético.



A faixa entre 0,7 a 1000 μm corresponde à região do infravermelho que ao interagir com a matéria alteram os níveis vibracionais de uma ligação covalente. As vibrações podem ser de dois tipos: deformações axiais e deformações angulares (Figura 26). As primeiras ocorrem ao longo do eixo da molécula aumentando ou diminuindo a distância interatômica alternadamente e recebem a denominação de estiramento simétrico e assimétrico. No segundo caso, ocorre o movimento de um conjunto de átomos em relação à molécula, sem alteração das posições relativas do mesmo dentro do grupo. As deformações angulares também podem ser simétricas e assimétricas no plano ou fora dele. Normalmente a unidade de medida de absorção utilizada é em número de ondas, representada por cm^{-1} (MUCHA, 2003).

Figura 26 - Deformações axiais simétricas (a), assimétricas (b), angulares simétricas (c) e assimétricas (d) no plano e fora do plano (e,f). Os sinais X e • indicam movimentos para dentro e para fora do plano do papel, respectivamente.



Fonte: <http://pt.slideshare.net/sunnykareilly/espectroscopia-em-iv-e-uv>

A técnica de FTIR foi utilizada para caracterizar os materiais, quitosana, tripolifosfato, 1,4-Naftoquinona e arcabouços confeccionados. Esta caracterização foi realizada em um espectrômetro modelo Spectrum 400 da Perkin Elmer e teve como objetivo identificar as bandas características dos grupos funcionais presentes nas matérias primas utilizadas nesta pesquisa, utilizando a faixa de varredura de 4000 a 600 cm^{-1} (FOOK, 2012).

4.3.7.5 Análise Térmica

Análise Térmica consiste num conjunto de técnicas que são utilizadas para medir as propriedades físicas ou químicas de uma substância em função da temperatura ou tempo, enquanto a substância é submetida a um programa controlado de temperatura (IONASHIRO, 1988).

A Tabela 4 abaixo apresenta as diferentes técnicas de Análise Térmica com as respectivas propriedades físicas medidas.

Tabela 4 - Classificação das Técnicas Termoanalíticas.

Propriedade Medida	Técnicas	Abreviatura
Massa	Termogravimetria	TG
	Detecção de gás desprendido.	EDG
	Análise de gás desprendido.	EDA
Temperatura	Determinação da curva de aquecimento. Análise térmica diferencial.	DTA
Entalpia	Calorimetria exploratória diferencial (a).	DSC
Dimensões	Termodilatometria.	
Características Mecânicas	Análise termomecânica. Termomecanometria dinâmica.	TMA DMA
Características Acústicas	Termossonimetria. Termoacustimetria.	TS
Características Ópticas	Termoptometria.	TO

Características Elétricas	Termoeletrometria	TE
Características Magnéticas	Termomagnetometria.	TM

Fonte: ABRATEC, (1988).

No presente trabalho foi utilizado a curva termogravimétrica e sua derivada (DTG), com os seguintes parâmetros: massa 4,2 mg; razão de aquecimento 10°C/m; atmosfera dinâmica de nitrogênio com fluxo de 20ml/m e range de aquecimento de 25 a 500°C.

4.3.7.6 Grau de Intumescimento.

Este ensaio teve como objetivo avaliar o comportamento do material quando imerso em uma solução com características semelhantes ao meio interno do organismo. Trata-se de um experimento de grande importância uma vez que a absorção de líquido pelo material pode ser um fator importante na liberação do fármaco.

Para execução do ensaio, foram cortados, com auxílio de bisturi, 10 cubos com aresta de 0,5 cm dos arcabouços de Q, QT, QN e QNT. Cada cubo, com área de superfície de 1,5 cm² e volume de 0,125 cm³ foi pesado em balança analítica digital antes da imersão em solução de PBS (*Phosphate Buffered Saline*). Posteriormente, os cubos foram imersos em solução de PBS por um período de 24h. Em sequência, foram removidos da solução e o peso úmido de cada fragmento foi medido na mesma balança. O cálculo do grau de intumescimento (em porcentagem) foi realizado segundo a equação 3.

$$GI\% = \left(\frac{M_f - M_0}{M_0} \right) \times 100 \quad (3)$$

onde:

GI% – Grau de intumescimento em porcentagem

M_f – Massa intumescida

M₀ – Massa seca

4.3.7.7 Degradação Enzimática *in vitro*

Este ensaio foi utilizado com base nas normas ASTM F1635-04 *Standard Test Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants* (2009) e a ASTM F2103-01 *Standard Guide for Characterization and Testing of Chitosan Salts as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue-Engineered Medical Products Applications* (2007).

Para realização desse estudo, as amostras com geometria cúbica de 0,5 cm de aresta, área de superfície de 1,5 cm² e volume de 0,125 cm³, foram divididas em dois grupos: no primeiro grupo os arcabouços foram imersos em solução de lisozima/*Phosphate Buffered Saline* – PBS (constituída por NaCl, KCl, Na₂HPO₄ e KH₂PO₄ ou NaH₂PO₄) com concentração de 1,5 mg/ml, e no segundo grupo foi utilizado apenas a solução de PBS, para controle (FOOK, 2012).

Foram preparadas 120 amostras dos arcabouços de Q, QT, QN e QNT, divididas em 03 grupos de 40 amostras cada, para submersão em PBS e PBS/Lisozima durante 7, 14 e 21 dias (Tabela 5), buscando reproduzir os ciclos de quimioterapia no tratamento do câncer. Antes da imersão, os cubos foram pesados em balança analítica, imersos na solução e colocados na estufa a 37°C. Ao final de 7 dias, o 1º grupo foi removido da estufa, lavado em água destilada, congelado no ultra freezer a -70°C, liofilizado por 72h e novamente pesados. No segundo e terceiro grupos, as soluções de PBS e PBS/lisozima foram trocadas por novas soluções com a mesma composição e novamente acondicionados na estufa à mesma temperatura. Após 14 dias, o segundo grupo foi removido da estufa, seguindo o procedimento aplicado ao 1º grupo. A solução (PBS e PBS/lisozima) do 3º grupo foi trocada por novas soluções e novamente acondicionada na estufa por mais 7 dias. Por fim, após 21 dias, o último grupo foi processado da mesma forma dos demais grupos. O cálculo da perda de massa (em porcentagem) foi determinado pela expressão abaixo (equação 4):

$$PM\% = \left(\frac{M_0 - M_f}{M_0} \right) \times 100 \quad (4)$$

onde:

PM% – Perda de massa em percentagem

M_0 – Massa inicial

M_f – Massa final

Tabela 5 – Grupos de amostras para degradação enzimática *in vitro*.

ARCABOUÇO	PERÍODO					
	7 DIAS		14 DIAS		21 DIAS	
	PBS	PBS + LISOZIMA	PBS	PBS + LISOZIMA	PBS	PBS + LISOZIMA
Q	05*	05	05	05	05	05
QT	05	05	05	05	05	05
QN	05	05	05	05	05	05
QNT	05	05	05	05	05	05

*Número de Amostras

4.3.8 Análise de dados

Para construção dos gráficos e verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) (HOLANDA, 2011). Os softwares estatísticos utilizados foram o *Statistica for Windows*®, versão 10.0 e *Origin*®, versão 9.0, instalados em um microcomputador Itautec modelo N8775.

CAPÍTULO 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO



Grupo de Biomateriais
UFCG | UAEMa

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos Arcabouços de Quitosana (Q), Quitosana/Tripolifosfato (QT), Quitosana/1,4 – Naftoquinona (QN) e Quitosana/Tripolifosfato/1,4 – Naftoquinona (QNT)

5.1.1 Aspecto Macroscópico

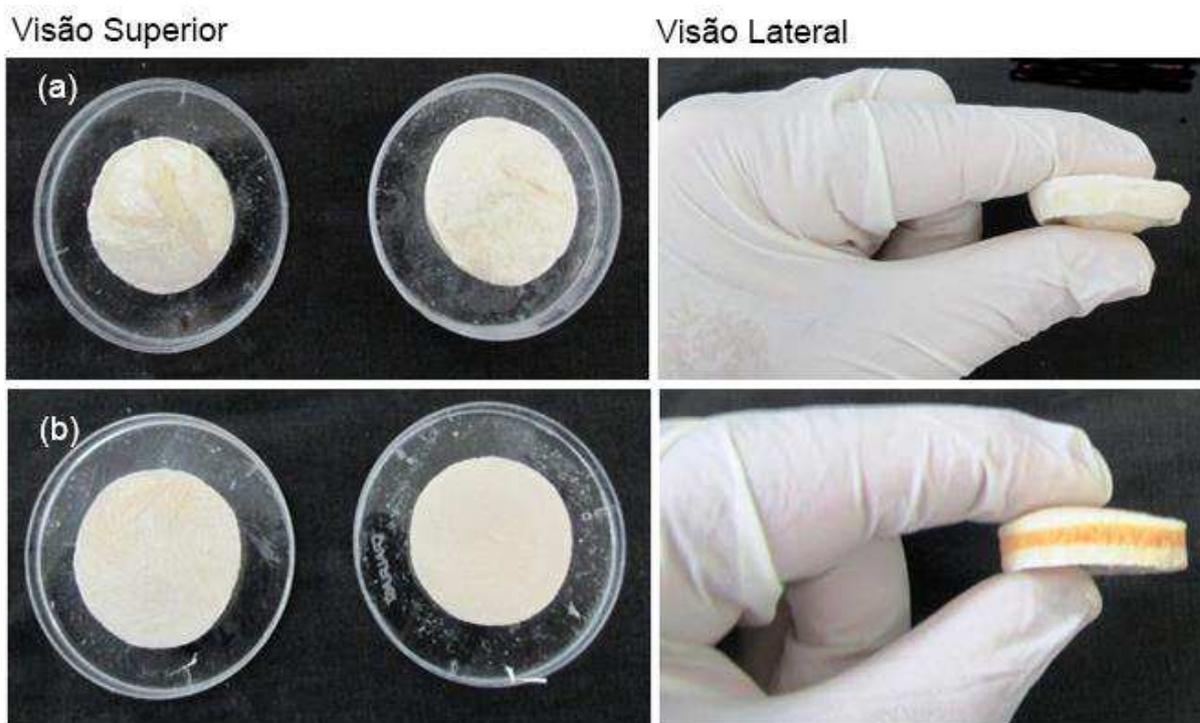
Nas Figuras 27 e 28 observam-se os arcabouços de Q, QT, QN, e QNT após a liofilização e neutralização. Evidenciou-se uma superfície irregular nos arcabouços de quitosana (visão superior) e uma faixa alaranjada no centro dos arcabouços contendo o fármaco ou nas extremidades dos arcabouços com inversão de camadas, sendo um indício da incorporação da Naftoquinona na matriz de quitosana. Estes dados estão coerentes com a coloração da solução de quitosana com o fármaco apresentada na metodologia.

Figura 27 - Arcabouços de quitosana (a), quitosana/1,4 – Naftoquinona (b).



Fonte: Do Autor.

Figura 28 - Arcabouço de quitosana/tripolifosfato (a) e quitosana /tripolifosfato/ 1,4 - Naftoquinona (b).



Fonte: Do Autor.

Os arcabouços QNI (Figura 29), conforme descrito em matérias e métodos, ainda serão caracterizados e seus dados apresentados em trabalhos futuros.

Figura 29 - Arcabouços de quitosana com 1,4 - Naftoquinona com camadas invertidas.



Fonte: Do Autor.

Uma das características bastante evidente foi a diferença de tamanho entre os arcabouços Q, QT, QN e QNT reticulados e não reticulados, evidenciado pelas diferenças de diâmetros e volumes entre estas duas condições (Figura 30).

Figura 30 -Medidas dos diâmetros (cm) dos arcabouços de Q (a), QT (b), QN (c) e QNT (d).



Fonte: Do Autor.

Através da medida de massa e o cálculo dos volumes e densidades dos arcabouços reticulados (Equação 5 e 6) foi possível demonstrar uma redução de aproximadamente 50% do volume dos mesmos com conseqüente aumento de densidade (Tabela 6).

Equação 5: Cálculo do Volume

$$V = \pi r^2 \times h$$

onde:

V – Volume

r – raio

h – espessura

Equação 6: Cálculo da Densidade

$$D = m/v$$

onde:

D = densidade

m = massa

v = volume

Tabela 6 - Densidade dos arcabouços.

Arcabouço	Massa (g)	Volume (cm³)	Densidade (g/cm³)
Quitosana	0,5280	13,99	0,04
Quitosana + Tripolifosfato	0,6914	6,43	0,11
Quitosana + 1,4 - Naftoquinona	0,6501	19,17	0,03
Quitosana + 1,4 - Naftoquinona + Tripolifosfato	0,8214	7,61	0,11

Fonte: Do Autor.

Provavelmente, a redução do volume decorre da ação reticuladora do tripolifosfato nos arcabouços de quitosana e quitosana/fármaco. Além disso, pôde-se observar maior resistência a compressão manual dos arcabouços reticulados quando comparado aos demais. O aumento de densidade também foi observado por Fernandes (2009), trabalhando com a reticulação de um compósito de poli(dimetilsiloxano).

5.1.2 Difração de Raios X

As Figuras de 31 a 37 ilustram os difratogramas dos pós da quitosana, 1,4 – naftoquinona, tripolifosfato e dos arcabouços de Q, QT, QN e QNT. Analisando os difratogramas observa-se que o TPP e a 1,4 Naftoquinona apresentam picos no intervalo $2\theta = 10 - 70^\circ$ (Figura 32) e $2\theta = 10 - 60^\circ$ (Figura 33) com grau de cristalinidade de 86,81 e 60,18%, respectivamente. Este fato evidencia a estrutura cristalina apresentada pelos dois compostos (BOU *et al.*, 2000). Entretanto, a quitosana na forma de pó apresenta 2 picos largos em $2\theta = 10^\circ$ e 20° (Figura 31) aproximadamente, grau de cristalinidade de 8,49%, evidenciando

a estrutura semicristalina do polímero (MANSUR, 2008; AZEVEDO, 2007; SOUZA, 2009).

Figura 31 - Difratoograma da quitosana em pó.

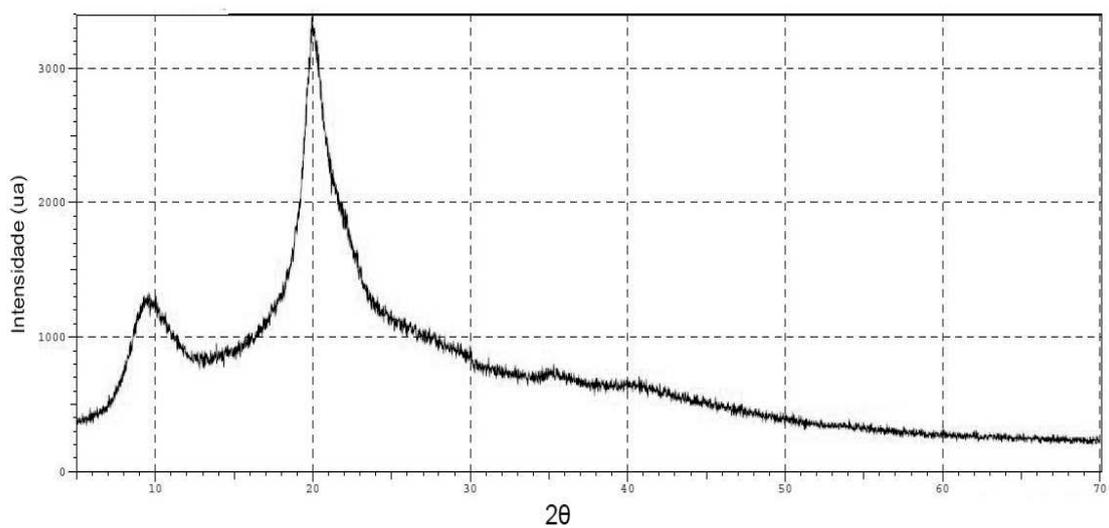


Figura 32 - Difratoograma da Naftoquinona em pó.

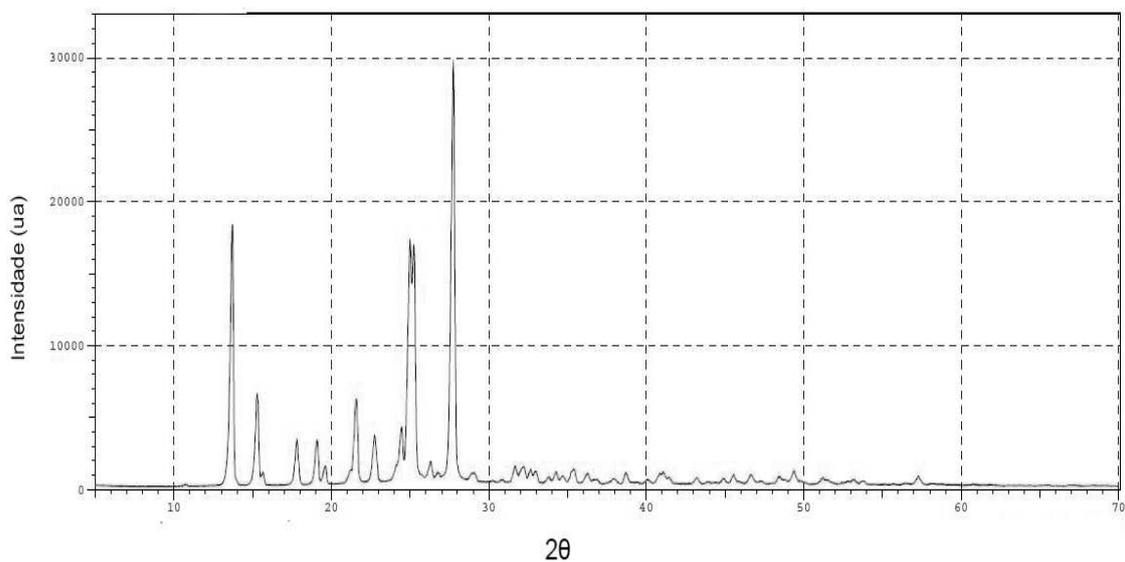
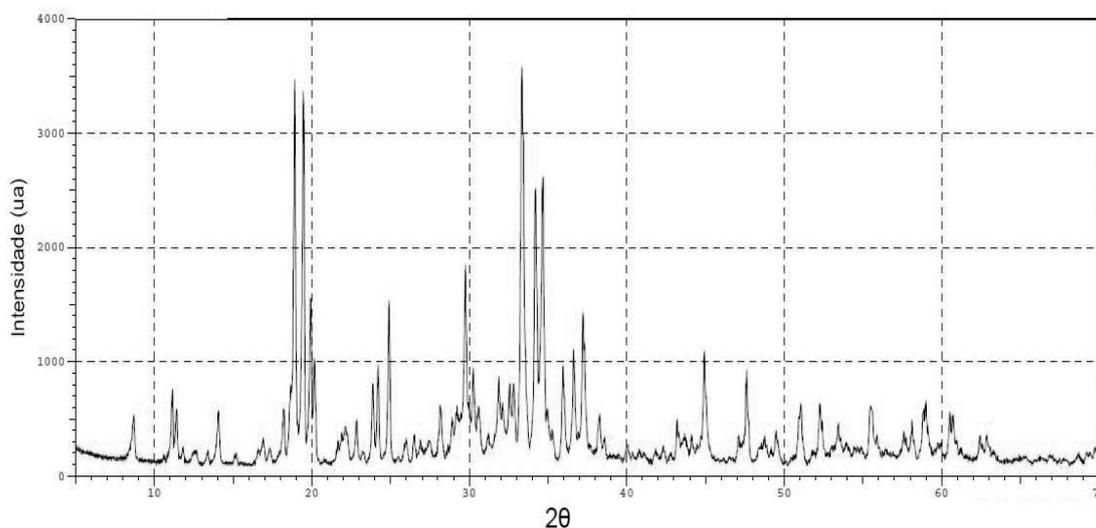


Figura 33 - Difratoograma TPP em pó.



Com relação aos arcabouços, o de quitosana (Q) também apresenta dois picos de forma semelhante à quitosana em pó, embora o primeiro com menor intensidade e grau de cristalinidade de 4,5% (Figura 34). Já o de quitosana com tripolifosfato (QT) apresentou um difratoograma com um pico largo em aproximadamente $2\theta = 24^\circ$ e grau de cristalinidade de 2,87%, evidenciando a diminuição da cristalinidade da quitosana ocasionada pelo agente reticulante (Figura 35), corroborando com a pesquisa de Laus *et al.* (2006), que trabalhou com microesferas de quitosana reticulada com TPP de Fook (2012) que trabalhou com o polímero reticulado com glutaraldeído e procianidinas.

Figura 34 - Difratoograma do arcabouço Q.

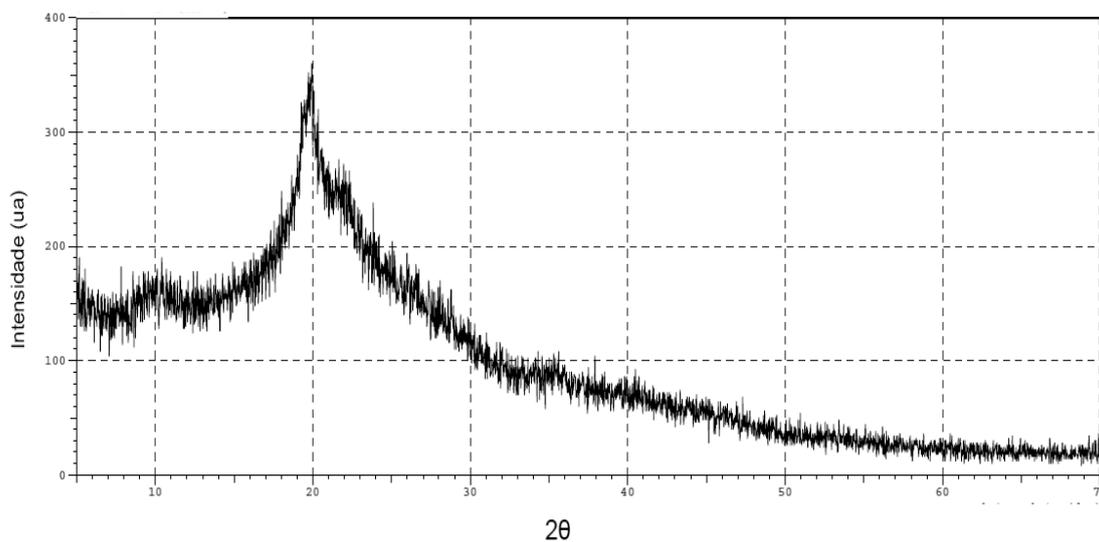
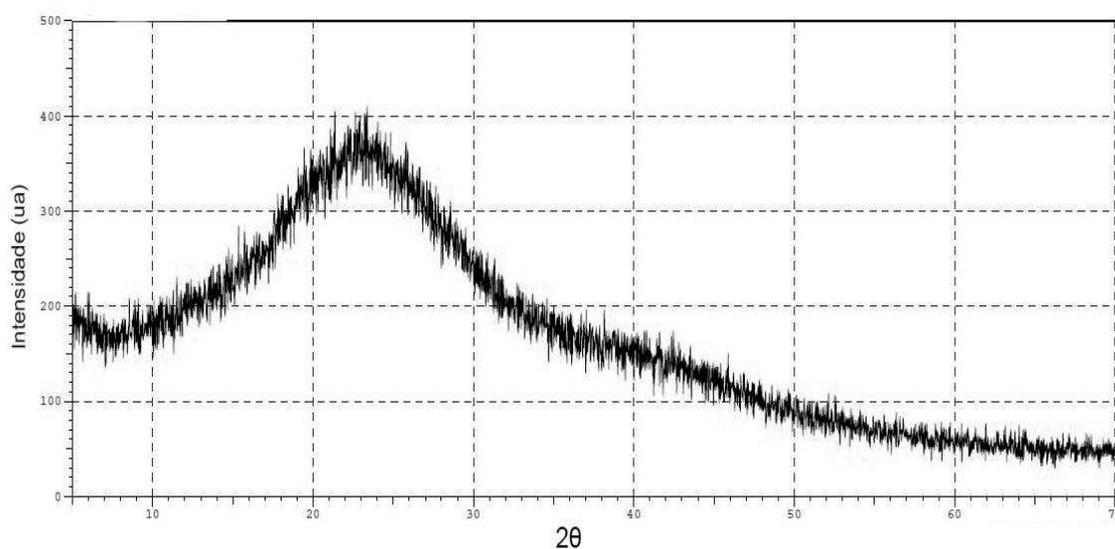


Figura 35 - Difratoograma do arcabouço QT.



O arcabouço de quitosana com Naftoquinona (QN) apresenta dois picos largos em $2\theta = 10$ e 20° (Figura 36) menos intensos do observado no arcabouço de quitosana e grau de cristalinidade de 2,04 %, demonstrando a influência do fármaco na matriz polimérica. Por fim, o conjunto quitosana/TPP/1,4 –

Naftoquinona (QTN) ilustra um pico em $2\theta = 20^\circ$ e grau de cristalinidade de 2,54% (Figura 37), indicando uma possível competição entre o fármaco e o TPP pelos mesmos sítios de ligação. Estes dados são relevantes uma vez que a cristalinidade é um dos fatores que influencia a velocidade de degradação enzimática da quitosana (HOLANDA, 2011). O grau de cristalinidade de todos os materiais foi calculado automaticamente pelo software que acompanha o Difratorômetro de Raios X.

Figura 36 - Difratorograma do arcabouço QN.

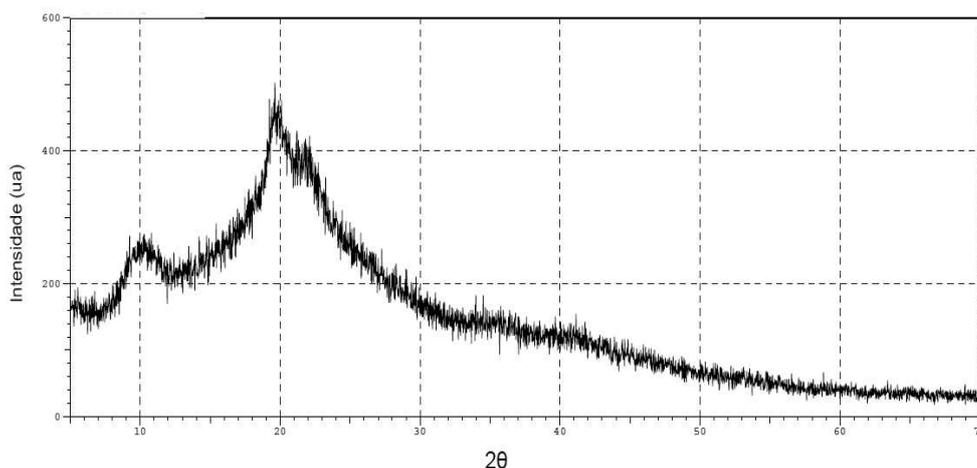
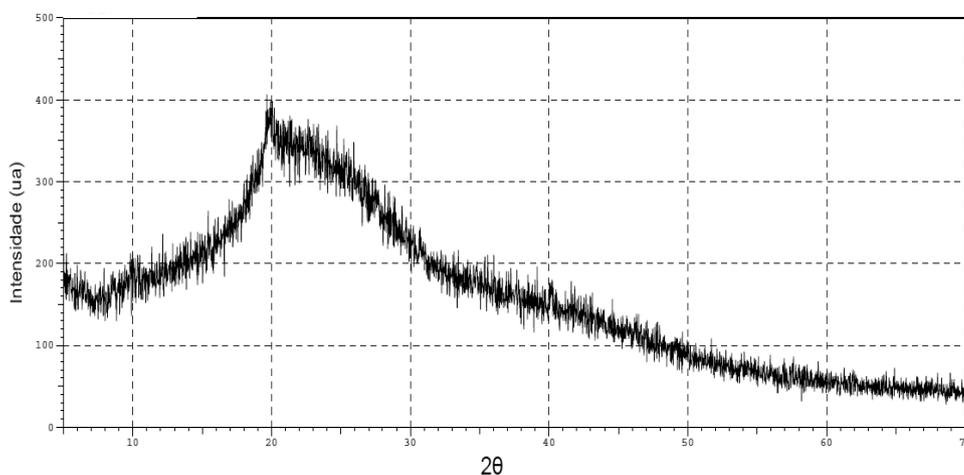


Figura 37 - Difratorograma do arcabouço QTN.



5.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e EDS.

Nas Figuras 38 a 41 observam-se as micrografias das superfícies e cortes transversais dos arcabouços de Q, QT, QN e QNT (500 X) respectivamente, onde se evidencia uma estrutura porosa na superfície e uma região transversal lamelar com a mesma característica porosa em todas as micrografias, indicando a presença de poros intercomunicantes. Estas observações estão de acordo com os trabalhos de Fook (2012), Azevedo (2007) e Fávère (2009).

Ao lado de cada micrografia está ilustrado o gráfico de barras com a composição química elementar de alguns pontos da superfície e região de corte, de cada arcabouço.

Figura 38 - Micrografia Eletrônica da Superfície (a), Corte (b) e EDS do Arcabouço de Quitosana.

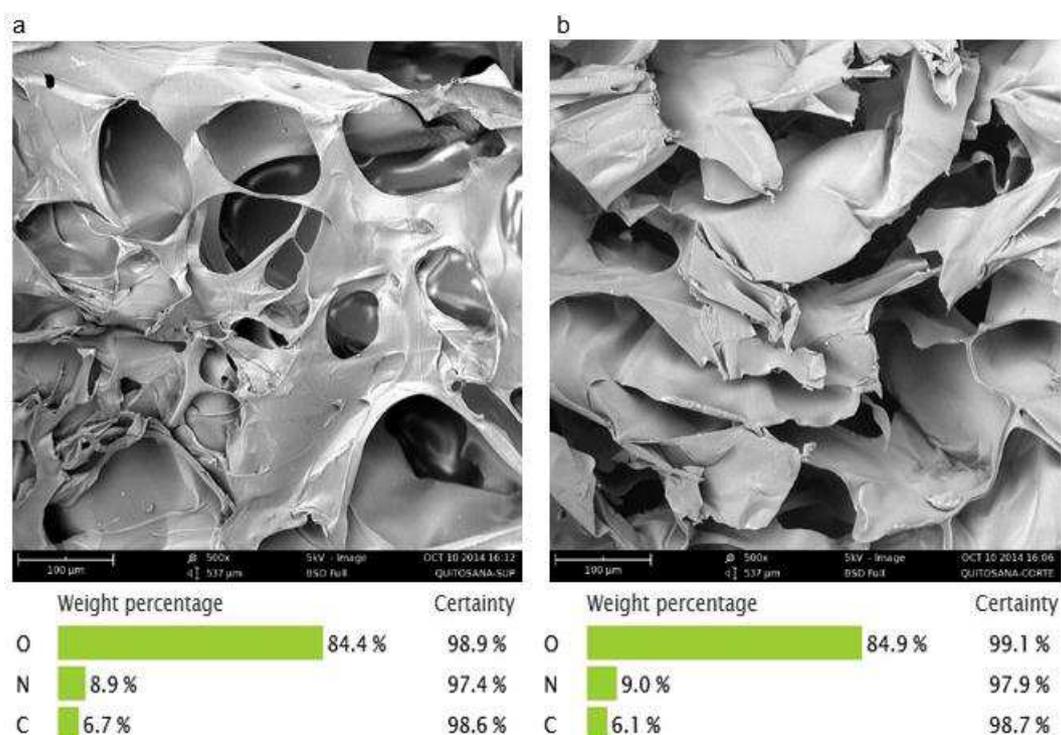


Figura 39 - Micrografia Eletrônica da Superfície (a), Corte (b) e EDS do Arcabouço de Quitosana com Tripolifosfato de Sódio.

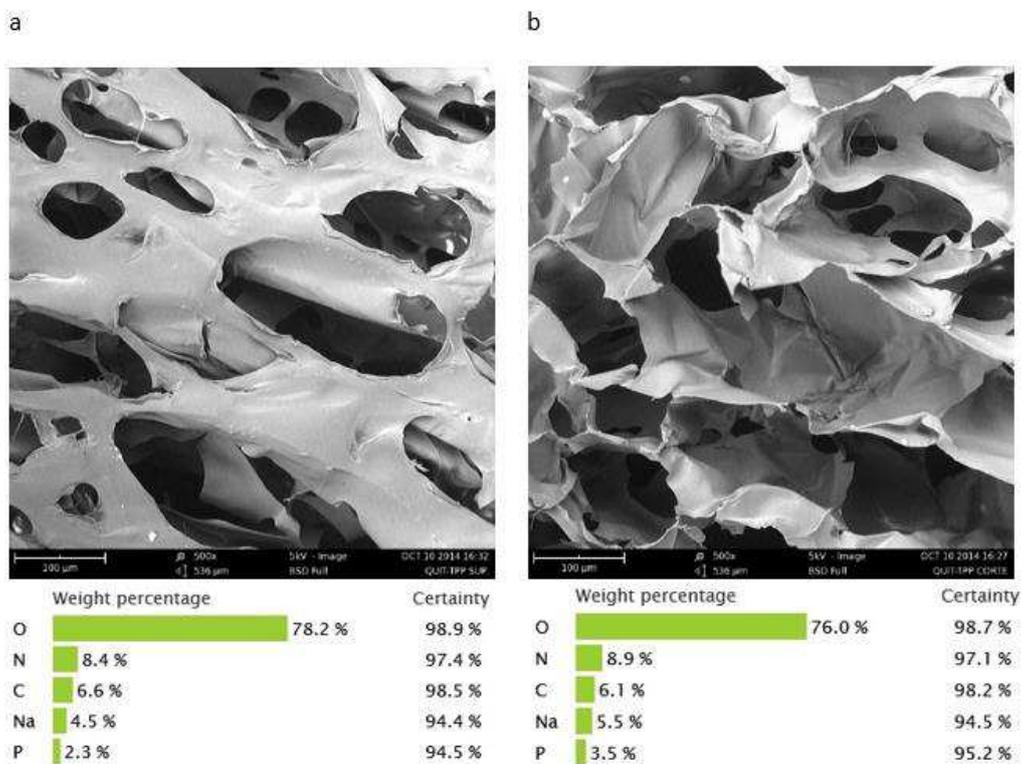


Figura 40 - Micrografia Eletrônica da Superfície (a), Corte (b) e EDS do Arcabouço de Quitosana com 1,4 – Naftoquinona.

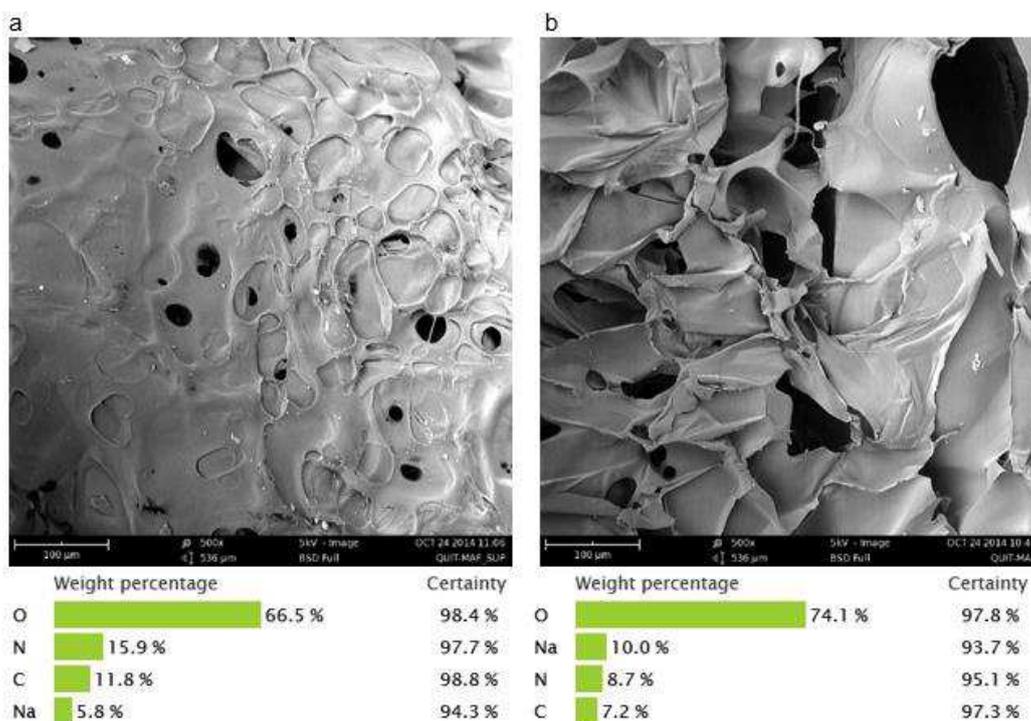
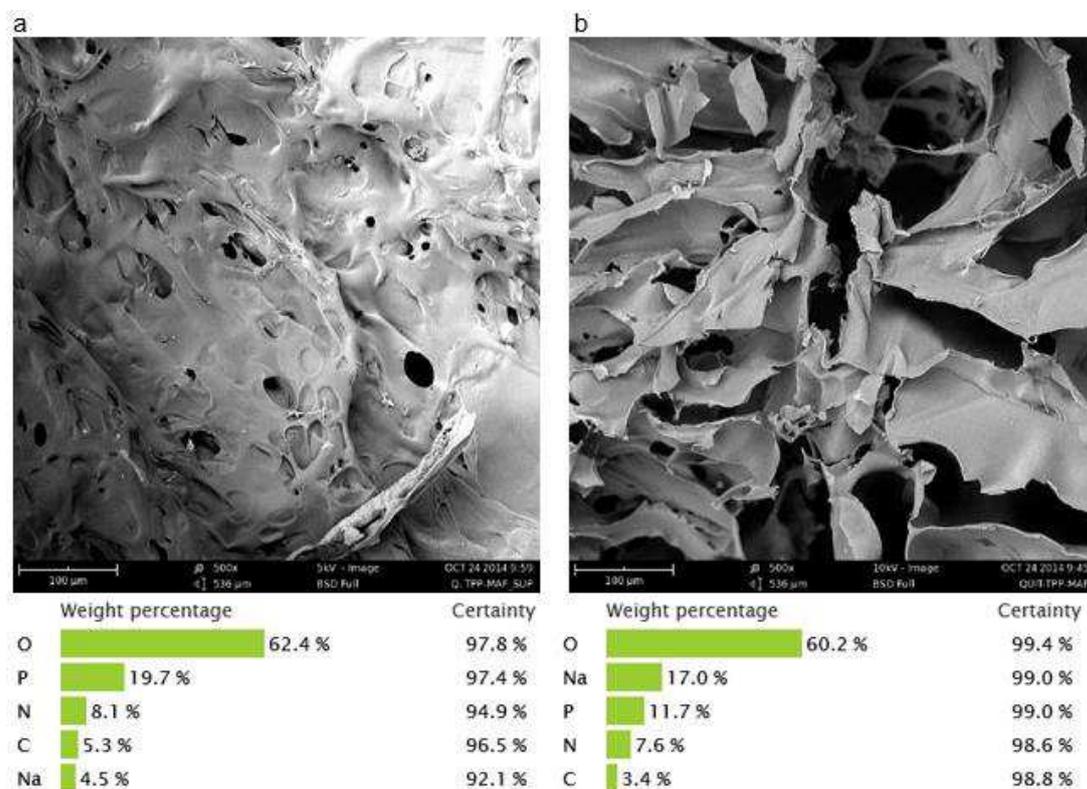


Figura 41 - Micrografia Eletrônica da Superfície (a), Corte (b) e EDS do Arcabouço de Quitosana com 1,4 – Naftoquinona e Tripolifosfato de Sódio.



A porosidade evidenciada em todos os arcabouços é de grande importância para um sistema de liberação de fármacos, permitindo a penetração de fluidos biológicos na matriz polimérica, facilitando a difusão dos fármacos para o meio (FÁVERE, 2009).

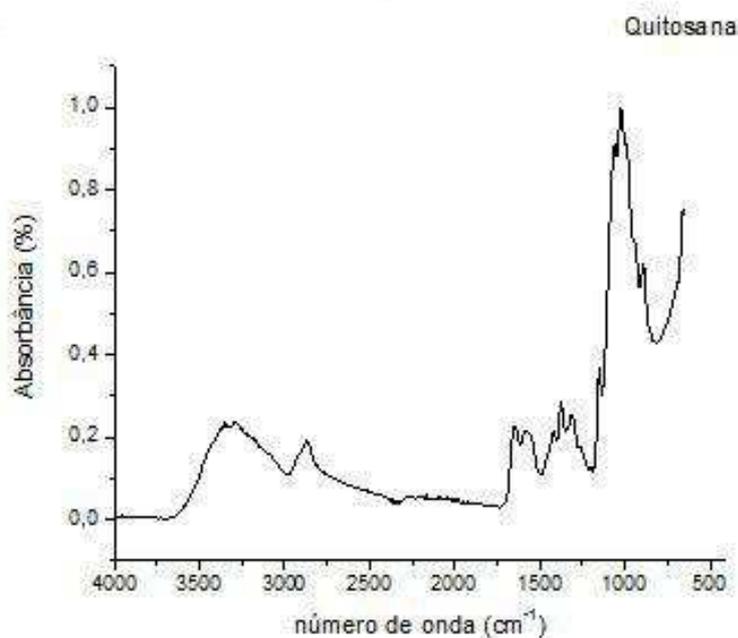
A caracterização por EDS demonstrou a presença dos elementos químicos presentes na quitosana (O, C, e N) e, no caso dos arcabouços reticulados, a presença do fósforo. Outro dado relevante é um maior percentual de oxigênio na região de corte dos arcabouços com 1,4 – Naftoquinona, reforçando a probabilidade do mesmo ter sido incorporado. Entretanto, em alguns arcabouços, observa-se a presença do sódio, elemento que não faz parte da estrutura química da quitosana nem da Naftoquinona, decorrendo possivelmente da presença de resíduos da solução de NaOH que ficaram impregnados nos arcabouços.

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

Os espectros do pó de quitosana, tripolifosfato, 1,4 - Naftoquinona e dos arcabouços estão apresentados na Figura 42 a 48. Ao analisar o FTIR do pó de quitosana (Figura 42) pode-se observar a presença das bandas características de absorção em 3353, 2933 e 2873 cm^{-1} decorrente das vibrações de estiramento dos grupos funcionais $-\text{OH}$, $-\text{CH}_2$ e CH_3 (FIDELES, 2010; MARTINÉZ-CAMACHO *et al.*, 2010), o agrupamento amino, com banda de absorção na região de 3400 e 3500 cm^{-1} , foi provavelmente sobreposto pelo grupo $-\text{OH}$ decorrentes da formação de pontes de hidrogênio intermoleculares (FIDELES 2010; LIMA, 2010).

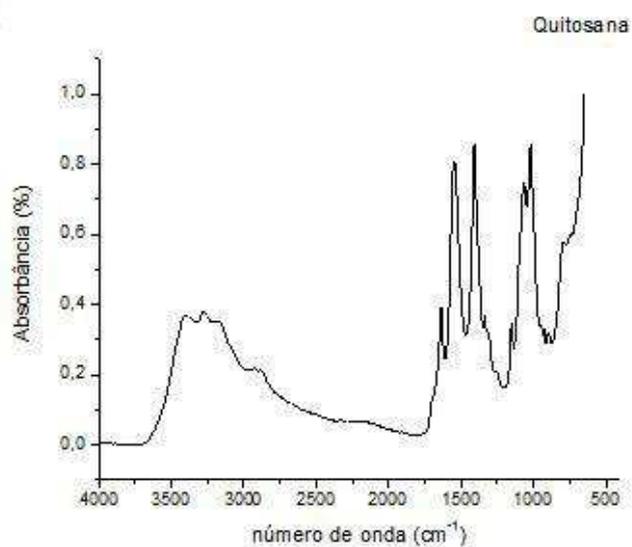
Ainda apresenta as bandas de absorção 1650 e 1575 cm^{-1} decorrem da vibração de estiramento da ligação $-\text{C}=\text{O}$ e à deformação da ligação N-H, respectivamente. A presença dessas duas bandas (C=O e N-H), em conjunto, indica a presença de grupos acetamidos (AROF: OSMAN, 2003) uma vez que a quitosana não está 100% desacetilada, apresentando grupos cetoamidos, característica da quitina. A banda de absorção em 1378 cm^{-1} é característica da deformação angular simétrica dos grupos metil (CH_3) do grupo acetamido (KOLHE; KANNAM, 2003; TORRES *et al.*, 2005), confirmando a desacetilação parcial da quitosana (SIONKOWSKA *et al.*, 2004). As bandas de absorção na região de 1152 e 895 cm^{-1} correspondem ao estiramento das ligações C-O-C e a absorção de 1057 e 1027 cm^{-1} (vibrações de estiramento do grupo C-O) são características da estrutura sacarídica da quitosana (MINCHEVA *et al.*, 2004).

Figura 42 - FTIR da quitosana (pó).



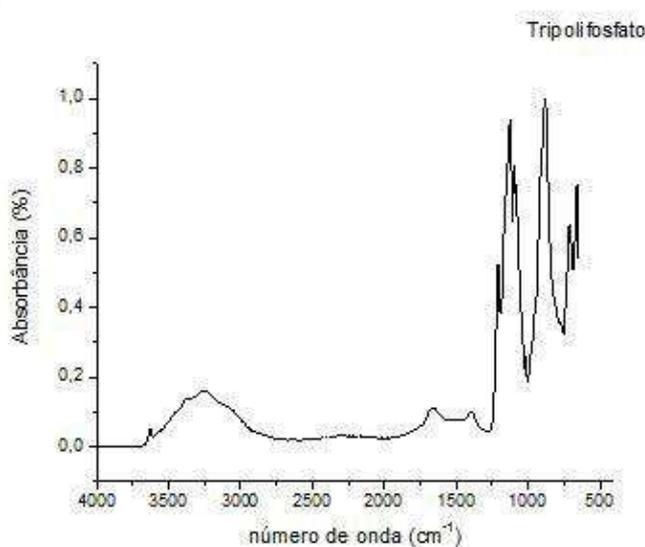
Analisando o FTIR do arcabouço de quitosana (Figura 43), percebe-se duas bandas intensas no espectro em torno de 1557cm⁻¹ e 1407 cm⁻¹, as quais de acordo com Barbosa (2007), são características das vibrações (-COO-) referentes a um sal de ácido carboxílico, no caso, o acetato de quitosana.

Figura 43 - FTIR do arcabouço de quitosana.



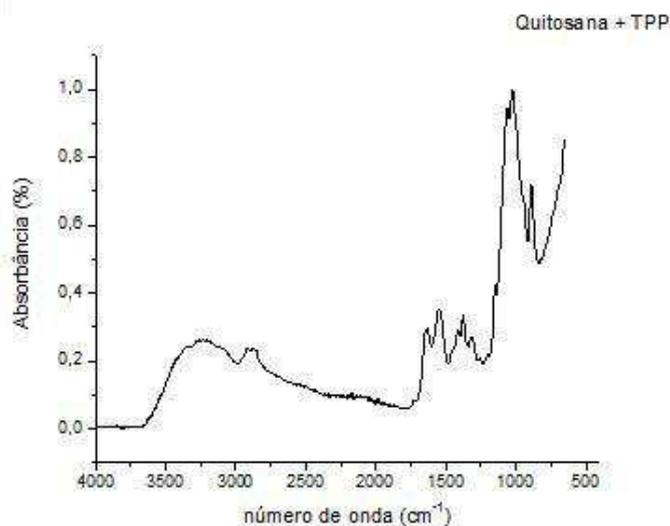
Avaliando o espectro do TPP (pó) (Figura 44) observam-se bandas de alta intensidade em 888, 1095, 1137 e 1210 cm^{-1} , correspondendo ao estiramento assimétrico P - O - P, estiramento simétrico e assimétrico do grupo PO_3 , estiramentos axiais assimétricos e simétricos do grupo PO_2 e estiramento simétrico do grupo P=O, respectivamente.

Figura 44 - FTIR do tripolifosfato em pó.



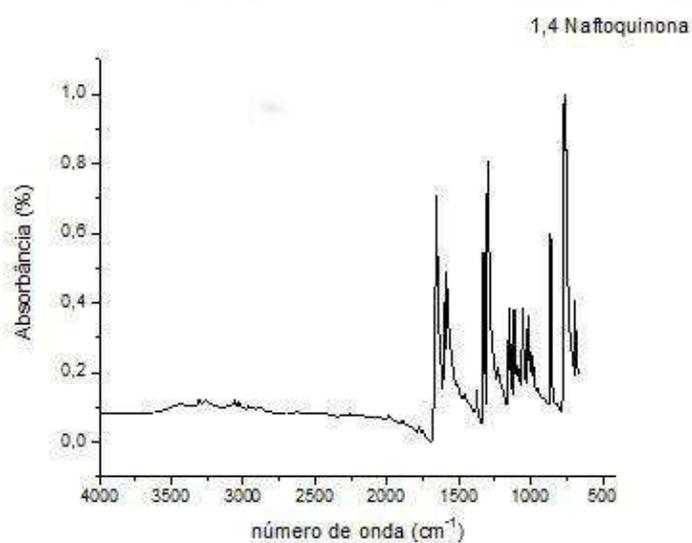
Analisando o arcabouço QT (Figura 45), observa-se uma redução no espectro entre 1557 cm^{-1} e 1407 cm^{-1} que provavelmente decorre da reticulação do arcabouço pelo TPP, interagindo com os grupos NH_3 . Observa-se ainda bandas correspondentes aos grupos P - O - P, PO_3 , PO_2 e P=O, descritos no FTIR do Tripolifosfato.

Figura 45 - FTIR do arcabouço de quitosana + TPP.



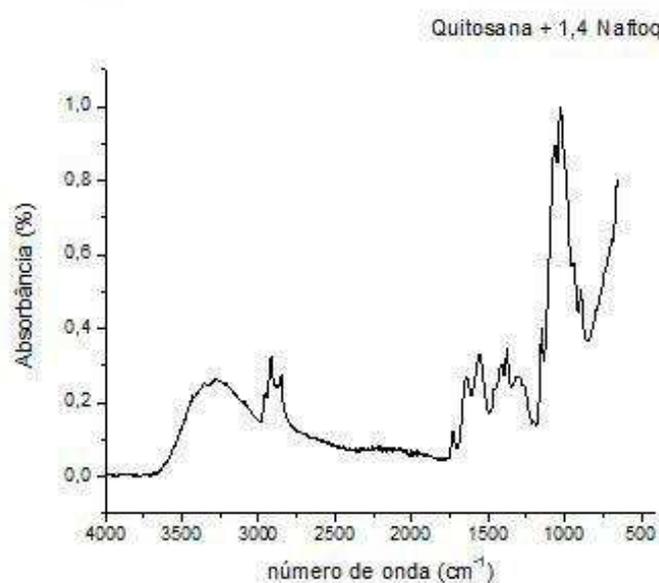
Avaliando o espectro da 1,4 Naftoquinona (Figura 46) em pó observa-se a presença de várias bandas entre 600 e 1750 cm^{-1} . Entre 1600 e 1720 cm^{-1} decorre do estiramento dos grupos carbonila ($\text{C}=\text{O}$) presentes nas posições 1 e 4 como também $\text{C}=\text{C}$ presente na estrutura do fármaco. As demais bandas resultam da deformação angular fora do plano dos grupos $\text{C}-\text{H}$ (SILVERSTEIN *et al.*, 2006)

Figura 46 - FTIR de 1,4 Naftoquinona em pó.



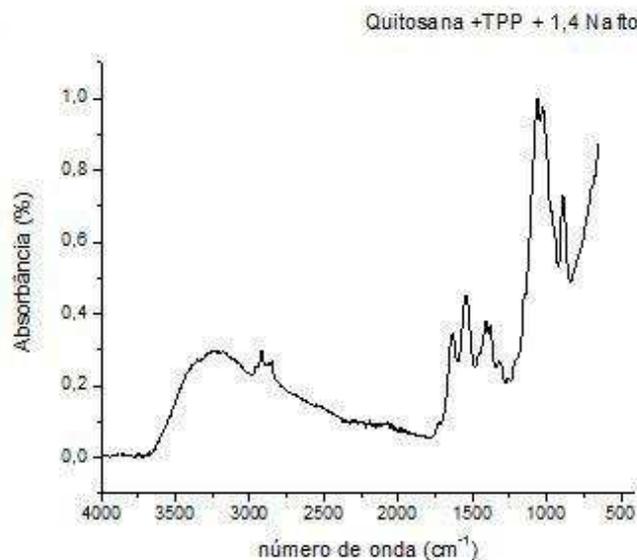
O arcabouço de QN (Figura 47) apresenta bandas entre 1250 e 1750 cm^{-1} ocasionadas provavelmente pela interação entre os grupos carbonila e os grupos NH_3^+ do polímero. Outro dado relevante é a redução da banda entre 3000 e 3500 cm^{-1} , quando comparado com o arcabouço de quitosana, resultante possivelmente da formação de pontes de hidrogênio entre os grupos carbonila e as hidroxilas do polímero.

Figura 47 - FTIR do arcabouço de quitosana + 1,4 – Naftoquinona.



Por fim, o espectro do arcabouço de QNT (Figura 48) evidencia uma elevação da intensidade da banda entre 3000 e 3500 cm^{-1} e 1250 e 1750 cm^{-1} relacionados provavelmente à competição entre TPP e o fármaco pela interação com os grupos reativos do polímero. Resultados semelhantes foram obtidos por Wu *et al.* (2005) na interação do TPP com nanopartículas de quitosana. As análises de todos os FTIRs apresentados são fortes evidências da reticulação e incorporação do fármaco pelos arcabouços. Evidencia-se ainda bandas correspondentes aos grupos P – O – P, PO_3 , PO_2 e $\text{P}=\text{O}$, descritos no FTIR do Tripolifosfato.

Figura 48 - FTIR do arcabouço de quitosana + TPP + 1,4 – Naftoquinona.



5.1.5 Análise térmica

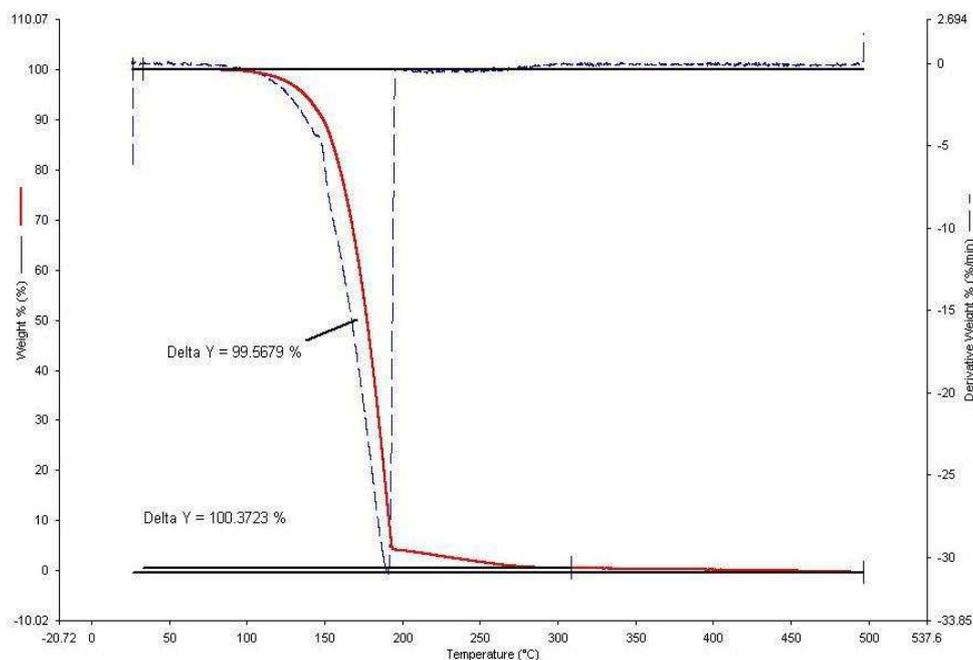
A termogravimetria é uma das técnicas de análise térmica que permite a avaliação da variação de massa de uma substância em função do tempo ou temperatura, enquanto a substância é submetida a um programa controlado de temperatura. Possui diversas aplicações inclusive na indústria farmacêutica para avaliação da estabilidade térmica dos fármacos, fases de decomposição dos mesmos entre outras (IONASHIRO *et al.*, 2008).

A DTG (derivada primeira da curva termogravimétrica, em função da temperatura ou tempo) é um tratamento matemático da curva termogravimétrica, auxiliando na interpretação da curva não só nas temperaturas inicial e final de decomposição como também na maior resolução do número de etapas em que a substância é decomposta (IONASHIRO *et al.*, 1988).

As Figuras 49 a 53 ilustram as curvas termogravimétricas do fármaco e dos arcabouços de Q, QT, QN e QNT, respectivamente, e suas derivadas. Todas as curvas foram construídas com os seguintes parâmetros: massa de 3,8 mg; atmosfera dinâmica de nitrogênio com fluxo de 20 ml/m, razão de aquecimento de 10°C/m e ranger de temperatura de 30 à 600°C.

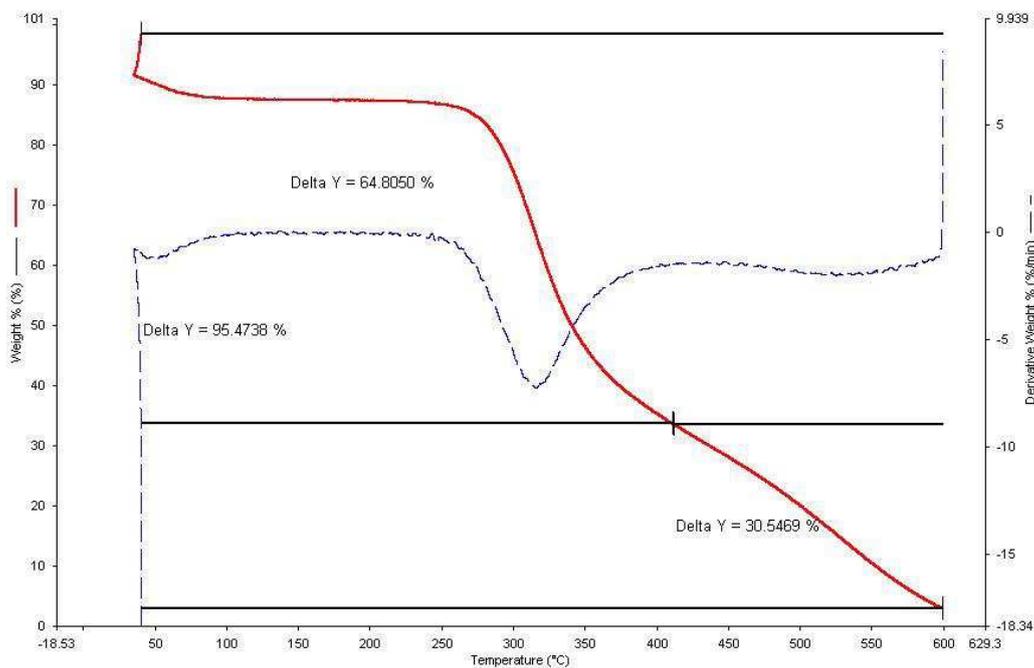
Analisando o gráfico referente ao fármaco, observa-se uma perda de massa de cerca de 99,7 % entre aproximadamente 116 à 195^oC e os restantes 3,3 % entre 195 e 312^oC (Figura 49).

Figura 49 - Curva termogravimétrica e DTG da 1,4 – Naftoquinona.



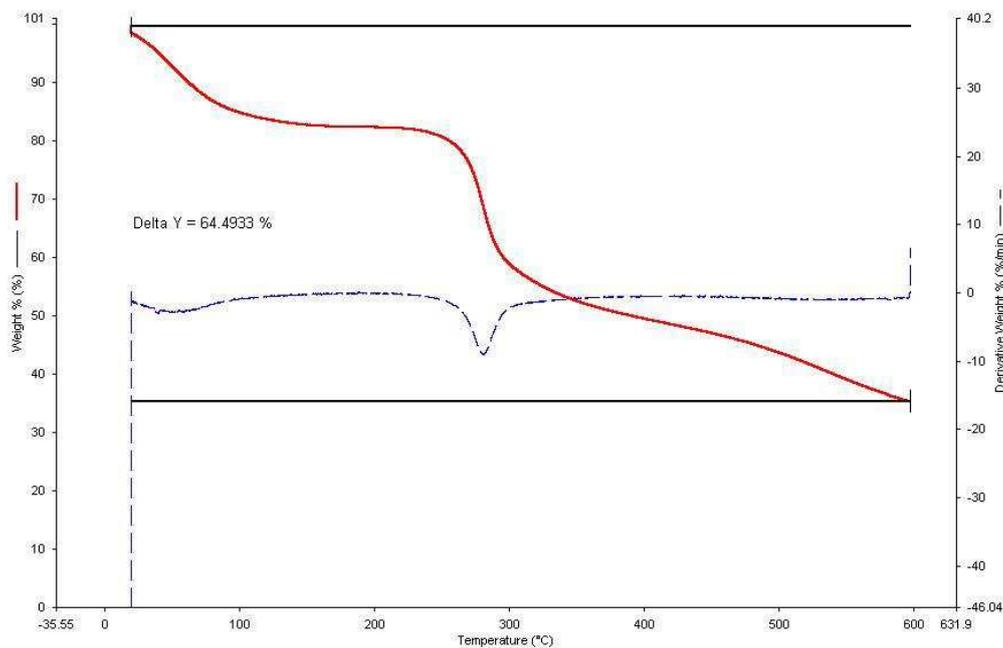
O arcabouço de quitosana apresentou uma perda inicial de aproximadamente 11,8% entre 30 à 76^oC (provavelmente pelo desprendimento de moléculas pequenas como a água ainda presente nos arcabouços após a liofilização), 54,1 % no intervalo de 234 à 413^oC, 30,5% na faixa entre 413 à 600^oC e massa residual de 3,6% em 600^oC. (Figura 50).

Figura 50 - Curva termogravimétrica e DTG do arcabouço de quitosana.



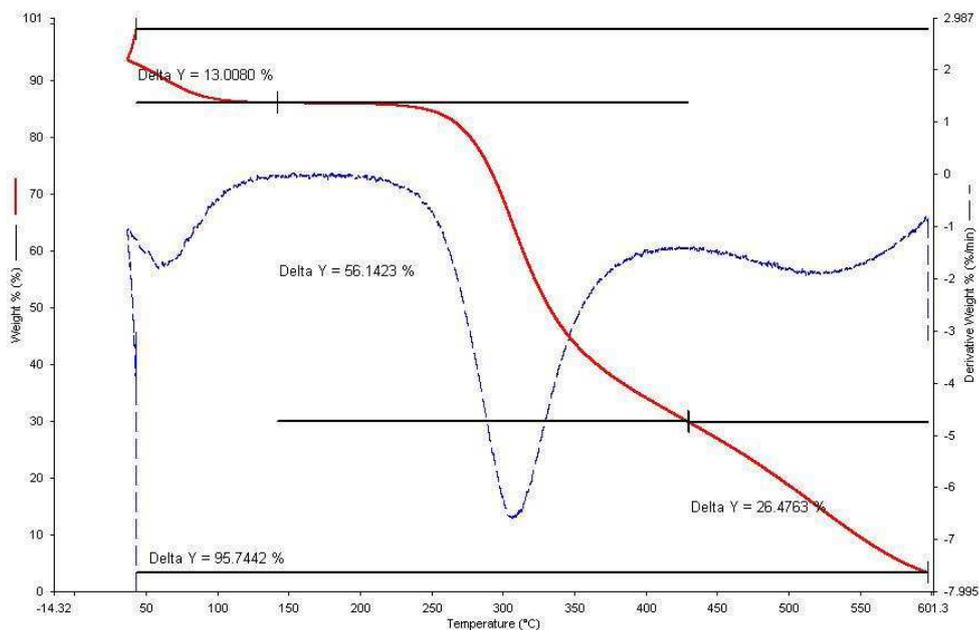
Com relação à quitosana reticulada com TPP, verificou-se uma perda inicial de 17,15% de massa entre 30 – 145^oC seguida de uma redução de 29,5% entre 192 – 346^oC, 17,7 no intervalo entre 346 e 600^oC e massa residual de 35,65% em 600^oC. A curva DTG evidencia uma taxa de decomposição mais acentuada do que o arcabouço de quitosana, apresentando, entretanto, maior massa residual (Figura 51).

Figura 51 - Curva termogravimétrica e DTG do arcabouço de quitosana + TPP.



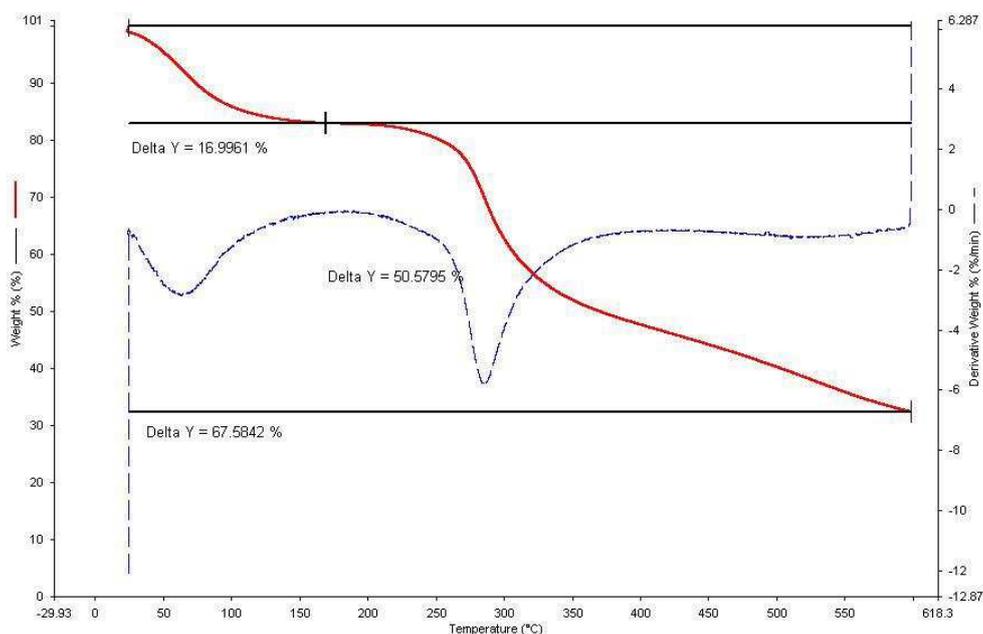
Quanto ao arcabouço de quitosana com 1,4 – Naftoquinona, houve uma perda de massa de 13 % no intervalo de 30 – 141^oC, seguida por 56,14% de perda no ranger de 212 à 429^oC, 27,64 entre 429 e 600^oC com massa residual de aproximadamente 3,32% em 600^oC (Figura 52).

Figura 52 - Curva termogravimétrica e DTG do arcabouço quitosana + 1,4 – Naftoquinona.



Por fim, o arcabouço constituído por quitosana/TPP/1,4 – Naftoquinona apresentou redução de massa de cerca de 16,99% entre 30 à 168,9°C, 50,58% no intervalo entre 200 e 600°C e massa residual de aproximadamente 32,41% aos 600°C (Figura 53).

Figura 53 - Curva termogravimétrica e DTG do arcabouço de quitosana + TPP + 1,4 - Naftoquinona.



A comparação cuidadosa das curvas dos arcabouços reticulados com os não reticulados percebe-se que, embora ocorra redução da estabilidade térmica nos primeiros, a velocidade de decomposição, após a maior perda de massa, acontece mais lentamente e a massa residual é maior.

Resultados semelhantes foram obtidos por Laus *et al.* (2006) que trabalhou com microesferas de quitosana reticuladas com TPP e Souza (2009), trabalhando com quitosana quimicamente modificada na remoção de cátions. A causa provável para o fenômeno é a redução da cristalinidade do polímero provocada pelo agente reticulante, confirmada pelos resultados apresentados pelo DRX.

Assim, a termogravimetria é extremamente importante por fornecer dados fundamentais para o acondicionamento adequado dos arcabouços e para as técnicas mais apropriadas para esterilização dos mesmos, quando forem utilizados em humanos. Além disto, comprova a reticulação dos arcabouços submetidos ao TPP.

5.1.6 Grau de Intumescimento

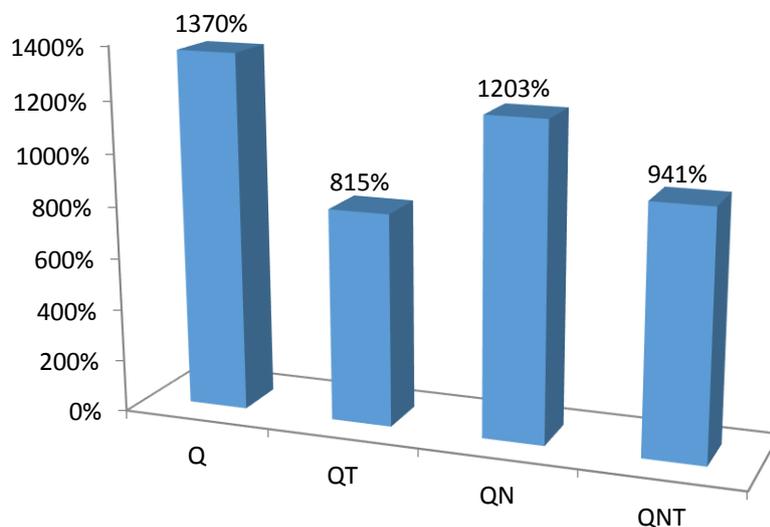
A Tabela 7 apresenta os valores médios e desvios padrão das massas secas e intumescidas dos arcabouços de Q, QT, QN e QNT após imersão em solução de PBS (pH 7,4) por um período de 24h. Comparando-se as diferenças entre a massa seca e intumescida para cada arcabouço, o resultado foi altamente significativo ($p < 0,001$). Com relação à Q e QT, a diferença foi significativa ($p < 0,05$). Já entre Q e QN intumescidos, a diferença não foi significativa ($p > 0,05$), sendo extremamente significativa entre QT e QNT.

Tabela 7 - Valores médios e respectivos desvios padrão das massas secas e intumescidas dos arcabouços de Q, QT, QN e QNT.

Arcabouço	Massa Seca (g)	Desvio Padrão	Massa Intumescida (g)	Desvio Padrão	GI%
Q	0,0220	0,00383	0,3235	0,07365	1370
QT	0,0443	0,00699	0,4057	0,06035	815
QN	0,02504	0,00407	0,3264	0,09115	1203
QNT	0,02919	0,00368	0,30392	0,04673	941

O Gráfico apresentado na Figura 54 ilustra o grau de intumescimento calculado segundo a equação 3. Analisando o gráfico, observa-se que houve um ganho de massa de aproximadamente 13, 8, 12 e 9 vezes nos arcabouços de Q, QT, QN e QNT, respectivamente, indicando uma alta capacidade de absorção por todos os arcabouços. Este fato decorre provavelmente da penetração do líquido nos arcabouços porosos e da interação da água (através de pontes de hidrogênio) com pontos reativos ($-\text{NH}_3^+$, NH_2 e $-\text{OH}$).

Figura 54 - Grau de intumescimento dos arcabouços de Q, QT, QN e QNT.



O menor intumescimento observado em QT e QNT decorre da possível interação do agente reticulante e do fármaco competindo com a água pelos mesmos sítios reativos. Já na comparação entre QT e QNT, o maior intumescimento do arcabouço contendo o fármaco deve-se provavelmente a competição entre o mesmo e o agente reticulante e a interação de sítios reativos da Naftoquinona com moléculas de água. Resultados semelhantes foram obtidos por Fidélis (2014), Fook (2012), Jiankang *et al.* (2009), Yang *et al.* (2010) e Oliveira (2013).

5.1.7 Biodegradação Enzimática.

A Tabela 8 ilustra a degradação dos arcabouços em solução de PBS e PBS/lisozima em 7, 14 e 21 dias.

Analisando os dados da Tabela 8, observa-se um ganho de massa decrescente nos arcabouços de Q e QN. Este fato provavelmente decorreu de uma lavagem insuficiente para remoção do sal, precipitação do mesmo nas amostras e, portanto, ganho de massa. Também se observa perda de massa nos arcabouços QT e QNT mesmo na solução contendo apenas PBS,

possivelmente em virtude das modificações do pH do meio que oscilou de 7.4 no início dos ensaios até 7.08 no final. Resultado semelhante foi obtido por Oliveira *et al.* (2012).

Tabela 8 – Biodegradação em solução de PBS e PBS/lisozima dos arcabouços Q, QT, QN, QNT nos intervalos 7, 14, 21 dias

ARCABOUÇO	PBS			PBS + LISOZIMA		
	PERCENTAGEM DE PERDA DE MASSA			PERCENTAGEM DE PERDA DE MASSA		
	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS
Q	-22%*	-7%*	-2%*	22%	25%	41%
QT	3%	6%	17%	43%	79%	74%
QN	-28%*	-17%*	-14%*	11%	18%	5%
QNT	3%	6%	13%	43%	77%	67%

*Valores negativos significam ganho de massa.

Todos os arcabouços imersos em solução com lisozima apresentaram maior perda de massa em 7, 14 e 21 dias do que aqueles em solução com apenas PBS. Nota-se, ainda, que de todos os arcabouços, os reticulados apresentaram maiores valores percentuais de perda de massa. Os resultados foram significativos ($p < 0,05$) com exceção de quitosana/PBS e quitosana/PBS/lisozima (14 dias), bem como quitosana/Naftoquinona/PBS e quitosana/Naftoquinona/PBS/lisozima no mesmo período ($p > 0,05$). A causa provável da maior perda de massa foi a diminuição da cristalinidade do polímero provocada pelo agente reticulante, demonstrada nos ensaios de DRX, termogravimetria e grau de intumescimento e corroborados com os trabalhos já mencionados. A elevada taxa de degradação provocada pela reticulação é um fator importante uma vez que, variando a velocidade de degradação, por meio da variação da concentração do reticulador, é possível controlar a permanência do sistema de liberação do fármaco no organismo e consequentemente a liberação do próprio fármaco.

CAPÍTULO 6 - CONCLUSÕES



Grupo de Biomateriais
UFCG | UAEMa

6 CONCLUSÕES

- O estudo químico realizado através do FTIR identificou todas as bandas características da quitosana.
- O estudo morfológico dos arcabouços realizado por MEV revelou a formação de uma estrutura tridimensional com poros interconectados;
- Através da técnica de EDS, pode-se confirmar a presença dos elementos sódio, nitrogênio, carbono, fósforo, oxigênio e nitrogênio, nos arcabouços produzidos.
- A reticulação dos arcabouços aumentou a velocidade de degradação e diminuição da estabilidade térmica. Porém, a massa residual dos mesmos foi maior nos arcabouços reticulados.
- Houve formação de arcabouços porosos, com propriedades morfológicas e físico-químicas que podem contribuir para carrear fármacos antineoplásicos cuja taxa de degradação pode ser controlada pela reticulação dos mesmos.
- A incorporação do fármaco pelo arcabouço foi confirmada por DRX, FTIR, Grau de Intumescimento e Termogravimetria.

CAPÍTULO 7 – PROPOSIÇÕES FUTURAS



Grupo de Biomateriais
UFCG | UAEMa

7 PROPOSIÇÕES FUTURAS

No presente trabalho foram desenvolvidos arcabouços de quitosana reticulados e não reticulados, bem como a incorporação de um agente antineoplásico nas referidas matrizes na perspectiva da confecção de um sistema de liberação controlada de fármacos antitumorais. Entretanto faz-se necessário outros procedimentos experimentais a fim de alcançar a confecção do referido sistema e sua utilização, entre eles:

- Determinar a cinética de liberação do fármaco;
- Avaliar a viabilidade de células de melanoma (B16F10) através do teste de MTT;
- Caracterizar os arcabouços com camadas invertidas;
- Avaliar o efeito de outros agentes reticulantes, bem como variar a concentração do TPP a fim de observar o efeito sobre a velocidade de degradação da matriz de quitosana e consequente liberação da droga;
- Realizar estudos comparativos com fármacos já utilizados comercialmente;
- Utilizar outros agentes neutralizadores a fim de evitar a presença de elementos químicos indesejáveis nos arcabouços ou reavaliar a metodologia utilizada para remoção dos referidos elementos;
- Finalmente, após a conclusão dos estudos *in vitro*, iniciar a fase experimental *in vivo* com animais subhumanos portadores de tumores malignos e, posteriormente, percorrer todas as etapas de estudos clínicos em humanos.

Desta forma, ainda existe um longo caminho a ser percorrido até que se possa utilizar um sistema de liberação controlada de fármacos antitumorais em humanos. Entretanto, com muito trabalho e perseverança, o objetivo será alcançado.

CAPÍTULO 8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



Grupo de Biomateriais
UFCG | UAEMa

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERS, A. P. F.; MELCHIADES.F. G.; MACHADO, R.; BALDO, J. B.; BOSHI. A. O. **Um Método Simples de Caracterização de Argilominerais por Difração de raios-X.** *Cerâmica* 48 (305) Jan/Fev/Mar 2002.

ARÊAS, P. C. F. **Avaliação da Atividade antitumoral de Naftoquinonas 2007.** Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia) Universidade Federal Fluminense.

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

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVESS. A.; BEZERRA D. C. LIA FOOK M. V.; COSTA A.C.F.M. **Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais:** *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v.2.3 (2007) 27-34.

AZEVEDO, J.R. et. al. Physical and chemical characterization insulin-loaded chitosan-TPP nanoparticles. *J Therm Anal Calorim*, 2011.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES S. A.; BEZERRA, D. C.; FOOK M. V. L.; COSTA; A. C. F. M. **Quitina e Quitosana: Aplicações como Biomateriais.** *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v. 2.3 (2007) 27-34

ASTM International: F1635-04 Standard Test Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants.

ASTM International: F2103-01 Standard Guide for Characterization and Testing of Chitosan Salts as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue-Engineered Medical Product Applications, 2007.

BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no Infravermelho na Caracterização de compostos Orgânicos**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2007. 189 p.

BARBOSA, R. C. **Compósito Quitosana/Carbonato de Cálcio para Utilização em Cânulas de Fístula Ruminal**. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais). Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Federal de Campina Grande. 2011.

BEZERRA, D. P.; MILITÃO, G. C. G.; CASTRO, F. O.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; ELMIRO, F. J. M.; COSTA-LOTUFO, L. V. **Toxicol. in Vitro**. 2007, 21, 1.

BOU, E.; ORTIZ, J.; SÁNCHEZ, E.; VICIANO F. **Controle de Qualidade dos Tripolifosfatos Sódicos Empregados na Fabricação de Engobes e Esmaltes**. *Cerâmica Industrial*, 5 (4) julho/agosto, 2000.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. **Química e Farmacologia de Quimioterápicos Antineoplásicos Derivados de Plantas**. *Quím. Nova*, vol.33, nº 6, pp. 1359-1369. 2010.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S. & PARKER, K. L. **As Bases farmacológicas da Terapêutica – Goodman & Gilman**. 11ª Ed, Mc Graw Hill. Rio de Janeiro, 2006.

CALLISTER, D. C. J. **Ciência e Engenharia de Materiais – uma Introdução**. 7ª Ed. Livros Técnicos e Científicos Editora LTDA (LTC), Rio de Janeiro, 2008.

CHAMPE, P. C.; HARVEY R, A.; FERRIER D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 5ª Ed. Artmed, São Paulo, 2012.

CARNEIRO, J. & JUNQUEIRA, L. C. **Biologia Celular e Molecular**. 9^o Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2012.

CARVALHO, P. S. P.; ROSA, A. L.; BASSI, A. P. F.; PEREIRA, L. A. V. D. **Biomateriais Aplicados a Implantodontia**. *Revista Implantnews* 2010;7 (3^a-PBA): 56-65

CEREHIARA, T.; LUPPI, B.; BIGUEEI, F.; ZEEHI, V.; J. **Pharm. Pharmacol.** 2003, 55, 1623.

CHOW, L.C. **“Next generation calcium phosphate-based biomaterials”**. *Dental Materials Journal*, v.28, n.1, p.1-10, 2009.

COIMBRA, P. M. A. **Preparação e Sistemas de Libertação Controlada de Fármacos com Base em Polímeros de Origem Natural**. 2010. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Portugal. 2010.

CREE, Ian A. **Cancer Cell Culture: Methods and Protocols**. Totowa: Springer Protocols, 2000.

FIDÉLES, T. B.. **Desenvolvimento de Scaffolds de Quitosana para Aplicação na Engenharia de Tecidos**. 2014. 122 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2014.

FIDÉLES, T. B. **Filmes Reticulados de Quitosana para Aplicação como Biomaterial**. Programa de pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais. Universidade de Federal de Campina Grande (Dissertação), 72f, 2010.

FÁVERE, V. T.; LARANJEIRA, M.C. M. **quitosana: Biopolímero Funcional com Potencial Industrial Biomédico**. *Quim. Nova*, Vol. 32, Nº 3, 672-678, 2009.

FERRARI, M. FORNASIERO, M. ISETTA, A. **MTT colorimetric assay for testing Macrophage activity in vitro**. *Journal of Immunological Methods*, 1990. 131; 165-172.

FERNANDA, B. M. P. **Influência do Processo de Reticulação no Comportamento de um Compósito de Poli (Dimetilsiloxano)**. 2009. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências de Materiais). Instituto Militar de Engenharia. Rio de Janeiro, 2009.

FILHO, G. B. Bogliolo – **Patologia. 8º ed.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

FOSTER, I. **Cancer: A cell cycle defect**. *Radiography* 2008, ed. 14, pp. 144 - 149.

FOOK, A. C. B. M. **Produção e caracterização de arcabouços compósitos HÁ/Biopolímero para engenharia de tecidos**. 2012. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais). Centro de Ciência e Tecnologia. Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande. 2012.

GIUNCHEDI, P. *et al.* **Formulation and in vivo evaluation of chlorhexidine buccal tablets prepared using drug-loaded chitosan microspheres**. *Eur J Pharm Biopharm*, v. 53, p.233-239, 2002.

GONSALVES, A. A.; ARAÚJO, C. R. M.; SOARES, N. A.; GOULART, M. O. F.; ABREU, F. C. **Diferentes Estratégias para Reticulação de Quitosana**. *Quím. Nova*, vol.34, nº 7, pp. 1215-1223. 2011.

GOULART, G. A. S. **Obtenção e Caracterização de Micropartículas de Quitosana Contendo Papaína**. 2006. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas. São Paulo, 2006.

GRASSI, M. S.; COSTA, M.T.Z.; VAZ F.A.C. **Fatores Imunológicos do Leite Humano**. *Pediatria (São Paulo)* 2001:23(3) 259-263.

GUINESI, L.S.; ESTEVES, A.A.; CAVALHEIRO, É.T.G. **“Adsorção de íons cobre (II) pela quitosana usando coluna em sistema sob fluxo hidrodinâmico”**. *Quím. Nova*, vol.30, n.4, pp. 809-814. 2007.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E.. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12. ed. Brasil: Elsevier, 2011.

HOLANDA L. A. **Membranas de quitosana para usos em sistema de liberação controlada de Insulina**. 2011. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos). Centro de Ciência e Tecnologia. Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande. 2011.

IONASHIRO, M.; GIOLITO, I. **A Nomenclatura em Análise Térmica – Parte II**. *Cerâmica*, v. 34, p. 163-164, 1988.

JIANKANG, H.; DICHEN, L.; YAXIONG, L.; BO, Y.; HANXIANG, Z.; QIN, L.; BINGHENG, L.; YI, L. **Preparation of chitosan-gelatin hybrid scaffolds with well-organized microstructures for hepatic tissue engineering**. *Acta Biomaterialia*, v. 5, p. 453-461, 2009.

KAYASHIMA, T.. **1,4-Naphthoquinone is a potent inhibitor of human cancer cell growth and angiogenesis**. Cancer Letters, X, v. 278, n. 1, p.34-40, 2009.

KLACK, K.; CARVALHO, J. F. **Vitamina K: Metabolismo, Fonte e Interação com o Anticoagulante Varfarina**. Revista Brasileira reumatol, vol. 46, nº 6. Pp. 398-406, 2006.

KLÍSSIA, R. F.; GONÇALVES, R. B./ SCHWARCZ, W. D.; FREDERICO, R. C. P.; MACIEL, S. M.; ANDRADE, F. B. **Avaliação do Padrão de Expressão de Proteínas Salivares Lactoferrina e lisozima e sua Associação com Experiência e atividade de Cárie**. Revista Odonto Ciências. 2010;25(4):344-349.

KOLHE, P.; KANNAN R. **Improvement in Ductility of Chitosan through Blending and Copolymerization with PEG: FTIR Investigation of Molecular Interactions**. v.4, p. 173-180, 2003.

KUMAR, V. *et al.* **Patologia -Bases Patológicas das Doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

KUMAR, M. R. S. *et al.* **Cytotoxic, genotoxic and oxidative stress induced by 1,4-naphthoquinone in B16F1 melanoma tumor cells**. Toxicology In Vitro, X, v. 23, n. 2, p.242-250, 2009.

KUMBAR, Sangamesh G.; SOPPIMATH, Kumaresh S.; AMINABHAVI, Tejraj M.. **Synthesis and characterization of polyacrylamide-grafted chitosan hydrogel microspheres for the controlled release of indomethacin**. Journal of Applied Polymer Science, X, v. 87, n. 9, p.1525-1536, 2003.

LAUS, R.; LARANJEIRA, M. C. M.; MARTINS, A. O.; FÁVERE, V. T.; PEDROSA R. C.; BENASSI, J. C.; GEREMIAS R. **Microesfera de quitosana Reticuladas com Tripolifosfato Utilizadas para Remoção de Acidez, Ferro (III) e Manganês (II) de Águas Contaminadas pela Mineração de Carvão.** Quím. Nova, vol.29, nº 1, 2006.

LIMA, R. S. C. **Desenvolvimento de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos: Quitosana/Insulina.** Tese (Doutorado em Engenharia de Processos). Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Federal de Campina Grande. 2010.

MANSUR, H. S.; COSTA, E. S. **Preparação e Caracterização de Blendas de Quitosana/poli (Álcool Vinílico) Reticuladas Quimicamente com Glutaraldeído para Aplicação em Engenharia de Tecido.** Quím. Nova, vol.31, nº6, pp. 1460-1466. 2008.

MARTINÉZ-CAMACHO, A.P. *et al.* **Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties.** Carbohydrate Polymers, v. 82, n. 2, p.305-315, 2010.

MARZZOCO, A.; TORRES B.B. **Bioquímica Básica.** 3º Ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2007.

MARTINS, K. F. **Obtenção e Caracterização de Microesferas do Copolímero PLDLA Contendo Paclitaxel.** Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências de Materiais. Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2013.

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

MONTENEGRO, T.; BRITO B. C. E.; CARDOSO, A. P.; FRANCO, M. **Patologia – Processos Gerais**. 6º ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2015.

MUCHA, M.. **Thermogravimetric and FTIR Studies of chitosan blends**. *Thermochimica Acta*, v. 396, p 153-166, 2003.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T.. **Polymeric applications as biomaterials in the areas of tissue engineering and controlled drug delivery**. *Advances In Biochemical Engineering/biotechnology*, X, v. 102, p.47-90, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M.. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 16. ed. São Paulo: Artmed, 2014.

OLIVEIRA, A. P. R. **Desenvolvimento de Membranas de gelatina/quitosana e o Estudo do processo de Reticulação**. 2013. Dissertação (Mestre em Ciências). Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Instituto de química de São Carlos – da Universidade de São Paulo.

OLIVEIRA, R. A.; BARBOZA, P.A.; CARDOSO, M.J.B.; BARBOZA, R. C.; PINTO, M.R.O.; FOOK, M.V.L. **Síntese e caracterização de Compósito Quitosana Extraído de Casca de Ovo para possíveis Aplicações como Curativo**. Trabalho Apresentado no Encontro Nacional de Educação, ciência e Tecnologia/UEPB, 2012.

OLIVEIRA. J. R. B. & RIBAS R. V. **Lei de Moseley, Análise de cristais por Raios-X e Difração de Elétrons**. Instituto de Física da USP. Disponível em <<http://disciplinas.stoa.usp.br/mod/resource/view.php?id=11351>> Acesso em: 10 de março de 2015.

PADILHA, A. F. e AMBRÓZIO FILHO, F. **Técnicas de Análise Microestrutural**. Ed. HERMUS, São Paulo, 2004.

PAGÉ, M. BEJAOUI, N. CING-MARS, B. LEMIEUX, P. **Optimization of the Tetrazolium-based colorimetric assay for the measurement of cell number and cytotoxicity**. International Journal of Immunopharmacology, 1988. 10; 785-793.

PINTO, J. G. S.; CIPRAND, M. T. O.; AGUIAR, R. C.; LIMA, P. V. HERNANDES, P. A. G.; JÚNIOR, A. N. S. **Enxerto Autógeno x Biomateriais no Tratamento de Fraturas e Deformidade Faciais – Uma Revisão de Conceitos Atuais**. RFO, v. 12, n. 3 p. 79-84, 2007.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5º ed. São Paulo: Elsevier, 2003.

RATNER, B. D., HOFFMAN A.S., SCHOEN F.J., LEMONS J E. **Biomaterials science : an introduction to materials in medicine**. 2 Ed. Academic Press, 2004.

REIS, A.C.B.P. **Encapsulação de fármacos peptídicos pelo método de emulsificação/gelificação interna**. Tese de Doutorado. Universidade de Coimbra, Coimbra, 2007.

RODRIGO, L. B. **Aplicações de Biomateriais em Ortopedia**. Estudos tecnológicos em Engenharia, 9(2):63-76, 2013.

RUBIN, E.; GORSTEIN, F.; RUBIN, R. SCHWARTING, R.; STRAYER, D. **Patologia – Bases Clinicopatológicas da Medicina**. 4º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SILVA, M. N.; FERREIRA V. F.; SOUZA M. C. B. V. Um Panorama Atual da **Química e da Farmacologia de Naftoquinonas, com Ênfase na β -lapachona e Derivados**. Quím. Nova, vol.26, nº3, pp. 407-416. 2003.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 5^o ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SEO, H.; SHOJI, A.; ISOH, Y.; KAWAMURA, M; SAKAGAMI, Y. Em **Antibacterial fiber blended with chitosan**; KARNICKI, Z. S.; BRZESKI, M. M.; BYKOWSKI, P. J.; WOJTASZ-PAJAK, A., eds.; Chitin world Wirtschaftsverlag: Germany, 1994.

SÍTIO DO INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 07 de novembro de 2012.

SÍTIO DO INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 15 de agosto de 2012.

SÍTIO DO INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 28 de julho de 2013.

SÍTIO DO INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 10 de março de 2014.

SOARES, A. G. **Fórum de Biotecnologia e Biomateriais**. Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-graduação e Pesquisa de Engenharia. Universidade Federal do rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2005.

SOUZA A. **Materiais mesoporosos ordenados aplicados como sistemas para liberação controlada de drogas**. Dissertação (Mestre em ciências e tecnologia dos materiais). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materias. Centro de Desenvolvimento da Tecnologia. Comissão Nacional de Energia Nuclear. Belo Horizonte – MG. 2006.

SOUZA, K. S. O Uso de Polissacarídeo Natural Quitosana Quimicamente Modificado na Remoção de Cátions e Termoquímica de Interação na Interface Sólido/Líquido. 2009. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Estadual de Camoinas, Instituto de Química, São Paulo. 2009.

SPIN-NETO, R. *et al.* Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. Revista de Odontologia da UNESP, v.37, p. 155-161, 2008.

SANTOS, P. S. **Ciência e Tecnologia de Argilas**. Ed. Edigard Blucher Ltda., Vol 3, 1992.

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

SRIVASTAVA, V.; NEGI, J. K.; GUPTA, M.; KHANUJA, S. P. S. **BIOORG. Med. Chem.** 2005, 13, 5892.

STOCKERT, J. C. CASTRO, A. CAÑETE, M. HOROBIN, R. W. VILLANUEVA, A. **MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the Formazan product is in Lipid droplets**. *ActaHistochemica*, 2012. 114; 785-796.

STODDART, M. **Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols** (1ªed). Totowa: Springer Protocols.

STRYER, L. **Bioquímica. 6º Ed. Rio de Janeiro:** Guanabara Koogan, 2008.

TIPLER, P. A. **Física para Cientistas e Engenheiros. 6º ed.** Rio de Janeiro: LTC, 2009.

THEIN-HAN, W.W.; MISRA, R.D.K. Biomimetic chitosan-nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. v.5, p.1182-1197), 2009.

TORRES, M. A.; VIEIRA, R. S.; BEPPU, M. M.; SANTANA, C. C. **Produção e Caracterização de Microesferas de Quitosana Modificadas Quimicamente.** *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 15, n. 4, p. 306-312, 2005.

WU, Y.; YANG, W.; WANG, C.; HU, J.; FU, S.; **Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate.** *Pharmaceutical Nanotechnology*, 295, p. 235-245, 2005.

XUA, X.; YAO FUA, X.; HUA, H.; DUANB, Y.; ZHANG, Z. **Quantitative determination of insulin entrapment efficiency in triblockcopolymeric nanoparticles by high-performance liquid chromatography.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* v.41, 266–273, 2006.

YANG, B.; LI, X.; SHI, S.; KONG, X.; GUO, G.; HUANG, M.; LUO, F.; WEI, Y. IONASHIRO, M.; GIOLITO, A. I.. **A nomenclatura em Análise Térmica = Parte II.** *Cerâmica*, v. 34, p. 164-164, 1988.

ZHAO, X.; QIN, Z. **Preparation and characterization of a novel chitosan scaffold.** *Carbohydrate Polymers*, v. 80, p.860-865, 2010.

YILMAZ, B.; KADIOGLU, Y. **Development and Validation of HPLC Method for Determination of Human Insulin in Pharmaceutical Preparation.** International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research.v.2 p.40, 2010.

YOSHIOKA, H. *et al.* **Chitosan-derived polymer-surfactants and their micellar properties.** *Biosci Biotechnol Biochem*, v. 59, n. 10, p.1901-1904, 1995.

ANEXOS



Grupo de Biomateriais
UFCG | UAEMa

9 ANEXOS

ANEXO 1 - Resumo da absorção no infravermelho para compostos orgânicos.

1) 3.600 - 2.700 cm^{-1}

Número de onda (cm^{-1})	Grupo funcional	Comentários
3.640 - 3.610	O-H (livre)	Banda fina, mais forte quando medida em solução diluída.
3.600 - 3.200	O-H (associado)	3.600 - 3.500: Banda fina resultante de ligações diméricas. 3.400 - 3.200: Banda forte, larga, resultante da associação polimérica. A intensidade da banda depende da concentração.
3.200 - 2.500	O-H (quelato)	Ligação de hidrogênio intramolecular com C=O, NO ₂ : Banda larga, de intensidade normalmente fraca e a frequência é inversamente proporcional à força da ligação.
3.500 - 3.070	N-H	a) NH ₂ livre em aminas primárias - aminas primárias alifáticas: ~ 3.500 - aminas aromáticas: ~ 3.400 b) NH ₂ livre em amidas: 3.500 - 3.400 c) NH ₂ associado em aminas primárias - aminas alifáticas e aromáticas: 3.400 - 3.100 d) NH ₂ associado em amidas: 3.350 - 3.100 e) NH livre em aminas secundárias: - aminas primárias alifáticas: 3.350 - 3.300 - aminas aromáticas: ~ 3.450

		- pirróis, indóis: ~ 3.490 f) NH livre em amidas: 3.460 - 3.420 g) NH associado em aminas secundárias: 3.400 - 3.100 h) NH associado em amidas: 3.320 - 3.070
~ 3.300	C-H de alcinos	Confirmado pela presença de uma banda de 2.260 - 2.100 (C≡C).
3.080 - 3.020	C-H de alcenos	
~ 3.030	C-H de aromáticos	Muitas vezes obscurecida.
2.960 - 2.850	C-H alifáticos	CH ₃ , CH ₂ (carbonos prim. e sec.): 2.960 - 2.850 CH (carbono terc.): 2.890 - 2.880
2.820 e 2.720	C-H de aldeídos	

2) 2.300 - 1.900 cm⁻¹

Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Comentários
2.275 - 2.250	N=C=O (isocianatos)	Banda de forte intensidade.
2.260 - 2.200	C ≡ N (nitrilas)	a) Nitrilas conjugadas: 2.235 - 2.210 b) Nitrilas não conjugadas: 2.260 - 2.240
2.260 - 2.100	C ≡ C	Pode estar ausente em acetilenos simétricos.
~ 2.260	N ≡ N (sais de diazônio)	
2.175 - 2.140	SC ≡ N (tiocianatos)	

2.160 - 2.120	-N=N=N (azidas)	
~ 2.150	C=C=O (cetonas)	
2.140 - 1.990	N=C=S (isotiocianatos)	Banda larga e intensa.
~ 1950	C=C=C (alenos)	Duas bandas para alenos terminais ou ligados a grupos de efeito -I.

3) 1.800 - 1.400 cm^{-1}

Número de onda (cm^{-1})	Grupo funcional	Comentários
1.820 e 1.760	C=O de anidridos	Aparecem duas bandas, correspondentes aos dois grupos C=O.
1.815 - 1.790	C=O de cloreto de acila	Conjugação desloca a banda cerca de 20 cm^{-1} para frequência mais baixa.
1.760 e 1.710	C=O de ác. carboxílicos	O monômero tem banda de ~ 1.760 e o dímero, ~ 1.710. Às vezes não se observa essa banda em solventes polares.
1.750 - 1.740	C=O de ésteres	Absorção sujeita a efeitos de conjugação e de efeito indutivo.
1.740 - 1.720	C=O de aldeídos	Absorção sujeita a efeitos de conjugação e de efeito indutivo.
1.720 - 1.700	C=O de cetonas	Somente para cetonas acíclicas (dialquil-cetonas).
1.700 - 1.630	C=O de amidas	a) Amidas não substituídas - livres: ~ 1.690 - associadas: ~ 1.650

		<p>Efeito de conjugação ou efeitos indutivos causam deslocamento de cerca de 15 cm^{-1} para frequência mais alta. Em amidas cíclicas a frequência é aumentada de cerca de 40 cm^{-1} por unidade de decréscimo do tamanho do anel.</p> <p>b) Amidas N-substituídas: $1.700 - 1.630$ c) Amidas N,N-substituídas: $1.670 - 1.630$</p> <p>Apresentam uma única banda.</p>
1.675 - 1.645	C=C	<p>Intensidade usualmente de fraca a média. As bandas estão ausentes em alcenos simétricos. A presença de uma ou duas bandas adicionais de $1.650 - 1.600$ ocorre em alcenos conjugados.</p>
1.600, 1.580, 1.500 e 1.450	C=C de aromáticos	<p>Vibrações de núcleos aromáticos. A banda de 1.580 é intensa quando o grupo fenila é conjugado com insaturações ou mesmo ligado a átomos com pares de elétrons livres. A banda de 1.450 geralmente é obscurecida e a banda de 1.500 é normalmente mais forte.</p>
1.590 - 1.550	NH ₂	<p>Banda média a forte, correspondente à deformação angular simétrica no plano.</p>
1.560 e 1.350	NO ₂	<p>Bandas fortes de deformação axial assimétrica e simétrica, respectivamente. Ambas estão sujeitas a efeitos de conjugação. (a banda cai -30cm^{-1}).</p>
1.580 - 1495	N-H	<p>Banda fraca de deformação angular, muitas vezes obscurecida pela banda de</p>

		1.560 de aromáticos. Esta banda também é usada para caracterizar aminas e amidas secundárias.
--	--	---

4) 1.500 - 600 cm⁻¹

Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Comentários
1.470 - 1.430	CH ₂	Deformação angular de -(CH ₂) _n - sendo que para n > 3 a banda aparece na região por volta de 720 (deformação angular de cadeia).
~ 1.420	CH ₂ adjacente a carbonila	Deformação angular.
1.390 - 1.370	CH ₃	Deformação angular. Em caso de dimetil geminal a banda aparecerá como um duplete.
1.400 - 500	C-X (X = halogênio)	a) C-F: 1.400-1.000 b) C-Cl: 800-600 c) C-Br: 750-500 d) C-I: ~ 500
1.350 - 1.310 e 1.140 - 1.200	SO ₂ (sulfona)	Bandas intensas de deformação axial assimétrica e simétrica, respectivamente.
1.420 e 1.300 - 1.200	C-O de ác. carboxílicos	Aparecem duas bandas de deformação axial, devido ao acoplamento da deformação angular

		no plano da ligação O-H e a deformação axial de C-O.
1.300 - 1.050	C-O de ésteres	a) Ésteres saturados: 1.300 - 1.050 b) Ésteres insaturados e aromáticos: 2 bandas (1.300 - 1.250 e 1.200 - 1.050)
1.275 - 1.020	C-O de éteres	a) Éteres alifáticos: 1.070 - 1.150 b) Éteres aromáticos e vinílicos: 2 bandas (1.200 - 1.275 e 1.020 - 1.075)
1.200 - 1.050	C-O de álcoois e fenóis	a) Álcool prim: ~ 1.050 b) Álcool sec: ~ 1.100 a) Álcool terc: ~ 1.150 a) Fenóis: ~ 1.200
1.340 - 1250	C-N de aromáticos	
1.280 - 1.180	C-N de alifáticos	
1.060 - 1.040	S=O (sulfóxido)	Esta banda é deslocada de 10 a 20 cm^{-1} para frequência mais baixa por efeito de conjugação. Grupos metileno na posição alfa dão origem a uma banda de ~ 1.415.
990 e 910	RCH=CH ₂	Deformação angular fora do plano.
970 - 960	-CH=CH-	
~ 920	O-H	Banda larga (deformação angular) de média intensidade, devido à deformação angular fora do plano da C=O de ác. carboxílicos.
895 - 885	R ₂ C=CH ₂	
840 - 790	R ₂ C=CHR	C-H fora do plano.

730 - 675	-CH=CH-	C-H fora do plano.
770 - 730 e 710 - 690	Anel aromático	Deformação angular de 5 H adjacentes (anéis monossustituídos).
770 - 735	Anel aromático	Deformação angular de 4 H adjacentes (anéis orto-sustituídos). Outros exemplos: piridina orto-sustituída, naftalenos não substituídos em um dos anéis.
810 - 750 e 710 - 690	Anel aromático	Deformação angular de 3 H adjacentes (anéis meta-sustituídos e 1,2,3-trissustituídos). Outros exemplos: naftalenos monossustituídos na posição alfa.
860 - 800	Anel aromático	2H adjacentes (anéis para-sustituídos e 1,2,3,4-tetrassustituídos).
900 - 860	Anel aromático	H isolado: pode estar presente no benzeno meta-dissustituído, além de outros aromáticos. A banda tem intensidade fraca.
790 - 730	Grupos etila e propila	Deformação angular ("rocking"). a) Etila: 790 - 720 b) Propila: 745 - 730
~ 720	-(CH ₂) _n - (para n > 3)	Deformação angular de cadeia ("rocking").

Fonte: Extraída de

http://www.reocities.com/vienna/choir/9201/tabela_de_absorcao_no_infravermelho.htm