

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

Paula Bezerra de Araújo

**MATRIZES DE QUITOSANA/GELATINA PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE
ETONOGESTREL**

Campina Grande - PB

2018

Paula Bezerra de Araújo

**MATRIZES DE QUITOSANA/GELATINA PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE
ETONOGESTREL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais**.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook

Campina Grande - PB

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

A663m Araújo, Paula Bezerra de.
Matrizes de quitosana/gelatina para liberação controlada de etonogestrel / Paula Bezerra de Araújo. – Campina Grande, 2018.
59 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2018.
"Orientação: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook".
Referências.

1. Biomateriais. 2. Métodos Contraceptivos. 3. Etonogestrel. 4. Quitosana/Gelatina. I. Fook, Marcus Vinicius Lia. II. Título.

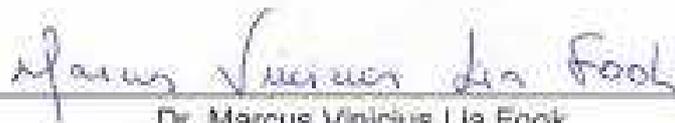
CDU 62:61 (043)

PAULA BEZERRA DE ARAÚJO

MATRIZES DE QUITOSANA/GELATINA PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE
ETONOGESTREL

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciência e
Engenharia de Materiais como requisito
parcial à obtenção do título de **Mestre
em Ciência e Engenharia de
Materiais**.

Aprovado em: 21/02/2018



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



Dr.ª Rosana Araújo Rosendo
Examinadora Externa
UFCG/CSTR



Dr.ª Vânia Barbosa Coutinho
Examinadora Externa
COESP/J.PESSOA



Dr. Geírmes de Araújo Neves
Examinador Interno
PPG-CEMat/UAEMa/UFCG

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar aos meus pais, que por mais que houvesse dificuldades, sempre batalharam para me educarem e tornarem a pessoa que sou hoje...

Ao meu marido Marcelo o qual sempre me apoiou e me incentivou a correr atrás dos meus sonhos e objetivos...

Ao Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook orientador e grande amigo que ganhei nesses dois anos e meio de convivência, uma pessoa maravilhosa e com um imenso coração, além de tudo um grande professor e incentivador da ciência.

Ao Dr. Wladymyr Jefferson B. de Sousa, orientador de laboratório, e além de tudo um grande colega, que nos momentos mais necessários sempre esteve disposto a esclarecer minhas dúvidas...

Ao Dr. Rosseberg por sempre ajudar e dar contribuições para o desenvolvimento do trabalho.

Ao CERTBIO e em especial a Thiago Guedes e a André Júnior, pelos ensinamentos em laboratório.

Aos colegas do mestrado que tornaram as aulas e responsabilidades mais lúdicas e agradáveis.

A todos que conviveram comigo, seja nos momentos felizes, nos momentos de angústias e tristezas, muito obrigada por fazerem parte dessa etapa de minha vida...

“A coragem é a primeira das qualidades humanas
porque garante todas as outras”.

Aristóteles

RESUMO

Os usos de métodos anticoncepcionais trouxeram à sociedade um avanço incontestável à mulher, resultando em uma modificação da visão sexual feminina, fazendo com que o início da atividade sexual ocorresse cada vez mais precoce. Entretanto, a falha do uso dos métodos contraceptivos pode acarretar na gravidez indesejada, impactando assim nos índices de mortalidade materna, nos resultados perinatais e em déficits socioeconômicos no futuro desta nova família gerada. Entre os contraceptivos com uma menor taxa de falha encontram-se os métodos reversíveis de longa duração, destacando os implantes subdérmicos de etonogestrel, considerado um fármaco altamente eficaz e com rápida reversibilidade quando retirado do organismo. No entanto, os implantes têm suas complicações devido a inserção e retirada o que gera restrições ao método. Busca-se atualmente um sistema de liberação de fármaco de longa duração e menos invasivo e que seja constituído por uma matriz biodegradável. Sabendo-se das características da quitosana e da gelatina como biopolímero biodegradável e que apresenta propriedades físico-químicas e biológicas para este tipo de aplicação, essa pesquisa teve como objetivo o desenvolvimento de um biomaterial de quitosana e gelatina para liberação do etonogestrel. O sistema de liberação de fármaco na forma de membrana foi preparado pelo método de evaporação de solvente, através da dissolução da quitosana em ácido acético 1% (v/v), sendo acrescentada a gelatina nas proporções de 5 e 10% em relação a massa da quitosana, e posterior incorporação do fármaco. Para neutralização, as membranas foram submetidas a uma atmosfera de hidróxido de amônio a 2 % (v/v) por 48hs. Todas as amostras foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)/ Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDS), Difração de raios-X (DRX), Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Molhabilidade por Medida de Ângulo de Contato, Biodegradação, Intumescimento e Citotoxicidade. O ensaio de MEV demonstrou que a incorporação do fármaco ocorreu de forma homogênea. No DRX observou-se que após a adição do etonogestrel ocorreu um aumento da cristalinidade dos filmes. Os espectros de FTIR comprovaram que houve interação entre o Etonogestrel e a matriz polimérica. A Molhabilidade denotou um caráter hidrofílico das amostras. Na análise de biodegradação, observou-se que a mesma é influenciada pela concentração de gelatina e pela ação da lisozima. Quanto ao grau de intumescimento, observou-se um maior aumento das amostras com fármaco. Quanto ao ensaio de Citotoxicidade todas as amostras estudadas apresentaram-se viáveis para ser utilizadas como biomaterial. Sendo assim, conclui-se que as membranas apresentam potencial para utilização em sistema de liberação de etonogestrel, vislumbrando o uso como biomaterial biodegradável com ação contraceptiva.

Palavras-Chave: Contracepção. Etonogestrel. Bioabsorção. Liberação de Fármaco. Biomateriais.

ABSTRACT

The use of contraceptive methods brought to society an undeniable advance to the woman, resulting in a modification of the female sexual vision, causing the onset of sexual activity to occur more and more precocious. However, failure to use contraceptive methods can lead to unwanted pregnancies, thus affecting maternal mortality rates, perinatal outcomes and socioeconomic deficits in the future of this new family. Among contraceptives with a lower failure rate are reversible long-term methods, highlighting etonogestrel subdermal implants, considered a highly effective drug and with rapid reversibility when withdrawn from the body. However, implants have their complications due to insertion and withdrawal which creates restrictions to the method. A long-term and less invasive drug delivery system is currently in use and is comprised of a biodegradable matrix. Knowing the characteristics of chitosan and gelatine as biodegradable biopolymer and that presents physico-chemical and biological properties for this type of application, this research had as objective the development of a biomaterial of chitosan and gelatine for the release of etonogestrel. The membrane-releasing drug delivery system was prepared by the solvent evaporation method, by dissolving the chitosan in 1% (v / v) acetic acid, gelatin being added in the proportions of 5 and 10% by mass chitosan, and subsequent incorporation of the drug. For neutralization, the membranes were submitted to an atmosphere of 2% (v / v) ammonium hydroxide for 48hs. All samples were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM) / X-ray Dispersive Energy Spectroscopy (XRD), X-ray Diffraction (XRD), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Measurement Wettability contact angle, biodegradation, swelling and cytotoxicity. The MEV assay demonstrated that the drug incorporation occurred homogeneously. In the XRD, it was observed that after the addition of etonogestrel an increase in the crystallinity of the films occurred. The FTIR spectra showed that there was interaction between the Etonogestrel and the polymer matrix. Wettability indicated a hydrophilic character of the samples. In the analysis of biodegradation, it was observed that it is influenced by the concentration of gelatine and by the action of lysozyme. As to the degree of swelling, a greater increase of samples with drug was observed. As for the cytotoxicity assay all samples studied were feasible to be used as biomaterial. Therefore, it is concluded that the membranes present potential for use in the etonogestrel release system, with the use of biodegradable biomaterial with contraceptive action as a biodegradable biomaterial.

Keywords: Contraception. Etonogestrel. Bioabsorption. Controlled Release. Biomaterials.

PUBLICAÇÕES

P. B. Araújo ^{1*}; T. G. C. Garcia¹; A. G. Bezerra Junior¹; R. M. R. Colaço¹; W. J. B. Sousa¹; R. C. Barbosa¹; M. V. L. Fook¹. Matrizes de quitosana/gelatina para liberação de Etonogestrel. Revista Eletrônica de Materiais e Processos – REMAP. ISSN 1809-8797.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo menstrual.	15
Figura 2 - Níveis dos hormônios sexuais com relação no ciclo menstrual.	15
Figura 3 - Estrutura básica dos esteroides.....	16
Figura 4 - Estrutura molecular do Etonogestrel	22
Figura 5 - Estrutura da quitosana	25
Figura 6 - Fluxograma do processamento das amostras.	30
Figura 7 - Membrana de quitosana/gelatina e etonogestrel.	31
Figura 8 - Aparelho goniômetro.....	33
Figura 9 - Imagens de MEV da membrana de quitosana e quitosana com gelatina com magnificação de 500x.	36
Figura 10 - Imagens de MEV da membrana de quitosana com etonogestrel, quitosana com etonogestrel e gelatina.	37
Figura 11 - Difratoograma de Raios X das amostras de quitosana.	38
Figura 12 - Difratoograma de Raios X das amostras de quitosana com gelatina.....	39
Figura 13 - Difratoograma de Raios X das amostras de quitosana com etonogestrel, quitosana com etonogestrel e gelatina.....	40
Figura 14 - Espectro de FTIR do pó da Quitosana.....	41
Figura 15 - Espectro de FTIR do Gelatina em pó.....	41
Figura 16 - Espectro de FTIR das membranas de quitosana e quitosana/gelatina. ...	42
Figura 17 - Espectro de FTIR das membranas de quitosana e quitosana/gelatina etonogestrel.....	43
Figura 18 - Gráfico com os valores referente a Molhabilidade por Medida de Ângulo de Contato das amostras analisadas.	44
Figura 19 - Grau de Intumescimento das amostras.	47
Figura 20 - Viabilidade celular das membranas de quitosana e quitosana com gelatina, com e sem fármaco.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Codificação das amostras	31
Tabela 2 - Identificação da composição química das amostras de quitosana e quitosana com gelatina, realizada por Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).	37
Tabela 3 - Identificação da composição química das amostras de quitosana com fármaco e quitosana com fármaco e gelatina, realizada por Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).....	38
Tabela 4 - Perda de massa percentual das membranas de quitosana e dos biocompósitos submetidos a ensaios de biodegradação.	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MAC	Métodos Anticonceptivos
HSFs	Hormônios Sexuais Femininos
FSH	Hormônio Folículo-Estimulante
LH	Hormônio Luteinizante
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
C	Átomos de Carbono
E1	Estroma
E2	Beta-estradiol
E3	Estriol
TPM	Tensão Pré-Menstrual
LARC	Métodos Contraceptivos Reversíveis de Longa Duração
DIU	Dispositivos Intrauterinos
ISSO	Organização Internacional de Normalização
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
CERTIBIO	Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste
PBS	Phosphate Buffered Saline
LISOZIMA	Lysozyme from hen egg White
NH ₄ OH	Hidróxido de Amônia
DRX	Difração de raios-X
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
EDS	Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X
FTIR	Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier
WT	Peso da Amostra no Tempo t
WO	Peso Inicial da Amostra
ASTM	Standard test Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants
PI	Peso Inicial
PF	Peso Final

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Ciclo menstrual.....	14
2.2 Hormônio sexuais femininos (HSFs)	16
2.3 Métodos Contraceptivos.....	18
2.3.1 Métodos Contraceptivos Hormonais.....	20
2.3.2 Contracepção Reversível de Longa Duração	20
2.3.3 Implante de etonogestrel	21
2.4 Biomateriais.....	22
2.4.1 Quitosana	24
2.4.2 Gelatina	25
2.5 Liberação Controlada de Fármacos	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 Local da Pesquisa	28
3.2 Materiais.....	28
3.2.1 Reagentes	28
3.3 Métodos.....	28
3.3.1 Obtenção das membranas de quitosana	28
3.3.2 Obtenção das membranas de quitosana com gelatina.....	29
3.3.3 Obtenção das membranas de quitosana com gelatina e etonogestrel	29
3.4 Caracterização	31
3.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) /Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDS).....	32
3.4.2 Difração de raios-X (DRX)	32
3.4.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	32
3.4.4 Molhabilidade por Medida do Ângulo de Contato	33
3.4.5 Biodegradação	33
3.4.6 Grau de Intumescimento (GI)	34
3.4.7 Citotoxicidade	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36

4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) / e Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS)	36
4.2 Difração de raios-X (DRX).....	38
4.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	40
4.4 Molhabilidade por Medidas do Ângulo de Contato	44
4.5 Biodegradação	45
4.6 Grau de Intumescimento	47
4.7 Citotoxicidade.....	48
5 CONCLUSÃO.....	50
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1 INTRODUÇÃO

Os métodos contraceptivos, ao longo dos tempos, passaram a ser uma preocupação constante na vida das mulheres com idade fértil em todo o mundo, através da revolução humana, no que diz respeito à forma de encarar a sexualidade e a procriação (Lima, Vaz e Partata, 2011).

No Brasil, assim como nos países do terceiro mundo, a divulgação dos Métodos Anticonceptivos (MAC) constituiu e estabelece parte de políticas internacionais, voltadas para a redução da população, da mortalidade materna e dos desfechos perinatais, garantindo mais eficácia, através da taxa de continuidade da medicação hormonal. Porém, nas últimas décadas, verifica-se uma alta na taxa de gestações, podendo estar relacionada aos efeitos adversos provocados e ao uso errôneo dos MAC disponível no mercado, levando as usuárias a descontinuar o seu uso (Albuquerque *et al.*, 2017; Carmo *et al.*, 2017; Moraes *et al.*, 2015).

Existem vários tipos de métodos, dentre eles, os mais eficazes são os implantes contraceptivos subcutâneos à base do fármaco etonogestrel, que é um progestágeno (forma sintética de um hormônio feminino natural desenvolvido através da progesterona). Tal implante é introduzido no tecido subcutâneo da paciente e age continuamente no organismo, liberando a droga e bloqueando a ovulação por um período prolongado de até 3 anos. Apesar de ser um método muito eficiente, várias pacientes se queixam de complicações relacionadas à inserção e principalmente à retirada dos implantes após a sua vida útil.

A necessidade da obtenção de um sistema de liberação de fármaco que tenha longa duração e seja menos invasivo, constituído por uma matriz biodegradável, torna-se cada vez mais importante. Sabendo disto, a utilização da quitosana como matriz biopolimérica apresenta vantagens em relação ao seu uso como biomaterial (Senel e Mcclure, 2004).

Outro biopolímero com potenciais aplicações biomédicas, inclusive na utilização em sistemas de liberação de fármaco é a gelatina, que é derivado do colágeno, uma proteína presente na grande maioria dos seres vivos (Prestes, 2012; Bader e Putnam, 2014).

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um biomaterial biodegradável de quitosana e gelatina para liberação prolongada de etonogestrel para fins contraceptivos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ciclo menstrual

A menstruação é um sangramento vaginal periódico que começa na menarca, ou primeira menstruação espontânea, e termina com a menopausa, ou última menstruação espontânea da vida da mulher. O ciclo menstrual é o conjunto de modificações causadas pela ação integrada do eixo hipotálamo-hipófise-ovário (HHO) que determina as modificações fisiológicas do organismo feminino, visando prepará-lo para reprodução (Bouzas, Braga e Leão, 2010).

A duração de um ciclo regular é em média de 28 dias. Ele pode ser mais curto, de apenas 20 dias, ou, mais longo, de até 45 dias. A duração do ciclo varia entre mulheres ou numa mesma mulher e pode ser dividido em 3 fases distintas: fase menstrual, fase proliferativa ou folicular e fase lútea ou secretória (Vander *et al.*, 2001).

A fase menstrual inicia-se no 1º dia da menstruação e vai geralmente até o 5º dia. Caracteriza-se por uma redução súbita nos níveis de progesterona e estrógeno. A fase proliferativa ou ovulatória dura do 6º até o 13º dia após a menstruação. Nesta fase, aumenta a secreção de estrógeno até o seu nível mais elevado, proporcionando a recrutação do folículo dominante que será rompido na ovulação. Seguindo a fase proliferativa nas mulheres que apresentam um ciclo sexual normal de 28 dias, ocorre a ovulação no 14º dia. A secreção de LH pela hipófise anterior aumenta acentuadamente, elevando-se entre seis e 10 vezes, atingindo seu nível máximo cerca de 16 horas antes da ovulação. Em seguida, vem a fase lútea ou secretória, que vai do 15º ao 28º dia após a menstruação. Nos últimos dias do ciclo menstrual, o corpo lúteo degenera-se e os níveis de progesterona e estrógeno caem, provocando o início do fluxo menstrual e um novo ciclo se repete (Guyton e Hall, 2017).

Após a ovulação, dá-se início a fase lútea, também conhecida como fase secretora, quando o folículo rompido é transformado pelo Hormônio Lutinizante (LH) em corpo lúteo. É nesta fase do ciclo que são secretadas grandes quantidades dos hormônios sexuais femininos. O corpo lúteo tende a regredir de nove a onze dias após a ovulação, favorecendo ao declínio da taxa de estradiol e de progesterona para que possa promover a descamação e a eliminação do endométrio através do fluxo menstrual (Meurer, 2005; Leite, 2008). A Figura 1 ilustra as alterações sofridas pelo

útero e ovário durante o ciclo menstrual e a Figura 2 a flutuação hormonal do ciclo menstrual.

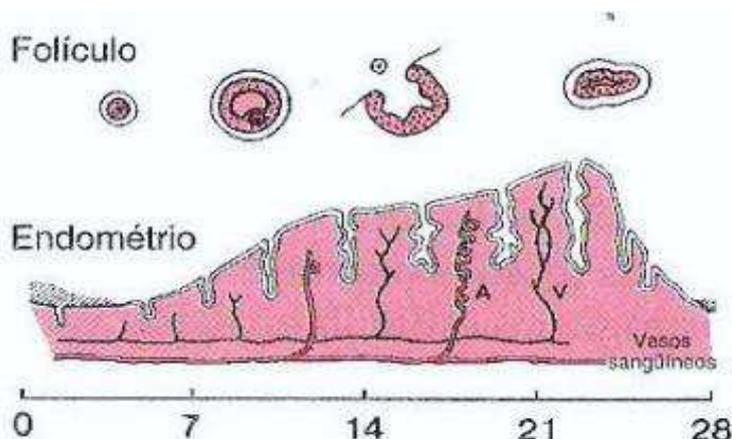


Figura 1 - Ciclo menstrual (Adaptado por Addor, 2007).

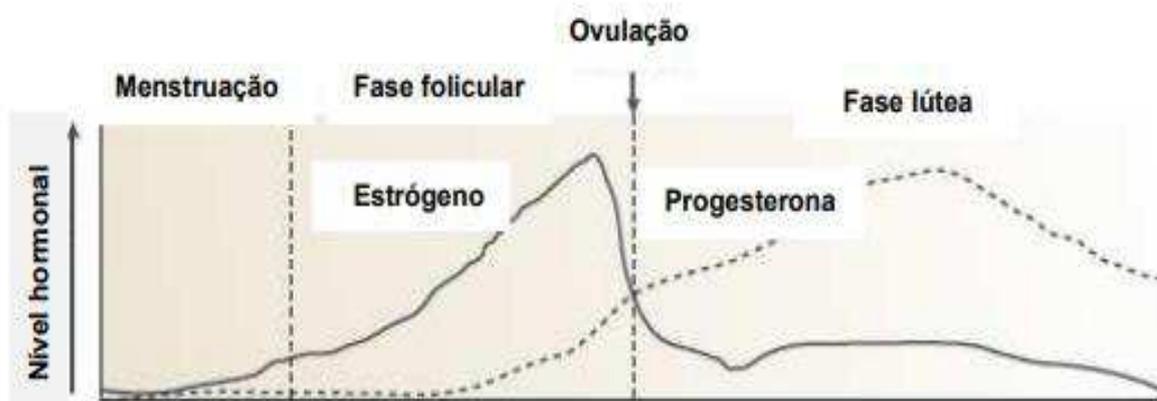


Figura 2 - Níveis dos hormônios sexuais com relação no ciclo menstrual (Fonte: modificado por Accetturi, 2014).

Durante os anos reprodutivos da mulher, os níveis hormonais flutuam conforme a interação da maturação do ciclo reprodutivo com a ação dos hormônios sexuais, modulando os efeitos e afetando boa parte do sistema metabólico e o sistema nervoso autônomo (Leite, 2008). Fantozzi (2015) complementa que a variação dos Hormônios Sexuais Femininos (HSFs) e o ciclo reprodutivo exercem uma atividade moduladora importante para o sistema imune da mulher.

2.2 Hormônio sexuais femininos (HSFs)

Hormônios são substâncias químicas que transferem informações e instruções entre as células, em animais e plantas. Também chamados de "mensageiros químicos do corpo", os hormônios regulam o crescimento, o desenvolvimento, controlam as funções de muitos tecidos, auxiliam as funções reprodutivas e regulam o metabolismo (Costa, 2009). São classificados em dois tipos principais com base na sua composição química. A maioria dos hormônios são peptídios derivados de aminoácidos produzidos pela parte anterior da hipófise, pela tireóide e paratireóides, pela placenta e pelo pâncreas (Constanzom, 2014).

Os hormônios esteróides (sexuais) secretados pelas glândulas supra-renais e pelas gônadas (ovários e testículos) são de natureza lipídica, sintetizados a partir do colesterol e modificados por uma série de reações químicas, até que um hormônio fique pronto para ser posto em ação imediatamente (Speroff e Fritz, 2014).

Segundo a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), os esteróides compreendem uma classe de hormônios cuja estrutura básica é formada através do ciclopentano fenantreno (o colesterol), correspondente a Figura 3. Onde, através desta estrutura, se formam ligações duplas, metilas, carbonilas e hidroxilas, originando a uma série de hormônios esteróides (Machado, 2010).

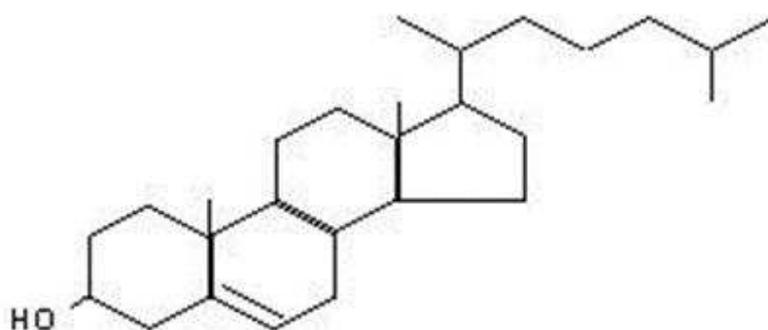


Figura 3 - Estrutura básica dos esteróides (Fonte: <http://reocities.com/CapeCanaveral/launchpad/9071/Lipidios.html>, 2017).

Os hormônios sexuais se dividem em três grupos, que se diferem apenas em relação a quantidade de Átomos de Carbono (C), como, por exemplo, as progestinas, que contém C_{21} , já os androgênios contém C_{19} e os estrogênios C_{18} . Neste grupo também está incluída a vitamina D3 ativa (1,25-dihidroxi-colecalciferol) (Vigo *et al.*, 2011).

É durante o período da puberdade que a menina começa a produzir os principais HSFs, sendo eles descritos como estrogênio, progesterona e a testosterona (Fantozzi, 2015). O ovário em funcionamento normal sintetiza e secreta os hormônios esteroides sexuais em um padrão de controle preciso que, em sua grande parte, é determinado pelas gonadotrofinas hipofisárias.

O estrogênio refere-se ao principal hormônio feminino, além deste ser considerado o mais potente por ser conhecido em afetar de forma indireta e diretamente todos os sistemas do organismo (Guapo, 2013). Tal hormônio pode ser encontrado sob três formas: oestroma (E1), 17 beta-estradiol (E2) e o estriol (E3), sendo E2 o principal e mais potente estrogênio endógeno circulante durante os anos reprodutivos (Yakabe, 2004).

O estrógeno atua no controle da ovulação e no desenvolvimento das características sexuais femininas. A flutuação dos níveis de concentração do estrogênio no organismo pode interferir no funcionamento adequado do organismo, já que possui receptores espalhados por todos os sistemas, apresentando uma maior interação com os sistemas imunológico, neuromuscular, cardiovascular, além de influenciar na composição óssea e na pele. Ainda assim, tal hormônio se relaciona intimamente com as questões nutricionais e comportamentais de cada mulher (Machado, 2010; Silva, 2012; Oliveira *et al.*, 2016).

A progesterona é o único progestágeno natural, produzido pelo corpo lúteo ovariano após a ovulação, pela placenta durante a gestação, pelas adrenais e pelo sistema nervoso. A mesma atua de diversas formas no organismo e é componente importante para a complexa regulação da função reprodutiva feminina. Age majoritariamente regulando as mudanças que ocorrem no processo de menstruação, acentuando o espessamento endometrial e preparando o útero para a fecundação; e no período da gestação, sendo através do desenvolvimento das glândulas mamárias para a amamentação como também inibindo as contrações uterinas a fim de manter a estabilidade e a permanência do feto dentro do útero (Raimundo, 2007; Machado 2010).

Não menos importante, a progesterona exerce efeito no organismo como anti-inflamatório e como modulador na imunidade, interferindo no sistema imunológico, afetando nas funções do timo e nas modulações da atividade dos fagócitos, linfócitos T e B (Soares, 2010; Accetturi, 2014).

Sabe-se ainda que a progesterona atua sobre no sistema nervoso central, atuando na mediação dos sinais requeridos responsáveis pelo comportamento sexual, por possuir grande distribuição no tecido cerebral, onde também modula o processamento cognitivo e emocional nas mulheres (Graham e Clarke, 1997). Em evidências recentes, foi visto que tal hormônio possui peça chave na modulação da massa óssea corpórea (Accetturi, 2014).

Os progestógenos sintéticos tentam mimetizar o efeito da progesterona, e são chamados de progestinas. Estas têm diferentes propriedades farmacológicas dependentes de sua molécula originária (Vigo *et al.*, 2011).

As progestinas têm sido utilizadas para a contracepção há mais de 30 anos. As propriedades anticoncepcionais da progesterona sintética foram reconhecidos pela primeira vez na década de 1950. Sua ação contraceptiva ocorre em quatro formas: inibição da ovulação dose dependente, espessamento do muco endocervical, atrofia endometrial e redução da motilidade tubária. As progestinas podem ser administradas na forma de comprimidos, implantes, injeções, e intrauterina ou por aplicação intravaginal (Baptista *et al.*, 2007).

As progestinas incluem uma ampla variedade de esteróides com ações de progesterona-like. Na última década, vários novos progestágenos têm sido sintetizados para utilização em contraceptivos e terapia hormonal. As progestinas mais potentes podem ser utilizadas com doses muito baixas e também ser disponibilizadas em vias não orais de ação (Sitruk-Ware e Nath, 2010).

2.3 Métodos Contraceptivos

Anticoncepção é o uso de métodos e técnicas com a finalidade de impedir que o relacionamento sexual resulte em gravidez. Os métodos contraceptivos são avanços tecnológicos projetados para superar a biologia, fazendo com que casais possam atuar sobre impulsos e desejos naturais com riscos de gravidez diminuída. Mais claramente, são definidos como o produto ou como o procedimento médico que interfere na capacidade reprodutiva de um ato sexual (Hubachera e Trussellb, 2015).

O uso de anticoncepcionais evita cerca de 230 milhões de partos por ano e o planejamento familiar, quando bem sucedido, atua na prevenção de gravidezes indesejadas. Esta é uma estratégia substantiva e eficaz de prevenção primária para reduzir a mortalidade materna nos países em desenvolvimento, já que desta forma as

pacientes não seriam expostas aos riscos de uma gestação, nem à vulnerabilidade de um aborto ilegal (Li, Liu e Tsui, 2012).

Em todo o mundo, 25 milhões de abortos inseguros ocorreram todos os anos entre 2010 e 2014, de acordo com um relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do Instituto Guttmacher. Cerca de 97% deles são realizados na África, na Ásia e na América Latina. A anticoncepção, por sua vez, além de reduzir o número de mortes maternas, melhora os resultados perinatais e a sobrevivência infantil por aumentar o espaçamento entre os nascimentos (Carmo *et al.*, 2017).

Em adolescentes, a gestação indesejada possui uma repercussão ainda maior pois, além do maior risco de complicações inerentes à gestação e desfechos neonatais, irão apresentar mais dificuldades sócio-econômicas no futuro (Albuquerque, 2017).

Tais métodos se dividem de acordo com o mecanismo de ação: a) métodos comportamentais que estão embasados na auto-observação que ocorre no organismo ao longo do ciclo menstrual, sendo necessário que as usuárias tenham ciclos menstruais regulares e que exista cumplicidade entre o casal (Ogino-Knaus, temperatura basal corporal, muco-cervical ou Billings); b) os métodos de barreira que consistem em obstáculos mecânicos ou químicos à penetração dos espermatozoides no canal cervical (preservativo: masculino e feminino, diafragma, geléias espermicidas); c) métodos hormonais (oral-pílula, injetáveis e implante) cuja finalidade básica é impedir a concepção; d) dispositivo intra-uterino (DIU), que atuam impedindo a fecundação; e) métodos cirúrgicos ou esterilização (ligadura das trompas e a vasectomia); f) contracepção de emergência, método alternativo hormonal oral que evita a gravidez quando ingerido até 72 horas após a relação sexual desprotegida (Vilela, 2004).

Para que a utilização correta e a eficácia do método seja realizado, faz-se necessário o acompanhamento clínico-ginecológico, pois a escolha do contraceptivo depende das contraindicações, do custo, do tempo pretendido de anticoncepção, da reversibilidade e da praticidade. A contracepção pode ser alcançada utilizando-se métodos hormonais ou não hormonais (Vieira *et al.*, 2006).

2.3.1 Métodos Contraceptivos Hormonais

Sociedades, tanto nos países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos, sofrem de inaceitáveis altas taxas de gravidezes não-intencionais e indesejadas, apesar da disponibilidade de seguras e eficazes formas de contracepção (Townsend *et al.*, 2011).

Entende-se por anticoncepção hormonal a utilização de drogas classificadas como hormônios em dose e modo adequados para impedir a ocorrência de uma gravidez não desejada inibindo uma ovulação, sem qualquer restrição às relações sexuais. Os hormônios usados para anticoncepção são esteróides sexuais sintéticos estrogênicos e progestogênicos (Febrasgo/Femina, 2010).

A anticoncepção hormonal pode ser desenvolvida de diversas formas. Dependendo do desejo da paciente, pode ser encontrada na forma de pílulas orais, de medicações injetáveis, implantes subcutâneos, anéis vaginais, dispositivos intrauterinos com progestágeno e adesivos cutâneos. Os hormônios podem ser utilizados combinados (estrógenos + progestágenos) ou só contendo um progestágeno (Poli, 2009).

Os métodos contraceptivos hormonais não somente possuem efeitos de anticoncepcionais, mas também possui outros tipos de finalidade que favorece a saúde da mulher; entre eles: a diminuição da oleosidade da pele e do cabelo, a supressão e o controle de sangramentos menstruais, a diminuição da quantidade de pêlos pelo corpo, além da diminuição de sintomas associados à Tensão Pré-Menstrual (TPM), como irritabilidade, ansiedade, tristeza e cólicas (Faray, 2008).

Para tanto, existe a necessidade de expandir as opções de anticoncepcionais disponíveis, os quais podem não ser aceitáveis para todos os usuários. O desenvolvimento de métodos melhor tolerados, bem como sistemas de longa ação é de particular importância quando se deseja melhor adesão, aumentando assim a eficácia dos métodos (Sitruk-Ware, 2006).

2.3.2 Contracepção Reversível de Longa Duração

Os métodos contraceptivos reversíveis de longa duração (LARC, na sigla em inglês) são métodos que não precisam de intervenção do paciente por um longo período de tempo. São representados pelos dispositivos intrauterinos (DIU) e

implantes subcutâneos contraceptivos. São métodos apropriados para a maioria das mulheres em idade reprodutiva com eficácia contraceptiva similar à laqueadura tubária bilateral, com <1% de índice de falha. Apresentam as mais altas taxas de satisfação e continuidade de uso, entre todos os contraceptivos reversíveis. Adicionalmente, uma característica dos métodos de longa duração é que todos são livres de estrógeno. O estrógeno é o hormônio associado a eventos tromboembólicos (Nicholas e Peipert, 2011).

Os métodos contraceptivos de longa duração são 20 vezes mais eficazes na prevenção da gravidez indesejada do que de curta duração (pílulas, adesivos e anéis). A alta eficácia da LARC foi igual em idades diferentes das mulheres e proporcionada por não necessitar da ingestão diária de medicação (Winner *et al.*, 2012).

2.3.3 Implante de etonogestrel

A primeira tentativa do uso de implantes subdérmicos de progesterona foi realizada no final de 1980. O objetivo era desenvolver um método de longa duração, livre de falhas e sem possuir efeitos colaterais relacionados aos estrógenos (Baptista, 2007).

No Brasil, somente está liberado para uso, pelo Departamento de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, o Implanon® que é um bastão único polimérico (copolímero de etileno vinil acetato) que contém 68 mg de etonogestrel. Tem 4 cm de comprimento por 2 mm de diâmetro e duração de uso de três anos, período em que libera, inicialmente, 60 a 70 µg do hormônio por dia, e no terceiro ano de uso 25 a 30 µg/dia (liberação homogênea e estável). Após aproximadamente três anos, quando o mesmo necessita ser retirado (Braga e Vieira, 2015; Broecker, Jurich e Fuchs, 2016).

O ENG é uma molécula referente à forma sintética do hormônio feminino natural, sendo este desenvolvido através da progesterona, sendo esta utilizada apenas como um contraceptivo. Esta molécula possui ainda fórmula molecular de $C_{22}H_{28}O_2$, onde possui estrutura molecular mediante a Figura 4 (Broecker, Jurich e Fuchs, 2016).

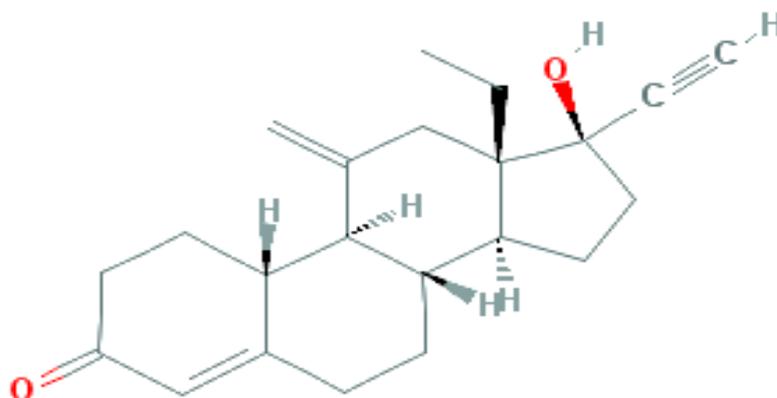


Figura 4 - Estrutura molecular do Etonogestrel (Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/sml0356?lang=pt®ion=BR>, 2017).

O implante deve ser inserido subdérmico, ou seja, logo abaixo da pele, tornando-se palpável logo após a sua aplicação com anestesia local, na face interna do braço não dominante, entre o primeiro e quinto dia do ciclo menstrual, sem necessidade de método contraceptivo adicional. Seu mecanismo de ação inclui a inibição da ovulação e a modificação do muco cervical (Implanon, 2017).

Entretanto, quando inserido em plano mais profundo que o subdérmico, torna-se mais susceptível a danos vasculares ou neurais, podendo ser notados através de relatos de parestesia e à migração na localização do próprio implante (Braga e Vieira, 2015).

Buscando novas formas de utilização desse tipo de hormônio buscou-se uma matriz que está fundamentada na classe denominada biomateriais.

2.4 Biomateriais

Um biomaterial é uma substância ou a combinação de substâncias de origem natural ou sintética, que foi projetada e conformada para que, sozinha ou como parte de um sistema complexo, possa ser usada para direcionar, controlar as interações com os componentes dos sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou de diagnóstico, em medicina humana ou veterinária (Williams, 2009; Keane e Badylak, 2014).

O campo da ciência dos biomateriais abrange quatro classes principais do ponto de vista da Engenharia de Materiais: poliméricos, cerâmicos, metálicos e compósitos. Estes materiais são amplamente utilizados na ginecologia, obstetrícia,

odontologia, oftalmologia, ortopedia, ou seja, em diversas aplicações médicas e biológicas. Além das considerações acerca das classes dos materiais, um fator considerado primordial na utilização ou combinação desses, para que possam atuar em sistemas *in vivo* de forma eficiente e/ou reparadora em determinada perda ou patologia, é a biocompatibilidade (Ratner *et al.*, 2005; Oréfice, Pereira e Mansur, 2012).

A biocompatibilidade é definida como a capacidade de um material apresentar resposta apropriada, quando aplicado, não causando reação inflamatória crônica, reação de corpo estranho ou mesmo toxicidade. Ela gira em torno da interação celular com o biomaterial. Além da biocompatibilidade, a biodegradabilidade e a bioabsorção, são outras características importantes na utilização dos mesmos (Santos Júnior e Wada, 2007; Attaf, 2011).

Sabendo disso, os biomateriais poliméricos estão dentre os mais empregados no âmbito médico. Dentre as principais vantagens em comparação aos materiais cerâmicos ou metálicos, destacam-se a facilidade de fabricação para produzir formas variadas (partículas, filmes, fios, dentre outros), o processamento secundário, custo razoável, boas propriedades reológicas e mecânicas, e sobretudo sua biointeração com o meio biológico (Heath, Cooper, 2013).

Dentre as diversas classes de biomateriais existentes, destaca-se a classe dos bioreabsorvíveis. Os polímeros biodegradáveis/reabsorvíveis são materiais que acabam por ser degradados, solubilizados ou fagocitados após a reparação dos tecidos, evitando a permanência de um corpo estranho no organismo (Santos Júnior e Wada, 2007; Nandi *et al.*, 2010).

Estas definições destacam a importância de que um biomaterial não deverá produzir quaisquer efeitos adversos clinicamente significativos no hospedeiro. Como reflexo mais concreto, as diretrizes Organização Internacional de Normalização (ISO) 10993 representam uma série de normas para avaliar a biocompatibilidade de um dispositivo médico antes de um estudo clínico (Jiang *et al.*, 2014).

Um dos desafios no campo de biomateriais é que todos os dispositivos de implantes, cujas propriedades físicas são resultado de milhões de anos de otimização evolutiva e que têm a capacidade de crescimento, regeneração e reparo sejam utilizados na medicina. E nesse contexto, as aplicações dos biopolímeros na medicina regenerativa tem se tornado cada vez mais eficaz no tratamento de feridas, na

liberação controlada de fármacos, entre outras (Mogosanu e Grumezescu, 2014; Orefice *et al.*, 2006).

Para tanto, a utilização de biomateriais à base de quitosana e gelatina são uma realidade na área da saúde, e sua aplicação vem sendo estudada em vários campos, desde a indústria farmacêutica, até a engenharia tecidual. Tendo em vista que esses polímeros naturais possuem grupos funcionais (como grupamentos amino, grupos carboxílicos e hidroxilas) disponíveis para modificações químicas (hidrólise, oxidação, redução, esterificação, ligações cruzadas, etc.) e enzimáticas e que também interagem com outras moléculas, através destes pode-se obter uma vasta variedade de produtos com propriedades adaptáveis (Gomes *et al.*, 2013; Spin-Neto *et al.*, 2008).

2.4.1 Quitosana

A quitosana é um biopolímero que apresenta uma estrutura formada por ligações glicosídicas entre unidades de $\beta(1,4)$ -2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranosose e $\beta(1,4)$ -2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose. É obtida a partir da reação de desacetilação da quitina, sendo denominada quitosana quando apresentar grau de desacetilação acima de 50%. É considerada como um material funcional apropriado para aplicações biomédicas por sua alta biocompatibilidade, biodegradabilidade, não-antigenicidade e propriedades de adsorção (Simões *et al.*, 2010; Dias *et al.*, 2013).

A cadeia polimérica da quitosana é do tipo linear e para determinadas aplicações tem sido utilizados agentes reticulantes como: ácido sulfúrico, glutaraldeído, tripolifosfato, genipina entre outros. Assim como a maioria dos polissacarídeos e proteínas, a quitosana é um termoplástico, pois é constituído de cadeias poliméricas individuais que são mantidas juntas por ligações relativamente fracas, como ligações dipolo-dipolo e forças de Van der Waals, podendo ser processado por técnicas usuais e ser dissolvido em solventes, formar filmes e outros dispositivos (Figura 5) (Fideles, 2010; Jayakumar *et al.*, 2011; Dash *et al.*, 2011).

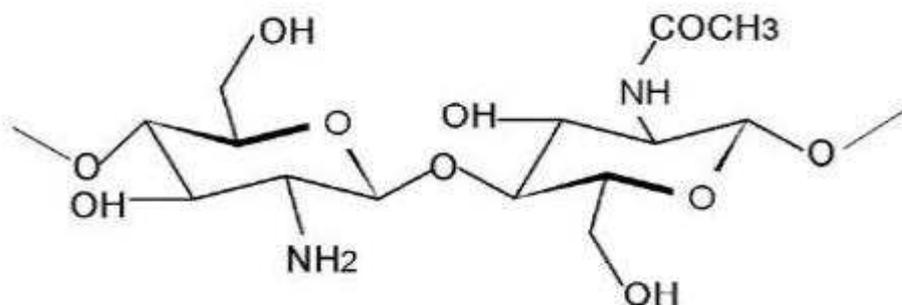


Figura 5 - Estrutura da quitosana (Pengpong *et al.*, 2014).

A biocompatibilidade da quitosana tem sido investigada e relatada ao longo das últimas décadas. Muitos estudos foram realizados para avaliar a biocompatibilidade *in vitro* da quitosana e de sistemas à base de quitosana usando vários tipos de células, tais como fibroblastos, osteoblastos, condrócitos, células endoteliais, células neurais e hepatócitos (Jiang *et al.*, 2014).

A versatilidade da quitosana permite sua conformação em formas tão variadas quanto sua aplicabilidade como fibras, arcabouços, membranas, esferas etc. Por ela não ser hidrolisada pelas enzimas digestivas no homem e a sua estrutura química ser similar à da celulose, ela pode ser usada como um novo tipo de fibra dietética. A aplicação da mesma no meio biológico depende de sua massa molar e de seu grau de acetilação, e isto está relacionado à efetividade do processo de desacetilação da quitina, além da forma como se apresenta, isto é, como gel, fibra, nanopartícula, esponja, membrana, pó ou filme. Nas formas de esponja e micro grânulos, também pode ser utilizado para liberação de drogas (Jing *et al.*, 1997; Jayakumar *et al.*, 2010).

Tendo em vista as limitações da quitosana e, vislumbrando agregar características nas propriedades desse polímero, tais como, biodegradabilidade, bioabsorção e não toxicidade, as pesquisas tem se intensificado cada vez mais na utilização de outro biopolímero nos sistemas de liberação de fármaco, como é o caso da gelatina.

2.4.2 Gelatina

A gelatina é obtida através da hidrólise do colágeno a partir do aquecimento e consequentemente degradação da estrutura conformacional da tripla-hélice, provocando a desnaturação da mesma. Basicamente, a obtenção da gelatina pode se

dar em três etapas principais: pré-tratamento da matéria prima, extração da gelatina e purificação / secagem. Durante o pré-tratamento, onde são quebradas as cadeias polipeptídicas do colágeno, pode ser obtidas dois diferentes tipos de gelatinas, à depender apenas do método empregado, sendo elas dos tipos A e B (Karim e Bhat, 2009).

A gelatina é utilizada na indústria farmacêutica na forma de cápsulas e microesferas; selantes para próteses vasculares; como mantas absorventes para uso cirúrgico; como curativos e adesivos. Trata-se de uma proteína solúvel derivada da desnaturação parcial do colágeno. Apresenta boa biocompatibilidade e osteocondutividade e como biomaterial possui vários atrativos, entre eles, a não-antigenicidade em condições fisiológicas, sendo completamente reabsorvida *in vivo*. Suas propriedades de adesividade e plasticidade tornam a gelatina uma matriz adequada para compósitos e também na obtenção de estruturas tridimensionais utilizadas em sistemas para liberação controlada de fármaco (Liu *et al.*, 2006; Silva, 2013).

Em temperatura de aproximadamente 40 °C, as soluções aquosas de gelatina estão no estado sol e sofrem gelatinização quando resfriadas à temperatura ambiente. A transformação sol-gel ocorre devido à transição ordem-desordem conformacional das cadeias da gelatina que formam regiões termoreversíveis pelas ligações entre as hélices em zonas de conexão estabilizadas por ligações de hidrogênio (Bigi *et al.*, 2004).

As propriedades da gelatina estão divididas em dois grupos principais: as propriedades relativas ao comportamento gelificante e as propriedades fundamentadas em seu comportamento superficial (baseadas na presença de grupos carregados, seções hidrofílicas ou hidrofóbicas da cadeia proteica) conseguindo assim ter aplicações na indústria de alimentos, cosméticos e farmacêutica. Assim, estes materiais conseguem facilmente formar películas, microencapsular compostos, estabilizar emulsões, apresentando as propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade, que fazem deles materiais promissores para a preparação de biomateriais (Gómez - Guillén *et al.*, 2011).

2.5 Liberação Controlada de Fármacos

No tratamento de disfunções relacionadas à saúde é desejável que o medicamento alcance o seu local de ação a uma concentração particular e que esta dose terapêutica permaneça constante em um período suficientemente longo para alterar o processo. No entanto, a ação de agentes farmacêuticos é limitada por vários fatores, incluindo a sua degradação, a sua interação com outras células e a sua incapacidade para penetrar nos tecidos como resultado da sua natureza química. Por estas razões, novas formulações são estudadas para alcançar uma resposta farmacológica maior, entre estes os sistemas poliméricos de transportadores de fármaco são de grande interesse. Vários tipos de dispositivos formados por matrizes poliméricas têm sido utilizados em formas farmacêuticas como: Comprimidos, cápsulas, grânulos, sistemas transdérmicos e implantes. Estes dispositivos poliméricos apresentam mecanismos que governam a liberação do fármaco (Coimbra, 2010).

O desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos envolve conhecimentos multidisciplinares que utilizam os avanços nas ciências biológicas, farmacêuticas, químicas, físicas e das engenharias sendo vitais para o sucesso do desenvolvimento de produtos (Del Valle *et al.*, 2009). Silva (2013) desenvolveu membranas de quitosana e gelatina para liberação de heparina com indicação de uso no tratamento do tromboembolismo venoso.

As principais vantagens ao desenvolver e utilizar os sistemas de liberação controlada são: manter nível terapêutico com baixa oscilação; impedir níveis tóxicos e efeitos colaterais locais e sistêmicos; evitar subníveis terapêuticos, aumentar concentrações plasmáticas de princípios ativos de meia-vida plasmática relativamente curta; maior segurança na utilização de alguns fármacos de elevada potência; maior comodidade pela diminuição do número de administrações diárias facilitando adesão do paciente ao tratamento, podendo evitar a administração noturna (Lyra *et al.*, 2007).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local da Pesquisa

A pesquisa foi realizada na Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste – CERTBIO.

3.2 Materiais

- Quitosana - Produzida no CERTBIO, Grau Médico. Massa molar 260KDa (Médio Peso). Acima 90% Grau de desacetilação;
- Gelatina tipo A obtida de pele suína - Sigma Aldrich;
- Etonogestrel- Sigma Aldrich®.

3.2.1 Reagentes

- Ácido Acético Glacial - Vetec® Química Fina Ltda com grau analítico.
- Lisozima - Sigma Aldrich®;
- PBS: *Phosphate Buffered Saline* (PBS) - Sigma Aldrich®, pH = 7,4;
- Hidróxido de amônio - Vetec® Química Fina Ltda com grau analítico;
- Água destilada.

3.3 Métodos

3.3.1 Obtenção das membranas de quitosana

As membranas foram obtidas através do método de evaporação de solvente, por meio da dissolução do polímero em ácido acético (1% v/v), para uma concentração final da solução polimérica (1% m/v), por meio de agitação magnética por um período de 2 horas, em aproximadamente 40 °C de temperatura.

Após obtenção da solução de quitosana, a mesma foi distribuída em placas de Petri de acrílico de 5,5 cm, onde constou de um volume final em cada placa de 30 mL de solução, em seguida foram submetidas à secagem em estufa com temperatura 37 °C por 5 dias até a completa evaporação do solvente, seguido de neutralização por hidróxido de amônia (NH₄OH) a 2% (v/v) por 2 h.

3.3.2 Obtenção das membranas de quitosana com gelatina

As membranas de quitosana com gelatina foram preparadas seguindo a metodologia anteriormente citada, e posteriormente acrescentou-se à solução de quitosana, gelatina nas proporções de 5 % e 10 % (m/m) em relação ao valor de massa da quitosana.

3.3.3 Obtenção das membranas de quitosana com gelatina e etonogestrel

Utilizou-se o etonogestrel na proporção de 4 mg (referência da produção diária na fase folicular), o qual foi adicionado as soluções de quitosana sem e com gelatina, seguindo a metodologia anterior, através da agitação magnética da solução por um período de duração de 2 horas, a fim de se obter uma homogeneização adequada do fármaco.

Para obtenção das membranas utilizou-se a mesma metodologia descrita para as membranas sem o fármaco. E para a neutralização, as membranas foram submetidas a uma atmosfera com NH₄OH a 2 % (v/v) por 2 h. A Figura 6 ilustra o Fluxograma simplificado da produção das membranas de quitosana/gelatina e etonogestrel e a Figura 7 a membrana confeccionada.

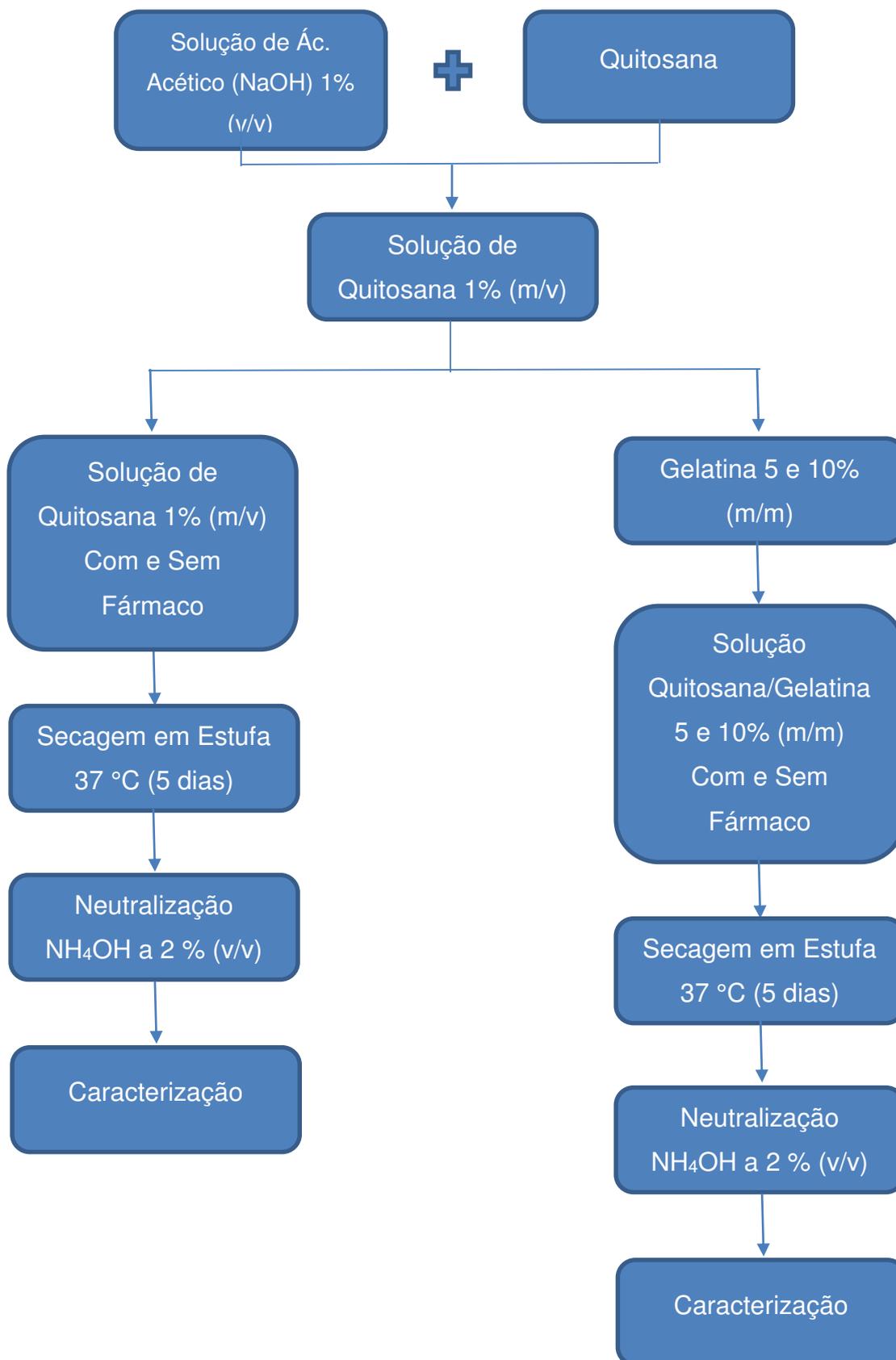


Figura 6 - Fluxograma do processamento das amostras (Fonte:Própria).



Figura 7 - Membrana de quitosana/gelatina e etonogestrel (Fonte: Própria).

Após a obtenção das amostras, as mesmas foram codificadas conforme ilustradas na Tabela 1.

Tabela 1 - Codificação das amostras

Codificação das Amostras	
Q	Quitosana
QG5	Quitosana e Gelatina 5%
QG10	Quitosana e Gelatina 10%
QE	Quitosana e Etonogestrel
QEG5	Quitosana, Etonogestrel e Gelatina 5%
QEG10	Quitosana, Etonogestrel e Gelatina 10%

Fonte: Própria

3.4 Caracterização

Todas as amostras foram caracterizadas por meio dos seguintes ensaios: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV); Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDS); Difração de raios-X (DRX); Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR); Molhabilidade por Medida de Ângulo de Contato; Biodegradação; Grau de Intumescimento e Citotoxicidade. Foram preparadas 5 amostras de cada tipo de material para cada ensaio.

3.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) /Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDS)

Para realização das análises, utilizou-se o microscópio eletrônico de varredura de bancada, modelo TM-1000, marca Hitachi, no qual possui aumento de até 10000x, profundidade de foco de 1mm, resolução de 30nm, 15KV, além do baixo vácuo e pressão variada (1 a 270Pa), sem recobrimento metálico. O MEV foi utilizado para identificar a morfologia da superfície das membranas. As imagens foram obtidas através da magnificação de 500x.

A caracterização por EDS foi realizada através do sistema de microanálise química do EDS, no qual encontra-se acoplado no MEV, para determinar a composição pontual do biomaterial.

3.4.2 Difração de raios-X (DRX)

As análises de difração de raios X foram conduzidas à temperatura ambiente em aparelho XRD-6000 Shimadzu, empregando radiação $K\alpha$ do cobre (1,5418 Å), tensão de 40 kV e corrente 30 mA. As amostras foram examinadas em um intervalo de 2θ entre 5 e 30°, sob uma velocidade de 2°/min. O objetivo deste ensaio foi estudar o comportamento cristalográfico do material.

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

As amostras foram submetidas a técnica de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), em temperatura ambiente e o equipamento utilizado foi o Spectrum 400 da Perkin Elmer. A técnica FTIR foi realizada para identificar as bandas características dos grupos funcionais presentes nas amostras, utilizando a faixa de varredura de 4000 a 650 cm^{-1} .

3.4.4 Molhabilidade por Medida do Ângulo de Contato

A técnica consistiu no cálculo da molhabilidade da membrana baseada na análise do formato da gota, por meio da utilização do aparelho goniômetro. O ângulo de molhabilidade entre a água com tensão superficial conhecida e a superfície sólida depende da relação entre as forças adesivas, que faz com que a gota se espalhe sobre a superfície. A Figura 8 ilustra o aparelho goniômetro utilizado para realizar a análise de Molhabilidade.



Figura 8 - Aparelho goniômetro (Fonte: Própria).

3.4.5 Biodegradação

O ensaio de biodegradação foi realizado para observar a degradação das membranas nos períodos de 7, 14 e 21 dias.

Este ensaio foi realizado com base na norma ASTM F1635-11 Standard test Method for *in vitro* Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants (2011).

As membranas obtidas foram pesadas em balança digital antes e após serem submetidas ao ensaio de biodegradação, no intuito de verificar a perda de massa das mesmas. Em seguida, foram divididas em dois grupos, onde foi utilizada a solução de *Phosphate Buffered Saline* – PBS com concentração de 1mg/mL como controle (pH

próximo de 7) e o outro grupo contendo uma solução com PBS e Lisozima. O pH da solução foi verificado no início e após o término do ensaio para avaliação das possíveis variações.

Com isso, foram utilizadas cinco amostras para cada tipo de membrana, no qual se refere a amostras com solução de PBS como também as amostras na solução com lisozima. Logo após, o material foi colocado em estufa microbiológica para incubação, sob a temperatura de 37°C, sendo retirada da estufa após o período de 7, 14 e 21 dias, e lavado com água destilada. A secagem foi realizada durante o período de 24 horas em estufa a 50°C, seguidas de pesagem em balança analítica. Os resultados da biodegradação foram obtidos a partir da razão entre Peso Final (Mf) pelo Peso Inicial (Mi), como ilustrado na Equação 1.

$$MR = \frac{Mf}{Mi} \quad \text{Equação 1}$$

3.4.6 Grau de Intumescimento (GI)

Este ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar o grau de intumescimento das membranas obtidas. As mesmas inicialmente foram pesadas e mantidas em solução de PBS por 24 h. Em seguida, retirou-se da solução e colocou-se sobre papel filtro para que o excesso de solução fosse retirado, sendo elas logo em seguida pesadas em balança digital. O grau de intumescimento de cada amostra no tempo t, foram calculadas de acordo com a Equação 2.

Todas as amostras foram pesadas antes e após o intumescimento para verificar o quanto a membrana ganhou em peso.

$$GI = \frac{Wt - W0}{W0} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

Wt: é o peso da amostra no tempo t

Wo: é o peso inicial da amostra

3.4.7 Citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* das membranas foi realizada pelo teste de avaliação da viabilidade celular dos macrófagos por MTT [brometo de 3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] de acordo com a ISO 10993-5:2009. Os parâmetros de avaliação observados são a porcentagem de morte celular e a IC50 (concentração do produto que inibe 50% do crescimento celular).

O MTT é um ensaio colorimétrico quantitativo, sensível e de confiança que mensura a viabilidade, proliferação e atividade das células, baseando-se na capacidade da enzima desidrogenase encontrada nas mitocôndrias de células vivas converter o substrato amarelo, solúvel em água (MTT) em produto de cor púrpura, decorrente da formação de cristais de formazana, que são insolúveis em água, que poderão ser então detectados através da leitura da absorbância em um espectrofotômetro. A quantidade do formazana produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) / e Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS)

A Figura 9 ilustra as imagens obtidas de MEV das amostras de quitosana e quitosana com gelatina. Na análise da morfologia das membranas (Q, QG5 e QG10) observa-se uma superfície densa e lisa, com a presença de algumas partículas dispersas, provavelmente decorrentes do processo de solubilização da solução. Quando comparadas, não foi possível visualizar diferenças significativas.



Figura 9 - Imagens de MEV da membrana de quitosana e quitosana com gelatina com magnificação de 500x (Fonte: Própria).

Nascimento (2014), nas análises de MEV de suas membranas de quitosana, constatou que as mesmas se apresentaram densas, lisas e planas e sem a presença de poros, corroborando com os achados nessa pesquisa.

Ao analisar os dados da Tabela 2, constatou-se a presença dos elementos oxigênio, nitrogênio e carbono presentes nos filmes, característicos da quitosana e da gelatina, nota-se também a presença do elemento silício, que possivelmente é proveniente de uma contaminação que ocorreu durante o processamento das amostras.

Tabela 2- Identificação da composição química das amostras de quitosana e quitosana com gelatina, realizada por Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).

AMOSTRAS	Oxigênio (%)	Nitrogênio (%)	Carbono (%)
Q	75,9 %	12,5 %	11,6 %
QG5	73,00%	13,8%	13,2%
QG10	72,8%	13,8%	13,4%

Fonte: Própria

No trabalho de Melin (2013), foi verificada a predominância dos elementos carbono (C) e oxigênio (O), presentes na estrutura da quitosana e da carboximetilcelulose. Já Cruz e colaboradores (2016) observaram a partir da caracterização por EDS a presença dos elementos químicos presentes na quitosana (O, C, e N).

Nas imagens de MEV (Figura 10), as membranas de quitosana com fármaco e quitosana com fármaco e gelatina, apresentaram uma morfologia lisa e densa, entretanto na amostra QEG5 observam-se algumas marcas (traços), provenientes das ranhuras presentes na placa de Petri.

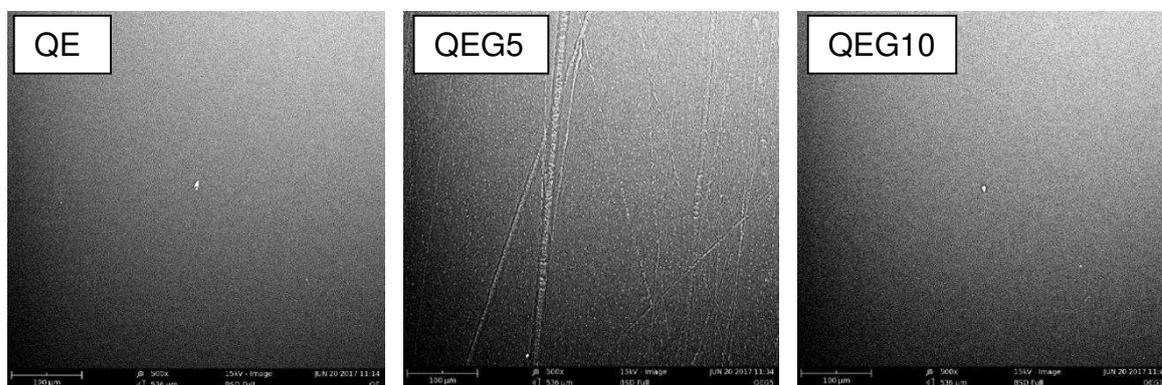


Figura 10- Imagens de MEV da membrana de quitosana com etonogestrel, quitosana com etonogestrel e gelatina (Fonte: Própria).

Não se observa diferenças morfológicas entre as membranas com e sem fármaco. Entretanto, no estudo de Furtado (2014), identificou-se a separação da interface entre a matriz polimérica e o fármaco.

Na análise de espectroscopia por energia dispersiva de raios x (Tabela 3), após a adição do fármaco, observa-se um aumento no percentual do elemento oxigênio proveniente da molécula de Etonogestrel.

Tabela 3- Identificação da composição química das amostras de quitosana com fármaco e quitosana com fármaco e gelatina, realizada por Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).

AMOSTRA	Oxigênio (%)	Nitrogênio (%)	Carbono (%)
QE	81%	11%	8%
QEG5	73,5%	14,5%	12%
QEG10	78,9%	12%	9,2%

Fonte: Própria

Por meio dos estudos de Klauss (2010), no qual o mesmo observou a caracterização por EDS de matrizes de PCL e Progesterona, os resultados encontrados evidenciaram a proporcionalidade de carbono e oxigênio presente na composição do polímero e do fármaco, o que corrobora com os resultados obtidos nessa pesquisa.

4.2 Difração de raios-X (DRX)

Na Figura 11 observa-se o difratograma do filme de quitosana, onde nota-se um perfil semicristalino com pico em torno de 20°.

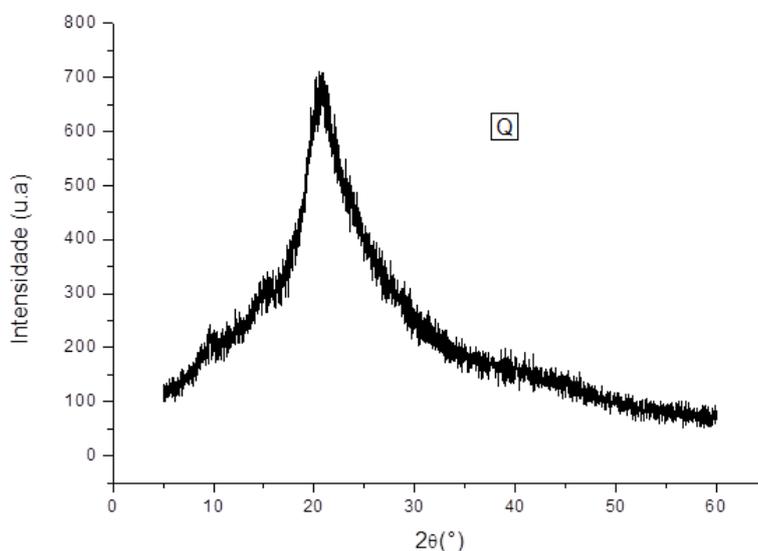


Figura 11 - Difratograma de Raios X das amostras de quitosana (Fonte: Própria).

Fidèles (2010) e Holanda (2011) quando trabalharam com filmes de quitosana, observaram uma única banda larga encontrada em torno de 15-30°, com pico máximo 2θ em torno de 20°, sendo este comportamento típico de polímeros semicristalinos.

Nos filmes de quitosana com 5% de gelatina (Figura 12), foi possível identificar uma discreta diminuição da intensidade do pico quando comparada com o difratograma da membrana de quitosana pura. Já na membrana com 10% de gelatina observou-se um discreto aumento da intensidade do pico. Esse resultado indica que o percentual de gelatina inserido na membrana altera a cristalinidade do material.

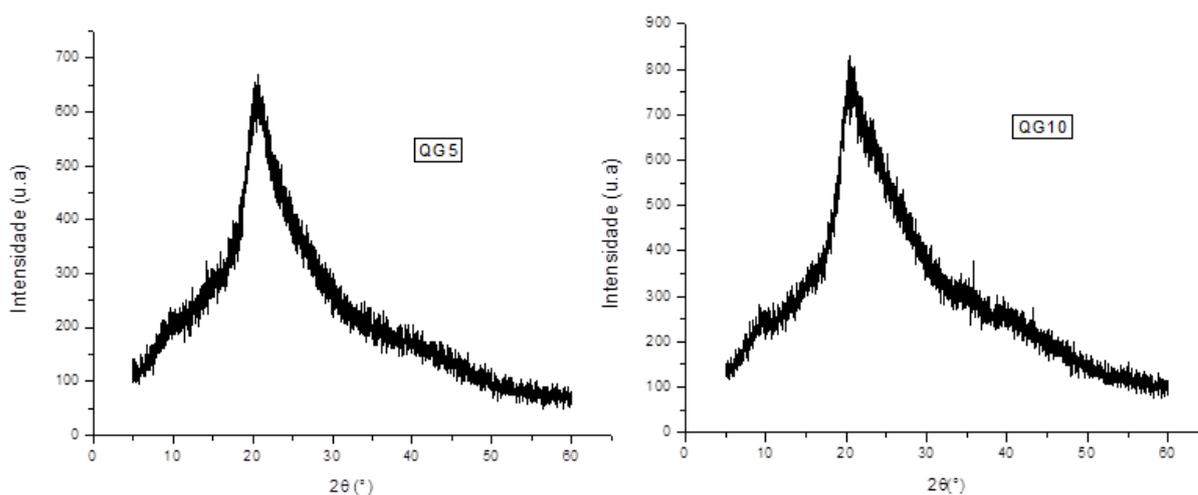


Figura 12 - Difratograma de Raios X das amostras de quitosana com gelatina (Fonte: Própria).

Segundo Araújo *et al.* (2012) essa característica de banda larga indica que a base polimérica da quitosana seguida pelas ligações N-glicosídicas entre os monômeros da estrutura, ocasiona em desordenamento cristalino devido as longas distâncias interatômicas, gerando uma estrutura aleatória.

A Figura 13 ilustra os difratogramas das amostras com fármaco. Nota-se nos difratogramas com o fármaco um perfil semicristalino, entretanto, com a incorporação do mesmo, observou-se redução na intensidade dos picos, como também um deslocamento de 20° para 23° quando comparado as membranas sem o fármaco.

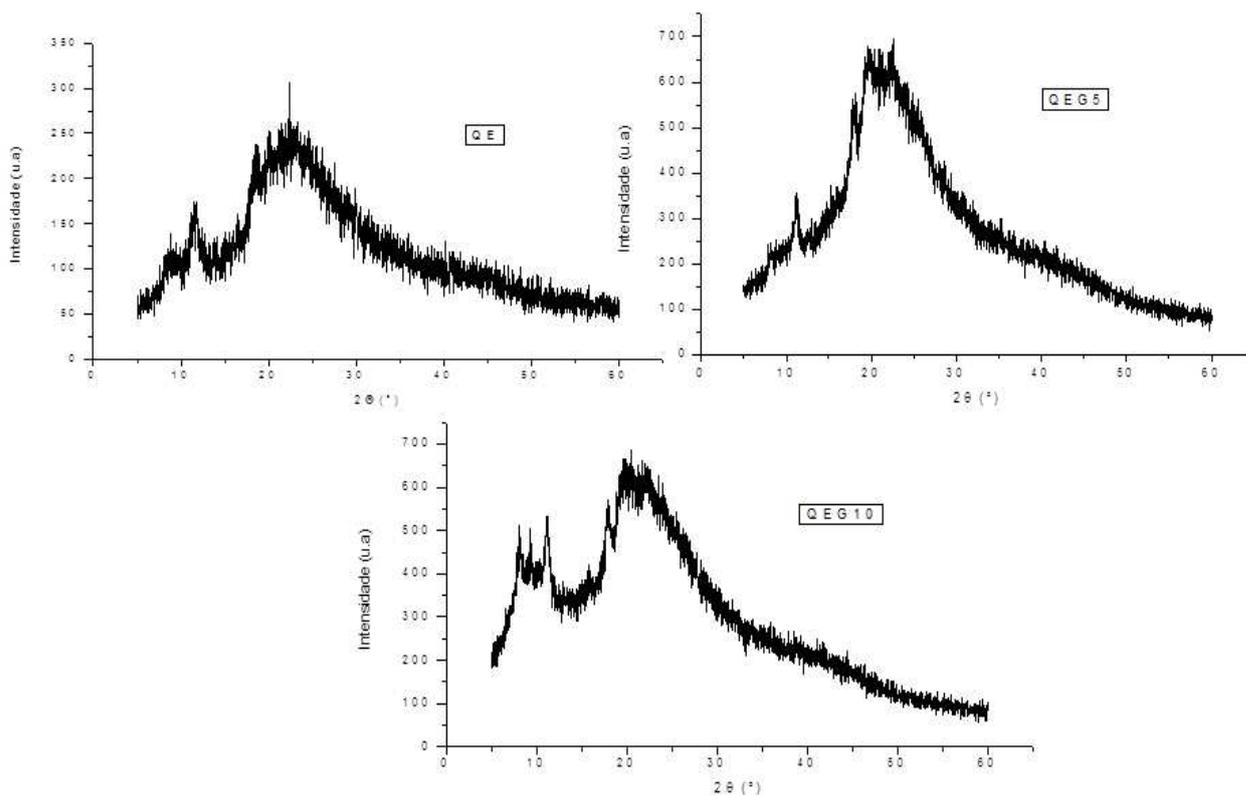


Figura 13 - Difratoograma de Raios X das amostras de quitosana com etonogestrel, quitosana com etonogestrel e gelatina (Fonte: Própria).

Esses resultados estão de acordo com os encontrados nos estudos de Klauss (2010) no desenvolvimento de dispositivos poliméricos implantáveis para a liberação de fármaco, onde observou-se um perfil semicristalino na amostra de etonogestrel analisada, com picos intensos em 2θ em torno de $10,5^\circ$ a 17° .

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

A técnica de FTIR foi realizada para avaliar se ocorreu a interação entre os grupos funcionais característicos dos materiais utilizados para obtenção do biocompósito nesta pesquisa. A Figura 14 ilustra o espectrograma obtido da Quitosana.

Analisando o espectro de infravermelho da quitosana constata-se que o mesmo apresentou bandas de absorções na região entre 3670 a 3000 cm^{-1} referente as vibrações de estiramento dos grupos OH e NH. Na região em torno de 2970 a 2850 cm^{-1} observa-se vibrações de deformação axial referente a carbonos alifáticos C-N.

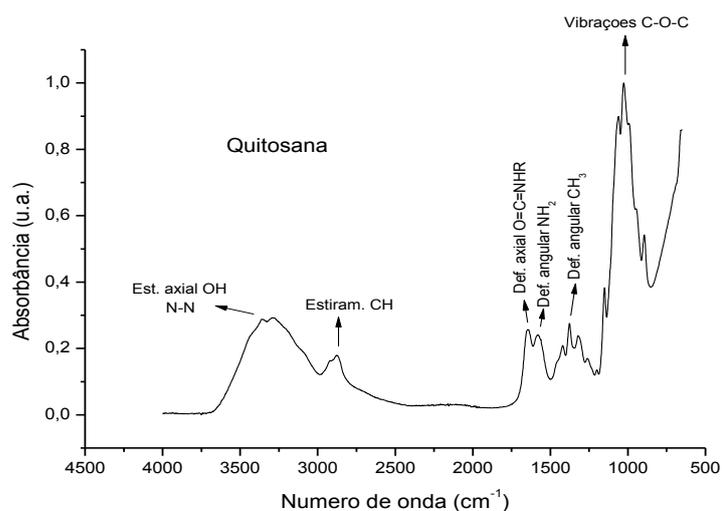


Figura 14 - Espectro de FTIR do pó da Quitosana (Fonte: Própria).

Nas bandas referentes as regiões em torno de 1700 a 1630 cm^{-1} e 1600 a 1530 cm^{-1} , nota-se vibrações de deformação axial de duplas ligações $\text{C}=\text{O}$ de amidas N -substituídas e à deformação angular simétrica no plano do grupo NH_2 respectivamente. Em torno de 1420 cm^{-1} observa-se vibrações do tipo de deformação axial do grupo C-O . A banda em 1068 cm^{-1} é referente a deformações axiais e angulares de ligações C-O de álcoois, e por fim as bandas nas regiões de $1152, 1022$ e 901 cm^{-1} são atribuídas ao alongamento $-\text{C-O-C}-$. Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Camacho *et al.* (2010) e Rachipudi *et al.* (2013).

A Figura 15 ilustra o espectro de FTIR da Gelatina em pó, no qual foi possível intensificar os seus grupos característicos.

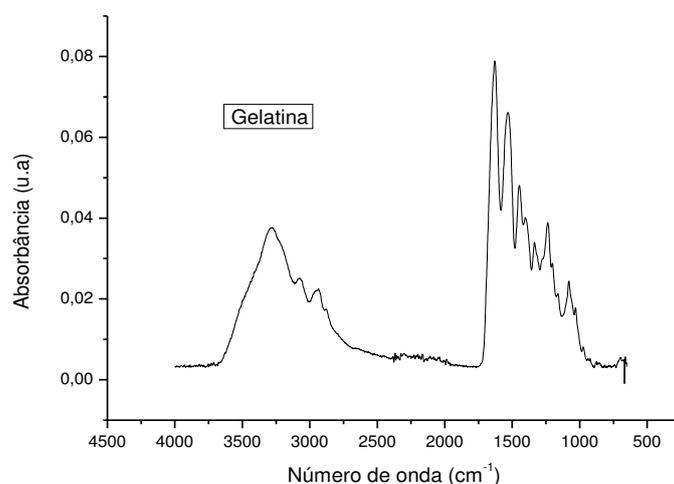


Figura 15 - Espectro de FTIR do Gelatina em pó (Fonte: Própria).

Na região de 3290 cm^{-1} , apresenta-se banda larga, resultante da associação polimérica das vibrações de deformação axial do grupo O-H. Nas bandas 1632 , 1537 e 1450 cm^{-1} , observa-se as vibrações do tipo deformação axial e angular de amins e amidas substituídas do grupo N-H e do grupo CH_2 respectivamente. Nas regiões 1331 , 1241 , 1084 cm^{-1} , é possível identificar as vibrações do tipo deformação axial e angular de carbonos aromáticos e alifáticos do grupo C-N e do grupo C-O de álcoois secundários.

Analisando os espectros de FTIR dos filmes obtidos (Figura 16 e 17) de quitosana e quitosana com gelatina, com e sem fármaco, pode-se notar que após a incorporação do fármaco houve um aumento na intensidade de todas as bandas, além disso, pode ser observado na região 1540 e 1410 cm^{-1} um deslocamento das bandas amina e amidas, o que evidencia a interação entre o fármaco e a matriz polimérica.

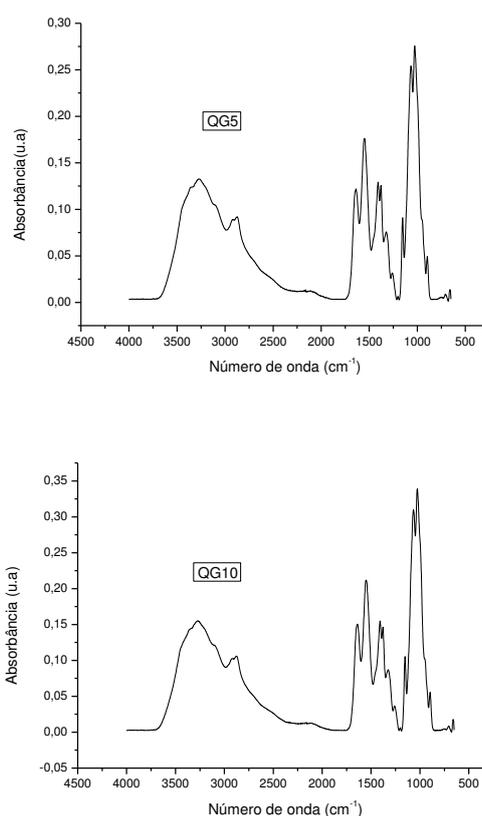


Figura 16 - Espectro de FTIR das membranas de quitosana e quitosana/gelatina (Fonte: Própria).

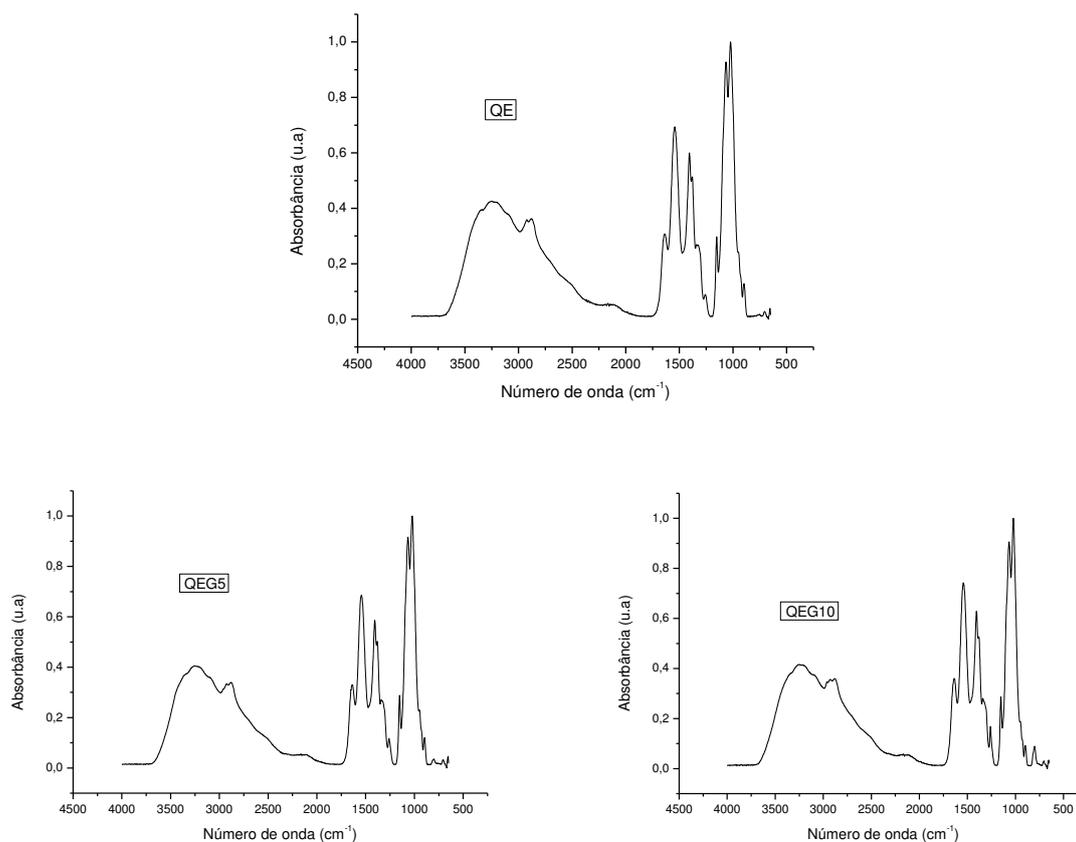


Figura 17- Espectro de FTIR das membranas de quitosana e quitosana/gelatina etonogestrel (Fonte: Própria).

Os resultados obtidos por Liu *et al.* (2006), em que se observou as seguintes bandas referentes ao espectro de gelatina, foram encontrados em 3290 cm^{-1} , estiramento O-H, na região 1656 cm^{-1} referente ao estiramento da carbonila (amida I), em 1556 cm^{-1} vibrações no plano da ligação N-H e ao estiramento C-H (amida II), resultados estes que corroboram com os encontrados neste trabalho.

Vulcani e Plepis (2006) quando avaliaram o espectro da matriz polimérica de colágeno para liberação de progesterona, observaram que no espectro do colágeno destacaram-se as bandas 1450 e 1235 cm^{-1} e que no da progesterona as bandas características da molécula estão em torno da região entre 1700 e 1200 cm^{-1} , notaram que com a incorporação da progesterona na matriz polimérica as bandas características do colágeno em 1450 e 1235 cm^{-1} sofreram sobreposição em torno de 1650 e 1400 cm^{-1} , corroborando com os resultados obtidos para os achados nessa pesquisa.

4.4 Molhabilidade por Medidas do Ângulo de Contato

A Figura 18 ilustra os valores de Molhabilidade das membranas estudadas. A partir dos valores obtidos, nota-se um aumento no ângulo de contato das amostras após a incorporação do fármaco, isso se justifica pela redução da cristalinidade das mesmas em decorrência da adição do Etonogestrel, entretanto os valores evidenciam que as amostras apresentam um caráter hidrofílico, visto que os valores observados estão abaixo do ângulo de contato de 90°.

A técnica é fundamentada na medida do ângulo de contato da gota, o qual avalia as características de hidrofiliicidade e hidrofobicidade, portanto para materiais que apresentem ângulo de contato maior que 90° considerar-se-á material com perfil hidrofóbico, porém quando o material apresentar ângulo de contato inferior a 90° o mesmo é dito como material de perfil caracteristicamente hidrofílico.

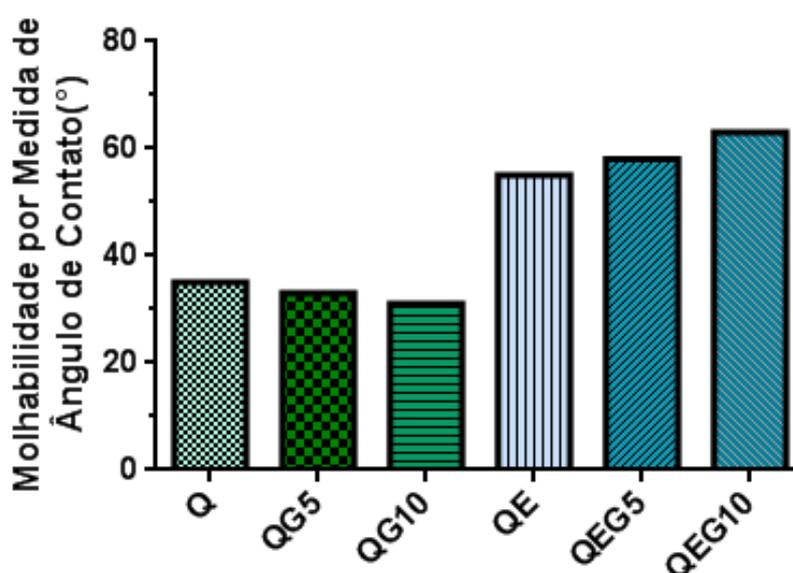


Figura 18 - Gráfico com os valores referentes a Molhabilidade por Medida de Ângulo de Contato das amostras analisadas (Fonte: Própria).

A molhabilidade é afetada pela presença de grupos polares e não polares na superfície. A incorporação de grupos funcionais tais como: C-OH (álcool), C-O-O-H (hidro peróxido), H-C=O (aldeído), C=O (carbonila), C-O-C=O (Ester), C-O-O (peróxido), H-O-C=O (ácido) e NH₂ (amina), através do ataque à superfície polimérica podem provocar modificação superficial (Macêdo *et al.*, 2012). Esse fato pode então explicar as interações químicas ocorridas entre o fármaco e a matriz polimérica.

A molécula do Etonogestrel apresenta um caráter anfipático, ou seja, a mesma apresenta regiões com grupos polares e apolares. Possivelmente os grupamentos hidroxila e carbonila da molécula do Etonogestrel, interagiram com os grupamentos aminas e amidas da matriz polimérica, como anteriormente observado pela Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier, essa ligação expôs o grupamento apolar da molécula do fármaco ($C\equiv C$) na superfície, tornando os filmes menos hidrofílicos após a incorporação do Etonogestrel.

4.5 Biodegradação

A análise de biodegradação foi realizada aos 7, 14 e 21 dias em solução de PBS e PBS/Lisozima e os resultados estão expressos na Tabela 4.

Tabela 4 - Perda de massa percentual das membranas de quitosana e dos biocompósitos submetidos a ensaios de biodegradação.

Ensaio	PERDA DE MASSA DAS MEMBRANAS 7, 14 e 21 DIAS DE ENSAIO (%)					
	PBS			Lisozima/PBS		
	7 dias	14 dias	21 dias	7 dias	14 dias	21 dias
Q	1,5	7,1	8,0	2,2	7,5	11,3
QG5	6,1	11,3	17,4	7,7	13,1	15,1
QG10	11,1	13,2	18,5	12,8	14,6	20,3
QE	1,7	8,0	9,1	2,3	8,7	13,4
QEG5	9,8	16,3	20,1	12,1	21,3	22,3
QEG10	20,2	22,2	25,6	22,3	24,8	30,4

Fonte: Própria

Analisando os valores obtidos com a degradação das membranas de quitosana expostos em PBS e lisozima/PBS no período de 7, 14 e 21 dias, observou-se que, em todas as amostras, a degradação foi mais acentuada sob a ação da lisozima, o que demonstra a eficiência desta enzima na degradação da quitosana e corrobora com os resultados encontrados por Holanda (2011).

A hidrólise enzimática de um polímero vai depender da hidrofiliabilidade da cadeia polimérica, a qual deve ocorrer sempre na superfície do polímero, e esta pode ser facilitada pelo aumento da hidrofiliabilidade superficial do mesmo (Paoli, 2009).

Segundo Dallan (2005), a avaliação da degradação de um biomaterial no meio biológico é de suma importância, visto que esta caracterização está diretamente relacionada ao tempo em que o material será absorvido pelo organismo após sua inserção ou utilização no corpo.

Segundo Nelson e Cox (2014), a quitosana é metabolizada por certas enzimas humanas, especialmente a lisozima. A presença de grupos amino desacetilados permite maior reatividade da quitosana em relação à quitina. A lisozima é encontrada no fluido lacrimal em teores acima de 1%, no muco dos mamíferos e pode ser produzida por bactérias e outros organismos. É capaz de digerir a parede celular de bactérias cujas estruturas contêm carboidratos. Sua ação provém da degradação do esqueleto glicosídico do peptidoglicano.

A degradação da quitosana pela lisozima depende, dentre outros fatores, do grau de desacetilação da quitosana, uma vez que a lisozima se liga aos grupamentos N-acetilglicosamina presentes na estrutura deste polissacarídeo. Estes grupamentos são de fundamental importância no reconhecimento da quitosana como substrato para a lisozima (Kurita *et al.*, 2000; Suh e Matthew, 2000).

Nas membranas adicionadas de gelatina foi possível notar que o aumento da concentração de gelatina nos filmes possibilitou maior percentual de degradação mássica nas amostras, da mesma forma ocorreu com a inserção do fármaco.

Nos estudos de Batista (2015), as amostras de quitosana que ficaram expostas ao meio PBS seguiram um aumento gradativo na degradação mássica ao decorrer dos 21 dias de análise, no entanto, ocorreu um incremento na faixa de 3,6 a 4,6% do total de massa degradada nos filmes que ficaram imersos em meio PBS com a enzima Lisozima, sendo assim, corroborando assim com os resultados encontrados nesse trabalho.

De acordo com Medeiros (2016), a biodegradação de muitos polímeros tem sido estudada, especialmente da quitosana, por ser de fácil manipulação, favorecendo esse tipo de estudo. Quando o mesmo estudou o tempo de biodegradação de esferas de quitosana na presença da lisozima, observou que houve uma diminuição da massa das esferas, reforçando os resultados encontrados nessa pesquisa.

4.6 Grau de Intumescimento

A Figura 19 ilustra o percentual de intumescimento das amostras de quitosana, quitosana/gelatina e quitosana/gelatina/etonogestrel. Observa-se que após a adição do fármaco nas membranas, houve um aumento do intumescimento das amostras, sendo mais evidenciado na amostra QE. Esse fato pode estar atrelado a boa interação química entre o fármaco e a quitosana, além disso, nota-se também que o acréscimo de gelatina nos filmes com fármaco pode-se evidenciar que possivelmente haja uma competição entre a gelatina e o fármaco pelos grupos reativos da quitosana. Outro aspecto importante observado, quando se correlaciona esta análise com os resultados observados na análise de DRX, é que as membranas com o etonogestrel apresentaram menor cristalinidade, tendo em vista que a cristalinidade de um determinado material está diretamente relacionada a conformação dos átomos em sua estrutura e que quanto menor a cristalinidade menor a organização destes, pode-se inferir que essa redução na cristalinidade na amostra QE contribuiu para a permeação de líquidos na mesma, favorecendo assim um maior intumescimento.

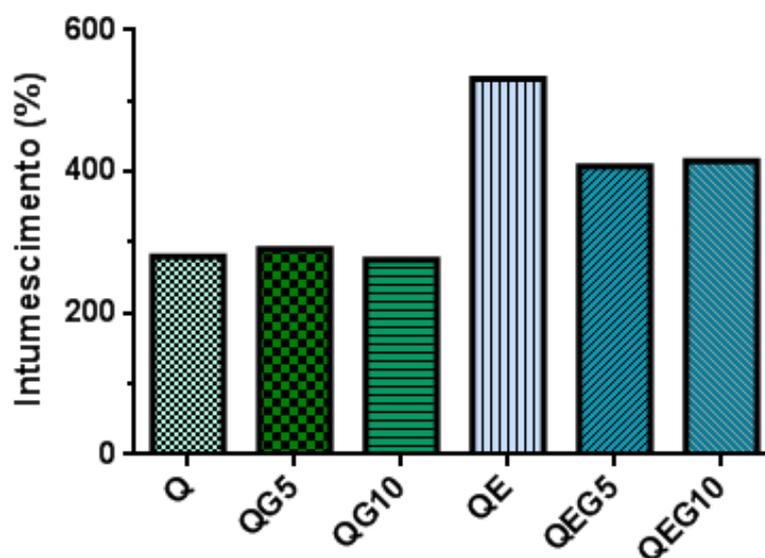


Figura 19 - Grau de Intumescimento das amostras (Fonte: Própria).

Segundo Rodrigues (2016), o intumescimento depende da presença de grupos hidrofílicos em regiões acessíveis, diante disso, a redução na cristalinidade aumenta a disponibilidade destes grupos influenciando na absorção de líquido pela amostra.

De acordo com Gonçalves e Araújo (2011) o intumescimento é dependente da penetração do líquido nos arca-bouços e da interação da água (através de ligações de hidrogênio) com pontos reativos ($-NH_3^+$, NH_2 e $-OH$). Os grupos $-NH_3^+$ estão presentes, principalmente, na quitosana com pH inferior a 7,2.

No trabalho de Gomes (2017) na análise de intumescimento das amostras de quitosana com fenticonazol, foi observado um perfil aparente ao encontrado nesse trabalho, evidenciando-se os mesmos aspectos vistos, tais como, boa interação entre o fármaco e a matriz quitosana e a possível competição entre o fármaco e a gelatina pelos sítios ativos da quitosana.

4.7 Citotoxicidade

A avaliação da atividade citotóxica das membranas foi realizada pelo método do MTT e teve por objetivo avaliar a viabilidade das células em face do material produzido para uso em organismos vivos, pois todo material que tem por finalidade ser utilizado em ser vivo deve, como regra de segurança, não ser tóxico e ser biocompatível. Os resultados de citotoxicidade das membranas estão ilustrados na Figura 20.

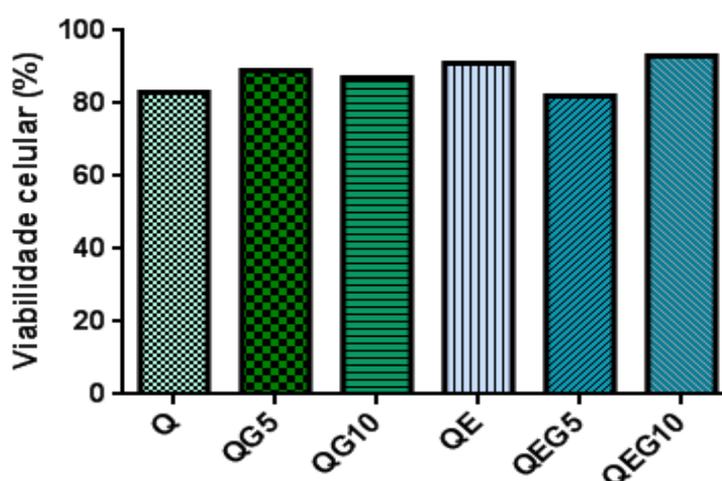


Figura 20- Viabilidade celular das membranas de quitosana e quitosana com gelatina, com e sem fármaco (Fonte: Própria).

Quando comparado o percentual de citotoxicidade das membranas com o valor mínimo determinado por Bispo (2009), que é de 50%, e pela norma ISO 10993-5:2009

que é de 70%, pode-se afirmar que todas as membranas se apresentam viáveis, uma vez que se encontram com percentual de viabilidade acima de 80%.

Barbosa (2011) e Sousa (2012) confeccionaram membranas de quitosana e, da mesma forma constataram que a quitosana não é citotóxica. Estes resultados corroboram com os encontrados nesta dissertação e indicaram que o etonogestrel não alterou a viabilidade celular.

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nesta pesquisa pode-se concluir que a técnica de processamento utilizada para obtenção das membranas é promissora, o que possibilita sua aplicação na produção de um biomaterial para utilização *in vivo* como método contraceptivo, pois o fármaco interagiu com a matriz polimérica, além disso, apresentou viabilidade celular acima do estabelecido pela norma vigente.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Estudo da validação de metodologia analítica e liberação do etonogestrel;
Avaliação pré-clínica para confirmar a efetividade do sistema de fármaco de longa duração e menos invasivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCETTURI, B. G. **Avaliação do papel dos hormônios sexuais feminino sem modelo murino de asma experimental.** Tese de Doutorado em Farmacologia. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
- ALBUQUERQUE, A. P. S.; PITANGUI, A. C. R.; RODRIGUES, P. M. G.; ARAUJO, R. C. Prevalence of rapid repeat pregnancy and associated factors in adolescents in Caruaru, Pernambuco. **Rev. Bras. Saúde Mater. Infant.**, v.17, n.2, p. 347-354, jun., 2017.
- ARAÚJO, P. M. A. G.; SANTOS, P. T. A.; SANTOS, P. T. A.; COSTA, A. C. F. M.; ARÁUJO, E. M. Obtenção de filmes de quitosana para aplicação em Engenharia de Tecido. Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais. Natal – RN, 2012.
- ATTAF, B. **Advances in composite materials for medicine and nanotechnology.** Croatia: InTech, 2011.
- BADER, R. A.; PUTNAM, D. A. **Engineering polymer systems for improved drug delivery.** New York: Wiley. 2014.
- BAPTISTA, P. V.; MONTEIRO S. B.; FURTADO, M. J.; COSTA, A. R. O que há de novo em contracepção hormonal não oral? Artigo de Revisão/Review Article. **Acta Obstet Ginecol Port**; v.1 n.2. p. 84-90. 2007.
- BARBOSA, R. C., **Compósitos Quitosana/Carbonato de Cálcio para Utilização em Cânulas de Fístula Ruminal.** Dissertação (Doutorado em Engenharia de Materiais) 119f. Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, 2011.
- BATISTA, J. G. S. **Desenvolvimento de matrizes poliméricas biodegradáveis à base de quitosana e possíveis blendas como sistemas de liberação controlada de fármacos.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais, IPEN, 2015.
- BIGI, A.; PANZAVOLTA, S.; RUBINI, K. Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. **Biomaterials**, v. 25, n. 25, p. 5675-5680, 2004.
- BISPO, V. M. **Estudo do efeito da reticulação por Genipin em suportes biocompatíveis de Quitosana-PVA.** 2009. 140p. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Minas), Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2009.
- BOUZAS, I.; BRAGA, C.; LEÃO, L. Ciclo menstrual na adolescência. **Adolesc Saude.** 2010;7(3):59-63.
- BROECKER, J.; JURICH, J.; FUCHS, R. The relationship between long-acting reversible contraception and insurance coverage: a retrospective analysis. **Contraception.** v. 93, n. 3, p. 266-272, 2016.

BRAGA, G. C.; VIEIRA, C. S. Anticoncepcionais reversíveis de longa duração: Implante liberador de etonogestrel (Implanon). **Femina**. v. 43, suppl. 1, 2015.

CAMACHO, K. G.; VARGENS, O. M. C.; PROGIANTI, J. M.; SPÍNDOLA, T. Vivenciando repercussões e transformações de uma gestação: perspectivas de gestantes. *Ciencia y Enfermeria*. **Concepcion**, 16 (2), 115-125, 2010.

CARMO, L. S. M. P.; BRAGA, G. C.; FERRIANI, R. A.; QUINTANA, S. M.; VIEIRA, C. S. Timing of Etonogestrel-Releasing Implants and Growth of Breastfed Infants. A Randomized Controlled Trial. **Obstetrics & Gynecology**. v. 130, n. 1, jul., 2017.

COIMBRA, P. M. A. **Preparação e Caracterização de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos com base em Polímeros de Origem Natural**. Tese (Doutorado). Universidade de Coimbra, 2010.

CONSTANZO, L. S. *Fisiologia*. 5a Edição. Elsevier. Editora LTDA. 2014

COSTA, V.C. I. *Fisiologia do Adulto e Idoso*.UNAERP. 2009

CRUZ, J. M.; CATÃO, C. D. S.; BARBOSA, R. C.; FOOK, M. V. L. Síntese e caracterização de arcabouços de quitosana com agente antineoplásicos. *Revista Matéria*, v.21, n.1, pp. 129 – 140, 2016.

DALLAN, P. R. M. **Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração da pele**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. (Tese). 194f, 2005.

DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R. M.; CHIELLINI, E. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Prog Polym Sci**, v. 36, p. 981-1014, 2011.

DEL VALLE, E. M. M.; GALÁN, M. A.; CARBONELL, R.G. Drug delivery technologies: The way forward in the new decade. **Industrial and Engineering Chemistry Research**. v. 48, n. 5, p. 2475-2486, 2009.

DIAS, K. B. et al. Chitin and chitosan: Characteristics, uses and production current perspectives. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 4, n. 3, p. 184-191.Ago. 2013.

FANTOZZI, E. T. **Hormônios sexuais femininos como moduladores da geração de mediadores inflamatórios em modelo experimental de isquemia e reperfusão intestinal**. Dissertação. Pós-Graduação em ciências. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

FARAY, H. E. F.G. **Fatores determinantes da prática de métodos contraceptivos entre universitárias da área da saúde**. Dissertação. Pós-Graduação em saúde materno-infantil. Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2008.

FEBRASGO/FEMINA. Manual de anticoncepção da mulher. vol. 37, n 9, 2010.

FIDÉLES, T. B. **Filmes reticulados de quitosana 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.

FURTADO, G. T. S. **Quitosana/Curcumina: Membranas de liberação controlada para tratamento de melanoma**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande. 2014.

GOMES, V. V. **Obtenção de biomaterial para liberação de fenticonazol, utilizado no tratamento da vaginite fúngica**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais pela UFCG, 2017.

GOMES, M.; AZEVEDO, H.; MALAFAYA, P.; SILVA, S.; OLIVEIRA, J.; SILVA, G.; MANO, R. S. J.; REIS, R. Em *Natural Polymers in Tissue Engineering Applications*; Ebnesajjad, S., eds.; **Elsevier**: Kidlington, 2013, cap. 16.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; MONTERO, M. P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: a review. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1813-1827, 2011.

GONÇALVES, A. A.; ARAÚJO, R. M. Diferentes estratégias para a Reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, n. 7, pp. 1215-1233, 2011.

GRAHAM, J. D.; CLARKE, C. L. Physiological Action of Progesterone in Target Tissues*. *Westmead Institute for Cancer Research*. The role of progestins for contraception **Acta Obstet Gynecol Scand**, 2005.

GUAPO, V. G. **Investigações de fatores implicados na diferença entre os sexos no reconhecimento de expressões faciais: Emoção despertada e fases do ciclo menstrual**. Tese 116f. Pós-Graduação em Ciências Médicas. Faculdade de Medicina e Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

GUYTON AC, HALL JE. **Fisiologia humana e mecanismo das doenças**. 13a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

HEATH, D. E.; COOPER, S. L. Em *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. Ratner, B. D.; Hoffman, A. S.; Schoen, F. J.; Lemons, J. E., eds.; Academic Press: Oxford, 2013, cap. I.2.2. **Polymers**: Basic Principles.

HOLANDA, A. L. de. **Membranas de Quitosana para uso em Sistema de Liberação Controlada de Insulina: Síntese e Caracterização**. 2011. (Tese Doutorado). Universidade Federal de Campina Grande. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos. Campina Grande.

HUBACHERA, D.; TRUSSELLB, J. A definition of modern contraceptive methods **Contraception**, v. 92, p. 420–421. 2015.

IMPLANON®, Bulaetonogestrel Schering-Plough Indústria Farmacêutica Ltda. Implante, 2017.

JAYAKUMAR, R.; PRABAHARAN, M.; KUMAR, P. T. S.; NAIR, S. V.; TAMURA, H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. **Biotechnol Adv**, v. 29, p. 322-337, 2011.

JAYAKUMAR, R.; CHENNAZHI, K. P.; MUZZARELLI, R. A. A.; TAMURA, H.; NAIR, S. V.; SELVAMURUGAM, N. Chitosan conjugated DNA nanoparticles in gene therapy. **Carbohydrate Polymers**, 79, 1-8. 2010.

JIANG, T.; JAMES, R.; KUMBAR, S.G.; LAURENCIN, C.T. Chapter 5 - Chitosan as a Biomaterial: Structure, Properties, and Applications in Tissue Engineering and Drug Delivery. In: KUMBAR, S. G.; LAURENCIN, C. T., *et al* (Ed.). **Natural and Synthetic Biomedical Polymers**. Oxford: Elsevier, p. 91-113, 2014.

JING, S. B.; LI, L.; Ji, D.; TAKIGUCHI, Y.; YAMAGUCHI, T. Effect of chitosan on renal function in patients with chronic renal failure. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 49, n. 9, p. 721-723, 1997.

KARIM, A. A.; BHAT, R. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 563–576, 2009.

KEANE, T. J.; BADYLAK, S. F. Biomaterials for tissue engineering applications. **Seminars in Pediatric Surgery**, v. 23, n. 3, 2014.

KLAUSS, P. **Dispositivos poliméricos implantáveis para a liberação de fármaco**. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Santa Catarina. 2010.

KURITA, K.; KAJI, Y.; MORI, T.; NISHIYAMA, Y. Enzymatic degradation of b-chitin: susceptibility and the influence of deacetylation. **Carbohydrate Polymers**, v.42, p.19-21, 2000.

LEITE, R. M. P. **Ciclo estral e menstrual: repercussão da agressão nutricional precoce sobre os parâmetros locomotores em ratas e consequências sobre as propriedades neuromecânicas em mulheres jovens**. Tese. Pós graduação em nutrição. Centro de Ciências da Universidade Federal de Pernambuco e da Escola de Doutorado da Universidade de Tecnologia de Compiègne, Recife, 2008.

LIMA, L. R. M.; VAZ, S. N. D. A.; PARTATA, A. K. Contracepção medicamentosa em situações especiais. **Revista Científico ITPAC**. v. 4, n. 2, Abr., 2011.

LI, Q.; LIU, L.; TSUI, A. O. Maternal deaths averted by contraceptive use: an analysis of 172 countries Saifuddin Ahmed, **Lancet** 2012; 380: 111–25.

LIU, D.; EWI, Y.; YAO, P.; JIANG, L. Determination of degree of acetylation of chitosan by UV spectrophotometry using dual standards. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 782-785, 2006.

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

MACÊDO, M. O. C.; MACÊDO, H. R. A.; SILVA, G. C.; SILVA, M. A. M.; JÚNIOR, C. A. Estudo comparativo da modificação superficial de membranas de quitosana tratadas por plasma de oxigênio, nitrogênio e hidrogênio. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.7.2 (2012) 95 – 103.

MACHADO, K. S. **Determinação de hormônios sexuais femininos na bacia do Alto de Iguaçu, região metropolitana de Curitiba-PR**. Dissertação, 116f. Pós-Graduação em engenharia de recursos hídricos e ambiental. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

MEDEIROS, L. A. D. M.; BARBOSA, R. C.; ROSENDO, R. A.; OLIVEIRA, D. K. M.; VIANA, F. A. C.; FOOK, M. V. L. Esferas de quitosana/D. ambrosioides (mastruz) para aplicação como biomaterial. **Rev. Bras. Odontol.**, Rio de Janeiro, v. 73, n. 2, p. 124-9, Abr./Jun. 2016.

MELIN, G. R. **Desenvolvimento de membranas à base de quitosana e de carboximetilcelulose para aplicação na área biomédica**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação na Escola de Artes, Ciências e Humanidades da USP, 2013.

MEURER, E. M. **Fono articulação e traços suprassegmentais de adolescentes nas fases folicular e luteal dos ciclos menstruais**. Tese 117f. Pós graduação em ciências médicas. Pós graduação em ciências médicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

MOGOSANU, G. D.; GRUMEZESCU, A. M. **Int. J. Pharm.** 2014, p. 463, v.127.

MORAES, M. S. T.; OLIVEIRA, R. C.; SANTOS, J. M.; LUCENA JÚNIOR, R. P.; QUEIROZ, J. R. C.; COBUCCI, R. N. O. Efeitos adversos em usuárias de implantes contraceptivos. **FEMINA**. v. 43, n. 1, fev., 2015.

NANDI, S. K.; ROY, S.; MUKHERJEE, P.; KUNDU, B.; DE, D. K., BASU, D. Orthopaedic applications of bone graft & graft substitutes: a review. **Indian J Med Res**. 2010;132:15–30.

NASCIMENTO, I. V. S. R. **Desenvolvimento de Sistemas Quitosana/Piperina para liberação controlada de fármacos**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande. 2014.

NELSON, D.; COX, M. Lehninger: Princípios de bioquímica. São Paulo: Saraiva, p. 220-223, 2014.

NICHOLAS, M. C.; PEIPERT, J. F. Efficacy and Safety of Long-Acting Reversible Contraception Amy Stoddard, **Colleen, Drugs** 2011; 71 (8): 969-980).

ORÉFICE, R. L., PEREIRA, M. M., MANSUR, H. S. **Biomateriais** – fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro: **Editora Cultura Médica**, 2012.

OLIVEIRA, J.; PERUCH, M. H.; GONÇALVES, S.; HAAS, P. Padrão hormonal feminino: Menopausa e terapia de reposição. **Revista Brasileira de Análise Clínicas**. v. 3, n.48, 2016.

ORÉFICE, R.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. Biomateriais: Fundamentos e Aplicações. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.

PAOLI, M. A. Degradação e estabilização de polímeros. **Artliber**, São Paulo (2009).

POLI, M. E. H. Manual de Anticoncepção. FEBRASGO, 2009

PRESTES, R. C. Colágeno e seus derivados: Características e Aplicações em Produtos Cárneos. UNOPAR **Cient Ciênc Biol Saúde**, v.15, p. 65-74, 2012.

RAIMUNDO, C. C. M. **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia**. Dissertação 126f. Pós-Graduação em química. Instituto de Química pela Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN F. J.; LEMONS, J. E.; An introduction to materials in medicine. **Academic Press**, San Diego, (2005).

RODRIGUES, M. A. V. **Biomateriais de quitosana/gelatina com resina de jatobá: influência do grau de acetilação da quitosana e da inclusão da resina**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo. 2016

SANTOS JÚNIOR, A. R.; WADA, M. L. F. Polímeros Biorreabsorvíveis como Substrato para Cultura de Células e Engenharia Tecidual. São Paulo – Campinas. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 17, p. 308-317, 2007.

SENEL, S.; MCCLURE, J. S. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 1467-1480, 2004.

SILVA, S. N. **Atividade fitoestrogênica de Morusnigra L., Moraceae, em ratas ovariectomizadas**. Tese, 125 f. Pós-Graduação em biotecnologia da rede nordeste de biotecnologia. Ponto Focal da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2010.

SILVA, R. S. M. **Desenvolvimento e avaliação de membranas de quitosana/gelatina/heparina**. Tese, 139f. Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais. Universidade Federal de Campina Grande-UFCG. Campina Grande, 2013.

SIMÕES, A. S. et al. Desempenho da matriz híbrida sio2-quitosana na imobilização da lipase microbiana de *Candida rugosa*. **Química Nova**, Lorena, v. 34, n. 1, p.33-38, 2010.

SITRUK-WARE, R. Contraception: an international perspective. **Contraception** 2006; 73:215–22.

SITRUK-WARE, R.; NATH, A. Contraception/Review article: The use of newer progestins for contraception. *Regine Sitruk-Warea, Anita Nath*. 2010/410–417.

SOARES, C. R. **Influência dos hormônios sexuais femininos sobre a influência alérgica pulmonar em modelo murino de asma crônica**. Dissertação. Pós-Graduação em Ciências. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

SOUSA, W. J. B., **Desenvolvimento de Filmes Híbridos de Quitosana/Fosfato de Cálcio com Incorporação de Vitamina E**. 2012, 100f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais), Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG. 2012.

PEROFF, L.; FRITZ, M. A. *Clinical Gynecology endocrinology and infertility*. 8 ed., Baltimore: Lippincot Willians e Willians, 2014.

SPIN-NETO, R.; PAVONE, C.; FREITAS, R. M.; MARCANTONIO, R. A. C.; MARCANTONIO JÚNIOR, E. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. **Revista de Odontologia da UNESP**. v. 37, n. 2, p. 155-161, 2008.

SUH, J.K.F.; MATTHEW, H.W.T. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review, **Biomaterials**, v.21, p.2589-2598, 2000.

TOWNSEND, J. W.; SITRUK-WARE, R.; WILLIAMS, K.; ASKEW, I.; BRILL, K. New strategies for providing hormonal contraception in developing countries. **Contraception** 2011; 83:405–9.

VANDER A, SHERMAN J, LUCIANO D. *Human Physiology. The Mechanisms of body function*. 8th ed. New York: Mc Graw-Hill, 2001

VIEIRA, L. M.; SAES, S. O.; DÓRIA, A. A. B.; GOLDBERG, T. B. L. Reflexões sobre a anticoncepção na adolescência no Brasil. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant**. v. 6, n. 1, p. 135-140, 2006.

VIGO, F.; LUBIANCA, J. N.; CORLETA, H. E. Progestágenos: farmacologia e uso clínico – Revisão. **Femina**, V. 39, n 3, 2011.

VILELA, A. L. M. Métodos anticoncepcionais. Anatomia e fisiologia humana. Disponível em: <http://www.afh.bio.br/básicos/repro8.htm>. [2004 fev 6].

VULCANI, V. A. S. **Matrizes de colágeno para liberação controlada de progesterona**. (Dissertação de Mestrado). Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia. São Carlos, 2004.

VULCANI, V. A. S; PLEPIS, A. M. G. Ensaios de liberação in vitro de progesterona a partir de matrizes de colágeno aniônico. **Vet. Not.** Uberlândia, v. 12, n. 2, p. 47-54, Ago-Dez. 2006.

WILLIAMS, D. F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 5897-5909.2009

WINNER, B.; PEIPERT, J. F.; ZHAO, Q.; BUCKEL, C.; MADDEN, T.; ALLSWORTH, J. E.; SECURA, G. M. Effectiveness of long-acting reversible contraception. **N Engl J Med** 2012;

YAKABE, C. **Determinação do 17 b-estradiol em formas farmacêuticas utilizadas na terapia hormonal.** Tese. Pós-Graduação em Fármaco e Medicamento. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.