



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



**ADRIANA DA COSTA BRAZ**

**FILME DE QUITOSANA PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE COLCHICINA  
PARA TRATAMENTO DE CARCINOMA BASOCELULAR**

**CAMPINA GRANDE  
DEZEMBRO/2014**

**ADRIANA DA COSTA BRAZ**

**FILME DE QUITOSANA PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE COLCHICINA  
PARA TRATAMENTO DE CARCINOMA BASOCELULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande, Área de Concentração: Materiais Avançados, como requisito à Obtenção do título de mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook

CAMPINA GRANDE  
DEZEMBRO/2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

B827f Braz, Adriana da Costa.  
Filme de quitosana para liberação controlada de colchicina para tratamento de carcinoma basocelular / Adriana da Costa Braz. – Campina Grande, 2014.  
88 f. : color.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2014.

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

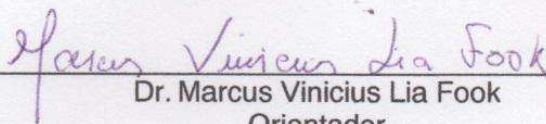
1. Quitosana. 2. Carcinoma Basocelular. 3. Biomaterias. 4. Colchicina. 5. Liberação Controlada. I. Fook, Marcus Vinicius Lia. II. Título.

CDU 677.473(043)

**FILMES DE QUITOSANA COM LIBERAÇÃO CONTROLADA DE  
COLCHICINA PARA TRATAMENTO DE CARCINOMA BASO  
CELULAR**

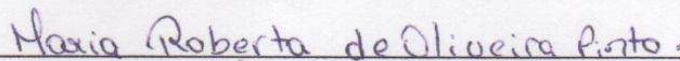
**ADRIANA DA COSTA BRAZ**

Dissertação Aprovada em 12/12/2014 pela banca examinadora constituída dos seguintes membros:



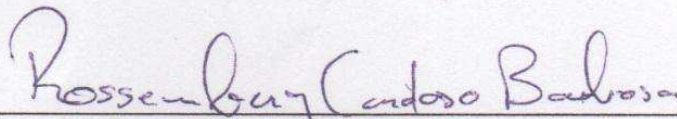
---

Dr. Marcus Vinicius Lia Fook  
Orientador  
PPG-CEMat/UAEM/UFCG



---

Dr.<sup>a</sup> Maria Roberta de Oliveira Pinto  
Examinadora Externa  
UEPB



---

Dr. Rossemberg Barbosa Cardoso  
Examinadora Externa  
UFCG

Dedico esta dissertação

Ao meu pai Levi e minha mãe Adair;

Ao meu marido César, minha filha Mariana e meu filho Theo;

Aos meus amigos Otávio Lopes e Sandra Carvalho;

E a todos que torcem pelo meu sucesso

Agradeço, primeiramente, a Deus por estar aqui, vencendo mais um desafio da minha vida, iluminando meus caminhos, abençoando cada passo da minha vida e da minha família;

À meu marido, meus filhos e meus pais, pelo amor a mim dedicado, pela paciência e tolerância das minhas ausências;

Ao Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook, pela orientação, e principalmente pela confiança depositada e a contribuição para minha formação acadêmica e profissional;

Ao meu amigo Otávio Lopes pelo incentivo e apoio em todo processo deste trabalho;

À minha amiga Sandra Carvalho pelo encorajamento e contribuição no trabalho;

Aos professores e pesquisadores do CERTBIO, que contribuíram direto ou indiretamente no desenvolvimento do trabalho;

À Associação Médica da Paraíba, pelo convênio com o Programa de Pós Graduação em Engenharia de Materiais da UFCG, abrindo oportunidades e parcerias de grande relevância para a ciência.

## RESUMO

O Carcinoma basocelular é o câncer mais comum do mundo, e apesar da sua evolução muitas vezes benigna, com altas taxas de cura, algumas vezes nos deparamos com casos mais agressivos, invasivos, destrutivos e de difícil controle. É sabido que já houve avanços terapêuticos para estes casos específicos, a exemplo do Vismodegib, entretanto o uso desta droga ainda é uma realidade distante para nossos pacientes brasileiros que se expõe a índices elevados de radiações solares, na maioria trabalhadores rurais de baixa renda e com grande dificuldade a acessibilidade ao sistema público de saúde. Por isso, o presente trabalho sugere uma alternativa para o controle das formas graves do carcinoma basocelular, através da produção de um filme de quitosana dopado de colchicina substância sabidamente antimitótica e com evidência clínica já citada na literatura no carcinoma basocelular, por via transdérmica por liberação controlada da droga que permita mantê-la em um nível sérico contínuo, suficiente para sua ação antimitótica, causando morte seletiva das células tumorais, diminuindo ou extirpando esses tumores, com custos mais acessíveis, pois é uma droga de baixo custo, melhorando consequentemente a morbidade da doença e a qualidade de vida destes pacientes. E os resultados obtidos através das caracterizações apresentaram membranas com variações de cristalinidade (por DRX) de acordo com o processo de reticulação. Por FTIR pode-se observar certa interação entre o fármaco e os grupos amina da quitosana. Pelas microscopias ótica e eletrônica, pode-se observar que o acréscimo de fármaco proporcionou alguma rugosidade a membrana. Também pelas microscopias verificou-se a reticulação não homogênea da superfície da membrana. Por EDS não se verificou nenhum elemento estranho a estrutura da quitosana e do fármaco. Por medida do ângulo de molhabilidade pode-se verificar aumento do perfil hidrofílico da membrana por adição do fármaco, perfil este que foi modificado pelo processo de reticulação. A partir do ensaio de citotoxicidade pode-se constatar que a membrana apresenta certa citotoxicidade. Este resultado demonstra também o potencial da membrana de quitosana em liberar o fármaco, considerando que a membrana apenas de quitosana não apresenta toxicidade em meio biológico, sendo a toxicidade observada no ensaio decorrente do fármaco liberado.

Palavras-chave: Carcinoma Basocelular. Biomateriais. Quitosana. Colchicina. Liberação Controlada.

## ABSTRACT

Basal cell carcinoma is the most common cancer in the world, and despite its evolution often benign, with high cure rates, sometimes we are faced with more aggressive, invasive cases, destructive and difficult to control. It is known that there have been advances in treatment for these specific cases, such as the Vismodegib, however this drug is still a distant reality for our Brazilian patients who are exposed to high levels of solar radiation in most rural workers from low-income, great difficulty accessibility to the public health system. Therefore, this study suggests an alternative for the control of severe forms of basal cell carcinoma, through the production of a chitosan film doped colchicine known antimitotic substance and with clinical evidence already mentioned in the literature in basal cell carcinoma, transdermally for release controlled drug that allows keep at a steady serum level, enough for their antimitotic, causing selective killing of tumor cells, reducing or extirpating these tumors, with more affordable because it is an inexpensive drug, consequently improving morbidity the disease and the quality of life of these patients. And the results obtained from the characterization showed membranes crystallinity variations (XRD) according to the crosslinking process. By FTIR one can observe some interaction between the drug and amino groups of chitosan. Through optical and electronic microscopy, it can be seen that addition of drug has provided some roughness to the membrane. Also by microscopy verified the inhomogeneous crosslinking of the membrane surface. EDS there was no foreign object the structure of chitosan and the drug. By measuring the wetting angle can be checked increase the hydrophilic profile of the drug by adding the membrane, this profile has been modified by the crosslinking process. From the cytotoxicity assay can be seen that the membrane has some cytotoxicity. This result also demonstrates the potential of chitosan membrane to release the drug, whereas only chitosan membrane shows no toxicity in biological medium, with the toxicity observed in this trial due to the released drug.

Keywords: Basal Cell Carcinoma. Biomaterials. Chitosan. Colchicine. Controlled Release.



## LISTA DE ABREVIATURAS

**AINE** – Antiinflamatório não esteroidal

**ASTM** – American Society for Testing and Materials

**CBC** – Carcinoma basocelular

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**DRX** – Difração de Raios X

**EDS** – Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X

**FDA** – Food and Drugs Administration

**FTIR** – Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier

**HPLC** – High Performance Liquede Chromatography

**INCA** – Instituto Nacional do Câncer

**ISO** – International Organization for Standardization

**LCF** - Liberação Controlada de Fármaco

**MEV** – Microscopia Eletrônica de Varredura

**MO** – Microscopia Ótica

**MTT** – Brometo de dimetiltiazol-difenil-tetrazólio

**PBS** – Phosphate Buffered Saline

**PDT** – Terapia Fotodinâmica

**PUVA** – Psoraleno com Ultravioleta A

**SLC** – Sistema de Liberação Controlada

**TPP** – Tripolifosfato de sódio

**UVB** – Ultravioleta B

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01	Representação esquemática da estrutura da pele.....	18
Figura 02	Ilustração do melanoma, carcinoma basocelular e carcinoma epidermóide.....	21
Figura 03	Carcinoma basocelular a) Ilustração do Carcinoma basocelular b) Paciente com Carcinoma basocelular.....	24
Figura 04	Tipos de apresentação dos Carcinomas basocelular – a) CBC nódulo-ulcerativo; b) CBC pigmentado; c) CBC superficial; d) CBC esclerodermiforme; e) CBC fibroepitelioma.....	25
Figura 05	Pacientes com Carcinomas basocelular avançados (a, b, c, d).....	26
Figura 06	Estrutura química da quitosana.....	32
Figura 07	Interação iônica entre a quitosana e o TPP.....	36
Figura 08	1Comparação dos perfis de liberação de um fármaco resultantes da administração de um sistema convencional por dose única, várias doses e de um sistema de liberação controlada.....	38
Figura 09	Classificação da liberação controlada de fármaco e suas principais vias de administração.....	41
Figura 10	Esquema que representa as vias de permeação do fármaco através do estrato córneo, isto é, através dos corneócitos e da matriz lipídica intercelular – via transcelular, e via da matriz lipídica entre os corneócitos – via intercelular.....	45
Figura 11	Estrutura química da Colchicina.....	48
Figura 12	Ação dos fármacos nos microtúbulos. a) Alcalóides da vinca; b) Colchicina; c) Paclitaxel.....	50
Figura 13	Fluxograma da metodologia empregada.....	52
Figura 14	Difratograma de DRX da amostra de quitosana utilizada como padrão neste trabalho em comparação com o difratograma da colchinha na forma de comprimido.....	57
Figura 15	Difratogramas de DRX das membranas de quitosana/colchicina sem reticulação e reticuladas em soluções com diferentes concentrações de TPP.....	58
Figura 16	Espectros de FTIR da quitosana e colchicina comprimido.....	60
Figura 17	Espectros de FTIR das membranas de quitosana/colchicina sem e reticuladas.....	61

Figura 18	Microscopia Ótica da membrana de quitosana nos aumentos de a) 350x e b) 1050x.....	62
Figura 19	Microscopia Ótica da membrana de quitosana/colchicina sem reticulação nos aumentos de a) 350x e b) 1050x.....	63
Figura 20	2 Microscopia Ótica da membrana de quitosana/colchicina reticulada com solução de 1% de TPP nos aumentos de a) 350x e b) 1050x.....	63
Figura 21	Microscopia Ótica da membrana de quitosana/colchicina reticulada com solução de 2,5% de TPP nos aumentos de a) 350x e b) 1050x.....	64
Figura 22	Microscopia Ótica da membrana de quitosana/colchicina reticulada com solução de 5% de TPP nos aumentos de a) 350x e b) 1050x.....	65
Figura 23	MEV da membrana apenas de quitosana nos aumentos de a) 200x, b) 1000x e c) 300.....	66
Figura 24	MEV da membrana de quitosana/colchicina sem reticulação nos aumentos de a) 200x, b) 1000x e c) 3000x.....	66
Figura 25	MEV da membrana de quitosana/colchicina reticulada com solução de 1% de TPP nos aumentos de a) 200x, b) 1000x e c) 3000x.....	67
Figura 26	MEV da membrana de quitosana/colchicina reticulada com solução de 2,5% de TPP nos aumentos de a) 200x, b) 1000x e c) 3000x.....	68
Figura 27	MEV da membrana de quitosana/colchicina reticulada com solução de 5% de TPP nos aumentos de a) 200x, b) 1000x e c) 3000x.....	68
Figura 28	EDS das membranas a) quitosana/colchicina sem reticulação, b) quitosana/colchicina reticulada com solução de 1% de TPP, c) quitosana/colchicina reticulada com solução de 2,5% de TPP e d) quitosana/colchicina reticulada com solução de 5% de TPP.....	69
Figura 29	Resultados do Ensaio de Tensão Superficial das membranas de quitosana e quitosana/colchicina, com e sem reticulação.....	70
Figura 30	Cromatogramas das soluções-padrão da colchicina (Rosa) e quitosana (Preto) obtido por CLAE-UV a 245 nm.....	71
Figura 31	Cromatogramas da membrana de quitosana/colchicina sem reticulação nos tempos de a) 30 min, b) 3 hs, c) 20 hs e d) sobreposição dos gráficos para comparação dos resultados 30 min (rosa), 3 hs (azul) e 20 hs (preto).....	72
Figura 32	Cromatogramas da membrana de quitosana/colchicina sem reticulação nos tempos de a) 30 min, b) 3 hs, c) 20 hs e d) sobreposição dos gráficos para comparação dos resultados 30 min (rosa), 3 hs (azul) e 20 hs (preto).....	73

Figura 33	Cromatogramas da membrana de quitosana/colchicina sem reticulação nos tempos de a) 30 min, b) 3 hs, c) 20 hs e d) sobreposição dos gráficos para comparação dos resultados 30 min (rosa), 3 hs (azul) e 20 hs (preto) .....	74
Figura 34	Resultados do ensaio de citotoxicidade para as membranas de quitosana e quitosana/colchicina sem reticulação.....	75

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>Geral</b> .....	<b>16</b>
<b>2.2</b>	<b>Específicos</b> .....	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1</b>	<b>Histologia da pele</b> .....	<b>17</b>
<b>3.2</b>	<b>Câncer de Pele – Carcinoma Basocelular (CBC)</b> .....	<b>19</b>
<b>3.3</b>	<b>Biomateriais</b> .....	<b>30</b>
<b>3.4</b>	<b>Quitosana</b> .....	<b>32</b>
<b>3.5</b>	<b>Liberação Controlada de Fármaco</b> .....	<b>37</b>
<b>3.6</b>	<b>Sistemas Poliméricos de Liberação de Fármacos</b> .....	<b>40</b>
<b>3.7</b>	<b>Sistemas de Liberação Transdérmica</b> .....	<b>42</b>
3.7.1	Vias de Permeação do Fármaco .....	45
3.7.1.1	<i>O Folículo como sítio de ação de fármacos</i> .....	47
<b>3.8</b>	<b>Liberação controlada a partir de filmes</b> .....	<b>47</b>
<b>3.9</b>	<b>Colchicina</b> .....	<b>48</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>52</b>
<b>4.1</b>	<b>Local da Pesquisa</b> .....	<b>52</b>
<b>4.2</b>	<b>Materiais</b> .....	<b>52</b>
<b>4.3</b>	<b>Métodos</b> .....	<b>52</b>
4.3.1	Preparação da solução e membrana de quitosana .....	53
4.3.2	Preparação da solução e membrana de quitosana/colchicina .....	53
4.3.3	Reticulação das membrana de quitosana e quitosana/colchicina em TPP .....	53
<b>4.4</b>	<b>Caracterizações</b> .....	<b>53</b>
4.3.1	<i>Difração de Raios X (DRX)</i> .....	54
4.3.2	<i>Espectroscopia da Região de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i> .....	54
4.3.3	<i>Microscopia Óptica (MO)</i> .....	54
4.3.4	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i> .....	54
4.3.5	<i>Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDS)</i> .....	55
4.3.6	<i>Molhabilidade de Ângulo de Contato</i> .....	55

4.3.7	<i>Ensaio de Liberação Controlada de Fármaco</i> .....	55
4.3.8	<i>Ensaio de Citotoxicidade</i> .....	56
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>5.1</b>	<b>Difração de Raios X (DRX)</b> .....	<b>57</b>
<b>5.2</b>	<b>Espectroscopia da Região de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</b> .....	<b>59</b>
<b>5.3</b>	<b>Microscopia Óptica (MO)</b> .....	<b>62</b>
<b>5.4</b>	<b>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</b> .....	<b>65</b>
<b>5.5</b>	<b>Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDS)</b> .....	<b>69</b>
<b>5.6</b>	<b>Molhabilidade de Ângulo de Contato</b> .....	<b>70</b>
<b>5.7</b>	<b>Ensaio de Liberação Controlada de Fármaco</b> .....	<b>71</b>
5.7.1	<i>Desenvolvimento do método para identificação da colchicina</i> .....	71
5.7.2	<i>Avaliação da colchicina nas membranas</i> .....	72
<b>5.8</b>	<b>Ensaio de Citotoxicidade</b> .....	<b>74</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>76</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>78</b>

## 1 INTRODUÇÃO\*

A quitosana é um biomaterial polimérico emergente com grande aplicação nas áreas farmacêutica e biomédica, nomeadamente em sistemas de libertação controlada de fármacos e regeneração de tecidos. Entre os fatores motivadores deste interesse incluem-se a grande abundância da quitosana, potenciando um recurso natural economicamente atrativo e a presença de um conjunto de propriedades químicas e biológicas de elevada utilidade para áreas específicas (MOURA, 2012).

É um polissacarídeo natural que pode ser obtido de carapaças de crustáceos, agrega várias características que o tornam um suporte ideal para imobilização de certos organismos. Destaca-se sua biodegradabilidade, lipofilicidade, capacidade de formar gel e microesferas, além de poder ser reticulado (CARVALHO et. al, 2006).

Isto nos mostra a potencialidade da utilização de biomateriais poliméricos veiculando fármacos com libertação controlada, inclusive para doenças oncológicas, no qual destacamos o Carcinoma basocelular por sua alta incidência, fazendo parte da maioria dos novos casos de cânceres não melanoma estimada em 2014 de 98.420 homens e 83.710 mulheres no Brasil (INCA, 2014), leva-nos a buscar alternativas terapêuticas eficazes e com menores efeitos colaterais.

O Câncer de pele tem distribuição universal e costuma apresentar-se sob três formas principais: melanoma, carcinoma basocelular e carcinoma espinocelular. Os carcinomas basocelular e espinocelular são também conhecidos como cânceres não melanoma, sendo o Carcinoma basocelular, em ambos os sexos, o câncer mais comum no Brasil, portanto um importante problema de saúde pública (INCA, 2014).

Em geral, o Carcinoma basocelular tem bom prognóstico, com altos índices de cura se tratados de forma precoce e adequada. Contudo, se negligenciado é mais provável que seja localmente agressivo, destruindo tecidos adjacentes, provocando mutilações, deformações, podendo até dar metástases (GOLDENBERG, 2013). Tratar casos com Carcinomas basocelular recorrentes, múltiplos, metastáticos e associados a síndromes vem sendo um grande desafio para a classe médica, visto que as modalidades terapêuticas disponíveis até o momento ou são contraindicadas ou ineficazes ou de custo muito elevado.

O tratamento medicamentoso antitumoral mais eficaz, indicado e aprovado pelo FDA a partir de 2012, para adultos com Carcinoma basocelular localmente avançado, metastáticos e casos com contraindicação para cirurgia e radioterapia, é o Vismodegib (GDC – 0449). É uma droga com efeitos colaterais menores, quando comparados a outras drogas quimioterápicas já usadas para Carcinoma basocelular avançado (GOLDENBERG, 2013), porém com custo extremamente elevado.

A Colchicina, alcaloide isolado do *Colchicum autumnale* L., é classicamente usada no tratamento da Gota, e recentemente foi descoberta sua ação antimitótica, por sua ação nos microtúbulos, a semelhança dos quimioterápicos da classe dos taxanos. Porém até o momento nenhum uso significativo em terapias anticancerígenas foi estabelecido, devido a toxicidade apresentada (BRANDÃO, 2010).

A utilização do fármaco por via transdérmica oferece vantagens em diversas circunstâncias quando comparada às outras vias de administração. O metabolismo de primeira passagem hepática, comum para fármacos administrados pela via oral, é o responsável por diminuir a biodisponibilidade e degradar diversos fármacos. Essa via impede que esse efeito de primeira passagem hepática ocorra (JALÓN et al., 2000; BORTOLON et al., 2008).

Além disso, alguns efeitos indesejáveis no estômago, como ocorrem com antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) administrados pela via oral, podem gerar efeitos secundários, como náuseas, dispepsia, diarreia, constipação, ulceração e sangramento na mucosa, o que não ocorre pela via transdérmica (JALÓN et. al, 2000; BORTOLON et. al, 2008). Ademais, a via transdérmica oferece vantagem sobre a via intravenosa e intramuscular por ser indolor e não invasiva, aumentando a adesão do paciente à terapia (SWART et. al, 2005; OZGÜNEY et. al, 2006; BADRAN et. al, 2009).

Por isso, o presente trabalho sugere uma alternativa para o controle das formas graves do carcinoma basocelular, através da produção de um filme de quitosana dopado de colchicina substância sabidamente antimitótica e com evidência clínica já citada na literatura no carcinoma basocelular (ABREU, 2008), por via transdérmica por liberação controlada da droga que permita mantê-la em um nível sérico contínuo, suficiente para sua ação antimitótica, causando morte seletiva das células tumorais, diminuindo ou extirpando esses tumores, com custos mais



acessíveis, pois é uma droga de baixo custo, melhorando conseqüentemente a morbidade da doença e a qualidade de vida destes pacientes.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Desenvolver filmes de quitosana, de aplicação transdérmica, para uso em sistema de liberação controlada de colchicina.

### **2.2 Específicos**

- Estabelecer as variáveis de processamento para obtenção de filmes de quitosana para o uso em sistema de liberação controlada de colchicina;
- Identificar as variáveis via reticulação química para controlar a taxa de liberação do fármaco;
- Avaliar físico-quimicamente a incorporação da colchicina nos filmes de quitosana;
- Desenvolver material com tecnologia nacional e de baixo custo.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Histologia da pele

A pele é o manto que reveste todo o organismo, indispensável à vida e que isola os componentes orgânicos do meio exterior. É composta de uma estrutura complexa de tecidos de naturezas variadas, dispostos e inter-relacionados de modo a adequar-se de maneira harmônica ao desempenho de suas funções. A pele representa ao mesmo tempo uma barreira protetora e o principal órgão de comunicação com o exterior. Esta barreira biológica é composta de três camadas: a epiderme, a derme e o tecido subcutâneo (LOURENÇO, 2006).

A epiderme é essencialmente dividida em duas partes: a parte mais interna, que corresponde à epiderme viável (150 $\mu$ m) (HOUK et. al, 1988) e o estrato córneo, que constitui a parte mais externa. A epiderme viável é subdividida em quatro subcamadas: estrato lúcido, estrato granuloso, estrato espinhoso e estrato germinativo, sendo responsável pela multiplicação e diferenciação de células, que dão origem às células do estrato córneo. O estrato córneo é a camada mais superficial da epiderme (5 a 8  $\mu$ m, chegando excepcionalmente a 20 $\mu$ m). Mais de 90% de suas células são corneócitos (CEVC, 2004).

Os corneócitos são células achatadas, anucleadas e preenchidas com queratina. Nos mamíferos estes corneócitos estão distribuídos em aproximadamente quinze camadas e encontram-se associados com numerosos desmossomas (CEVC, 2004). Entre os corneócitos há uma grande quantidade de material lipídico, altamente organizado, que funciona como um “cimento” extracelular, vedando os espaços entre as células. Estes lipídeos compreendem ácidos graxos livres, colesterol, ésteres de colesterol e ceramidas (CEVC et al., 1996).

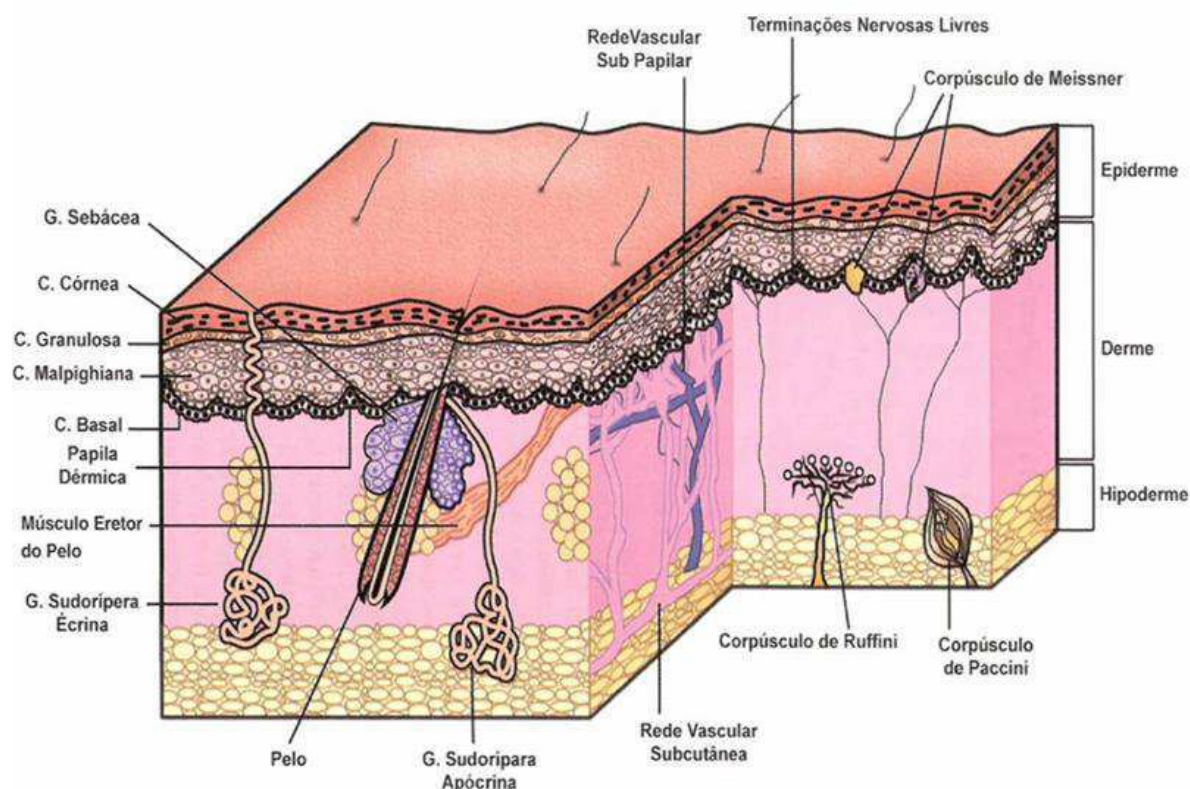
A qualidade, a quantidade e a cristalinidade dos lipídeos do estrato córneo determinam a perfeição da barreira da pele (CEVC, 2004). A camada córnea constitui a principal barreira para a passagem de solutos e, juntamente com a matriz lipídica, possui grande importância nos estudos de permeabilidade da pele (ABRAHAM et al., 1995).

A derme (2mm), camada vascularizada da pele (RAMOS, SILVA, 2010), é um tecido conectivo composto de fibras colágenas, elásticas, reticulina e da substância fundamental, que dá suporte aos vasos sanguíneos, linfáticos e às células nervosas.

Os apêndices cutâneos (os folículos pilosos, as glândulas sebáceas e as glândulas sudoríparas) originam-se na derme e estendem-se até a superfície da pele. Na derme estão presentes também os fibroblastos (células responsáveis pela produção da substância fundamental e pelas fibras) e as células de defesa. O transporte de solutos nesta área é rápido, podendo atingir a circulação sistêmica, através dos vasos sanguíneos (LOURENÇO, 2006).

O tecido subcutâneo está localizado abaixo da derme e constitui-se num tecido fibrilar, contendo células adiposas que desempenham papel de proteção mecânica, de conservação da temperatura corporal e de reserva de calor. Não possui um papel na absorção percutânea, porque se situa abaixo do sistema vascular, localizado na derme (SINGH, 1993). A estrutura anatômica da pele está representada na Figura 01.

Figura 01 - Representação esquemática da estrutura da pele.



Fonte - Sampaio; Rivitti, (2001).

A via cutânea é uma alternativa para aquelas drogas potencialmente tóxicas quando administrada por outras vias, para terapias prolongadas e de substituição. As drogas aplicadas sobre a pele, sobre um sítio bem definido, permitindo o fármaco

se difundir desde o estrato córneo até a hipoderme e entrar na corrente sanguínea produzindo um efeito sistêmico.

A pele é um importante órgão na clínica de várias doenças, como exemplo o câncer de pele, ou condições benignas que afeta principalmente ou primariamente outros órgãos do corpo humano.

### **3.2 Câncer de pele – Carcinoma Basocelular (CBC)**

O Brasil vem sofrendo mudanças em seu perfil demográfico, consequência, entre outros fatores, do processo de urbanização populacional, da industrialização e dos avanços da ciência e da tecnologia. A essas novas características da sociedade brasileira, unem-se os novos estilos de vida e a exposição, ainda mais intensa, a fatores de risco próprios do mundo contemporâneo. Esse processo de mudança demográfica, denominado de “envelhecimento” da população, associado à transformação nas relações entre as pessoas e seu ambiente, trouxe uma alteração importante no perfil de morbimortalidade, diminuindo a ocorrência das doenças infectocontagiosas e colocando as doenças crônico-degenerativas, incluindo os cânceres (neoplasias), como novo centro de atenção dos problemas de doença e morte da população brasileira (INCA, 2014). Tradicionalmente, a eficácia terapêutica é avaliada, em pesquisa oncológica, por parâmetros biomédicos, como diminuição do tumor, intervalo livre de doença e toxicidade. Mas os resultados do tratamento do câncer precisam também ser medidos em termos do que ele traz de limitações físicas e psicológicas ao paciente. Daí, a necessidade de se estabelecer o impacto da doença, e do seu tratamento, sobre a qualidade de vida do doente. Em estudos experimentais, a inclusão da avaliação de resultados, em termos de qualidade de vida, aumenta a informação sobre a evolução da doença e a toxicidade dos tratamentos. A qualidade de vida pode se constituir em um fator prognóstico (KLIGERMAN, 1999).

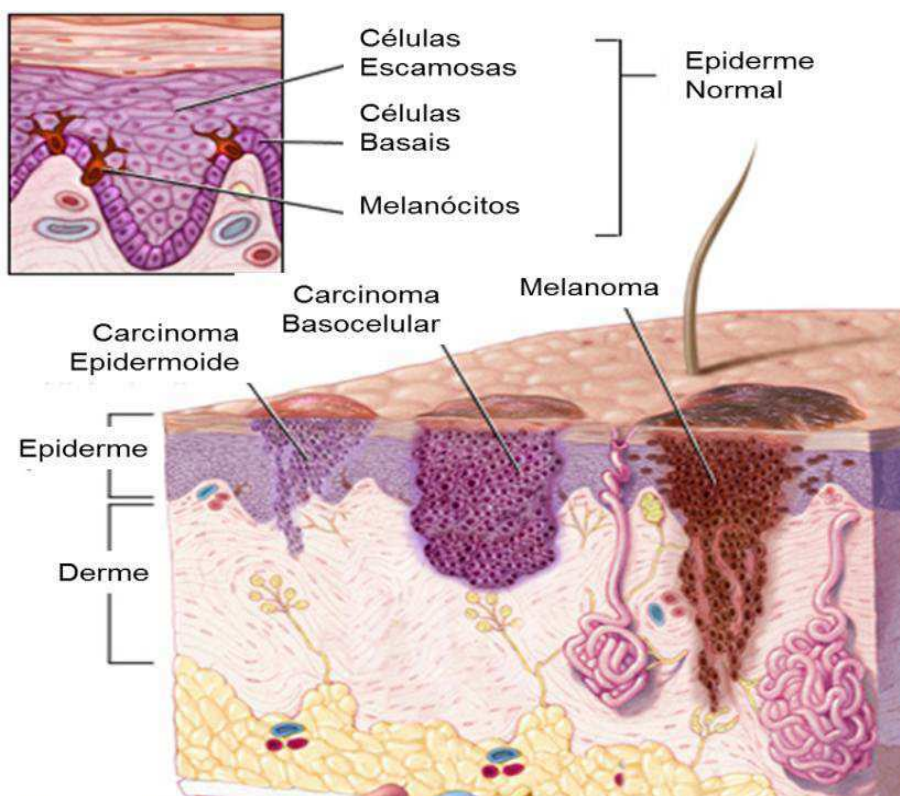
O câncer é uma enfermidade caracterizada por crescimento desordenado e descontrolado de algumas células capazes de invadir outros tecidos, atualmente, está relacionada ao termo neoplasia maligna. O câncer é uma doença que envolve mudanças dinâmicas no genoma da célula. As ideias contemporâneas sobre carcinogênese mostram uma série de mudanças genéticas e epigenéticas, que conferem uma vantagem seletiva de crescimento sobre as células normais (LAIRD,

2003) (MARTINEZ, 2006). A ocorrência dessas alterações está envolvida com ganho de função, quando acometem oncogenes, perda de função, se os genes-alvo forem os genes supressores de tumor, e comprometimento da manutenção da integridade genômica, quando essas alterações afetam os genes de reparo do DNA. Assim, as alterações tanto genéticas quanto epigenéticas promovem a instabilidade da homeostase celular (BIRD, 2002) (LAIRD, 2003). Pode afetar pessoas de todas as idades, mas o risco para a maioria dos tipos de câncer aumenta com a idade. Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Por exemplo, existem diversos tipos de câncer de pele porque a pele é formada de mais de um tipo de célula. Se o câncer tem início em tecidos epiteliais como pele ou mucosas ele é denominado carcinoma. Devido à relativa semelhança entre células malignas e normais do corpo, o grande desafio para o tratamento de cânceres é a distinção entre estas células (BRANDÃO, 2010).

As neoplasias constituem a segunda maior causa de morte no mundo, perdendo apenas para as doenças do aparelho circulatório. Em países como o Brasil, as neoplasias conduzem às altas taxas de mortalidade, devido ao fato de serem diagnosticadas em estágios avançados (BARROS, 2000). No Brasil, a estimativa para o ano de 2014, que será válida também para o ano de 2015, aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. O câncer de pele do tipo não melanoma (182 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil) (INCA, 2014).

O câncer de pele tem distribuição universal e costuma apresentar-se sob três principais formas: melanoma, carcinoma basocelular e carcinoma espinocelular (ou epidermoide) representada na Figura 02. Os carcinomas basocelular e epidermoide são também conhecidos como câncer de pele não melanoma, tipo mais frequentes de câncer de pele e câncer mais frequente na população de pele clara (INCA, 2014).

Figura 02– Ilustração do melanoma, carcinoma basocelular e carcinoma epidermoide.



Fonte – Adaptado de Mayo, (2011).

Os cânceres de pele não melanoma são os mais frequentes, e destes o Carcinoma basocelular é tumor maligno mais frequente do mundo, chegando a ser quatro vezes mais comum que o Carcinoma espinocelular (RAMOS-E-SILVA, 2010). Os cânceres cutâneos não melanoma correspondem a 40% de todas as lesões malignas, com mais de um milhão de casos novos por ano. Incluem-se nesses dados diferentes tumores malignos, sendo o carcinoma basocelular e o carcinoma espinocelular os mais freqüentes com 75% e 20% dos casos, respectivamente (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014).

No Brasil, o câncer de pele não melanoma é o tumor mais incidente em ambos os sexos. A estimativa de casos novos de câncer de pele não melanoma nos homens é de 98.420 e nas mulheres é de 83.710 em 2014. Esses valores correspondem a um risco estimado de 100,75 casos novos a cada 100 mil homens e 82,24 a cada 100 mil mulheres (INCA 2014).

O câncer de pele não melanoma é o mais incidente em homens nas regiões Sul (159,51/ 100 mil), Sudeste (133,48/ 100 mil) e Centro-Oeste (110,94/ 100 mil). Nas regiões Nordeste (40,37/ 100 mil) e Norte (28,34/ 100 mil), encontra-se na segunda posição. Nas mulheres, é o mais frequente em todas as regiões, com um

risco estimado de 112,28/ 100 mil no Sudeste, 99,31/ 100 mil no Centro-Oeste, 86,03/ 100 mil no Sul, 46,68/ 100 mil no Nordeste e 24,73/ 100 mil no Norte (INCA, 2014).

O Carcinoma basocelular é tumor epidérmico, com crescimento lento e invasibilidade local, que afeta mais frequentemente os caucasianos. Tende a infiltrar os tecidos por contiguidade, de forma tridimensional e irregular, com extensões subclínicas digitiformes (RAMOS-E-SILVA, 2010). As metástases são raras 0,0028% a 0,5% (LARA et. al, 2001), e a morbidade está relacionada à invasão e destruição tecidual local, principalmente na cabeça e pescoço (60% a 80% dos carcinomas basocelular) (STERN, 1999). É mais frequente em homens, apesar de um aumento significativo nas mulheres nos últimos anos, e sua incidência aumenta com a proximidade dos trópicos e com a idade, sendo a idade média em torno de 69 anos. Tem mortalidade baixa na ordem de 0,05 a 0,08 / 100.000 habitantes (HAMUKSELA et. al, 1999).

A exposição à radiação ultravioleta de forma intermitente é o principal fator causador do carcinoma basocelular (WONG, 2003). Outros fatores de risco incluem: Características fenotípicas como: pessoas de pele clara (tipos de pele I e II de Fitzpatrick) com dificuldade de bronzear e queima fácil, presença de sardas, olhos azuis, cabelos loiros ou ruivos; Queimadura solar; História prévia de tratamento com radioterápicos, PUVA, exposição a substâncias carcinogênicas (arsênio, organofosforados e coaltar); Pacientes imunossuprimidos; Herança genética (GOLDENBERG, 2013). Com relação ao cigarro, embora não existam evidências indiscutíveis, alguns trabalhos relacionam o tabagismo a carcinomas basocelulares com mais de 1cm de diâmetro (SMITH, 2001). Mesmo existindo esses múltiplos fatores de risco, hoje o maior destaque na patogênese do Carcinoma basocelular são as alterações genéticas (WALLS ET AL, 2014).

A etiologia do CBC é multifatorial, com componentes extrínsecos (Meio Ambiente) e intrínsecos (Fatores do hospedeiro), que influenciam o aparecimento do tumor. O componente ambiental de maior importância é a radiação ultravioleta (UV) que é absorvida pelo DNA celular, onde determina alterações, sobretudo nas bases pirimidínicas, levando a formação de dímeros, que desestabiliza genes importantes envolvidos no controle do ciclo celular (TELFER, 2008). As células que dão origem ao CBC são as células da camada basal da epiderme e provavelmente células pluripotentes dos folículos pilosos (LI, 2014). Estudos apontam a origem do CBC dos



folículos pilosos, pois já se isolou citrulina em células tumorais, além da constatação da dependência de seu estroma para crescimento das células tumorais (HOLMES, 1968) (ASADA, 1993).

Nos últimos 25 anos houve um grande avanço no entendimento das bases moleculares da carcinogênese e da progressão tumoral. O aprofundamento do entendimento da pato-biologia e genética do câncer tem fornecido ferramentas importantes para o diagnóstico molecular e monitoramento da doença e já proporcionou a identificação de diversos alvos terapêuticos. Um dos grandes desafios atuais é o desenvolvimento de drogas alvo-específicas capazes de eliminar a célula tumoral sem causar danos às células normais ou que possam ser usadas em associação a terapias convencionais para aperfeiçoá-las (RÜNGER, 2008) (LI, 2014).

A genética molecular do CBC foi conhecida através de estudos da Síndrome do Nevo Basocelular, onde foi revelado anomalia do gen PTC, que se localiza no braço longo do cromossomo 9 (9q22), causado por heterozigocidade nesse locus e inativação dele ou mutação sofrida pela radiação UVB. Esse gen é supressor tumoral e ele codifica a proteína p53 (LEFFELL, 1999) (GAILANI,1997) (JONHSON, 1996) (SALDANHA, 2001) (BALE, 2001).

O processo de tumorigênese envolve basicamente duas categorias de genes: os oncogenes e os genes supressores tumorais. Os genes considerados oncogenes presentes na via de sinalização celular Hedgehog e envolvidos na carcinogênese do CBC são: gene SMO, Gli1, CDKN2A, TP53, PTCH, SUFU (HEITZER, 2007).

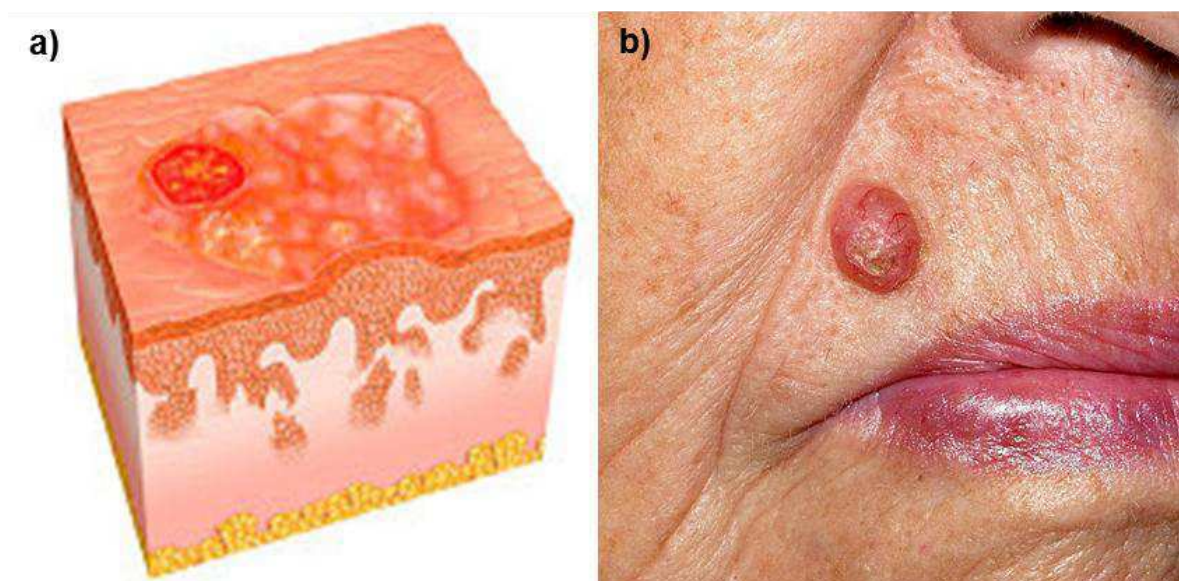
Nas últimas décadas estudos mostraram que o fenômeno epigenético está envolvido em vários processos biológicos: desenvolvimento embrionário, compensação de dose, regulação da expressão gênica e estabilidade genômica (BAYLIN,1986) (JAIN, 2003). Outra contribuição do estudo epigenético é a de propor mudanças na forma de compreender a perda do controle dos processos biológicos que culminam em neoplasias (BAYLIN, 2005). O fenômeno epigenético pode ser definido como mudança no material genético, que altera a regulação da expressão gênica de maneira herdada pelas células somáticas e, algumas vezes, também pelas da linhagem germinativa, porém ele não é caracterizado como mutação, pois não envolve mudança na sequência de DNA (LAIRD, 2005). Dentre as alterações epigenéticas que consistem na mudança de padrão epigenético, ou seja, modificações bioquímicas relacionadas com a modulação da informação genética

são listadas: acetilação, fosforilação, metilação e ubiquinação de histonas e metilação do DNA (LI, 2002). A via de sinalização celular Hedgehog tem importante papel na diferenciação, polaridade, proliferação celular e carcinogênese. Esta via encontra-se alterada em alguns tipos de cânceres, em especial no CBC (CIRRONE, 2012).

Outras alterações também já foram encontradas como trissomia do cromossomo 6 (NANGIA, 2001); presença de microfilamentos de actina de miofibroblastos, responsáveis pela motilidade celular, foram encontrados no estroma circunjacente e nas células basalóides da periferia dos ninhos tumorais de CBC, o que possivelmente justifique a sua invasão tumoral, principalmente nas formas esclerodermiforme e micronodular (DE ROSA, 1994).

Os carcinomas basocelulares acometem geralmente pessoas de pele clara com idade superior a 50 anos, havendo predileção pelo sexo masculino. Costumam apresentar desde o início borda ligeiramente elevada, lisa e brilhante, assemelhando-se a uma pérola (Figura 03). Essa borda perolada constitui o sinal clínico mais marcante desse tipo de tumor. Iniciando como pequeno nódulo, pode ulcerar ou escoriar depois de algum tempo, dando origem a uma das formas clínicas mais comuns - a chamada forma nódulo-ulcerativa (MACKIE, 1998).

Figura 03 – Carcinoma basocelular a) Ilustração do carcinoma basocelular e b) paciente com carcinoma basocelular.



Fonte – Adaptado Hamuksela et al., (1999).

Os carcinomas basocelulares podem ser classificados em cinco tipos (KIRKHAM,1997) como representado na figura 04:

- nódulo-ulcerativo
- pigmentado
- esclerodermiforme ou fibrosante
- superficial
- fibroepitelioma

Figura 04 – Tipos de apresentação dos Carcinomas basocelular – a) CBC nódulo-ulcerativo; b) CBC pigmentado; c) CBC superficial; d) CBC esclerodermiforme; e) CBC fibroepitelioma.



Fonte – Próprio autor.

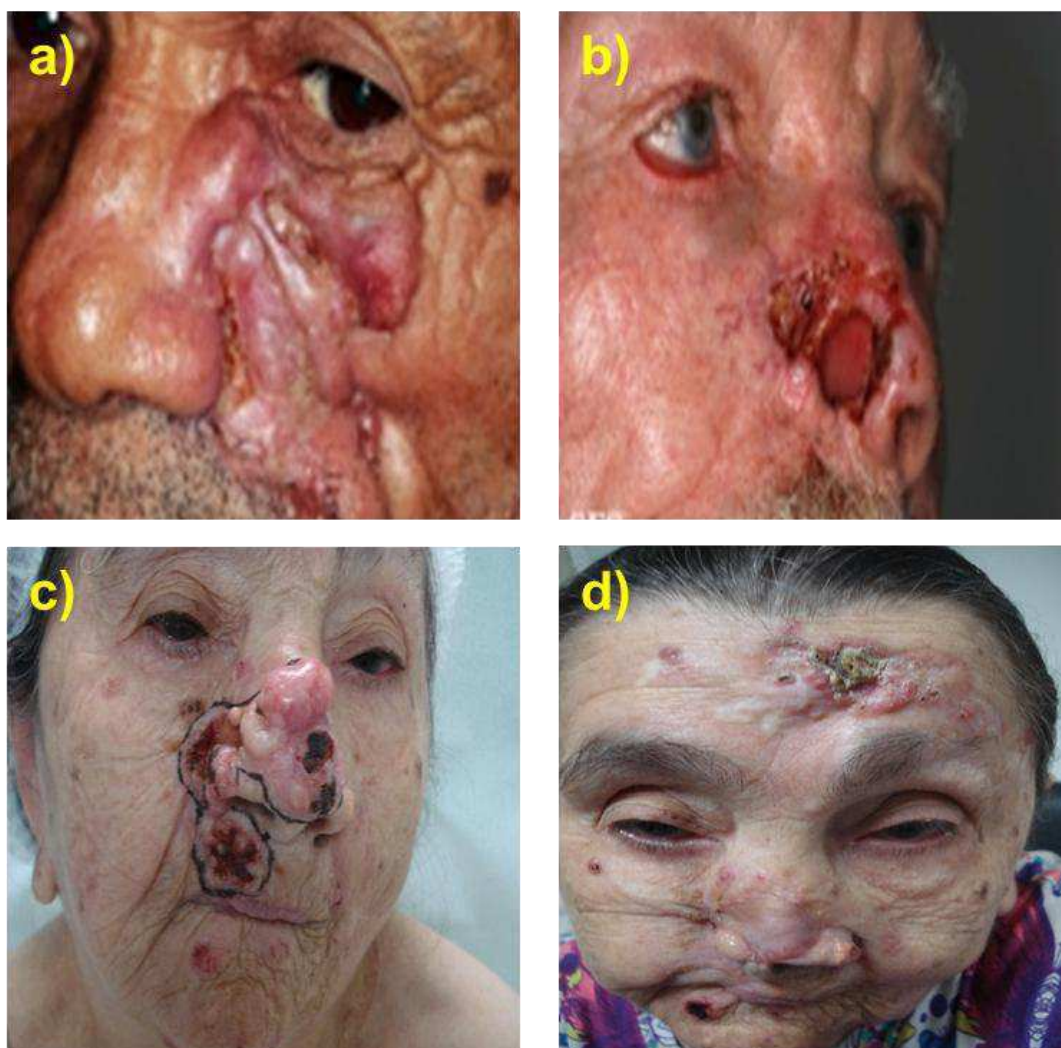
A localização mais frequente desses tumores é face e região cervical, mas pode aparecer em qualquer parte do corpo, raramente em palmas e plantas (8 casos apenas foram relatados até o momento não associado a Síndrome de Gorlin) (SALOMÃO, 1999).



O diagnóstico é fundamentalmente clínico, porém, em muitos casos o exame histopatológico deverá ser realizado para confirmar o tumor e seu subtipo, uma vez que isto definirá o prognóstico desta neoplasia e programação adequada do seu tratamento. Outros exames podem ser úteis em casos mais específicos como a Dermatoscopia, Microscopia Confocal a Laser próximo do Infravermelho e Citologia esfoliativa (RAMOS-E-SILVA, 2010).

Quanto à evolução, geralmente tem comportamento benigno, crescimento lento e assintomáticos (KOPKE, 2002). Porém, alguns se comportam de forma mais agressivas, infiltrando, destruindo tecidos adjacentes, provocando mutilações e deformações e, portanto reduzindo muito a qualidade de vida destes pacientes (GOLDENBERG, 2013). Formas apresentadas na Figura 05.

Figura 05 – Pacientes com Carcinomas basocelular avançados (a, b, c, d).



Fonte – Clínica Dermatológica Santa Catarina (2013).

Esses tumores podem ser classificados em primários, recidivados, metastáticos e ligados a síndromes, ou de acordo com seu tamanho, localização e morfologia clínica e histológica, pelo qual é escolhido o tratamento mais adequado. Chama atenção os tumores acima de 1 cm, àqueles localizados em região retroauricular, nasal, perinasal, periorbital, peripalpebral e couro cabeludo e os tipos histológicos esclerodermiforme, infiltrativo, micronodular ou basoescamoso, pois são mais propensos a recidivas pela dificuldade técnica em dar margens de segurança no tratamento cirúrgico (RASSENER, 1993) (LANG, 1991). Os fatores associados à alta recorrência incluem: Tipo histológico esclerodermiforme, infiltrativo, micronodular ou basoescamoso; Tamanho e profundidade do tumor; Localização do tumor centrofacial, nariz, orelhas ou couro cabeludo; Bordas do tumor pouco definidas; Envolvimento perineural ou vascular; Recorrência apesar de tratamento; Positividade de margens cirúrgicas; Idade avançada e Sexo masculino (BOGELUND,2007).

Os Carcinomas basocelulares metastáticos são raros, e ocorrem mais pela via linfática do que hematogênica (SOVER, 1993), e geralmente em tumores acima de 5 cm e evolução com mais de 5 anos (SNOW, 1994).

São vários os métodos terapêuticos, excisionais ou destrutivos, que podem ser utilizados para o tratamento do carcinoma basocelular. O tratamento desses tumores é amplamente baseado no risco deles recidivarem ou progredirem para doença avançada. Para tanto, dois aspectos são extremamente relevantes na escolha da modalidade terapêutica: condições clínicas do paciente, relacionadas diretamente com as co-morbidades, por exemplo, uso de marcapasso, medicamentos anticoagulantes, dificuldade de locomoção e até mesmo a motivação do paciente a depender principalmente das mutilações que poderá ocorrer de acordo com a localização, extensão e destruição do tumor; e fatores dependentes do tumor propriamente dito, como tamanho, tempo de evolução, tipo histológico e situação se primário ou recidivado (WALLS,2014). Além destes, é importante considerar as complicações, os resultados cosméticos, cuidados pós-tratamento, custo e taxas de recorrência relacionados com a modalidade terapêutica selecionada (RAMOS-E-SILVA, 2010).

Convencionalmente o tratamento de primeira linha dos Carcinomas basocelular de baixo risco é a cirurgia convencional, com alto índice de cura (ABROMOVITS, 2008). A cirurgia é um método rápido e simples, porém é um

método operador-dependente, ou seja, a obtenção dos melhores resultados depende da técnica cirúrgica (FLEISCHER, 2001). Nos Carcinomas basocelular de alto risco os tratamentos cirúrgicos, seja a cirurgia convencional ou a Cirurgia Micrográfica de Mohs, também são os tratamentos de escolha (GOLDENBERG, 2013). Esta última modalidade cirúrgica citada tem os maiores índices de cura, 98% a 99% (ROEW, 1989), entretanto tem suas desvantagens, pois exige treinamento especializado, tem custo elevado, não é feito por planos de saúde, necessita de ambiente hospitalar e abordagem multidisciplinar (KOPKE, 2002).

Além das cirurgias, temos os tratamentos não cirúrgicos para esses tumores que incluem: Radioterapia, Curetagem com Eletrocoagulação, Criocirurgia, Terapia Fotodinâmica (PDT), Farmacoterapia tópica e Terapia Sistêmica (SILVERMAN, 1991) (DAWBER, 1998) (KOPKE, 2002).

Como opção em tumores de baixo risco, porém extensos, multifocal ou em áreas sensíveis temos a radioterapia. Terapia que apresenta efeitos a curto prazo de prurido e alopecia, e a longo prazo de despigmentação, telangiectasias, atrofia e até radionecrose em pele fina (GOLDENBERG, 2013), e taxas de recidiva que variam de 6 a 10% (SILVERMAN, 1991). Sua indicação deve ser considerada opção alternativa para pacientes idosos com pequena expectativa de vida, portadores de tumores extensos e que fossem incapacitados para o tratamento cirúrgico (SILVERMAN, 1992).

A Terapia Fotodinâmica (PDT) é aprovada para CBC superficial, quando a cirurgia ou radioterapia são contraindicadas, na Europa, Austrália, Nova Zelândia e Canadá (BOTTO, 2013). O conceito da PDT é a indução da citotoxicidade das células proliferativas por meio de uma fonte de luz. Para que isso ocorra, são necessários 3 componentes: agente fotossensibilizante, luz e oxigênio. A técnica, em geral, consiste de duas etapas. Na primeira, o agente fotossensibilizante acumula-se nas células tumorais após a administração tópica ou sistêmica. Na segunda, o tumor fotossensibilizado é exposto à luz de comprimento de onda que coincida com o espectro de absorção do agente fotossensibilizante. Durante a PDT, o agente fotossensibilizante ligado ao tumor é ativado na presença de luz. Essa ativação leva-o do estado de repouso ao estado de ativação chamado singlet, de meia vida curta. Nessa etapa, as moléculas podem retornar ao estado de repouso, emitindo energia em forma de fluorescência por meio da liberação de fótons ou progredir na cadeia de reações químicas, até atingir o estado triplet de meia vida

mais longa. As moléculas no estado triplet transferem sua energia diretamente ao oxigênio intracelular, formando o oxigênio singlet ( $^1\text{O}_2$ ), altamente reativo, de meia vida curta e responsável pela morte celular (TOREZAN, 2009). Apesar dos excelentes resultados estéticos e funcionais a longo prazo, sua penetração é de apenas 3 mm, portanto recidivas cerca de 50% (KOPKE, 2002), além do custo elevado.

Na farmacoterapia tópica os medicamentos aprovados pelo FDA são: Imiquimod e 5- fluoruracil, para pequenos tumores superficiais quando o tratamento cirúrgico está contraindicado (MICALI, 2014). Porém, seu uso pode dificultar a delimitação das margens clínicas da lesão, o que prejudica uma abordagem cirúrgica posterior (RAMOS-E-SILVA, 2010).

Atualmente, a quimioterapia (Terapia sistêmica) é a modalidade terapêutica que possui maior incidência de cura de muitos tumores, incluindo os mais avançados, e a que mais aumenta a sobrevida dos portadores de câncer (HERSEY, 1999).

A primeira terapia sistêmica para Carcinoma basocelular, aprovada pelo FDA a partir de 2012, é o Vismodegib (GDC-0449), que age inibindo a via de sinalização hedgehog (WALLS, 2014) (KUDCHADKAR,2012), evidência encontrada em cerca de 83% dos pacientes com CBC esporádico e 100% daqueles com Síndrome de Gorlin. São indicados em carcinomas basocelular metastáticos, localmente avançado, inoperáveis ou não candidatos a radioterapia. É administrado na dose de 150mg/dia. É uma droga com efeitos colaterais menores, quando comparados a outras drogas quimioterápicas já usadas para Carcinoma basocelular avançado como Metotrexato, Bleomicina, Vincristina, 5 Fluoruracil, Ciclofosfamida, Dactomicina, Toiomicina (GANTI,2011).

Já existem estudos de outras populações de Carcinoma Basocelular com Vismodegib, como em Síndrome de Gorlin e CBC localizados no couro cabeludo, tórax, ombro e dorso superior. Tem boas respostas clínicas e histológicas (GOLDENBERG, 2013).

Hoje, a maioria dos estudos e trabalhos estão em busca de novas opções terapêuticas para o Carcinoma basocelular avançado ou metastático baseada no conhecimento molecular da patogênese do CBC, porém ainda são terapias de custos muito elevados. Tendo em vista que a maioria desses pacientes são trabalhadores rurais com intensa exposição solar, e com grande dificuldade a

acessibilidade a serviços especializados, faz-se necessário encontrarmos alternativas terapêuticas mais viáveis.

Apesar da eficácia dos quimioterápicos no tratamento das neoplasias, tais agentes são extremamente tóxicos a qualquer tecido, normal ou canceroso, provocando efeitos colaterais graves aos pacientes, o que diminui a qualidade de vida dos pacientes. Por esse motivo, os sistemas poliméricos de liberação de fármacos antitumorais vêm sendo amplamente investigados como uma alternativa terapêutica ao tratamento das neoplasias. Esses sistemas podem ser implantados diretamente no local de ação, permitindo a liberação controlada e prolongada do agente quimioterápico, minimizando, conseqüentemente, os efeitos colaterais provocados por esses fármacos administrados pelas vias convencionais (CONTRAM, 2000) (FIALHO, 2007) (HERSEY, 1999).

### **3.3 Biomateriais**

A definição mais aceita atualmente acerca de biomateriais é empregada pelo Instituto Nacional Americano de Saúde que descreve biomateriais como sendo "qualquer substância ou associação de substâncias, com exceção de drogas, de origem sintética ou natural, que podem ser usados por qualquer período de tempo, que aumenta ou substitui, parcial ou totalmente, qualquer tecido, órgão ou função do corpo, afim de manter ou melhorar a qualidade de vida do indivíduo" (BERGMAN et al, 2013).

Como característica imprescindível, estes materiais devem ser biocompatíveis, ou seja, devem atender ao requisito de funcionalidade para o qual foram projetados, não estimulando ou provocando o mínimo de reações alérgicas ou inflamatórias (SOARES, 2002).

Os biomateriais podem ser divididos em 3 classes principais de materiais: poliméricos, cerâmicos, e metálicos. Por vezes diferentes classes de materiais podem ser combinadas dando origem aos compósitos, podendo-se nomear como a quarta classe dos biomateriais. Os polímeros representam a maior classe dentre os biomateriais (RATNER et al., 2013).

Polímeros naturais usados como biomateriais são comumente chamados de biopolímeros. Uma grande variedade de biopolímeros vem sendo usada em aplicações biomédicas, graças às características físico-químicas dos polímeros e



sua versatilidade estrutural, que permite adequá-los em termos de propriedades a cada aplicação específica. A possibilidade de alterar um ou outro grupamento químico pertencente à arquitetura macromolecular das cadeias pode viabilizar, por exemplo, o estabelecimento de alguma interação específica entre o biomaterial e o tecido hospedeiro (ORÉFICE et al, 2006). A vida é polimérica na sua essência: os mais importantes componentes de uma célula viva (proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos) são todos polímeros. A natureza usa os polímeros para construção e como parte do complicado mecanismo celular (GALAEV; MATTIASSON, 1999).

Além da função, ou objetivos da formulação e das características do princípio ativo, as propriedades físico-químicas do polímero são fatores de suma importância que determinam sua utilização (PILLAI; PANCHAGNULA, 2001; RIOS, 2005). Essas propriedades são dependentes da natureza química dos monômeros, do processo e da técnica de preparação do polímero, do peso molecular, que depende das condições de polimerização para cada monômero, e da estrutura macromolecular (MANO; MENDES, 1999). As propriedades físicas dos polímeros estão relacionadas à resistência das ligações covalentes, à rigidez dos segmentos na cadeia polimérica e à resistência das forças intermoleculares (MANO; MENDES, 1999). Devido à diversidade inerente das estruturas e exigência do completo entendimento da superfície e propriedades do polímero que podem fornecer as funções químicas, interfacial, mecânica e biológica desejada, a seleção e *design* de um polímero se tornam uma tarefa bastante desafiadora (PILLAI; PANCHAGNULA, 2001).

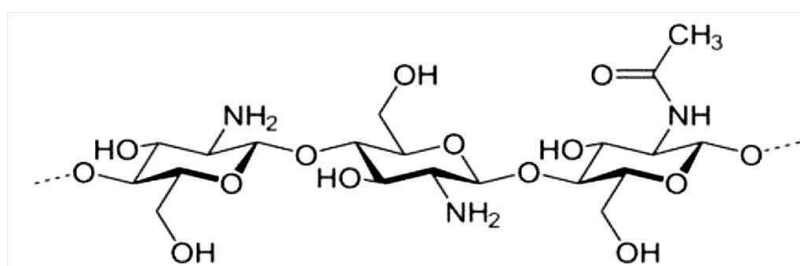
Em relação às propriedades dos polímeros, dois critérios devem ser seguidos na elaboração de uma formulação. Em primeiro lugar, as características químicas do polímero não devem comprometer a ação dos ingredientes ativos; em segundo, as propriedades físicas do polímero devem ser consistentes e reprodutíveis de lote a lote. Depois desses critérios terem sido encontrados, os formuladores devem concentrar-se nas características específicas dos polímeros (RIOS, 2005). Dentre as várias propriedades dos polímeros, algumas se demonstram mais importantes quando na elaboração de um sistema de liberação de fármacos, como a permeabilidade (JACOBS; MASON, 1993), propriedades de superfície como hidrofobicidade, lubrificação, lisura, energia de superfície (ANGELOVA; HUNKELER, 1999), adesão, solubilidade (PILLAI; PANCHAGNULA, 2001) e temperatura de transição vítrea (ZHU, 2002).

O uso de polímeros naturais para aplicações diversificadas, têm sido de vital importância para os avanços das ciências e apresentam várias vantagens como serem de fácil obtenção, serem biocompatíveis e biodegradáveis (AZEVEDO et al, 2007). Os biomateriais poliméricos a base de quitosana constituem uma classe emergente de materiais com grande aplicação nas áreas farmacêutica e biomédica, nomeadamente em sistemas de libertação controlada de fármacos e regeneração de tecidos. Entre os fatores motivadores deste interesse incluem-se a grande abundância da matéria-prima da quitosana, potenciando um recurso natural economicamente atrativo, e a presença de um conjunto invulgar de propriedades químicas e biológicas de elevada utilidade para áreas específicas. O crescente interesse deste biopolímero na área farmacêutica e médica tem gerado oportunidades de desenvolvimento de biomateriais especializados, principalmente através de modificações químicas e físicas da molécula, as quais têm promovido no polímero novas atividades biológicas (MOURA, 2012).

### 3.4 Quitosana

A quitosana (Figura 06) é um polissacarídeo obtido por desacetilação parcial da quitina e, tem sido tradicionalmente usada nos países orientais para o tratamento de queimaduras e cicatrização de feridas (CHANDY et. al, 1993). A quitosana foi isolada em 1859 pelo aquecimento da quitina em solução concentrada de hidróxido de potássio, resultando na sua parcial desacetilação (FREEPONS, 1986). Mas o nome quitosana foi proposto em 1894 por Hoppe Seyler, que verificou que esta substância possuía a quantidade de nitrogênio igual à quitina original (ROBERTS, 1992). A estrutura deste importante polímero apenas ficou totalmente conhecida no ano de 1950 (CAMPANHA FILHO, 2007).

Figura 06 – Estrutura química da quitosana.



Fonte – Azevedo et al., (2007)

A quitosana é um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável, de grande importância econômica e ambiental (AZEVEDO et al, 2007). A quitosana é de interesse comercial, devido à sua elevada percentagem de nitrogênio (6,89%) em comparação com a celulose sinteticamente substituída (1,25%). A quitosana foi produzida industrialmente por volta de 1971, no Japão e EUA, países líderes do mercado mundial deste produto. Por volta de 1993, o Brasil também passou a comercializar quitina e quitosana em larga escala, sendo esta última atualmente comercializada por diversos fornecedores em variados graus de pureza, peso molecular e grau de desacetilação. Dentre as empresas brasileiras que produzem quitosana, duas têm obtido destaque na produção e comercialização destes biopolímeros. São elas: Polymar Indústria Comércio Exportação e Importação, situada em Fortaleza-CE, e Kito Química Fina, localizada em Palhoça-SC (KUMAR, 2000; SANTOS, 2004).

Apresenta em maior proporção, na cadeia polimérica, unidades de - (1-4) - 2 - amino - 2 - desóxi - D glicose e, um menor número de unidades de - (1-4) - 2 acetamido - 2 - desóxi - D - glicose da quitina. Possui semelhança na sua estrutura química com a celulose, porém exibe propriedades diferenciadas devido à presença dos grupos amínicos (Figura 06). Pode ser encontrada naturalmente na parede dos fungos, especialmente nas espécies do gênero *Mucor*, e no exoesqueleto de crustáceos, como o caranguejo e o camarão. Certamente, o parâmetro que diferencia quitosana e quitina é o grau de desacetilação ou grau de acetilação, já que são complementares entre si para o valor de 100% do grau determinado. Esta é uma das características químicas mais importantes, que pode influenciar no desempenho e em diversas aplicações da quitosana. O termo quitosana é usado para identificar a quitina na com mais de 50% dos monômeros na forma desacetilada 50%. Contudo, o correto grau de desacetilação que diferencia a quitina da quitosana não está totalmente definido, ocorrendo divergência entre os autores quanto ao limite de desacetilação que categoriza a quitina ou a quitosana (GOY et al, 2004).

A reação de desacetilação da quitina envolve a remoção dos grupamentos de acetamida (-NHCOCH<sub>3</sub>) que são transformados, em graus variados, em grupos amino (-NH<sub>2</sub>), dando origem à quitosana. A versatilidade da quitosana depende principalmente destes grupos amino altamente reativos. O grau de desacetilação depende principalmente do método de purificação e das condições de reação para

sua obtenção. Portanto, é importante caracterizar a quitosana por meio da determinação do grau de desacetilação antes da sua utilização. Essa caracterização é muito importante, devido à ocorrência no mercado de comercialização indevida de quitina como quitosana (BAXTER et al., 1992).

A quitosana é solúvel em soluções ácidas diluídas formando um polímero catiônico a partir da protonação (adição de prótons) do grupo amino ( $\text{NH}^{3+}$ ), que confere propriedades diferenciadas em relação às fibras vegetais, como a celulose (LARANJEIRA & FÁVERE, 2009; AZEVEDO et al., 2007).

Embora a estrutura da quitosana seja representada como um homopolímero, a operação de desacetilação é raramente completa e a maioria dos produtos comerciais são de copolímeros compostos por unidades repetidas de quitosana e quitina alternadamente (CHANDY et. al, 1993). Os maiores produtores de quitina e quitosana (Estados Unidos e Japão) têm aumentado nos últimos anos a produção desses polímeros naturais em consequência do aumento da sua utilização nas diferentes aplicações, principalmente na indústria de alimentos, quelação de metais e produção de membranas simétricas para separação de gases (EIDEM, 1980).

A prática industrial mais comum, e que também é bastante empregada em laboratórios de pesquisa, é aquela na qual a desacetilação da quitina é realizada em suspensão de solução aquosa de hidróxido de sódio, sendo que a concentração dessa solução, o excesso de álcali, o tempo e a temperatura da reação são variáveis, conforme o procedimento adotado. Assim, não se pode definir uma condição padronizada para a realização dessa reação. Entretanto, é reconhecido que os principais fatores que afetam a eficiência da desacetilação e as características das quitosanas obtidas são: a) temperatura e tempo de reação; b) concentração da solução de álcali e adição de diluente (álcoois de cadeia curta e cetonas são empregadas); c) razão quitina/álcali; d) tamanho das partículas de quitina; e) atmosfera da reação e presença de agentes que evitem a despolimerização (AZEVEDO et al, 2007).

A quitosana se caracteriza por possuir grupos amínicos livres, pela solubilidade em soluções ácidas, insolubilidade em pH superior a 6,5, insolubilidade em  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , baixa solubilidade em  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , insolubilidade em solventes orgânicos e grupos amínicos protonados ( $-\text{NH}^{3+}$ ), solubilidade em pH inferior a 6,5, capacidade de formar soluções viscosas com formação de geleificação com poliânions e de se solubilizar em misturas de água e álcool (MUZZARELLI et. al, 1986). Uma

característica singular da quitosana reside no fato deste heteropolissacarídeo apresentar, dentre todos os biopolímeros naturais, o maior caráter catiônico, uma vez que a maioria dos polissacarídeos animais ou vegetais apresenta caráter neutro (celulose, dextrana, amido) ou aniônico (alginato, carragenina, xantana). Em adição, algumas funções particulares da quitosana estão diretamente relacionadas a seu caráter eletrolítico, inclusive certos procedimentos de reticulação de suas cadeias (GONÇALVES, 2011).

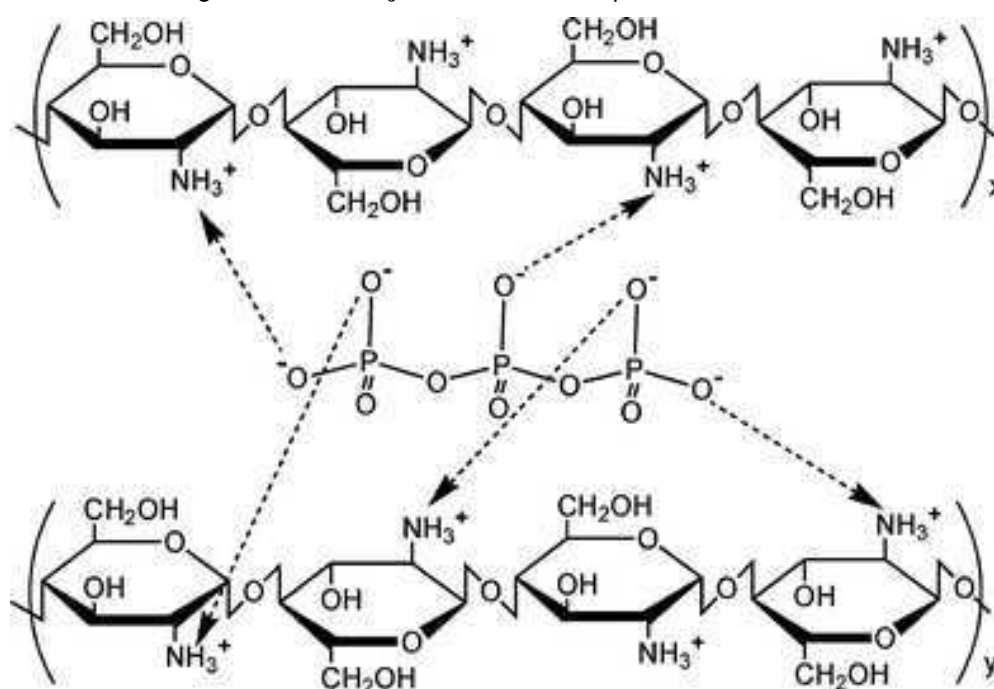
Muitos dos métodos disponíveis na literatura para obtenção de derivados estruturais da quitosana promovem a reticulação das cadeias poliméricas desse biopolímero, estratégia que confere às quitosanas modificadas propriedades atraentes, tais como, maior resistência à dissolução em meio ácido, menor hidrofília, geração de estruturas poliméricas densas ou porosas e redução da reatividade química do material preparado. Frente a essas novas propriedades, aplicações mais específicas podem ser vinculadas à quitosana: fabricação de resinas para extração em fase sólida de íons metálicos, corantes e poluentes orgânicos, desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos e construção de biossensores baseados na imobilização de enzimas ou de células vivas em filmes de quitosana reticulada.

A reticulação das cadeias poliméricas de quitosana ocorre por meio da reação entre sítios reativos específicos presentes nas unidades estruturais da quitosana e alguns reagentes reticulantes. No caso da quitosana, os sítios mais reativos são os grupos amino e hidroxila das unidades de *GlcN* e *GlcNAc*. A elevação do grau de reticulação, reduz a porosidade do material obtido, a permeabilidade à água e a difusão de possíveis substâncias aprisionadas nas redes poliméricas formadas. A maior parte dos processos de reticulação une covalentemente as cadeias poliméricas de quitosana por meio de mecanismos reacionais distintos e dependentes do tipo de agente de entrecruzamento empregado. Essas reações ocorrem unindo de forma permanente sítios reativos de cadeias poliméricas diferentes através de ligações intermoleculares, ou regiões distintas de uma mesma cadeia por meio de ligações intramoleculares. Outra forma de reticular permanentemente a quitosana consiste em realizar reações de reticulação induzidas por um iniciador fotoquímico ativado por luz ultravioleta. A reticulação iônica é um processo reacional muito prático do ponto de vista experimental, uma vez que exige apenas a mistura do agente de entrecruzamento com a quitosana (GONÇALVES,

2011). O tripolifosfato de sódio (TPP) é um agente químico utilizado neste tipo de reticulação da quitosana.

O tripolifosfato de sódio é um ânion multivalente e atóxico que vem sendo estudado como agente reticulante alternativo ao glutaraldeído (considerado antigênico). O TPP pode reticular a quitosana, formando um gel, pela interação iônica entre suas cargas negativas e as cargas positivas dos grupamentos amino da quitosana (CALVO et. al, 1997). Essa interação está ilustrada na Figura 07.

Figura 07 – Interação iônica entre a quitosana e o TPP.



Fonte – Azevedo et.al, (2011).

O grande número de cargas negativas do TPP resulta na sua grande habilidade de reticular iônica a quitosana. O tratamento de quitosana com TPP resulta numa diminuição da susceptibilidade de degradação da quitosana pela quitinase, além de alterar o comportamento de solubilidade do polímero, o que pode ser usado como ferramenta para mudanças desejáveis nas propriedades da quitosana para aplicações específicas (REIS, 2008).

Por ser considerado um ânion de baixa massa molar, o TPP vem sendo utilizado, também, como agente reticulante físico, na formulação e na preparação de sistemas de liberação controlada de fármaco (ZHU, 2002).

### 3.5 Liberação Controlada de Fármaco

A pesquisa de fármacos tem atravessado diversas fases, iniciando-se com a busca de plantas medicinais no início das civilizações humanas, evoluindo à fase da química sintética na metade do século XX e, finalmente, à era biotecnológica no início do século XXI. Assim, o final do século passado e o início deste têm sido marcados por grandes avanços tecnológicos, incluindo o acentuado desenvolvimento de novas formas de liberação de fármacos. Por estar envolvida com pesquisa multidisciplinar, a tecnologia de liberação controlada de fármacos representa uma das áreas promissoras da ciência, contribuindo de maneira inovadora para o tratamento da saúde do homem (ALLEN JR et al, 2007).

A fusão da ciência de polímeros com as ciências farmacêuticas conduziu para um avanço espetacular em termos de “inovação” (flexibilidade no estado físico, forma, tamanho e superfície) no *design* e desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos (PILLAI; PANCHAGNULA, 2001).

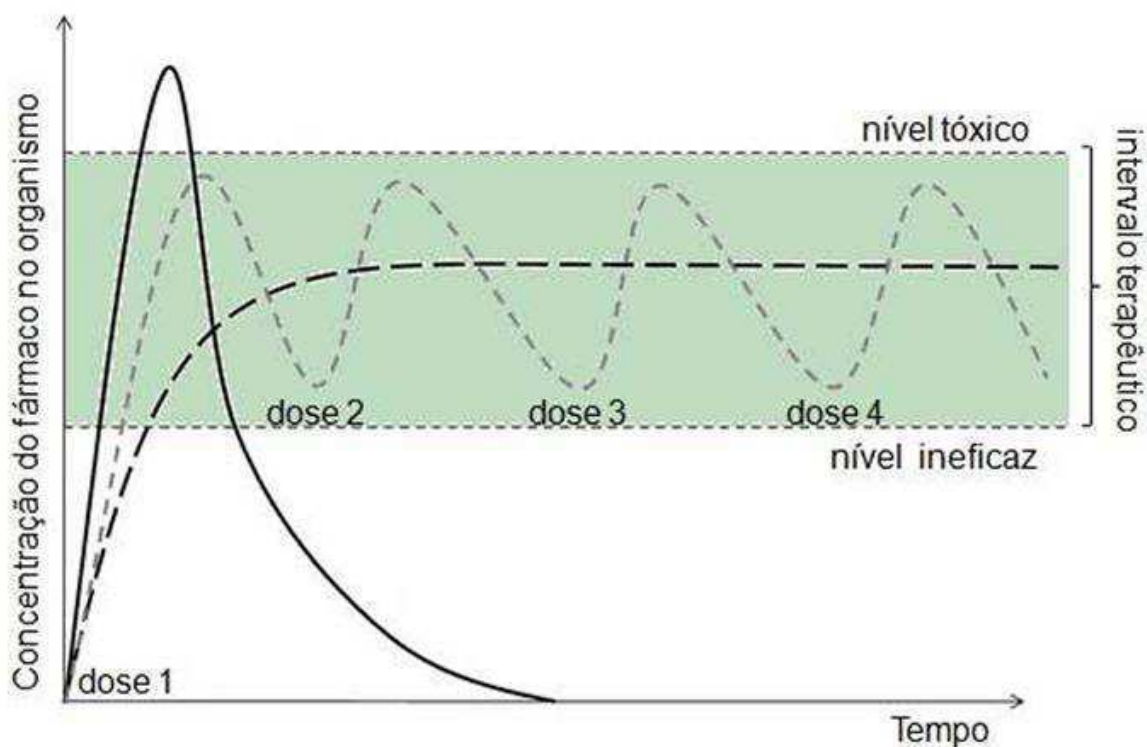
A ação biológica produzida por um medicamento não é simplesmente função da atividade intrínseca do fármaco que ele veicula (PRISTA, 1996) (PANDIT, 2008). Inúmeros fenômenos, mais ou menos complexos, se manifestam a partir do momento da administração, os quais dependem não só dos princípios ativos e do organismo ao qual eles são administrados, mais ainda, em larga escala, da fórmula e formulação farmacêutica utilizada (SILVA, 2006) (PANDIT, 2008). Sem dúvida, para que um fármaco seja eficaz, é necessário que uma quantidade suficiente dele chegue ao sítio ou sítios de ação e ali permaneça por um tempo suficiente para exercer o seu efeito farmacológico. Isso depende da via e da forma pelas quais o fármaco é administrado e da velocidade com que ele é liberado (AULTON, 2005) (PANDIT, 2008).

A duração da atividade dos medicamentos é bastante variada, sendo, em geral, de alguns minutos a algumas horas (VOIGHT, 1982). Em formas farmacêuticas convencionais, ou também chamadas de sistemas de liberação imediata, o sistema farmacêutico serve apenas de suporte para a substância ativa, pouco interferindo nas características de liberação. Logo depois da administração dessas formas farmacêuticas (nebulização ou “spray”, injeção e comprimidos), a maioria do conteúdo do fármaco é liberada e o efeito terapêutico se manifesta mais ou menos rapidamente e de forma indiscriminada (ANSEL, 2000) (MOURA, 2012).

Depois de atingir o pico de concentração máxima de fármaco no sangue, o efeito terapêutico começa a diminuir. Para assegurar um efeito terapêutico contínuo, cada nova dose deve ser administrada enquanto o nível sanguíneo do fármaco ainda se encontra acima do limite mínimo necessário para que haja efeito terapêutico. Deste modo, se os intervalos de tempo forem excessivamente curtos, cada concentração máxima é mais elevada que a anterior e poderá ultrapassar o efeito terapêutico e atingir o nível tóxico. Ao contrário, se as doses individuais forem excessivamente espaçadas, então o problema adquire o aspecto inverso e ao fim de pouco tempo as concentrações mínimas são insuficientes para conseguir o nível terapêutico aceitável. Portanto, a solução consiste em estabelecer um plano de tratamento no qual a dose máxima não ultrapasse a necessária para o efeito terapêutico, com o objetivo de não provocar fenômenos de intoxicação, e a dose mínima não se reduza a valores que façam com que o doente fique privado por um certo tempo da ação efetiva do fármaco, como pode ser vista na Figura 08 (MOURA, 2012).

Figura 08 – Comparação dos perfis de liberação de um fármaco resultantes da administração de um sistema de libertação convencional por dose única (—) e várias doses (----) e de um sistema de libertação controlada (-----).

Fonte: DASH et. al, 1998.



Fonte – Dash et al., (1998).



Se a dosagem unitária e o intervalo de tempo com que esta é administrada forem corretamente escolhidos, o que não é fácil, haverá oscilações no nível sanguíneo, mas este se manterá dentro dos limites de resposta terapêutica efetiva. Como consequência, tem existido desde muito tempo o interesse na obtenção de formas farmacêuticas de sistemas de liberação modificada, que possam introduzir o fármaco no organismo em um tempo determinado e em um sítio específico, em quantidade terapêutica, eliminando ou reduzindo as oscilações nas concentrações plasmáticas, tão comuns quando se utiliza um sistema farmacêutico convencional, mantendo a concentração do fármaco dentro da faixa terapêutica, reduzindo as reações adversas e, assim, aumentando a aceitação do paciente ao tratamento (VOUGHT, 1982).

Em 1952, um dos primeiros sistemas de liberação de fármacos foi comercialmente disponível (PILLAI, 2001).

Os Sistemas de Liberação Controlada (SLC) têm por objetivo prolongar e melhorar o controle da administração de fármacos por forma a aperfeiçoar a sua ação terapêutica com o mínimo de efeitos colaterais. Entendendo-se por “fármaco” todos os compostos bioativos administrados com intuito terapêutico, desde moléculas de baixo peso molecular a proteínas e a material genético (MOURA, 2012).

Cada fármaco possui um intervalo de ação terapêutica acima do qual ele é tóxico e abaixo do qual é ineficaz. O objetivo dos SLC reside em manter a concentração do fármaco no organismo dentro do intervalo terapêutico por tempo prolongado, utilizando-se uma única dosagem (MOURA, 2012). Portanto, a vantagem mais evidente na utilização de um sistema de liberação controlada é a simplificação do esquema posológico, uma vez que a frequência da administração do medicamento é reduzida (SUNY, 2003).

Em termos gerais, os fármacos que mais se adaptam aos SLC possuem as seguintes características: velocidades médias de absorção e excreção; absorção uniforme no trato gastrointestinal; absorção em doses relativamente pequenas; margem de segurança relativamente larga; utilização no tratamento de doenças crônicas em vez de agudas (VENDRUSCULO, 2005).

A melhoria no desenvolvimento de sistemas de liberação modificada depende estritamente da seleção de um agente apropriado capaz de controlar a liberação do fármaco, manter a ação terapêutica ao longo do tempo e/ou de liberar o fármaco em

um determinado tecido ou órgão alvo. Dentro das opções, os polímeros são agentes versáteis e promissores para exercer tal função (LOPES, 2005).

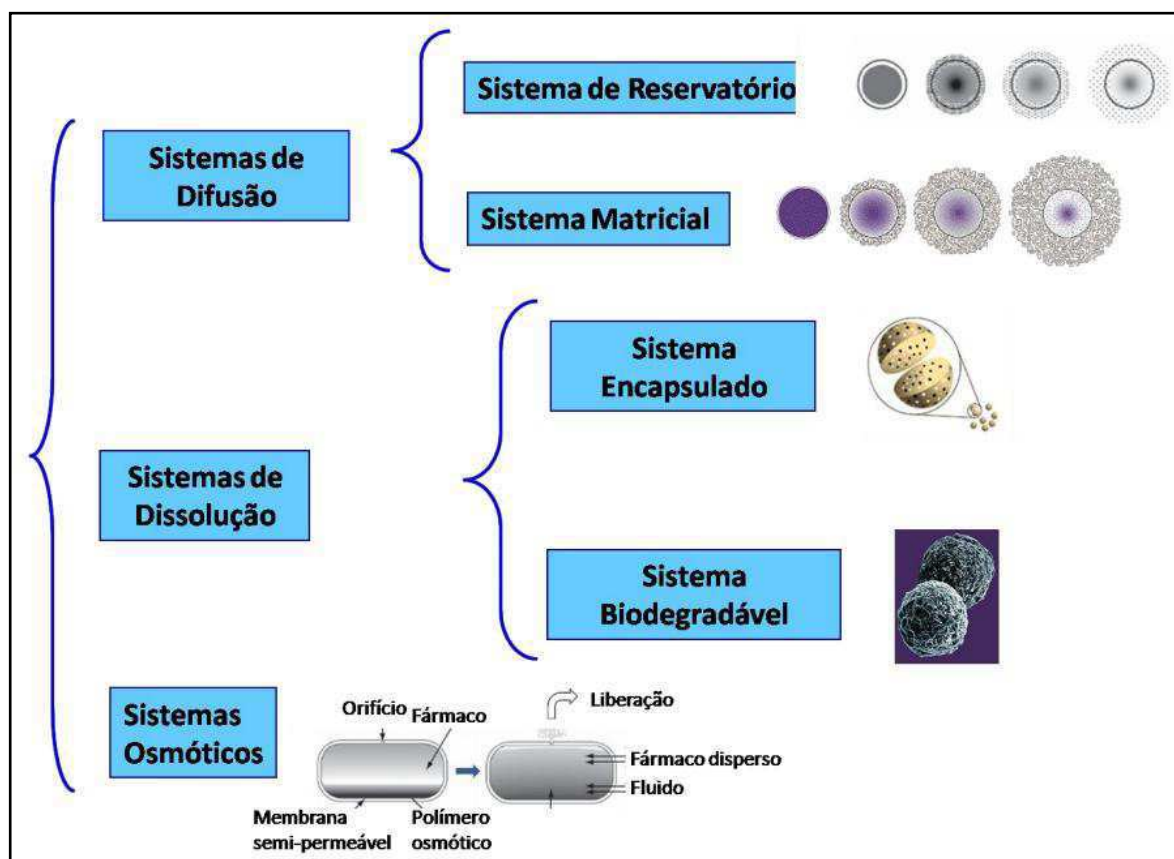
### **3.6 Sistemas Poliméricos de Liberação de Fármacos**

Os polímeros constituem a classe de materiais mais versátil e têm mudado o nosso dia a dia no decorrer de várias décadas (PILLAI, 2001) (LIU, 2009). Nessas últimas décadas, a união entre ciências de polímeros e ciências farmacêuticas levou a uma inovação no propósito e desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos (KIM, 2009).

Devido as suas diversas aplicações e funcionalidades, especialmente em terapias de liberação controlada do fármaco, os polímeros estão dentre os excipientes mais utilizados para a obtenção de formas farmacêuticas (RIOS, 2005). Estes sistemas poliméricos são destinados, principalmente, a alcançar a liberação modificada de fármacos. Dentre as principais características que o polímero a ser utilizado nesses sistemas deve apresentar é ser biocompatível e, de preferência, biodegradável (WILIAMS, 1999) (FOURNIER, 2003). Os materiais biodegradáveis degradam dentro do organismo como resultado de processos biológicos naturais, eliminando a necessidade de remoção do sistema de liberação de fármaco após a completa eliminação do princípio ativo (JONES, 2004).

Os sistemas poliméricos de liberação controlada de fármacos podem ser agrupados, de acordo com sua estrutura, em sistemas matriciais e em sistemas com uma barreira, também chamados de reservatórios (DUMITRIU, 1993). Em geral, a Liberação Controlada de Fármaco (LCF) utiliza como métodos de liberação a difusão, a dissolução e a osmose, nos quais quase sempre é possível utilizar o sistema de reservatório e o sistema matricial (LIMA, 2010). Nos sistemas matriciais o fármaco é adsorvido ou solubilizado no interior de uma matriz polimérica. Enquanto que nos sistemas reservatórios, a substância ativa se encontra envolvida por membrana polimérica, isolando o núcleo do meio externo, retardando a liberação do fármaco (Figura 09) (SCHAFFAZICK, 2003).

Figura 09 – Classificação da liberação controlada de fármaco e suas principais vias de administração.



Fonte – LIMA, (2010).

A liberação do fármaco nos sistemas reservatórios é controlada por uma membrana microporosa ou semipermeável. O reservatório pode ser composto pelo fármaco sólido ou uma suspensão em meio líquido. As paredes do reservatório são impermeáveis de um lado e não porosas ou microporosas de outro. O fármaco migra numa taxa controlada para o sítio de absorção. Tais sistemas liberam o fármaco numa taxa menor do que a capacidade de permeação da pele, sendo a liberação do fármaco, portanto, controlada pelo sistema e não pela pele (DITTGEN, 1998; VENKATRAMAN, GALE, 1998). Os sistemas reservatórios têm a desvantagem de apresentarem todo o fármaco depositado em um compartimento. Caso a membrana se rompa, o fármaco fica exposto e perde-se o controle de sua liberação. Neste modelo a pele é saturada após aplicação do sistema pelo fármaco presente na membrana adesiva (ZHAN et al., 2006; DITTGEN, 1998; VENKATRAMAN & GALE, 1998).

Nos sistemas matriciais o fármaco pode ser disperso em um gel que controla a difusão ou pode ser disperso em uma matriz polimérica contendo uma camada

adesiva que controla a liberação do fármaco. Um lado da matriz permanece em contato com a pele, enquanto o outro lado é protegido por uma membrana laminada. O fármaco difunde através da estrutura até o sítio de absorção (VALENTA, AUNER, 2002). Nestes sistemas a liberação do fármaco pode envolver processos de intumescimento do polímero, difusão do fármaco e erosão da matriz. Em alguns casos, o fármaco pode estar ligado quimicamente à cadeia polimérica e ser liberado pela quebra hidrofílica ou enzimática dessa ligação. Um ou mais desses processos podem regular a liberação em uma mesma forma farmacêutica, dependendo do tipo de polímero empregado e das propriedades físico-químicas do fármaco (PEZZINI, SILVA, FERRAZ, 2007). O sistema de matriz é mais seguro que o de reservatório. O mecanismo de liberação não é a simples difusão, como no reservatório, mas depende se a molécula do fármaco possui uma solubilidade finita na matriz e se a concentração total por unidade de volume (incluindo o fármaco não dissolvido) é maior do que a solubilidade finita na matriz (SHIN et al., 2005; VALENTA, AUNER, 2002).

Nos sistemas de difusão a taxa de liberação da droga é determinada pela sua difusão através de um polímero insolúvel em água. Destaca-se, nestes sistemas, dois tipos de dispositivos: os reservatórios nos quais um núcleo de droga é cercado por uma membrana polimérica e os dispositivos de matriz onde a droga dissolvida ou dispersa é distribuída uniformemente em uma matriz polimérica inerte (LEE; ROBINSON, 2004).

Nos Sistemas Osmóticos, a pressão osmótica pode ser empregada como força propulsora para gerar uma liberação constante do fármaco. Um reservatório de fármaco, na forma de solução ou no estado sólido, contido num recipiente semipermeável constitui a base desses sistemas terapêuticos conhecidos como bombas osmóticas (LEE; ROBINSON, 2004).

O alvo deste estudo é desenvolver um sistema de liberação controlada transdérmica.

### **3.7 Sistemas de Liberação Transdérmicos**

A via cutânea é uma alternativa para aquelas drogas potencialmente tóxicas quando administrada por outras vias, para terapias prolongadas e de substituição (ALLEVATO, 2007).

A liberação transdérmica de fármacos pode ter como finalidade ação local ou sistêmica. Os objetivos desta última são: evitar administrações repetidas, ter liberação prolongada e manter as concentrações plasmáticas constantes (VEIGA et al., 2002). Na atualidade se aplica esta via de administração a numerosos fármacos cuja magnitude molecular e propriedades físico-químicas o permitam (ALLEVATO, 2007). Alguns autores relatam que embora seja difícil estabelecer princípios gerais que afetam a penetração cutânea aplicáveis a todas as combinações possíveis de fármacos, veículos e condições da pele, alguns fatores acabam sendo consensos e são citados na maioria dos trabalhos relacionados à área (PAPARELLA & VALLEY, 2005; SIMONSEN et al., 2002; ANSEL et al., 2000):

- Concentração do fármaco: de modo geral, a quantidade de fármaco que permeia a pele por unidade de superfície de área por intervalo de tempo aumenta à medida que a concentração do fármaco no veículo aumenta;
- Área de aplicação: uma quantidade maior do fármaco é absorvida pela via cutânea quando a substância é aplicada numa área maior;
- Afinidade do fármaco com a pele: o fármaco deve apresentar maior atração físico-química com a pele do que com o veículo no qual é apresentado para que migre do veículo em favor da pele. Entretanto, certo grau de solubilidade do fármaco tanto em lipídios quanto em água é considerado essencial para a permeação efetiva, que parece ser aumentada por veículos que se espalham facilmente sobre a superfície da pele e misturam-se rapidamente com o sebo colocando o medicamento em contato com as células;
- Hidratação cutânea: veículos que aumentam a hidratação da pele geralmente favorecem a permeação cutânea. Logo, veículos oleosos e/ou os curativos oclusivos agem como barreira à umidade pela qual o suor da pele não pode passar, resultando em aumento da hidratação cutânea;
- Tempo e intensidade de massagem: de modo geral, o tempo e a intensidade de fricção ou massagem na aplicação tópica influenciam a quantidade de fármaco absorvida, quanto maior o período e a intensidade de fricção, maior a absorção;
- Local de aplicação: a permeação cutânea parece ser maior quando o medicamento é aplicado à pele que possui uma camada córnea fina. Além da

espessura, as propriedades do estrato córneo variam nas diversas partes do corpo, incluindo diferenças no número de camadas celulares, empilhamento e tamanho das células e quantidade de lipídios superficiais;

- Permanência do medicamento sobre a pele: geralmente, quanto maior o período de permanência do medicamento sobre a pele, maior será a permeação. Entretanto, as alterações de hidratação ou a saturação da pele com o fármaco podem interferir significativamente no aumento da permeação com o tempo.

Existem diferentes estruturas que atuam como barreira para penetração de drogas na pele: camada córnea (ácida e aquosa), camada subcórnea (eletrolítica), junção dermoepidérmica, derme e unidade pilosebácea (atuam como shunts de baixa resistência). Sendo o estrato córneo, uma barreira altamente lipofílica, a qual evita a perda excessiva de água e previne a penetração de moléculas (ALLEVATO, 2007). Para aumentar o alcance de fármacos que podem ser liberados eficientemente pela pele têm sido utilizados promotores físicos ou químicos de permeação que interagem continuamente com a mesma para promover o fluxo do fármaco (CHORILLI et al, 2006). Porém a maior estratégia ainda é a hidratação, pois aumenta a espessura vertical da camada celular, reduzindo sua densidade e diminuindo a resistência à difusão (ALLEVATO, 2007).

Os promotores físicos de permeação incluem-se: iontoforese, sonoforese, eletropermeabilização, magnetoforese (CHORILLI et al, 2006). A iontoforese envolve a liberação de compostos químicos com carga através da membrana da pele, usando um campo elétrico. Neste processo, embora a densidade atual aparente por área de unidade seja baixa, a maior parte da corrente penetra pelo folículo piloso (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2004; ANSEL et al., 2000). A sonoforese ou fonoforese, que consiste na utilização do ultra-som de alta frequência, também está sendo estudada com o objetivo de aumentar a liberação transdérmica de fármacos. Acredita-se que o ultrassom de alta frequência possa influenciar a integridade do estrato córneo, afetando desta forma a permeabilidade (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2004; CHORILLI et al., 2003; ZAGUE et al., 2003; ANSEL et al., 2000; BRONAUGH & MAIBACH, 1989). A eletropermeabilização cria um poro aquoso na bicamada lipídica cutânea por aplicação de pulsos elétricos curtos de aproximadamente 100-1000 V/cm, proporcionando um caminho para a permeação do fármaco que

atravessa diretamente o estrato córneo (BRONAUGH & MAIBACH,1989). A magnetoforese é uma técnica ainda limitada que estuda a capacidade dos campos de magnetismo moverem magneticamente um material através da pele, num mecanismo baseado na tecnologia de microchip para a liberação de fármacos (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2004; BRONAUGH & MAIBACH, 1989).

O promotor químico de permeação ideal deve promover uma redução reversível nas propriedades de barreira da pele sem danos a longo prazo para as células viáveis (CHORILLI, et al, 2006). Os mecanismos propostos para ação dos promotores químicos de permeação cutânea são: redução da resistência do estrato córneo devido à alteração de suas propriedades físico-químicas; alteração da hidratação do estrato córneo; alteração da estrutura lipídica e lipoprotéica dos canais intercelulares pela desnaturação ou ação de solventes e mecanismos de transporte dos princípios ativos ionizáveis (HADGRAFT, LANE, 2005; ANSEL et al., 2000). Entre os promotores de permeação químicos é citado: água, dimetilsulfóxido (DMSO), azona, pirrolidonas, ácidos graxos, álcoois, uréia e tensoativos (CHORILLI et al, 2006).

As vantagens da via transdérmica de administração de fármacos são: a pele ser o órgão de mais fácil acesso do corpo humano; diminuir as variações plasmáticas de fármaco, ou seja, entrada de uma quantidade constante de um princípio ativo, com níveis sanguíneos uniformes, constantes e sustentados; diminuir a frequência de administração; anular a variabilidade da absorção oral; anular o metabolismo pré-sistêmico; possibilidade imediata de interromper a administração; uso simples, indolor, boa aceitação, otimizando a aderência do tratamento (VEIGA et. al, 2002; ALLEVATO, 2007). A função barreira do estrato córneo, o intervalo de tempo entre a administração e o alcançar de concentração terapêutica (lagtime), a possibilidade de irritação local e a possibilidade de desencadear tolerância e/ou resistência constituem, no entanto, em desvantagens desta via de administração (VEIGA et al, 2002).

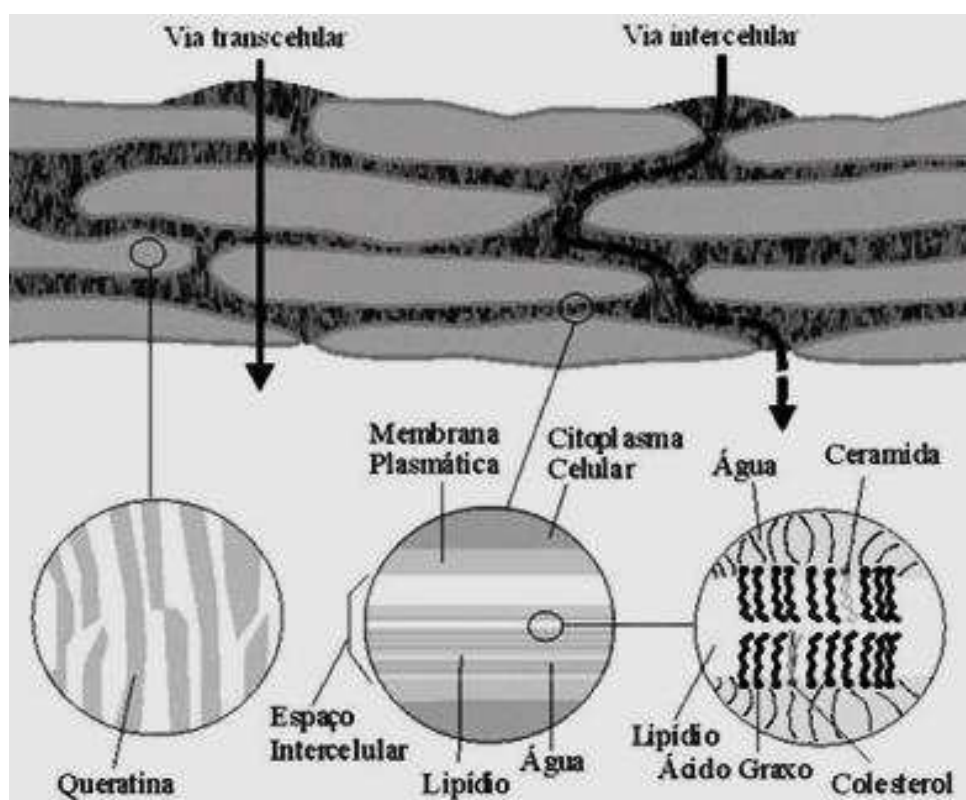
Os fármacos que são bons candidatos ao desenvolvimento por esta via de administração são os de baixo peso molecular (menores de 500 daltons); não iônicas; possuem solubilidade em lipídios e água; são estáveis em temperatura ambiente; apresentam elevada potência; não são irritantes; possuem extensa metabolização hepática; tem tempos de meia-vida curtos; não sofrem metabolismo

na pele; não induzem tolerância e tem bons coeficientes de partição (ALLEVATO, 2007) (VEIGA et. al, 2002).

### 3.7.1 Vias de permeação do Fármaco

Os apêndices da pele apenas constituem 0,1% da superfície desta pelo que se estima ser a via transepidermica a principal via de permeação de fármacos (SUHONEN et. al, 1999). Assim, a absorção percutânea via transepidermica envolve a difusão através do estrato córneo, das células viáveis da epiderme e, finalmente, das camadas superiores da derme até à microcirculação. O passo determinante da absorção cutânea é a permeação através do estrato córneo. As proteínas desta camada constituem uma camada descontínua, enquanto que a fase lipídica é contínua. Teoricamente, existem, então, duas vias potenciais de passagem: a transcelular e a intercelular, tal como se pode ver na Figura 10 (VEIGA et. al, 2002).

Figura 10 – Esquema que representa as vias de permeação do fármaco através do estrato córneo, isto é, através dos corneócitos e da matriz lipídica intercelular – via transcelular, e via da matriz lipídica entre os corneócitos – via intercelular.



Fonte – Suhonen et al., (1999).



Contudo, em ambas as vias de permeação a estrutura do estrato córneo obriga o fármaco a se difundir através das bicamadas lipídicas intercelulares (VEIGA et. al, 2002).

#### *3.7.1.1 O folículo piloso como sítio de ação de fármacos*

As unidades pilosebáceas têm um importante papel nos processos de permeação e penetração de compostos aplicados topicamente. O folículo piloso humano não constitui somente um reservatório, mas também um ponto de entrada para substâncias aplicadas topicamente e contribui significativamente para o transporte de fármacos para o interior da pele (VOGT et al., 2005).

Sistemas de liberação de fármacos e formulações destinadas a ter o folículo piloso humano como alvo seletivo pode permitir o envio de doses efetivas de compostos ativos para o interior do ducto folicular. Possíveis aplicações incluem o tratamento de anormalidades do crescimento dos pêlos, bem como o tratamento de doenças associadas ao folículo piloso e de desordens gerais da pele (VOGT et al., 2005).

Ultimamente tem-se desenvolvido filmes polímeros para utilização em sistemas de liberação controlada de fármacos.

### **3.8 Liberação de fármacos a partir de filmes**

A principal aplicação dos filmes enquanto SLC é a liberação de fármacos por via transdérmica. A liberação ocorre a partir da matriz polimérica de forma contínua, sem, no entanto, atingir níveis tóxicos no organismo e danificar as células da membrana epitelial. A grande vantagem da liberação transdérmica face, por exemplo, à via oral reside na proteção do fármaco da biotransformação pré-sistêmica e da hidrólise enzimática no trato gastrointestinal (SILVA et al., 2006; RASOOL et al., 2011).

A facilidade da quitosana para ser processado na forma de filmes deu lugar às primeiras aplicações investigadas deste polímero natural. De uma forma geral, os filmes de quitosana possuem propriedades físicas e mecânicas dependentes do grau de desacetilação (percentagem de grupos amina presentes) e da massa molar do polímero, elevada flexibilidade e estabilidade e são facilmente hidratados

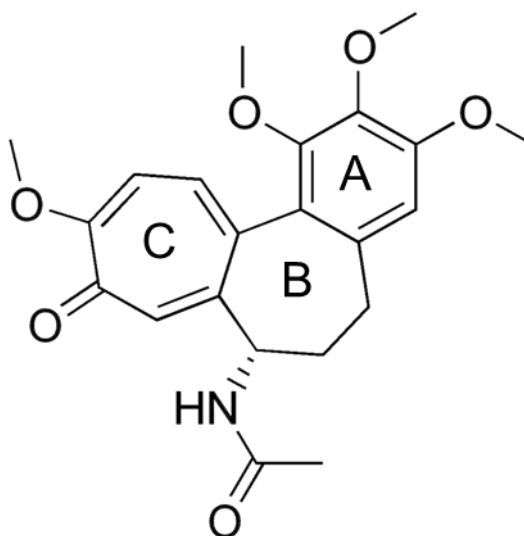
(HWANG et al., 2003). A colchicina é um exemplo de fármaco que pode ser incorporado a uma matriz polimérica com o interesse que sua liberação seja controlada.

### 3.9 Colchicina

A Colchicina é um produto natural obtido da planta *Colchicum autumnale*, também conhecido como açafreão-do-prado e cólchico. É o agente antigota mais antigo que se conhece. Preparações feitas com essa planta é anterior a Era Cristã. Seu uso no tratamento da gota iniciou-se no século XVIII e atualmente é empregada não só em quadros dermatológicos, mas em várias outras doenças (GUZZO, 1996).

Foi somente em 1820 que a colchicina, o princípio ativo do cólchico, foi isolada pelos químicos franceses Pelletier e Caventon. Sua configuração absoluta só foi descrita em 1955, por Corrodi e Hardegger. A colchicina, cuja estrutura química está representada na Figura 11, é um alcaloide tricíclico, contendo em sua estrutura uma trimetoxifenila (Figura 11, anel A), um anel de sete membros (Figura 11, anel B) com um grupo acetamida na posição 7, e um anel tropolônico (Figura 11, anel C). A colchicina natural apresenta apenas um centro estereogênico no carbono 7, com configuração absoluta S, de acordo com sistema de nomenclatura de estereoisômeros descrito por Cahn-Ingold-Prelog (GUZZO, 1996).

Figura 11 – Estrutura química da Colchicina.



Fonte – Guzzo, (1996).

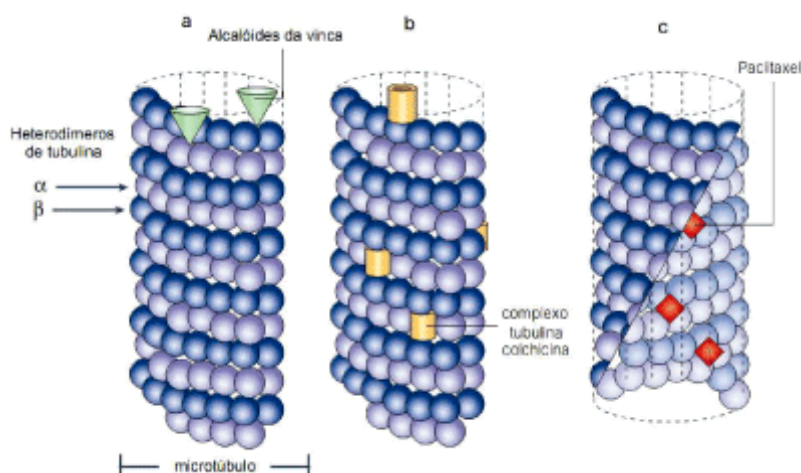
Há muito tempo, os vegetais representam as maiores fontes de substâncias ativas que podem ser usadas na terapêutica, incluindo os medicamentos anticancerígenos, a exemplo os alcaloides da Vinca, com vista a encontrar tratamentos mais efetivos e seletivos, ou que visem à descoberta de novas estratégias que impeçam o avanço da doença (BRANDÃO, 2010).

Por 200 anos, a gota foi a única enfermidade tratada com colchicina, até que, nas últimas décadas, inúmeras pesquisas encontraram outras indicações do alcaloide.

A colchicina é um agente antimitótico e, tem sido amplamente utilizada como recurso experimental no estudo da função e divisão normal e anormal da célula. A colchicina pode fazer cessar a divisão celular vegetal e animal tanto in vitro como in vivo. A mitose é interrompida na metáfase, devido à falência da formação do fuso, surgindo, então configurações nucleares bizarras e anormais que freqüentemente levam à morte celular (CAMPAGNOLO, 1989).

É conhecida as ações da Colchicina como anti-inflamatória, antifibrótica, antimitótica e antiosteolítica (RAMOS-E-SILVA, 2010). Essas ações estão relacionadas a ligação da colchicina às tubulinas livres e conseqüentemente, formação de complexos tubulina-colchicina, que então se copolimerizam, resultando em microtúbulos com inúmeras moléculas de tubulina alternadas com moléculas de colchicina (Figura 12). Obviamente esse fato interfere na dinâmica normal dos microtúbulos e acaba por inibir a polimerização dos mesmos, e por fim, interromper a divisão celular, justificando também sua ação antimitótica (BRANDÃO, 2010). Esta inibição da formação de microtúbulos é especialmente útil em terapias anticancerígenas porque as células cancerígenas proliferam de forma rápida e descontrolada (LAROCQUE, 2014).

Figura 12 – Ação dos fármacos nos microtúbulos. a) Alcalóides da vinca; b) Colchicina; c) Paclitaxel.



Fonte – Brandão e col, (2010).

A substância tem ampla distribuição, excetuando-se o tecido cardíaco, cérebro e músculos, porém com afinidade pela concentração nos neutrófilos. Após a metabolização hepática, será eliminada principalmente nas fezes e em menor quantidade por excreção renal (GUZZO, 1996; AZULAY, 2004). É absorvida principalmente no íleo com uma biodisponibilidade de até 40%, um pico plasmático de 0,5 – 2h pós-ingesta e uma rápida distribuição tissular, principalmente em fígado, rins, medula óssea, leucócitos e baço. O efeito farmacológico aparece durante as 12h seguintes do início do tratamento. A vida média de eliminação oscila de 4 a 30h (MARTÍNEZ, 2008). A excreção renal pode estar aumentada em pacientes com problemas hepáticos. Devido ao alto grau de captação pelos tecidos, a eliminação da colchicina pode continuar por 10 dias ou mais, após cessar a administração do produto (GUZZO, 1996).

Não existe consenso acerca de quais são os níveis tóxicos da colchicina, porém a probabilidade de toxicidade aumenta quando se ingere de maneira aguda (MARTÍNEZ, 2008). A dose tóxica é de aproximadamente 10 mg. As doses que provocam reações capazes de levar à morte são ao redor de 40 mg (GUZZO, 1996). A toxicidade da colchicina é maior nos órgãos com alta captação celular, como o trato digestivo e medula óssea. Os efeitos colaterais numa etapa inicial consistem em náuseas, diarreia, vômitos, dor abdominal tipo cólica. Numa segunda fase incluem-se aplasia medular, anemia hemolítica, insuficiência hepática, insuficiência renal, coagulação intravascular disseminada, além de alopecia, miopatias, disestesias, neuropatia periférica, paralisia ascendente, diminuição dos reflexos

miotáticos, alterações dermatológicas tipo eritema nodoso, necrose epidérmica tóxica. E numa terceira fase culmina com choque cardiogênico, parada respiratória e morte (MARTÍNEZ, 2008).

É contraindicada em casos de insuficiências renais, hepáticas ou cardíacas severas e durante a gravidez (GUZZO, 1996) (MARTINS, 2001).

Recentemente, o número de moléculas alvo usadas para o desenvolvimento de novas opções de tratamento cresceu consideravelmente, a exemplo da Colchicina, usada classicamente no tratamento da gota, hoje utilizada em diversas patologias, mas até o momento nenhum uso significativo em terapias anticancerígenas foi estabelecido, devido à toxicidade apresentada (BRANDÃO, 2010). Para tanto, é de grande importância desenvolver alternativas para tornar este fármaco mais seletivo, seguro e não tóxico (LAROCQUE, 2014).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Local da pesquisa

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste – CERTBIO, localizado na Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais na Universidade Federal de Campina Grande.

### 4.2 Materiais

- Quitosana Médio Peso Molecular, Sigma Aldrich<sup>®</sup>;
- Ácido Acético Glacial P.A. (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>), Vetec<sup>®</sup>;
- Hidróxido de Sódio P.A. (NaOH), Vetec<sup>®</sup>;
- Tripolifosfato de Sódio (TPP) (Na<sub>5</sub>O<sub>10</sub>P<sub>3</sub>), Sigma Aldrich<sup>®</sup>;
- Colchicina (C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>6</sub>) comprimido de 1 mg, Apsen<sup>®</sup>.

### 4.3 Métodos

A metodologia foi desenvolvida de acordo com o fluxograma da Figura 13. As etapas do processo foram exploradas com maior profundidade nos tópicos seguintes.

Figura 13 – Fluxograma da metodologia empregada.



Fonte – Próprio autor.

#### 4.3.1 Preparação da solução e membrana de quitosana.

A solução de quitosana foi preparada na concentração de 1% (m/v) por dissolução do pó de quitosana em solução de ácido acético 1% (v/v) sob agitação mecânica e temperatura ambiente por 20 h.

A membrana de quitosana foi obtida pelo método de evaporação do solvente, onde 50 ml da solução de quitosana foram vertidos em placa Petri (15 cm de diâmetro) e, posteriormente submetidos ao processo de secagem sobre ventilação forçada de ar por um período de 24 h. Os filmes secos foram neutralizados em solução de hidróxido de sódio 1 M por uma 1 h, e consecutivamente estirados e secos em temperatura ambiente.

#### 4.3.2 Preparação da solução e membrana de quitosana/colchicina

A solução de quitosana foi preparada como no tópico 4.3.1, e em seguida a ela adicionada comprimidos de colchicina macerados em almofariz necessários para obter uma concentração de 3,75 mg de colchicina por cm<sup>2</sup> de membrana, o que corresponde a ¼ da dose diária indicada para uma pessoa adulta. A homogeneização da solução foi realizada em ultrassom durante 30 min em temperatura ambiente. Os processos de formação de membrana foram idênticos aos descritos no tópico 4.3.1.

#### 4.3.3 Reticulação das membranas de quitosana e quitosana/colchicina em TPP

Foram preparadas soluções de Tripolifosfato de Sódio nas concentrações de 1%, 2,5% e 5% (m/v) por dissolução deste sal em água destilada. As membranas preparadas nos tópicos 4.3.1 e 4.3.2 foram reticuladas por imersão em solução de TPP (nas 3 concentrações estudadas) por um período de 30 min, seguida de lavagem com água destilada e estiramento para secagem.

### 4.4 Caracterizações

As membranas de quitosana e quitosana/colchicina, com e sem reticulação, foram caracterizadas por Difração de Raios X (DRX), Espectroscopia na Região de

Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Microscopia Ótica (MO), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS), Ensaio de Ângulo de Molhabilidade, Ensaio de Liberação Controlada de Fármaco e Ensaio de Citotoxicidade.

#### 4.4.1 Difração de Raios X (DRX)

A técnica de difração de raios X foi realizada para a determinação das fases existentes e obtenção de informações sobre a cristalinidade do material em estudo. O equipamento utilizado foi um difratômetro Shimadzu modelo XRD 6000, montagem Bragg-Brentano, sistema  $\theta$ - $2\theta$  e radiação monocromática de cobre, a leitura foi efetuada entre  $2\theta=5^\circ$  e  $2\theta=40^\circ$  a velocidade de  $2^\circ/\text{min}$ .

#### 4.4.2 Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A análise por FTIR foi realizada com intuito de identificar os grupos funcionais do material desenvolvido, atentando para possíveis modificações provocadas pela adição do fármaco assim como pelo processo de reticulação. As análises foram realizadas em equipamento Spectrum 400 da Perkin Elmer a temperatura ambiente, analisando o comprimento de onda  $4000$  a  $650\text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.4.3 Microscopia Ótica (MO)

A Microscopia Ótica foi realizada para verificar a morfologia das membranas desenvolvidas. Para a análise foi utilizado o Microscópio Óptico Hirox de reflexão e transmissão com acessórios 2D e variação de  $50X$ - $4000X$ , acoplado a uma estação de Análise de Imagens. Os aumentos estudados para todas as amostras foram os de  $350x$  e  $1050x$ .

#### 4.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

A caracterização por MEV é uma técnica utilizada para análise micro estrutural da morfologia e da topografia sobre superfícies dos sólidos e foi utilizada



para esta pesquisa o equipamento da marca PHENOM, modelo MEV PROX, fabricante PHENOM WORD aumento máximo de 40000x, profundidade de foco 1mm, resolução de 30nm, tensão de 5, 10 e 15 KV, baixo vácuo e pressão variada (1 a 270 Pa), sem recobrimento metálico, mesmo em amostras não condutoras.

#### 4.4.5 Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS)

A análise por EDS foi realizada com objetivo de analisar e quantificar os elementos químicos que constituem a estrutura do material desenvolvido. A análise foi realizada no equipamento HITACHI®, modelo TM 1000.

#### 4.4.6 Molhabilidade de Ângulo de Contato

Para a realização deste ensaio foi utilizado um goniômetro desenvolvido por técnicos da Unidade Acadêmica de Engenharia Mecânica da UFCG (Universidade Federal de Campina Grande) que se encontra instalado no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais (CERTBIO) da Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais, da UFCG. Esse ensaio possibilita identificar o perfil hidrofílico/hidrofóbico do material estudado. O ensaio foi realizado em triplicada para cada variável estudada.

#### 4.4.7 Ensaio de Liberação Controlada de Fármaco

O Ensaio de Liberação Controlada foi realizado para determinar a taxa de liberação da colchicina pela membrana de quitosana. As membranas de quitosana com fármaco incorporado foram submetidas a banho agitado contendo solução tampão de PBS (pH = 7,43), as membranas permaneceram estáticas durante todo o processo com auxílio de redes de contenção. Alíquotas de 0,5 mL da solução do banho foram coletadas em diferentes períodos de tempo, sempre repondo a mesma quantidade no banho com solução de PBS virgem. As alíquotas coletadas foram analisadas por HPLC. Para a análise utilizou-se cromatógrafo líquido de ultra eficiência Shimadzu (CLUE) equipado com duas bombas modelo LC-20AD, injetor automático SIL-20-A<sub>HT</sub>, forno para coluna CTO-20A, detector com comprimento de onda variável UV/Vis modelo SPD-20A, controlador CBM-20A, integrador automático

computadorizado com software LC Solution<sup>®</sup>. A fase estacionária foi composta por uma coluna C18 SHIM-PACK XR-ODS (*d.i.* 3,0mm X 50mm, 2,2 µm). A fase móvel que forneceu melhor seletividade ao método foi constituída de uma mistura isocrática de acetonitrila:água (40:60, v/v). As análises foram realizadas em temperatura controlada (40°C), utilizando um fluxo de 0,1mL/min e volume de injeção de 10µL.

#### 4.4.8 Ensaio de Citotoxicidade

Com o objetivo de atender a norma ISO 0993 que recomenda ensaios *in vitro* de citotoxicidade como testes iniciais para materiais que ficaram em contato com a pele, escolheu-se o teste de avaliação da viabilidade celular dos macrófagos por MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il )-2,5-difenil-tetrazólio]. Tal ensaio foi realizado com fibroblastos L 929 adquiridos no Banco de Célula do Rio de Janeiro (BCRJ). O ensaio foi realizado no CERTBIO.

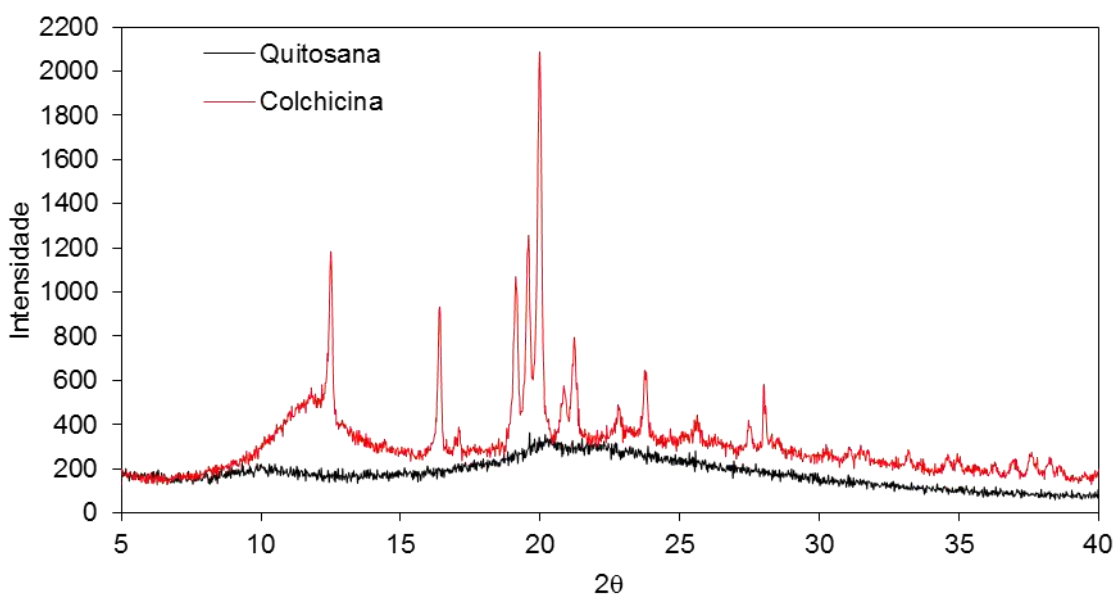
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Difração de raios X (DRX)

As análises por DRX foram realizadas visando analisar as modificações ocorridas na cristalinidade da quitosana, tanto pela incorporação do fármaco, colchicina, como pelas diferentes concentrações de TPP as quais as membranas foram submetidas.

Na Figura 14 observa-se o difratograma da quitosana pura utilizada como padrão neste trabalho em comparação com o difratograma da colchicina na forma de comprimido.

Figura 14 – Difratograma de DRX da amostra de quitosana utilizada como padrão neste trabalho em comparação com o difratograma da colchinha na forma de comprimido.



Fonte – Próprio autor.

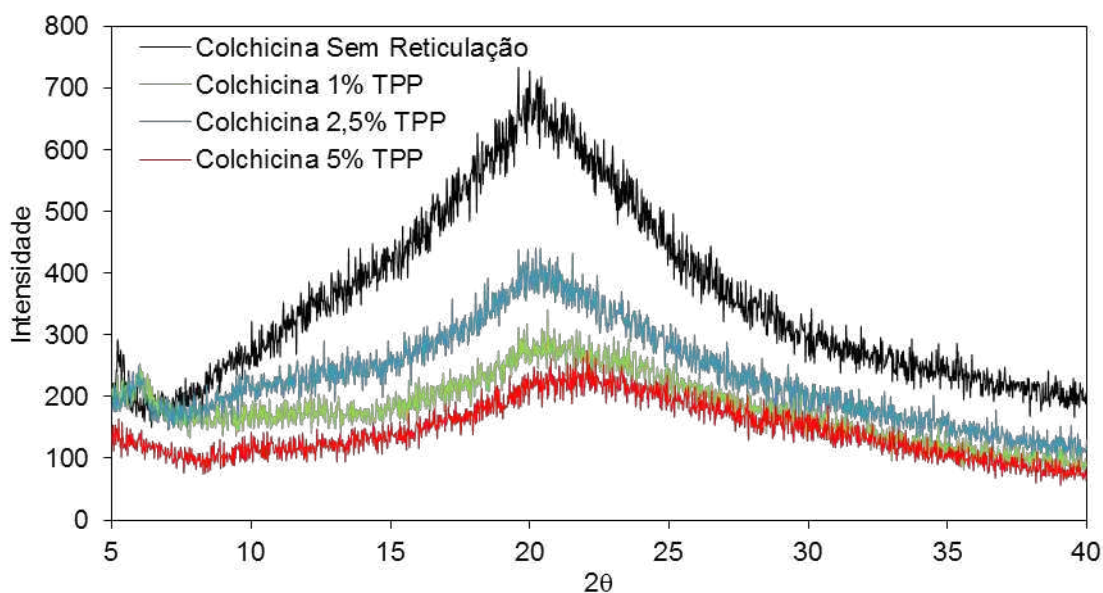
Verifica-se na Figura 14 para o difratograma da quitosana um perfil típico de um material semicristalino com a presença de dois picos de base larga localizados e aproximadamente  $2\theta=10^\circ$  e  $2\theta=20^\circ$ , que segundo Urugami, Tokuro (2006), corresponde a um difratograma típico de quitosana.

Para o difratograma do comprimido de colchicina, devido a pequena quantidade de fármaco contido no mesmo (1mg/comprimido), não foi possível verificar com nitidez certos picos característico deste fármaco, observando-se

predominância dos picos relacionados ao excipiente polivinilpirrolidona K30 (PVP K30) em aproximadamente  $2\theta=12,5^\circ$ ,  $2\theta=17,5^\circ$ ,  $2\theta=20^\circ$ ,  $2\theta=24^\circ$  e  $2\theta=28^\circ$  (LEI et al, 2011), entretanto pode-se observar picos em aproximadamente  $2\theta=18^\circ$ ,  $2\theta=19^\circ$ ,  $2\theta=19,5^\circ$  e  $2\theta=21,5^\circ$ , correspondentes a colchicina, além de um pico intenso em aproximadamente  $2\theta=20^\circ$  que corresponde tanto ao PVP K30 como a colchicina (PATENTE, 2013).

Na Figura 15 observam-se os difratogramas das membranas sintetizadas sem reticulação e reticuladas em soluções com diferentes concentrações de TPP.

Figura 15 – Difratogramas de DRX das membranas de quitosana/colchicina sem reticulação e reticuladas em soluções com diferentes concentrações de TPP.



Fonte – Próprio autor.

Para o difratograma da membrana de quitosana/colchicina sem reticulação na Figura 15, verifica-se aumento da intensidade do pico presente em aproximadamente  $2\theta=20^\circ$  quando comparado com o difratograma da quitosana pura, na Figura 14, e aparente desaparecimento do pico em aproximadamente  $2\theta=10^\circ$ , picos estes característicos da quitosana. Isto pode estar relacionado a adição do fármaco, e seus excipientes, a solução de quitosana, o que proporcionou maior cristalinidade, quando comparada com a membrana de quitosana pura, a membrana de quitosana/colchicina.

Com a reticulação verificou-se diminuição do perfil cristalino das membranas de quitosana/colchicina, podendo ser observado o pico da quitosana presente em aproximadamente  $2\theta=10^\circ$ .

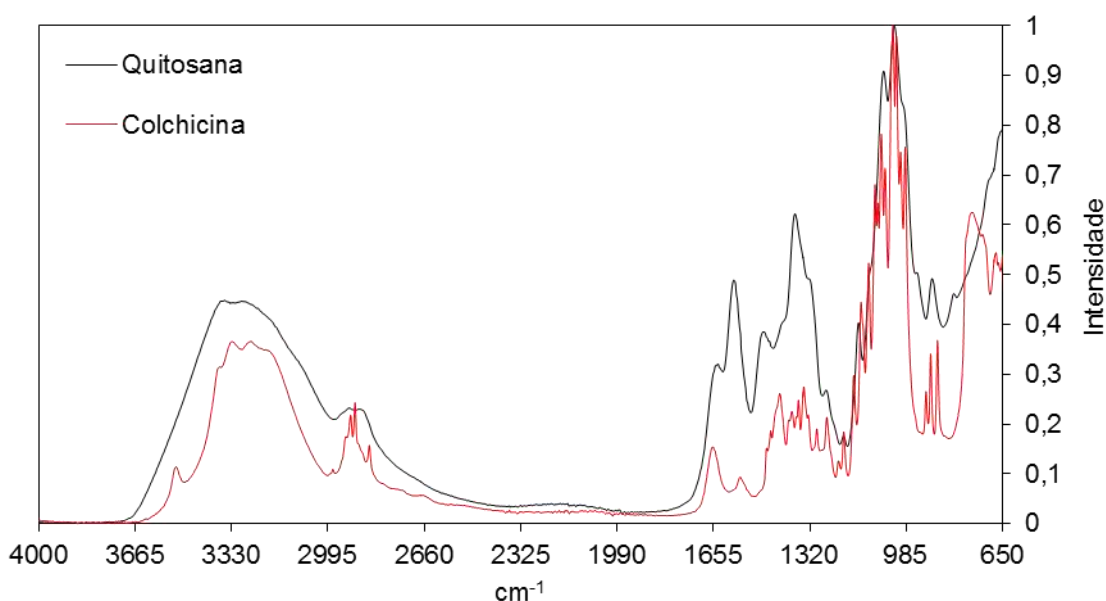
A membrana de quitosana/colchicina apresenta-se mais cristalina que as demais que foram submetidas ao processo de reticulação devido ao fato que, quando o polímero é submetido apenas a neutralização por meio alcalino, esta desprotonação favorece a organização estrutural pela formação de pontes de hidrogênio inter e intra moleculares, gerando assim uma rede com certa organização e compactação de cadeias. Quando estas membranas que foram neutralizadas são submetidas ao processo de reticulação, o reticulante iônico (no caso o TPP) uniu as cadeias por ligações entre os grupamentos amins da quitosana desestruturando pontes de hidrogênio antes existentes e gerando ligações iônicas menos organizadas, aumentando assim o perfil amorfo das membranas (PATI, ADHIKARI, DHARA, 2011) que pode ser observado nos difratogramas da Figura 15, indicando modificações estruturais decorrentes do processo de reticulação.

## **5.2 Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

Com o interesse de verificar as possíveis alterações ocorridas nos grupos funcionais da quitosana, assim como no fármaco colchicina, foram realizadas análises de FTIR nas amostras padrões de quitosana e colchicina, bem como nas membranas de quitosana/colchicina sem e com reticulação.

Para facilitar a visualização de possíveis modificações nos grupos funcionais, foram realizadas as análises de FTIR dos padrões de quitosana e colchicina (colchicina comprimido) que podem ser observadas na Figura 16.

Figura 16 – Espectros de FTIR da quitosana e colchicina comprimido.



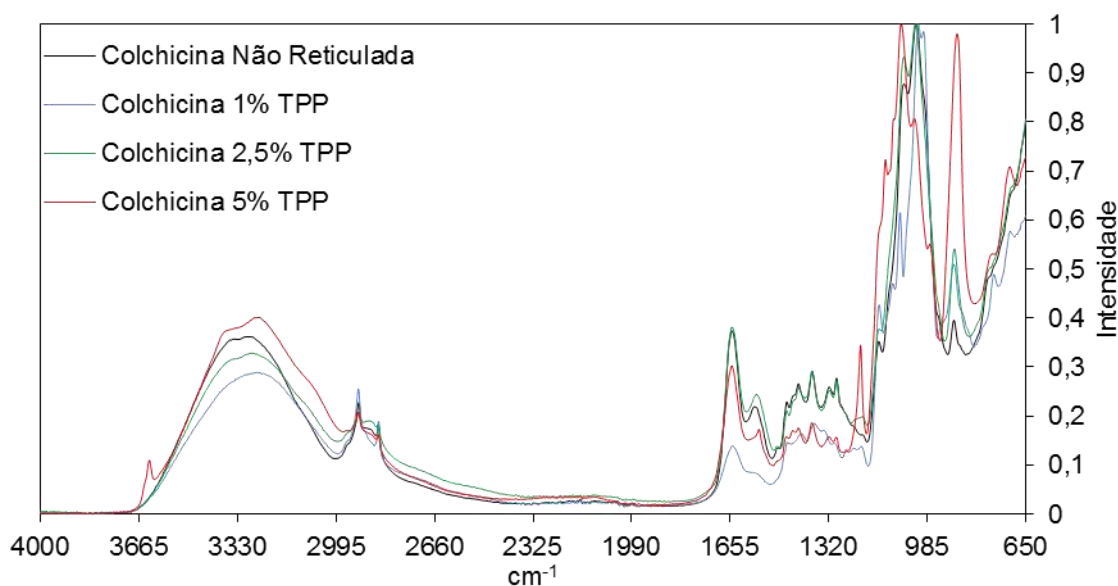
Fonte – Próprio autor.

O espectro de infravermelho da quitosana obtido (Figura 16) está de acordo com os resultados apresentados por Ponciano, (2010) onde também foi observada a presença das bandas consequentes das vibrações dos grupos funcionais correspondentes a O-H da hidroxila e N-H da amina em  $\sim 3400\text{-}\sim 2995\text{ cm}^{-1}$ , C-H do  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  em  $\sim 2995\text{-}\sim 2873\text{ cm}^{-1}$ , do RHN-C=O da amida em  $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ , do N-H da amina em  $\sim 1560\text{ cm}^{-1}$ , novamente do O-H da hidroxila e do C-H do anel glicosídico em  $\sim 1423\text{ cm}^{-1}$  e  $\sim 1319\text{ cm}^{-1}$  respectivamente, do C-H do  $\text{CH}_3$  em  $\sim 1377\text{ cm}^{-1}$  e do C-O-C da ligação éter em  $\sim 1150\text{ cm}^{-1}$ ,  $\sim 1062\text{ cm}^{-1}$  e  $\sim 1020\text{ cm}^{-1}$ .

Em conjunto ao espectro da quitosana observa-se o espectro da colchicina também na Figura 16, para este espectro podem ser verificados as bandas consequentes das vibrações dos grupos funcionais correspondentes a O-H da hidroxila em  $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$  e  $\sim 3400\text{-}\sim 2995\text{ cm}^{-1}$ , sendo a banda mais intensa em  $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$  corresponde a hidroxilas não ligadas a pontes de hidrogênio, C-H do  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  em  $\sim 2995\text{-}\sim 2873\text{ cm}^{-1}$ , do RHN-C=O da amida em  $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ , do C=O associação a C-C em  $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ , C-H constituinte dos ciclos não aromáticos do fármaco em  $\sim 1400\text{-}\sim 1300\text{ cm}^{-1}$  e C-H constituintes do anel benzeno em  $\sim 860\text{-}\sim 800\text{ cm}^{-1}$ ; a banda localizada em  $\sim 750\text{ cm}^{-1}$  corresponde a forma como o anel benzeno da estrutura do fármaco é substituído.

Na Figura 17 observam-se os espectros de FTIR das membranas de quitosana/colchicina sem e reticuladas.

Figura 17 – Espectros de FTIR das membranas de quitosana/colchicina sem e reticuladas.



Fonte – Próprio autor.

Verificou-se na Figura 17 que a adição do fármaco a quitosana (membrana de quitosana/colchicina sem reticulação, preto) proporcionou alterações quanto a intensidade dos grupos amida e amina da membrana, essa alteração pode ser notada em  $\sim 1655 \text{ cm}^{-1}$  e  $\sim 1560 \text{ cm}^{-1}$  respectivamente, onde observou-se a diminuição da intensidade da banda de amina e aumento da banda de amida. Este fato pode estar ligado à presença de grupos amida na constituição do fármaco, o que aumentou a presença do mesmo no meio. Outro fator a ser considerado é a possível interação do fármaco com os grupamentos amina da quitosana, já que essa diminuição da intensidade da banda de amina I pode indicar menor quantidade desse grupamento livre, assim como também pode ter ocorrido ligação direta do fármaco com essa amina I levando a formação de aminas secundárias que tem leitura encoberta pela banda de hidroxilas em aproximadamente  $\sim 3400\text{-}\sim 2995 \text{ cm}^{-1}$ .

Observa-se para as membranas reticuladas deslocamento na banda em  $\sim 3400\text{-}\sim 2995 \text{ cm}^{-1}$  correspondente as hidroxilas em pontes de hidrogênio, este acontecimento pode estar associado ao aumento de concentração de grupos hidroxila, o que desloca essa banda para a direita, entretanto essas hidroxilas podem ser resultado das pontes de hidrogênio entre o TPP e a quitosana, o que causa menor organização estrutural (como já observada na análise de DRX) que as pontes de hidrogênio entre as cadeias de quitosana. Verifica-se também para as membranas reticuladas o surgimento de uma banda em aproximadamente  $1170 \text{ cm}^{-1}$

(observada em maior intensidade para a membrana de quitosana/colchicina reticulada com solução 5% de TPP (m/v), esta banda está relacionada a vibração das ligações P=O oriundas do reticulante utilizado.

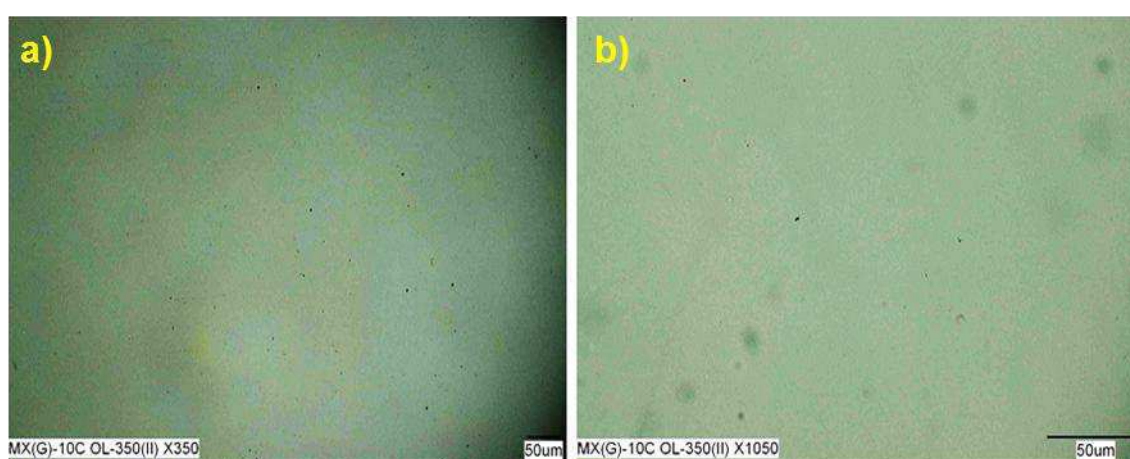
Verificou-se para a membrana quitosana/colchicina reticulada com solução 5% TPP (m/v) o surgimento da banda em  $\sim 3665\text{ cm}^{-1}$  relacionado as hidroxilas livres do fármaco utilizado, além de evidenciar duas bandas praticamente encobertas pela banda de hidroxila em  $\sim 3500\text{ cm}^{-1}$  e  $\sim 3100\text{ cm}^{-1}$  correspondentes ao grupo amina II, levando a crer em uma possível alteração da estrutura da quitosana por adição de molécula ou átomo em sua estrutura a partir do seu grupo amina I, como já mencionado na discussão para a membrana de quitosana/colchicina sem reticulação.

### 5.3 Microscopia Ótica (MO)

A análise de Microscopia Ótica foi realizada visando verificar a morfologia das membranas sintetizadas.

Na Figura 18 observa-se a membrana apenas de quitosana, o ensaio foi realizado nesta amostra para facilitar a visualização das modificações ocorridas nas membranas decorrentes da adição do fármaco e do processo de reticulação.

Figura 18 – Microscopia Ótica da membrana de quitosana nos aumentos de a) 350x e b) 1050x.



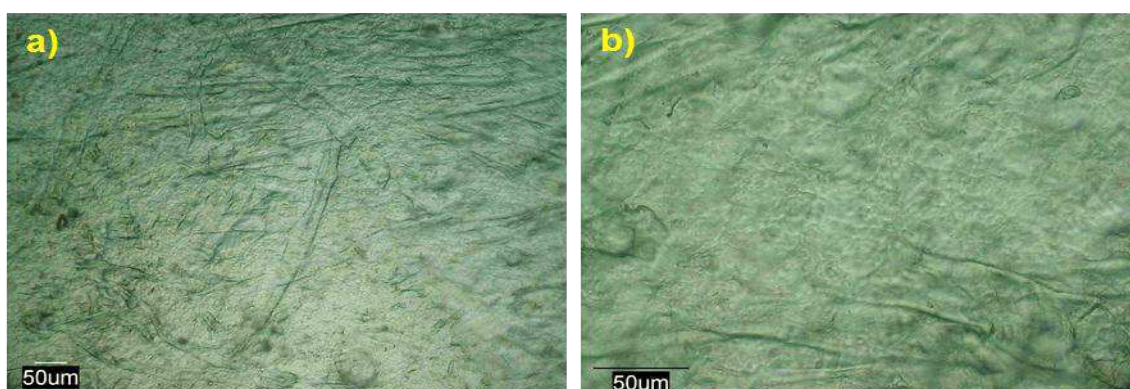
Fonte – Próprio autor.



Observa-se na Figura 18, uma superfície uniforme e lisa, características de uma membrana densa de quitosana, o que está de acordo com estudos realizados por Lima (2010).

Verifica-se na Figura 19 a Microscopia Ótica da membrana de quitosana e colchicina sem reticulação.

Figura 19 – Microscopia Ótica da membrana de quitosana/colchicina sem reticulação nos aumentos de a) 350x e b) 1050x.

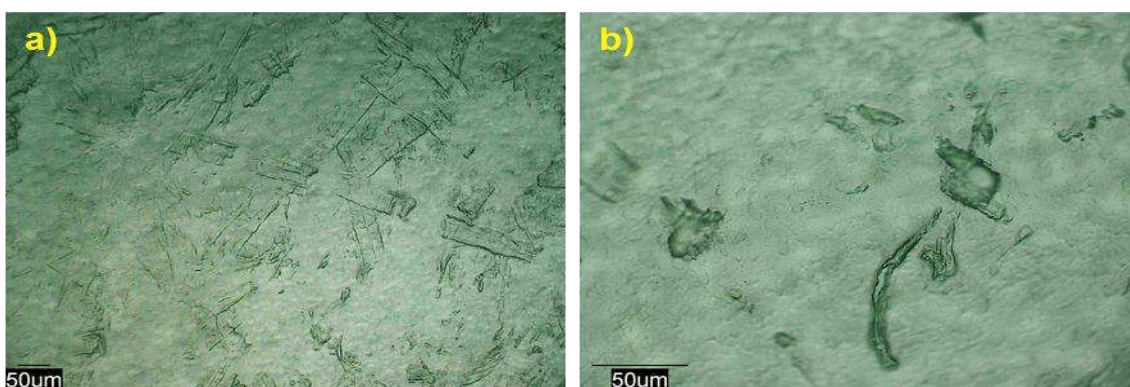


Fonte – Próprio autor.

Para a Figura 19 observou-se que a adição do fármaco colchicina alterou a superfície da membrana de quitosana, atribuindo-a rugosidades inexistentes na membrana apenas de quitosana, rugosidades estas sem direcionamento preferencial gerando relevos aleatórios em toda a superfície. Além do fármaco, os excipientes nele contidos podem ter influenciado na estrutura da membrana.

Na Figura 20 observam-se as microscopias da membrana de quitosana/colchicina reticulada com solução de 1% de TPP (m/v).

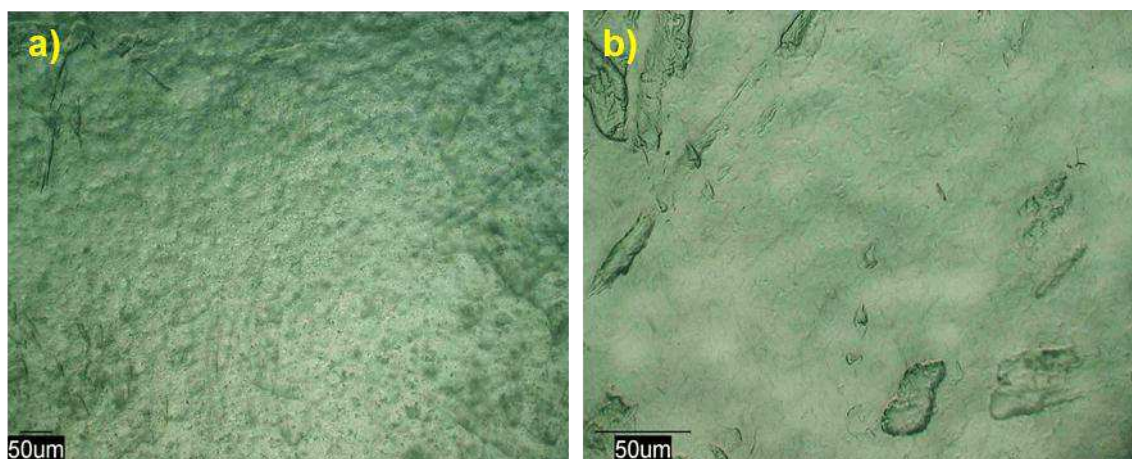
Figura 20 – Microscopia Ótica da membrana de quitosana/colchicina reticulada com solução de 1% de TPP nos aumentos de a) 350x e b) 1050x.



Fonte – Próprio autor.

Nota-se na membrana da Figura 20 a) uma superfície com regiões de aparente hipo e hiper concentração, regiões estas mais evidentes na Figura 20 b) onde nitidamente são visualizados aglomerados (representando os hiperconcentrados) e regiões lisas (representado os hipoconcentrados). Este fato pode estar relacionado a ação desigual do reticulante na amostra gerando regiões altamente reticuladas e regiões com baixa reticulação. Resultado semelhante pode ser observado para a membrana de quitosana/colchicina reticulada com solução de 2,5% de TPP (m/v) (Figura 21), entretanto com menor intensidade (como pode ser verificado na Figura 21 a)), o que indica uma ação mais efetiva do reticulante em praticamente toda superfície da amostra quando comparado com a membrana reticulada com solução de 1% de TPP (m/v).

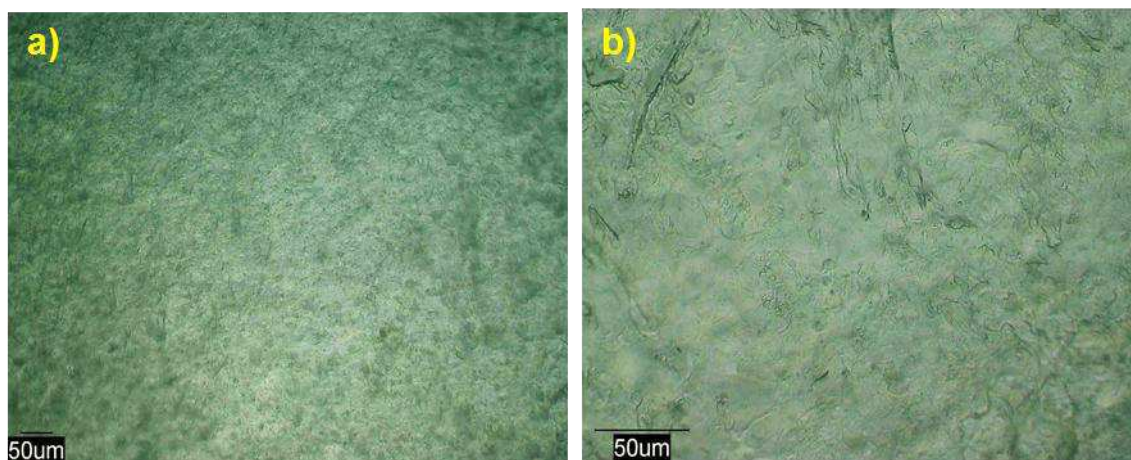
Figura 21 – Microscopia Ótica da membrana de quitosana/colchicina reticulada com solução de 2,5% de TPP nos aumentos de a) 350x e b) 1050x.



Fonte – Próprio autor.

Na Figura 22, correspondente a amostra de quitosana/colchicina reticulada com solução de 5% de TPP, observa-se maior homogeneidade de superfície, quando comparada com as amostras reticuladas com solução de 1% e 2,5% de TPP, o que indica que a reticulação com esta concentração apresentou-se mais efetiva, reticulando praticamente toda a membrana o que evitou a formação de regiões de hiper e hipo concentração.

Figura 22 – Microscopia Ótica da membrana de quitosana/colchicina reticulada com solução de 5% de TPP nos aumentos de a) 350x e b) 1050x.



Fonte – Próprio autor.

As observações realizadas na análise de MO corroboram com as informações verificadas nas análises de DRX e FTIR, indicando modificações na membrana tanto pela incorporação do fármaco como pelo processo de reticulação.

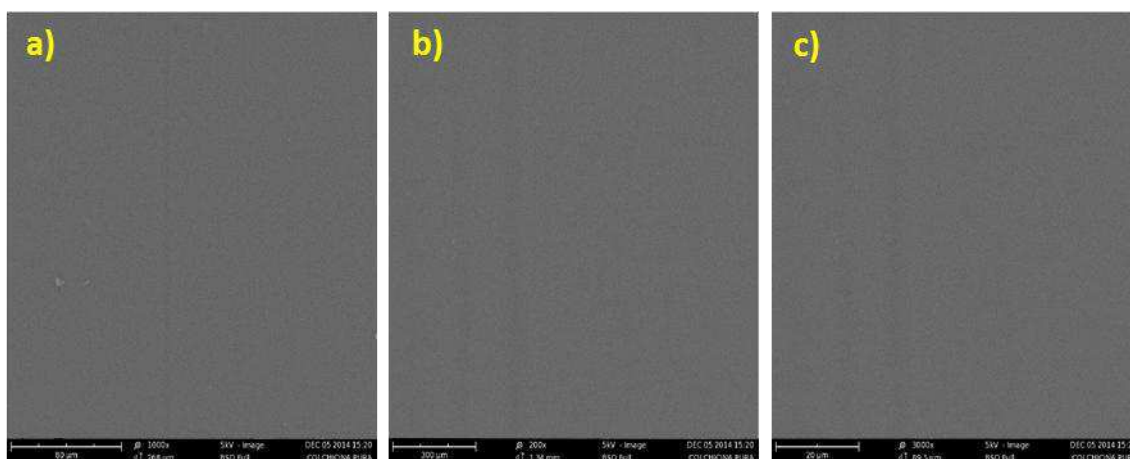
#### 5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise de MEV foi realizada para que, associada a MO, pudesse ser verificada a morfologia das membranas sintetizadas. Devido ao fato que a imagem de MEV ser de caráter virtual, pois o que é visualizado é a transcodificação da energia emitida pelos elétrons, possibilita-se uma visão mais detalhada da morfologia sem que haja interferência da luz visível.

Para melhor visualizar as modificações ocorridas a membrana de quitosana por adição do fármaco colchicina, observa-se na Figura 23 a membrana apenas de quitosana.



Figura 23 – MEV da membrana apenas de quitosana nos aumentos de a) 200x, b) 1000x e c) 3000.

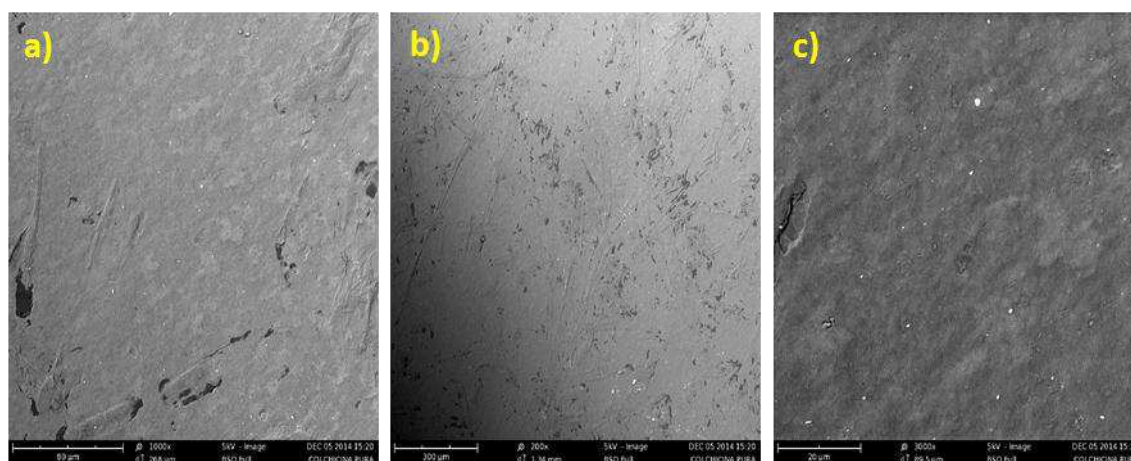


Fonte – Próprio autor.

Assim como para o resultado de MO para membrana apenas de quitosana, pode-se verificar na Figura 23 uma superfície uniforme e lisa, características de uma membrana densa de quitosana.

Na Figura 24 verifica-se a membrana de quitosana/colchicina sem reticulação.

Figura 24 – MEV da membrana de quitosana/colchicina sem reticulação nos aumentos de a) 200x, b) 1000x e c) 3000x.



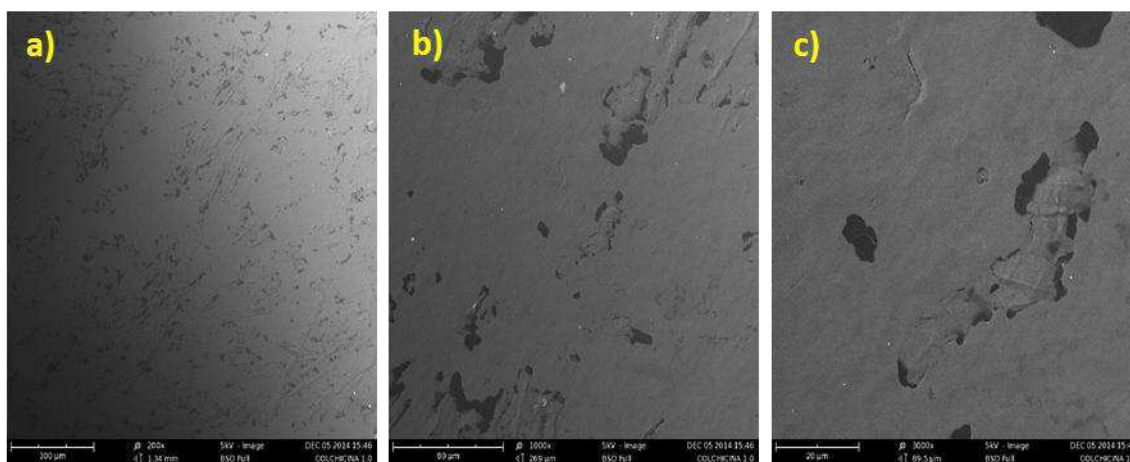
Fonte – Próprio autor.

Verifica-se na Figura 24 que a membrana de quitosana contendo o fármaco apresenta estrutura semelhante a observada na MO. Observa-se para esta membrana rugosidades não direcionadas diferenciando-a da membrana apenas de quitosana. Notam-se também a presença de fissuras semelhantes a fraturas em toda a superfície da amostra (mais evidentes na Figura 24 canto inferior esquerdo), fissuras estas que não conseguiam ser vistas na análise de MO. Percebe-se na

superfície a presença de fragmentos dispersos, fragmentos estes analisados por EDS e associados a acetato de sódio que permaneceram na estrutura mesmo após a lavagem. O acetato de sódio é produto da neutralização do ácido acético (utilizado para solubilizar a quitosana) com hidróxido de sódio.

Na Figura 25 observam-se as análises de MEV obtidas para a membrana de quitosana/colchicina reticulada com solução de 1% de TPP.

Figura 25 – MEV da membrana de quitosana/colchicina reticulada com solução de 1% de TPP nos aumentos de a) 200x, b) 1000x e c) 3000x.



Fonte – Próprio autor.

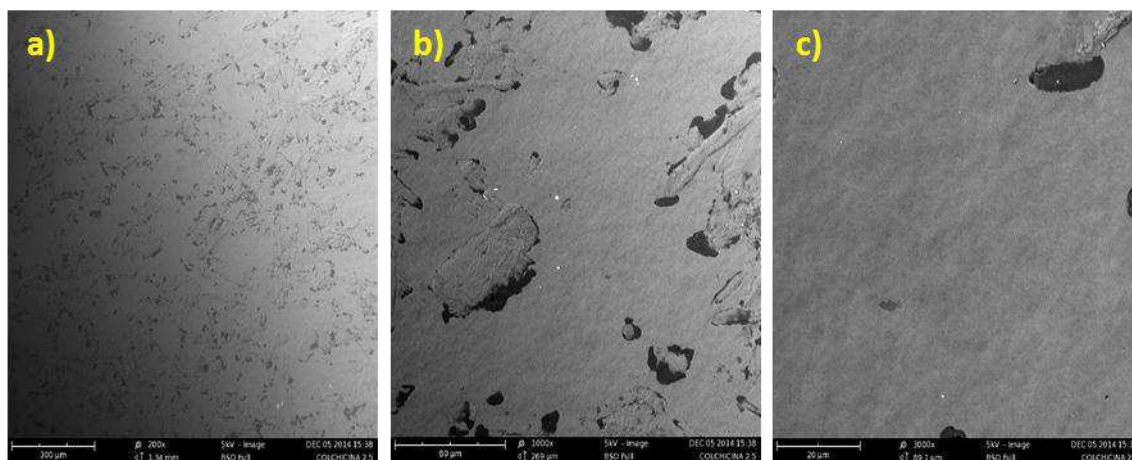
Na Figura 25 verifica-se uma superfície semelhante a da membrana de quitosana/colchicina sem reticulação, entretanto com fissuras mais acentuadas, fissuras estas não possíveis de serem observadas por MO.

Assim como na Microscopia Ótica, verificam-se zonas de hipo e hiper concentração, representadas por aglomerados que podem melhor ser visualizados na Figura 25 c). A presença das fissuras ao redor das regiões de hiper concentração fortalecem o fato suposto na MO de que a membrana é reticulada de forma não homogeneia, formando regiões intensamente reticuladas (aglomerados) e regiões onde praticamente não ocorreu reticulação (lisas).

Alguns fragmentos podem ser visualizados na membrana de quitosana/colchicina reticulada com 1% de TPP, estes fragmentos foram associados, a partir de EDS, a presença de tripolifosfato de sódio (TPP) disperso na superfície da amostra.

Na Figura 26 observam-se as micrografias da membrana de quitosana/colchicina reticulada com solução de 2,5% de TPP.

Figura 26 – MEV da membrana de quitosana/colchicina reticulada com solução de 2,5% de TPP nos aumentos de a) 200x, b) 1000x e c) 3000.

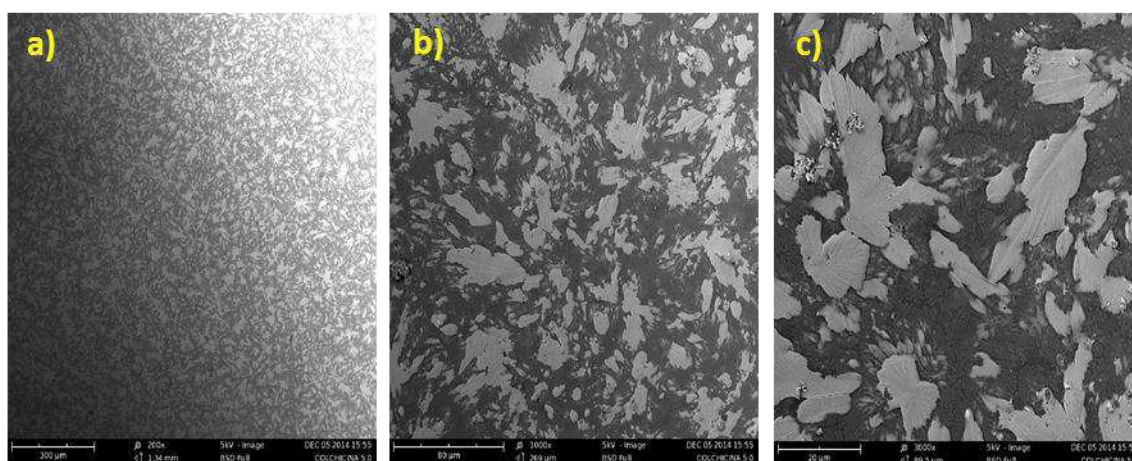


Fonte – Próprio autor.

Verifica-se na Figura 26, estrutura semelhante a observada para a membrana de quitosana/colchicina reticulada com 1% de TPP, entretanto com maior número de fissuras e regiões de baixa e alta concentração. Para esta membrana também é possível visualizar a presença de fragmentos em sua superfície, estes fragmentos também foram associados, a partir de EDS, ao TPP.

Na Figura 27 verificam-se as micrografias para as membranas de quitosana/colchicina reticuladas com solução de 5% de TPP.

Figura 27 – MEV da membrana de quitosana/colchicina reticulada com solução de 5% de TPP nos aumentos de a) 200x, b) 1000x e c) 3000x.



Fonte – Próprio autor.

Verifica-se nas micrografias para a membrana de quitosana/colchicina reticulada com solução de 5% de TPP (Figura 27) superfície divergente a observada por MO, na qual, devido visualização mais nítida da superfície proporcionada pela

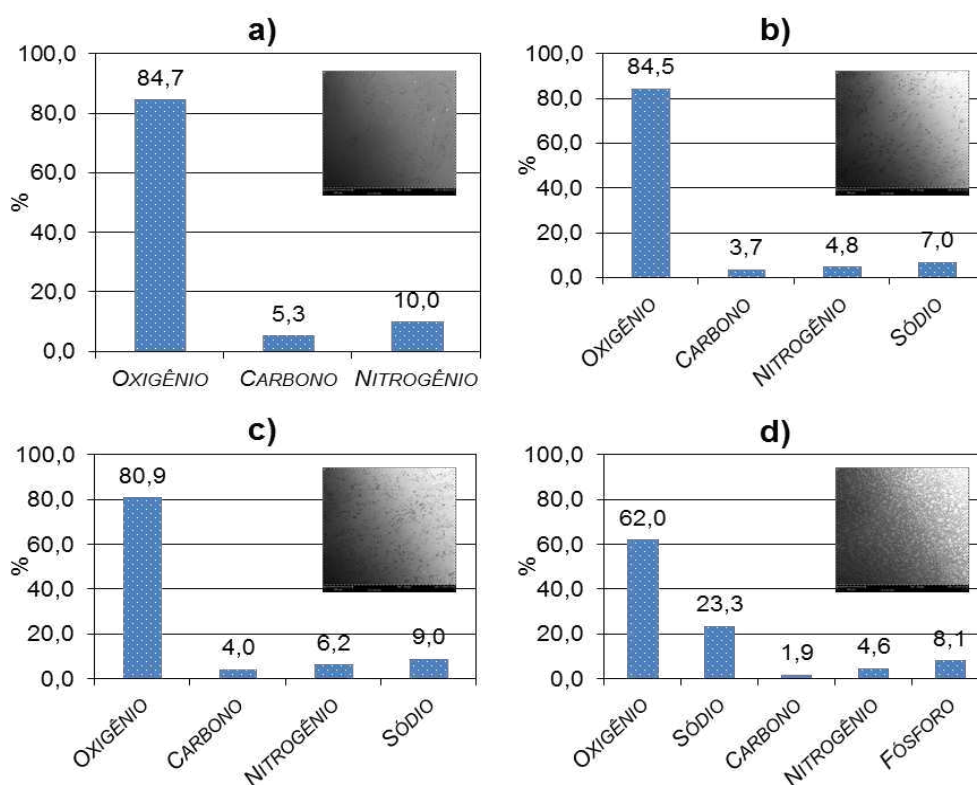
varredura dos elétrons sem que ocorresse a interferência da luz visível, foi possível observar impregnação de TPP (cuja composição foi comprovada por análise de EDS) em toda a superfície da membrana, fato este decorrente da alta concentração de TPP (5% m/v) utilizada no processo de reticulação, sinalizando saturação da membrana por TPP.

### 5.5 Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS)

Visando identificar os átomos presentes nas membranas de quitosana/colchicina, antes e após o processo de reticulação.

Na Figura 28 observam-se os resultados obtidos para a análise por EDS.

Figura 28 – EDS das membranas a) quitosana/colchicina sem reticulação, b) quitosana/colchicina reticulada com solução de 1% de TPP, c) quitosana/colchicina reticulada com solução de 2,5% de TPP e d) quitosana/colchicina reticulada com solução de 5% de TPP.



Fonte – Próprio autor.

Observa-se na Figura 28 a), para a membrana de quitosana/colchicina sem reticulação, a presença dos átomos carbono, oxigênio e nitrogênio, átomos estes que constituem tanto a estrutura da quitosana como a da colchicina, não foram



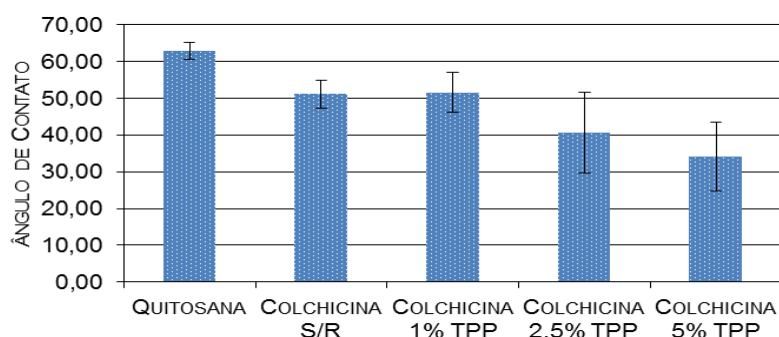
observados átomos que divergem a estrutura das duas moléculas. Para a Figura 28 b), observou-se a presença dos átomos carbono, oxigênio e nitrogênio, com origem semelhante a mencionada anteriormente para a membrana de quitosana/colchicina sem reticulação, entretanto verifica-se uma maior presença do átomo de sódio, sódio este que tem origem do TPP utilizado para reticular a membrana. O tripolisofato de sódio apresenta átomos de oxigênio em sua constituição que podem interferir no percentual do mesmo na análise de EDS. A Figura 28 c) e d), representando as análises de EDS das membranas de quitosana/colchicina reticuladas com solução de 2,5% e 5% de TPP respectivamente, apresentam constituição química semelhante e com idêntica origem a da membrana de quitosana/colchicina reticulada com 1% de TPP, excetuando-se para a presença do átomo de fósforo observado na Figura 28 d), átomo este relacionado ao TPP em excesso observado na MEV para esta mesma membrana.

## 5.6 Ensaio de Ângulo de Molhabilidade

O ensaio de tensão superficial foi realizado para avaliar o perfil hidrofóbico/hidrofílico das membranas de quitosana e quitosana/colchicina, com e sem reticulação.

Observa-se na Figura 29 os resultados da análise de tensão superficial das membranas de quitosana e quitosana/colchicina com e sem reticulação.

Figura 29 – Resultados do Ensaio de Tensão Superficial das membranas de quitosana e quitosana/colchicina, com e sem reticulação.



Fonte – Próprio autor.

Verifica-se na Figura 29 que todas as amostras apresentaram perfil hidrofílico por possuírem ângulo de contato menor que 90° (WOODWARD, 2008). Com a



adição de colchicina às membranas (em todas as amostras) verificou-se diminuição do ângulo de contato indicando aumento da hidrofiliabilidade.

A reticulação das membranas com solução de TPP provocou aumento da hidrofiliabilidade das amostras, exceto para a variação reticulada com solução de 1% de TPP, entretanto as amostras reticuladas com soluções de 2,5% e 5% de TPP apresentaram grande desvio padrão, o que pode indicar regiões de menor e maior hidrofiliabilidade na superfície das membranas. Estes resultados corroboram com os observados na análise por MO onde foi possível verificar diferentes morfologias na superfície da amostra.

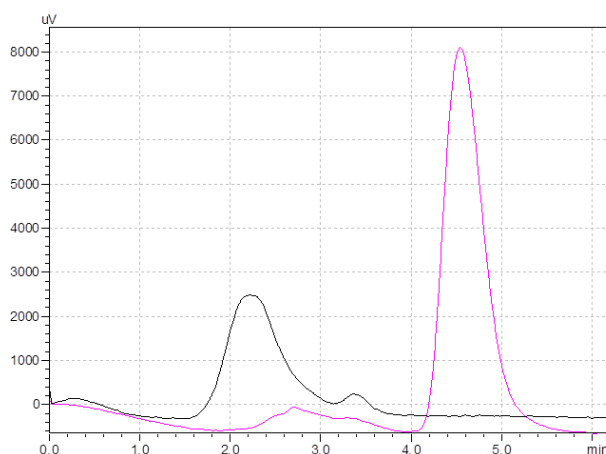
## 5.7 Ensaio de Liberação Controlada de Fármaco

### 5.7.1 Desenvolvimento do método para identificação da colchicina

Durante o desenvolvimento de um método analítico, faz-se necessário a otimização de diversas etapas como a preparação do material, a separação da amostra e a quantificação. O pico de absorção máxima da colchicina dissolvida em metanol ocorreu em 245 nm, e, apresentou um tempo de retenção de 4.21 minutos.

O método analítico desenvolvido foi seletivo para a colchicina, tendo em vista, que houve a separação entre o fármaco em estudo e os picos de possíveis interferentes presentes na membrana de quitosana como observado na Figura 30.

Figura 30 – Cromatogramas das soluções-padrão da colchicina (Rosa) e quitosana (Preto) obtido por CLAE-UV a 245 nm.

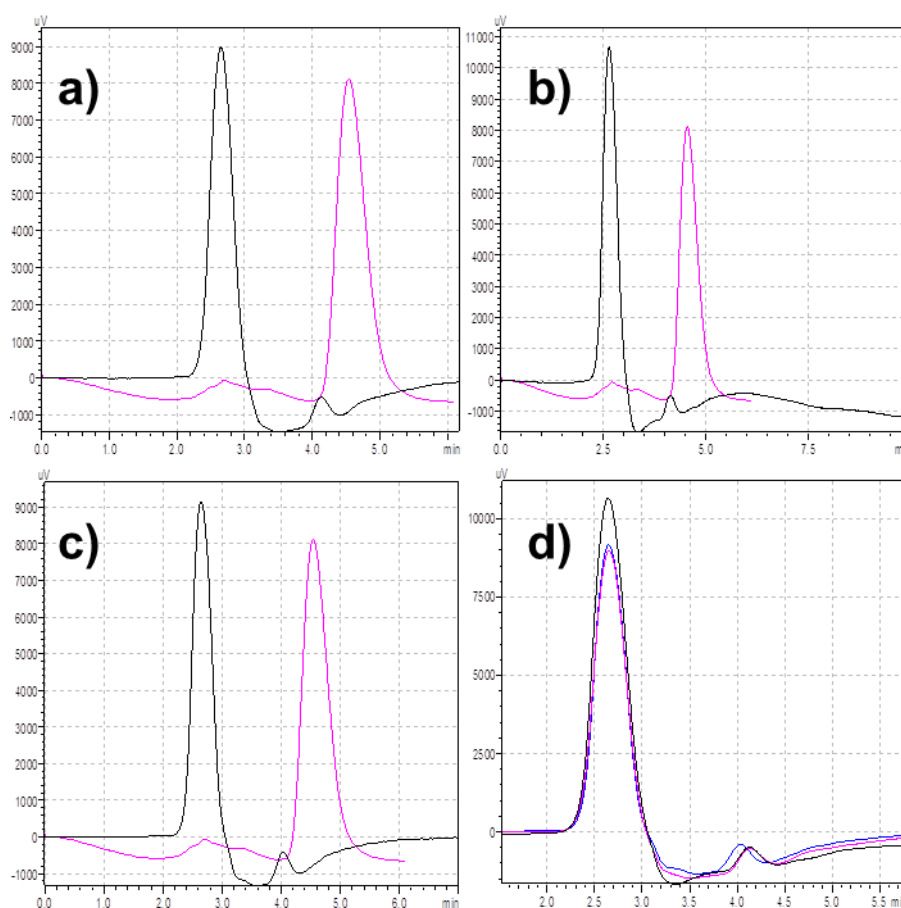


Fonte – Próprio autor.

### 5.7.2 Avaliação da colchicina nas membranas

Foram avaliadas qualitativamente as concentrações de colchicina nas membranas de quitosana/colchicina sem reticulação, quitosana/colchicina reticulada com solução de 1% de TPP e quitosana/colchicina reticulada com solução de 5% de TPP. As alíquotas foram coletadas nos tempos de 30 min, 3 hs e 20 hs. Na Figura 31 observam-se os cromatogramas para a membrana de quitosana/colchicina sem reticulação.

Figura 31 – Cromatogramas da membrana de quitosana/colchicina sem reticulação nos tempos de a) 30 min, b) 3 hs, c) 20 hs e d) sobreposição dos gráficos para comparação dos resultados 30 min (rosa), 3 hs (azul) e 20 hs (preto).



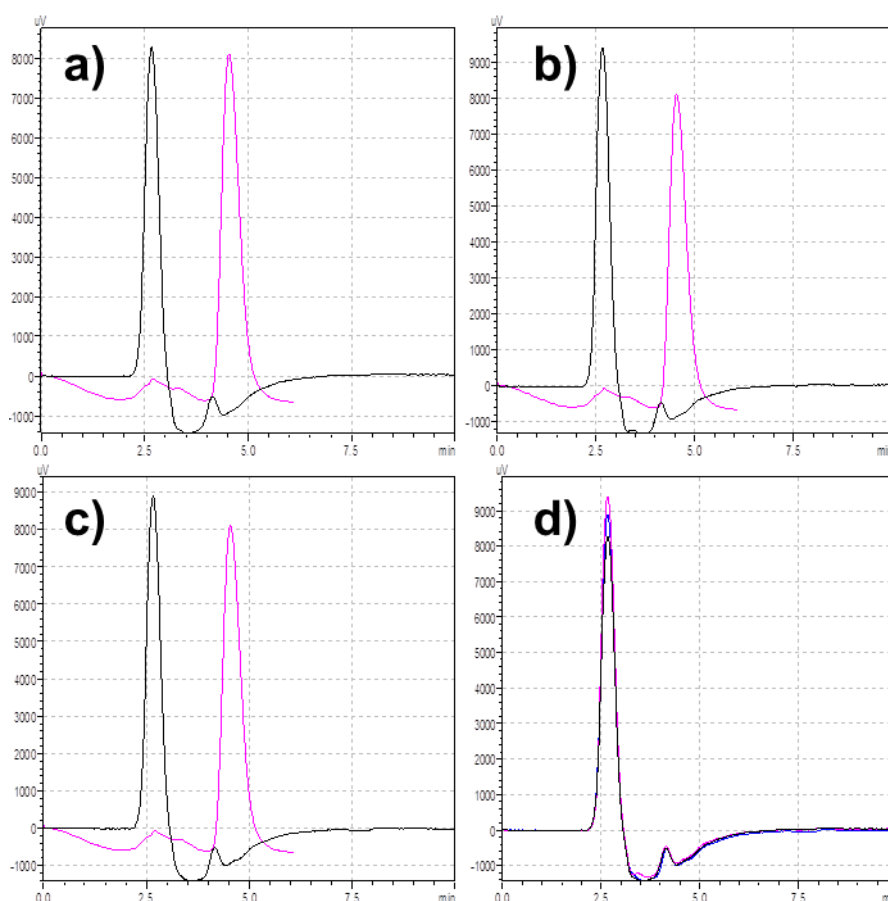
Fonte – Próprio autor.

Verifica-se na Figura 21 a presença (em todos os gráficos) do pico de quitosana, indicando degradação da amostra no decorrer do ensaio, degradação esta que permanece constante do tempo de 30 min a 3 hs (indicado pela

sobreposição dos picos correspondentes visualizados na Figura 21 d)) apresentando acréscimo em 20 hs, entretanto não verifica-se alteração na concentração de colchicina no decorrer do experimento, mantendo-se constante a intensidade do pico de colchicina do ensaio de 30 min até o de 20 hr (que pode ser identificado pela sobreposição dos picos na Figura 21 d)), o que indica que o fármaco foi liberado uma única vez.

Na Figura 32 observam-se os cromatogramas para a membrana de quitosana/colchicina sem reticulação.

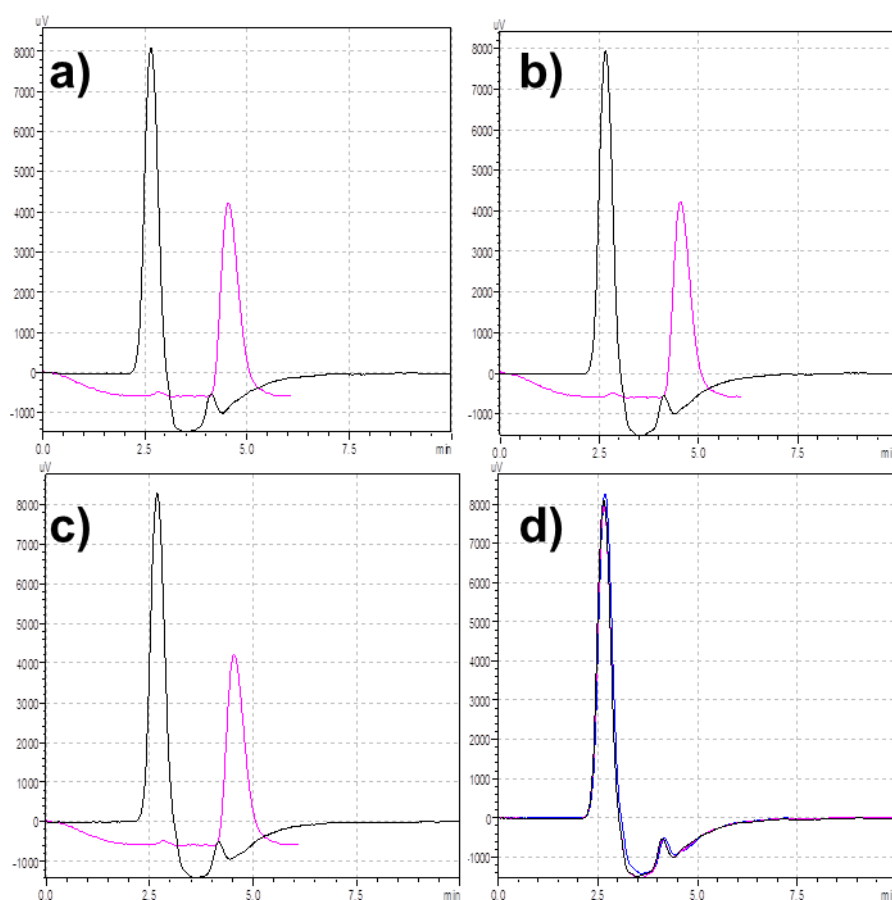
Figura 32 – Cromatogramas da membrana de quitosana/colchicina sem reticulação nos tempos de a) 30 min, b) 3 hs, c) 20 hs e d) sobreposição dos gráficos para comparação dos resultados 30 min (rosa), 3 hs (azul) e 20 hs (preto).



Fonte – Próprio autor.

Na Figura 33 observam-se os cromatogramas para a membrana de quitosana/colchicina sem reticulação.

Figura 33 – Cromatogramas da membrana de quitosana/colchicina sem reticulação nos tempos de a) 30 min, b) 3 hs, c) 20 hs e d) sobreposição dos gráficos para comparação dos resultados 30 min (rosa), 3 hs (azul) e 20 hs (preto).



Fonte – Próprio autor.

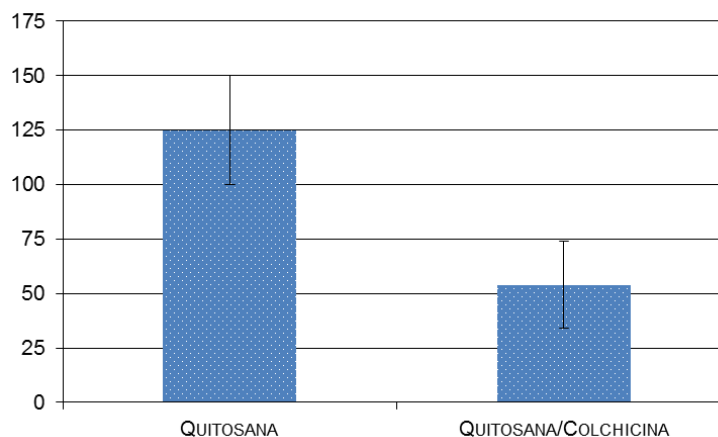
Os resultados obtidos para as amostras de quitosana/colchicina reticuladas com solução de 1% e 5% de TPP apresentaram resultados semelhantes aos da membrana de quitosana/colchicina sem reticulação, indicando uma não variação na taxa de liberação do fármaco que pode ser correlacionada a reticulação.

## 5.8 Ensaio de Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado para avaliar a toxicidade do material em meio biológico, visando que a membrana desenvolvida tem como finalidade o contato íntimo com tecidos biológicos.

Na Figura 34 observam-se os resultados do ensaio de citotoxicidade das membranas de quitosana e quitosana/colchicina sem reticulação.

Figura 34 – Resultados do ensaio de citotoxicidade para as membranas de quitosana e quitosana/colchicina sem reticulação.



Fonte – Próprio autor.

A avaliação da citotoxicidade foi realizada para a membrana de quitosana e quitosana/colchicina sem reticulação, obtendo-se viabilidade de  $(125 \pm 25)\%$  e  $(54 \pm 20)\%$  respectivamente, indicando que a membrana de quitosana/colchicina sem reticulação apresenta certa citotoxicidade, o que é interessante pelo fato que o fármaco incorporado terá como finalidade tratar células cancerosas. Este resultado também demonstra o potencial da membrana de quitosana em liberar o fármaco, considerando que a membrana apenas de quitosana não apresenta toxicidade (viabilidade de  $(125 \pm 25)\%$ ) em meio biológico, sendo a toxicidade observada no ensaio decorrente do fármaco liberado.

## 6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados chegaram-se as seguintes conclusões:

- A viabilidade de incorporar colchicina em solução de quitosana e obter membranas densas destas soluções;
- A partir da difração de raios X pode-se verificar aumentos da intensidade de cristalinidade da membrana de quitosana por incorporação de colchicina a solução matriz, além de verificar que o processo de reticulação com TPP provocou diminuição da intensidade dos picos cristalinos da quitosana, diminuição esta ocasionada pela reticulação iônica desorganizada ocasionada pelo tripolifosfato de sódio;
- Com o espectro de FTIR pode-se verificar certa interação entre o fármaco e os grupamentos amina da quitosana. Verificou-se também para as membranas reticuladas aumento da intensidade das pontes de hidrogênio relacionadas a reticulação por TPP;
- Por microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura pode-se verificar alteração da morfologia densa, da quitosana, para rugosa por incorporação da colchicina a solução matriz, rugosidade esta que foi acentuada com a reticulação com TPP. Verificou-se também que a reticulação por tripolisfosfato de sódio ocorre de diferentes formas na superfície da membrana gerando regiões com divisões de fases;
- A partir da análise de ângulo de molhabilidade verificou-se diminuição do perfil hidrofóbico da membrana decorrente da reticulação por TPP, diminuição esta oriunda da estrutura menos organizada da membrana gerada pela reticulação por tripolifosfato de sódio.
- De acordo com o ensaio de liberação controlada de fármaco pode-se observar que o fármaco não é liberado de forma contínua, liberado apenas uma única dosagem no intervalo de 20 hs, fato este que pode estar relacionado a forma de liberação matricial da membrana de quitosana/colchicina que necessita se degradada para que a liberação do fármaco ocorra. Não foi verificada variação no padrão de liberação decorrente do processo de reticulação.

- A partir do ensaio de citotoxicidade pode-se constatar que a membrana apresenta certa citotoxicidade. Este resultado demonstra também o potencial da membrana de quitosana em liberar o fármaco, considerando que a membrana apenas de quitosana não apresenta toxicidade em meio biológico, sendo a toxicidade observada no ensaio decorrente do fármaco liberado.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, M.H.; CHADHA, H.S.; MITCHELL, R.C. The factors that influence skin permeation of solutes. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v.47, n.1, p.8-16, 1995.
- ABRAMOVITS W, A cryosurgeon's view point of exision vs crycirurgery or basal cell carcinomas. **Dermatol surg.** 34, 582. 2008.
- ABREU, M. A. M. M. Colchicina tópica para tratamento do Carcinoma basocelular. **An Bras Dermatol.**; 83 (supl 1): S1 – 158, 2008.
- ALLEN JR, L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL H. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos.** 8. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, , 2007.
- ALLEVATO M A. Sistemas Terapêuticos Transdérmicos. **Acta Terap Dermatol**; 30: 154 – 165,2007.
- ALVAREZ -RONAM, R. at al Visualization of skin penetration using confocal laser scanning microscopy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** (58): 301-316, 2004.
- ANSEL, H.C at al Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. 6.ed. **São Paulo: Premier**, 2000.
- ASADA M, et al. Solid basal cell epithelioma possibly originates from the outer root sheath of the hair follicle. **Acta Derm Venereol** (Stockh) 1993;73:286.
- AULTON, M. E. Delineamento de Formas Farmacêuticas. 2 ed. Porto Alegre: Art med, 2005.
- AZEVEDO, J.R. et. al. Physical and chemical characterization insulin-loaded chitosan-TPP nanoparticles. **J Therm Anal Calorim**, 2011.
- AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomaterial. **Revista Eletrônica de Materias e Processos**; v. 2,3, p. 27 – 34, 2007.
- BADRAN, M.M.; KUNTSCHKE, J.; FAHR, A. Skin penetration enhancement by a microneedle device (Dermaroller®) in vitro: Dependency on needle size and applied formulation. **Eur J Pharm Sci.**; 36(4-5):511-23, 2009.
- BALE AE, YU K. The Hedgehog pathway and basal cell carcinomas. **Hum Mol Genet** 2001;10:757-62.
- BARROS, MA, GIORDANA, AMS. Radioterapia. In: Ayoub AC, Fontes ALC, Silva MAA, Alves NRC, Gigliotte P, Silva YB. Planejando o cuidar na enfermagem oncológica. São Paulo (SP): Lemar; 2000. p. 187-99.



BAXTER, A.; DILLON, M.; ANTHONY TAYLOR, K. D.; ROBERTS, G. A. Improved method for ir determination of the degree of N-acetylation of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.14, n.3, p.166-169, 1992.

BAYLIN SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. **Nat ClinPractOncol**, v.2 Suppl 1, p.S4-11, 2005.

BAYLIN SB; HOPPENER JW.; DE BUSTROS A; et al. DNA methylation patterns of the calcitonin gene in human lung cancers and lymphomas. **Cancer Res**, v.46, n.6, p.2917-22, 1986.

BERGMAN, C. P.; STUMPF, A. Microstructure, Properties and Degradation. **Dental Ceramics**, VII, 84f, 2013.

BIRD A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes Dev**, v.16, n.1, p.6-21, 2002.

BLACKWELL, J.; WEIH, M. A. Structure of chitin-protein complexes: Ovipositor of the ichneumon fly *Megarhyssa*. **Journal of molecular biology**, v. 137, n. 1, p. 49-60, 1980.

BOGELUND FS, PHILIPSEN PA, GUIADECK R. Fctors ffeeting the recurrence rte of basal cell carcinoma. *Acta Derm Venerol*; 87(4): 330-334; 2007.

BORTOLON, F.F.; SATO, M.E.; ANDREAZZA, R.C.S.; BRESOLIN, T.M.B. Effect of enhancers on the in vitro percutaneous absorption of piroxicam from compounding formulations. **Rev Bras Farm**. 44(3):433-49, 2008.

BOTTO N, ROGERS G. Nontradicional management of basal cell carcinoma. *J Drugs Dermatol*. 2013; 12(5): 525-532.

BRANDÃO H N, DAVID J P, COUTO RD, NASCIMENTO J A P, DAVID J M. Química e Farmacologia de Quimioterápicos Antineoplásicos Derivados de Plantas. **Química Nova**, 33(6), 2010.

BRONAUGH, R.L. et al. Percutaneous Absorption. 2 nd.ed. **New York: Marcel Dekker**, p.197-200; 283,284, 1989.

CALVO, P.; REMUÑÁN-LOPEZ, C.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. **Pharm. Res.**, v.14, p. 1431-1436, 1997.

CAMPAGNOLO O A, OLEG IOSIFOVICH D. M. SABATOVICH, AZULAY M M, CARNEIRO S C S, AZULAY R D. Colchicina em dermatologia :**Anais Bras dermatol** 64(6)329-33 1989.

CARDOSO, M. B.; **Contribuição ao estudo da reação de desacetilação de quitina: Estudos da desacetilação assistida por ultrassom de alta potência**. 2008. 95f. Tese (Doutorado em Físico-Química) Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos.

CAMPANA-FILHO, S.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F.; CARDOSO, M.; BATTISTI, M.; SIM, P.; GOY, R.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. Extração, estruturas e propriedades de  $\alpha$ - e  $\beta$ -quitina. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p.644-650, 2007.

CARVALHO, T. C. Biomateriais à base de quitosana de camarão e bactérias para remoção de metais traços e petróleo. **Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Ceará**, 117 f., 2006.

CEVC, G.; BLUME, G.; SCHÄTZLEIN, A.; GEBAUER, D.; PAUL, A. The skin: a pathway for systemic treatment with patches and lipid based carriers. **Adv. Drug Del. Rev.**, Amsterdam, v.18, n.3, p.349-378, 1996.

CEVC, G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. **Adv. Drug Del. Rev.**, Amsterdam, v.56, n.5, p.675-711, 2004.

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

DASH, A. K.; CUDWORTH, G. C. Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v.40, p.1-12, 1998.

CHORILLI, M, at al. Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos, **Rev. Bras. Farm.**, 88(1): 1- 12, 2007

CHORILLI, M. at al. Estudo da influência do ultra-som na eficácia de gel acrescido de hialuronidase através de avaliação histológica. **Cosmetics & Toiletries** 15(3): 58, 2003.

CIRRONE F, HARRIS CS. Vismodegib and the hedgehog pathway: a new treatment for basal cell carcinoma. **Clin The.** 2012 Oct;34(10):2039-50. doi: 10.1016/j.clinthera.2012.08.011.

CONTRAM RS, KUMAR V, COLLINS T. Neoplasia. Patologia estrutural e funcional. 6ª ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan; 2000.

DIMITRIU, S. Polymeric Biomaterials. New York: Marcel Dekker, 1993.

DE ROSA G, BARRA E, STAINBANO S, et al. Fibronectin, laminin, type IV collagen distribution, and myofibroblastic stromal reaction in aggressive and nonaggressive basal cell carcinoma. **Am J Dermatopathol** 1994;16:258-67.

DAWBER RPR, WALKER NPJ, LAWRENCE CM. Physical and Laser Therapies. In: Champion RH, Burton JL, Burns DA, Breathnach SM, eds. **Rook/Wilkinson/Ebling Textbook of Dermatology. 6th Edition**. London: Blackwell Science, 1998:3573-92.

DITTEGEN, M. Transdermale therapeutische systeme. **Med. Monatsschr. Pharm.** (21): 365.3771998.

FERREIRA, P.; COELHO, J. F. J.; SANTOS, K. S. C. R. DOS; FERREIRA, E. I.; GIL, M. H. Thermal characterization of chitosan-grafted membranes to be used as wound dressings. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v.25; p.233-251, 2006.

FIALHO SL, SILVA-CUNHA, AJ. Sistemas de transporte de drogas para o segmento posterior do olho: bases fundamentais e aplicações. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 70, n. 1, p. 173-179, 2007.

FLEISCHER AB, FELDMAN SR, BARLOW JO, et al. The specialty of the treating physician affects the likelihood of tumor-free resection margins for basal cell carcinoma: Results from a multi-institutional retrospective study. **J Am Acad Dermatol** 2001;44:224-30

FOURNIER, E. et al. Biocompatibility of implantable sythetic polymer drug carriersfocus on brain biocompatibility. **Biomaterials**. v. 24, nº 19, p. 3311 – 3331, 2003.

FREEPONS, D. Enhancing food production whit chitosan seed-coating technology. In: MUZZARELLI, R.; JEUNIAUX, C.; GOODAY, G. W. (Ed.). Chitin in nature and technology. **New York: Plenum Press**, 1986.

GAILANI MR, BALE AE. Developmental genes and cancer: role of patched in basal cell carcinoma of the skin. **J Natl Cancer Inst** 1997;89:1103-9.

GALAEV, I.Y.; MATTIASSON, B. “Smart” polymers and what they could do in biotechnology and medicine. **Trends Biotechnol.**, Amsterdam, v. 17, p.335-340, 1999.

GANTI AK, KESSINGER A. Systemic Therapy for disseminated basal cell carcinoma, an uncommon manifestation of a common cancer. **Cancer Treat. Rev.** 2011; 37(6): 440-443.

GOLDENBERG, G; HOMID, O. Non Surgical Treatment Optcions for Basal Cell Carcinoma – Focus on Advanced Disease. **J Drugs in Dermatology**; 12(12): 1369 – 1378, 2013.

GONÇALVES, A. A. et al. Diferentes estratégias para reticulação da quitosana. **Química Nova**; v. 34(7): São Paulo, 2011.

HADGRAFT, J.; LANE, M.E. Skin permeation: **The years of enlightenment. International Journal of Pharmaceutics** (305): 2-12, 2005.

HAMUKSELA – SVAHN A, PUKKALA E, KARVONER J. Basal Cell Skin Carcinoma and Other Nonmelanoma Skin Cancers in Finland from through. **Arch Dermatol**; 135: 781-6,1999.

HEITZER E, LASSACHER A, QUEHENBERGER F, KERL H, WOLF P. UV Fingerprints Predominate in the PTCH Mutation Spectra of Basal Cell Carcinomas

Independent of Clinical Phenotype. **Journal of Investigative Dermatology** (2007) 127, 2872–2881.

HERSEY P. Impediments to successful immunotherapy. **Pharmacol. Ther.** V. 81, p. 111-119, 1999.

HOLMES EJ, BENNINGTON JL, HABER SL. Citrulline-containing basal cell carcinomas. **Cancer** 1968;22:663.

HOUK, J.; GUY, R.H. Membrane models for skin penetration studies. **Chem. Rev.**, Washington, v.88, n.3, p.455-471, 1988.

HWANG, K. T.; KIM, J. T.; JUNG, S. T.; CHO, G. S.; PARK, H. J. Properties of chitosan-based biopolymer films with various degrees of deacetylation and molecular weights. **Journal of Applied Polymer Science**, v.89, p.3476-84, 2003.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. Incidência de Câncer no Brasil – Estimativa 2014. **Ministério da Saúde**, 2014.

JACOBS, I.C.; MASON, N.S. Polymer delivery systems concepts, in Polymeric delivery systems: properties and applications, B.A. Charpentier, Editor, **American Chemical Society**: Washington, DC. 1993, p. 1-17.

JAIN PK. Epigenetics: the role of methylation in the mechanism of action of tumor suppressor genes. **Ann N Y AcadSci**, v.983, p.71-83, 2003.

JALÓN, E.G.; JOSA, M.; CAMPANERO, M.A.; SANTOYO, S.; YGARTUA, P. Determination by highperformance liquid chromatography of ketoprofen in vitro in rat skin permeation samples. **J. Chromatogr. A.** 870(1-2):143-9, 2000.

JONES, D. Pharmaceutical applications of polymers for drug delivery. **Shrewsbury: Smithers Rap**, v. 15, 2004.

JOHNSON RL, ROTHMAN AL, XIE J, et al. Human homolog of patched??PTCH??, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. **Science** 1996;272:1668-71.

KIM, I.-Y.; SEO, S.-J.; MOON, H.-S.; YOO, M.-K.; PARK, I.-Y.; KIM, B.-C.; CHO, C.S. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. **Biotechnology Advances**, v.26, p.1-21, 2008.

KIM, S. et al. Engineered polymers for advanced drug delivery. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** , v. 71, nº 3, p. 420 – 430, 2009.

KIRKHAM N. Tumors and Cysts of the Epidermis. In: Elder D, Elenitsas R, Jaworsky C, Johnson Jr B. eds. **Lever's - Hystopathology of the Skin**. 8th Edition. Philadelphia New York: Lippincott-Raven Publishers, 1997:685-746.

KLIGERMAN J., Câncer e Qualidade de vida. **Revista Brasileira de Cancerologia** - Volume 45 nº2 Abr/Maio/Jun 1999.

KOPKE, L F F; SHIMIDT, S M. Carcinoma basocelular. **An Bras Dermatol**, 77(3):249-85, 2002.

KUDCHADKAR R. et al. Advances in the treatment of basal cell carcinoma: Hedgehog Inhibitors. **Sem. Oncol**; 39(2), 139-144, 2012.

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

LAIRD PW. Cancer epigenetics. **Hum Mol Genet**, v.14 Spec No 1, p.R65-76, Apr 15, 2005.

LANG PG Jr, MAIZE JG. Basal Cell Carcinoma. In: Friedman R, Rigel D, Kopf A, Matthew N, Baker D, eds. Cancer of the skin. Philadelphia London Toronto Montreal Sydney Tokyo: Saunders Company, 1991: 35-73.

LARA, J.R.L; MIGUEL, V.E.R; KOWALSKY, L.P.; BOTTURA, L. Carcinoma basocelular metastático. Relato de caso. **Bras Dermatol**,76(4):429-35, 2001.

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

LAROCQUE K, OVADJE P, DJURDJEVIC S, MEHDI M, GREEN J, PANDEY S. Novel Analogue of Colchicine Induces Selective Prodeath Autophagy and Necrosis in Human Cancer cell. **Plos One**; 9(1): e87064: 1 – 10, 2014.

LEE, T.W.Y; ROBINSON, J.R. Sistema de Liberação Controlada de Drogas. In: GENNARO, A.R.(Ed.) Remington: **A Ciência e a Prática da Farmácia**, 20.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap.47, p.931-960, 2004.

LEFELL DJ, FITZGERALD DA. Basal Cell Carcinoma. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, et al. eds. **Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine**. 5th Edition. New York: McGraw-Hill, 1999:857-64.

LEI, Y.; LU, Y.; QI, J.; NIE, S.; HU, F.; PAN, W.; WU, W. Solid self-nanoemulsifying cyclosporin A pellets prepared by fluid-bed coating: preparation, characterization and in vitro redispersibility, 2011.

LIMA, R.S.C. Desenvolvimento de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos: Quitosana/Insulina. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos). Universidade Federal de Campina Grande, 2010, 112 f.

LI E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. **Nat Rev Genet**, v.3, n.9, p.662-73, 2002.

LI Z J, MACK S C, MAK1 T H ,ANGERS S, TYLOR M D and HUI1. Evasion of p53 and G2/M checkpoints are characteristic of Hh-driven basal cell carcinoma. **Oncogene**.2014, May, 15;33(20):2674-84

LIU, S. et al. Polymer – based therapeutics macromolecules; v. , 2009.

LOPES, C. M. et al. Formas Farmacêuticas de Liberação Modificada: polímeros disponíveis. **Rev. Bras.Ciê.Farm.** v.41, nº 2, p. 143 – 154, 2005,

LOURENÇO, V. A. Desenvolvimento e avaliação de micropartículas de quitosana para a veiculação de dimetilaminoetanol (DMAE) na pele. **Tese de Mestrado, Universidade de São Paulo**, 2006.

MACKIE RM. Epidermal Skin Tumors. In: Champion RH, Burton JL, Burns DA, Breathnach SM, eds. **Rook/Wilkinson/Ebling Textbook of Dermatology**. 6th Edition. London: Blackwell Science, 1998:1651-93.

MARTINEZ MAR, FRANCISCO G, CABRAL LS; et al. Genética molecular aplicada ao câncer cutâneo não melanoma. **An Bras Dermatol**. 2006;81(5):405-19.

MARTÍNEZ, G.; DE LA ROSA,G.; BOSACONA,N. Intoxicación fulminante por colchicine.**Farmácia Hospitalaria**, 32(2): 125-127, 2008.

MICALI G., LUCARRUBA F, NASCA MR, FERRARO S, SCHWARTZ A. Topical pharmacotherapy for skin cancer. Part II clinical applicattions. *J Am Acad Dermatol*. June; 2014;70 (6): 979(12).

MOURA, M. J. Aplicações da Quitosana em Liberação Controlada de Fármacos: algumas considerações. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.8, N.14; 2012.

MUZZARELLI, R. A. A.; ROCCHETTI, R. The determination of the degree of acetylation of chitosan by spectrophotometry. In: MUZZARELLI, R.; JEUNIAUX, C.; GOODAY, G. W. (Ed.). **Chitin in nature and technology**. New York: Plenum Press, 1986.

NANGIA R, SAIT SNJ, BLOCK A, et al. Trisomy 6 in Basal Cell Carcinomas Correlates with Metastatic Potential - A Dual Color Fluorescence in Situ Hybridizations Study on Paraffin Sections. **Cancer** 2001;91:1927-32.

OLIVEIRA, R.B et al Polímeros na obtenção de Sistemas de liberação de fármacos/ **Revista Eletrônica de Farmácia** Vol 3 (2), 29-35, 2006.

ORÉFICE, R. L. et al. Materiais Poliméricos – Ciência e Aplicação como Biomateriais. **Biomateriais: fundamentos e aplicações** – Rio de Janeiro: Cultura Médica; p. 87 – 155, 2006.

OZGÜNEY, I.S.; KARASULU, H.Y.; KANTARCI, G.; SÖZER, S.; GÜNERI, T.; EERTAN, G. Transdermal delivery of diclofenac sodium through rat skin from various formulations. **AAPS Pharm Sci Tech** 39-45, 2006.

PANDIT, N. K. Introdução às Ciências Farmacêuticas. Porto Alegre: Artmed, 2008.

PAPARELLA, S.; VALLEY, H. Transdermal patches: an unseen risk for harm. **Journal of Emergency Nursing** 31(3): 278-281, 2005.

PATENTE US 8519002 B2, Colchicine solid complex: methods of making; and methods of use thereof, 2013.

PATI, F.; ADHIKARI, B.; DHARA, S.; DEVELOPMENT OF CHITOSAN-TRIPOLYPHOSPHATE FIBERS THROUGH PH DEPENDENT IONOTROPIC GELATION, CARBOHYDRATE RESERCH, 2011.

PETER, M. G. Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. **Pure Appl. Chem.**, v. 32, p. 629-640, 1995.

PEZZINI, B. R.; SILVA, M.A.S.; FERRAZ, H.G. Fórmulas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n.4, p.491-502, 2007.

PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. Polymers in drug delivery, **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 5, p. 447-451, 2001.

PILLAI, O. et al. Drug delivery: on odyssey of 100 years. **Curr. Opin. Chem. Biol.** V. 5 nº 4, p. 439 – 446, 2001.

PONCIANO, J. J. Desenvolvimento de membranas bioabsorvíveis com variado nível de orientação molecular para aplicação como biomaterial. 2010. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciência e Tecnologia. Campina Grande, 2010.

PRISTA, L. N. et al. Tecnologia Farmacêutica. 4. Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996.

RAMOS-E-SILVA, M. R. Carcinoma Basocelular. **Fundamentos da Dermatologia 1**; 2: 1717 – 1733, 2010.

RASSNER G, SCHLAGENHAUFF B, BREUNINGER H. DER klinische Variantenreichtum der Basaliome und seine Bedeutung. In: Petres J, Lohrisch I, eds. Das Basaliom - **Klinik und Therapie**. Berlin: Springer-Verlag, 1993: 3-11.

RASOOL, B. K. A.; AZIZ, U. S.; SARHEED, O.; RASOOL, A. A. A. Design and evaluation of a bioadhesive film for transdermal delivery of propranolol hydrochloride. **Acta Pharmaceutica**, v.61, p.271-282, 2011.

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. L.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. Biomaterial Science, 3ª Edição, 2013.

REIS, R.L. et al. Smart Systems based on Polysaccharides. **Natural – Based Polymers For Biomedical Applications**: p. 131 - 135, 2008.

RIOS, M. Polymers for Controlled Release: Formulation Follows Function. **Pharm. Technol.** , New York, v. 29, n. 6, p. 42 – 50, 2005.

ROEW DE, CARROLL RJ, DAY Jr. CL. Long-term recurrence rates in previously untreated (primary) basal cell carcinoma: Implications for patient follow-up. **J Dermatol Surg Oncol** 1989;15:315-28

RÜNGER T M & Ulrike P. Kappes. Mechanisms of mutation formation with long-wave ultraviolet light (UVA) **Department of Dermatology, Boston University School of Medicine, Boston, MA, USA. Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine** 24, 2–10, 2008.

SALDANHA G. The Hedgehog signaling pathway and cancer. **J Pathol** 2001;193:427-32.

SALOMÃO P, KOPEK LFF, ACHADO-PINTO J. Palmar basal cell carcinoma: case report and literature review. **Dermatol Surg** 1999;25:908-10.

SAMPAIO, S.A.P.; RIVITTI, E.A. Anatomia e fisiologia. **Dermatologia**. São Paulo: Artes Médicas , cap. 1, p.5. 2001.

SANTOS, J. E.; SOARES, J.; DOCKAL, E.; CAMPANA-FILHO, S. P.; CAVALHEIRO, É. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.13, n.4, p. 242-249. 2003.

SCHAFFAZICK, J.R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726 – 737, 2003.

SHIN, S.C.; KIM, H.J.; OH, I.J.; CHO, C.W.; YANG, K.H. Development of tretinoin gels for enhanced transdermal delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** (60): 67.71, 2005.

SILVA, P. **Farmacologia**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

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

SILVERMAN MK, KOPF AW, GRIN CM, BART RS, LEVENSTEIN MJ. Recurrence rates of treated basal cell carcinomas. Part 1: Overview. **J Dermatol Surg Oncol** 1991;17:713-18.

SILVERMAN MK, KOPF AW, GLADSTEIN AH, BARTt RS, GRIN CM, LEVENSTEIN MJ. Recurrence rates of treated basal cell carcinomas. Part 4: X-Ray Therapy. **J Dermatol Surg Oncol** 1992;18:549-54.

SMITH JB, RANDLE HW. Giant Basal Cell Carcinoma and Cigarette Smoking. **Cutis** 2001;67:73-6.



SIMONSEN, L.; PETERSEN, M.B.; Groth, L. In vivo skin penetration of salicylic compounds in hairless rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** (17): 95-104, 2002.

SINGH, S.; SINGH, J. Transdermal drug delivery by positive diffusion and iontophoresis: a review. **Med. Res. Rev.**, New York, v.13, n.5, p.569-621, Sep. 1993.

SNOW SN, SAHL I W, LO SJ, et al. Metastatic Basal Cell Carcinoma. Report of five cases. **Cancer** 1994;73:328-35.

SOARES, G. A. Biomateriais: Classificação, Seleção e Avaliação. **EE e COPPE/UFRJ**, Rio de Janeiro, 2002.

SOVER HP, CERRONI L, KERL H. Basaliom und Metastasen. In: Petres J, Lohrisch I, eds. Das Basaliom - **Klinik und Therapie**. Berlin: **Springer-Verlag**, 1993: 25-30.

STERN, R.S. The mysteries of geographic variability in nonmelanoma skin cancer incidence (editorial). **Arch Dermatol**.135:843-4,1999.

SUHONEN, T. M., BOUWSTRA J. A., URTTI, A. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v.59, 1999.

SUN, Y et al. Application of artificial neural networks in design of controlled release drug delivery systems. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 55; nº 9, p. 1201 – 1215, 2003.

SWART, H.; BREYTENBACH, J.C.; HADGRAFT, J.; PLESSIS, J. Synthesis and transdermal penetration of NSAID glycoside esters. **Int. J. Pharm.** 71-9, 2005.

TOREZAN L I; NIWALL A B M; NETO C F. Terapia fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações: **An. Bras. Dermatol.** vol.84 no.5 Rio de Janeiro Sept./Oct. 2009.

TELFER N R, COLVER G B\* and MORTON C A. Guidelines for the management of basal cell carcinoma. **British Journal of Dermatology** 2008 159, pp35–48

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

VALLE,E. M. M. et al. Drug delivery Technologies: The Way forward in the new decade. **Ind. Eng. Chem. Res**, v. 48, nº 5, p. 2475 – 2486, 2009.

VALENTA, C.; AUNER, B.G. The use of polymers for dermal and transdermal delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** (58): 279-89,2002.

VENKATREMAN, S.; GALE, R. Skin adhesives and skin adhesion . **Transdermal drug delivery systems**. **Biomaterials** (19): 1119.1136, 1998.

VEIGA, F.; MARTINS, M. F. R. M. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 38, n. 1, 2002.

VOGT, A.; MANDT, N.; LADERMANN, J.; SCHAEFER, H.; BLUME-PEYTAVI, U. Follicular targeting-a promising tool in selective dermatotherapy. **J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.**, Oxon, v.10, p.252-255, 2005.

VOIGHT, R. , BORNSCHEIN, M. **Tratado de Tecnologia Farmacêutica**. 3 ed. Zaragoza: Editorial Acrilia, 1982.

WALLS B. et al, Targeted therapy for cutaneous Oncology: Skin Cancer Part I. *Drugs Dermatol*; 13(8): 947 – 952, 2014.

WILLIAMS, D. F. *The Williams Dictionary of Biomateriais*. Liverpool: University Press, 1999.

WONG CSM, STRANGE RC, LEAR JR,. Basal cell carcinoma. **B.M.J** 327:794-8, 2003.

ZAGUE, V.; GUIRADO, G.N.; CHORILLI, M.; VIEIRA, C.E.C.; POLACOW, M.L O.; PIRES-DE-CAMPOS, M.S.M.; LEONARDI, G.R. Transmissibility of ultrasound through the hydrophilic gel increase of hyaluronidase. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** . 39(2): 100, 2003.

ZHAN, X.; TANG, G.; CHEN, S.; MAO, Z. A new copolymer membrane controlling clonidine linear release in a transdermal drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics** 2006 322: 1-5.

ZHU, Y. Properties of polymeric drug delivery systems prepared by hot-melt extrusion. 2002. Tese (Doutorado)- Faculty of the Graduate School of the University of Texas, Austin, 2002.