



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA DE PROCESSOS**



ALECSANDRA FERREIRA TOMAZ

**DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANA DE QUITOSANA/1,4 NAFTOQUINONA
PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA: CURATIVO PARA FERIDAS
ONCOLÓGICAS**

**CAMPINA GRANDE-PB
2017**

ALECSANDRA FERREIRA TOMAZ

**DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANA DE QUITOSANA/1,4 NAFTOQUINONA
PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA: CURATIVO PARA FERIDAS
ONCOLÓGICAS**

Tese apresentada à banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos da Universidade Federal de Campina Grande, Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos, para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Processos.

Orientadores: Prof. Dr. Antonio Gilson Barbosa de Lima
Prof Dr. Marcus Vinícius Lia Fook

CAMPINA GRANDE-PB

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

T655d

Tomaz, Alecsandra Ferreira.

Desenvolvimento de membrana de quitosana/1,4 naftoquinona para liberação controlada : curativo para feridas oncológicas / Alecsandra Ferreira Tomaz. – Campina Grande, 2018.

143 f. : il. color.

Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2017.

"Orientação: Prof. Dr. Antonio Gilson Barbosa de Lima, Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook."

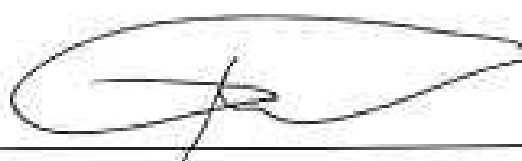
Referências.

1. Quitosana. 2. 1,4-naftoquinona. 3. Liberação de Fármaco.
I. Lima, Antonio Gilson Barbosa de. II. Fook, Marcus Vinícius Lia.
III. Título.

CDU 677.473:615.4(043)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE
ALECSANDRA FERREIRA TOMAZ APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS DO CENTRO DE CIÊNCIAS E
TECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

Tese de Doutorado aprovada em 15 de dezembro de 2017.



Prof. Dr. Antonio Gilson Barbosa de Lima
(Orientador – DEM/UFMG)



Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook
(Orientador – DEMA/UFMG)



Prof. Dr. Marcos Antonio Sabino Gutierrez
(Examinador Externo – Universidade Simon Bolivar, USB, Caracas-Venezuela)



Profª. Dra. Andrea Granada Ferreira
(Examinadora Externa – Pesquisadora/UFSC)



Profª. Dra. Adriana Lima de Holanda
(Examinadora Externa – FCM/CG)



Profª. Dra. Luana Abílio Diniz M. Medeiros
(Examinadora Externa – UFCG/CSTR)

Aos meus pais, Lindacir e Tomaz.

Aos meus filhos, Laura Maria e Alexandre.

Dedico.

“Até aqui nos ajudou o Senhor”.

1 Samuel 7:12

AGRADECIMENTOS

A DEUS,

por minha vida, pelas oportunidades e por se mostrar sempre presente.

Aos meus pais, **Lindacir e Tomaz**, pelo amor, por entenderem meus momentos de ausência e por me ensinarem a nunca desistir.

Aos meus filhos, **Laura Maria e Alexandre**, que a cada dia que Deus me concede agradeço a Ele a oportunidade de ser mãe!

À minha tia, **Inácia e meus irmãos Alisson e Lindiane**, pelo amor e por tudo que compartilhamos.

Aos meus orientadores, **Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook e Prof. Dr. Antonio Gilson Barbosa de Lima**. Obrigada por todo conhecimento transmitido, pelos ensinamentos de vida, pelas oportunidades, por confiarem em mim, me acolherem nos momentos difíceis e me incentivarem continuamente. Serei sempre grata!

Ao **Prof. Dr. Marcos Antonio Sabino Gutierrez** pela confiança, dedicação constante, por ser um exemplo de docência e pela valiosa e sempre disponível colaboração. Eu sei que lhe “aperriei e aperreio” demais. Muito obrigada!

Ao **Prof. Dr. Jackson Borba Cruz**, pelo apoio no início dessa pesquisa.

À estimada **Eliza Juliana**, que me levou ao CERTBIO e intermediou o contato com Prof. Marcus Vinícius.

Ao amigo **Rossemberg Cardoso Barbosa**, por ter compartilhado comigo seu conhecimento, tempo e amizade, sempre me apontando o caminho e mostrando que sou capaz.

Ao meu amigo **Wladymyr Jefferson**, por ter me acolhido em sua amizade, carinho, cuidados de um irmão, além de toda disponibilidade quando precisei.

Aos meus companheiros de equipe de trabalho, **André, Thiago Caju, Thiago Guedes, Rodolfo, Jéssica, Darlyson, Guilherme, Rosa, Kleilton, Filipe e Bartolomeu Jorge (in memorian)**. Tenham certeza que, com vocês, o tempo naquela sala voa!!

À **Profª Drª Maria Roberta** por sua dedicação, pela conversa amiga e acolhedora de sempre.

Ao **Prof Bolívar Damasceno** por todo o tempo dedicado às minhas dúvidas.

Aos colegas do CERTBIO: **Josué, Milena, Cristiane, Tiago Fidélis, Carlos, Vítor, Franci, Itamara, Isabel, William, Klaidson, Márcio, Valéria, Glória, Imaraly, João, Matheus, Socorro, Gislaine, Dayana, Lívia, Otto, Danielle, Glauber, Jucélia, Mayelli, Rita, Bianca, Raid, Flávia, Daniel, Silvia e Michele** e aos colegas que fazem as engrenagens do CERTBIO não parar: **Pedro, Dailma, Tânia, Toninho, Antônio, Jacqueline**. O aprendizado e convívio com vocês é sempre muito agradável.

À **Paulinha**, pela suavidade e tranquilidade com que sempre me recebe, fazendo com que as broncas que surgem sejam mínimas.

A Sr. **Sérgio**, por sempre estar disponível a todos os meus pedidos, sempre disposto a ajudar.

Aos professores que fizeram parte das bancas as quais estava sendo avaliada: **Profª Drª Verônica Evangelista, Profª Drª Maria Roberta Pinto, Profª Drª Waldênia Freire, Profª Drª Andrea Granada, Profª Drª Luana Abílio, Profª Drª Adriana Holanda, Prof. Dr Marcus Vinícius, Prof Antônio Gilson, Prof. Marcos Sabino, Prof Osvaldo Soares**. Agradeço cada contribuição feita para a construção desse trabalho.

À equipe da **Profa Dra Suédina/Laboratório NANOPOL: Albaniza, Cristiano e Aracelli**: vocês são demais!!

A **UEPB** por conceder o afastamento parcial das atividades docentes e ao Departamento de Fisioterapia, nas pessoas de Profa Márcia Darlene e Giselda Félix, obrigada pela compreensão de sempre.

A **todos os meus amigos**, que mesmo distante fisicamente sempre me incentivaram e me apoiaram.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

As lesões cutâneas associadas ao câncer de pele apresentam crescente importância na atualidade, visto que este tipo de câncer é o mais incidente para ambos os sexos no Brasil, mesmo sendo considerado de baixa letalidade. Suas características de sangramento, exsudação intensa e presença de odores, além da dificuldade da aceleração do processo cicatricial sugerem a necessidade do desenvolvimento de biomateriais que possam ser utilizados como curativos no intuito de prover melhor resposta à esta condição. Nesse sentido, esse trabalho teve como objetivo desenvolver membrana de quitosana para liberação controlada de 1,4-naftoquinona como proposta de curativo para feridas oncológicas. Para tanto, foram desenvolvidas membranas de quitosana e quitosana/1,4-naftoquinona pelo método de liofilização e evaporação de solvente (densas). Para quantificar o 1,4-naftoquinona nas membranas de quitosana foi utilizada a espectroscopia na região do ultravioleta (UV/VIS), cuja metodologia foi validada analiticamente. Para caracterização química, física e biológica destas foram utilizadas a Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Difração de Raios X (DRX), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Termogravimetria (TG), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Ensaio de Tração, Teste de Molhabilidade, Grau de Intumescimento (GI), Biodegradação e Citotoxicidade. No ensaio de FTIR confirmou-se a reticulação e interação da quitosana com o 1,4-naftoquinona. Na técnica de DRX observou-se os picos característicos da quitosana nas membranas desenvolvidas e naquelas com 1,4-naftoquinona constatou-se um aumento da cristalinidade. Na MEV foram identificadas estruturas porosas, lamelares e fibrilares nas membranas liofilizadas e nas por evaporação de solvente uma estrutura lisa e homogêna. Os resultados de TG e DSC indicaram que a adição do agente reticulante e do 1,4-naftoquinona elevou à resistência à temperatura das amostras. As membranas por evaporação de solvente apresentaram maior resistência ao ensaio de tração. Todas membranas confeccionadas exibiram perfil de hidroflicidade e GI elevado. Constatou-se que membranas densas degradaram mais que as liofilizadas. No ensaio de liberação controlada foi possível evidenciar uma liberação lenta, controlada, caracterizada em etapas. As membranas com melhores resultados no ensaio de liberação foram submetidas ao teste de citotoxicidade e apresentaram-se tóxicas. Conclui-se que essas membranas são promissoras para uso como curativo em liberação controlada de 1,4-naftoquinona.

Palavras-chave: 1,4-naftoquinona. Quitosana. Liberação de fármaco.

ABSTRACT

Skin lesions associated with skin cancer present an increasing importance today, since this type of cancer is the most frequent for both sexes in Brazil, even though it is considered of low lethality. Its bleeding characteristics, intense exudation and the presence of odors, as well as the difficulty of accelerating the cicatricial process suggest the need for the development of biomaterials that can be used as curatives in order to provide better response to this condition. In this sense, this work aimed to develop a chitosan membrane for controlled release of 1,4-naphthoquinone as a curative proposal for oncological wounds. So, chitosan and chitosan/1,4-naphthoquinone membranes were developed by the freeze-drying and solution casting method (dense) method. To quantify the 1,4-naphthoquinone in the chitosan membranes, ultraviolet spectroscopy (UV/VIS) was used, whose methodology was validated analytically. For chemical, physical and biological characterization of these membranes, it was used Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), X-ray Diffraction (XRD), Scanning Electron Microscopy (SEM), Thermogravimetry (TG), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Traction Test, Wettability Test, Swelling Degree (SD), Biodegradation and Cytotoxicity. In the FTIR assay the cross-linking and interaction of chitosan with 1,4-naphthoquinone was confirmed. In the XRD technique the characteristic peaks of chitosan in the developed membranes were observed and in those with 1,4-naphthoquinone an increase in the crystallinity was observed. In the MEV, porous, lamellar and fibrillary structures were identified in the lyophilized membranes and in the solvent evaporation a smooth and homogeneous structure. The results of TG and DSC indicated that the addition of the crosslinking agent and 1,4-naphthoquinone increased the temperature resistance of the samples. The membranes by solvent evaporation presented higher resistance to the tensile test. All prepared membranes exhibited high hydrophilicity and SD profiles. Dense membranes have degraded more than lyophilized and the membranes submitted to the cytotoxicity assay were toxic. In the controlled release assay it was possible to demonstrate a slow, controlled release, characterized in steps. The membranes with the best results in the release assay were cytotoxic. It is concluded that such membranes are promising for use as dressing in controlled release of 1,4-naphthoquinone..

Keywords: 1,4-naphthoquinone. Chitosan. Drug Release.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Histologia da pele.....	21
Figura 2 - Estimativas para o ano de 2016 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária. Paraíba/João Pessoa.	26
Figura 3 - Regra do ABCDE	27
Figura 4 - Comparação das estruturas moleculares da celulose, da quitina e da quitosana.	40
Figura 5 - Célula unitária ortorrômbica	42
Figura 6 - Exemplos de quinonas de origem natural. Estreptonigrina (1), urdamicinona (2), lapachol (3), α -lapachona (4) e β -lapachona (5)	47
Figura 7 - Estrutura de quinonas que ocorrem naturalmente.(1) daunorubicina e (2) mitomicina C.	47
Figura 8 - Estrutura química do naftaleno (1) e 1,4-naftoquinona (2).....	49
Figura 9 - Representação de um sistema de liberação convencional e controlada de fármaco.....	51
Figura 10 - Fluxograma da produção de membranas de quitosana com e sem 1,4-naftoquinona, 1ª metodologia – liofilização.	60
Figura 11 - Fluxograma da produção de membranas de quitosana com e sem 1,4-naftoquinona, 2ª metodologia – evaporação de solvente.	60
Figura 12 – Ângulo de contato θ entre uma gota líquida e uma superfície	69
Figura 13 - Aspecto macroscópico das membranas de quitosana sem e com a incorporação do 1,4-naftoquinona, seguida da reticulação e após neutralização na solução de hidróxido de amônio.....	74
Figura 14 - Aspecto macroscópico das membranas liofilizadas de quitosana sem e com a incorporação do 1,4-naftoquinona. a) QT05L, b) QN7T05L e c) QN7T05L após reticulação a 0,5%.....	76
Figura 15 - Aspecto macroscópico das membranas produzidas pelo processo de evaporação de solvente de quitosana sem e com a incorporação do 1,4-naftoquinona. a) QT05E, b) QN7T05E e c) QT05E e QN7T05L após reticulação a 0,5%.....	78
Figura 16 - Espectros de FTIR dos pós da quitosana, tripolifosfato de sódio e 1,4-naftoquinona.	78

Figura 17 - Espectros de FTIR das membranas de quitosana liofilizadas (a) e por evaporação de solvente (b), neutralizadas e reticuladas.	80
Figura 18 - Espectros de FTIR das membranas de quitosana/1,4-naftoquinona liofilizadas (a) e por evaporação de solvente (b), neutralizadas e reticuladas.	81
Figura 19 - Difrátogramas de raios X do pó da quitosana, tripolifosfato de sódio e 1,4-naftoquinona.	83
Figura 20 - Difrátogramas de raios X das membranas de quitosana liofilizadas (a) e por evaporação de solvente (b), neutralizadas e reticuladas.	84
Figura 21 - Difrátogramas de raios X das membranas de quitosana/1,4-naftoquinona liofilizadas (a) e por evaporação de solvente (b), neutralizadas e reticuladas.	86
Figura 22 - Micrografias eletrônicas de varredura da superfície das membranas de quitosana liofilizadas, neutralizada (a) QNL e reticuladas (b) QT01L, (c) QT03L, (d) QT05L, com magnitude de 500x, seguidas do corte transversal com magnitude de 100x, respectivamente.	87
Figura 23 - Micrografias eletrônicas de varredura da superfície das membranas liofilizadas de quitosana com 1,4-naftoquinona liofilizadas, neutralizada (a) QN7L e reticuladas (b) QN7T01L, (c) QN7T03L, (d) QN7T05L, com magnitude de 500x, seguidas do corte transversal com magnitude de 100x, respectivamente.	88
Figura 24 - Micrografias eletrônicas de varredura da superfície das membranas de quitosana por evaporação de solvente, neutralizada (a) QNE e reticuladas (b) QT01E, (c) QT03E, (d) QT05E, com magnitude de 500x e 1000x, respectivamente.	89
Figura 25 - Micrografias eletrônicas de varredura da superfície das membranas de quitosana com 1,4-naftoquinona por evaporação de solvente, neutralizadas (a) QN7E e reticuladas (b) QN7T01E, (c) QN7T03E, (d) QN7T05E, com magnitude de 500x e 1000x, respectivamente.	90
Figura 26 - Curvas termogravimétricas dos pós de quitosana, tripolifosfato de sódio e 1,4-naftoquinona.	91
Figura 27 - Curvas termogravimétricas das membranas de quitosana liofilizadas (a) e por evaporação de solvente (b), neutralizadas e reticuladas.	93
Figura 28 - Curvas termogravimétricas das membranas de quitosana com 1,4-naftoquinona liofilizadas (a) e por evaporação de solvente (b), neutralizadas e reticuladas.	94
Figura 29 - Termogramas dos pós de quitosana, tripolifosfato de sódio e 1,4-naftoquinona.	96

Figura 30 - Termogramas das membranas de quitosana liofilizadas (a) e por evaporação de solvente (b), neutralizadas e reticuladas.	97
Figura 31 - Termogramas das membranas de quitosana/1,4-naftoquinona liofilizadas (a) e por evaporação de solvente (b), neutralizadas e reticuladas.....	98
Figura 32 - Medida do ângulo de contato das membranas de quitosana e quitosana/1,4-naftoquinona liofilizadas.	102
Figura 33 - Medida do ângulo de contato das membranas de quitosana e quitosana/1,4-naftoquinona por evaporação de solvente.	103
Figura 34 - Grau de intumescimento das membranas de quitosana e quitosana/1,4-naftoquinona liofilizadas.	104
Figura 35 - Grau de intumescimento das membranas de quitosana e quitosana/1,4-naftoquinona por evaporação de solvente.....	106
Figura 36 - Percentual da viabilidade de fibroblastos L929 nas membranas QN7T05L, QN7T03L, QN7T01L, QN7I e QT05L e cálculo da incerteza.	110
Figura 37 - Espectro da solução de 1,4-naftoquinona, com a absorção máxima em 341 nm.....	113
Figura 38 - Espectro da solução de 1,4-naftoquinona, com a absorção máxima em 341 nm.....	113
Figura 39 - Curva analítica do 1,4-naftoquinona, obtida pelo método espectrofotométrico UV/VIS, no intervalo de concentração entre 50 a 450 $\mu\text{Mol/L}$	114
Figura 40 - Gráfico da concentração de 1,4-naftoquinona liberado a partir das membranas liofilizadas QN7T05L, QN7T03L, QN7T01L e QN7L imersas em PBS durante 14 dias.	117
Figura 41 - Gráfico da concentração de 1,4-naftoquinona liberado a partir das membranas liofilizadas QN7T05E, QN7T03E, QN7T01E e QN7E imersas em PBS durante 14 dias.	118
Figura 42 - Desenho esquemático da distribuição do 1,4-naftoquinona na membrana de quitosana seguida do processo difusional após o contato com a solução, neste caso, PBS.	121
Figura 43 - Desenho esquemático da organização molecular de ambos os tipos de membrana, liofilizada e por evaporação de solvente.....	122

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Diferenças mais comuns entre os tumores benignos e malignos.	23
Tabela 2 - Classificação e tipos de curativos.	34
Tabela 3 - Resumo de alguns tipos de curativos, suas vantagens, desvantagens e possíveis aplicações.	35
Tabela 4 - Tipos de sistemas de liberação controlada.	52
Tabela 5 - Código das membranas confeccionadas.	63
Tabela 6 - Volume e densidade das membranas de quitosana e quitosana/1,4-naftoquinona, liofilizadas, antes e após reticulação e neutralização.	77
Tabela 7 - Principais bandas de absorção nos espectros de FTIR para os pós de quitosana, tripolifosfato de sódio, 1,4-naftoquinona e membranas de quitosana e quitosana/1,4-naftoquinona.	82
Tabela 8 - Valores aproximados da perda de massa, temperatura e massa residual relativos às etapas de decomposição térmica para as membranas de quitosana liofilizadas e por evaporação de solvente, neutralizadas e reticuladas.	93
Tabela 9 - Valores aproximados da perda de massa, temperatura e massa residual relativos às etapas de decomposição térmica para as membranas de quitosana/1,4-naftoquinona liofilizadas e por evaporação de solvente, neutralizadas e reticuladas.	94
Tabela 10 - Valores médios das propriedades mecânicas das membranas de quitosana e quitosana/1,4-naftoquinona liofilizadas QNL, QT01L, QT03L, QT05L, QN7L, QN7T01L, QN7T03L, QN7T05L.	99
Tabela 11 - Valores médios das propriedades mecânicas das membranas de quitosana e quitosana/1,4-naftoquinona por evaporação de solvente QNE, QT01E, QT03E, QT05E, QN7E, QN7T01E, QN7T03E, QN7T05E.	100
Tabela 12 - Perda de massa percentual das membranas de quitosana e quitosana/1,4-naftoquinona liofilizadas submetidas ao ensaio de biodegradação.	108
Tabela 13 - Perda de massa percentual das membranas de quitosana e quitosana/1,4-naftoquinona por evaporação de solvente submetidas ao ensaio de biodegradação.	108
Tabela 14 - Valores da exatidão em três níveis de concentração de 1,4-naftoquinona.	115

Tabela 15 - Dados da precisão do método analítico a partir da concentração de 250 $\mu\text{Mol/L}$ 116

Tabela 16 - Dados da robustez do método analítico a partir da concentração de 250 $\mu\text{Mol/L}$ 116

LISTA DE ABREVIATURAS

CBC	Carcinoma basocelular
CEC	Carcinoma espinocelular
CLAE	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
CPNM	Câncer de pele não melanoma
CPM	Câncer de pele do tipo melanoma
DRX	Difração de Raios X
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EDS	Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X
FDA	Food and Drug Administration
FF	Formas farmacêuticas
FTIR	Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier
GD	Grau de Desacetilação
GI	Grau de Intumescimento
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NaOH	Hidróxido de sódio
NH ₄ OH	Hidróxido de amônio
PCL	Poli caprolactona
PLA	Poliácido láctico
PGA	Poliácido glicólico
PVP	Poli vinil pirrolidona
PMMA	Polimetilmetacrilato
SLC	Sistemas de liberação controlada
SUS	Sistema Único de Saúde
TG	Termogravimetria
TPP	Tripolifosfato de sódio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL:	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	20
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS SOBRE A PELE	21
3.2 O CÂNCER DE PELE	23
3.3 FERIDAS	28
3.4 CURATIVOS	31
3.5 BIOMATERIAIS.....	37
3.6 QUITOSANA.....	39
3.7 1,4-NAFTOQUINONA	46
3.8 LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACO	50
3.9 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	56
4 MATERIAL E MÉTODOS	59
4.1 MATERIAIS.....	59
4.2 METODOLOGIA	59
4.2.1 Preparação das membranas sem e com incorporação de 1,4-naftoquinona	61
4.2.2 Processo de neutralização	61
4.2.3 Desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação do 1,4-naftoquinona	63
4.3 CARACTERIZAÇÕES.....	66
4.3.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	66
4.3.2 Difração de Raios X (DRX)	67
4.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	67
4.3.4 Termogravimetria (TG)	68
4.3.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	68
4.3.6 Ensaio Mecânico de Tração	69
4.3.7 Ensaio de Molhabilidade por Ângulo de Contato	69
4.3.8 Grau de Intumescimento (GI)	70

4.3.9 Biodegradação Enzimática	71
4.3.10 Avaliação da Viabilidade Celular dos Fibroblastos (Citotoxicidade)	72
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	73
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS	76
5.1.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	78
5.1.2 Difração de Raios X (DRX)	83
5.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	87
5.1.4 Termogravimetria (TG/DTG)	90
5.1.5 Calorimetria Exploratória Diferencial	95
5.1.6 Ensaio Mecânico de Tração	98
5.1.7 Ensaio de Molhabilidade por Ângulo de Contato	101
5.1.8 Grau de Intumescimento (GI)	104
5.1.9 Biodegradação Enzimática	107
5.1.10 Avaliação da Viabilidade Celular (Citotoxicidade)	110
5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DO 1,4-NAFTOQUINONA	112
5.2.1 Determinação do Comprimento de Onda do 1,4-naftoquinona	112
5.2.2 Especificidade e Seletividade	113
5.2.3 Linearidade e Intervalo	114
5.2.4 Exatidão	115
5.2.5 Precisão	115
5.2.6 Robustez	116
5.2.7 Limite de Detecção e Limite de Quantificação	117
5.3 LIBERAÇÃO DO 1,4-NAFTOQUINONA A PARTIR DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA	117
6 CONCLUSÕES	123
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	125
REFERÊNCIAS	126

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a estimativa para o biênio 2016-2017 é de aproximadamente 600 mil casos novos de câncer, incluindo o de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema relacionado à essa doença no país, que deverá ter, no intervalo referido 180 mil casos novos, devendo ser, assim, o tipo mais incidente na população brasileira (INCA, 2016).

O aumento dos casos de incidência assume especial gravidade entre o grupo populacional com idade superior a 65 anos, pois a ocorrência dos cânceres de pele não melanoma aumenta com a idade, em especial a incidência do carcinoma epidermóide (INCA, 2016). Some-se a isso, como item de agravamento de cenário, o fato de que, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a porção do segmento supracitado deve passar de 7,4% para 26,7% do total, significando isso a expansão do universo de pessoas dos atuais 14,9 milhões para 58,4 milhões de indivíduos, até o ano de 2060 (IBGE, 2010).

Como as células malignas agem por meio de infiltração da pele, sangue e/ou vasos podem levar ao desenvolvimento de feridas malignas ou úlceras crônicas, com potenciais consideráveis de evolução para lesões ainda mais graves. Tal circunstância reveste de extrema importância a necessidade de se desenvolver métodos de controle/tratamento desse tipo de ferida (SOPATA et al., 2013; FROMANTIN et al., 2014).

A relevância mencionada guarda vinculação com aspectos fisiológicos e suas decorrências psicológicas. Dor intensa, odor repugnante, sangramento, vazamento de exsudato da ferida e infecções resultam, amiúde, em alterações na imagem corporal sucedida de depressão e isolamento social (PROBST; ARBER; FAITHFULL, 2009).

Nesse sentido, os polímeros naturais podem ser empregados na produção de curativos modernos para esse tipo de ferida, devido à biocompatibilidade, à biodegradabilidade, e às propriedades mecânicas ajustadas à promoção de suporte para a migração e proliferação celular voltadas à reparação e regeneração das lesões, destacando-se, nesse contexto, o alginato, a gelatina, a celulose, o colágeno, com sobredestaque para a quitina e a quitosana (YUDANOVA; RESHETOV, 2006; KIM et al., 2008).

A quitosana apresenta importante versatilidade, podendo ser usada na indústria alimentícia, de cosméticos, farmacêutica e médica, e possui características singulares

(biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioadesividade, bioatividade) que fazem dela uma candidata potencial para aplicações biomédicas, constituindo-se em uma alternativa na cicatrização de feridas agudas e crônicas, incluindo a liberação controlada de drogas antineoplásicas, a exemplo da curcumina, piperina e 1,4-naftoquinona (DALLAN, 2005; MUZZARELLI, 2009; NASCIMENTO, 2014; SILVA, 2015; OLIVEIRA, 2015, CRUZ, 2015).

As naftoquinonas e seus derivados naturais e sintéticos possuem uma ampla gama de estruturas e de atividades anticancerígenas, especialmente contra algumas linhagens de células cancerosas. Esse atributo, associado à baixa toxicidade de segmentos desses compostos, as tem qualificado para posterior desenvolvimento como possíveis quimioterápicos contra o câncer (WELLINGTON, 2015).

Em estudos *in vitro* já realizados com o 1,4-naftoquinona observou-se seu potencial citotóxico em relação às células de câncer de cólon, câncer de mama humano, câncer hepatocelular, leucemia e melanoma humano, além da indução de estresse oxidativo, apoptose e danos na membrana celular, tornando-se objeto de diversas pesquisas nesta área (KAYASHIMA et al., 2009; KUMAR et al., 2009; KLAUS et al., 2010; WANG et al., 2015).

Produtos naturais têm provado ser a fonte mais segura e econômica de novos fármacos ou metabólitos secundários com propriedades farmacológicas, especialmente de agentes antineoplásicos. 63% deste tipo de fármaco introduzido nos últimos 25 anos são produtos naturais ou foram delineadas a partir de fontes naturais e quando combinados a anticorpos monoclonais ou polímeros carreadores, podem converter-se em uma terapia mais eficaz (KARIKAS, 2010; HERNÁNDEZ et al., 2016).

A extensa quantidade de materiais poliméricos que estão sendo testados na investigação de sistema de liberação controlada de fármacos se faz importante pelos benefícios apresentados aos pacientes, como a melhoria do efeito terapêutico, diminuição da toxicidade e efeitos colaterais reduzidos. A obtenção de um curativo polimérico de baixo custo associado à uma droga antitumoral pode representar uma possibilidade de controle e cuidado mais efetivo das feridas oncológicas destes indivíduos.

Em razão desse contexto, o objetivo dessa pesquisa foi desenvolver membrana de quitosana para liberação controlada de 1,4-naftoquinona como proposta de curativo para feridas oncológicas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

- Desenvolver membranas de quitosana para liberação controlada do 1,4-naftoquinona como proposta de curativo para feridas oncológicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Preparar membranas à base de quitosana e quitosana/1,4-naftoquinona;
- Caracterizar física e quimicamente as membranas;
- Avaliar a toxicidade *in vitro* do sistema;
- Estudar a degradação das membranas;
- Avaliar a cinética de liberação do 1,4 naftoquinona.

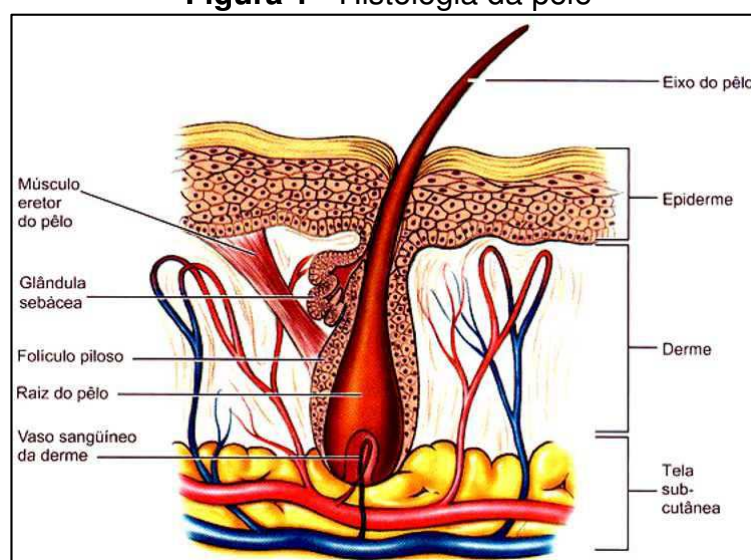
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS SOBRE A PELE

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano e constitui 16% do peso corporal; mede cerca de 1,5 a 2,0 m² aproximadamente em um adulto jovem de estatura mediana. Ela resguarda os órgãos internos, limita a passagem de produtos químicos dentro e fora do corpo, estabiliza a pressão sanguínea, temperatura e media as sensações de calor, frio, toque e dor, além de expressar as emoções. Serve como uma barreira protetora, com papel importante na homeostase, podendo sofrer danos mecânicos, químicos, biológicos e por radiação (GARTNER; HIATT, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; EVANS et al., 2013;).

A condição de órgão externo, em contato direto com o meio e seus elementos, confere-lhe maior exposição a cortes, contusões, queimaduras, mordidas e picadas. Detergentes, resíduos químicos, solventes orgânicos e poluentes podem penetrar na superfície (EVANS et al., 2013). Fármacos tópicos e sistêmicos, produtos de beleza, cosméticos e doenças também podem danificar a pele, que é composta por três camadas de tecidos: a epiderme, derme e hipoderme (gordura subcutânea) (Figura 1), (BARRY, 2005).

Figura 1 - Histologia da pele



Fonte: www.corpohumano1.webnode.pt/sistemas/sistema-tegumentar-2/

A epiderme tem entre suas funções, prevenir a perda de calor e de água para o ambiente e a infiltração de bactérias. É importante no controle da absorção percutânea de fármacos e outros produtos químicos. Em geral, a epiderme possui a camada basal, a espinhosa, a granulosa e a camada córnea (MANDELBAUM et al., 2003; BORGES et al., 2004; BARRY, 2005).

A camada basal contém células em divisão e é dessa camada que resulta todas as outras células da epiderme. A espinhosa tem importante função na coesão da epiderme e na sua resistência ao atrito. A camada granulosa é distinta porque sua célula contém numerosos grânulos, que são envolvidos por membrana e vão contribuir para a constituição do material da camada córnea. Esta última, a mais superficial das camadas, é composta por células achatadas, mortas e sem núcleo, superpostas, e repletas de queratina (COSTA; SPERANCINI, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A derme é constituída de um tecido conjuntivo que sustenta a epiderme e é composta por numerosos fibrócitos, os quais sintetizam as proteínas das fibrilas do colágeno e da elastina que sustentam o tecido. É na derme que se localizam os vasos sanguíneos e linfáticos responsáveis pela nutrição da epiderme e também os nervos e órgãos sensoriais a eles associados. A derme é dividida em derme papilar, derme reticular e hipoderme. Na derme papilar, a função das papilas é aumentar a zona de contato derme-epiderme, proporcionando maior resistência à pele. A derme reticular é responsável pela resistência e elasticidade da pele (COSTA; SPERANCINI, 2001; BORGES et al., 2004).

A hipoderme (gordura subcutânea) é a camada mais profunda da pele, sendo composta em sua maior parte por tecido adiposo; contém os principais vasos e nervos a partir dos quais a derme é suprida, sendo essa camada responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas na qual se apoia. Funciona como amortecedor mecânico e barreira térmica, que sintetiza e estoca rapidamente substâncias energéticas prontamente disponíveis atuando também como isolamento efetivo do calor, como armazenamento de alimentos, além de absorver choques (COSTA; SPERANCINI, 2001; BARRY, 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

3.2 O CÂNCER DE PELE

A pele pode ser atingida por condições patogênicas básicas, como qualquer outro órgão, as quais poderão produzir alterações microscópicas fundamentais e que, macroscopicamente, podem traduzir-se em lesões elementares. Dentre estes fenômenos mencionam-se as neoplasias (BARDINI; LOURENÇO; FISSMER, 2012).

Neoplasia é um termo que designa uma proliferação celular anormal e descontrolada em relação aos demais tecidos normais, que persiste mesmo depois de cessado o estímulo desencadeante, sem um objetivo definido e sem controle fisiológico, persistente e com efeitos agressivos ao organismo. Procede de modificações nos genes que regulam o crescimento, a diferenciação, reparação do DNA e apoptose (KUMAR et al., 2010; MORAES et al., 2016).

O universo das células neoplásicas apresenta dois subtipos designados benigno e maligno, ambos com capacidade de determinar o desenvolvimento de tumores. No caso das malignas (câncer) verifica-se também a possibilidade de formação de tumores à distância, independentes e descontínuos em relação aos tumores primários (KUMAR et al., 2010). A Tabela 1 apresenta as diferenças entre tais tumores.

Tabela 1 - Diferenças mais comuns entre os tumores benignos e malignos.

Crítérios	Benignos	Malignos
Encapsulação	Presença frequente	Geralmente ausente
Crescimento	Lento, expansivo e bem delimitado	Rápido, infiltrativo com delimitação imprecisa
Morfologia	Reproduz o aspecto do tecido de origem	Características diferentes do tecido de origem
Mitoses	Raras e típicas	Frequentes e atípicas
Antigenicidade	Ausente	Presente, porém fraca
Metástases	Não ocorrem	Frequentes

Fonte: INCA (2008).

O termo tumor referia-se anteriormente ao edema originado por uma inflamação. Entretanto, atualmente, o mesmo é considerado sinônimo de neoplasia.

Sua nomenclatura está, geralmente, associada ao componente parenquimatoso (KUMAR et al., 2010).

O câncer de pele tem distribuição universal e costuma apresentar-se sob três principais formas: melanoma; carcinoma basocelular (CBC) e carcinoma espinocelular (CEC), estes dois últimos conhecidos como não melanoma. Embora ambos sejam diferentes ao exame clínico e histopatológico, são parecidos quanto ao diagnóstico, pois apresentam baixa letalidade, e quando diagnosticado precocemente, as chances de cura são elevadas e as metástases são raras. Os fatores de risco para o CBC abrangem queimaduras solares, exposições intermitentes, muita exposição durante a infância, pele/olhos e cabelos claros, doenças ou medicamentos imunossupressores (HIV), histórico familiar de câncer de pele, contato com arsênico; para o CEC tem-se exposição contínua, traumas de repetição, infecção por HPV, dermatite de estase crônica, pacientes transplantados, e lúpus. A baixa mortalidade ainda constitui uma das causas apontadas para a subnotificação do câncer de pele não melanoma em todo o mundo, mesmo com a crescente incidência (COSTA, 2012; INCA, 2014; DIDIER; BRUM; AERTS, 2014; IMANICHI et al., 2017).

O câncer de pele do tipo melanoma (CPM) tem baixa incidência quando comparado aos outros tumores de pele. É mais frequente em populações de pele clara. Abrange a história pessoal ou familiar de melanoma, além da exposição esporádica e intensa ao sol, com conseqüente queimadura solar em mais de um episódio (FERREIRA; NASCIMENTO; ROTTA, 2011; COSTA, 2012).

Seu prognóstico é bom para os tumores localizados, enquanto que para melanomas metastáticos, é reservado, com repercussões mais graves (COSTA, 2012; INCA, 2016). A sua letalidade é elevada, e apresenta uma estimativa de 3 mil casos novos em homens e 2.670 casos novos em mulheres para o ano de 2016. As maiores taxas estimadas em homens e mulheres encontram-se na região Sul do país (INCA, 2016).

As expectativas da *American Cancer Society* para melanoma nos Estados Unidos, no ano de 2016 são que 76.380 novos casos sejam diagnosticados (aproximadamente 46.870 em homens e 29.510 em mulheres). A mortalidade é esperada em aproximadamente 10.130 pessoas (6.750 homens e 3.380 mulheres) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

O melanoma é uma neoplasia maligna, cujo desenvolvimento é resultante de múltiplas e progressivas alterações no DNA celular, causando uma proliferação

descontrolada dos melanócitos, que são células dendríticas localizadas na camada basal da epiderme (GANDINI et al., 2005; DUPRAT NETO; BRECHTBUHL, 2013). Pode ser causado por ativação de proto-oncogenes, por mutações ou deleções de genes supressores tumorais ou por alteração estrutural dos cromossomos (GANDINI et al., 2005). No caso do melanoma hereditário, mutações nos genes CDKN2 e CDK4 aumentam em 60%-90% o risco para essa neoplasia (FREEDBERG et al., 2003).

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) recomenda que as estimativas por ele anunciadas sejam consideradas como mínimas, pois há elevada probabilidade de sub-registro e de sub-diagnóstico (INCA, 2016).

Apesar de não representar ameaça à vida, a imprecisão nos registros de ocorrência dos casos de câncer de pele não melanoma (CPNM) para a saúde pública é danosa, podendo resultar, aos pacientes, prejuízos estéticos significativos, surgidos com mais frequência na pele constantemente exposta à radiação solar, da região da cabeça e do pescoço (COSTA, 2012; INCA, 2014).

A incidência dessa doença vem aumentando, assim como seus custos. Na Austrália, em 2001, o CPNM foi o que gerou mais gasto com o tratamento, custando ao sistema de saúde daquele país US\$ 262 milhões. Nos Estados Unidos, as despesas anuais com o tratamento deste tipo de câncer chegaram a US\$ 650 milhões no ano de 1995; na Alemanha, em 2003, as hospitalizações em decorrência desta doença chegaram ao patamar de US\$ 281 milhões (CHEN, et al., 2006; BAADE et al., 2008; STANG et al., 2008). No Brasil, mesmo com a importante demanda financeira deste tipo de tratamento, não há estimativas detalhadas dos custos para o Sistema Único de Saúde (SUS), visto que informações quanto ao seu diagnóstico e tratamento não são sistematicamente registradas (BÓCOLI et al., 2013).

Esperam-se 80.850 casos novos de câncer de pele não melanoma nos homens e 94.910 nas mulheres no Brasil, em 2016. Esses valores correspondem a um risco estimado de 81,66 casos novos a cada 100 mil homens e 91,98 para cada 100 mil mulheres (INCA, 2016). Na Figura 2 pode ser visualizada a estimativa de casos novos de câncer para o estado da Paraíba e sua capital.

Figura 2 - Estimativas para o ano de 2016 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária. Paraíba/João Pessoa.

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estado		Capital		Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	1.040	54,49	190	53,56	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	800	39,50	250	62,69
Colo do Útero	-	-	-	-	330	16,21	80	19,39
Traqueia, Brônquio e Pulmão	180	9,37	50	14,73	150	7,50	40	10,22
Cólon e Reto	120	6,20	40	10,75	150	7,42	50	12,86
Estômago	230	12,10	50	13,17	180	8,90	30	8,48
Cavidade Oral	150	8,15	30	9,42	110	5,66	20	5,79
Laringe	130	6,65	30	9,80	40	1,92	**	1,89
Bexiga	70	3,62	20	4,42	40	2,04	**	2,74
Esôfago	100	5,54	20	5,40	50	2,30	**	1,28
Ovário	-	-	-	-	90	4,38	30	6,41
Linfoma de Hodgkin	**	0,79	**	1,35	**	0,49	**	0,49
Linfoma não Hodgkin	80	4,24	20	6,77	50	2,64	20	5,71
Glândula Tireoide	60	3,30	**	3,66	170	8,20	50	11,73
Sistema Nervoso Central	90	4,82	20	7,15	80	3,91	20	5,44
Leucemias	90	4,70	20	6,40	90	4,64	20	6,06
Corpo do Útero	-	-	-	-	100	4,94	30	7,29
Pele Melanoma	40	2,09	**	3,23	30	1,34	**	1,34
Outras Localizações	710	37,49	150	42,41	650	32,33	170	41,23
Subtotal	3.100	162,96	670	190,23	3.120	154,07	860	213,82
Pele não Melanoma	1.010	53,05	120	32,96	1.020	50,51	160	39,53
Todas as Neoplasias	4.110	216,06	790	224,30	4.140	204,44	1.020	253,60

Fonte: INCA, (2016).

Muito embora as pessoas sejam cientes dos riscos, alertadas que são por meio de campanhas de informação e prevenção vinculadas na mídia, especialmente na época do verão, as afecções patológicas relacionadas ao câncer de pele ainda aumentam de forma considerável, circunstância que desperta acentuada preocupação na comunidade científica, sobremaneira por também revelar o recrudescimento dos casos da patologia entre indivíduos jovens (IRANZO et al., 2015).

Para auxiliar na identificação dos sinais que constituem um alerta sobre a possibilidade de um câncer de pele, foi elaborada a regra do ABCDE, sugerida pela Sociedade Brasileira de Dermatologia (2016): As lesões consideradas suspeitas são as que preenchem os seguintes critérios: A = assimetria; B = bordas irregulares; C =

coloração mista; D = diâmetro maior ou igual a 5 mm; E = evolução, segundo a Figura 3.

Figura 3 - Regra do ABCDE

	Sinais de nascença	Melanoma
A ssimetria Qual é o formato?	Bem redondo e simétrico	Assimétrico
B ordas Qual a aparência das bordas?	Regular e geométrico	Irregular e com bordas recortadas
C or Quantas cores?	Uma	Diversas
D imensão Qual é o tamanho?	Pequena (< 5 mm)	Grande (> 5 mm)
E volução Você notou alguma alteração recente em um do critérios supra?		

Fonte: <http://www.helenabordon.com/a-pele-nos-da-sinais/> (2016)

As ações que envolvem proteção individual contra luz solar, como prevenção primária são efetivas e de custo relativamente baixo para prevenção do câncer de pele. Neste nível, ainda podem ser incluídas ações de educação em saúde para a população e a promoção de ambientes que propiciem a proteção contra as radiações solares, principalmente nos locais de lazer e trabalho. Em relação à proteção secundária, esta se baseia no diagnóstico precoce e acurado de lesões iniciais e com dimensões menores, o que implica menor chance de deformidades/cicatrizes e até mesmo preservar a vida do paciente, no caso do melanoma (COSTA, 2012; INCA, 2014).

As células malignas que se infiltram pela pele, sangue e/ou vasos linfáticos podem levar ao desenvolvimento de feridas malignas ou úlceras crônicas e estas, na

maioria das vezes, geram lesões irreversíveis, a exemplo de quando atingem áreas da face como periocular, cavidade nasal e orelha, o que pode causar disfunção do órgão afetado e produzir deformidades, sendo necessárias cirurgias plásticas. Tal condição é considerada um problema de saúde pública, visto utilizar recursos que são destinados ao tratamento ao invés da prevenção, além de agravar a qualidade de vida do indivíduo acometido, sendo de extrema importância encontrar métodos de controlar/tratar este tipo de ferida (SOPATA et al., 2013; FROMANTIN et al., 2014; IMANICHI et al., 2017).

A ocorrência de câncer da pele de grandes volumes é uma realidade no Brasil, e sua negligência procede da carência de informação dos pacientes, baixo nível socioeconômico e cultural da população, bem como erros diagnósticos por parte da equipe de saúde durante o primeiro atendimento ao paciente. O atraso no diagnóstico e na realização da conduta adequada pode alterar a história natural da doença, aumentando os riscos de recidiva, metástase e óbito (ESPÓSITO et al., 2017).

3.3 FERIDAS

Ferida pode ser conceituada como qualquer ruptura da integridade da pele, membranas, mucosas ou de qualquer outra estrutura corporal. Pode ter como causas os traumas físicos ou ser desencadeada por uma afecção clínica, apresentando-se de diversas formas, tamanhos e profundidades (CESARETTI, 1998; BORGES et al., 2001).

Traumatismos, queimaduras, úlceras por pressão, úlceras por hipertensão venosa, feridas em membros inferiores de indivíduos diabéticos e feridas por radioterapia são exemplos de algumas das etiologias de feridas encontradas na prática clínica. Quanto à complexidade, têm-se as feridas simples e as complexas. Definem-se feridas simples como aquelas que evoluem espontaneamente para a resolução, seguindo os três estágios principais da cicatrização fisiológica: inflamação, proliferação celular e remodelagem tecidual (ISAAC et al., 2010).

As feridas complexas são lesões que acometem áreas extensas e/ou profundas, que necessitam de recursos especiais para sua resolução; têm seu processo de evolução natural alterado e representam ameaça à viabilidade de um membro ou são feridas recorrentes que reabram ou necessitam de tratamento mais

elaborado (FERREIRA et al., 2006). Quanto ao tempo, essas feridas são classificadas como agudas ou crônicas. A primeira se refere aos ferimentos formados de maneira recente e a segunda tem um tempo de cicatrização maior que o esperado, devido à sua etiologia (GOMES; COSTA; MARIANO, 2005).

As feridas malignas podem ser provenientes de câncer primário na pele ou de metástases e são caracterizadas pelo crescimento desordenado das células, que invadem tecidos e órgãos e multiplicam-se rapidamente e de maneira descontrolada, dando origem aos tumores malignos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; FROMANTIN et al., 2014; GOZZO, et al., 2014; AZEVEDO et al., 2014a). Quanto ao seu aspecto, podem ser classificadas em: a) Feridas ulcerativas malignas, quando estão ulceradas e formam crateras rasas, b) Feridas fungosas malignas, quando são semelhantes à couve-flor e, c) Feridas fungosas malignas ulceradas, união do aspecto vegetativo e partes ulceradas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Avalia-se que essas lesões venham a acometer, entre 5% a 10% dos indivíduos com câncer metastático ou com tumor primário, ou seja, pode se desenvolver em estágios iniciais, como no câncer de pele, ou na fase terminal da doença; entretanto, os cânceres de pele, mama, cabeça e pescoço são os mais frequentes para o surgimento dessas feridas (GOZZO et al., 2014; AZEVEDO et al., 2014a).

O processo dessas feridas compreende três situações descritas a seguir: a) crescimento do tumor, o que leva ao rompimento da pele; b) neovascularização, o que provê substratos para o crescimento tumoral e, c) invasão da membrana basal das células saudáveis, onde há processo de crescimento expansivo da ferida sobre a superfície acometida.

Com o crescimento anormal e desorganizado, tem-se a formação, no sítio da ferida, de agregados de massa tumoral necrótica, onde ocorre contaminação por micro-organismos aeróbicos (por exemplo: *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*) e anaeróbicos (bacteroides). O produto final do metabolismo desses micro-organismos são os ácidos graxos voláteis de cadeia curta (ácido acético, caproico), além dos gases putrescina e cadaverina, que desencadeiam odor fétido às feridas tumorais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Esses tumores, quando cutâneos, apresentam-se inicialmente na forma de uma ou várias feridas que não cicatrizam, com coloração variável. Além disso, características importantes como lesões friáveis, dolorosas, sangramento, exsudação intensa, odor fétido, além de um progressivo desfiguramento corporal podem ser

observados nesses tipos de feridas (POLETTI et al., 2002; GOMES; CAMARGO, 2004; FROMANTIN et al., 2014; GOZZO et al., 2014).

Tais observações exigem cuidados paliativos com o objetivo de aliviar os sintomas e melhorar a qualidade de vida do paciente e sua família, em função da reduzida chance de cura, da sensação de perda de dignidade, da independência e do estigma da lesão tumoral (AZEVEDO et al., 2014a; AZEVEDO et al., 2014b).

As feridas oncológicas apresentam elevada relevância na atualidade, visto que o câncer de pele corresponde ao tipo mais incidente para ambos os sexos no Brasil e, embora sua letalidade seja considerada baixa, em alguns casos nos quais há demora no diagnóstico, esse câncer pode levar a ulcerações e deformidades físicas graves e morte, como no caso de epiteloma espinocelular e melanoma (CUSTÓDIO et al., 2010; INCA, 2014). São diversos os fatores que levam à negligência desse tipo de tumor, dentre eles a idade avançada e baixo nível socioeconômico e educacional do paciente. O abandono do seguimento clínico após a cirurgia também sugere que o indivíduo acometido não compreendeu a gravidade da doença e suas consequências (ESPÓSITO et al., 2017).

No que se refere à avaliação dessas feridas, é importante considerar desde o quadro clínico geral até a situação psicológica e emocional do paciente. Na observação e caracterização da lesão cutânea propriamente dita, deve-se verificar a localização anatômica, grau de contaminação, tipo de tecido, tamanho da lesão, profundidade, formação de túneis e cistos, bordas, leito da ferida, condição da pele circunjacente, características do exsudato, presença de corpos estranhos, presença de dor, hipersensibilidade, temperatura e odor (AZEVEDO et al., 2014a).

As feridas associadas ao câncer de pele apresentam cicatrização difícil e não respondem bem aos tratamentos convencionais, mesmo após o tratamento cirúrgico. Salienta-se que as feridas associadas ao câncer precisam sofrer excisão além dos limites da lesão, deixando as margens livres de neoplasia ou células malignas, pois há o risco de recidiva da lesão através das células malignas que ficaram no local, perifericamente às margens da ferida operatória (MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009; PEREIRA FILHO; BICALHO; SILVA, 2012).

Os pacientes portadores destas feridas, sob tratamento pela radioterapia e quimioterapia, apresentam importante resposta a redução e involução do processo desfigurante que elas provocam. Tal contexto reforça a utilização de produtos cicatrizantes. Entretanto, ao se considerar que a recidiva do tumor pode ser

consequência de uma única célula alterada, questiona-se o uso dos produtos cicatrizantes, visto que eles induzem a divisão celular para fins de reparação tecidual.

Os pacientes excluídos da fase de tratamento curativo, à medida que o quadro clínico se agrava, caminham para o avanço progressivo da ferida neoplásica, onde o tecido necrótico se prolifera e o uso dos antissépticos, considerados citotóxicos para o tecido de granulação, passa a ser útil, pois a cicatrização não é a meta. A meta é alcançar o controle da secreção e do odor, sangramento, dor e prurido, além de um curativo confortável, funcional e estético (AGUIAR; SILVA, 2012).

Dentre as estratégias de tratamento direcionadas aos indivíduos com feridas malignas, tem-se: radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e laserterapia. Todavia, a terapia tópica é a que proporciona melhores resultados, é mais acessível, envolve diversos produtos e tem um custo inferior às mencionadas anteriormente, e abrange a utilização de curativos e coberturas (AZEVEDO et al., 2014a).

Durante o processo de cicatrização das feridas, os curativos são utilizados para regeneração e reparo dos tecidos da derme e epiderme. Os materiais para curativos destas feridas funcionam, basicamente, como barreiras físicas permeáveis para manter a umidade e oxigenação, e proteger a ferida, principalmente contra microorganismos (ADAMIAN et al., 2004) .

3.4 CURATIVOS

Os primeiros registros históricos de aplicações de materiais considerados como curativos são datados dos tempos egípcios, muito embora se saiba que este tipo de procedimento foi realizado desde os tempos da pré-história, com aplicações de extratos de plantas, água, neve, gelo, frutas e lama sobre as feridas. O termo curativo é muito amplo e consiste no conjunto de procedimentos que envolvem limpeza, cobertura da ferida, desbridamento, absorção e drenagem de exsudatos, tendo como objetivo o favorecimento da cicatrização (FRANCO; GONÇALVES, 2008; SMANIOTTO et al., 2012).

Esse processo pode levar ao restabelecimento da parte afetada pela síntese da cicatriz, composta essencialmente de tecido colagenoso, porém diferente do tecido normal. A cicatrização pode ser uma resposta efetiva à lesão, mas não acarreta em um restabelecimento da estrutura e função normal do tecido (WILLIAMS, 2006).

Cada ferida, dependendo de suas características, possui um curativo específico. Para escolher os curativos ideais para tratar uma ferida, essa deve ser avaliada regularmente por mudanças no tamanho, profundidade, quantidade de exsudato e infecção (JONES; MILTON, 2000; AGARWAL et al., 2011).

A camada do curativo em contato direto com a ferida é chamada de camada de contato; esta pode mudar radicalmente as suas características conforme a sua aplicação. Idealmente, na maioria dos ferimentos, a camada de contato permite a comunicação do leito da ferida com as camadas mais profundas do curativo, sem causar danos epiteliais quando são trocados, pois não são aderentes. Ela deve controlar a dor, proteger as estruturas vitais, tais como tendões, e permitir a drenagem para seguir-se à segunda camada. As demais camadas do curativo são conhecidas como curativos secundários, e geralmente consistem de felpas ou gaze, preenchimento que pode funcionar para fornecer suporte para o curativo primário, fornecer barreira às bactérias e água, absorver os fluidos da ferida, ou selar a ferida em oclusiva ou semi-oclusiva (HANNA; GIACOPELLI, 1997; JAYAKUMAR et al., 2011).

A escolha do material adequado para o curativo depende de fatores intrínsecos e extrínsecos, e deve ser baseada no conhecimento tanto fisiopatológico como bioquímico dos mecanismos de cicatrização e reparação tissular (SMANIOTTO et al., 2012).

Quando a integridade da pele é alterada, inicia-se a cicatrização, que é um processo complexo, envolvendo a interação entre células estromais e circulatórias que são ativadas por um conjunto de mediadores químicos, fragmentos de células e matriz celular, microorganismos e alterações físico-químicas do microambiente da lesão e áreas circunvizinhas. A fase inflamatória ou exsudativa inicia-se logo após a lesão, com formação de rede de fibrina e migração de neutrófilos e macrófagos, com o objetivo de remover tecidos desvitalizados (BALBINO; MOREIRA; CURI, 2005).

A fase proliferativa é dividida em três subfases e é responsável pela formação do tecido de granulação. A primeira subfase é a reepitelização que ocorre pela migração de queratinócitos das bordas e anexos remanescentes; a segunda é a fibroplasia, na qual ocorre proliferação de fibroblastos e produção de colágeno, elastina e outras proteínas; a terceira é a angiogênese que ocorre paralelamente à fibroplasia, onde os novos vasos darão suporte à formação da nova matriz. A última fase é a de maturação ou remodelação, onde ocorre a substituição do colágeno tipo

3 pelo tipo 1, absorção de água, diminuição do número de vasos, o que pode acontecer entre 6 meses a 2 anos (MANDELBAUM; DISANTIS; MANDELBAUM, 2003; BALBINO; MOREIRA; CURI, 2005).

Com base na natureza da ferida e quantidade de tecido lesado, as lesões cutâneas podem ter uma cicatrização por primeira ou por segunda intenção. A cicatrização por primeira intenção ocorre por aproximação das bordas, com menor quantidade de colágeno e reduzido o tempo de recuperação; já a cicatrização por segunda intenção, é um processo mais lento, com alto risco de infecção, produzindo retração cicatricial, cicatrizes extensas e alto custo de tratamento (HESS, 2002).

O tratamento das feridas cutâneas é dinâmico e depende, a cada momento, da evolução das fases de cicatrização. Alguns aspectos devem ser considerados no momento da escolha do tipo de curativo: adequação à natureza, à localização e ao tamanho da ferida (FRANCO; GONÇALVES, 2008; SMANIOTTO et al., 2012).

Existem quatro tipos de curativos que são: a) Curativo semi-oclusivo: é absorvente e comumente utilizado em feridas cirúrgicas, drenos, feridas exsudativas, absorvendo o exsudato e isolando-o da pele adjacente saudável; b) Curativo oclusivo: atua como barreira mecânica, impede a perda de fluidos, promove isolamento térmico, veda a ferida, a fim de impedir enfisema, e formação de crosta; c) Curativo compressivo: utilizado para reduzir o fluxo sanguíneo, promover a estase e ajudar na aproximação das extremidades da lesão e por fim, d) Curativo aberto que é realizado em ferimentos que não há necessidade de serem ocluídos como cortes pequenos, suturas e escoriações (GOMES; COSTA; MARIANO, 2005).

Os curativos mais indicados para as feridas malignas são os oclusivos, devido à necessidade de absorção do exsudato, sangramento e controle do odor, da dor e do prurido. O curativo também deve ser confortável, funcional e estético, preenchendo as cavidades, sendo proporcional à lesão, sem alterar a anatomia e a autoimagem do indivíduo (AGUIAR; SILVA, 2012).

Outra classificação sugerida por Fan et al., (2011) menciona que os curativos podem ser classificados em curativos passivos, curativos com princípios ativos, curativos inteligentes e curativos biológicos, conforme observado na Tabela 2.

Tabela 2 - Classificação e tipos de curativos.

Classificação	Tipos
Curativos passivos	Curativo não-aderente Filme transparente Espuma polimérica Hidrocoloide Hidrogel
Curativo com princípios ativos	Alginato Carvão ativado Placas de prata
Curativos inteligentes	Matriz de colágeno Matriz de celulose
Curativos biológicos	Curativos biológicos

Fonte: Fan et al., (2011).

Existem alguns pré-requisitos básicos a serem considerados nos curativos: ter a boa tolerância dérmica; favorecer a aplicação de medicação tópica, o conforto físico e psicológico do paciente; possuir a capacidade de remover/absorver a drenagem das secreções, manter a umidade entre a lesão e o curativo, apresentar impermeabilidade a bactérias, ser isento de partículas e de compostos tóxicos contaminadores, permitir troca gasosa, fornecer isolamento térmico, ser permeável aos raios-x e/ou exames, não aderir à lesão, evitando traumas durante a sua retirada, e comprimir, sustentar ou imobilizar o ferimento. Ainda devem ser mencionados o menor custo, a aparência atrativa, isento de odor, promover menor dor e reparação mais rápida da ferida (BORGES; CHIANCA, 2000; GEOVANINI; O. JÚNIOR; PALERMO, 2008; SMANIOTTO et al., 2012).

Há muitos curativos disponíveis no mercado associados a coberturas, nas quais são aplicadas substâncias farmacológicas de uso tópico (por exemplo, sulfadiazina de prata, metronidazol e curativos de carvão ativado) que têm sido utilizados para feridas, com vistas a limpar, controlar o sangramento, exsudato e o odor fétido, mas nenhum foi projetado especificamente para este tipo de lesão maligna (FROMANTIN et al., 2014; AZEVEDO et al., 2014b; GOZZO et al., 2014).

A Tabela 3 apresenta alguns tipos de curativos e suas possíveis aplicações, a depender do tipo de ferida.

Tabela 3 - Resumo de alguns tipos de curativos, suas vantagens, desvantagens e possíveis aplicações.

Curativos	Vantagens	Desvantagens	Aplicações
Gazes	Baratas e acessíveis	Curativo seco de baixa proteção contra bactérias	Limpeza e proteção de feridas profundas
Filmes	Retém a umidade, são transparentes e protegem a ferida de contaminações	Aprisiona o fluido, descama a pele	Feridas com mínima exsudação
Hidrogéis	Retém a umidade, não causa traumas em sua remoção, alivia as dores	Pode causar uma hiperidratação	Feridas secas e doloridas
Alginatos	Altamente absorventes e hemostáticos	Detritos fibrosos	Feridas com exsudação de moderada a elevada
Curativos de desodorização	Feitos a partir de carvão ativado, capaz de absorver moléculas de gás	O curativo não pode ser cortado para não liberar o carvão ativado na lesão	Podem ser utilizados como curativos primários ou secundários para conter odores em feridas infectadas ou malignas
Curativos à base de prata	Utilizado como agente antimicrobiano	O curativo não pode ser cortado para não liberar prata na lesão	Combate à atividade antimicrobiana, reduz ou elimina odores
Curativo com ácido graxo essencial (AGE)	Promove quimiotaxia e angiogênese, mantém o meio úmido	Necessita de um curativo secundário	Feridas abertas com ou sem infecção
Hidrocolóide	Estimula a angiogênese e o desbridamento autolítico	Nas primeiras trocas poderá ocorrer odor desagradável devido à remoção de tecidos desvitalizados	Feridas abertas, não infectadas, com leve a moderada exsudação
Curativo de hidropolímero	Proporciona um ambiente úmido, absorve o exsudato e estimula o desbridamento autolítico	Não pode ser utilizado em feridas infectadas ou com necrose	Feridas abertas não infectadas, com baixa a moderada exsudação

Fonte: Fonder et al., (2008); Geovanini, O. Júnior e Palermo (2008); Madhumathi et al., (2010).

Uma solução baseada em miltefosina (Miltex®, Baxter, UK) está disponível para o tratamento de metástases cutâneas de câncer de mama e sua aplicação é restrita a nódulos subcutâneos e/ou ulcerações de pequeno porte (FROMANTIN et al., 2014). O uso apropriado de um produto para a efetivação de um curativo que venha a reduzir os sinais e sintomas relacionados a esse tipo de ferida tem sido mencionado como uma peça-chave no controle desta (GOZZO et al., 2014).

Esforços estão direcionados a utilização de produtos de origem biológica como quitina e seus derivados, que são capazes de acelerar o processo de cura em níveis molecular, celular e sistêmico (ALMEIDA, 2009; JAYAKUMAR et al., 2011; NERY, 2014). Estratégias atuais de pesquisadores para o tratamento de lesões focam na aceleração da restauração da ferida através do desenvolvimento sistemático de biomateriais que possam ser utilizados como curativos *eco-friendly* e sustentáveis (AHAMED et al., 2015).

A quitosana, derivada da desacetilação da quitina, tem sido amplamente utilizada em aplicações médicas. Devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, atividade antimicrobiana e propriedade hemostática; vários curativos à base de quitosana já foram produzidos, a exemplo do curativo da Hemcon®, aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), capaz de cessar o sangramento após uma lesão e pode funcionar como uma barreira contra bactérias (HUANG et al., 2015; DREIFKE; JAYASURIYA; JAYASURIYA, 2015).

Um dispositivo de quimioterapia local (filmes) utilizando quitosana como sistema carreador de fármaco e o ácido elágico (EA) como uma droga anticâncer foi elaborado por pesquisadores nas concentrações de 0, 0,05, 0,1, 0,5, e 1% (m/v). A linhagem de células de melanoma humana WM115 foi usada como modelo de câncer de pele para avaliar a resposta celular dos filmes, e a linhagem celular de fibroblastos de recém-nascido humano, HS68, foi usado como controle. Os filmes de quitosana com 0,5 e 1% (m/v) demonstraram ter um efeito antiproliferativo potente sobre as células de melanoma através da indução da morte celular por apoptose, demonstrando que o filme produzido pode ser potencialmente utilizado na quimioterapia local (KIM et al., 2008).

A quitosana exerce influência positiva em várias etapas do complexo processo de cicatrização da ferida. Gradualmente ela irá despolimerizar em N-acetil-d-glucosamina, que inicia a proliferação de fibroblastos, auxilia na deposição ordenada de colágeno e estimula níveis elevados de síntese de ácido hialurônico natural, no

local da ferida (ARCHANA et al., 2015). Foi relatado que possui atividade hemostática, através da ativação de plaquetas e, em feridas tratadas com quitosana, observou-se também, um aumento da infiltração de células inflamatórias e uma atividade angiogênica, promovendo cicatrização da ferida (BOUCARD et al., 2007; LORD et al., 2011).

Em um estudo com filme preparado à base de quitosana, poli vinil pirrolidona (PVP) e nanopartículas de óxido de prata observou-se excelentes resultados para aplicações em processos de cicatrização. Além de uma boa capacidade de dilatação que é um dos fatores importantes para a redução do risco de desidratação de feridas, também apresentou boa atividade antibacteriana (ARCHANA et al., 2015).

Kumar e colaboradores (2012) avaliaram uma bandagem de hidrogel de quitosana/nanonanocompósito de óxido de zinco e verificaram taxa controlada de degradação, reforço da coagulação sanguínea, excelente capacidade de ativação plaquetária, cicatrização melhorada, sem causar toxicidade para células saudáveis e atividade antibacteriana, o que incentiva o uso dessas bandagens/compósitos para queimaduras, feridas crônicas e úlceras do pé diabético.

3.5 BIOMATERIAIS

Os biomateriais podem ser conceituados como materiais sintéticos ou naturais, destinados a interface com sistemas biológicos, utilizados para interagir, no todo ou em parte do organismo vivo humano e animal, com a finalidade de avaliar, tratar, aumentar ou substituir quaisquer tecidos, órgãos ou funções (TABATA, 2009; WILLIAMS, 2009; KUMBHAR; PAWAR, 2017).

Devem ser atóxicos, anticarcinogênicos, antimutagênicos e não desencadear uma resposta imune, visto que são desenvolvidos com o objetivo de interação com o organismo vivo. Dentre os biomateriais naturais encontram-se os de origem polimérica como a quitosana, colágeno, celulose e de origem cerâmica, como a hidroxiapatita de osso animal. Já entre os sintéticos, encontram-se os metais, polímeros sintéticos, cerâmicas e os compósitos (ALVARADO, 2012; NERY, 2014).

Os biomateriais podem ser classificados de acordo com duas vertentes: a sua composição química e o seu comportamento biológico. A primeira subdivide os biomateriais em 4 classes: a) metais e ligas metálicas – utilizados para substituição

óssea e de articulações, reconstituição e implantes dentários; b) cerâmicos – usados na substituição de articulações, substituição, aumento e reconstituição óssea; c) polímeros – usados em sistemas de liberação de fármacos, substituição de articulações, reconstituição dentária e d) compósitos – utilizados na reconstituição óssea e dentária, substituição óssea e de articulações (WILLIAMS; CAHN; BEVER, 1990; GUTIERRES et al., 2006).

Quanto à classificação segundo o comportamento biológico, esta é baseada na resposta do tecido hospedeiro: 1. Bioinertes - são aqueles que provocam reação mínima no organismo, encontrando-se em ligação direta ao tecido receptor, a exemplo do titânio; 2. Biotolerados - são moderadamente aceitos pelo tecido receptor, induzindo geralmente a formação de uma fina cápsula fibrosa, seu exemplo é o aço inoxidável e o polimetilmetacrilato (PMMA); 3. Bioativos - nestes existe uma interação direta entre os tecidos vivos e o biomaterial, onde este induz a uma resposta positiva, a exemplo da aceleração do processo cicatricial pela quitosana; 4. Reabsorvíveis - aqueles que são lentamente degradáveis e gradualmente substituídos pelos tecidos onde são implantados (WILLIAMS; CAHN; BEVER, 1990; GUTIERRES et al., 2006).

Ao se intencionar o uso de um biomaterial, ele deve respeitar alguns pré-requisitos como biocompatibilidade (a habilidade do material e de seus possíveis produtos de degradação serem tolerados pelos tecidos envoltórios e não causarem prejuízos aos organismos em curto e longo prazo), a biodegradabilidade (fenômeno em que o material é degradado ou solubilizado em fluidos tissulares, desaparecendo do sítio de implantação), e a velocidade de degradação do material (PEREIRA; VASCONCELOS; ORÉFICE, 1999; RIBEIRO, 2009; TABATA, 2009).

Ao se observar a evolução dos biomateriais, estas considerações sobre biocompatibilidade e biodegradabilidade fazem parte de uma segunda geração de biomateriais. Na primeira geração, foram desenvolvidos os materiais considerados bioinertes, cujo objetivo para seu desenvolvimento era o de não induzir reação de corpo estranho no organismo (HENCH, 1980). A terceira geração compreende os materiais capazes de estimular respostas celulares específicas em nível molecular (HENCH; POLAK, 2002).

A quarta geração é demonstrada a partir do início de 2010 como uma potencialidade nos processos de formação de tecidos moles ou duros. Infere-se que esta geração será a responsável pela utilização da nanotecnologia, dos nanomateriais e que conduzirá a compreensão dos processos de formação de tecido ósseo,

abrangendo os processos de osseoindução, osseointegração e da formação de um novo tecido ósseo, através da engenharia de tecidos, e ainda fixação de implantes e a liberação controlada de fármacos (MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005).

Por essas gerações representarem uma evolução nas propriedades dos materiais envolvidos, de acordo com as necessidades e exigências que surgiam, elas são interpretadas de forma conceitual e não cronológica (NAVARRO et al., 2008).

A ciência dos biomateriais é uma área multidisciplinar. Compreende não apenas o desenvolvimento de produtos a serem utilizados como substitutos de tecidos danificados, mas o entendimento das interações destes com o organismo receptor, devendo ser, dessa forma, biocompatível e biofuncional (VERT, 2007).

Na área de regeneração tecidual, pesquisas têm sido desenvolvidas para a obtenção de biomateriais que tenham a propriedade de preencher temporariamente a região lesada, até que o processo cicatricial se concretize ou que se direcione esse processo regenerativo, com o desenvolvimento de potenciais curativos para tratamento de lesões cutâneas, aumentando a qualidade de vida e o bem-estar dos pacientes; dentre os polímeros de origem natural, tem-se a quitosana, que apresenta importante relevância (NERY, 2014).

3.6 QUITOSANA

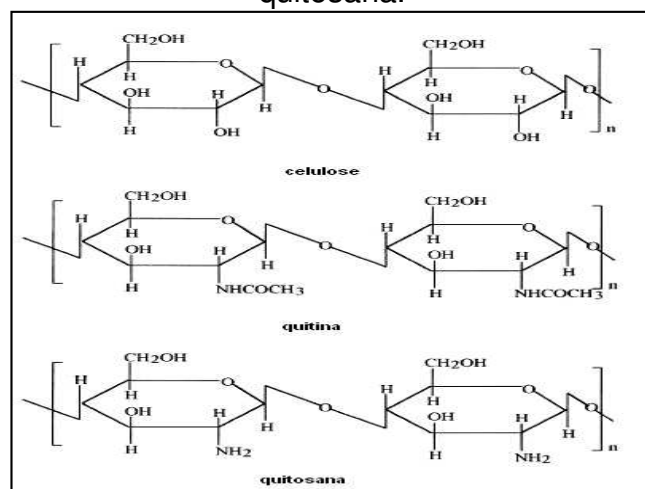
A quitosana é um polímero natural, atóxico, biocompatível, biodegradável, abundante, renovável e de importância econômica e ambiental. Ela é obtida a partir de exoesqueleto de insetos, artrópodes, tais como camarões, caranguejos, lagostas e krills, rejeitos dos mariscos processados pela indústria pesqueira, que em algumas situações são considerados poluentes. Seu emprego diminui o impacto ambiental causado pelo acúmulo nos ambientes onde é gerado ou estocado (AZEVEDO et al., 2007; RIVEROA; GARCÍA; PINOTTI, 2010).

Os Estados Unidos e o Japão são considerados os maiores produtores mundiais de quitosana, produção esta que tem aumentado devido à sua crescente utilização em diversas áreas (MOURA et al., 2006).

A quitosana é um polissacarídeo composto por N-acetil-2-desoxi-D-glucosamina e 2-amino-2-desoxi-D-glucosamina, catiônico, semicristalino, de cadeia linear, derivado do processo de desacetilação da quitina, sendo o segundo composto

orgânico mais abundante da natureza, ficando atrás apenas da celulose (Figura 4) (AZEVEDO, 2007).

Figura 4 - Comparação das estruturas moleculares da celulose, da quitina e da quitosana.



Fonte: Azevedo (2007).

A quitina foi isolada de cogumelos, pela primeira vez em 1811, pelo professor francês Henri Braconnot o qual a nomeou como fungina. Em 1823, Odier isolou uma substância insolúvel contida na carapaça dos insetos e passou a chamá-la de quitina, palavra derivada do grego *Chiton*, que significa carapaça ou caixa protetora (RAVI KUMAR, 2000). O pesquisador afirmou que se tratava da mesma substância encontrada nas plantas, a celulose, porém, em 1843, Payen detectou que a quitina continha nitrogênio em sua estrutura e a diferenciou da celulose (ALMEIDA, 2009).

O processo de desacetilação da quitina é resultante de uma solução aquosa 40-45% (m/v) de hidróxido de sódio (NaOH) a uma temperatura de 90-120°C durante 4-5h. As condições utilizadas para a desacetilação determinam o peso molecular do polímero e o grau de desacetilação da quitosana, que representa a porcentagem de grupos NH_2 livres. Quando o grau de desacetilação da quitina alcança aproximadamente 50%, o polímero torna-se solúvel em soluções aquosas de ácidos fracos e passa a ser chamado de quitosana. Contudo, a solubilidade da quitosana também depende de outros parâmetros como peso molecular e concentração do ácido utilizado (DASH et al., 2011).

A massa molecular da quitosana varia de 100.000g/mol a 1.000.000 g/mol. As classificações quanto à massa são: Baixa Massa Molecular (100.000 g/mol ou 150 KDa); Média Massa Molecular (500.000 g/mol ou 150 e 700 KDa) e Elevado Peso

Molecular (1.000.000 g/mol ou acima de 700 KDa) (MUZZARELLI, 2009; WONG, 2009).

Outra forma de se conseguir a quitosana é através da desacetilação microbiológica com microorganismos ou enzimas exclusivas. O grau de desacetilação, que é representado pela percentagem de grupos aminos livres é um relevante parâmetro que influencia nas propriedades físico-químicas e nas aplicações da quitosana, estando compreendido entre 60 e 95% (DALLAN, 2005; MALAFAYA; SILVA; REIS, 2007).

Os principais fatores que afetam a eficiência da desacetilação e as características da quitosana são a temperatura e tempo de reação; concentração da solução de álcali e adição de diluente (alcoóis de cadeia curta e cetonas são empregados); razão quitina/álcali; tamanho das partículas de quitina; atmosfera da reação e presença de agentes que evitem a despolimerização (AZEVEDO et al., 2007).

O elevado número de grupos aminos livres na cadeia de quitosana a torna susceptível a variações de pH, dessa forma a sua solubilidade em meio aquoso ácido é promovida pela protonação destes grupos livres que passam de NH_2 para NH_3^+ (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006). O ácido acético e o fórmico são os mais usados para a solubilização da quitosana. Alguns ácidos inorgânicos diluídos, como o ácido nítrico, clorídrico, perclórico e fosfórico, também podem ser utilizados para preparar uma dispersão da quitosana, porém apenas após prolongada agitação e aquecimento. Misturas como dimetilformamida com tetróxido de dinitrogênio numa proporção de 3:1 também podem ser utilizados como solventes (DAMIAN et al., 2005; SILVA; SANTOS FERREIRA, 2006; LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

Posteriormente à sua dissolução, a quitosana atua como um polieletrólito catiônico viscoso possibilitando a obtenção de filmes, membranas e géis (NIEKRASZEWICZ, 2005). Esta característica físico-química de possuir cargas positivas, leva a quitosana a apresentar uma natureza básica com pKa variando de 6,3 a 7,2 e a torna quimicamente desejável para interação com outros polímeros de cargas opostas (BUENO, 2010).

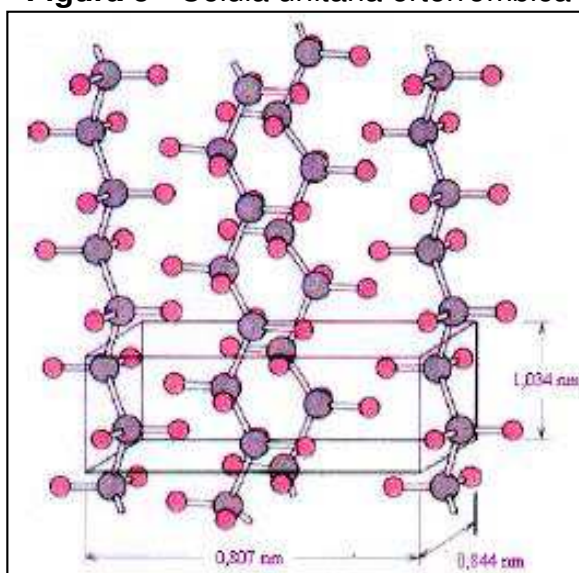
A solubilidade em soluções ácidas como a agregação com poliânions atribui propriedades excelentes a quitosana na forma de gel. Junto com propriedades biológicas que incluem biocompatibilidade, biodegradabilidade em produtos inofensivos, não tóxicos, afinidade a proteínas, propriedade hemostática, fungistática,

anticolesterol. A quitina e a quitosana oferecem um largo potencial em uma ampla faixa de aplicações que tende a crescer, uma vez que os materiais à base de quitosana tornem-se padronizados e disponíveis. De maneira importante, como biopolímeros e materiais biodegradáveis, a quitina/quitosana é segura para os seres humanos e para o ambiente natural (KUMAR; DOMB et al., 2004; DENG, 2007).

A quitosana, quando no estado sólido, é descrita como um polímero semicristalino e polimorfismos são citados na literatura. As cadeias deste polímero ligam-se através do hidrogênio em três diferentes estruturas cristalinas (α , β , γ), cujo arranjo é dependente da polaridade adquirida pelas cadeias de açúcar. A estrutura α apresenta cadeias orientadas com arranjo antiparalelo e células unitárias ortorrômbicas, com campo magnético forte. A estrutura β apresenta as cadeias orientadas de forma paralela e é constituída de células monoclinicas e a estrutura γ tem orientação mista (STAMFORD, 2006; AZEVEDO et al., 2007).

Através da difração de raios-X observa-se uma célula unitária ortorrômbica com parâmetros de rede $a=0,807\text{nm}$; $b=0,844\text{nm}$ e $c=1,034\text{nm}$ e duas cadeias antiparalelas de quitosana e nenhuma molécula de água (Figura 5). A sua cristalinidade pode variar a depender da origem e do tratamento do polímero durante sua extração, quando a quitosana é obtida da carapaça de caranguejo possui cristalinidade maior do que a extraída da carapaça de lagosta, esta última é maior que a de camarão (RINAUDO, 2006; AZEVEDO et al., 2007; ARANAZ et al., 2009).

Figura 5 - Célula unitária ortorrômbica



Fonte: Azevedo et al., (2007)

Técnicas de modificação química com o objetivo de aumentar a estabilidade química e física da quitosana têm sido empregadas, dentre elas tem-se a reticulação. Esta consiste na introdução de moléculas de baixa massa molar, denominadas de agentes de reticulação. Através desse processo pode-se obter um material quimicamente mais resistente ao meio ácido, uma redução da sua capacidade de retenção de água, estabilidade química e térmica, rigidez estrutural, permeabilidade, cor, capacidade de imobilização proteica e celular. As reações envolvidas na reticulação por agentes bifuncionais ocorrem entre os grupos amino e hidroxilas da quitosana (MENDES et al., 2011).

A reticulação das cadeias poliméricas de quitosana (reação de entrecruzamento) é um tipo de modificação química que objetiva unir suas cadeias, ou ainda, ligar suas cadeias às de outros polímeros gerando redes poliméricas híbridas. Tal procedimento acontece por meio da reação entre sítios reativos específicos presentes nas unidades estruturais da quitosana e alguns reagentes reticulantes (BERGER et al., 2004).

Esse processo sofre influência tanto de algumas propriedades físico-químicas da quitosana utilizada quanto das condições reacionais adotadas. Assim, grau de desacetilação (GD), massa relativa, temperatura e tempo reacional elevado, em geral, favorecem as reações e causam o aumento do grau de reticulação. As reticulações também sofrem influência do tipo e da concentração do agente reticulante envolvido. Com a elevação do grau de reticulação, reduz-se a porosidade do material obtido, a permeabilidade à água e a difusão de possíveis substâncias aprisionadas nas redes poliméricas formadas (BERGER et al., 2004).

Agentes reticulantes, tais como glutaraldeído, genipina, epícloridrina, formaldeído e ácido sulfúrico são usados para aumentar a sua estabilidade química, resistência mecânica e tempo de liberação de fármacos carreadores (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009; GONSALVES et al., 2011; MENDES et al., 2011). Entretanto, os agentes reticulantes glutaraldeído e formaldeído são tóxicos e requerem uma excessiva purificação durante a preparação de hidrogéis no intuito de eliminar resíduos que não formaram ligações cruzadas (BERGER et al., 2004).

Quanto à biodegradação da quitosana, esta leva à formação de oligossacarídeos não tóxicos, de comprimento variável. Estes últimos podem ser incorporados em vias metabólicas ou ser excretados. A taxa de degradação da quitosana está relacionada principalmente ao seu grau de desacetilação (GD), mas

também para a distribuição de resíduos de N-acetil D-glucosamina e a massa molecular da quitosana (FIDELES, 2010; WANG et al., 2011).

Ressalta-se que a quitosana é um polímero semicristalino, e como a cristalinidade do polímero está inversamente relacionada com a cinética de biodegradação, quando o GD da quitosana diminui, a sua cristalinidade, também diminui, o que resulta num aumento da taxa de biodegradação. As cadeias pequenas de quitosana serão mais rapidamente degradadas em oligossacarídeos quando comparadas com a quitosana com alta massa molecular (CROISIER; JÉRÔME, 2013).

As abordagens para o uso da quitosana são diversas, na farmacêutica englobam o seu uso como excipiente e um carreador potencial para administração controlada de fármacos específicos e macromoléculas, e em formulações de administração oral, nasal, transdérmica, parenteral e tópica, Além da obtenção de nanopartículas para veiculação de proteínas, vacinas e DNA. Ela pode ser obtida na forma de hidrogéis, membranas, fibras, nanopartículas, arcabouços e esponjas (KATO; ONISHI; MACHIDA, 2003; BERGER et al., 2004; JAYAKUMAR et al, 2010).

A mucoadesividade da quitosana e derivados catiônicos é reconhecida como um fator para adsorção de drogas, especialmente em um pH neutro. Alguns avanços recentes em sistemas de liberação de fármaco devem ser mencionados (RINAUDO, 2006). A quitosana como sistema já foi testada para a administração de proteínas/peptídeos, fatores de crescimento, anti-inflamatórios, antibióticos, bem como em terapia gênica e aplicações em bioimagem (DASH et al., 2011).

Na área biomédica, a quitosana tem sido estudada na cicatrização de feridas, produção de curativos, administração de medicamentos; algumas de suas aplicações abrangem ação antimicrobiana e antifúngica, analgésica, antitumoral e regeneração de tecidos (KATO; ONISHI; MACHIDA, 2003; NICOLOSI; MORAES, 2005; CHUNG; CHEN, 2008; JAYAKUMAR, et al, 2010; DASH et al., 2011; KHAN, 2011).

A quitosana tem atraído atenção por sua atividade antimicrobiana e antifúngica, as quais são dependentes de fatores como o tipo de quitosana, grau de desacetilação, massa molar, pH do meio e temperatura. Esse mecanismo é afetado pela massa molar. A alta massa deve inibir o crescimento devido ao seu tamanho maior, enquanto que a baixa massa molar pode entrar na célula fúngica. A quitosana apresentou efeito bactericida mais evidente em bactérias gram-positivas que em gram-negativas (KHAN, 2011).

A atividade antimicrobiana da quitosana é um pouco complexa; dois mecanismos têm sido relatados na literatura para explicar a atividade antibacteriana e antifúngica da quitosana. No primeiro mecanismo proposto, a quitosana carregada positivamente pode interagir com grupos carregados negativamente na superfície de células, e como consequência, alterar a sua permeabilidade. Isso impediria que materiais essenciais entrassem na célula e/ou permitisse a saída de solutos fundamentais para fora da mesma. O segundo mecanismo envolve a ligação da quitosana com o DNA celular (ainda através de grupos amino protonados), o que levaria à inibição da síntese de RNA microbiana (CHUNG; CHEN, 2008).

A natureza policatiônica da quitosana também explica seus efeitos analgésicos. A forte ação analgésica tópica tanto da quitina quanto da quitosana é mencionada nos estudos realizados por Okamoto et al., (2002) que mostraram que esse efeito é consequência da captura de hidrogênios ácidos liberados no local da inflamação pela ionização do grupo amínico NH_3^+ .

A atividade antitumoral também foi encontrada na literatura. Foi observado que a quitosana fornece uma matriz não protéica para o crescimento de tecido 3D, o que aciona macrófagos para a atividade tumoricida (JAYAKUMAR et al, 2010). Em um estudo sobre o hidrogel de quitosana com ^{131}I - norcholesterol (^{131}I -NC) foi testada sua aplicabilidade em um modelo de xenotransplante de câncer de mama em rato, este hidrogel reticulado com glutaraldeído reduziu a progressão do tumor e impediu em 69% a recorrência de tumores e metástase (DASH et al., 2011). A N-succinil-quitosana (Suc-Chi) tem sido estudada para a quimioterapia do câncer como um veículo de fármaco e os conjugados de mitomicina C com Suc-Chi exibiram boas atividades antitumorais contra vários tumores (KATO; ONISHI; MACHIDA, 2003).

A membrana de quitosana estimula a proliferação celular e a organização dos tecidos. Fornece estrutura para o crescimento celular e proteínas para a cicatrização, fortalece o novo tecido, atua como obstáculo contra agentes infecciosos, torna mínima a deformação cutânea, além de estimular a coagulação sanguínea natural, absorver os fluidos provenientes da ferida (exsudato) e bloquear as terminações nervosas, reduzindo a dor. A quitosana é bastante útil no tratamento de feridas, pois acelera o processo de cura destas (NICOLOSI; MORAES, 2005).

Os estudos sobre quitosana consideram que ela é um excelente material biológico a ser utilizada na cicatrização de feridas. Tal tratamento é um processo complexo que envolve resposta integrada por fatores de crescimento e muitos tipos

de células, a fim de obter uma recuperação rápida da arquitetura e função da pele. Assim, a exploração das propriedades da quitosana e sua modificação em várias formas podem ser utilizadas como material de remoção de feridas. Os materiais de curativos baseados em quitosana e seus derivados têm propriedades de alta durabilidade, boa biocompatibilidade, não toxicidade e boa capacidade de absorção de água (BANO et al., 2014).

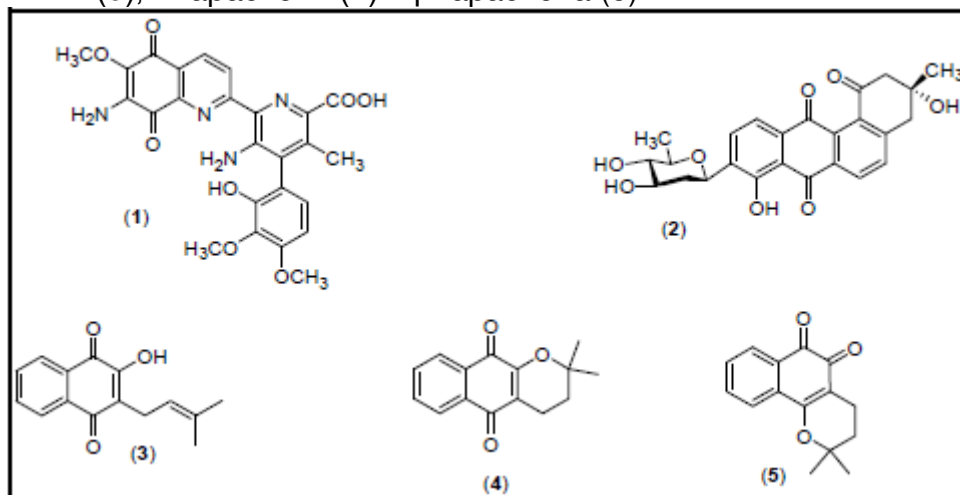
Além disso, a quitosana e seus derivados, em combinação com polímeros naturais ou sintéticos, levariam a acelerar a cicatrização de feridas. Assim, o material à base de quitosana pode ser considerado como uma possibilidade viável para o tratamento da ferida devido à sua natureza antimicrobiana, capacidade de acelerar a cicatrização da ferida, hemostática e analgésica (BANO et al., 2017).

3.7 1,4-NAFTOQUINONA

As quinonas e seus derivados são grupos de substâncias naturalmente obtidas ou sintetizadas em laboratório. São amplamente distribuídas na natureza (plantas superiores, artrópodes, fungos, líquenes, algas, bactérias e vírus) e estão, muitas vezes, associadas às distintas atividades farmacológicas, a exemplo da atividade antiinflamatória, analgésica, antiviral, antibacteriana, antimalarial, tripanossomicida, fungicida, antiproliferativa e anticancerígena. O interesse nestas substâncias tem aumentado, não apenas devido à sua relevância nos processos bioquímicos vitais, como também ao destaque cada vez maior que vêm expondo em distintos estudos farmacológicos (SUBRAMANIAN; FERREIRA; TRSIC, 1998; MATES; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 2000; FERREIRA, 2008; MORAES et al., 2014).

Uma ampla variedade de quinonas, de origem natural, vem chamando a atenção dos pesquisadores devido ao vasto número de trabalhos na literatura por seus efeitos em várias funções biológicas, a exemplo da estreptonigrina (1), urdamicinona (2), lapachol (3), α -lapachona (4) e β -lapachona (5) obtidas a partir de extratos de plantas (Figura 6) (FERREIRA, 2008).

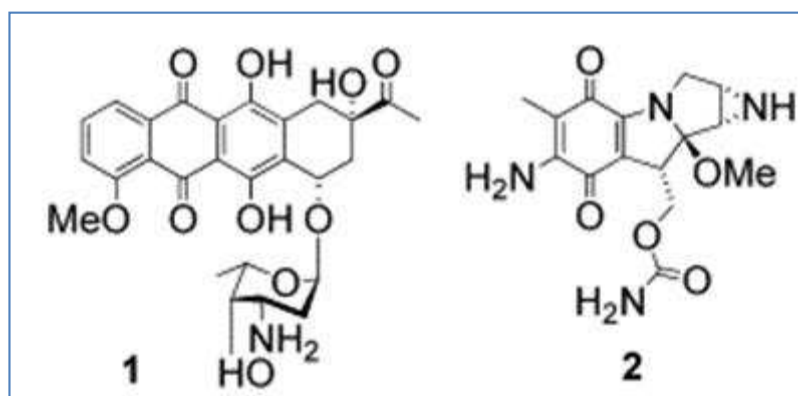
Figura 6 - Exemplos de quinonas de origem natural. Estreptonigrina (1), urdamicinona (2), lapachol (3), α -lapachona (4) e β -lapachona (5)



Fonte: Ferreira (2008).

Vários fármacos anticancerígenos clinicamente importantes contêm o radical quinona como uma parte relevante das suas estruturas, tais como daunorubicina (1) e mitomicina C (2), expostos na Figura 7, e existe um número crescente de trabalhos sobre a avaliação biológica de análogos sintéticos e novos produtos naturais relacionados a esta classe de compostos, especialmente porque a resistência à drogas permanece como um problema na farmacoterapia do câncer, e a quimioterapia é vital, com muitos químicos envolvidos na procura de um novo agente antitumoral (OWTON, 1999; ATAMANYUK et al., 2013; WANG et al., 2015).

Figura 7 - Estrutura de quinonas que ocorrem naturalmente.(1) daunorubicina e (2) mitomicina C.



Fonte: Bonifazi et al., (2010).

A estrutura das quinonas apresenta dois grupamentos carbonilas em um anel insaturado de seis átomos de carbono, situados relativamente em posições “orto” ou “para” (SOUSA; LOPES; ANDRADE, 2016). As quinonas são classificadas em

conformidade com o sistema aromático presente nas suas estruturas: tem-se as benzoquinonas, antraquinonas e naftoquinonas, estas últimas estão relacionadas com o anel naftalênico. Vários estudos relataram a atividade antitumoral de naftoquinonas, devido à redução do crescimento de linhagens de células tumorais, quando combinadas à outras substâncias (MORAES et al., 2014; LÓPEZ et al., 2014).

Os derivados de quinona podem ser tóxicos para as células por uma série de mecanismos, incluindo ciclos redox (habilidade das quinonas de aceitarem um ou dois elétrons, formando uma espécie radicalar aniônica ou dianiônica), arilação, indução de quebras na cadeia de DNA, a geração de radicais livres, alquilação, através da formação de quinona meteto, apoptose e ação como inibidores da topoisomerase via intercalação de DNA, ou seja, as quinonas tem atraído atenção devido a seus múltiplos mecanismos de ação (MOORE, 1977; MILLER; RODGERS; COHEN, 1986; JARDIM et al., 2015).

O crescente aumento de microorganismos patogênicos resistentes a fármacos e o aumento dos casos de câncer no mundo tem impulsionado a busca por novos agentes com atividade biológica para serem utilizados em terapias alternativas. Nesta área, as naftoquinonas parecem ser candidatos em potencial, visto serem compostos de origem natural, utilizados na medicina tradicional no tratamento de várias doenças. A modificação da estrutura primária das naftoquinonas com diferentes grupos funcionais pode potencializar a sua atividade biológica, melhorar a sua solubilidade e diminuir os efeitos colaterais indesejáveis (LEYVA et al., 2017).

As naftoquinonas podem causar o estresse oxidativo em células expostas e, por conseguinte, afetar a sinalização redox. A geração de espécies reativas de oxigênio e modulação de sinalização redox são propriedades das naftoquinonas que as tornam interessantes para o desenvolvimento de novos compostos de uso potencial em vários contextos terapêuticos (KLOTZ; HOU; JACOB, 2014).

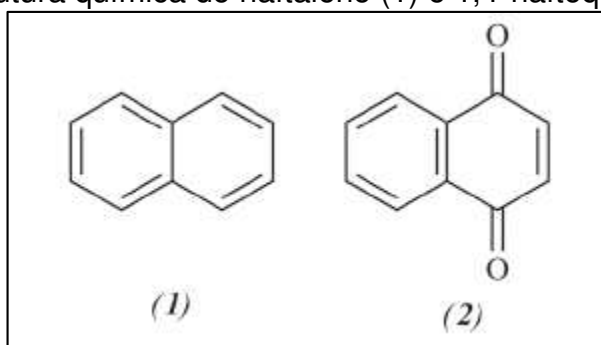
Com relação à atividade antitumoral, mais especificamente, diversas substâncias desta classe têm apresentado resultados promissores. Entre elas estão a 1,4 naftoquinona, 2-butanoil-1,4-naftoquinona, 2-propanoilamina-1,4-naftoquinona, β -lapachona, lapachol, lausona, biflorina, etc. (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003; BEZERRA et al., 2007; ÁREAS, 2007; BRANDÃO et al., 2010; ATAMANYUK et al., 2013).

O composto 1,4-naftoquinona ($C_{10}H_6O_2$, massa molar de 158,15 g/mol, ponto de fusão $128,5^{\circ}C$, densidade de $1,42\text{ g/cm}^3$) é caracterizado por dois grupos carbonila

na posição 1,4. As naftoquinonas são compostos orgânicos altamente reativos, utilizados como corantes naturais ou sintéticos cujas cores variam de amarelo para vermelho. Estes compostos e os seus derivados são α , β compostos carbonila insaturados. São amplamente encontrados na natureza, especialmente em famílias de plantas superiores (*Plumbaginaceae*, *Juglandaceae*, *Ebenaceae*, *Boraginaceae*, *Dioncophyllaceae*, *Verbenaceae*, *Lythraceae* e *Euphorbiaceae*), além de algas, fungos, alguns animais e como produto de metabolismo de algumas bactérias (LÓPEZ et al., 2014). É solúvel em benzeno, éter dietílico, clorofórmio, ácido acético glacial e pode ser preparado industrialmente através da oxidação de naftaleno usando pentóxido de vanádio (V_2O_5) como catalisador (YU, 2014).

O 1,4-naftoquinona (Figura 8) é conhecido por conferir atividade anticancerígena em várias drogas, tais como estreptonigrina, mitomicina C, daunorrubicina, mitomicina C, doxorrubicina e mitoxantrona (ATAMANYUK et al., 2013; KLAUS et al., 2010). Foi relatado que o 1,4-naftoquinona interfere no transporte de elétrons e no processo de fosforilação oxidativo e desempenha um papel na inibição de enzima e ligações cruzadas de DNA (WANG et al., 2015).

Figura 8 - Estrutura química do naftaleno (1) e 1,4-naftoquinona (2)



Fonte: López et al., (2014)

Foram observados 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; KUMAR et al., 2009).

No estudo feito por Kayashima et al., (2009) foram examinados os efeitos de compostos de naftoquinona na angiogênese, utilizando um ensaio de anel aórtico de rato em 100 $\mu\text{M/L}$. Entre estes compostos, o 1,4-naftoquinona apresentou a mais forte atividade anti-angiogênica. Em outra pesquisa realizada para investigar a atividade

citotóxica e genotóxica, bem como o potencial de induzir o estresse oxidativo de naftoquinonas relacionadas à fontes naturais (plumbagina, juglona, lawsona e lapachol) em comparação com 1,4-naftoquinona e menadiona em queratinócitos humanos, verificou-se que o 1,4-naftoquinona, menadiona, juglona e plumbagina não são apenas muito mais citotóxicas do que a lawsona e lapachol, mas também são capazes de induzir fortemente o estresse oxidativo e danos ao DNA (KLAUS et al., 2010).

O potencial citotóxico do 1,4-naftoquinona foi estudado em células de melanoma B16F1 cultivadas *in vitro*. A partir de resultados já publicados anteriormente pode-se concluir que o radical quinona NQ14 tem a capacidade de induzir espécies reativas de oxigênio (EROS). Dessa forma, o estresse oxidativo, os danos na membrana celular, a inibição da sobrevivência clonogênica, a apoptose, bem como o modo necrótico de morte celular pode ter contribuído para os efeitos citotóxicos observados de NQ14 contra as células tumorais de melanoma. No entanto, os pesquisadores afirmam que estudos usando células normais para a comparação com o NQ14 são essenciais antes de defenderem sua aplicação terapêutica (KUMAR et al., 2009).

3.8 LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACO

O objetivo fundamental de um fármaco, quando administrado, é atingir concentrações plasmáticas ou níveis de concentrações adequadas nos tecidos, sendo terapêuticamente efetivo e não tóxico, por um período prolongado de tempo (MOURA, 2009; COIMBRA, 2010). Nos sistemas convencionais de liberação de fármaco, o seu nível é liberado rapidamente após ser administrado, sendo empregados nesses sistemas diluentes solúveis, desintegrantes e/ou outros recursos que favorecem os processos de liberação e dissolução do fármaco (PEZZIN; SILVA; FERRAZ et al., 2007; KLAUSS, 2010).

Entretanto, diversas limitações/necessidades foram observadas através dessa forma convencional, as quais incluem impossibilidade de manter uma concentração terapêutica do fármaco que permaneça constante no local de ação durante o tratamento; flutuações inevitáveis das concentrações de fármaco no local de ação podem levar o paciente a ser sobremedicado ou submedicado; fármacos com tempo

de meia-vida biológica curtos podem requerer doses frequentes para manter as concentrações plasmáticas dentro da faixa terapêutica, sendo de extrema importância a adesão do paciente ao tratamento, fato este que constitui em motivo relevante para falha ou ineficiência terapêutica (COLLET; MORETON, 2005).

Dessa forma, tem-se observado uma quantidade importante de trabalhos envolvidos em delinear sistemas de liberação de fármacos que possam se ajustar adequadamente às novas necessidades. Os sistemas de liberação controlada (SLC) são promissores em relação ao aumento da eficácia terapêutica de um fármaco através da manutenção de níveis dos fármacos dentro da faixa terapêutica, diminuindo significativamente a toxicidade e reduzindo a necessidade de várias doses, em relação ao sistema convencional; isso induz à melhor adesão do paciente ao tratamento (Figura 9) (COLLET; MORETON, 2005; SILVA, 2012;).

Figura 9 - Representação de um sistema de liberação convencional e controlada de fármaco.



Fonte: Adaptado de Júnior (2007).

Embora estes sistemas possam apresentar vantagens que se sobrepõem ao sistema de liberação convencional, também podem apresentar desvantagens, a exemplo da probabilidade de ocorrência de liberação rápida do fármaco, a partir de um sistema de liberação prolongada, em função de um defeito no produto; utilização de fármacos que possuem baixo tempo de meia-vida com dificuldade de absorção no trato gastrointestinal; impossibilidade de cessar de imediato a finalidade terapêutica

em caso de intolerância ou intoxicação do paciente; risco de acúmulo do fármaco no organismo com baixa velocidade de eliminação (LYRA et al., 2007).

Alguns sistemas de liberação controlada são observados, conforme a Tabela 4.

Tabela 4 - Tipos de sistemas de liberação controlada.

SISTEMAS	AÇÃO
Liberação retardada	Indica que o fármaco não é liberado imediatamente após a administração, mas um tempo depois. A detecção do fármaco na corrente sanguínea é prolongado.
Liberação repetida	Uma dose individual é liberada regularmente logo após a administração, e uma segunda ou terceira doses são subsequentemente liberadas em intervalos intermitentes.
Liberação prolongada	Indica que o fármaco é disponibilizado para absorção por um período de tempo mais prolongado de que a partir de uma forma farmacêutica convencional. São disponibilizadas duas doses do fármaco, a primeira, chamada de dose inicial de liberação imediata, necessária para produzir o efeito farmacológico desejado sem causar danos ao organismo. A segunda, chamada dose de manutenção, é liberada de modo gradual, com a finalidade de prolongar a extensão da resposta farmacológica.
Liberação sustentada	Indica uma liberação inicial de fármaco, suficiente para disponibilizar a dose terapêutica logo após a administração, a qual é seguida de uma liberação gradual do fármaco, por um período de tempo estendido.
Liberação estendida	Refere-se a formas farmacêuticas que liberam o fármaco lentamente de modo a manter as concentrações plasmáticas no nível terapêutico, por um período prolongado de tempo.
Liberação controlada	Refere-se a formas farmacêuticas que liberam o fármaco em uma velocidade constante e fornecem concentrações plasmáticas que permanecem invariáveis com o tempo.
Liberação modificada	Refere-se a formas farmacêuticas definidas pela USP, como as cujas características de curso e/ou localização da liberação de fármacos são escolhidas para satisfazer objetivos terapêuticos ou de conveniência não-oferecidos pelas formas convencionais.

Fonte: Adaptado de Collet e Moreton (2005) e Albanez (2012).

Espécies coloidais, como lipossomas, micro e nanopartículas, vêm sendo estudadas para esse sistema que, em geral, pode ser utilizado para melhorar a biodisponibilidade, manter o efeito do fármaco no sítio alvo, solubilizar fármacos, melhorar a estabilidade física e química de agentes terapêuticos, minimizar efeitos colaterais e reduzir a toxicidade (MOURA, 2009).

A tecnologia de liberação de fármaco representa uma das fronteiras da ciência, e envolve diversos aspectos multidisciplinares, o que pode contribuir para o avanço da saúde dos indivíduos, e ainda um campo de estudo muito vasto, reunindo esforços de diversas áreas. Os SLC oferecem inúmeras vantagens quando comparados às formas farmacêuticas convencionais (MARCHETTI; SARAIVA, 2005).

Outras propriedades que também merecem destaque a respeito dos polímeros usados como SLC são a biodegradabilidade e a bioadesão. A primeira é um atributo explorado na modulação da liberação de fármacos, uma vez que é altamente desejável que um material introduzido no organismo desapareça depois de cumprida sua função, sem a necessidade de intervenções para sua retirada, a exemplo dos poliésteres alifáticos (poli (ácido láctico) PLA, poli (ácido glicólico) PGA, poli (caprolactona) (PCL) e copolímeros dos ácidos láctico e glicólico (PLGA). Quanto à bioadesividade, as características que a favorecem abrangem a elevada massa molar, a capacidade de dispersão em água, a presença de grande número de grupos carboxila e/ou hidroxila, a habilidade de formar ligações de hidrogênio, a flexibilidade da cadeia polimérica e, a presença de superfície negativamente carregada, embora alguns polímeros catiônicos sejam bioadesivos (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010).

A liberação controlada de fármaco ocorre quando este (ou um agente ativo) combinado a um polímero, que pode ser natural ou sintético, é liberado de uma maneira pré-determinada. Dentre os mecanismos que controlam a liberação da substância ativa, três podem ser liberados de um sistema polimérico: difusão, intumescimento e erosão. A predominância de um desses mecanismos depende do excipiente polimérico a ser utilizado (LOPES; LOBO; COSTA, 2005; MASOOD, 2007).

Nos sistemas controlados por difusão, a liberação pode acontecer através dos poros da matriz polimérica ou entre as cadeias do polímero (MASOOD, 2007). No processo de liberação do fármaco por intumescimento, as matrizes hidrofílicas absorvem água, liberando o fármaco da superfície da matriz polimérica e, conseqüentemente, sofrem intumescimento/relaxamento das cadeias poliméricas,

formando uma camada gelatinosa de polímero (estado maleável). À medida que a água hidrata o núcleo seco, a camada exterior gelificada pode sofrer erosão por solubilização parcial ou total do polímero (erosão física). A penetração da água faz com que as cadeias do polímero se afastem, promovendo a difusão do fármaco (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

No mecanismo de erosão química, o material em contato com os fluídos aquosos do corpo, sofre hidrólise da cadeia principal instável. Para os polímeros semicristalinos isso ocorre em duas fases. Na primeira fase, a água penetra o dispositivo atacando preferencialmente as ligações químicas na fase amorfa, originando oligômeros ou monômeros. Na segunda fase, a degradação, tendo como produto moléculas menores, ocorre por processos enzimáticos (MIDDLETON; TIPTON, 2000). O perfil de liberação do fármaco varia e depende de fatores como a natureza do fármaco (hidrofílico/hidrofóbico), taxa de degradação do polímero, permeabilidade da água e interação fármaco-matriz polimérica (LAO; VENKATRAMAN; PEPPAS et al., 2008).

Quanto às tecnologias disponíveis para sustentar a liberação de fármacos a partir de formas farmacêuticas (FF) (sólida, semi-sólida ou líquida), destacam-se os sistemas matriciais, reservatório ou osmóticos. Independente do sistema e do tipo de FF, o uso de excipientes específicos é necessário. Esses materiais geralmente são polímeros com características e propriedades especiais, tais como: capacidade de formação de estruturas (matrizes ou membranas) microporosas/semipermeáveis, capacidade de intumescimento em contato com a água e capacidade de complexação com fármacos (PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007).

Nos sistemas matriciais (ou monolíticos), o fármaco pode se encontrar homogeneamente disperso na matriz polimérica, dentro de um reservatório ou adsorvido em sua superfície, e na sua liberação estão envolvidos processos físicos e químicos, incluindo penetração de água na matriz, difusão do fármaco pelos poros da matriz, degradação do polímero ou uma combinação dos dois mecanismos. Embora simples de preparar, esses materiais têm a desvantagem de o fármaco poder ser liberado de modo repentino por meio de um colapso da matriz, o que pode gerar consequências sérias para o paciente. Essas matrizes podem ser preparadas sob a forma de comprimidos, cápsulas gelatinosas, grânulos, péletes, minicomprimidos (LYRA et al., 2007; PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007).

No sistema do tipo reservatório tem-se um dispositivo contendo o fármaco (sólido ou líquido) que se encontra isolado do meio externo por uma membrana polimérica. O fármaco é liberado por difusão através da membrana, que pode ser microporosa ou não apresentar poros. Quando uma membrana não-porosa é empregada, a liberação é conduzida pela difusão da substância ativa através do polímero e, assim, pode ser modulada pela seleção de um polímero no qual ela apresente a difusividade adequada. No caso de membranas microporosas, a difusão do fármaco no meio que estiver preenchendo os poros determinará o processo de liberação. Neste tipo de sistema a alta concentração de fármaco no interior do dispositivo é essencial para manter um gradiente de concentração constante através da membrana (PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007; MASOOD, 2007; BAJPAI et al., 2008).

Quanto às bombas osmóticas, estas são sistemas que utilizam pressão osmótica para modular a liberação do fármaco. A FF é constituída por um núcleo (comprimido, cápsula gelatinosa dura ou mole) revestido com uma membrana semipermeável, que possui um orifício feito a laser. O núcleo contém um agente osmótico, que pode ser a substância ativa ou outro material. Após a administração da FF, o solvente penetra no núcleo (atraído pelo agente osmótico), aumentando a pressão interna, resultando na liberação do fármaco dissolvido ou disperso, através do orifício na membrana (PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007).

Polímeros biodegradáveis estão disponíveis e têm sido estudados para aplicações na liberação controlada de fármacos. Estes polímeros são sistemas aptos para controlar a taxa de liberação do fármaco, evitando a necessidade da retirada da matriz após a exaustão do fármaco (OLIVEIRA, 2015; LYRA et al., 2007).

Um polímero viável seria a quitosana, visto ser um produto natural, de baixo custo e renovável, biocompatível, biodegradável e atóxico. A quitosana pode ser quimicamente modificada e ser processada em diferentes formas como soluções, filme, arcabouços, blendas e como sistemas para liberação controlada de fármacos (SILVA, 2005; AZEVEDO et al., 2007; NASCIMENTO, 2014; SILVA, 2015; OLIVEIRA, 2015, CRUZ, 2015).

A utilização de quitosana como excipiente para liberação de fármacos direcionada às células tumorais se torna interessante, pois estas expressam um fosfolípídeo aniônico, chamado fosfatidilserina, que pode interagir com a carga positiva na quitosana, exercendo um papel importante na captação celular (YU et al.,

2012). Assim, os grupos NH_3^+ presentes na cadeia da quitosana podem interagir com os grupos negativos na membrana da célula, possibilitando a ligação do sistema com a membrana e levando a uma interação sistema-célula (LIU et al., 2004).

À medida em que o tratamento contra o câncer foi se desenvolvendo, através da introdução de novos medicamentos, observou-se que a resistência celular cancerígena aos medicamentos era devido aos mecanismos celulares, ou seja, a questão primordial é conseguir fazer com que o medicamento chegue ao tumor em concentrações suficientes para obter a eficácia do tratamento, visto que aumentar a dose não é uma opção interessante pois a maioria é administrada no limite de tolerância do organismo. O mesmo deve ser transportado no sangue até o tumor, atravessar a parede vascular e difundir-se pelo interstício até a célula tumoral, entretanto em cada uma dessas etapas existem barreiras que funcionam como fatores de resistência (MACHADO; CHAMMAS, 2013).

Dentre as barreiras existentes tem-se o fluxo sanguíneo baixo e intermitente em algumas áreas do tumor, o que dificulta a chegada do medicamento; no microambiente tumoral, devido ao baixo pH ou hipóxia o medicamento pode não funcionar adequadamente; a alta pressão do fluido intersticial do tumor e gradientes transcapilares baixos restringem o extravasamento das drogas ao interstício tumoral. Depois de extravasar, a droga ainda se depara com o fluxo convectivo à periferia do tumor, uma longa distância a percorrer por difusão e ainda uma trama complexa de moléculas de matriz que podem adsorver ou se ligar a substâncias, restringindo sua difusão. Há a teoria de que a nanopartícula ideal para entrada no tecido tumoral deve ser catiônica, o que atinge seletivamente os vasos tumorais, e depois de entrar no interstício ela deve ser neutra para se difundir mais facilmente (MACHADO; CHAMMAS, 2013).

3.9 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Uma ampla variedade de curativos tem sido desenvolvida utilizando polímeros naturais e alguns deles tem apresentado sucesso em diversas aplicações biomédicas, incluindo carreador de fármaco, conforme já mencionado. Entretanto, observa-se a necessidade de, ao se desenvolver um sistema de liberação controlada a partir de um polímero associado a um fármaco, desenvolver e validar um método analítico, com a

meta de garantir a qualidade dos resultados obtidos, assim como sua eficiência na rotina laboratorial (BRITO et al., 2003).

A validação é a confirmação através do fornecimento de evidência objetiva de que o método é adequado ao uso destinado. A Resolução Específica (RE) nº 899/03 da ANVISA acrescenta que a validação deve ser realizada através da análise de uma série de parâmetros, cujo objetivo é assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos, atendendo às exigências das aplicações analíticas. Os parâmetros abrangem especificidade e seletividade, linearidade e faixa linear de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão e robustez (BRASIL, 2003).

- Especificidade e seletividade é a capacidade que o método possui de mensurar exatamente um composto em presença de outros componentes como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003).
- Quanto à linearidade e faixa linear de trabalho, compreende-se o primeiro como capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes. O coeficiente de correlação é calculado pela regressão linear através do método dos mínimos quadrados. Os dados obtidos devem ter o coeficiente de correlação (r) = 0,99, indicando, assim, a relação aceitável entre as concentrações do analito e as respostas analíticas, que devem obedecer a uma variação de 80% a 120% da concentração teórica (BRASIL, 2003).
- O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado, através de condições experimentais estabelecidas. No que se refere ao limite de quantificação (LQ), este é conhecido como a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser verificada com precisão e exatidão aceitáveis sob as mesmas condições (BRASIL, 2003).
- A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados encontrados pelo método experimental em relação ao valor verdadeiro/teórico. No que se refere à precisão, essa avalia a

proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra, e pode ser determinada por meio da repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade ou precisão intra-corrída, refere-se a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação, já a precisão intermediária ou precisão inter-corrídas, a concordância acontece entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes (BRASIL, 2003).

- A robustez de um método analítico é conceituada como a sensibilidade em resistir a pequenas e deliberadas variações nas condições analíticas. Estas pequenas mudanças refletem as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos (BRASIL, 2003).

4 MATERIAL E MÉTODOS

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

4.1 MATERIAIS

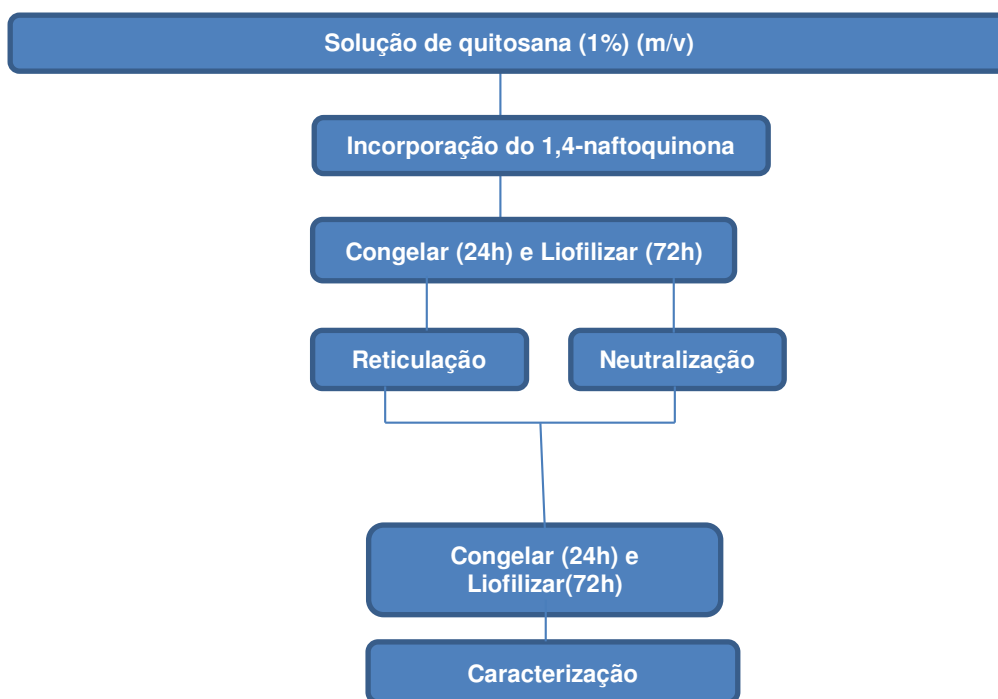
- Quitosana produzida no CERTBIO, com massa molar de $2,6 \times 10^5$ Da, aproximadamente 90% de grau de desacetilação.
- Ácido Acético Glacial ($C_2H_4O_2$) - Vetec® Química Fina Ltda com grau analítico;
- 1,4 – Naftoquinona ($C_{10}H_6O_2$), massa molar de 158, 15 g/mol - Sigma Aldrich®;
- Hidróxido de amônio (NH_4OH) 28-30% P.A., Neon;
- Tripolifosfato de sódio ($Na_5P_3O_{10}$) - Sigma Aldrich®;
- *Phosphate Buffered Saline* (PBS) - Sigma Aldrich®, pH = 7,4;
- Lisozima – Sigma Aldrich®.

Todos os materiais foram utilizados conforme recebido, sem nenhuma purificação

4.2 METODOLOGIA

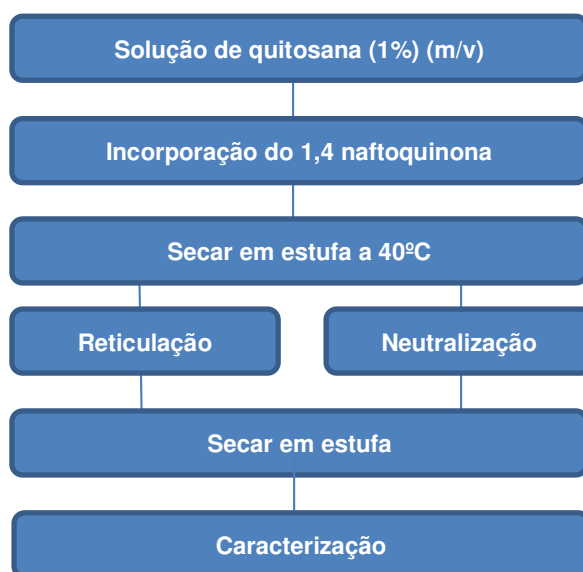
A obtenção das membranas de quitosana e quitosana/1,4-naftoquinona foi realizada seguindo dois processos: liofilização e evaporação de solvente. O primeiro foi obtido a partir de adaptações provenientes de Cruz et al., (2016). Ambos seguem apresentados nas Figuras 10 e 11, através dos fluxogramas elaborados.

Figura 10 - Fluxograma da produção de membranas de quitosana com e sem 1,4-naftoquinona, 1ª metodologia – liofilização.



Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Figura 11 - Fluxograma da produção de membranas de quitosana com e sem 1,4-naftoquinona, 2ª metodologia – evaporação de solvente.



Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

4.2.1 Preparação das membranas de quitosana sem e com incorporação de 1,4-naftoquinona

A solução de quitosana 1% (m/v) foi preparada através da dissolução do polímero em ácido acético glacial a 1% (v/v), sob agitação mecânica a 50°C, por 2 h a 346 rpm. Ao término foi verificado o pH, 4,16, com Phmetro T-100 Tekma. Posteriormente foi vertida (10 mL) em placas de Petri em acrílico com 60,35 mm de diâmetro e 9,87 mm de altura e acondicionadas no ultra-freezer (-84°C) por 24 horas para congelamento. Em seguida foram transferidas para o liofilizador L 108, da LIOTOP, permanecendo por um período de 72 h, com o objetivo de formação de membranas com poros interconectados.

Para a solução de quitosana com 1,4-naftoquinona, foi adicionado 0,1185g desse último à solução a fim de se obter uma concentração final de 750 µMol/L. Para a completa dissolução foi necessário sonificar a solução durante duas horas, sob a temperatura de 45°C; para tanto utilizou-se o ULTRASONIC CLEANER, modelo ULTRACLEANER 1440 plus. Depois verificou-se o pH, com valor final de 4,10. Obtida a solução, essa foi vertida em placas de Petri e acondicionadas no ultra-freezer (-84°C) por 24 horas para congelamento seguido de liofilização (72h).

A segunda metodologia empregada segue semelhantemente a anterior na preparação das soluções de quitosana e quitosana/1,4-naftoquinona. Entretanto, ao invés de ser congelada e liofilizada, passou pelo processo de evaporação de solvente em uma estufa com circulação de ar sob temperatura constante de 40°C durante 24 horas. Posteriormente, seguiu-se a neutralização de uma parte das amostras e reticulação da outra, conforme será exposto adiante.

4.2.2 Processo de neutralização

Parte das amostras foi neutralizada com hidróxido de amônio (NH₄OH) por ser uma base solúvel, fraca e volátil, contribuindo para a ausência de resíduos do sal, ao se utilizar hidróxido de sódio (NaOH), conforme constatado na pesquisa de Cruz (2016).

A solução de hidróxido de amônio a 5% (v/v) foi preparada na capela de exaustão de gases da marca SPLabor, permanecendo as amostras sob atmosfera dessa solução, isolada sob uma cúpula de vidro, por um período de 72 horas.

Passado o período determinado, as mesmas foram retiradas e seguiu-se uma breve lavagem das membranas com água destilada e, após serem intumescidas, foram congeladas e liofilizadas, a exceção daquelas que foram para a estufa por mais 12 horas (aquelas que foram produzidas por evaporação de solvente).

4.2.3 Processo de reticulação

Nesta etapa foram preparadas três soluções de tripolifosfato de sódio (TPP): a 0,5%, 0,3% e a 0,1% (m/v). Posteriormente, as membranas de quitosana sem e com 1,4-naftoquinona foram divididas e distribuídas em bandejas circulares de aço inoxidável de diâmetro maior, contendo cada uma as devidas soluções de TPP, e as membranas permaneceram mergulhadas nas respectivas soluções por um período de 5 minutos. Sequencialmente, essas membranas foram lavadas com água destilada, intumescidas, congeladas (24h) e liofilizadas (72h). As membranas preparadas por evaporação de solvente retornaram para estufa por mais 12 horas.

As membranas liofilizadas foram separadas em quintuplicata sendo analisados dados como espessura, diâmetro e massa, antes e após o processo de neutralização, bem como o processo de reticulação. A espessura e o diâmetro foram mensurados com o auxílio de um paquímetro digital DIGIMESS 100-174BL, enquanto que a massa foi verificada através da balança analítica de precisão da Shimadzu AVY 220.

Na Tabela 5 observam-se as nomenclaturas adotadas neste trabalho para as diferentes membranas confeccionadas.

Tabela 5 - Código das membranas confeccionadas.

METODOLOGIA DE OBTENÇÃO	MEMBRANA	CÓDIGO
Liofilização	Quitosana neutralizada	QNL
	Quitosana reticulada a 0,5%	QT05L
	Quitosana reticulada a 0,3%	QT03L
	Quitosana reticulada a 0,1%	QT01L
	Quitosana/1,4-naftoquinona (750µM/L), neutralizada	QN7L
	Quitosana/1,4-naftoquinona (750µM/L), reticulada a 0,5%	QN7T05L
	Quitosana/1,4-naftoquinona (750µM/L), reticulada a 0,3%	QN7T03L
	Quitosana/ 1,4-naftoquinona (750µM/L), reticulada a 0,1%	QN7T01L
Evaporação de solvente	Quitosana neutralizada	QNE
	Quitosana reticulada a 0,5%	QT05E
	Quitosana reticulada a 0,3%	QT03E
	Quitosana reticulada a 0,1%	QT01E
	Quitosana/1,4-naftoquinona (750µM/L), neutralizada	QN7E
	Quitosana/1,4-naftoquinona (750µM/L), reticulada a 0,5%	QN7T05E
	Quitosana/1,4-naftoquinona (750µM/L), reticulada a 0,3%	QN7T03E
	Quitosana/1,4-naftoquinona (750µM/L), reticulada a 0,1%	QN7T01E

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

4.2.3 Desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação do 1,4-naftoquinona

No intuito de garantir que um método analítico forneça informações confiáveis sobre a amostra, ele deve ser validado, inclusive essa exigência se estende para o registro de novos produtos, tanto em nível de Brasil como em outros países.

A validação, nesse trabalho, foi realizada seguindo a RE Nº 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), com o objetivo de demonstrar que o método é apropriado para a determinação quantitativa do 1,4-naftoquinona e garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências e a confiabilidade dos resultados. Para que esses resultados sejam alcançados, o método deve apresentar seletividade, especificidade, linearidade, intervalo, exatidão, precisão, robustez, limite de detecção e de quantificação, adequados à análise (BRASIL, 2003).

Para a realização da validação foi utilizada as dependências do Laboratório NANOPO, localizado na UFCG. O método foi desenvolvido para espectroscopia na região do ultravioleta (UV/VIS) devido a sua utilização ser de baixo custo e de vasta aplicação na rotina laboratorial e simples instrumentação comparada à técnica de cromatografia (NUNES et al., 2015). A absorvância das amostras foi medida no comprimento de onda de máxima absorção em 341 nm, utilizando o espectrofotômetro de UV/Vis da Perkin-Elmer, modelo Lambda 35, empregando-se uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 10 mm, volume de 3,5 mL.

Inicialmente, a solução padrão foi obtida pesando 0,0071 g de 1,4-naftoquinona, que foi transferida para balão volumétrico de 100 mL com solução salina tampão fosfato (PBS) e, posteriormente, colocada em um sonificador durante 2 horas com temperatura constante de 40°C visando uma dissolução mais eficiente da substância nesse meio. Diluições com diferentes concentrações foram realizadas utilizando PBS a partir da solução padrão.

Os parâmetros de seletividade e especificidade foram verificados a partir da leitura em UV/VIS do 1,4-naftoquinona em vários solventes, comparando o comprimento de onda em cada amostra, com o objetivo de averiguar se os comprimentos de onda presentes não interfeririam naquele identificado na droga.

Em relação à linearidade e intervalo, a primeira foi determinada a partir da construção de três curvas de calibração usando cinco pontos com valores de concentração do 1,4-naftoquinona situados no intervalo de 50 a 450 µMol/L. A linearidade foi analisada por regressão linear calculada pelo método dos mínimos quadrados.

A exatidão foi observada avaliando-se três níveis de concentração do 1,4-naftoquinona (50, 250 e 450 µMol/L) em triplicata, totalizando nove quantificações. O coeficiente de variação e a porcentagem de recuperação foram utilizados para avaliar a exatidão definida na Equação 1:

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{CEO}{CT} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde: CEO = Concentração experimental obtida

CT = Concentração teórica

A precisão do método analítico foi avaliada em três níveis, na concentração média: repetibilidade (precisão intracorrída), precisão intermediária (precisão intercorrída) e reprodutibilidade. A repetibilidade foi verificada através da análise de seis soluções na concentração de 250 µMol/L. A precisão intermediária foi determinada pela análise de seis medidas de soluções na mesma concentração, realizadas em dois dias distintos e por operadores distintos. A reprodutibilidade (precisão interlaboratorial) foi realizada por meio da análise de seis soluções a uma concentração de 250 µMol/L, em um outro laboratório com equipamento diferente.

A robustez do método foi avaliada em sextuplicata pela variação do solvente nas amostras na concentração média (250 µMol/L), utilizando-se água destilada. A avaliação foi realizada pela análise dos coeficientes de variação entre as médias obtidas. Outro fator experimental envolvido na robustez foi a fotoestabilidade do 1,4-naftoquinona durante o período de análise. Foi observado que, em outro composto muito semelhante à 1,4-naftoquinona, haveria a possibilidade de sensibilidade à luz (CUNHA-FILHO et al., 2009). Para tanto, seis amostras da solução de 1,4-naftoquinona, à concentração de 450 µMol/L foram expostas à iluminação artificial durante 15 dias e comparadas diariamente através da leitura de sua absorbância em UV-VIS com outras seis protegidas da luz.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados, matematicamente, a partir da curva analítica resultante da média das três curvas analíticas. O cálculo para determinação dos valores correspondentes ao LD e LQ, fundamenta-se no desvio padrão do residual da linha de regressão e sua relação com a inclinação da reta (coeficiente angular) na curva analítica, seguindo as Equações 2 e 3:

$$LD = \frac{DP}{I} \times 3 \quad \text{Equação 2}$$

Onde: DP = Desvio padrão do intercepto com relação ao eixo dos Y;

I = Inclinação da curva analítica

$$LQ = \frac{DP}{I} \times 10 \quad \text{Equação 3}$$

Onde: DP = Desvio padrão do intercepto com relação ao eixo dos Y;

I = Inclinação da curva analítica

A concentração de 1,4-naftoquinona liberada nas membranas de quitosana de ambas metodologias, as neutralizadas e as que tiveram variações nas concentrações do agente reticulante, em solução tampão fosfato (PBS) foi analisada em espectrofotômetro UV-Vis da Perkim Elmer modelo Lambda 35, no Laboratório Nanopol. Cada tipo de membrana foi imersa em 25 mL de PBS, utilizada como meio de diluição e mantida em contínua agitação (50 rpm), a temperatura de 37°C em uma incubadora Shake modelo IKA-KS4000i.

Para avaliar o percentual do 1,4-naftoquinona liberado nas membranas, uma alíquota de, aproximadamente, 3 mL do sistema era retirada para leitura após decorridos os intervalos de tempos pré-determinados, os quais totalizaram uma análise com duração de 360 horas. Após a retirada de cada alíquota para ser quantificada, a mesma era reposta a sua solução de origem. O ensaio foi realizado em triplicata e, anteriormente à decisão de colocar as membranas imersas em 25 mL, foi averiguado em procedimento experimental o comportamento de liberação do 1,4-naftoquinona da membrana QN7T05L em 50 mL, como também em 25 mL de PBS. Decorridos 15 dias, verificou-se que havia um melhor perfil de liberação da membrana em solução de PBS referente à 25 mL, com concentração superior, justificando-se sua escolha para liberação da substância das demais membranas.

4.3 CARACTERIZAÇÕES

4.3.1 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. Tais 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).

A espectroscopia na região de infravermelho é utilizada para testar a identidade dos compostos, dando informações estruturais sobre as bandas dos agrupamentos

das moléculas e os grupos funcionais que participam da estrutura, além do cálculo do grau de substituição (análise semiquantitativa) descrito por Zorzin et al. (2015).

$$\%GS = \left(1 - \frac{\text{peak height cured}}{\text{peak height uncured}}\right) \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Esta técnica considera que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis vibracionais das moléculas (FOOK, 2005). Esta técnica foi utilizada para caracterizar os materiais quitosana, 1,4-naftoquinona e membranas confeccionadas. A análise foi obtida a partir do espectrômetro Spectrum 400 Perkin Elmer FTIR/FTNIR *Spectrometer*, com varredura entre 4000 a 600cm⁻¹.

4.3.2 Difração de Raios X (DRX)

A difração de raios X é um fenômeno de espalhamento da radiação eletromagnética, provocada pela interação entre o feixe de raios X incidente e os elétrons dos átomos componentes de um material. A técnica de difração de raios X é usada para se obter informações estruturais importantes sobre a cristalinidade de qualquer composto. A principal aplicação da difração de raios X refere-se à identificação de compostos cristalinos, sejam eles orgânicos ou inorgânicos (KAHN, 2011).

O objetivo da utilização do DRX é avaliar o grau de cristalinidade da membrana de quitosana e a possível influência na presença do 1,4-naftoquinona e agente reticulante. A análise foi realizada em um difratômetro da SHIMADZU (modelo XRD 7000) com varredura angular de 5° a 40° com passo de 1°/min, na montagem de Bragg-Brentano, sistema θ -2 θ , tensão de 40kV e corrente de 30mA, utilizando-se radiação de K α do Cobre ($\lambda = 1,5418$). O grau de cristalinidade de todos os materiais foi calculado automaticamente pelo *software* que acompanha o equipamento.

4.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) é um equipamento capaz de produzir imagens de alta ampliação (até 300.000 X) e resolução. A microscopia

eletrônica analisa o material através da irradiação por um fino feixe de elétrons que interage com a superfície da amostra e origina uma série de radiações, fornecendo, dessa forma, informação morfológica e topográfica sobre superfícies de sólidos, necessária para se entender o comportamento de superfícies (FIDELES, 2010; FOOK, 2005). A caracterização foi realizada no microscópio eletrônico de varredura de bancada, modelo TM-1000, marca Hitachi, com resolução máxima de 10.000 x instalado no Laboratório de Caracterização de Materiais – UAEMa/UFMG.

4.3.4 Termogravimetria (TG)

A utilização da análise de termogravimetria na caracterização de polímeros está pautada no estudo da estabilidade e decomposição térmica dos mesmos. Essa análise foi realizada com o objetivo de avaliar a estabilidade térmica das membranas e o comportamento da quitosana quando adicionado o 1,4-naftoquinona. As curvas de TG foram obtidas através de amostras acondicionadas em um cadinho de alumínio, no equipamento TGA 50H, Shimadzu, com os seguintes parâmetros: razão de aquecimento 10°C/min; atmosfera de ar sintético com fluxo de gás de 20 mL/min, variando de 25 a 600°C.

4.3.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica de análise térmica bastante utilizada para a obtenção de informações sobre as temperaturas de transição dos materiais como a temperatura de transição vítrea, a temperatura de cristalização e a temperatura de fusão cristalina (DALLAN, 2005).

A técnica de DSC foi realizada no equipamento DSC 8000/8500 Perkin Elmer, com o objetivo de observar as transições de fases e avaliar se existem mudanças nas propriedades nas amostras de quitosana e quitosana/1,4-naftoquinona e se ocorreram interações químicas entre a quitosana e o 1,4-naftoquinona. As amostras foram acondicionadas em cadinho de alumina, com a temperatura variando de 25°C a 400°C/min, razão de aquecimento de 10°C/min e atmosfera de gás nitrogênio com fluxo de 20 mL/min.

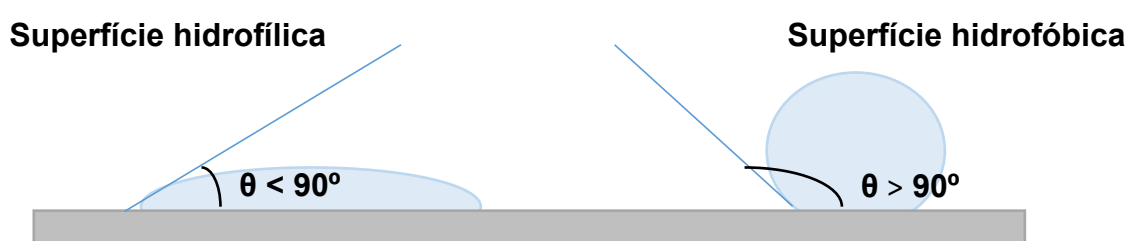
4.3.6 Ensaio Mecânico de Tração

Para o ensaio de tração foram utilizados 5 corpos de prova de cada tipo de membranas produzida e as médias de todas as amostras para maior representatividade dos dados obtidos. Este ensaio foi realizado na Máquina Universal de Ensaio, INSTRON, modelo 3366, de acordo com a norma ASTM D882-91 (ASTM, 1991) e teve como objetivo avaliar a resistência à tração das membranas de quitosana sem e com 1,4-naftoquinona. Foram utilizados os seguintes parâmetros: célula de carga de 500N, com uso de extensômetro mecânico a temperatura ambiente e velocidade de deslocamento do travessão de 5 mm/min.

4.3.7 Ensaio de Molhabilidade por Ângulo de Contato

O ângulo de contato é definido como o ângulo entre um plano tangente a uma gota do líquido e um plano contendo a superfície onde o líquido se encontra depositado, conforme esquematizado na Figura 12.

Figura 12 – Ângulo de contato θ entre uma gota líquida e uma superfície



Fonte: Rosendo (2016).

O ensaio consiste no cálculo da tensão superficial da membrana baseada na análise do formato da gota. O ângulo de molhabilidade entre a gota do líquido com tensão superficial conhecida e a superfície sólida depende da relação entre as forças adesivas, que fariam a gota se espalhar sobre a superfície.

Caso o ângulo de contato tenha um valor acima de 90° , o líquido tem a tendência a não molhar a superfície e a fase é chamada de não-molhante. Com um valor próximo

a 0°, o líquido recobre toda a superfície formando um filme fino de fluido molhante. Quando o valor do ângulo for menor ou igual a 90°, a molhabilidade é dita parcial. Logo, quanto menor for o ângulo, maior será a molhabilidade (WISNIEWSKI; ARGUELHO, 2011).

A realização do ensaio foi em triplicata, com as amostras cortadas na dimensão de 2,5 x 2,5 cm. O gotejamento ocorreu com água destilada (pH 6,9), sendo realizadas imagens fotográficas de cada gota em sequência, três gotas em cada amostra, as quais foram enviadas para o programa *Angle Calculator*, que calcula o ângulo formado, verificando assim se o material é hidrofílico ou hidrofóbico. Para o ensaio foi empregado um goniômetro desenvolvido por técnicos da Unidade Acadêmica de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

4.3.8 Grau de Intumescimento (GI)

Este ensaio é realizado no intuito de investigar o comportamento do material durante a imersão e permanência em solução aquosa semelhante ao meio interno do organismo. A absorção de líquido pelo material pode ser um fator importante na liberação do fármaco, daí reside sua importância.

Para realização deste ensaio foram preparadas amostras em quintuplicata das membranas de cada composição com dimensão de 1,0 x 1,0 cm. Cada amostra foi colocada em estufa a 40°C, por 24 horas, em seguida pesada em balança analítica de precisão digital antes da imersão em 5 mL de solução tampão fosfato (PBS) (pH 7,4) e colocada em uma estufa bacteriológica a 37 °C. As amostras foram pesadas nos tempos de 30 minutos, 2, 4, 6, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas. No ato da pesagem, elas eram removidas da solução, secas ligeiramente em papel absorvente para eliminar o excesso da solução, e o peso úmido de cada fragmento era medido na mesma balança. O grau de intumescimento (em porcentagem) foi determinado pela Equação 5:

$$\text{Grau de Intumescimento} = \frac{M_f - M_0}{M_0} \times 100 (\%)$$

Equação 5

Onde: M_f - Massa intumescida

M_0 - Massa seca

4.3.9 Biodegradação Enzimática

Esta caracterização foi baseada 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).

O Ensaio de Biodegradação Enzimática tem o objetivo de verificar a degradação de um biomaterial em meios biológicos, pois é uma das variáveis de grande relevância para sua caracterização, já que tal propriedade está diretamente relacionada ao tempo de vida útil dos materiais após o início de sua utilização pelo paciente (DALLAN, 2005).

Para realização desse estudo, as amostras foram divididas em dois grupos: no primeiro, as amostras das membranas foram imersas em solução de lisozima/*Phosphate Buffered Saline* – PBS, com concentração de 1,0 mg/mL, e no segundo grupo foi utilizada apenas a solução de PBS para controle (FOOK, 2012).

Anteriormente à imersão, cada amostra foi colocada em estufa a 40°C, por 24 horas, em seguida pesada em balança analítica de precisão digital. Foram utilizadas três amostras de cada membrana produzida, tanto para o tampão PBS, como para a solução de lisozima/PBS. As membranas foram imersas em cada uma das soluções descritas e avaliadas nos períodos de 7, 14, 21 e 30 dias e colocadas na estufa bacteriológica a 37°C. Ao final de sete dias, foi removido o 1º lote, e as amostras foram lavadas em água destilada, colocadas no ultra-freezer, a uma temperatura de -84°C por 24 horas, e em seguida no liofilizador pelo mesmo tempo sendo, posteriormente, eram colocadas em uma estufa a 40°C durante quatro horas e pesadas em balança analítica.

Nos segundo, terceiro e quarto lotes, as soluções de PBS e PBS/lisozima foram trocadas por novas soluções com a mesma composição e concentração a cada sete dias e, novamente, acondicionados na estufa à mesma temperatura. Após 14 dias, o segundo lote foi removido da estufa, passando pela mesma sequência de procedimentos já descritos, assim como os lotes subsequentes.

Para as membranas produzidas por evaporação de solvente, as mesmas não foram congeladas e liofilizadas conforme mencionado, mas seguiu-se o procedimento

de lavagem em água destilada e secagem em estufa a 40°C, por quatro horas e pesadas em balança analítica.

As diferenças percentuais das massas das amostras antes e após o ensaio forneceram os resultados referentes à degradação das membranas, observados a partir da média de ensaios em triplicata.

O cálculo da perda de massa foi determinado pela Equação 6, expressa abaixo:

$$PM\% = \left(\frac{M_0 - M_f}{M_0} \right) \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

Onde: M_0 - Massa inicial
 M_f - Massa final

4.3.10 Avaliação da Viabilidade Celular dos Fibroblastos (Citotoxicidade)

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* das membranas foi realizada pelo teste de avaliação da viabilidade celular de fibroblastos por MTT [brometo de 3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio] de acordo com a ISO 10993-5:2009. Foi utilizado o método direto de contato entre o substrato do material e as células. A linha celular foi L929 adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro.

Neste ensaio, o MTT é acumulado pelas células por endocitose e a redução do anel tetrazólico deste sal resulta na formação de cristais de formazan de cor azul que se acumulam em compartimentos endossomais e/ou lisossomais, sendo depois transportados para fora das células por exocitose. Sendo a endocitose um mecanismo fundamental das células vivas, o ensaio do MTT tem sido usado frequentemente como ensaio de viabilidade celular (SILVA, 2015). Como este teste é considerado relativamente seguro para o operador, rápido, sensível e reprodutível, o mesmo surgiu como uma alternativa, tornando-se um método popular de rastreamento para a citotoxicidade de vários compostos (STODDART, 2011).

Foram avaliadas as membranas que apresentaram melhor desempenho na liberação do 1,4-naftoquinona, neste caso a QN7T05L, QN7T03L e QN7T01L, além da QN7L e QT05L. Essas duas últimas com a finalidade de se observar o comportamento citotóxico em membrana neutralizada (QN7L) e em uma membrana

de quitosana sem 1,4-naftoquinona. Também se utilizou uma solução de PBS com 1,4-naftoquinona na concentração de 450 $\mu\text{Mol/L}$, para verificar a ação direta da substância. Para tanto, utilizou-se uma concentração de 5×10^5 células/mL RPMI e adicionados 100 μL em uma placa de 96 poços. A placa foi transferida para a estufa de CO_2 (5%) a 37 °C por 1 hora. Após este período, foram adicionadas as amostras e mais 200 μL de RPMI 1640-C. RPMI 1640-C foi utilizado como controle negativo. A placa foi incubada novamente em estufa de CO_2 (5%) a 37°C por 24 horas. Após as 24 horas, foram adicionados 100 μL de solução de MTT (0,5mg/mL) em RPMI 1640-C. Em seguida, a placa foi incubada em estufa de CO_2 (5%) a 37°C por 3 horas. Posteriormente o sobrenadante foi descartado e adicionado 100 μL de álcool isopropílico.

A leitura da densidade ótica foi determinada em um leitor de microplacas (Victor3 – PerkinElmer), a 540 nm com filtro de referência de 620 nm. A viabilidade celular foi calculada em porcentagem, considerando o controle negativo com 100% de viabilidade. O cálculo da viabilidade foi por meio do Teste de Grubbs para *Outliers*, posteriormente a esse teste, o cálculo da média e o desvio padrão corrigido foi realizado pelo Graph Pad Prism 6.

Segundo a classificação de citotoxicidade de materiais da norma ISO 10993-5:2009, a viabilidade celular (%) determina a citotoxicidade do material, de forma que se o percentual de viabilidade celular for $> 70\%$, o material é avaliado como não-citotóxico.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram, primeiramente, analisados descritivamente. Logo após, utilizou-se os testes estatísticos não-paramétricos de Kruskal-Wallis e de Wilcoxon, com nível de 95% de confiança para verificar a existência de diferenças significativas entre as medidas das membranas em estudo para os ensaios de Tração, Molhabilidade por Ângulo de Contato, Intumescimento, Biodegradação. Para execução das análises estatísticas utilizou-se o *software* SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*), versão 20.

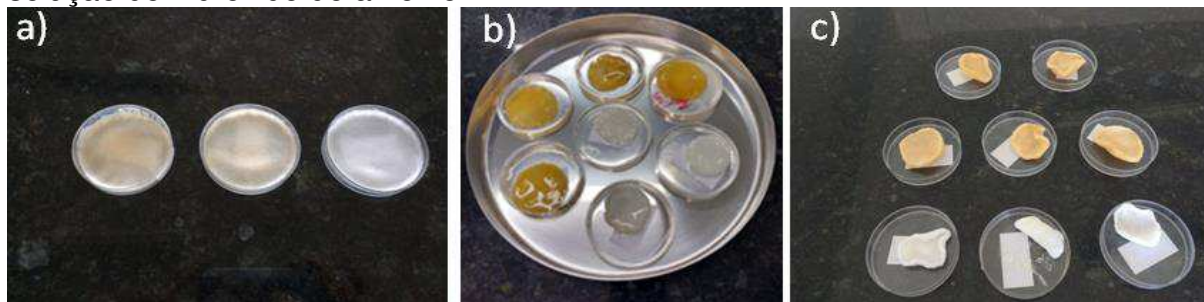
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi realizado um teste experimental exploratório para o estabelecimento das condições a serem utilizadas no desenvolvimento das membranas.

Na Figura 13 são apresentados os resultados das membranas descritas na primeira metodologia. Entretanto, essas membranas produzidas, na época, apresentavam concentração de 300 $\mu\text{Mol/L}$ e 600 $\mu\text{Mol/L}$ de 1,4-naftoquinona e foram reticuladas a uma concentração de 0,5% e 1% (m/v) durante 15 minutos.

Na Figura 13a é possível observar membranas de quitosana sem e com 1,4-naftoquinona liofilizadas. Na Figura 13b tem-se a incorporação do Tripolifosfato de Sódio, agente reticulante e, na Figura 13c tem-se as membranas neutralizadas com o hidróxido de amônio.

Figura 13 - Aspecto macroscópico das membranas de quitosana sem e com a incorporação do 1,4-naftoquinona, seguida da reticulação e após neutralização na solução de hidróxido de amônio



Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Foi possível inferir a incorporação do 1,4-naftoquinona nas membranas através da mudança de coloração entre as mesmas (Figura 13a), além de um odor peculiar. Durante o processo de reticulação (Figura 13b) foi observada uma diminuição no diâmetro das membranas, especialmente daquelas sem o 1,4-naftoquinona. Após a neutralização verificou-se que as mesmas estavam úmidas e retraídas, com destaque para as membranas de quitosana, conforme visto na Figura 13c (membranas brancas). Em seguida, as amostras foram colocadas para secar à temperatura ambiente no dessecador durante 24h.

Analisando as membranas quanto ao tamanho, foi notória a diferença após os processos de reticulação e neutralização, observando-se que a média da massa, diâmetro, espessura e volume estavam mais elevados anteriormente aos dois

processos e que, após tais parâmetros diminuïrem, houve conseqüente aumento de densidade, verificado através das Equações 7 e 8:

(7) - Cálculo do Volume

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

Onde:

V - volume

r - raio

h - espessura

(8) - Cálculo da Densidade

$$D = m/v$$

Onde:

D - densidade

m - massa

v – volume

Também foi constatada a fragilidade das membranas ao manipulá-las, sugerindo que o tempo de reticulação com o TPP pode ter levado à essa condição.

De acordo com essas observações, ajustes foram necessários e realizados no estabelecimento das metodologias de desenvolvimento das membranas, incluindo o tempo da reticulação, passando-se a usar um período de cinco minutos nesse processo. Em seguida, três propostas de produção de membranas de quitosana com 1,4-naftoquinona foram desenvolvidas: liofilização em monocamada, liofilização em dupla camada e por evaporação de solvente. Entretanto, verificou-se que a membrana liofilizada em dupla camada, devido à espessura da placa de Petri escolhida, não favorecia o estabelecimento das camadas, sendo assim, excluída. As outras duas foram produzidas nas concentrações de 300 µMol/L e 600 µMol/L de 1,4-naftoquinona e seguiu-se a caracterização.

As membranas foram caracterizadas quanto aos ensaios de FTIR, DRX, MEV, TG/DTG, Ensaio de Molhabilidade por Ângulo de Contato e Grau de Intumescimento. Todos os resultados foram satisfatórios sob o ponto de vista da constatação da incorporação do 1,4-naftoquinona na membrana de quitosana, bem como característica hidrofílica e bons parâmetros de intumescimento, servindo ao propósito de ser um curativo.

Entretanto, ao ser realizado o procedimento de liberação controlada do fármaco, no qual optou-se por fazer apenas com as membranas de maior concentração, no caso 600 µMol/L, verificou-se que a quantidade liberada após um acompanhamento de oito dias consecutivos era muito baixa. O período foi aumentado para 15 dias, quando foi observado um aumento na liberação. Compreendendo que

esse processo é parte essencial desta tese, após uma avaliação cuidadosa, decidiu-se por aumentar a concentração do 1,4-naftoquinona nas membranas para 750 $\mu\text{M/L}$ e diminuir a concentração do agente reticulante, ou seja, a variação passou de 1% para 0,1%, 0,3% e 0,5% (m/v) em ambas metodologias de processamento das membranas.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS

A partir dos ajustes realizados, serão apresentados nesta seção os resultados referentes à confecção das membranas de ambas metodologias (liofilização e evaporação de solvente), descrita nos itens 4.2.1 e 4.2.2, bem como as caracterizações, as quais incluíram FTIR, DRX, MEV, TG/DTG, DSC, Ensaio Mecânico de Tração, Ensaio de Molhabilidade por Ângulo de Contato, Grau de Intumescimento, Ensaio de Biodegradação e Viabilidade Celular (Citotoxicidade).

As membranas liofilizadas QT05L, QT03L, QT01L, QNL, QN7T05L, QN7T03L, QN7T01L, QN7L apresentaram, macroscopicamente, superfície uniforme e aspecto flexível, opaca e aparentemente sem partículas aglomeradas, conforme visualizado na Figura 14.

Figura 14 - Aspecto macroscópico das membranas liofilizadas de quitosana sem e com a incorporação do 1,4-naftoquinona. a) QT05L, b) QN7T05L e c) QN7T05L após reticulação a 0,5%.



Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Comparando-se as membranas, percebe-se uma alteração na coloração: as membranas visualizadas na Figura 14a referem-se às membranas de quitosana sem 1,4-naftoquinona e as membranas das Figuras 14b e 14c possuem a substância na concentração de 750 $\mu\text{Mol/L}$, que possivelmente conferiu uma cor amarelada, o que

faz disso um indicativo da incorporação da mesma na matriz de quitosana. Outra observação diz respeito a uma propriedade organoléptica: percebeu-se, por meio do olfato, que as membranas com o 1,4-naftoquinona apresentaram um odor típico dessa substância.

Uma das particularidades encontrada foi a diferença de tamanho e peso entre as membranas liofilizadas, neutralizadas e reticuladas, a partir do cálculo do volume e densidade (equações 7 e 8), cujos valores estão ilustrados na Tabela 6.

Tabela 6 - Volume e densidade das membranas de quitosana e quitosana/1,4-naftoquinona, liofilizadas, antes e após reticulação e neutralização.

MEMBRANAS	VOLUME		≠ (%)	DENSIDADE		≠ (%)
	(cm ³) antes	(cm ³) após		(g/cm ³) antes	(g/cm ³) após	
QNL	6,91	1,83	-73,47	0,02	0,06	225,48
QT01	5,63	5,41	-3,80	0,03	0,03	4,86
QT03	5,73	3,46	-39,55	0,03	0,04	61,23
QT05	6,58	1,13	-82,81	0,02	0,11	451,61
QN7L	8,30	4,18	-49,62	0,02	0,03	70,53
QN7T01	4,27	5,42	26,86	0,03	0,02	-31,07
QN7T03	5,47	3,70	-32,30	0,03	0,03	34,55
QN7T05	4,70	3,39	-27,74	0,03	0,04	24,02

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Essas membranas também seguiram um comportamento semelhante às do teste experimental exploratório já mencionado, com diminuição do volume e aumento da densidade após os processos de neutralização e reticulação. As neutralizadas apresentaram valores ligeiramente superiores quanto a esses dois parâmetros em relação às reticuladas. Supõe-se que o agente reticulante pode ter ocasionado a retração das membranas (CRUZ et al., 2016).

As membranas produzidas por evaporação de solvente QT05E, QT03E, QT01E, QNE, QN7T05E, QN7T03E, QN7T01E, QN7E também exibiram, macroscopicamente, uma superfície uniforme e aspecto flexível, transparente, mais fina e aparentemente sem partículas aglomeradas e, à medida em que o 1,4-naftoquinona foi incorporado, as membranas passaram a apresentar a coloração amarelada, conforme visualizado na Figura 15.

Figura 15 - Aspecto macroscópico das membranas produzidas pelo processo de evaporação de solvente de quitosana sem e com a incorporação do 1,4-naftoquinona. a) QT05E, b) QN7T05E e c) QT05E e QN7T05L após reticulação a 0,5%.



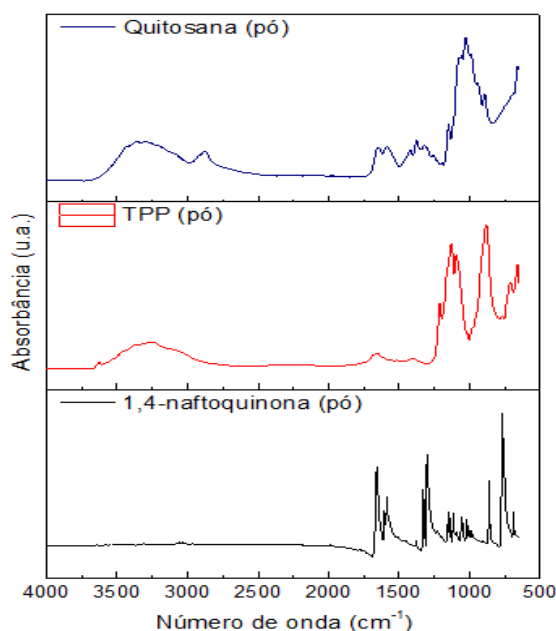
Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Para estas não foi possível realizar o cálculo do volume e densidade, porém é perceptível a diferença de tamanho após os processos de reticulação e neutralização.

5.1.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de FTIR foi utilizada com o objetivo de identificar os espectros (bandas características dos grupos funcionais) do pó de quitosana, tripolifosfato de sódio e 1,4-naftoquinona, ilustrados na Figura 16. Posteriormente, seguem-se as membranas produzidas com tais materiais.

Figura 16 - Espectros de FTIR dos pós da quitosana, tripolifosfato de sódio e 1,4-naftoquinona.



Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

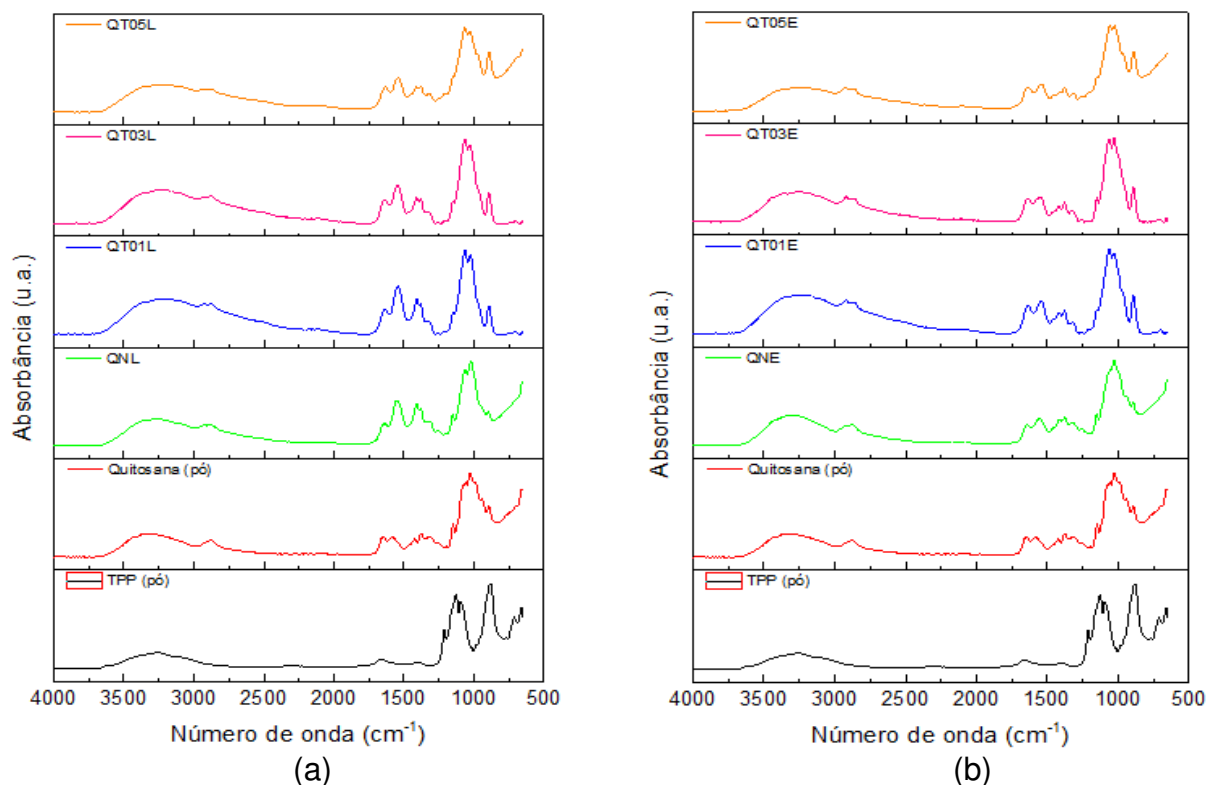
No espectro obtido a partir do pó da quitosana, Figura 16, podem ser observadas as principais bandas características desse polímero: a região localizada entre 3362 cm^{-1} a 3272 cm^{-1} corresponde às vibrações de estiramento dos grupos OH e NH. A banda 2876 cm^{-1} é atribuída à vibração de estiramento do grupo CH (DI MARTINO et al., 2017). A região 1650 cm^{-1} corresponde ao modo de vibração por estiramento da ligação C=O, e a banda 1585 cm^{-1} é atribuída à deformação da ligação -NH da amina. A presença dessas duas bandas (C=O e N-H), bem como a banda de absorção em 1379 cm^{-1} que é característica da deformação angular simétrica do grupo -CH₃, em conjunto, indica a presença de grupos acetamidos (AROF; OSMAN, 2003; KOLHE; KANNAM, 2003; TORRES et al., 2005), pois a quitosana não está 100% desacetilada, sendo uma característica da quitina (SIONKOWSKA et al., 2004). As bandas em 1147 cm^{-1} e 893 cm^{-1} são atribuídas à vibração de estiramento do grupo C-O-C. A banda de absorção na região de 1064 cm^{-1} corresponde à vibração de estiramento dos grupos C-O-C, característica da estrutura sacarídica da quitosana (DI MARTINO et al., 2017; MINCHEVA et al., 2004).

Ao se avaliar o espectro do TPP (pó) (Figura 16) identificou-se bandas intensas em várias regiões. A banda de absorção em 1206 cm^{-1} corresponde ao estiramento simétrico do grupo P=O, a banda 1129 cm^{-1} é atribuída ao estiramento axial simétrico e assimétrico do grupo PO₂. A banda 1090 cm^{-1} é característica do estiramento simétrico e assimétrico do grupo PO₃. A banda de absorção em 884 cm^{-1} corresponde ao estiramento assimétrico P-O-P (MARTINS et al., 2012).

Quanto ao espectro do pó do 1,4-naftoquinona (Figura 16), diversas bandas foram identificadas entre 1658 e 767 cm^{-1} . As bandas 1653 cm^{-1} e 1585 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento dos grupos carbonila (C=O) presentes nas posições 1 e 4, como também C=C presente na estrutura do fármaco (CRUZ, 2015). A banda identificada em 1297 cm^{-1} está, possivelmente, ligada a deformação axial do grupo C-O, devido o 1,4-naftoquinona ter grau de pureza 97%, esses 3% restantes podem ser relacionados às impurezas. As demais bandas (858 cm^{-1} e 767 cm^{-1}) correspondem à deformação angular fora do plano dos grupos C-H (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 2006).

Os espectros de FTIR das membranas de quitosana neutralizadas e reticuladas, sem 1,4-naftoquinona, de ambas metodologias seguem ilustrados nas Figuras 17a e 17b.

Figura 17 - Espectros de FTIR das membranas de quitosana liofilizadas (a) e por evaporação de solvente (b), neutralizadas e reticuladas.



Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

A verificação de bandas intensas na membrana QNL evidenciadas em 1550 cm^{-1} e 1414 cm^{-1} pode ser atribuída à presença do íon carboxilato, pois o método de obtenção das membranas foi através da solução de ácido acético, e como possivelmente não houve uma neutralização efetiva com o hidróxido de amônio, formou-se o acetato de quitosana, fato observado em outras pesquisas (FIDÉLIS et al., 2013; FURTADO, 2014).

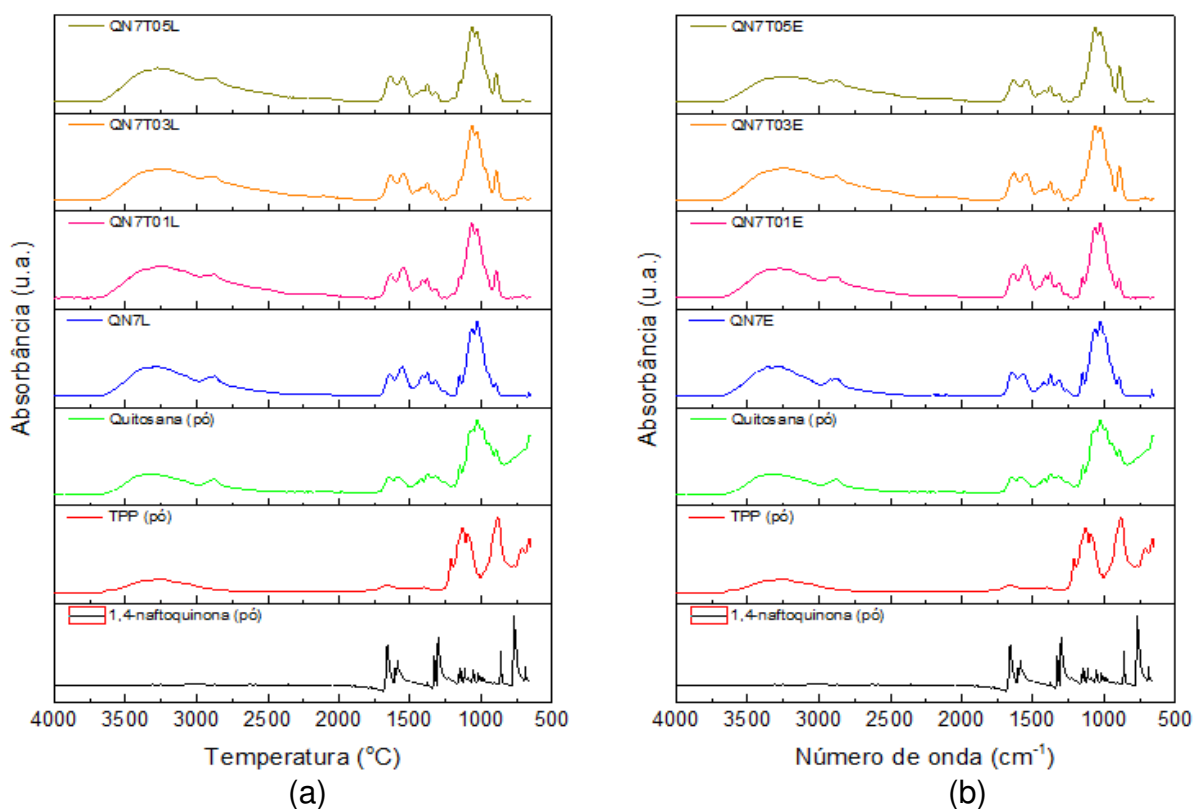
Nas membranas reticuladas QT01L, QT03L e QT05L foi observada um aumento da intensidade na região da banda entre 1585 cm^{-1} e 1521 cm^{-1} . É possível verificar uma banda discreta na membrana QT05L correspondente à vibração de estiramento do grupo $\text{P}=\text{O}$, 1206 cm^{-1} , o que confirma a interação entre quitosana e TPP, visto que a banda identificada foi semelhante à encontrada em outras pesquisas (GIERSZEWSKA-DRUŻYŃSKA; OSTROWSKA-CZUBENKO, 2010; PIERÓG; GIERSZEWSKA-DRUŻYŃSKA; OSTROWSKA-CZUBENKO, 2009). A presença das bandas 1550 cm^{-1} e 1206 cm^{-1} sugere que houve uma interação entre o grupo amino e fosfato, sendo a reticulação confirmada nessa análise. Nas três membranas identificou-se vibração da deformação N-H do grupo amina na região 1402 cm^{-1} e

deformação axial do grupo C-O-C em 1022 cm^{-1} . Foi observada uma banda em 895 cm^{-1} atribuído ao alongamento da ligação P-O-P, dado confirmado com o estudo de Martins et al., (2012).

Quanto às membranas preparadas por evaporação de solvente, a QNE diferentemente da QNL apresentou neutralização efetiva, devido a intensidade do grupo amina ($-\text{NH}_2$) na região 1563 cm^{-1} . Os espectros das amostras reticuladas apresentaram bandas em regiões semelhantes às liofilizadas, porém com menor intensidade nas regiões 1550 cm^{-1} e 1366 cm^{-1} . Na região equivalente à banda 895 cm^{-1} houve leve aumento da intensidade, confirmando a reticulação com a presença da ligação P-O-P.

Os espectros das membranas de quitosana/1,4-naftoquinona liofilizadas e por evaporação de solvente, neutralizadas e reticuladas, são apresentados na Figura 18a e 18b.

Figura 18 - Espectros de FTIR das membranas de quitosana/1,4-naftoquinona liofilizadas (a) e por evaporação de solvente (b), neutralizadas e reticuladas.



Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Ao se comparar as membranas de quitosana/1,4-naftoquinona com as de quitosana apenas, observa-se um aumento na intensidade da banda entre 3435 cm^{-1} e 3112 cm^{-1} e 1655 cm^{-1} e 1513 cm^{-1} , esta última região possivelmente relacionada à

competição do 1,4-naftoquinona pela interação com os grupos funcionais do polímero (CRUZ, 2015). As demais bandas permaneceram nas mesmas regiões quando comparados os dois grupos (liofilizadas e evaporadas com 1,4-naftoquinona). As principais bandas de absorção dos pós dos materiais e das membranas de quitosana e quitosana/1,4-naftoquinona podem ser visualizadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Principais bandas de absorção nos espectros de FTIR para os pós de quitosana, tripolifosfato de sódio, 1,4-naftoquinona e membranas de quitosana e quitosana/1,4-naftoquinona.

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
3362 a 3272	OH, NH
2876	CH
1650, 1653	C=O
1585, 1563, 1550	NH
1402	NH
1379	CH ₃
1297	C-O
1206	P=O
1147, 1064, 1022, 893	COC
1129	PO ₂
1090	PO ₃
895, 884	POP
858, 767	Deformação angular fora do plano CH

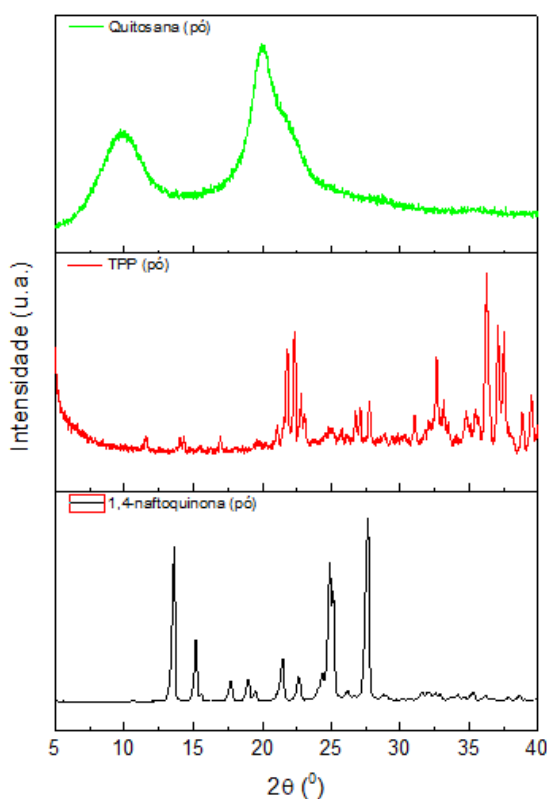
Fonte: Dados da Pesquisa, 2017

De modo a elucidar a interação do 1,4-naftoquinona e quitosana foi realizado um cálculo estimativo (Equação 4) através das bandas de interação correspondente à essas substâncias. Observou-se um aumento de 39,97% da banda 1650cm⁻¹ referente ao aumento da absorbância da vibração pelo efeito cumulativo de ambos compostos. Na banda 1585cm⁻¹ verificou-se uma redução de 29,12% da absorbância da banda correspondente à interação do grupo funcional C=O do 1,4-naftoquinona com o NH da quitosana.

5.1.2 Difração de Raios X (DRX)

O pó de quitosana, tripolifosfato de sódio e do 1,4-naftoquinona foram caracterizados por difração de raios X com a finalidade de observar sua cristalinidade e, posteriormente, a mesma propriedade nas membranas. Os respectivos difratogramas estão apresentados na Figura 19.

Figura 19 - Difratogramas de raios X do pó da quitosana, tripolifosfato de sódio e 1,4-naftoquinona.



Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

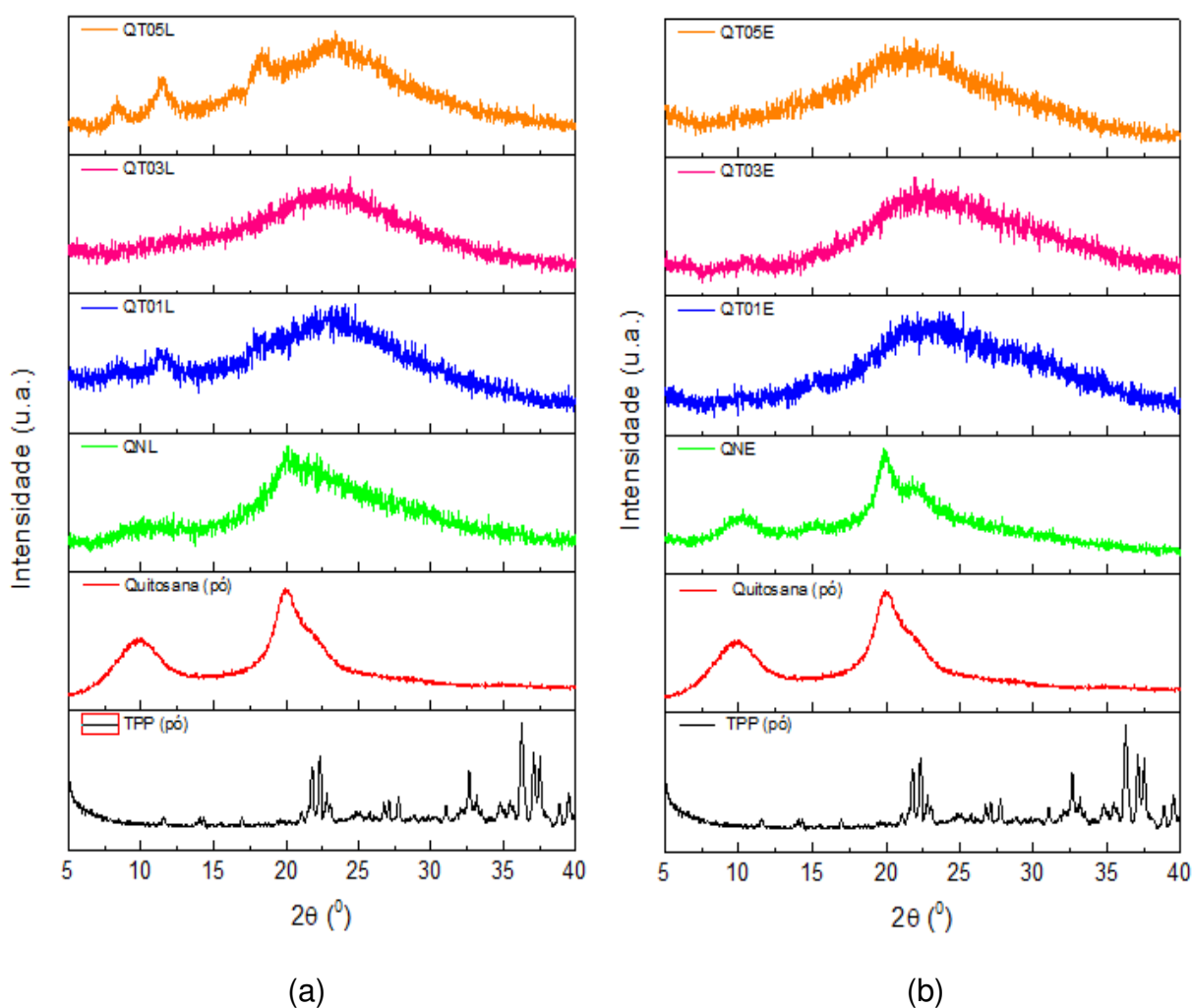
Ao observar o difratograma do pó da quitosana verifica-se que o mesmo apresentou picos com base larga em $2\theta = 9,8^\circ$ e $2\theta = 20^\circ$ (Figura 19), típicos de material semicristalino, estando em concordância com os difratogramas apresentados por Cruz et al., (2016), Barbosa (2011) e Fidéles (2010), e com grau de cristalinidade de 9,15%. A quitosana apresenta um perfil semicristalino consequente às fortes interações intra e intermolecular, caracterizada pelas pontes de hidrogênio formadas entre os grupos amina, álcool, amida, dentre outros grupos funcionais presentes (URAGAMI; TOKURA, 2006).

Na análise do Tripolifosfato de sódio, identificou-se a presença de picos de base estreita entre $2\theta = 11,6^\circ$ e $2\theta = 39,48^\circ$, com grau de cristalinidade elevado de 86,81%, corroborando outros estudos desenvolvidos (MARTINS et al., 2012; BOU et al., 2000).

Quanto ao difratograma do pó do 1,4-naftoquinona (Figura 19), esse apresentou picos intensos de base estreita entre $2\theta = 13,5^\circ$ e $2\theta = 27,7^\circ$ e grau de cristalinidade de 81,7%, o que condiz com um composto de estrutura cristalina.

A Figura 20 ilustra os difratogramas das membranas de quitosana liofilizadas e por evaporação de solvente, neutralizadas e reticuladas.

Figura 20 - Difratogramas de raios X das membranas de quitosana liofilizadas (a) e por evaporação de solvente (b), neutralizadas e reticuladas.



Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Observa-se que, embora a cristalinidade da membrana QNL com a presença do hidróxido de amônio tenha alcançado um valor de 20,9%, o seu difratograma apresentou um pico largo em aproximadamente $2\theta = 19,8^\circ$, e na região $2\theta = 8,5^\circ$ e $12,7^\circ$, um alargamento característico de fase amorfa, quando comparada ao pó de quitosana pura, o que está de acordo com os resultados de Martins et al., (2012). A membrana QNE apresentou grau de cristalinidade de 21,5%, e picos em $2\theta = 10,17^\circ$, $15,1^\circ$, $19,8^\circ$ e $22,13^\circ$.

Na membrana QT01L verifica-se a existência de dois picos em $2\theta = 8,5^\circ$ e $11,3^\circ$, provavelmente relacionados à presença do agente reticulante, pois seu grau de cristalinidade foi de 24,3%. A membrana QT03L apresentou um alargamento de pico na região entre $2\theta = 19,3^\circ$ a $26,9^\circ$ com grau de cristalinidade de 18%.

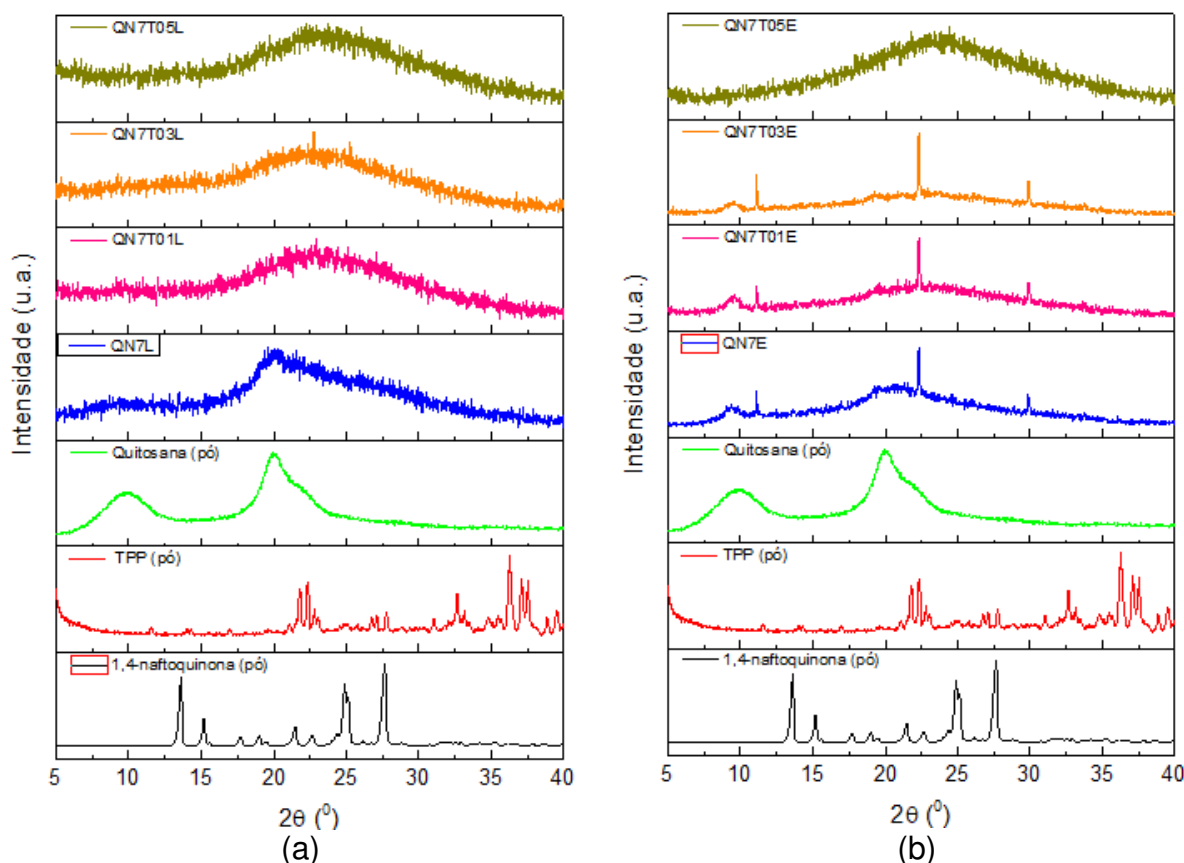
A membrana QT05L apresentou um difratograma com picos discretamente largos em aproximadamente $2\theta = 8,3^\circ$, $11,4^\circ$, $18,3^\circ$ e $23,4^\circ$ e grau de cristalinidade de 17%, evidenciando uma diminuição da cristalinidade, possivelmente ocasionada pelo agente reticulante, corroborando a pesquisa de Cruz et al., (2016), que trabalharam com síntese e caracterização de arcabouços de quitosana com agente antineoplásico e de Costa Jr e Mansur (2008), que caracterizaram blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia tecidual e justificaram essa redução devido à diminuição dos graus de liberdade na conformação 3D.

As membranas QT01E, QT03E e QT05E não apresentaram alteração do perfil cristalino entre si. Todas exibiram uma região de pico largo, quando comparado com a QNE e com o pó de quitosana, possivelmente devido à ação do TPP, com grau de cristalinidade crescente: 18%, 21,6% e 22,2%.

Os difratogramas das membranas de quitosana com 1,4-naftoquinona liofilizadas e por evaporação de solvente, neutralizadas e reticuladas seguem apresentados na Figura 21.

A membrana QN7L apresentou comportamento semelhante à QNL, mesmo com a adição do 1,4-naftoquinona, com pico de base larga de $2\theta = 20^\circ$ e grau de cristalinidade de 17,6%, diferindo dos valores encontrados na pesquisa de Cruz et al., (2016), cujo grau de cristalinidade foi inferior.

Figura 21 - Difratogramas de raios X das membranas de quitosana/1,4-naftoquinona liofilizadas (a) e por evaporação de solvente (b), neutralizadas e reticuladas.



Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

As membranas QN7T01L, QN7T03L e QN7T05L não apresentaram alteração do perfil cristalino entre si. Todas exibiram uma região de pico largo entre $2\theta = 19,2^\circ$ e $26,6^\circ$ e grau de cristalinidade crescente de 25,1%, 25,7% e 28,4%. Uma possível justificativa para tal característica pode ter sido a presença do 1,4-naftoquinona, bem como do próprio agente reticulante nessas membranas, elevando o grau de cristalinidade. Essas informações assumem importância ao se estudar a velocidade de degradação enzimática da quitosana, visto que esta é inversamente proporcional ao seu grau de cristalinidade (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

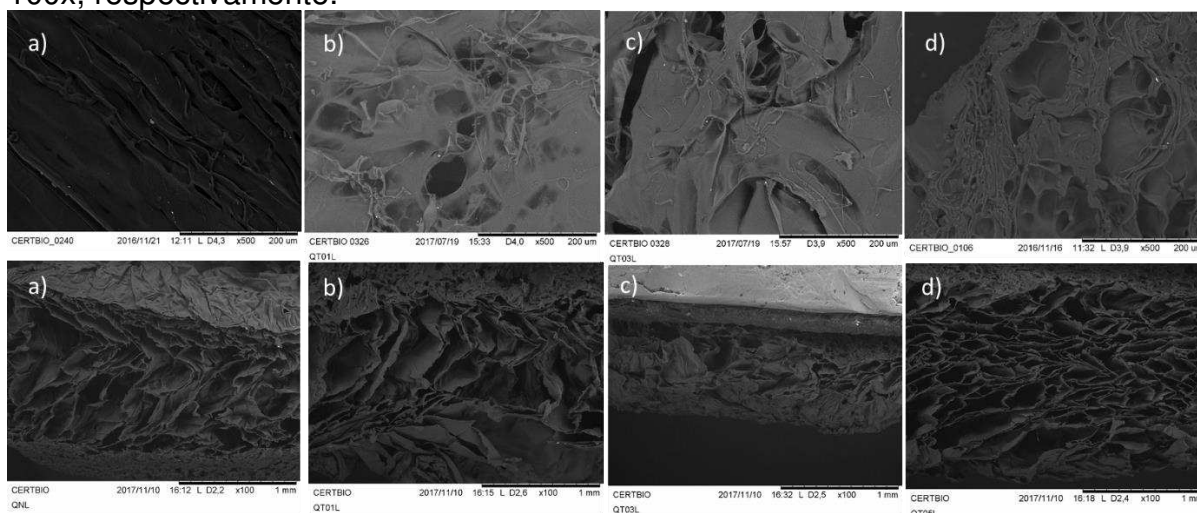
Ao se analisar as membranas com o 1,4-naftoquinona, porém produzidas por evaporação de solvente, evidencia-se uma diferença no seu perfil cristalino, com característica mais amorfa em relação às anteriores. As membranas QN7E, QN7T01E e QN7T03E apresentaram comportamento semelhantes, com os mesmos picos característicos em $2\theta = 9,5^\circ$, 11° , $22,3^\circ$ (esse possivelmente relacionado ao TPP) e $29,9^\circ$; o grau de cristalinidade foi 13,8%, 20,1% e 24,1%, respectivamente.

A QN7T05E exibiu um comportamento parecido com a QN7T05L no que se refere ao pico de base larga, 23,4°, porém seu grau de cristalinidade caiu para 16,2%.

5.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia da superfície das membranas liofilizadas, neutralizada QNL e reticuladas QT01L, QT03L e QT05L foi avaliada por MEV e segue ilustrada na Figura 22.

Figura 22 - Micrografias eletrônicas de varredura da superfície das membranas de quitosana liofilizadas, neutralizada (a) QNL e reticuladas (b) QT01L, (c) QT03L, (d) QT05L, com magnitude de 500x, seguidas do corte transversal com magnitude de 100x, respectivamente.



Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

A micrografia da membrana QNL (Figura 22a) apresenta superfície rugosa, com estrutura em sulcos paralelos, pouco profundos. Essas características também foram encontradas por Fidèles et al., (2013) e Cruz et al., (2016) em seus trabalhos.

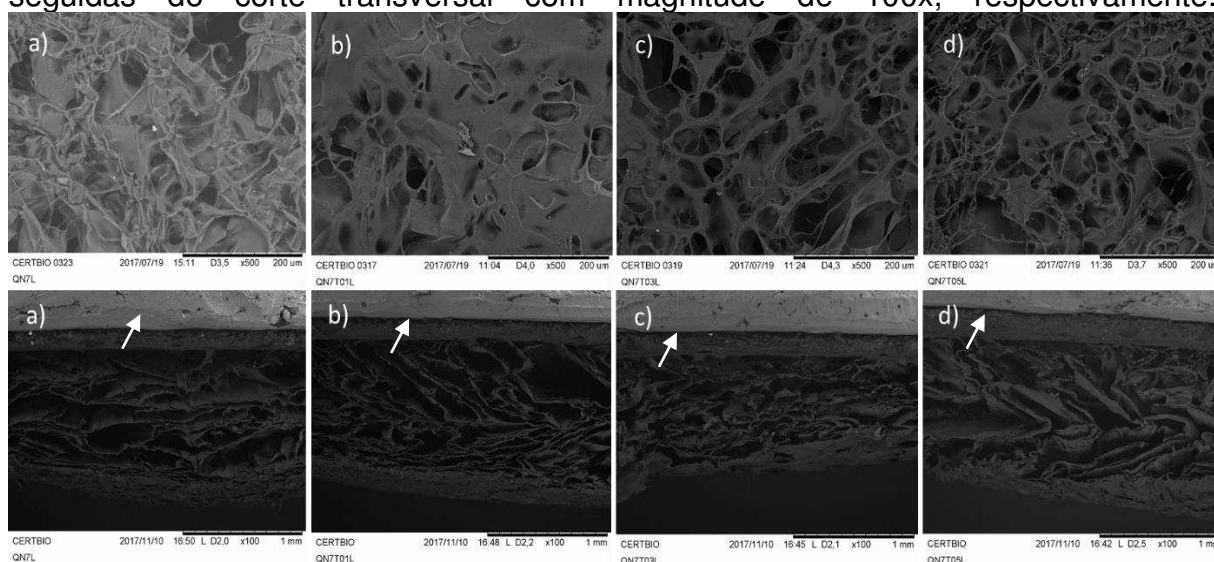
Observa-se na Figura 22b, 22c e 23d as micrografias referentes às membranas de quitosana reticuladas em diferentes concentrações em sequência: QT01L, QT03L e QT05L. Identifica-se a presença de poros que diminuem, bem como seu tamanho, provavelmente, à medida em que se aumenta a concentração do agente reticulante, e este fato confirma os estudos de Kim e Lee (2011). O congelamento seguido de liofilização realizado após a reação de reticulação, também pode ter alterado a morfologia das membranas pois, no congelamento, a água possui a tendência de se

concentrar em cristais desordenados na estrutura. A presença de partículas de tamanhos diferentes, dispersas, esbranquiçadas também foi identificada, possivelmente do agente reticulante TPP.

Ao corte transversal foi possível identificar estruturas lamelares, com poros interconectados, em concordância com os estudos de Cruz et al., (2016) e Pourhaghgouy e Zamanian (2015).

A morfologia das membranas de quitosana/1,4-naftoquinona liofilizadas, neutralizada e reticuladas está ilustrada na Figura 23.

Figura 23 - Micrografias eletrônicas de varredura da superfície das membranas liofilizadas de quitosana com 1,4-naftoquinona liofilizadas, neutralizada (a) QN7L e reticuladas (b) QN7T01L, (c) QN7T03L, (d) QN7T05L, com magnitude de 500x, seguidas do corte transversal com magnitude de 100x, respectivamente.



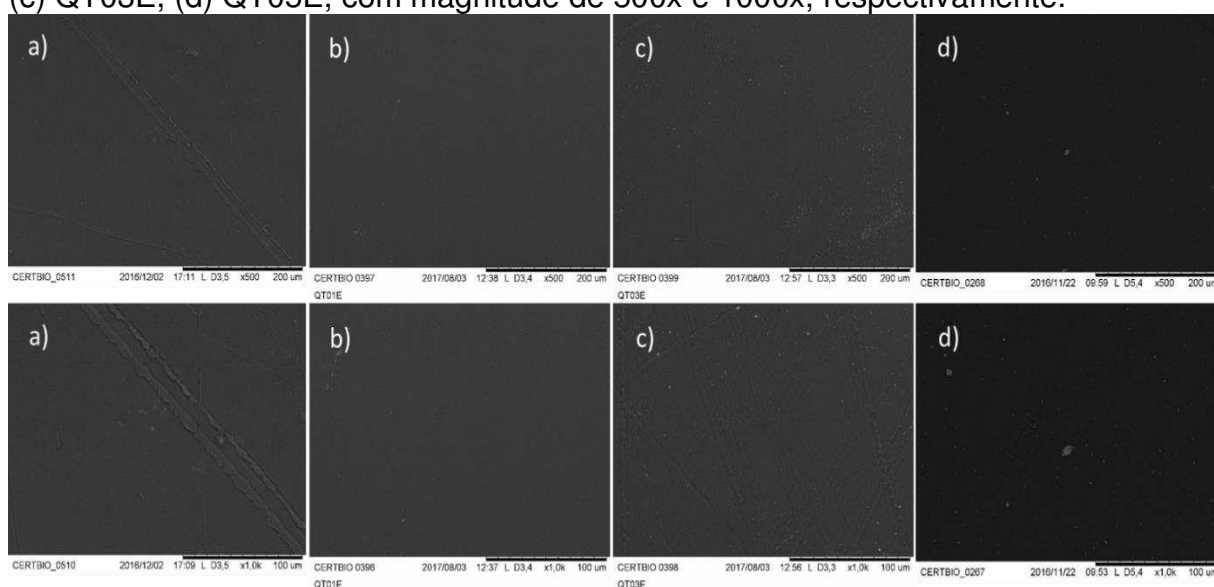
Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

As micrografias observadas nas Figuras 23a, 23b, 23c e 23d ilustram as membranas QN7L, QN7T01L, QN7T03L e QN7T05L, respectivamente. Verifica-se que, ao comparar com as anteriores, a adição de 1,4-naftoquinona promoveu uma formação mais intensa de poros com tamanhos e formas diferentes, interconectados aumentando a porosidade das mesmas e favorecendo a formação de estruturas fibrilares. As setas presentes nas imagens apontam para o suporte da fita de carbono utilizada para realização do ensaio.

A porosidade possui relevância em um sistema de liberação controlada de fármacos, uma vez que permite a penetração de fluidos biológicos, facilitando a difusão dos fármacos para o meio (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

Por meio da Figura 24 pode-se analisar o aspecto superficial das membranas de quitosana por evaporação de solvente, neutralizadas (hidróxido de amônio) e reticuladas (TPP) em três concentrações.

Figura 24 - Micrografias eletrônicas de varredura da superfície das membranas de quitosana por evaporação de solvente, neutralizada (a) QNE e reticuladas (b) QT01E, (c) QT03E, (d) QT05E, com magnitude de 500x e 1000x, respectivamente.

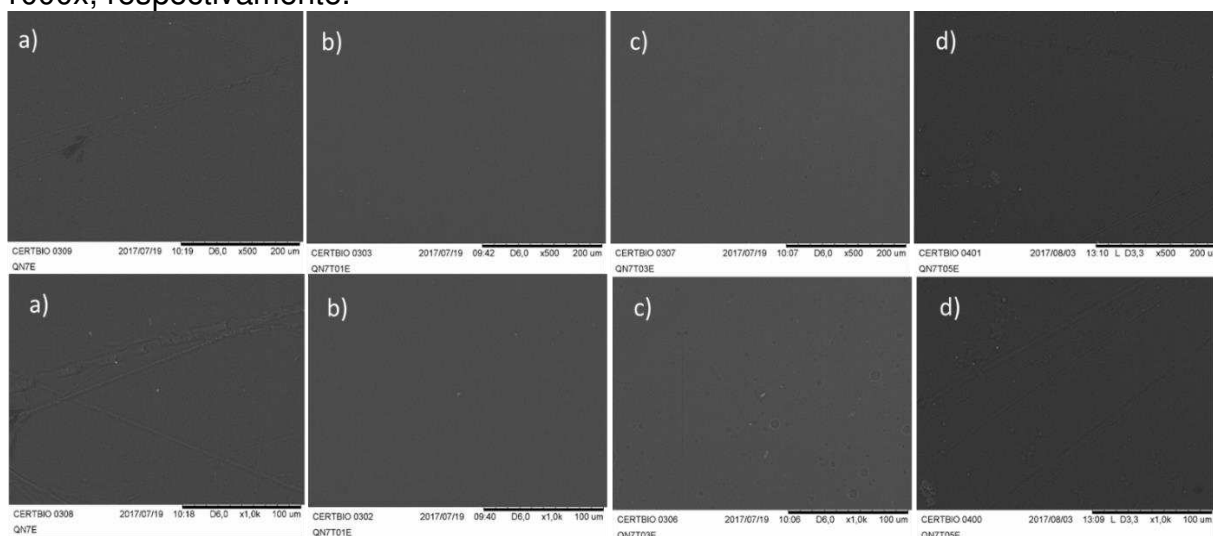


Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Pode-se perceber que não houve alteração superficial notória entre as amostras. As membranas aparentam homogeneidade, com riscos presentes em algumas superfícies analisadas devido às marcas provenientes do suporte de poliestireno no qual a solução de quitosana foi vertida para secagem. Sua topografia é lisa, densa, sem porosidade superficial. Em algumas micrografias observa-se a presença de partículas dispersas na superfície, as quais podem ser atribuídas ao agente reticulante que não foi totalmente dissolvido na solução.

As micrografias referentes às membranas de quitosana/1,4-naftoquinona produzidas por evaporação de solvente seguem ilustradas na Figura 25.

Figura 25 - Micrografias eletrônicas de varredura da superfície das membranas de quitosana com 1,4-naftoquinona por evaporação de solvente, neutralizadas (a) QN7E e reticuladas (b) QN7T01E, (c) QN7T03E, (d) QN7T05E, com magnitude de 500x e 1000x, respectivamente.



Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

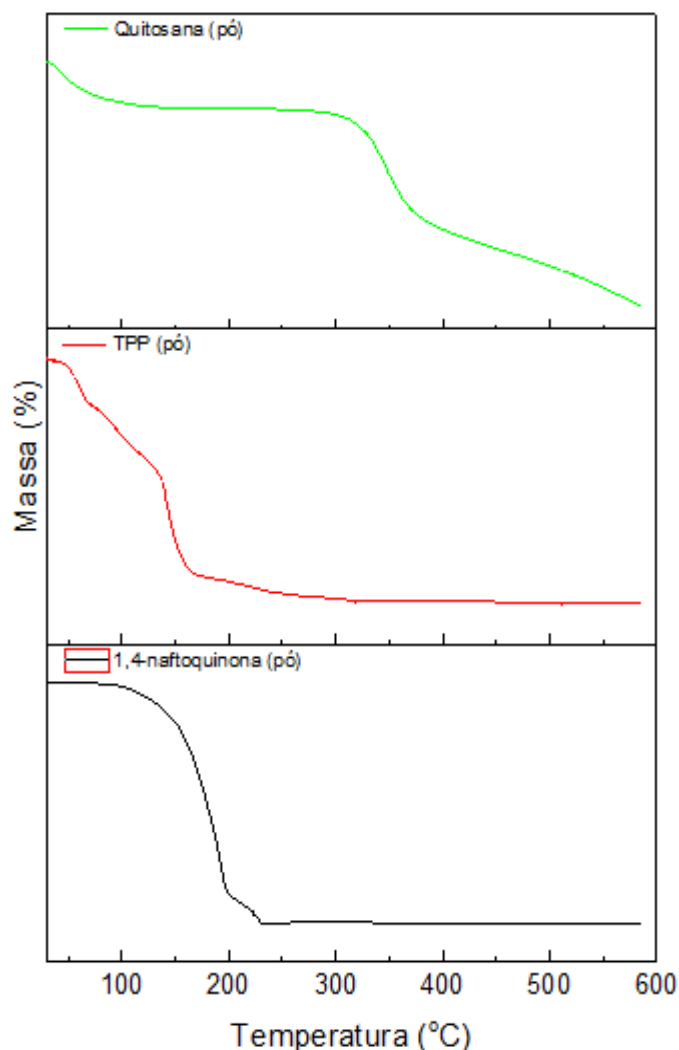
As características identificadas nas micrografias da Figura 25 são semelhantes às daquelas sem o 1,4-naftoquinona, inferindo-se que o composto está bem distribuído na matriz polimérica, pois não apresentam alteração de coloração.

5.1.4 Termogravimetria (TG/DTG)

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 é a termogravimetria. Apresenta várias aplicações inclusive na indústria farmacêutica para avaliação da estabilidade térmica dos fármacos, etapas de decomposição dos mesmos entre outras (IONASHIRO; GIOLITO, 2008).

A Figura 26 ilustra as curvas termogravimétricas do pó de quitosana, tripolifosfato de sódio e do 1,4-naftoquinona.

Figura 26 - Curvas termogravimétricas dos pós de quitosana, tripolifosfato de sódio e 1,4-naftoquinona.



Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Ao se observar a curva de TG do pó da quitosana, verifica-se a ocorrência de duas etapas. A primeira na faixa aproximada de 30 a 150°C, com perda de massa de 16,07%. A segunda etapa incidiu na faixa de 267 a 585°C, com perda de massa de 64,52% e massa residual de 19,41%. A primeira etapa pode ser decorrente da volatilização do solvente e desidratação, ou seja, a perda da água livre que se encontra ligada à cadeia de quitosana (grupo OH e NH) conforme já reportado em outros estudos (FIDÉLIS et al., 2013; FURTADO, 2014). A segunda é atribuída a uma desacetilação e despolimerização dos compostos (BRITO; CAMPANA FILHO, 2007).

Quanto ao tripolifosfato de sódio, na sua curva TG observou-se uma única etapa com perda de massa de 3,27% na faixa de temperatura entre 124 e 175°C, possivelmente referente à água livre retida no material.

A curva TG do pó do 1,4-naftoquinona apresentou perda de massa na faixa de 75 a 214°C de 92,19%, referente à degradação de sua molécula e uma segunda perda na faixa de aproximadamente 215 a 230°C, de 7,87% (Figura 26), possivelmente relacionada ao grupo C-O identificado no FTIR. Sousa et al., (2012), no estudo sobre estabilidade térmica das quinonas, reportaram que o 1,4-naftoquinona exibiu perda única de massa na faixa de temperatura entre 70 e 156°C, diferindo dos resultados da atual pesquisa.

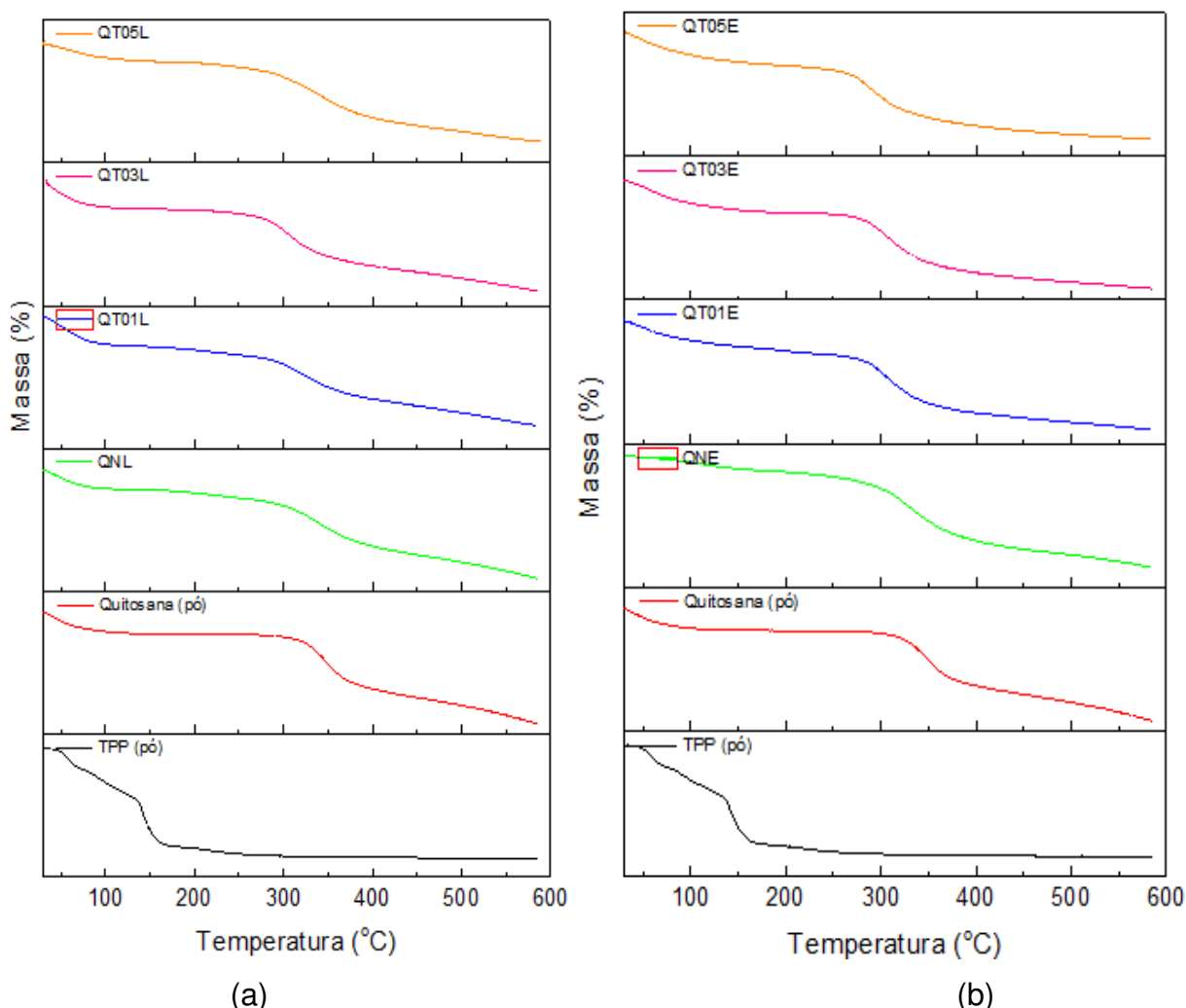
A Figura 27 ilustra as curvas termogravimétricas das membranas de quitosana liofilizadas e por evaporação de solvente, neutralizadas e reticuladas e a Tabela 8 apresenta os respectivos valores aproximados da perda de massa, temperatura e massa residual relativos às etapas de decomposição térmica destas membranas.

Ao se analisar a Figura 27 em conjunto com a Tabela 8, observa-se que a perda de massa inicial das membranas neutralizadas é semelhante; na segunda etapa a QNE alcança um valor maior para a perda de massa e para a temperatura de degradação, não apresentando massa residual, diferentemente da QNL.

Nas membranas reticuladas observa-se que a adição do TPP aumentou a estabilidade térmica das amostras e o percentual de massa residual é bem superior às membranas neutralizadas, em particular nas amostras por evaporação de solvente.

Estudos referem que o processo de reticulação quando é muito baixo, tende a diminuir a estabilidade térmica da amostra, porém quando a reticulação é aumentada até determinado ponto, essa estabilidade tende a aumentar, conforme visualizado neste trabalho, corroborando os trabalhos de Fidélis et al., (2013); Neto et al., (2005). É possível que uma maior quantidade de agente reticulante leve a um aumento na temperatura de decomposição, uma vez que novas ligações inter cruzam as moléculas (FIDÉLIS et al., 2013).

Figura 27 - Curvas termogravimétricas das membranas de quitosana liofilizadas (a) e por evaporação de solvente (b), neutralizadas e reticuladas.



Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Tabela 8 - Valores aproximados da perda de massa, temperatura e massa residual relativos às etapas de decomposição térmica para as membranas de quitosana liofilizadas e por evaporação de solvente, neutralizadas e reticuladas.

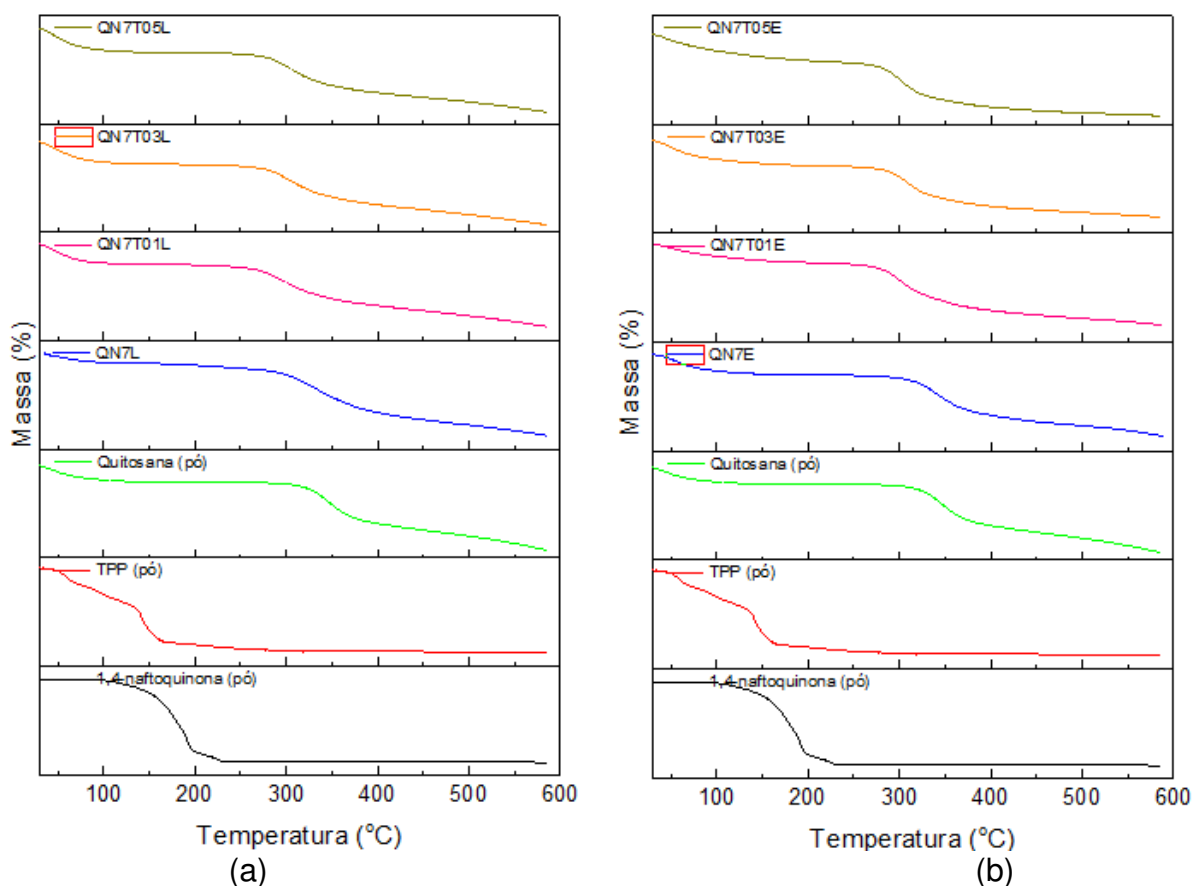
Amostras	1ª Etapa		2ª Etapa		Resíduo m(%)
	m(%)	T(°C)	m(%)	T(°C)	
QNL	15,91	30 – 125	72,95	135 – 586	11,13
QT01L	26,80	30 – 222	55,25	225 – 584	17,95
QT03L	18,53	30 – 165	51,38	177 – 588	30,09
QT05L	14,02	30 – 165	52,91	190 – 590	33,07
QNE	15,51	30 – 182	84,46	184 – 503	0
QT01E	18,01	30 – 232	40,05	235 – 584	41,94
QT03E	21,80	30 – 214	49,65	219 – 586	28,55
QT05E	17,75	30 – 195	39,30	197 – 583	42,95

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

As curvas termogravimétricas das membranas de quitosana/1,4-naftoquinona, liofilizadas e por evaporação de solvente, neutralizadas e reticuladas e os valores

aproximados da perda de massa, temperatura e massa residual relativos às etapas de decomposição térmica destas membranas são ilustradas na Figura 28 e Tabela 9.

Figura 28 - Curvas termogravimétricas das membranas de quitosana com 1,4-naftoquinona liofilizadas (a) e por evaporação de solvente (b), neutralizadas e reticuladas.



Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Tabela 9 - Valores aproximados da perda de massa, temperatura e massa residual relativos às etapas de decomposição térmica para as membranas de quitosana/1,4-naftoquinona liofilizadas e por evaporação de solvente, neutralizadas e reticuladas.

Amostras	1º Etapa		2º Etapa		Resíduo m(%)
	m(%)	T(°C)	m(%)	T(°C)	
QN7L	15,69	30 – 247	70,00	249 – 586	14,31
QN7T01L	19,28	30 – 198	55,69	209 – 585	25,03
QN7T03L	19,77	30 – 205	52,37	217 – 585	27,86
QN7T05L	20,47	30 – 206	48,90	215 – 585	30,63
QN7E	16,92	30 – 190	50,74	202 – 589	32,34
QN7T01E	14,00	30 – 200	46,41	208 – 587	39,59
QN7T03E	18,50	30 – 220	37,42	229 – 586	44,08
QN7T05E	18,50	30 – 217	35,75	221 – 585	45,75

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

As membranas neutralizadas QN7L e QN7E apresentaram maior resistência a temperatura de degradação, se fazendo necessária uma temperatura maior para

favorecer a degradação do material, que teve seu início em 249°C para QN7L e 202°C para QN7E. Entretanto, ao serem confrontadas com às de quitosana sem o 1,4-naftoquinona, infere-se que essa substância favoreceu essa condição.

Na análise comparativa do comportamento térmico entre as membranas liofilizadas e por evaporação de solvente (Tabela 9) não são observadas diferenças acentuadas. Ambos os grupos apresentaram uma perda de massa inicial em torno de 18%. A estabilidade térmica das amostras por evaporação de solvente apresentou um leve incremento ao serem comparadas com as liofilizadas, com diminuição da degradação na segunda etapa, o que resultou em massa residual maior. Não foram verificadas alterações no perfil de degradação entre as membranas reticuladas de quitosana e quitosana/1,4-naftoquinona.

Segundo Cruz et al., (2016), a termogravimetria reveste-se de importância por prover informações fundamentais para o acondicionamento adequado das membranas e para as técnicas mais adequadas de esterilização das mesmas, quando forem utilizadas em seres humanos.

5.1.5 Calorimetria Exploratória Diferencial

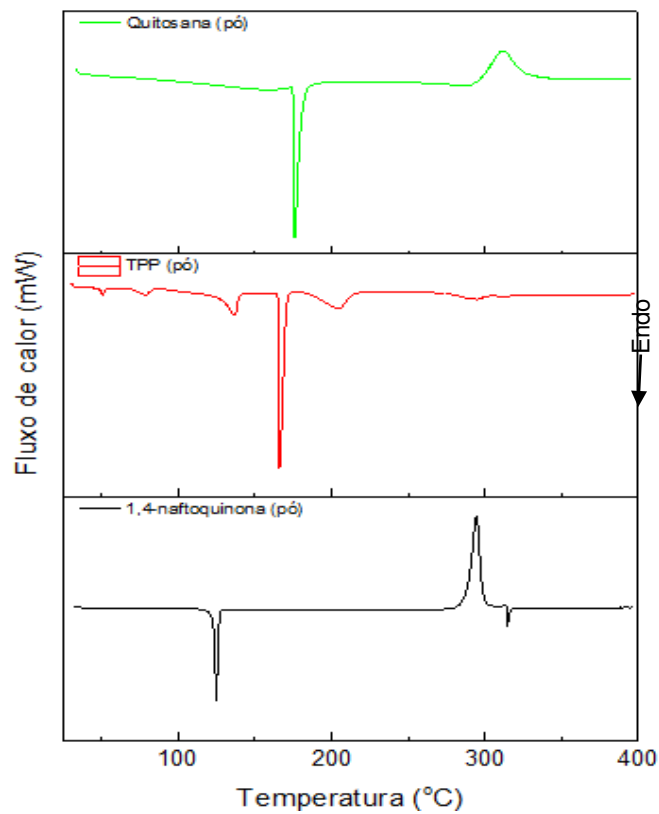
A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica termoanalítica empregada de forma complementar à Termogravimetria (TG). Nela mede-se a diferença de energia liberada ou absorvida pela amostra, em relação a um material de referência em função da temperatura, enquanto a amostra e a referência são submetidas a uma programação de temperatura (SILVA, 2016).

A Figura 29 ilustra os resultados das análises de calorimetria exploratória diferencial dos pós da quitosana, tripolifosfato de sódio e do 1,4-naftoquinona.

A curva DSC do pó da quitosana apresentou um pico endotérmico e um pico exotérmico; o primeiro pico localizado em 176°C alusivo à evaporação de substâncias voláteis, como água ligada as pontes de hidrogênio com os grupos hidroxila da quitosana e, o segundo se encontra em 311°C e relaciona-se à degradação da quitosana (SILVA et al., 2016; TORRES et al., 2005). Esses dados estão em consonância com os apresentados pela termogravimetria.

Quanto ao resultado da curva de DSC referente ao pó do tripolifosfato de sódio, esse apresentou vários picos endotérmicos, sendo o mais evidente em 165°C.

Figura 29 - Termogramas dos pós de quitosana, tripolifosfato de sódio e 1,4-naftoquinona.



Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

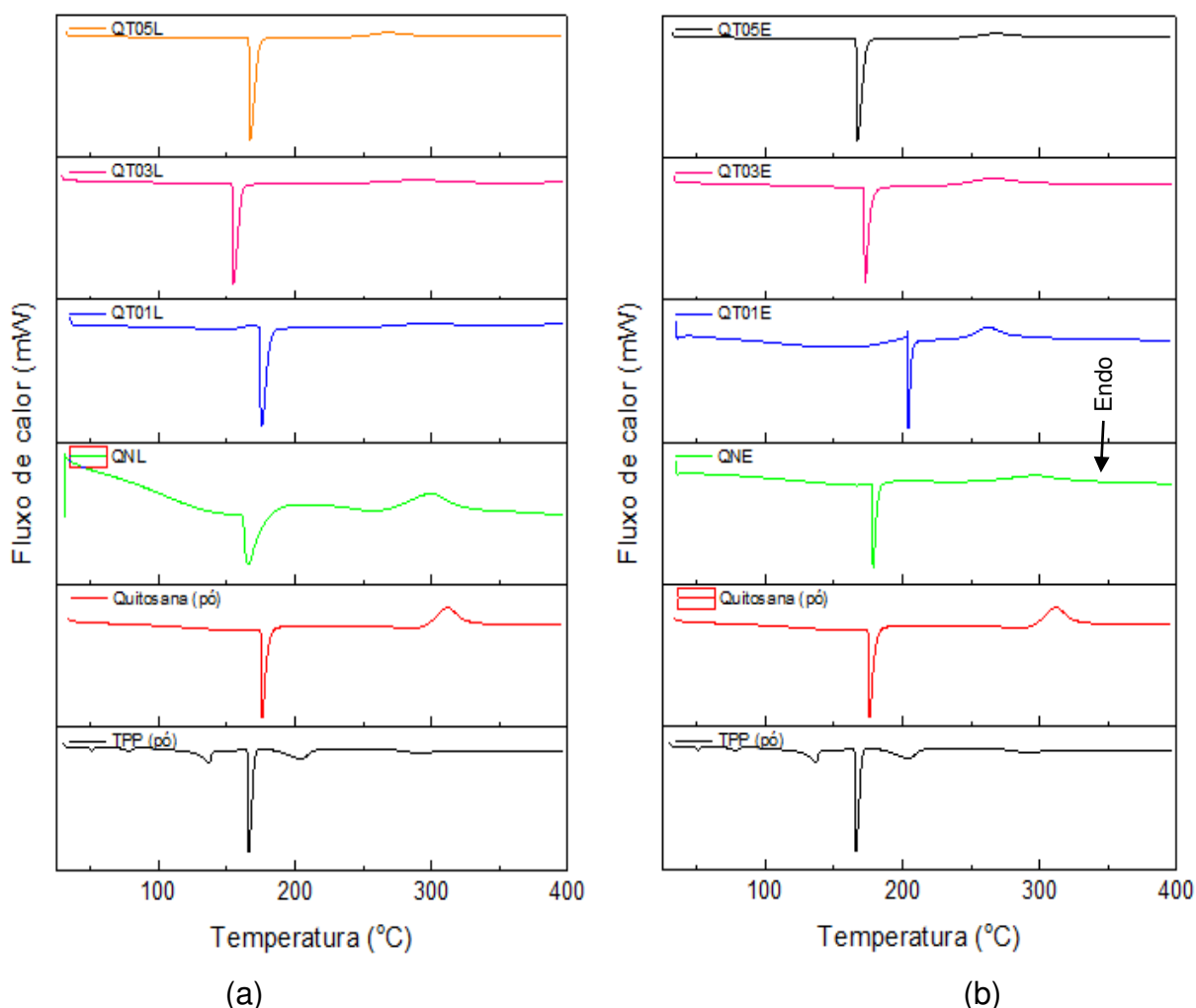
A partir da curva DSC do 1,4-naftoquinona observam-se dois picos: um endotérmico e um exotérmico. O pico endotérmico apresentou-se em 124°C e o pico exotérmico, referente à degradação do resíduo final do material se deu em, aproximadamente, 314°C, com a quebra do grupamento C-O, observado no FTIR, o que diferiu de um outro estudo, ao apresentar dois picos endotérmicos em 122°C e o outro entre 130 e 165°C sem evento exotérmico (SOUSA et al., 2012).

Os resultados dos termogramas das membranas de quitosana liofilizadas e por evaporação de solvente, neutralizadas e reticuladas estão ilustrados na Figura 30.

As membranas neutralizadas apresentaram uma pequena diferença no que se refere ao pico endotérmico, com a QNL em 166°C e a QNE em 178°C. O pico exotérmico foi semelhante em ambas. Para as membranas reticuladas, observou-se um aumento discreto de intensidade no pico endotérmico, em particular naquelas por evaporação de solvente; em contrapartida, pico exotérmico diminuiu. Dessa forma, é possível deduzir que a adição do TPP, assim como visto na Termogravimetria, aumentou a faixa de temperatura, passando de 135°C na segunda etapa onde ocorre

a degradação do material, neste caso as membranas neutralizadas, para 177°C, no mínimo, nas membranas com TPP, sendo necessária maior quantidade de energia para que ocorra a degradação do sistema.

Figura 30 - Termogramas das membranas de quitosana liofilizadas (a) e por evaporação de solvente (b), neutralizadas e reticuladas.

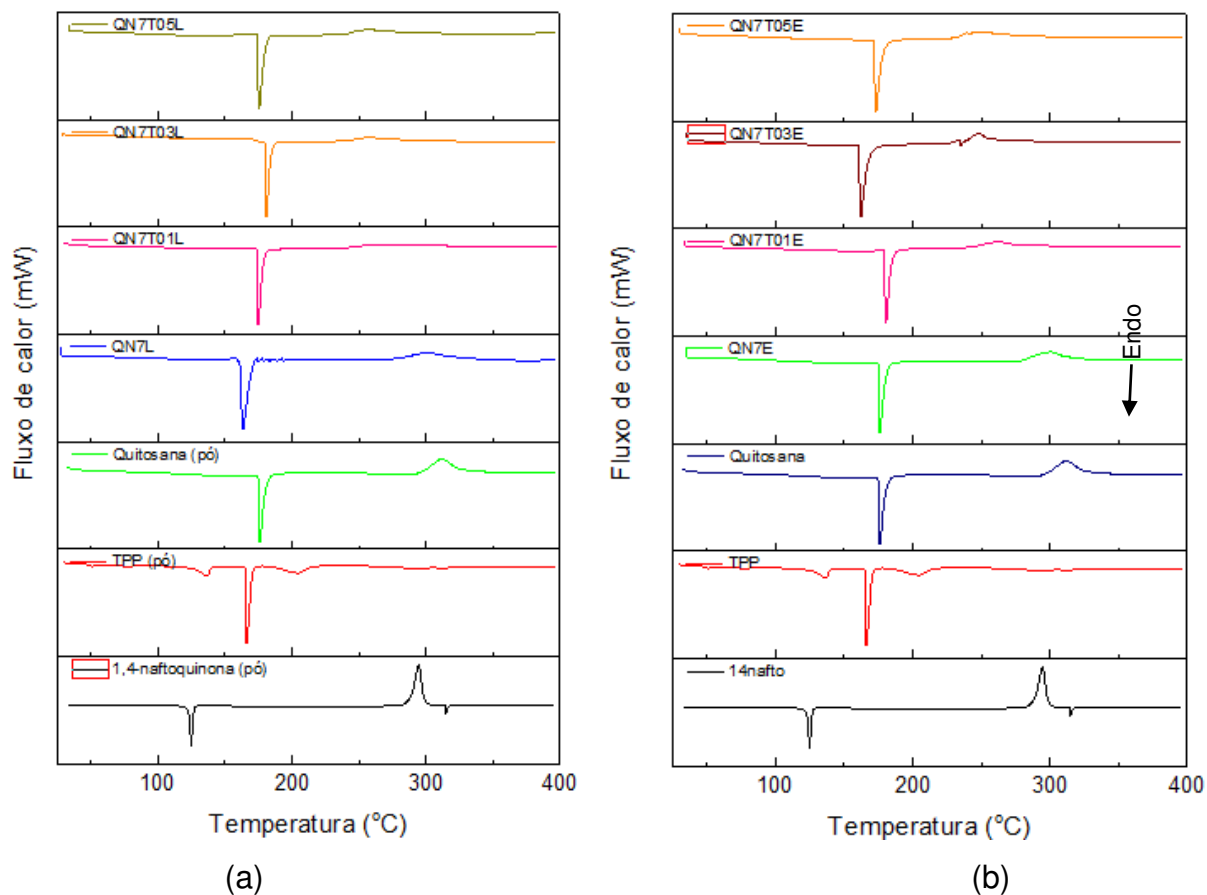


Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

A Figura 31 ilustra os termogramas das membranas de quitosana/1,4-naftoquinona liofilizadas e por evaporação de solvente, neutralizadas e reticuladas.

A presença do 1,4-naftoquinona nas membranas de quitosana neutralizadas não mudou o perfil térmico das mesmas. As membranas reticuladas e com 1,4-naftoquinona, de ambas metodologias, não apresentaram diferenças relevantes entre si no que se refere aos picos endotérmicos e exotérmicos.

Figura 31 - Termogramas das membranas de quitosana/1,4-naftoquinona liofilizadas (a) e por evaporação de solvente (b), neutralizadas e reticuladas.



Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

5.1.6 Ensaio Mecânico de Tração

Os valores encontrados a partir do ensaio de tração para as membranas de quitosana e quitosana/1,4-naftoquinona liofilizadas QNL, QT01L, QT03L, QT05L, QN7L, QN7T01L, QN7T03L, QN7T05L estão ilustrados na Tabela 10.

Os resultados das membranas liofilizadas reticuladas sugerem que houve um aumento da resistência à tensão ao serem comparadas com a neutralizada (QNL), cuja deformação aumentou. De acordo com Martins et al., (2012), através da interação dos grupos protonados da quitosana com os íons carregados negativamente do TPP há uma criação de redes iônicas, então quanto maior a quantidade de reticulação usada, maior a densidade de reticulação física e isso provê uma maior rigidez da cadeia polimérica. Entretanto, conforme relatado por Neto et al., (2005), é necessário que haja um equilíbrio no quantitativo utilizado no processo de reticulação.

A membrana QT01L apresentou maior resistência à tração em detrimento às demais (p -valor $<0,05$), com exceção da QT03L, confirmando os autores anteriormente mencionados. Quanto à deformação máxima foi possível identificar que a membrana QNL difere estatisticamente das demais membranas (p -valor $< 0,05$).

Tabela 10 - Valores médios das propriedades mecânicas das membranas de quitosana e quitosana/1,4-naftoquinona liofilizadas QNL, QT01L, QT03L, QT05L, QN7L, QN7T01L, QN7T03L, QN7T05L.

Membranas	Resistência à Tensão (MPa)	Deformação Máxima (%)	Módulo de Elasticidade (MPa)
QT05L	0,30 ± 0,13	5,09 ± 1,31	6,45 ± 3,77
QT03L	0,58 ± 0,12	3,81 ± 0,57	15,42 ± 2,35
QT01L	0,74 ± 0,32	3,95 ± 1,80	24,52 ± 17,89
QNL	0,13 ± 0,04	12,93 ± 3,90	1,09 ± 0,36
QN7T05L	0,07 ± 0,08	5,11 ± 2,38	1,97 ± 2,51
QN7T03L	0,16 ± 0,06	5,59 ± 3,36	3,62 ± 1,92
QN7T01L	0,09 ± 0,03	6,15 ± 3,32	1,04 ± 0,43
QN7L	1,59 ± 0,62	4,27 ± 0,87	40,37 ± 20,38

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Nas membranas com 1,4-naftoquinona (Tabela 10) observou-se uma redução dessa resistência, inferindo-se que o composto fragilizou o material, com exceção da QN7L que teve, dentre todas essas, maior resistência à tensão, com p -valor $<0,05$. Possivelmente, nesse caso, o próprio 1,4-naftoquinona pode ter agido como uma espécie de agente reticulante; além disso, essa membrana também diferiu estatisticamente (p -valor $<0,05$) no módulo elástico, quando comparada às demais do conjunto, com exceção da QT01L.

Em relação às membranas por evaporação de solvente, o comportamento do ensaio mecânico apresentou valores bem distintos quando comparados às liofilizadas. É possível observar na Tabela 11 um aumento importante na resistência à tensão dessas membranas e, mesmo com a adição do 1,4-naftoquinona às amostras reticuladas, as membranas entre si não apresentaram diferenças significativas, (p -valor = 0,590 $>0,05$). No que se refere à deformação, verificou-se que a membrana QNE apresentou um maior valor estatisticamente significativo frente às demais (p -valor $<0,05$). Quanto ao módulo elástico, a membrana QN7T01E exibiu valor

significativo maior (p -valor $<0,05$) em relação às membranas QN7E, QT03E e QNE e a membrana QN7E apresentou o menor valor (p -valor $<0,05$), com exceção da QT05E.

Valores aproximados à QNE foram reportados por Bonilla et al., (2013) em seu estudo sobre o impacto da adição de quitosana nas propriedades físicas em filmes com amido. Na avaliação da quitosana, eles observaram uma resistência à tensão de 74 Mpa, com deformação de 4,6%.

Tabela 11 - Valores médios das propriedades mecânicas das membranas de quitosana e quitosana/1,4-naftoquinona por evaporação de solvente QNE, QT01E, QT03E, QT05E, QN7E, QN7T01E, QN7T03E, QN7T05E.

Membranas	Resistência à Tensão (MPa)	Deformação Máxima (%)	Módulo de Elasticidade (MPa)
QT05E	48,96 ± 42,33	6,75 ± 4,08	1294,08 ± 1591,04
QT03E	33,45 ± 25,07	9,01 ± 3,61	487,84 ± 563,57
QT01E	52,29 ± 23,79	6,34 ± 1,77	868,46 ± 399,13
QNE	77,27 ± 63,33	29,63 ± 13,10	440,75 ± 630,07
QN7T05E	40,24 ± 42,47	4,62 ± 2,66	826,91 ± 889,99
QN7T03E	37,98 ± 37,57	5,00 ± 0,91	699,33 ± 570,63
QN7T01E	50,64 ± 17,62	3,65 ± 0,77	1390,99 ± 424,45
QN7E	29,80 ± 41,27	5,21 ± 2,94	29,75 ± 41,28

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Ao se comparar, estatisticamente, as membranas liofilizadas e as por evaporação de solvente verificou-se que quanto à resistência à tração as membranas evaporadas possuem valores médios maiores que as liofilizadas (p -valor $<0,05$) com exceção das membranas QN7 e QT05 de ambos os tipos. No que se refere à deformação máxima houve diferença significativa apenas para as membranas QT03E, QT01E e QNE. Para o módulo elástico, constatou-se que as membranas QN7T05E, QN7T03E, QN7T01E, QT03E, QT01E e QNE apresentaram valores médios significativamente maiores que as demais (p -valor $<0,05$). Esses resultados também podem estar relacionados à variabilidade na confecção dos corpos de prova, tempo/temperatura no decorrer do processo de congelamento/liofilização e ainda a direção das lamelas e/ou fibrilas identificadas na MEV.

Essas diferenças observadas entre ambos os tipos de membrana, principalmente no que se refere à resistência de tensão e o módulo elástico podem

estar relacionadas a forma como são processadas, pois nas liofilizadas observa-se que à medida em que ocorre o congelamento, os cristais crescem, as moléculas de quitosana superficiais são repelidas e empacotadas entre si, formando paredes (POURHAGHGOUY; ZAMANIAN, 2015). Uma vez que a quitosana é congelada, a liofilização do material é realizada, de modo que os cristais de gelo são removidos sem destruir suas paredes, e a estrutura porosa é assim obtida. Essa situação foi observada no ensaio de MEV já relatado.

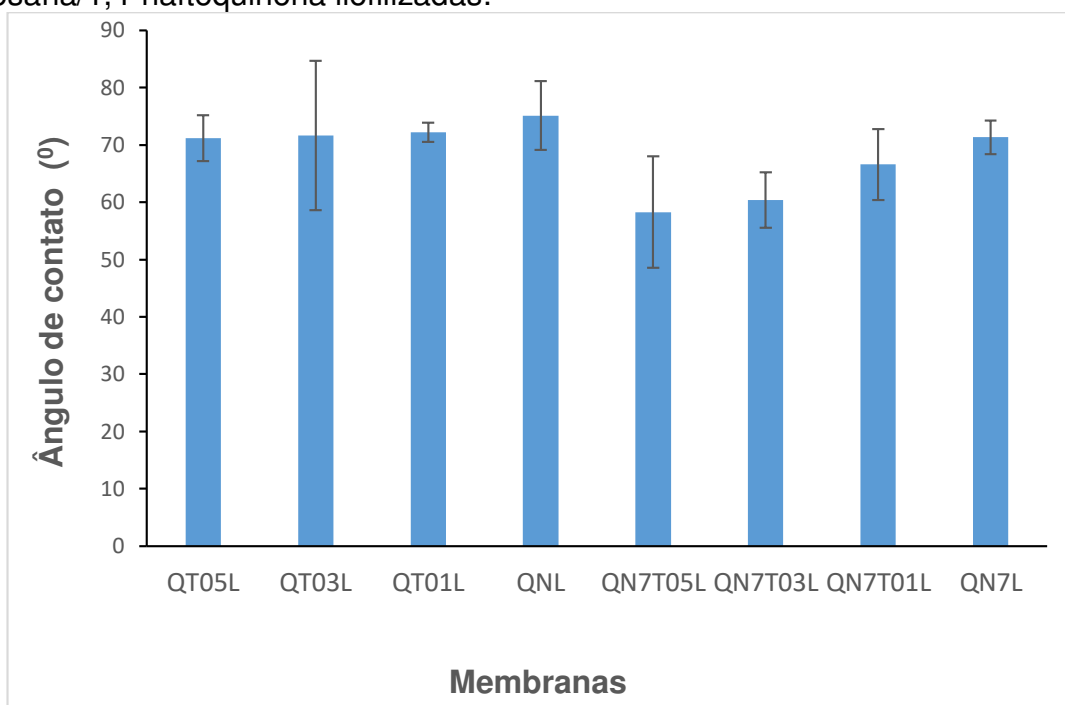
Em contrapartida, a formação da membrana por evaporação de solvente acontece devido à preservação de emaranhados de cadeia e interações intermoleculares formadas durante o processo de secagem, como a ligação eletrostática e de hidrogênio, que são conhecidas por desempenharem um papel essencial na estrutura dos polissacarídeos (BECERRA et al., 2017).

As propriedades mecânicas de filmes/membranas com menor deformação e valores razoáveis de resistência à tração sugerem que eles têm elevado potencial para uso em aplicações médicas (KOUCHAK; HANDALI; BOROUJENI, 2015; BANO et al., 2014). Salienta-se que, na confecção de um curativo deve-se ter como foco o objetivo do curativo, para qual tipo de ferida ele está sendo desenvolvido, em qual fase do processo de cicatrização será empregada, qual a área corporal será utilizada, visto que os biomateriais desenvolvidos devem ser utilizados em superfícies da pele com tensão na ruptura compatível com a do tecido normal, que pode sofrer uma variação entre 5 e 30 MPa (EVANS et al., 2013). Devem ser ainda considerados parâmetros como a permeabilidade ao vapor de água, intumescimento e molhabilidade.

5.1.7 Ensaio de Molhabilidade por Ângulo de Contato

De acordo com o ensaio de molhabilidade para as membranas de quitosana e quitosana/1,4-naftoquinona liofilizadas QNL, QT01L, QT03L, QT05L, QN7L, QN7T01L, QN7T03L, QN7T05L (Figura 32) foi observado que todas apresentaram resultados inferiores a 90°. Esses valores estão associados ao aumento da porosidade identificada na análise de MEV.

Figura 32 - Medida do ângulo de contato das membranas de quitosana e quitosana/1,4-naftoquinona liofilizadas.



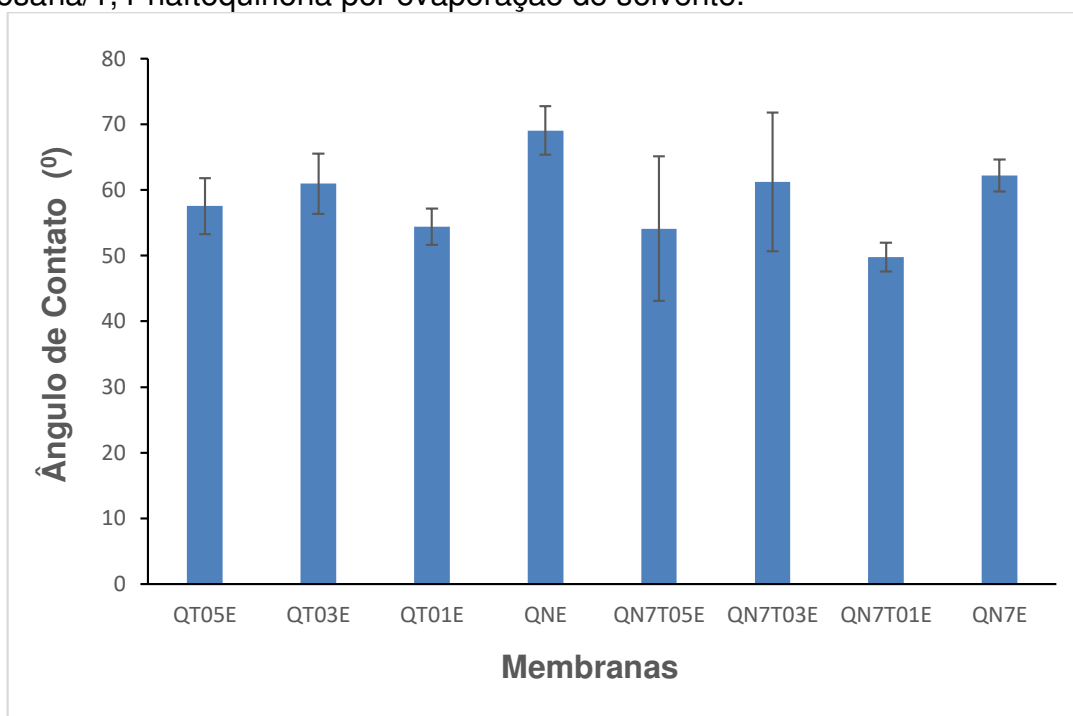
Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Tais resultados indicam hidrofiliçidade, característica desejada devido à finalidade proposta ao material. Convém ressaltar que os valores apresentados pelas membranas QN7T05L, QN7T03L e QN7T01L também corroboram a MEV, quando comparadas suas estruturas de superfície às demais e, estatisticamente comparadas à QNL a diferença é significativa (p -valor $<0,05$), indicando que o 1,4-naftoquinona possui influência na estrutura da superfície da membrana, favorecendo o perfil hidrofílico.

A hidrofiliçidade da quitosana, por sua vez, é atribuída aos grupos hidroxila e amino presentes em sua estrutura (TSAI; WANG, 2008). A presença de cargas positivas quando os grupos amino estão protonados diminuem a energia livre da superfície, otimizando a molhabilidade do material (ZHENG et al., 2009).

Na Figura 33 observa-se os resultados da medida de ângulo de contato das membranas produzidas por evaporação de solvente, neutralizadas e reticuladas.

Figura 33 - Medida do ângulo de contato das membranas de quitosana e quitosana/1,4-naftoquinona por evaporação de solvente.



Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Essas membranas, apesar de serem densas, exibiram uma medida de ângulo de contato menor que 90°, o que também indica hidrofiliçidade. Observou-se que a presença do agente reticulante (TPP) diminuiu o ângulo de contato nas membranas, observação essa confirmada através do resultado da análise estatística, na qual destaca-se que as membranas QNE e QN7E apresentaram ângulo de contato de contato estatisticamente maior que os valores médios das demais membranas (p -valor $<0,05$), com exceção da QN7T03E. Resultados semelhantes foram relatados por Fidélis (2010) e Holanda (2011).

Todavia, o estudo de Pieróg, Gierszewska-Drużyńska e Ostrowska-Czubenko (2009) menciona que a membrana de quitosana, após sua reticulação torna-se menos hidrofílica como resultado da perda dos sítios de ligação das aminas envolvidas na reação com o agente reticulante, porém apresenta uma maior resistência mecânica, fato confirmado com ensaio de tração. O perfil mais amorfo dessas membranas observadas através do DRX também corrobora os resultados da molhabilidade.

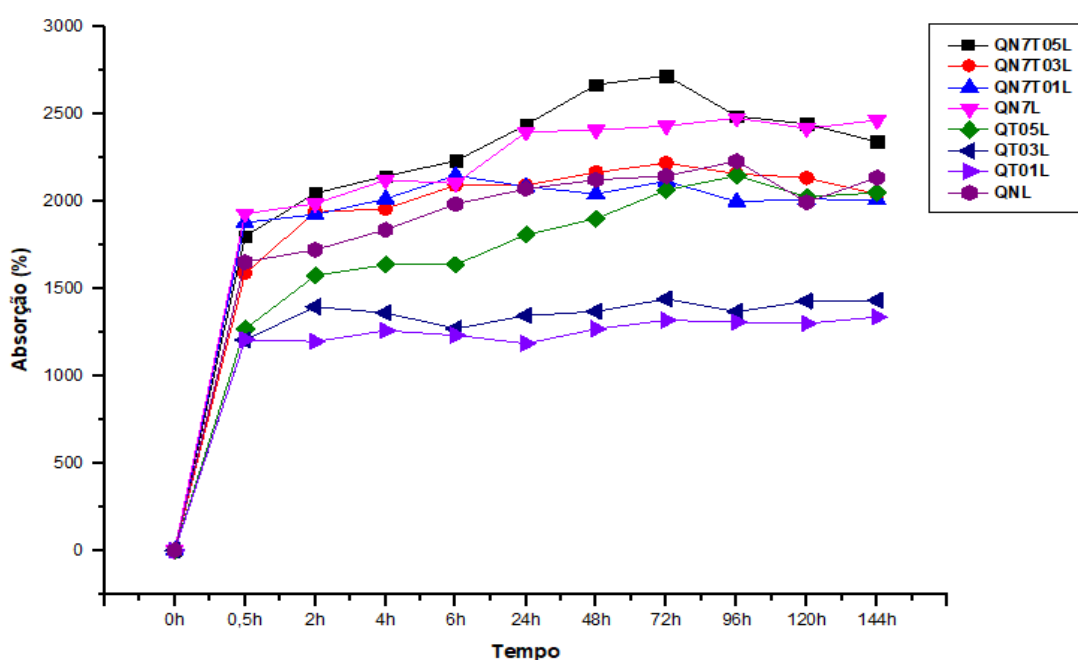
Quando foram comparados os valores médios do ângulo de contato das membranas liofilizadas QN7T01, QN7, QT05, QT01 e QLN com as membranas evaporadas, verificou-se que são estatisticamente maiores (p -valor $<0,05$) e as demais

não apresentaram diferença significativa, o que leva a compreensão que as membranas por evaporação de solvente, de maneira geral, mostraram-se mais hidrofílicas.

5.1.8 Grau de Intumescimento (GI)

A propriedade de intumescimento das membranas em resposta às condições fisiológicas simuladas foi estudada. A Figura 34 apresenta os resultados do grau de intumescimento para as membranas de quitosana e quitosana/1,4-naftoquinona liofilizadas QNL, QT01L, QT03L, QT05L, QN7L, QN7T01L, QN7T03L e QN7T05L em contato com 5 mL de solução tampão fosfato (PBS) (pH 7,4), no tempo de 144 horas. Os valores estão expostos a partir do cálculo da equação 5.

Figura 34 - Grau de intumescimento das membranas de quitosana e quitosana/1,4-naftoquinona liofilizadas.



Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Ao se analisar o gráfico, observa-se um ganho de massa entre todas as membranas chegando, a maioria a 1700%, o que comprova elevada capacidade de absorção, mantendo-se constante no decorrer das 144 horas. Através da análise

estatística verificou-se que após 72h não havia mais aumento significativo no ganho de massa das membranas (p -valor $\approx 0,0000 < 0,05$), indicando que esse ensaio para tais membranas pode ser finalizado antes das 144h.

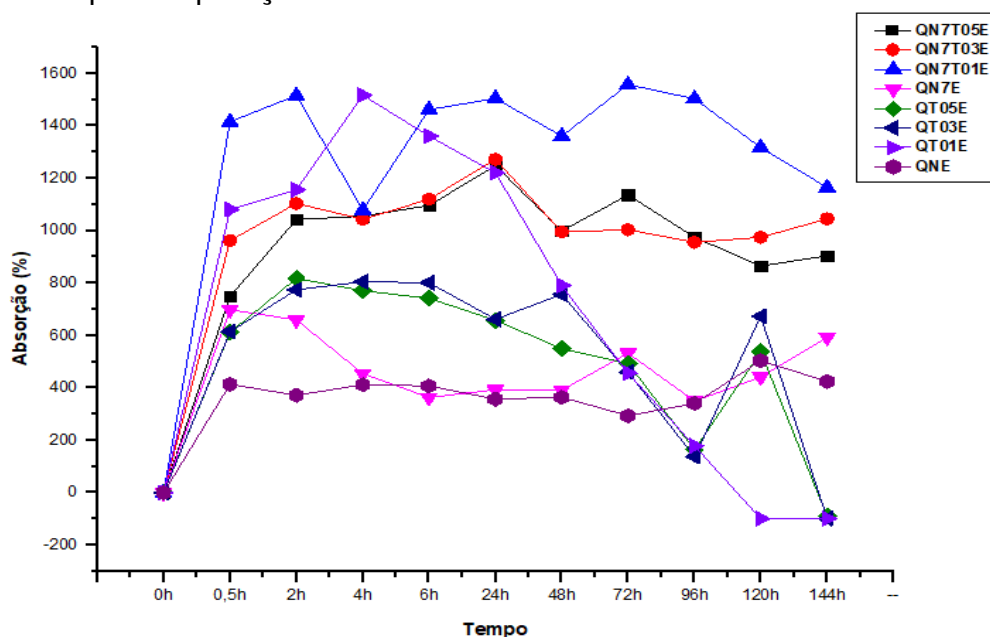
O menor GI das membranas de quitosana reticuladas (QT01L, QT03L e QT05L) pode estar relacionado ao processo de reticulação, com a incorporação do TPP, confirmado pelos resultados obtidos no FTIR, pois de acordo com Fidélis (2014), quando as cadeias macromoleculares são fixas por reticulações, a capacidade de intumescimento da rede polimérica é diminuída. Essa observação foi identificada na membrana QT01L, a qual apresentou o valor médio de massa estatisticamente menor que o das demais membranas (p -valor $< 0,05$). O estudo do comportamento do intumescimento representa um importante parâmetro que influencia diretamente a liberação cinética de fármaco, em particular quando esse processo se dá por difusão (DI MARTINO et al., 2017).

O GI das membranas de quitosana com 1,4-naftoquinona apresentou-se ligeiramente superior em relação às de quitosana, particularmente a QN7T05L, que diferiu estatisticamente das membranas QN7T03L, QN7T01L, QT05L, QT03L, QT01L e QLNL, de modo que tal membrana apresentou o valor médio de massa estatisticamente maior (p -valor $< 0,05$), indicando que a incorporação o 1,4-naftoquinona favoreceu o intumescimento. Tal resultado ratifica os ensaios de DRX, ângulo de contato e MEV.

As membranas neutralizadas também apresentaram um GI elevado, particularmente a QN7L, que divergiu estatisticamente das membranas QN7T01L, QT05L, QT03L e QT0 L, ao apresentar valor médio de massa significativamente maior (p -valor $< 0,05$), o que pode estar associado à neutralização parcial da quitosana, na qual os grupos amino da mesma são protonados, o que favoreceu maior interação com o PBS.

O grau de intumescimento das membranas por evaporação de solvente, neutralizada e reticuladas, é ilustrado na Figura 35.

Figura 35 - Grau de intumescimento das membranas de quitosana e quitosana/1,4-naftoquinona por evaporação de solvente.



Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Observa-se uma diminuição do GI dessas membranas, comportamento esperado de uma membrana densa quando comparada à uma porosa. Entretanto, ainda assim elas atingiram uma taxa de absorção superior a 400%, com uma estabilidade ao alcançar 2 horas, seguindo-se períodos alternados de perdas e ganhos no decorrer de 144 horas, possivelmente em uma tentativa de alcançar a estabilidade, quando algumas chegaram a degradação e pela variabilidade do processo na retirada do excesso de água no processo da pesagem.

Esses resultados corroboram com os ensaios de DRX, com a apresentação de um perfil mais amorfo e com a MEV, através de uma difusão inicial mais lenta. Por meio da análise estatística, obteve-se que após 24h, não houve mais ganho significativo no aumento de massa das membranas (p -valor=0,0058<0,05), indicando que esse ensaio para as membranas densas pode ser finalizado bem antes das 144h.

As membranas de quitosana reticuladas absorveram mais PBS que as membranas neutralizadas e, em um estudo realizado por Silva et al., (2004) é sugerida a explicação de que tal situação decorre da diminuição da cristalinidade do polímero reticulado, que provoca maior espaçamento entre as cadeias de quitosana.

As membranas com 1,4-naftoquinona (QN7T01E, QN7T03E e QN7T05E) apresentaram valor médio de GI estatisticamente maior que as membranas QN7E,

QT05E, QT03E e QLNE), p -valor $<0,05$ para um nível de confiança de 95%, de forma semelhante às liofilizadas (porosas).

Ao se realizar a comparação entre membranas liofilizadas e evaporadas, percebeu-se que, praticamente todas diferem estatisticamente (p -valor $<0,05$), exceto pela membrana QT01 (de ambos os tipos) (p -valor $<0,05$). Ou seja, as membranas liofilizadas apresentaram valores médios de intumescimento maiores que as membranas evaporadas, exceto pela membrana QT01, que não mostrou diferença significativa.

Estudos mencionam que a água é absorvida na membrana por dois processos: ligação de água ao próprio material e água sendo mantida no espaço dos poros da membrana (MA et al., 2017). Devido à ausência de poros nas membranas densas observadas nas imagens de MEV, a remoção de água das membranas ocorreu principalmente induzida pela ligação da água às próprias membranas.

A capacidade de um dispositivo de preservar água é um dos mais importantes aspectos em engenharia tecidual, em relação à pele, especialmente no tratamento de feridas (XI et al., 2010). A capacidade de absorção de líquido de um curativo para essa finalidade deve ser considerada, na perspectiva de uma rápida absorção do exsudato presente no leito da ferida (PANDIMA et al., 2012).

5.1.9 Biodegradação Enzimática

A Tabela 12 ilustra a degradação das membranas de quitosana e quitosana/1,4-naftoquinona liofilizadas em solução de PBS e PBS/lisozima em 7, 14, 21 e 30 dias.

Verifica-se que, de maneira geral, houve perda crescente de massa nas membranas, tanto nas imersas em PBS, quanto nas imersas em solução de PBS/lisozima. Essas últimas apresentaram uma perda de massa levemente superior em comparação com aquelas apenas em PBS, entretanto sem diferença significativa (p -valor $>0,05$). É possível identificar que as membranas que continham 1,4-naftoquinona perderam menos massa em relação às de quitosana e, à medida que diminuía a proporção do agente reticulante, a degradação do material foi maior. As membranas com 1,4-naftoquinona neutralizadas degradaram menos em ambos os tipos de soluções.

Tabela 12 - Perda de massa percentual das membranas de quitosana e quitosana/1,4-naftoquinona liofilizadas submetidas ao ensaio de biodegradação.

Membranas	Perda de massa das membranas 7, 14, 21 e 30 dias de ensaio (%)							
	PBS				Lisozima/PBS			
	7 dias	14 dias	21 dias	30 dias	7 dias	14 dias	21 dias	30 dias
QN7T05 L	11,99	10,30	19,93	22,03	7,79	19,61	21,17	31,08
QN7T03 L	11,60	13,10	19,04	46,17	12,38	21,63	26,31	38,29
QN7T01 L	9,68	10,4	20,22	50,43	9,66	21,2	15,64	53,70
QN7 L	11,70	17,36	20,73	24,65	19,18	30,04	31,67	26,95
QT05 L	3,58	6,81	62,16	71,09	18,15	31,92	62,71	74,44
QT03 L	6,28	18,09	33,24	37,53	22,25	35,21	37,82	48,90
QT01 L	12,54	27,33	39,75	44,21	26,21	41,94	53,69	56,29
QLN L	9,48	17,52	65,23	51,59	11,92	29,55	63,83	60,64

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Compreende-se que um índice de degradação adequado não é apenas benéfico para a regeneração de tecidos, mas também para suporte mecânico. Uma degradação muito rápida pode diminuir as propriedades mecânicas, enquanto que uma degradação muito lenta pode induzir uma reação inflamatória importante no hospedeiro, que pode causar interferência negativa ao final (BO et al., 2015).

Na Tabela 13 pode-se visualizar a degradação das membranas de quitosana e quitosana/1,4-naftoquinona por evaporação de solvente em solução de PBS e PBS/lisozima em 7, 14, 21 e 30 dias respectivamente.

O comportamento de degradação dessas membranas também seguiu semelhante às membranas liofilizadas, com exceção das membranas de quitosana sem 1,4-naftoquinona reticuladas, as quais degradaram totalmente ao término do 7º dia, não sendo realizadas as análises referentes às membranas correspondentes ao 14º, 21º e 30º dia. Observou-se que o tipo de solução empregado no processo de biodegradação não afetou a medida da massa das membranas significativamente (p -valor > 0,05).

Tabela 13 - Perda de massa percentual das membranas de quitosana e quitosana/1,4-naftoquinona por evaporação de solvente submetidas ao ensaio de biodegradação.

Membranas	Perda de massa das membranas 7, 14, 21 e 30 dias de ensaio (%)							
	PBS				Lisozima/PBS			
	7 dias	14 dias	21 dias	30 dias	7 dias	14 dias	21 dias	30 dias
QN7T05 E	4,37	27,93	28,77	62	8,92	29,34	34,86	47,15
QN7T03 E	5,37	17,47	19,24	33,54	22,5	42,30	51,41	46,80
QN7T01 E	34,71	33,927	43,58	47,78	20,89	41,49	49,47	46,46
QN7 E	10,46	22,58	29,88	30,76	15,52	35,32	33,90	45,19
QT05 E	100	-	-	-	100	-	-	-
QT03 E	100	-	-	-	100	-	-	-
QT01 E	100	-	-	-	100	-	-	-
QLN E	37,95	56,50	69,64	100	41,83	43,06	68,21	100

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Conforme já mencionado, as membranas apresentaram uma perda de massa mais acentuada na solução de PBS/lisozima. A lisozima é uma enzima que possui a habilidade de degradar polissacarídeos catalisando a inserção de moléculas de água para dentro da estrutura do polímero e, posteriormente quebrando as ligações intramoleculares (SHAMEKHI et al., 2017).

Os resultados encontrados corroboram com o estudo sobre síntese e caracterização de arcabouços de quitosana com agente antineoplásicos de Cruz et al., (2016). Além da lisozima favorecer a velocidade de degradação da quitosana, salienta-se também que o grau de desacetilação, o peso molecular, grau de cristalinidade e reticulação da quitosana possuem influência considerável na sua taxa de degradação (SHAMEKHI et al., 2017; YANG et al., 2007; ZHANG; NEAU, 2001).

O grau de reticulação apresentado nas membranas possui importância no processo de degradação, isso porque os pontos de reticulação restringem a passagem das moléculas de PBS e de lisozima para dentro de sua estrutura (SHAMEKHI et al., 2017), dificultando ou favorecendo a degradação, em consonância com o que foi visto na atual pesquisa. É provável que o 1,4-naftquinona tenha dificultado o processo de degradação das membranas, em possível ação como agente reticulante, além do próprio TPP utilizado, ou seja, a adição dessa substância pode ter prolongado o tempo de degradação das membranas. Tal observação é confirmada através dos resultados de DRX já mencionados, nos quais a presença dessas duas substâncias nas membranas favoreceu a um perfil menos amorfo.

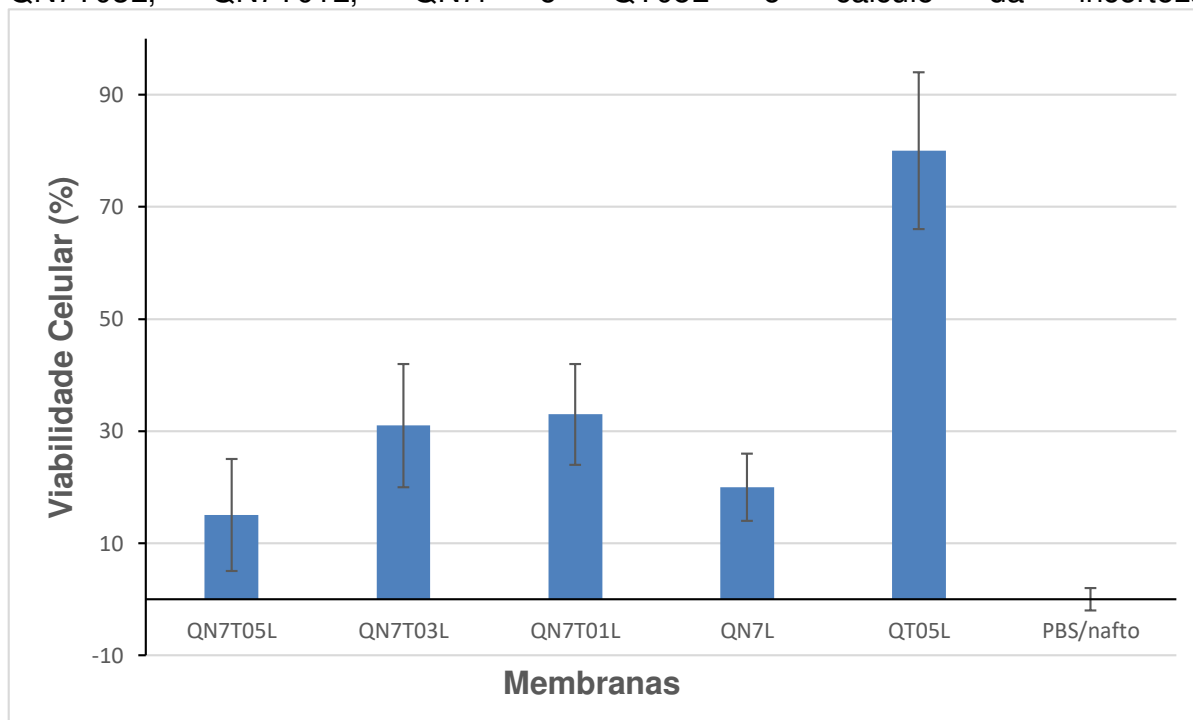
A velocidade da degradação provocada pela reticulação é um fator relevante uma vez que, variando esta taxa, é possível controlar a duração de um sistema de liberação do fármaco no organismo (CRUZ et al., 2016).

A característica física das membranas também ajuda a compreender o comportamento de degradação. Membranas densas, preparadas por evaporação de solvente, apresentam uma estrutura de rede compacta quando comparada a estrutura de hidrogel ou de um curativo poroso, sugerindo uma estabilidade relativamente prolongada quanto à biodegradação (MA, et al., 2017). Entretanto, nesta pesquisa, ao serem comparados os resultados entre as membranas liofilizadas e por evaporação de solvente, verificou-se que essas últimas diferem estatisticamente quanto às liofilizadas ($p\text{-valor}=0,021 < 0,05$), apresentando uma taxa de degradação superior às liofilizadas, possivelmente relacionada à espessura do material.

5.1.10 Avaliação da Viabilidade Celular (Citotoxicidade)

Os resultados ilustrados na Figura 36 correspondem à viabilidade celular das membranas que apresentaram melhor desempenho em relação às demais no que se refere à liberação controlada, neste caso a QN7T05L, QN7T03L e QN7T01L. A membrana QN7L foi utilizada para observar se o processo de neutralização teria alguma influência na citotoxicidade. A membrana QT05L por não possuir o 1,4-naftoquinona foi utilizada para comparação, assim como 1,4-naftoquinona dissolvido em PBS na concentração de 450 $\mu\text{Mol/L}$.

Figura 36 - Percentual da viabilidade de fibroblastos L929 nas membranas QN7T05L, QN7T03L, QN7T01L, QN7L e QT05L e cálculo da incerteza.



Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

De acordo com os resultados identificados, observa-se que as membranas estudadas apresentaram efeitos citotóxicos visto que, de acordo com a ISO 10993:2009, a viabilidade celular apresentou valores inferiores a 70%, inclusive ao subtrair o valor do cálculo da incerteza. Comparando-se os valores das três primeiras membranas, compreende-se que à medida que se diminuiu a concentração do agente reticulante, menos citotóxico era o efeito das mesmas. A membrana de quitosana com 1,4-naftoquinona neutralizada (QN7L) também apresentou potencial citotóxico,

aproximando-se do valor da QN7T05L. A membrana QT05L foi a que mais se aproximou da viabilidade celular, possivelmente pelo fato de não possuir o 1,4-naftoquinona. Todavia, quando comparado o percentual de citotoxicidade dessa última membrana com o valor mínimo determinado por Bispo (2009), que é de 50%, a membrana é considerada não citotóxica.

Em um estudo no qual se avaliou a viabilidade das células fibroblásticas embrionárias de ratos, NIH/3T3, tratadas com doxorubicina, 5-fluorouracil ou 5-fluorouracil + doxorubicina carregado em nanocomplexos à base de quitosana enxertada por ácido poliláctico modificado com carboxi observou-se que a viabilidade caiu para menos de 10% após 24 h de contato, indicando a maior eficácia desse sistema para transportar a droga para dentro das células (DI MARTINO et al., 2017).

A cultura celular é uma ferramenta importante para estudar a citotoxicidade de compostos com potencial atividade terapêutica (PAILARD et al., 1999). Várias moléculas que possuem a estrutura da quinona, apresentam efeitos antiproliferativos sobre crescimento da célula cancerígena. A atividade citotóxica das quinonas está relacionada à inibição de transportadores de elétrons, desacoplamento de fosforilação oxidativa, geração de EROS, e danos ao DNA (FREITAS et al., 2012).

Kayashima e colaboradores (2009) no seu estudo sobre os efeitos anti-câncer e anti-angiogênico das naftoquinonas e outros compostos estruturais semelhantes verificaram que, dentre os 13 compostos estudados, o 1,4-naftoquinona inibiu fortemente o crescimento das células de câncer de cólon humano (HCT116) e outras linhas celulares cancerígenas (A549 – pulmão, BALL-1 – leucemia linfoblástica, HeLa - cérvix, HL60 – leucemia promielocítica, e NUGC-3 – estômago).

Silva Júnior e colaboradores (2011) demonstraram que as naftoquinonas e os compostos derivados de β -lapachona têm atividade (valores de IC_{50} inferiores a 2 μ M) contra linhas celulares cancerígenas, a exemplo da HL-60 e MDA-MB435, induzindo à morte celular por apoptose, mediada pela formação de EROS. A biflorina inibiu a atividade proliferativa de cinco linhas celulares de câncer testadas, com melhores resultados contra o adenocarcinoma intestinal HCT-8 ($IC_{50} = 0,88 \mu\text{g mL}^{-1}$) (VASCONCELOS et al., 2005). Essa mesma substância tem mostrado eficiência em inibir a proliferação celular em linhagens tumorais CEM, HL-60 (leucemia), B16 (melanoma), HCT-8 (cólon), MCF-7 (mama). A linhagem tumoral SK-Br3 (mama) foi tratada com biflorina e também demonstrou relevante efeito citotóxico (WISINTAINER, et al., 2014).

A citotoxicidade de uma série de aminonaftoquinonas foi estudada contra as linhas celulares cancerígenas SF-295 (glioblastoma), MDAMB-435 (mama), HCT-8, HCT-116 (côlon), HL-60, OVCAR-8 (ovário), NCI-H358M (câncer de pulmão broncoalveolar) and PC3-M (próstata) e ainda contra PBMC (células mononucleares de sanguíneas). Cinco compostos da série apresentaram relevante atividade citotóxica e seletiva para todas as linhagens mencionadas ($IC_{50} = 0.49$ a $3.89 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os compostos foram menos citotóxicos para PBMC ($IC_{50} = 5.51$ a $17.61 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), exibindo uma certa seletividade (MORAES et al., 2014).

5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DO 1,4-NAFTOQUINONA

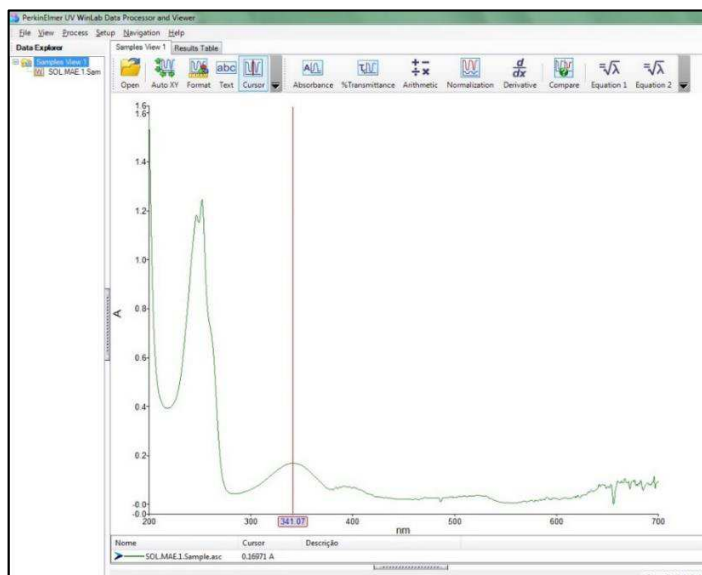
Os atributos de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ), foram consideradas para validação segundo a RE nº 899/2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); adequados à análise.

O processo de validação é crucial para definir se uma metodologia desenvolvida está adequada aos objetivos a que se destina, para a obtenção de resultados confiáveis que possam ser apropriadamente interpretados.

5.2.1 Determinação do Comprimento de Onda do 1,4-naftoquinona

Inicialmente foi realizada uma varredura na concentração de $450 \mu\text{Mol/L}$ de solução de 1,4-naftoquinona em PBS, entre 200 e 700 nm com o objetivo de identificar o comprimento de onda da substância, no qual obteve-se o pico de absorção máxima em 341 nm, conforme apresentado na Figura 37.

Figura 37 - Espectro da solução de 1,4-naftoquinona, com a absorção máxima em 341 nm.

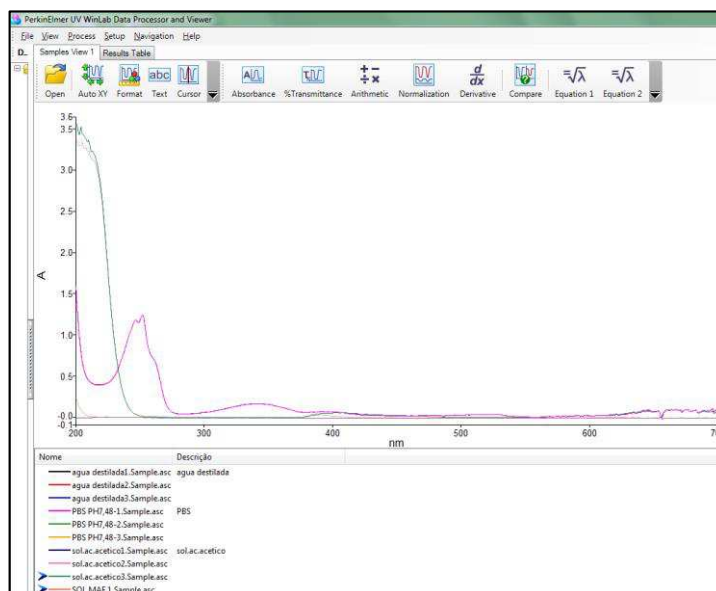


Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

5.2.2 Especificidade e Seletividade

Na Figura 38 observa-se a comparação entre o comprimento de onda da solução-mãe (1,4-naftoquinona/PBS) com água destilada, PBS e ácido acético.

Figura 38 - Espectro da solução de 1,4-naftoquinona, com a absorção máxima em 341 nm.



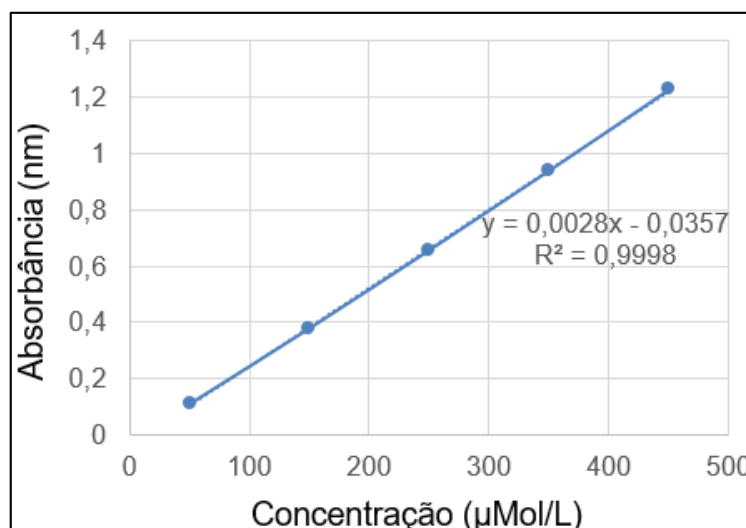
Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Verifica-se que não houve pico de absorção quanto às demais substâncias no comprimento de onda atribuído ao 1,4-naftoquinona, garantindo-se dessa forma que o método se apresenta seletivo e específico.

5.2.3 Linearidade e Intervalo

Para a linearidade foi analisada a solução de 1,4-naftoquinona utilizando cinco pontos, com concentrações variando de 50 a 450 $\mu\text{Mol/L}$. Foi obtida uma curva de origem linear, de acordo com o visualizado na Figura 39.

Figura 39 - Curva analítica do 1,4-naftoquinona, obtida pelo método espectrofotométrico UV/VIS, no intervalo de concentração entre 50 a 450 $\mu\text{Mol/L}$.



Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

O coeficiente de correlação foi de 0,9998, significando que 99,98 % da variação total em torno da média é explicada pela regressão linear. Logo, as soluções preparadas, dentro do intervalo especificado apresentaram leituras de absorção diretamente proporcionais à concentração, corroborando com o critério descrito na RE 899/2003 ANVISA, que determina um coeficiente de correlação mínimo de $r = 0,99$ do analito, confirmando a linearidade do método.

5.2.4 Exatidão

A exatidão para o presente método analítico foi determinada através das quantificações de três concentrações diferentes, declaradas com valores de baixa, média e alta concentração, cada uma em triplicata e os valores médios obtidos estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Valores da exatidão em três níveis de concentração de 1,4-naftoquinona.

Concentração Teórica ($\mu\text{Mol/L}$)	Média da Concentração Real ($\mu\text{Mol/L}$)	Coefficiente de Variação (%)	Exatidão (%)
50	51,732	0,165	103,464
250	244,853	0,031	97,943
450	453,714	0,095	100,825

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

A exatidão variou de 97,943 a 103,464%. O intervalo aceitável é de 80% a 120% da concentração teórica do teste, dessa forma, verifica-se que o método é considerado exato em relação as concentrações analisadas conforme as especificações estabelecidas pela agência reguladora (BRASIL, 2003).

5.2.5 Precisão

A repetibilidade (precisão intracorrida) do método foi avaliada a partir da leitura ($n=6$) do ponto médio da curva de calibração (250 $\mu\text{Mol/L}$); a precisão intermediária da mesma forma, porém em dois dias e com analistas distintos. A precisão interlaboratorial também foi realizada com a leitura do ponto médio, entretanto com o equipamento UV-1800, UV *spectrophotometer*, da Shimadzu, pertencente ao Laboratório de Química da Universidade Estadual da Paraíba. Os valores obtidos se encontram na Tabela 15.

Tabela 15 - Dados da precisão do método analítico a partir da concentração de 250 $\mu\text{Mol/L}$.

Analista	Concentração Teórica ($\mu\text{Mol/L}$)	Média da Concentração Real ($\mu\text{Mol/L}$)	Coefficiente de Variação (%)	Recuperação (%)
Intracorrída (analista a)				
	250	247,040	0,610	98,816
Intermediária/ Intercorrída				
(analista a)	250	247,802	0,183	99,120
(analista a)	250	244,718	0,078	97,887
(analista b)	250	234,286	0,194	93,714
(analista b)	250	242,379	0,059	96,951
Interlaboratorial				
(analista a)	250	246,5	0,544	98,6

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

De acordo com os valores observados na Tabela 15 a partir do Coeficiente de Variação (ou também chamado de Desvio Padrão Relativo – DPR), verifica-se que o mesmo está abaixo de 5%, valor esse considerado de referência pela ANVISA, avalia-se então que o método é preciso, não sofrendo influência de mudança de analista/dia/equipamento.

5.2.6 Robustez

Para a avaliação da robustez, optou-se pela substituição do solvente da concentração teórica média 250 $\mu\text{Mol/L}$. Na Tabela 16 verificam-se os valores correspondentes à robustez do método. Nessa etapa, foi utilizada a água destilada e observou-se que o CV se apresentou abaixo de 5%, conforme preconiza a RE 899/03, sendo considerado robusto.

Tabela 16 - Dados da robustez do método analítico a partir da concentração de 250 $\mu\text{Mol/L}$.

Solvente	Concentração Teórica ($\mu\text{Mol/L}$)	Média da Concentração Real ($\mu\text{Mol/L}$)	Coefficiente de Variação (%)	Recuperação (%)
Água destilada	250	242,40	0,134	96,96

Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

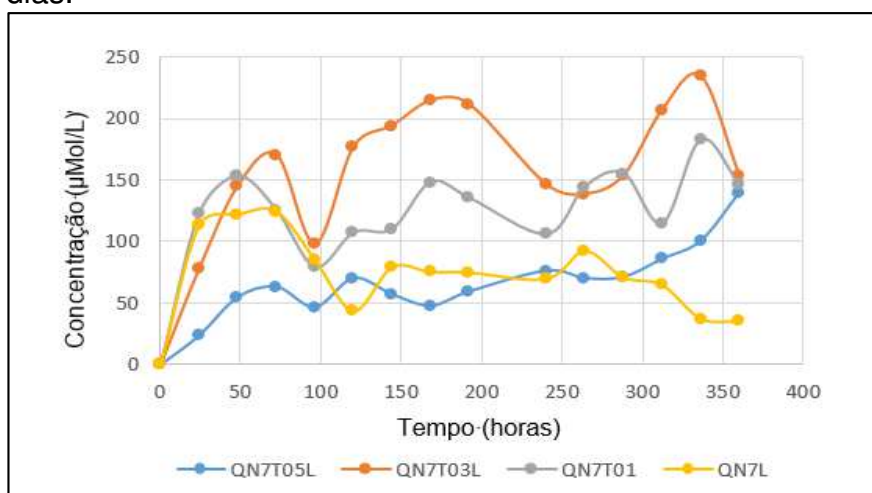
5.2.7 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

De acordo com as condições experimentais obtidas, os limites de detecção e de quantificação encontrados foram de 0,5965 $\mu\text{Mol/L}$ e de 1,9884 $\mu\text{Mol/L}$, respectivamente. Estes valores são de grande importância para a determinação do fármaco, com exatidão e precisão, em situações em que a concentração de analito na amostra possa ser muito baixa, como no caso de ensaios de cinética de dissolução (CUNHA-FILHO, et al., 2009). A partir dos resultados obtidos, a espectrofotometria UV/VIS se mostrou uma técnica linear, específica, exata, precisa e robusta, de acordo com os parâmetros de validação (BRASIL, 2003).

5.3 LIBERAÇÃO DO 1,4-NAFTOQUINONA A PARTIR DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA

A liberação *in vitro* do 1,4-naftoquinona a partir das membranas de quitosana liofilizadas e por evaporação de solvente foi estudada em solução tampão fosfato – PBS (pH = 7,4), e o meio de liberação foi quantificado por medida direta da absorbância a 341 nm, feita no UV-Vis. As Figuras 40 e 41 ilustram os valores de concentração em tempos predeterminados, totalizando um ensaio de 360 horas dos sistemas estudados.

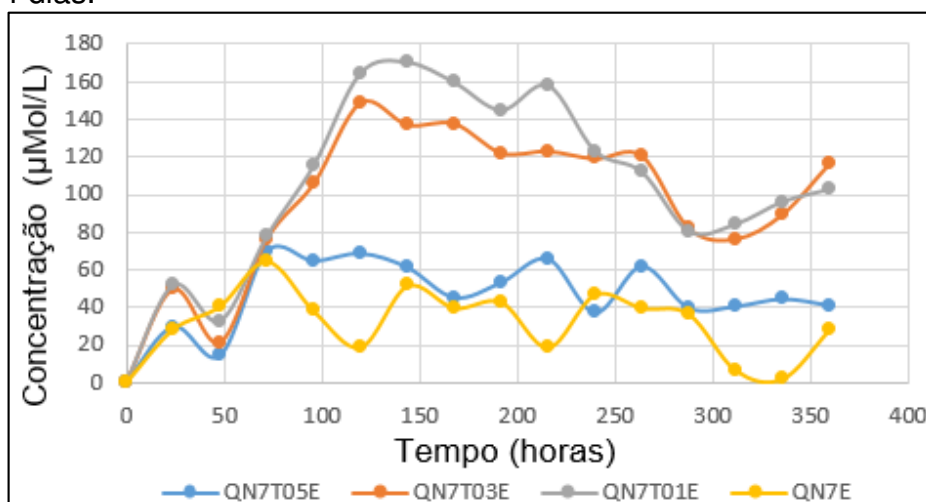
Figura 40 - Gráfico da concentração de 1,4-naftoquinona liberado a partir das membranas liofilizadas QN7T05L, QN7T03L, QN7T01L e QN7L imersas em PBS durante 14 dias.



Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

O perfil do comportamento de liberação das membranas liofilizadas (Figura 40), segundo o observado, foi realizado em três etapas. Para algumas membranas, mais de três. E, a última etapa, parece ser sempre maior que a precedida, com exceção da QN7L, provavelmente por não ter sido reticulada, não conseguindo manter padrão de liberação constante e crescente como as demais. Seu pico máximo ocorreu em 72 horas alusivo a 0,41% de fração (massa) liberada (491,68 μg). A liberação da amostra QN7T03L foi mais intensa, ocorrendo em três momentos, com o último chegando a uma concentração de aproximadamente 234 $\mu\text{Mol/L}$ em 336 horas referente a 0,78% (925,17 μg). As membranas QN7T01L e QN7T05L não apresentaram liberação superior à QN7T03L, porém elas deram indícios de que também possuíam capacidade para liberar a droga em mais etapas, como em um tempo superior a 15 dias.

Figura 41 - Gráfico da concentração de 1,4-naftoquinona liberado a partir das membranas liofilizadas QN7T05E, QN7T03E, QN7T01E e QN7E imersas em PBS durante 14 dias.



Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

A liberação do 1,4-naftoquinona das membranas por evaporação de solvente (Figura 41) apresentou um comportamento também em etapas, porém mais irregular que as liofilizadas, sem conseguirem alcançar o valor máximo inicial. Dentre estas, a que apresentou melhor desempenho foi a QN7T01E, a qual alcançou seu pico máximo em 144 horas, com concentração de 169,89 $\mu\text{Mol/L}$, equivalente a 0,56% de fração (massa) liberada (670,55 μg), seguida da QN7T03E e QN7T05E, todas com valores próximos da metade daqueles alcançados pela QN7T03L. A membrana com menor

perfil de liberação foi a QN7E, semelhante à neutralizada liofilizada (QN7L), alcançando pico máximo de concentração em 72 horas (64,27 $\mu\text{Mol/L}$), com 0,21% de fração (massa) liberada (253 μg). Esses comportamentos são justificados pelo ensaio de intumescimento, no qual as amostras que tiveram maior intumescimento liberaram maior quantidade do composto.

Ao se analisar o comportamento da liberação do 1,4-naftoquinona, verificou-se em ambos os tipos de membranas que não houve o efeito *burst* mencionado em outros estudos (SILVA, 2015; LOPES; VEIGA; MORAES, 2015). Esse efeito é conhecido como uma alta liberação inicial da droga, o que reduz o tempo de vida efetivo do dispositivo utilizado (HUANG; BRAZEL, 2001).

Em uma outra pesquisa observou-se um efeito *burst* inicial de 4,384% provavelmente devido a presença da droga na superfície polimérica, seguindo-se uma liberação sustentada de 76,74% no decorrer de 28 horas porque a droga, lentamente se difundiu para superfície através do núcleo, observação essa que, pode ter acontecido nesta pesquisa (GULATI; NAGAICH; SARAF, 2014). Esse comportamento pode favorecer uma liberação sustentada nos curativos, por exemplo, no que tange ao número de troca dos mesmos, pois a depender do tempo de liberação alcançado, assim como sua concentração, essa troca será reduzida favorecendo a reepitelização do tecido afetado e ação da substância, relacionado também ao tempo de degradação do polímero.

Esse tempo de liberação pode ser regulado aumentando ou diminuindo o grau de reticulação entre as cadeias poliméricas, observando a forma e composição do polímero ou através da modificação da superfície (HUANG; BRAZEL, 2001). A reticulação, nesse estudo foi do tipo física, realizada com o TPP em concentrações baixas, que variaram de 0,1 a 0,5%. Foi possível identificar que a reticulação a 0,3% e 0,1% favoreceram a liberação de uma massa maior, mantendo uma concentração quase constante no decorrer das etapas identificadas do ensaio para ambas metodologias.

O grau de intumescimento (GI) também deve ser considerado, pois o seu grau máximo ocorrerá quando as cadeias poliméricas interagirem com as moléculas do solvente e se expandirem até alcançar o estado de solvatação e, de acordo com a densidade de reticulação, a expansão do material ocorrerá sofrendo resistência até que o sistema atinja o equilíbrio, fato que influencia a cinética de liberação de fármacos

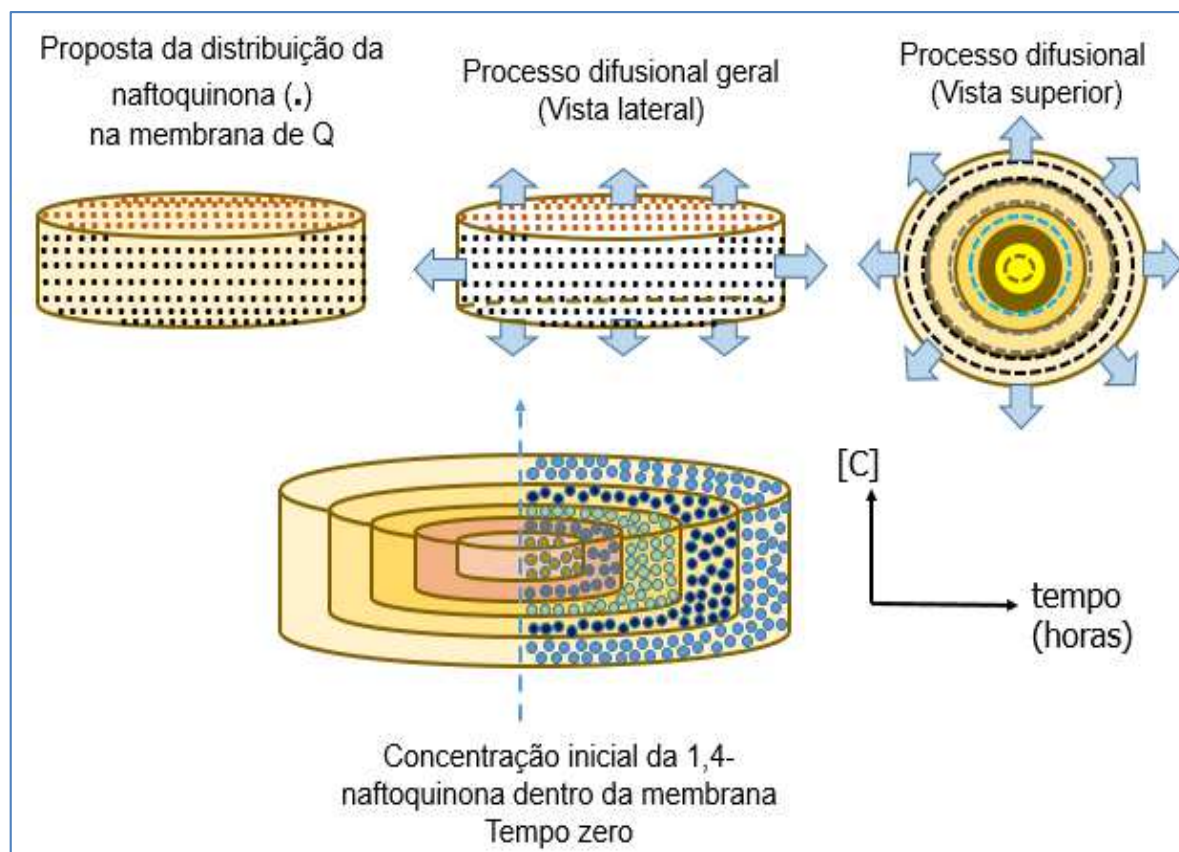
em sistemas matriciais. Tal situação é dependente da temperatura e do tipo de solvente utilizado (LANGER; PEPPAS, 2003)

A liberação, nesse estudo, foi favorecida pelo grau de intumescimento alcançado e mantido constante durante o tempo de realização do ensaio, principalmente no que se refere às membranas liofilizadas. Aquelas obtidas por evaporação de solvente também apresentaram um GI elevado, mas inferior às liofilizadas, e com comportamento irregular (semelhante a etapas ou fases) e isso se refletiu na liberação, sendo essa última também inferior à amostra mencionada.

O solvente onde se encontravam as membranas e seu pH também possuem influência no desempenho da liberação. A solução tampão fosfato PBS utilizada nesta pesquisa apresentou pH de 7,4. Estudos sinalizam que dispositivos poliméricos, a exemplo da quitosana, em presença de pH ácido são mais sensíveis no que se refere à liberação, influenciando positivamente nesse processo e no grau de intumescimento (VAGHANI; PATEL, 2011a; VAGHANI; PATEL, 2011b). Entretanto, o intumescimento verificado nesta pesquisa, considerando-se seu propósito, foi satisfatório e isso tem relação direta com a liberação e, quanto à essa última, o pH 7,4 pareceu não favorecer o efeito *burst* já comentado e, possivelmente manteve a liberação sustentada por mais tempo, mesmo que as concentrações não tenham sido tão elevadas. É provável que as ligações químicas entre os grupos funcionais da quitosana e do 1,4-naftoquinona também possam explicar essa situação ou a própria dificuldade de afinidade deste composto com o meio aquoso, visto ser hidrofóbico. Estudos semelhantes a esse já foram reportados (KHLIBSUWAN et al., 2017; TAMANNA; BULITTA; YU, 2015).

Sugere-se que o comportamento da liberação do 1,4-naftoquinona de ambos os conjuntos de membranas possa ser explicado pelo tipo de sistema que foi utilizado, neste caso o matricial. Nesse sistema acredita-se que o composto esteja homogeneamente disperso na matriz polimérica de quitosana e, para ser liberado são necessários processos que incluem a penetração de água na matriz, promovendo o intumescimento, a difusão do composto pelos poros dessa matriz e por fim, a erosão/degradação do polímero, inclusive alguns desses processos podem ocorrer simultaneamente (KIM et al., 2009). Um esquema ilustrativo pode ser observado a partir da Figura 42.

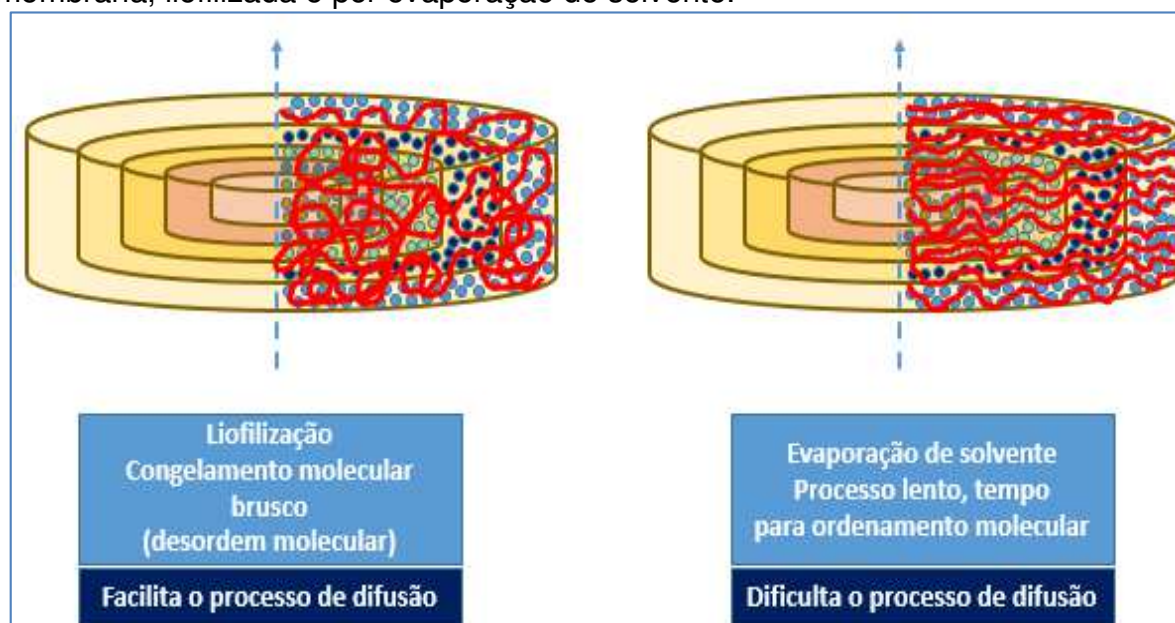
Figura 42 - Desenho esquemático da distribuição do 1,4-naftoquinona na membrana de quitosana seguida do processo difusional após o contato com a solução, neste caso, PBS.



Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Nessa pesquisa foram observadas tais características, porém de forma distinta entre as liofilizadas e as por evaporação de solvente, que possivelmente determinaram as diferenças entre as intensidades de liberação identificadas. Nas primeiras, devido ao processo de liofilização se desenvolver com um congelamento brusco prévio, não há tempo hábil para uma organização molecular, de forma que esse desordenamento proporciona uma facilitação no processo de difusão, enquanto que naquelas por evaporação de solvente, o processo de formação da matriz de quitosana se desenvolve mais lentamente, com tempo para uma ordenação molecular e isso dificulta o processo de difusão, conforme ilustrado na Figura 43.

Figura 43 - Desenho esquemático da organização molecular de ambos os tipos de membrana, liofilizada e por evaporação de solvente.



Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

O tipo de polímero hidrofílico escolhido e a quantidade na elaboração da matriz é de suma importância na obtenção de uma combinação adequada dos mecanismos mencionados. A sua compreensão está relacionada a possibilidade de modulação e controle mais efetivo na liberação dos fármacos (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

É interessante ressaltar que as membranas liofilizadas, as quais apresentaram um comportamento de liberação mais semelhante entre si e mais elevado em relação àquelas por evaporação de solvente, apesar da concentração do 1,4-naftoquinona não representar uma parcela considerável em relação ao quantitativo inicial incorporado (750 $\mu\text{Mol/L}$), foi reportado por Kayashima et al., (2009) que a concentração de 100 μMol foi efetiva na ação anti-angiogênica (priva a formação de vasos) em experimento com ratos e, na concentração de 300 μMol apresentou inibição significativa no crescimento de células proliferativas do HCT116 (células de câncer de cólon humano). O valor máximo alcançado nesse estudo foi de 234 $\mu\text{Mol/L}$, ou seja, um quantitativo próximo a um valor de referência.

6 CONCLUSÕES

- Os espectros de FTIR para os constituintes das membranas analisadas estão de acordo com o reportado na literatura, a exceção do 1,4-naftoquinona, utilizado nessa pesquisa, que além dos grupos funcionais característicos, apresentou o grupo C-O possivelmente relacionada a alguma substância encontrada nos 3% de impureza, visto que o 1,4-naftoquinona utilizado apresentou 97% de pureza;
- Os difratogramas apresentaram picos característicos da quitosana nas membranas desenvolvidas e, nas membranas com o 1,4-naftoquinona observou-se o aumento da cristalinidade;
- Na análise morfológica realizada pela MEV observou-se, nas membranas liofilizadas, características de superfície porosa e, naquelas por evaporação de solvente, uma superfície lisa, sem porosidade superficial e homogênea característica de um material denso;
- Nas análises de TG/DTG não foram observadas alterações relevantes quando comparadas as membranas liofilizadas com e sem reticulação e as obtidas por evaporação de solvente nessas mesmas condições;
- Ao ensaio de DSC observou-se que os resultados estão de acordo com o reportado na literatura, a exceção da curva exotérmica identificada no 1,4-naftoquinona, que pode estar relacionada à degradação do grupo funcional C-O, observada ao FTIR;
- No ensaio mecânico de tração verificou-se que as membranas por evaporação de solvente apresentaram resistência superior às liofilizadas;
- No teste de molhabilidade observou-se que todas as amostras exibiram um perfil hidrofílico; já na análise do grau de intumescimento verificou-se que as membranas liofilizadas apresentaram um aumento médio da massa média superior àquelas por evaporação de solvente, sendo todas acima de 400%;
- Não foi observada diferença significativa entre as membranas no que se refere às soluções de PBS e PBS/lisozima quanto à degradação. Entretanto, as amostras não porosas apresentaram degradação superior às porosas;
- Todas as amostras com 1,4-naftoquinona submetidas ao ensaio de citotoxicidade apresentaram-se tóxicas;

- No ensaio de liberação controlada foi possível evidenciar uma liberação lenta, controlada, caracterizada em etapas.
- Diante do exposto, pode-se concluir que as membranas de quitosana estudadas se apresentam promissoras como curativos para utilização em sistema de liberação controlada do 1,4-naftoquinona, de acordo com a finalidade proposta neste trabalho, em particular as membranas liofilizadas.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar a permeabilidade a vapor d'água, visto a existência de normas para elaboração de curativos;
- Realizar estudos comparativos com fármacos já utilizados comercialmente;
- Analisar qual o modelo matemático para a cinética de liberação do 1,4-naftoquinona nas membranas de quitosana melhor se adequa;
- Estudo sobre a eficiência das membranas liofilizadas (porosas) contendo 1,4-naftoquinona *in vivo*.

REFERÊNCIAS

ADAMIAN, A. A. et al. Development of new biologically active dressings and methodology of their use. **Khirurgiia** (Mosk), v. 12, p. 10–14, 2004.

AGARWAL, A. et al. Polymeric materials for chronic wound and burn dressings. In: FARRAR, D. (Ed.). **Advanced Wound Repair Therapies**: Woodhead Publishing, p.186-208, 2011.

AGUIAR, R. M.; SILVA, G. R.C. Os Cuidados de Enfermagem em Feridas Neoplásicas na Assistência Paliativa. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, UERJ, Ano 11, Abril/Junho, 2012.

AHAMED, M. I. N. Evaluation of biomaterial containing regenerated cellulose and chitosan incorporated with silver nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.72, p. 680–686, 2015.

ALBANEZ, R. **Recobrimento gastrorresistente de pellets de diclofenaco de sódio em leite fluidizado tipo wurster**. Dissertação (Mestrado). Curso de Engenharia Química, Departamento de Engenharia de Processos, Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química, Campinas, 2012.

ALMEIDA, T. L. **Desenvolvimento de membrana composta de PVAI e quitosana compatível com o sistema dermo-epidérmico**. Dissertação (Mestrado em Ciências em Tecnologia Nuclear). Universidade de São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2009.

ALVARADO. L. G. **Membrana transdérmica de liberação controlada utilizando quitosana, plasma e plaquetas para a regeneração de feridas**. Dissertação. (Mestrado em Biotecnologia Médica). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu, 2012.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Key statistics for melanoma skin cancer**. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/skincancer-melanoma/detailedguide/melanoma-skin-cancer-key-statistics>>. Acesso em: 14/09/2016.

ARANAZ, I., et al. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. **Current Chemical Biology**, v.3, n. 2, p. 203-230, 2009.

ARCHANA, D. et al. Chitosan-PVP-nano silver oxide wound dressing: In vitro and in vivo evaluation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 73, p. 49-57, 2015.

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

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

ASTM International: **D882-10**. Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. Disponível em: <https://compass.astm.org/EDIT/html_annot.cgi?D882>. Acesso em: 07/10/2016.

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.

ATAMANYUK, D. et al. Synthesis and biological activity of new thiopyrano[2,3-*d*]thiazoles containing a naphthoquinone moiety. **Scientia Pharmaceutica**, v. 81, p. 423-436, 2013.

AZEVEDO, I. C. et al. Tratamento de feridas: a especificidade das lesões oncológicas. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 7, n. 2, p. 303-313, maio/ago. 2014a.

AZEVEDO, I. C. et al. Conhecimento de Enfermeiros da Estratégia Saúde da Família sobre Avaliação e Tratamento de Feridas Oncológicas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 60, n.2, p. 119-127, 2014b.

AZEVEDO, V.V.C., et al. Materiais cerâmicos utilizados para implantes. **Revista eletrônica de Materiais e Processos**, v.2, n. 3, p. 35-42, 2007.

BAADE, P. D. et al. Factors associated with the number of lesions excised for each skin cancer. **Archives of Dermatology**, v. 144, p.1468-76, 2008.

BALBINO, C. A; PEREIRA, L. M; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.

BANO, I. et al. Characterization and potential applications of gamma irradiated chitosan and its blends with poly(vinyl alcohol). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 65, p. 81-88, 2014.

BANO, I. et al. Chitosan: A potential biopolymer for wound management. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.102, p. 380–383, 2017.

BARDINI, G; LOURENÇO, L., FISSMER, M. C. Avaliação do conhecimento e hábitos de pacientes dermatológicos em relação ao câncer da pele. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 41, n. 2, p. 56-63, 2012.

BARBOSA, R. C. **Compósitos quitosana/carbonato de cálcio para utilização em cânulas de fístula ruminal**. Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Campina Grande, 119 f, 2011.

BARRY, B. Liberação transdérmica de fármacos. In: Aulton, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2ªed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BAJPAL, A. K. et al. Responsive polymers in controlled drug delivery. **Progress in Polymer Science**, v. 33, p. 1088–1118, 2008.

BANO, I. et al., Chitosan: A potential biopolymer for wound management. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 380–383, 2017.

BECERRA, J. et al. Tuning the hydrophilic/hydrophobic balance to control the structure of chitosan films and their protein release behaviour, **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 4, p. 1070-1083, 2017.

BERGER, J. et al. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.57, p.19–34, 2004.

BEZERRA, D. P. et al. Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. **Toxicology in Vitro**, v. 21, n. 1., 2007.

BISPO, V. M. **Estudo do efeito da reticulação por Genipin em suportes biocompatíveis de Quitosana-PVA**. 2009. 140p. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Minas), Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2009.

BO, T. H. et al. Fabrication and Evaluation of Porous Keratin/chitosan (KCS) Scaffolds for Effectively Accelerating Wound Healing. **Biomed Environ Sci**, v. 28, n. 3, p. 178-189, 2015.

BÓCOLI, K. H. et al. Tratamento cirúrgico de carcinomas cutâneos pelo Sistema Único de Saúde: análise de custos **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 40, n. 6, p. 449-452, 2013.

BONIFAZI, E. L. et al. Antiproliferative activity of synthetic naphthoquinones related to lapachol. First synthesis of 5-hydroxylapachol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.18 p.2621–2630, 2010.

BONILLA, J. et al., Properties of wheat starch film-forming dispersions and films as affected by chitosan addition. **Journal of Food Engineering**, v.114, p. 303–312, 2013.

BORGES, E. L.; CHIANCA, T.C.M. Tratamento e cicatrização de feridas – parte 1. **Nursing**, São Paulo, n.21, p. 24–29, 2000.

BORGES, E. L. et al. **Feridas**: como tratar. Belo Horizonte: Coopemed Editora Médica, 2001.

BORGES, E. L. et al. Projeto de Extensão: Atendimento ao portador de ferida crônica, **Anais do 7º encontro de extensão da UFMG**, Área temática: Saúde, Belo Horizonte, 2004.

BOU, E. et al. Controle de Qualidade dos Tripolifosfatos Sódicos Empregados na Fabricação de Engobes e Esmaltes. **Cerâmica Industrial**, v. 5, n. 4, julho/agosto, 2000.

BOUCARD, N. et al. The use of physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following third-degree burns. **Biomaterials**, v 28, p. 3478–3488, 2007.

BRANDÃO, H. N. et al. Química e Farmacologia de Quimioterápicos Antineoplásicos Derivados de Plantas. **Química Nova**, vol.33, nº 6, pp. 1359-1369. 2010.

BRASIL. **Resolução-RE nº899**, 29/5/2003. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02/06/2003, seção 1 - Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, aprova o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. 2003.

BRITO, D.; CAMPANA FILHO, S. P.; Kinetics of the thermal degradation of chitosan. **Thermochimica Acta**, 465: p. 73-82, 2007.

BRITO, N. M.; AMARANTE-JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L.; **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

BUENO, C. Z. **Influência do tipo de estratégia de reforço das propriedades mecânicas nas características de membranas de quitosana e alginato projetadas para o recobrimento de lesões de pele**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 103f., 2010.

CESARETTI, I. U. R. Processo fisiológico de cicatrização da ferida. **Pelle Sana**, v.2, p.10-2, 1998.

CHEN, G. J. et al. Treatment patterns and cost of nonmelanoma skin cancer management. **Dermatology Surgery**, v.32, p. 1266-71, 2006.

CHUNG, Y. C.; CHEN, C. Y. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2806–14, 2008.

COIMBRA, P. M. A. **Preparação e Caracterização de sistemas de liberação controlada de fármacos com base em polímeros de origem natural**. Dissertação (Doutorado em engenharia química) – Faculdade de ciência e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 268f, 2010.

COLLET, J.; MORETON, C. Formas farmacêuticas perorais de liberação modificada. In: In: Aulton, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2ªed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

COSTA, C. S. Epidemiologia do câncer de pele no Brasil e evidências sobre sua prevenção. **Diagnóstico & Tratamento**, v.17, n. 4, p.206-8, 2012.

COSTA, C. R. M.; SPERANCINI, M.P.C. Atividade Física e o Processo de Envelhecimento da Pele. **Revista Mineira de Educação Física**, Viçosa, v. 9, n. 2, p. 73-88, 2001.

COSTA JR, E. S.; MANSUR, H. S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p.1460-1466, 2008

CROISIER, F.; JÉRÔME, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 49, p. 780–792, 2013.

CRUZ, J. B. **Arcabouços de quitosana/agente antineoplásico**: síntese, caracterização e aplicação. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 118, 2015.

CRUZ, J. B. et al. Síntese e caracterização de arcabouços de quitosana com agente antineoplásicos. **Revista Matéria**, v.21, n.1, p. 129 – 140, 2016

CUNHA-FILHO, M. S. S. et al. Validação da Metodologia Analítica e Desenvolvimento do Teste de Dissolução para o Antineoplásico Beta-Lapachona. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 6, p. 805-811, 2009.

CUSTÓDIO, G. et al. Epidemiologia dos carcinomas basocelulares em Tubarão, Santa Catarina (SC), Brasil, entre 1999 e 2008. **An. Bras. Dermatol.**, v. 85, n. 6, p. 819-826, 2010.

DALLAN, P. R. M. **Síntese e caracterização de membrana de quitosana para aplicação na regeneração de pele**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 212f., 2005.

DAMIAN, C. et al. Quitosana: Um Amino Polissacarídeo com Características Funcionais. **Alim. Nutri Araraquara**, v.16, n. 2, p.195-205, 2005.

DASH, M.; Chiellin, F; Ottenbrite, R. M.; Chiellini, E. Chitosan - A versatile semisynthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 36 p. 981–1014, 2011.

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

DIDIER, F. B. C. W; BRUM, L. F. S.; AERTS, D. R. G.C. Hábitos de exposição ao sol e uso de fotoproteção entre estudantes universitários de Teresina, Piauí. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, 23(3):487-496, jul-set, 2014.

DI MARTINO et al., Chitosan-based nanocomplexes for simultaneous loading, burstreduction and controlled release of doxorubicin and 5-fluorouracil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.102, p. 613–624, 2017.

DREIFKE, M. B.; JAYASURIYA, A. A.; JAYASURIYA, A. C. Current wound healing procedures and potential care. **Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications**, v. 48, p. 651–662, 2015.

DUPRAT NETO, J. P.; BRECHTBUHL, E. R. Melanoma Cutâneo. In: LOPES, A.; CHAMMAS, R.; IYEYASU, H. **Oncologia para graduação**. 3ed. São Paulo: Lemar, 2013, p. 528-534.

ESPÓSITO, A. C.C. et al., Fatores que levam à negligência quanto aos cânceres da pele não melanoma. **Diagnóstico & Tratamento**, v. 22, n. 2, p. 63-66, 2017.

EVANS, N. D. et al. Epithelial mechanobiology, skin wound healing, and the stem cell niche **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, v.28, p.397-409, 2013.

FAN, K. et al. State of the art in topical wound healing products. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 127, Suppl 1, p. 44-59, 2011.

FERREIRA, S. B. **Síntese e atividades farmacológicas de novos 1,2,3-triazóis glicoconjugados e naftoquinonas**. Tese (Doutorado em Química Orgânica). Instituto de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

FERREIRA, F. R., NASCIMENTO, L. F. C., ROTTA, O, Fatores de risco para câncer da pele não melanoma em Taubaté, SP: um estudo caso-controle. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 4, p.431-437, 2011.

FERREIRA, M. C. et al. Feridas complexas. **Revista Clinics**, v.61, n. 6, p.571-8, 2006.

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**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 2010.

FIDÉLES, T. B. et al. Evaluation of Ionic Crosslinked Chitosan Scaffolds for Biomedical Applications. **Journal of Chitin Chitosan Science**, v. 1, n. 3, 2013.

FRANCO, D.; GONÇALVES, L. F. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgões**, v. 35, p. 203–206, 2008.

FREEDBERG, I. et al. **Fitzpatrick's dermatology in general medicine**. 6th ed. New York: McGraw-Hill, 2003.

FREITAS, H.P.S. et al., Cytotoxic cordiaquinones from the roots of *Cordia polycephala*. *J. Braz. Chem. Soc.* v, 23, 1558–1562, 2012.

FROMANTIN, I. et al. A Prospective, Descriptive Cohort Study of Malignant Wound Characteristics and Wound Care Strategies in Patients with Breast Cancer. **Ostomy Wound Management**, v. 60, n. 6, p.38–48, 2014.

FONDER, M. A. et al. Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 58, n. 2, p. 185-206, 2008.

FOOK, M. V. L. **Desenvolvimento da técnica de deposição de hidroxiapatita na superfície de polietileno de ultra-peso molecular para aplicação como biomaterial**. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 128 f., 2005.

FOOK, A. C. B. M. **Produção e caracterização de arcabouços compósitos ha/biopolímero para engenharia de tecidos**. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 137 f., 2012.

FURTADO, G. T. F. S. **Quitosana/curcumina: membranas de liberação controlada para tratamento de melanoma**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 89 f., 2014.

GANDINI, S. et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. **European Journal of Cancer**, v.41n. 1, p. 45-60, 2005.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Colour textbook of histology**. 3ed. Saunders, 2007.

GEOVANINI, T.; O. JÚNIOR, A. G.; PALERMO, T. C. S. Curativos e coberturas. In: GEOVANINI, T.; O. JÚNIOR, A. G. **Manual de curativos**. 2ed. São Paulo: Corpus, 2008.

GIERSZEWSKA-DRUZZNSKA, M.; OSTROWSKA-CZUBENKO, J. The Effect of ionic crosslinking on thermal properties of hidrogel chitosan membranes. **Progress on Chemistry and Application of Chitin**. v. 15, 2010.

GOMES, I. P.; CAMARGO, T. C. Feridas tumorais e cuidado de enfermagem: buscando evidências para o controle de sintomas. **Revista de Enfermagem da UERJ**, v. 12, n.2, p. 211-216, 2004.

GOMES, F. V. L.; COSTA, M. R.; MARIANO, L. A. A. **Avaliação e tratamento de feridas-Manual de Curativos**. Comissão de Controle de Infecção Hospitalar Serviço de Controle de Infecção Hospitalar- CCIH, 2005.

GONSALVES, A. A de et al. Diferentes Estratégias para a Reticulação de Quitosana. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p.1215-1223, 2011.

GOZZO, T. O. et al. Ocorrência e manejo de feridas neoplásicas em mulheres com câncer de mama avançado. **Escola Anna Nery**, v.18, n.2, p. 270-276, 2014.

GULATI, N.; NAGAICH, U.; SARAF, S. Fabrication and in vitro characterization of polymeric nanoparticles for Parkinson's therapy: a novel approach. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 4, p.869-876, 2014.

GUTIERRES, M. et al. Substitutos ósseos: conceitos gerais e estado actual. **Arquivos de Medicina**, v. 19, n. 4, p. 153-162, 2006.

HANNA, J. R., GIACOPELLI, J. A. A review of wound healing and wound dressing products. **The Journal of Foot and Ankle Surgery**, v. 36, p. 2–14, 1997.

HENCH, L. L. Biomaterials. **Science**, Washington, v.208, p.826-831, 1980.

HENCH, L. L.; POLAK, J. Third generation biomedical materials. **Science**, Washington, v.295, p.1014-1017, 2002.

HENCH, L.L.; ETHRIDGE, E.C. **Biomaterial**: an interfacial approach. Academic Press: New York, 1982.

HERNÁNDEZ, I. C. et al. Citotoxicidad in vitro y potencialidades de los compuestos quinoides como agentes antitumorales. **Revista Cubana de Hematología, Inmunol y Hemoter.**, v. 32, n. 1, p. 30-42, 2016.

HESS, C. T. **Tratamento de feridas e úlceras**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Reichmann & Affonso;2002.

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.

HUANG, X; BRAZEL, C. S. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 73, p. 121–136, 2001.

HUANG, X. et al. Using absorbable chitosan hemostatic sponges as a promising surgical. **International Journal of Biological Macromolecules**, v 75, p. 322–329, 2015.

IMANICHI, D. et al. Fatores de risco do câncer de pele não melanoma em idosos no Brasil. **Diagnóstico & Tratamento**, v. 22, n. 1, p.3-7, 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE – (2010). Disponível em: <http://www.bbc.co.uk/portuguese/noticias/2013/08/130829_demografia_ibge_populacao_brasil_lgb.shtml>, acesso em 09 jun. 2014.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Ações de enfermagem para o controle do câncer**: uma proposta de integração ensino-serviço. 3ª ed., Rio de Janeiro: INCA, 2008.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2014**: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2016.

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

IRANZO, C. C. et al. Lesões cutâneas malignas e pré-malignas: conhecimentos, hábitos e campanhas de prevenção solar. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 28, n.1, p.1-6, 2015.

ISAAC, C, et al. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Rev Med**, v. 89, n. 3/4, p.125-31, 2010.

JARDIM, G. A. M. et al. Naphthoquinone-based chalcone hybrids and derivatives: synthesis and potent activity against cancer cell lines. **Medicinal Chemical Communications**, v. 6, p. 120–130, 2015.

JAYAKUMAR, K. et al. H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. **Biotechnology Advances**, 2011.

JONES, V.; MILTON, T., When and how to use adhesive film dressings, **Nursing Times**, v.96, p.3–4, 2000.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2008.

KAHN, H. **Difração de Raios X**. Disponível em: <http://www.agelfire.com/crazy3/qfl2308/1_multipart_xF8FF_2_DIFRACAO.pdf> Acesso em: 19/11/2011.

KATO, Y.; ONISHI, H.; MACHIDA, Y. Application of Chitin and Chitosan Derivatives in the Pharmaceutical Field. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 4, p. 303-309, 2003.

KARIKAS, G. A. Anticancer and chemopreventing natural products: some biochemical and therapeutic aspects. **Journal of the Balkan Union of Oncology**, v. 15, n. 4, p. 627-38, 2010.

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

KHAN, A. **A potencialidade do reagente metacrilato de glicidila imobilizado no biopolímero quitosana para a remoção de cátions**. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Estadual de campinas, Instituto de Química, 2011.

KHLIBSUWAN, R. et al. Chitosan-clay nanocomposite microparticles for controlled drug delivery: Effects of the MAS content and TPP crosslinking. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 40, p. 1-10, 2017.

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

KIM, M.Y.; LEE, J. Chitosan fibrous 3D networks prepared by freeze drying. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 1329-1336, 2011.

KIM, S. et al., Development of Chitosan–Ellagic Acid Films as a Local Drug Delivery System to Induce Apoptotic Death of Human Melanoma Cells. **Journal of Biomedical Materials Research, Part B: Applied Biomaterials**, 2008.

KIM, S. et al., Engineered polymers for advanced drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 420-430, 2009.

KLAUS, V. et al. 1,4-Naphthoquinones as inducers of oxidative damage and stress signaling in HaCaT human keratinocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.496 p.93–100, 2010.

KLAUSS, P. **Desenvolvimento de dispositivos poliméricos implantáveis para a liberação de fármaco fabricados por sinterização seletiva a laser**. (Tese Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina Departamento de Engenharia Mecânica Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais. Florianópolis, 2010.

KLOTZ, L. O.; HOU, X.; JACOB, C. 1,4-Naphthoquinones: From Oxidative Damage to Cellular and Inter-Cellular Signaling. **Molecules**, v. 19, p.14902-14918, 2014.

KOLHE, P.; KANNAN, R. M. Improvement in ductility of chitosan through blending and copolymerization with PEG: FTIR investigation of molecular interactions. **Biomacromolecules**, v. 4, n.1, p.173-180, 2003.

KOUCHAK, M.; HANDALI, s.; BOROUJENI, B. N. Evaluation of the Mechanical Properties and Drug Permeability of Chitosan/Eudragit RL Composite Film. **Osong Public Health and Research Perspectives**, v. 6, n. 1, p. 14-19, 2015.

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

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

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

KUMAR, P. T. S. et al. Flexible and Microporous Chitosan Hydrogel/Nano ZnO Composite Bandages for Wound Dressing: In Vitro and In Vivo Evaluation. **ACS Applied Materials Interfaces**, v. 4, p. 2618–2629, 2012.

KUMBHAR, S. G.; PAWAR, S. H. Self-Functionalized, Oppositely Charged Chitosan-Alginate Scaffolds for Biomedical Applications. **Biotechnology Industry Journal**, v 13, n. 2, 2017.

LANGER, R.; PEPPAS, N. Advances in biomaterials, drug delivery, and bionanotechnology. **American Institute of Chemical Engineers Journal**, v. 49, n. 12, p. 2990-3006, 2003.

LAO, L.L.; VENKATRAMAN, S.S.; PEPPAS, N.A. Modeling of drug release from biodegradable polymer blends. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v, 70, p. 796–803, 2008.

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

LEYVA, E. et al., Importancia química y biológica de naftoquinonas. Revisión bibliográfica. **Afinidad: Revista de química teórica y aplicada**, v.74, n. 577, p. 36-50, 2017.

LI, X. et al., Biodegradable MPEG-g-chitosan and methoxy poly(ethylene glycol)-b-poly(ϵ -caprolactone) composite films: Part 1. Preparation and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 2, p. 429-436, 2010.

LIU, H. et al. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, n. 2, p. 147-155, 2004.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: Polímeros hidrófilos. **Rev. Bras. Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143 - 154, 2005.

LOPES, S. A.; VEIGA, I. G.; MORAES, A. M. Desenvolvimento de dispositivo de quitosana e xantana para a liberação tópica ou em tecidos moles de indometacina, XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, p. 13205-13212, ISSN 2359-1757, <http://dx.doi.org/10.1016/chemeng-cobeq2014-0124-26924-156887>, 2015.

LÓPEZ, L. I. L. et al. Naphthoquinones: biological properties and synthesis of lawsone and derivatives — a structured review. *Vitae*, **Revista de La Facultad de Química Farmacéutica**, v. 21 n. 3, 2014.

LORD, M.S. et al. The modulation of platelet adhesion and activation by chitosan through plasma and extracellular matrix proteins. **Biomaterials**, v. 32. p. 6655-6662, 2011.

LYRA, et al., Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.26, n.5, p. 784-793, 2007.

MA, L. et al., Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. **Biomaterials**, v. 24, p. 4833-4841, 2003.

MA, Y. et al., Chitosan membrane dressings toughened by glycerol to load antibacterial drugs for wound healing. **Materials Science & Engineering C**, v. 80, n. 1, p. 522-531, 2017.

MACHADO, L. B. M.; CHAMMAS, R. Fatores teciduais de resistência a medicamentos em tumores. In: LOPES, A.; CHAMMAS, R.; IYAYASU, H. **Oncologia para graduação**. 3ed. São Paulo: Lemar, 2013, p. 158-166.

MADHUMATHI, K. et al. Development of novel chitin/nanosilver composite scaffolds for wound dressing applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 21, n. 2, p. 807-813, 2010.

MALAFAYA, P. B.; SILVA, G. A.; REIS, R. L. Natural origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 207-233, May, 2007.

MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, PAMPADO E.; MANDELBAUM, M.H. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources - Part I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 4, 2003.

MANDELBAUM, S. H; DISANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares-Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 393- 410, 2003.

MARCHETTI, J. M.; SARAIVA, J. Sistemas de liberação: estratégias para medicamentos eficazes. In: Aulton, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2ªed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

MARTINO, A. D.; KUCHARCZYK, P.; CAPAKOVA, Z.; HUMPOLICEK, P. Chitosan-based nanocomplexes for simultaneous loading, burst reduction and controlled release of doxorubicin and 5-fluorouracil. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 102, p. 613–624, 2017.

MARTINS, A. F.; OLIVEIRA, D. M.; PEREIRA, A.G.B.; RUBIRA, A.F.; MUNIZ, E.C. Chitosan/Tpp Microparticles Obtained by Microemulsion Method Applied in Controlled Release of Heparin, **International Journal of Biological Macromolecules**, Vol. 51, No. 5, 1127-1133, 2012.

MASOOD, S.H. Application of fused deposition modelling in controlled drug delivery devices. **Assembly Automation**, v. 27, n. 3, p. 325-22, 2007.

MATES, J. M.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F. M.; “Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy”. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v 32, n. 2, p.157-170, 2000.

MENDES, A. A. et al. Aplicação de quitosana como suporte de para uma imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

MENDONÇA, R. J. DE; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 257-62, 2009.

MIDDLETON, J. C.; TIPTON, A. J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. **Biomaterials**, v. 21, p. 2335-2346, 2000.

MILLER, M. G.; RODGERS, A.; COHEN, G. M. Mechanisms of toxicity of naphthoquinones to isolated hepatocytes. **Biochemical Pharmacology**, v 35, Issue 7, 1 April, p. 1177-1184, 1986.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Tratamento e controle de feridas tumorais e úlceras por pressão no câncer avançado**. Instituto Nacional do Câncer – INCA, Rio de Janeiro, 2009.

MOORE, H. W. Bioactivation as a model for drug design bioreductive alkylation. **Science**, v 197, Issue 4303, p 527-53, 1977.

MORAES, C. O. et al. Prevenção do câncer de pele – o autoexame como estratégia acessível a todos. **Revista Extendere**, v 4, n 1, p. 63-75, 2016.

MORAES, T. A. P. et al. Synthesis and Cytotoxic Evaluation of a Series of 2-Amino-Naphthoquinones against Human Cancer Cells. **Molecules**, v.19, p.13188-13199, 2014.

MOURA, R. E. **Síntese de nanopartículas à base de goma do cajueiro para aplicação em sistemas de liberação de fármacos**. Dissertação (Mestrado em química) – Programa de Pós-graduação em química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 79 f., 2009.

MOURA, C. et al. Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: avaliação do processo em escala piloto. **Vetor**, Rio grande, v. 16, p. 37-45, 2006.

MURUGAN, R.; RAMAKRISHNA, S. Development of nanocomposites for bone grafting. **Composites Science and Technology**, n. 65, p. 2385-2406, 2005.

MUZZARELLI, R. A. A. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, p. 167–182, 2009.

NASCIMENTO, I. V. S. R. **Desenvolvimento de sistemas quitosana/piperina para liberação controlada de fármacos**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 82f., 2014.

NAVARRO, M. et al. Biomaterials in orthopaedics. **Journal of the Royal Society Interface**, London, v.5, p. 1137-1158, 2008.

NERY, J.C. **Obtenção e caracterização de filmes contendo alginato de sódio e quitosana para potencial aplicação no tratamento de lesões cutâneas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais). Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

C. G. T. Neto, C. G. T., et al. Thermal analysis of chitosan based networks. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, p. 97-103, 2005.

NICOLOSI, J. G.; MORAES, A. M. Biomateriais destinados à terapia de queimaduras: estudo entre o custo e o potencial de efetividade de curativos avançados, Campinas, jul. 2005. VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, **Anais...** Disponível em: < <http://www.feq.unicamp.br/~cobeqic/tBT42.pdf>>.

NIEKRASZEWICZ, A. Chitosan medical dressings. **Fibers & Textiles in Eastern Europe**, v. 13, n. 6, p. 16-18, Jan/Dec., 2005.

NUNES, P. S. et al. Validation of a UV-VIS Spectrophotometric method for the determination of usnic acid /collagen-based membranes. **Scientia Plena**, v. 11, n. 9, p. 1-9, 2015.

OKAMOTO, Y. et al. Analgesic effects of chitin and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, n. 3, p. 249-252, 2002.

OLIVEIRA, S. S. L. **Desenvolvimento de arcabouços de quitosana/hidroxiapatita para liberação controlada de fármacos**. Dissertação. (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2015.

OWTON, W. M. The synthesis of quinines. **Journal of the Chemical Society - Perkin Transactions**. v.1, Issue 17, p. 2409-2420, 1999.

PAILARD, F. et al. Use of primary cultures of rat hepatocytes to predict toxicity in the early development of new chemical entities. **Toxicol. In Vitro**. v. 13, p. 693–700, 1999.

PANDIMA, D. M. et al. A novel wound dressing material dfibrine-chitosan-sodium alginate composite sheet. **Bulletin Material Science**, v. 35, n. 7, p.1157-11 63, 2012.

PANYAM, J.; LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p.329-347, 2003.

PEREIRA, A. P. V.; VASCONCELOS, W. L.; ORÉFICE, R. L. Novos biomateriais: Híbridos orgânicos-inorgânicos bioativos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v.9, p.104-109, 1999.

PEREIRA FILHO, J. S.; BICALHO, L.; SILVA, D. A. Uso de própolis associada a outros componentes no tratamento de feridas oncológicas após excisão. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v. 3, n. 2, Dezembro, 2012.

PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A S.; FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 4, p. 491-502, 2007.

PIERÓG, M.; GIERSZEWSKA-DRUZZNSKA, M.; OSTROWSKA-CZUBENKO, J. Effect of ionic crosslinking agents on swelling behavior of chitosan hidrogel membranes. **Progress on Chemistry and Application of Chitin**. v. 14, 2009.

POLETTI, N. A. A., CALIRI, M.H.L., SIMÃO, C. D. S. R., JULIANI, K. B., TÁCITO, V.E., Feridas malignas: uma revisão de literatura. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 48, n. 3, p. 411-417, 2002.

POURHAGHOUY, M; ZAMANIAN, A. Physical and Mechanical Properties of the Fully Interconnected Chitosan Ice-Templated Scaffolds. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, p. 41476-41482, 2015.

PROBST, S.; ARBER, A.; FAITHFULL, S. Malignant fungating wounds: A survey of nurses' clinical practice in Switzerland. **European Journal of Oncology Nursing**, v. 3, p.295–298, 2009.

RAVI KUMAR, M. N. V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.

RIBEIRO, G. B. M. **Obtenção de biomateriais porosos utilizando sílica coloidal como Aglutinante**. Trabalho de Diplomação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul, 51p., 2009.

RIVEROA, S.; GARCÍA, M. A.; PINOTTI, A. Crosslinking capacity of tannic acid in plasticized chitosan films. **Carbohydrate polymers**, v. 82, p. 270-276, 2010.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 603–632, 2006.

ROSENDO, R. A. **Desenvolvimento e caracterização de scaffolds de quitosana/Cissus Verticillata (L.) NiColson & C. E. Jarvis**. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 181f., 2016.

SHAMEKHI, M. A. et al. Fabrication and characterization of hydrothermal cross-linked chitosan porous scaffolds for cartilage tissue engineering applications. **Materials Science & Engineering C**, v. 80, n. 1, p. 532-542, 2017.

SILVA JR, E. N. et al. Synthesis and evaluation of quinonoid compounds against tumor cell lines. **Eur. J. Med. Chem.** v. 46, p. 399–410, 2011.

SILVA E. P. **Estudo da compatibilidade entre atorvastatina e excipientes por técnicas térmicas (TG, DSC) e FTIR utilizando correlação de Pearson**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 76f., 2016.

SILVA, M. C. **Arcabouços quitosana/curcumina como sistema de liberação controlada para tratamento de câncer de mama**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 180f., 2015.

SILVA, M.C. et al. Avaliação do método de obtenção de scaffolds quitosana/curcumina sobre a estrutura, morfologia e propriedades térmicas. **Revista Matéria**, v. 21, n. 03, p. 560-568, 2016.

SILVA, R. L. **Sistemas de liberação controlada de quitosana contendo antígeno capsular Vi de *Salmonella Typhi***. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Pará, Belém, 2012.

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. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 407-416, 2003.

SILVA, R. M. et al. Preparation and characterization in simulated body conditions of glutaraldehyde crosslinked chitosan membranes. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 15, p. 1105-1112, 2004.

SILVA, G. L. **Estudo da ação inibitória da quitosana sobre os enteropatógenos: *Salmonella Entérica, Shigella e Escherichia Coli EPEC***. Dissertação (mestrado em bioengenharia), Escola de Engenharia de São Carlos - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Paulo, 100 f., 2005.

SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S.C.R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, mar., 2006.

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

SIONKOWSKA, A.; et al. Molecular interactions in collagen and chitosan blends. **Biomaterials**, v. 25, p.795–801, 2004.

SMANIOTTO, P. H. S.; FERREIRA, M.C.; ISAAC, C.; GALLI, R. Sistematização de curativos para o tratamento clínico das feridas. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 27, n. 4, p. 623-6, 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA. **Sinais e sintomas**. Em: <http://www.sbd.org.br/informacoes/sobre-o-cancer-da-pele/sinais-e-sintomas/>>. Acesso em: 16/09/2016.

SOPATA, M. et al. The pilot study assessing efficacy and versatility of novel therapy for neoplastic ulceration: clinical and microbiological aspects. **Postep Derm Alergol.** v. 4. p. 237–245, 2013.

SOUSA, E. T.; LOPES, W.A.; ANDRADE, J. B. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. **Química Nova**, v. 39, n. 4, p. 486-495, 2016.

SOUSA, E. T. et al. Evaluation of thermal stability of quinones by thermal analysis techniques. **Thermochemica Acta**. v. 529, p. 1-5, 2012.

STAMFORD, T. C. M. **Produção, caracterização e atuação anticariogênica da quitosana extraída de *Cunninghamella elegans* UCP 542**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

STANG, A. et al. Nationwide hospitalization costs of skin melanoma and nonmelanoma skin cancer in Germany. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 22, p. 65-72, 2008.

STODDART, M. **Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols**. Totowa: Springer Protocols, 253p, 2011.

SUBRAMANIAN, S.; FERREIRA, M. M. C.; TRSIC, M.; A structure-activity relationship study of lapachol and some derivative of 1,4 naphthoquinones against carnosarcome walker 256. **Structure Chemical**, v. 9, n. 1, p. 47-57, 1998.

TABATA, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. **Journal of the Royal Society Interface**, London, v.6, n.3, p.311-324, 2009.

TAMANNA, T.; BULITTA, J.B.; YU, A. Controlling antibiotic release from mesoporous silica nano drug carriers via self-assembled polyelectrolyte coating. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.26, n.2, p.1-7, 2015.

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

TSAI, H. S.; WANG, Y. Z. Properties of hydrophilic chitosan network membranes by introducing binary crosslink agentes. **Polymer Bulletin**, v. 60, pp. 103-113, 2008.

URAGAMI T.; TOKURA S, (eds.) **Material Science of Chitin and Chitosan**, Japan: Kodansha Ltd., Springer, 2006.

VAGHANI, S. S.; PATEL, M. pH-sensitive hydrogels based on semi-interpenetrating network (semi-IPN) of chitosan and polyvinyl pyrrolidone for clarithromycin release. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 37, n. 10, p. 1160–1169, 2011a.

VAGHANI, S. S.; PATEL, M. Hydrogels Based on Interpenetrating Network of Chitosan and Polyvinyl Pyrrolidone for pH-Sensitive Delivery of Repaglinide. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 8, p. 126-135, 2011b.

VASCONCELOS, M.C. et al., Bioactivity of biflorin, a typical o-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora* L. Z. **Naturforsch**. v. 60, 394–398, 2005.

VERT, M. Polymeric biomaterials: strategies of the past VS strategies of the future. **Process in Polymer Science**. v. 32(8), p. 755-761, 2007.

VILLANOVA, J.C.O.; ORÉFICE, R.L.; CUNHA, A. S. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

WANG, J. J. et al Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. **International Journal of Nanomedicine**, v.6, p.765-774, 2011.

WANG, S. H. et al., Synthesis and Biological Evaluation of Lipophilic 1,4-Naphthoquinone Derivatives against Human Cancer Cell Lines. **Molecules**, v. 20, p. 11994-12015, 2015.

WELLINGTON, K. W. Understanding cancer and the anticancer activities of naphthoquinones – a review. **RSC Advances**, v. 5, p. 20309–20338, 2015.

WILLIAMS, D. To engineer is to create: the link between engineering and regeneration. **Trends in Biotechnology**, v. 24, p. 4-8, 2006.

WILLIAMS, D.F.; CAHN, R.W.; BEVER, M.B. **Concise Encyclopedia of Medical & Dental Materials**, Pergamon Press, 1990.

WILLIAMS, D.F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, v.30, p. 5897–5909, 2009.

WISINTAINER, G. G. N. S. et al., Biflorin: an o-naphthoquinone of clinical significance. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v 86, n. 4, p. 1907-1914, 2014.

WISNIEWSKI, A.; ARGUELHO, M. L. **Manual de Instruções e Roteiros de Experimentos. Laboratório de Química**. Universidade Federal de Sergipe, 2011. Disponível em: <http://albertowj.files.wordpress.com/2011/03/106372-apostila-2011_1-t3.pdf>. Acesso em 12/09/2016.

WONG,T.W. Chitosan and Its Uses in Design of Insulin Delivery System. **Recents Pantents on Drug Delivery & Formulation**, v. 3, p.8-25, 2009.

YANG, Y. M. et al. The controlling biodegradation of chitosan fibers by N-acetylation in vitro and in vivo. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, n. 11, p. 2117-2121, 2007.

YU, J. S. 1,4 - Naphthoquinone. **Synlett**, v. 25, p. 2377–2378, 2014.

YU, B.; et al. Positive Surface Charge Enhances Selective Cellular Uptake and Anticancer Efficacy of Selenium Nanoparticles. **Inorganic Chemistry**, v. 51, n. 16, p. 8956-8963, 2012.

YUDANOVA, T. N.; RESHETOV, I. V. Modern wound dressings: manufacturing and technology. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 40, n. 2, 2006.

ZHANG, H.; NEAU, S. H. In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation. **Biomaterials**, v. 22, n. 12, p. 1653-1658, 2001.

ZHENG, Z. et al., Surface properties of chitosan films modified with polycations and their effects on the behavior of PC12 cells. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 24, pp. 63-82, 2009.