



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA

Florença Sayuri Mikawa dos Santos

Avaliação do Potencial Reparador de Matriz de Quitosana
Associada a Óxido de Grafeno Funcionalizado com FGF2.
Aplicações no Tratamento da Mucosite Oral

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Renata Sales Nogueira

Botucatu

2023

Florença Sayuri Mikawa dos Santos

**Avaliação do Potencial Reparador de Matriz de Quitosana
Associada a Óxido de Grafeno Funcionalizado com FGF2.
Aplicações no Tratamento da Mucosite Oral**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Mestre em
Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Renata Sales Nogueira

Botucatu

2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Santos, Florença Sayuri Mikawa dos.
Avaliação do Potencial Reparador de Matriz de Quitosana
Associada a Óxido de Grafeno Funcionalizado com FGF.
Aplicações no Tratamento da Mucosite Oral / Florença Sayuri
Mikawa dos Santos - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu
Orientadora: Maria Renata Sales Nogueira
Capes: 31302017

1. Mucosite. 2. Estomatite - Tratamento. 3. Quitosana. 4.
Óxido de grafeno.

Palavras-chave: Mucosite Oral; Óxido de Grafeno;
Quitosana.

DEDICATÓRIA

Aos pacientes com câncer, acometidos pela mucosite oral, que este trabalho, de alguma maneira, possa contribuir de forma positiva para elevar a qualidade de vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Leandro e Florença, minha querida filha Lohana e meu companheiro de vida Victor, pelo apoio incondicional, pelas palavras de incentivo nos momentos difíceis e pelas vibrações em cada conquista alcançada.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Renata Sales Nogueira, por todos os ensinamentos acadêmicos, todo o compartilhamento de conhecimento, por sempre me motivar e tranquilizar nos momentos de dificuldade e por toda confiança em mim depositada.

À Adriana Sierra Assencio Almeida Barbosa, do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Lauro de Souza Lima, pela amizade, suporte técnico e prático.

À Bárbara de Oliveira e ao Adriano de Sousa Pessoa, da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP, pelos treinamentos para desenvolvimento de hidrogel e técnicas de cultura celular, respectivamente.

Ao engenheiro Will Braseliano, pelo suporte técnico na mensuração das membranas.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.” (Chico Xavier)

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina, Botucatu.

A Seção Técnica de Pós-Graduação da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina, Botucatu.

Ao Instituto Lauro de Souza Lima, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Bauru.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos.

“O homem não teria alcançado o possível se, repetidas vezes, não tivesse tentado o impossível.”

(Max Weber)

“O sucesso não tem a ver com a confiança que você tem, mas com o esforço que você está disposto a investir.”

(Michelle Obama)

RESUMO

DOS SANTOS, F. S. M. **Avaliação do Potencial Reparador de Matriz de Quitosana Associada a Óxido de Grafeno Funcionalizado com FGF2**. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2023.

A mucosite oral é um efeito colateral grave no tratamento do câncer que afeta a qualidade de vida dos pacientes. A prevenção e o tratamento eficazes dessa condição são urgentemente necessários, pois as abordagens atuais são apenas paliativas. Nesse sentido, os biopolímeros de quitosana e o óxido de grafeno estão sendo estudados como possíveis terapias. O objetivo deste estudo foi desenvolver e caracterizar compostos bioativos feitos de quitosana associada ao óxido de grafeno e FGF2, a fim de contribuir com o tratamento da mucosite oral em pacientes oncológicos. Foram produzidos hidrogéis e membranas bioadesivas, combinados em grupos: Quitosana (CH); Quitosana com FGF2 (CH/FGF); Quitosana com óxido de grafeno (CH/GO); Quitosana com óxido de grafeno e FGF2 (CH/GO/FGF); Controle (CTRL); Controle com FGF2 (CTRL/FGF). Os biomateriais foram avaliados em períodos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas. Os hidrogéis foram avaliados em testes físico-químicos de centrifugação e características organolépticas. As membranas foram avaliadas em testes de espessura, porosidade, absorção de líquidos e degradação de massa. Os biomateriais também foram avaliados quanto as respectivas propriedades antimicrobianas. Os resultados indicaram que os hidrogéis permitiram a formação de halos de inibição para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. As membranas apresentaram somente capacidade de inibição por contato, nas áreas subjacentes de disco-difusão. A biocompatibilidade e capacidade de promover migração celular dos biomateriais, foi investigada em fibroblastos NIH/3T3. A comparação entre os grupos mostrou diferenças estatisticamente significantes a partir de 48 horas nas membranas CH/GO e CH/GO/FGF, onde as áreas de fenda foram menores do que o grupo CTRL ($p = 0,047$; $0,030$). Após 72 horas, todos os grupos de membranas (CH, CH/FGF, CH/GO e CH/GO/FGF) promoveram redução significativa das fendas, em comparação a CTRL ($p = 0,003$; $0,005$; $0,004$; $0,001$) e CTRL/FGF ($p = 0,019$; $0,035$; $0,022$; $0,010$). Após 96 horas, todas as membranas também demonstraram fendas reduzidas em relação aos controles, CTRL ($p = 0,003$; $0,002$; $0,004$; $0,004$) e CTRL/FGF ($p = 0,016$; $0,012$; $0,020$; $0,020$). Os resultados da

avaliação de citotoxicidade, pelo ensaio MTT, mostraram que a maioria das preparações de hidrogel e membrana de quitosana apresentou viabilidade celular acima do limite de citotoxicidade. Alguns grupos de hidrogel, no entanto, demonstraram médias abaixo de 70%, indicando um possível efeito citotóxico desses materiais sobre os fibroblastos. Nossos resultados permitiram concluir que os compostos bioativos produzidos com quitosana, óxido de grafeno e FGF2 têm potencial terapêutico para tratar lesões de mucosite oral e, prospectivamente, outros tipos de úlceras cutâneas e mucosas. Vale destacar que as membranas de quitosana com óxido de grafeno e FGF2, apresentaram melhor desempenho físico-químico do que as preparações em hidrogel, além de serem menos citotóxicas e mais eficazes na promoção da migração celular.

Palavras-Chave: Mucosite Oral; Quitosana; Óxido de Grafeno

ABSTRACT

DOS SANTOS, F. S. M. *Evaluation of the Restorative Potential of Chitosan Matrix Associated with Functionalized Graphene Oxide with FGF2*. Dissertation (Master in Pathology) – São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”, Faculty of Medicine of Botucatu, 2023.

*Oral mucositis is a serious side effect of cancer treatment that affects patients' quality of life. Effective prevention and treatment of this condition is urgently needed as current approaches are only palliative. In this sense, chitosan biopolymers and graphene oxide are being studied as possible therapies. The aim of this study was to develop and characterize bioactive compounds made from chitosan associated with graphene oxide and FGF2, in order to contribute to the treatment of oral mucositis in cancer patients. Hydrogels and bioadhesive membranes were produced, combined into groups: Chitosan (CH); Chitosan with FGF2 (CH/FGF); Chitosan with graphene oxide (CH/GO); Chitosan with graphene oxide and FGF2 (CH/GO/FGF); Control (CTRL); Control with FGF2 (CTRL/FGF). The biomaterials were evaluated in periods of 0, 24, 48, 72 and 96 hours. The hydrogels were evaluated in physical-chemical tests of centrifugation and organoleptic characteristics. The membranes were evaluated in thickness, porosity, liquid absorption and mass degradation tests. Biomaterials were also evaluated for their respective antimicrobial properties. The results indicated that the hydrogels allowed the formation of inhibition zones for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. The membranes showed only contact inhibition capacity in the underlying areas of disk diffusion. The biocompatibility and ability to promote cell migration of biomaterials was investigated in NIH/3T3 fibroblasts. Comparison between groups showed statistically significant differences after 48 hours for the CH/GO and CH/GO/FGF membranes, where the gap areas were smaller than the CTRL group ($p = 0.047$; 0.030). After 72 hours, all groups of membranes (CH, CH/FGF, CH/GO and CH/GO/FGF) promoted a significant reduction of gaps, compared to CTRL ($p = 0.003$; 0.005 ; 0.004 ; 0.001) and CTRL/FGF ($p = 0.019$; 0.035 ; 0.022 ; 0.010). After 96 hours, all membranes also demonstrated reduced gaps relative to controls, CTRL ($p = 0.003$, 0.002 , 0.004 , 0.004) and CTRL/FGF ($p = 0.016$, 0.012 , 0.020 , 0.020). The results of the cytotoxicity evaluation, by the MTT assay, showed that most of the hydrogel and chitosan membrane preparations presented cell viability above the cytotoxicity limit. Some hydrogel groups, however, showed means below 70%, indicating a*

possible cytotoxic effect of these materials on fibroblasts. Our results allowed us to conclude that the bioactive compounds produced with chitosan, graphene oxide and FGF2 have therapeutic potential to treat oral mucositis lesions and, prospectively, other types of cutaneous and mucosal ulcers. It is worth noting that chitosan membranes with graphene oxide and FGF2 showed better physicochemical performance than hydrogel preparations, in addition to being less cytotoxic and more effective in promoting cell migration.

Keywords: *Oral Mucositis, Chitosan, Graphene Oxide*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1R¹. Representação da estrutura química da quitosana. National Center for Biotechnology Information. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chitosan>

Figura 2R. Representação da estrutura química do óxido de grafeno. National Center for Biotechnology Information. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/124202900>

Figura 1M². Preparações de hidrogel. Representação esquemática da divisão dos hidrogéis de quitosana 2%, para preparo dos demais grupos experimentais. (A) quitosana (CH); (B) CH com fator de crescimento fibroblástico 2 (CH/FGF); (C) CH com óxido de grafeno (CH/GO); (D) CH com GO e FGF

Figura 2M. Determinação da espessura de membrana. Representação esquemática dos pontos utilizados na determinação do valor médio de espessura das membranas fracionadas em discos

Figura 3M. Preparações de hidrogel. Aspecto visual dos hidrogéis nos grupos experimentais, (A) quitosana (CH); (B) CH com fator de crescimento fibroblástico 2 (CH/FGF); (C) CH com óxido de grafeno (CH/GO); (D) CH com GO e FGF2 (CH/GO/FGF)

Figura 4M. Aspecto e dimensões de membrana. Características macroscópicas das membranas, após fracionamento em diâmetros de 12 mm e 6 mm. (A) quitosana (CH); (B) CH com fator de crescimento fibroblástico 2 (CH/FGF); (C) CH com óxido de grafeno (CH/GO); (D) CH com GO e FGF2 (CH/GO/FGF)

Figura 5M. Teste de centrifugação. Aspecto visual dos hidrogéis após 3 ciclos de centrifugação com 2,5 g por amostra de hidrogel, em 3000 rpm (força G = 2.012), por 30 minutos, em temperatura ambiente. (A) quitosana (CH); (B) CH com fator de crescimento

¹ R = Revisão Bibliográfica

² M = Manuscrito

fibroblástico 2 (CH/FGF); (C) CH com óxido de grafeno (CH/GO); (D) CH com GO e FGF2 (CH/GO/FGF)

Figura 6M. Análise de espessura e porosidade de membrana. (A) Espessura e (B) Porosidade, avaliadas nos grupos experimentais: quitosana (CH); CH com fator de crescimento fibroblástico 2 (CH/FGF); CH com óxido de grafeno (CH/GO); CH com GO e FGF2 (CH/GO/FGF). Teste estatístico ANOVA, com pós-teste de Tukey. Resultados expressos como média e desvio padrão, obtidos de um ensaio/grupo, com cinco replicatas para (A) e três para (B). Valores de $p < 0,05$ indicam significância estatística

Figura 7M. Análise de absorção de líquidos e degradação de membrana. (A) Absorção e (B) degradação, avaliadas nos grupos experimentais: quitosana (CH); CH com fator de crescimento fibroblástico 2 (CH/FGF); CH com óxido de grafeno (CH/GO); CH com GO e FGF2 (CH/GO/FGF). Teste estatístico ANOVA, com pós-teste de Tukey. Resultados expressos como média e desvio padrão, obtidos de um ensaio/grupo, com três replicatas para (A) e (B). Valores de $p < 0,05$ indicam significância estatística

Figura 8M. Avaliação de propriedades antimicrobianas em hidrogel. Antibiógramas testados em *C. albicans*, *E. coli* e *S. aureus* em papel filtro embebido em hidrogel, para os grupos CH, CH/FGF, CH/GO e CH/GO/FGF

Figura 9M. Avaliação de propriedades antimicrobianas em hidrogel. Antibiógramas testados em *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* em papel filtro embebido em hidrogel, para os grupos CH, CH/FGF, CH/GO e CH/GO/FGF

Figura 10M. Ensaio controle de migração celular, sem hidrogel ou membrana. Avaliação do potencial de aumento na migração de fibroblastos (NIH/3T3), sem tratamento por quitosana e óxido de grafeno, entre 0 e 96 horas: Controle (CTRL); Controle com FGF2 (CTRL/FGF). Aumento: 100 X

Figura 11M. Ensaio de migração celular em hidrogel de quitosana, com ou sem FGF2. Avaliação do potencial de aumento na migração de fibroblastos NIH/3T3, entre 0 e 96 horas. Imagens representativas dos grupos experimentais: Quitosana (CH); Quitosana com FGF2 (CH/FGF). Aumento: 100 X

Figura 12M. Ensaio de migração celular em hidrogel de quitosana com óxido de grafeno e/ou FGF2. Avaliação do potencial de aumento na migração de fibroblastos NIH/3T3, entre 0 e 96 horas. Imagens representativas dos grupos experimentais: Quitosana com óxido de grafeno (CH/GO); Quitosana com óxido de grafeno e FGF2 (CH/GO/FGF). Aumento: 100 X

Figura 13M. Ensaio de migração celular em membrana de quitosana, com ou sem FGF2. Avaliação do potencial de aumento na migração de fibroblastos NIH/3T3, entre 0 e 96 horas. Imagens representativas dos grupos experimentais: Quitosana (CH); Quitosana com FGF2 (CH/FGF). Aumento: 100 X

Figura 14M. Ensaio de migração celular em membrana de quitosana, com óxido de grafeno e/ou FGF2. Avaliação do potencial de aumento na migração de fibroblastos NIH/3T3, entre 0 e 96 horas. Imagens representativas dos grupos experimentais: Quitosana com óxido de grafeno (CH/GO); Quitosana com óxido de grafeno e FGF2 (CH/GO/FGF). Aumento: 100 X

Figura 15M. Migração celular em hidrogel de quitosana, com ou sem óxido de grafeno e FGF2. Percentual de área de fenda em fibroblastos NIH/3T3, avaliado nos grupos: Controle (CTRL); Controle com FGF2 (CTRL/FGF); Quitosana (CH); Quitosana com FGF2 (CH/FGF); Quitosana com óxido de grafeno (CH/GO); Quitosana com óxido de grafeno e FGF2 (CH/GO/FGF). (A) Tempo inicial (T0), (B) 24 horas (T24), (C) T48, (D) T72, (E) T96, (F) Dados intragrupos. Teste estatístico ANOVA, com pós-teste de Tukey. Valores de $P < 0,05$ indicam significância estatística. Dados expressos em média e desvio padrão, representativos de dois ensaios independentes, um deles em duplicata

Figura 16M. Migração celular em membrana de quitosana, com ou sem óxido de grafeno e FGF2. Percentual de área de fenda em fibroblastos NIH/3T3, avaliado nos grupos: Controle (CTRL); Controle com FGF2 (CTRL/FGF); Quitosana (CH); Quitosana com FGF2 (CH/FGF); Quitosana com óxido de grafeno (CH/GO); Quitosana com óxido de grafeno e FGF2 (CH/GO/FGF). (A) Tempo inicial (T0), (B) 24 horas (T24), (C) T48, (D) T72, (E) T96, (F) Dados intragrupos. Teste estatístico ANOVA, com pós-teste de Tukey. Valores de $P < 0,05$ indicam significância estatística. Dados expressos em média e desvio padrão, representativos de dois ensaios independentes, um deles em duplicata

Figura 17M. Percentual de viabilidade celular dos biomateriais de quitosana e/ou óxido de grafeno e FGF2. (A) Hidrogéis e (B) membranas, avaliados entre 0 e 96 horas nos grupos: Quitosana (CH); Quitosana com FGF2 (CH/FGF); Quitosana com óxido de grafeno (CH/GO); Quitosana com óxido de grafeno e FGF2 (CH/GO/FGF). Teste estatístico ANOVA, com pós-teste de Tukey. Valores de $P < 0,05$ indicam significância estatística. Dados expressos em média e desvio padrão, representativos de dois ensaios independentes, em triplicata

LISTA DE TABELAS

Tabela 1R. Fatores de risco para o desenvolvimento de mucosite oral (MARIA, et al., 2017; PULITO et al., 2020).

Tabela 2R. Escala de classificação da toxicidade da mucosite oral (MARIA, et al., 2017).

Tabela 1M. Análise organoléptica ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Avaliação das características das preparações de hidrogel em função da temperatura, tempo e condições de armazenamento.

Tabela 2M. Análise organoléptica ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Avaliação das características das preparações de hidrogel em função da temperatura, tempo e condições de armazenamento.

Tabela 3M. Potencial hidrogeniônico de solução tampão utilizada em testes de absorção de líquidos e degradação.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µg – Micrograma

µl - Microlitro

µm - Micrometro

5-FU – Fluoruracil-5

CH – *Chitosan* (quitosana)

cm – Centímetro

DANT - Doenças e agravos não transmissíveis

EROs - Espécies reativas de oxigênio

FGF2 - *Fibroblast growth factor 2* (Fator de crescimento fibroblástico 2)

GO – *Graphene oxide* (Óxido de grafeno)

HD – Hidrogel

INCA – Instituto Nacional do Câncer

mg - Miligrama

ml - Mililitro

mm – Milímetro

MO – Mucosite Oral

MTT - brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il] -2,5- difeniltetrazólio

NCI - *National Cancer Institute*

°C – graus Celsius

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS - *Phosphate Buffered Saline* (Solução salina tamponada com fosfato)

rpm - Rotações por minuto

RTOG - *Radiation Therapy Oncology Group*

SFB - Soro fetal bovino

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – REVISÃO DA LITERATURA	20
REVISÃO DA LITERATURA	21
Considerações Gerais sobre o Câncer	21
Formas de Tratamento do Câncer	21
Mucosite Oral como Evento Adverso da Terapia Oncológica	22
Características Clínicas da Mucosite Oral	23
Prevalência da Mucosite Oral	23
Escala de Avaliação da Mucosite Oral	24
Mecanismos Fisiopatológicos da Mucosite Oral	25
Prevenção e Tratamento da Mucosite Oral	26
Novas Estratégias no Manejo da Mucosite Oral	27
Biomateriais – Quitosana	28
Biomateriais – Óxido de Grafeno	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
CAPÍTULO II – OBJETIVOS	37
OBJETIVO GERAL	38
Objetivos Específicos	38
CAPÍTULO III – MANUSCRITO	39
INTRODUÇÃO	40
MATERIAL E MÉTODOS	42
Desenho Experimental	42
Preparo de Hidrogel	42
Preparo de Membrana	43
Caracterização Físico-Química de Hidrogel	43
Teste de Centrifugação	43
Análise Organoléptica	43
Caracterização Físico-Química de Membrana	43
Teste de Espessura	44
Teste de Porosidade	44
Ensaio de Absorção de Líquidos	44
Ensaio de Degradação de Massa	45

Avaliação de Potencial Hidrogeniônico (pH)	45
Teste de Difusão em Disco	45
Ensaio <i>In Vitro</i>	46
Cultivo Celular	46
Teste de Migração Celular	46
Teste de Citotoxicidade	47
Análise Estatística	48
RESULTADOS	49
Características Físico-químicas Adequadas para o Desenvolvimento de Biomateriais	49
Quitosana e Óxido de Grafeno Apresentam Propriedades Antimicrobianas	50
Membranas de Quitosana e Óxido de Grafeno Induzem Migração Celular	50
DISCUSSÃO	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
FIGURAS	62
TABELAS	76
CAPÍTULO IV – CONCLUSÃO	79
CONCLUSÃO	80

CAPÍTULO I – REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

Considerações Gerais sobre o Câncer

Doenças e agravos não transmissíveis são responsáveis pela maioria dos adoecimentos e óbitos mundiais na atualidade. Estima-se que no século XXI o câncer é a causa principal de morte prematura (antes dos 70 anos de idade) e a barreira mais relevante para o impedimento do aumento da expectativa de vida em todos os países do mundo (INCA, 2019; Bray et al., 2018). A incidência e a mortalidade por câncer vêm crescendo no mundo, em parte pelo envelhecimento e crescimento populacional. Esse crescimento também pode ser atribuído à mudança na distribuição e prevalência dos fatores de risco de câncer, principalmente os relacionados ao desenvolvimento socioeconômico (Bray et al, 2021). A estimativa global de 2018 mostra que ocorreram 18 milhões de casos novos de câncer no mundo e 9,6 milhões de óbitos. No Brasil, segundo informações do Instituto Nacional do Câncer (INCA), são esperados cerca de 625 mil novos casos de câncer para cada ano do triênio 2020 a 2022 (INCA, 2019).

De acordo com Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é definido como um conjunto de mais de 100 processos patológicos que tem em comum a divisão anormal e replicação celular desordenada. Células neoplásicas crescem rapidamente dando origem aos tumores, que podem atingir outros tecidos e órgãos por meio de metástases. As metástases são caracterizadas por um processo sequencial e complexo, no qual as células cancerígenas invadem os órgãos específicos, incluindo pulmão, fígado, cérebro e ossos (Peinado et al, 2017). Cada célula dispõe de um padrão de divisão e replicação; a partir do momento que ocorre um erro nesse padrão, surge uma população celular neoplásica, com características biológicas independentes da população original. O câncer pode ocorrer em qualquer parte do corpo e em diferentes graus de agressividade (Ministério da Saúde, 2020). As principais abordagens terapêuticas utilizadas no câncer incluem cirurgia, radioterapia e quimioterapia, podendo ser administradas de modo isolado ou em conjunto (Curra et al, 2018).

Formas de Tratamento do Câncer

A quimioterapia é a forma mais utilizada no tratamento do câncer, no qual ocorre a administração de drogas antineoplásicas que agem de maneira sistêmica. (Csordas et al., 2014). Atuando em nível celular, interferem no processo de divisão e crescimento, tendo como objetivo a destruição das células malignas de modo a preservar as células saudáveis (Ribeiro; SANTOS, 2015). No entanto, as drogas quimioterápicas não atuam de forma tão seletiva e acabam danificando tanto as células malignas, quanto as células saudáveis, principalmente as células da mucosa oral, gastrointestinais, dérmicas e as do sistema imunológico, devido a rápida proliferação celular; o que explica, por exemplo, a perda de cabelo, náuseas e probabilidade de infecções oportunistas decorrentes da quimioterapia (Kwon, 2016; Csordas, et al., 2014). A intensidade dos efeitos colaterais varia conforme o tipo de droga quimioterápica utilizada, da dosagem, do tempo de tratamento e da resposta individual de cada paciente. Tais efeitos podem ser minimizados, com a combinação de outras terapias que tem por objetivo diminuir o efeito de cada agente isolado (Campos, et al., 2015).

A radioterapia consiste na administração de doses pré-estabelecidas de radiação ionizante direcionada às células malignas, com intuito de destruir ou inibir seu crescimento, buscando sempre causar o mínimo dano possível às células saudáveis adjacentes (Miranda; Souza, 2015). É considerada uma importante modalidade de tratamento para vários tipos de câncer, e cerca de 60% dos pacientes recebem radiação ionizante como parte de seu regime radioterapêutico. Embora a radioterapia tenha sucesso variável a depender do tipo de câncer, a toxicidade e os efeitos colaterais associados ao seu uso são preocupantes, pois podem afetar imensamente a qualidade de vida dos pacientes (Hall, et al., 2016). A toxicidade da radiação pode se manifestar de várias maneiras, e uma delas é a mucosite oral (MO) (Berkey, 2010).

Mucosite Oral como Evento Adverso da Terapia Oncológica

Com a chegada da quimioterapia na década de 1940, houve um aumento nos eventos adversos da terapia antitumoral. Entre tais eventos, está a MO, inicialmente denominada estomatite. Devido à falta de terapia eficaz e prevenção da MO, houve uma queda considerável na qualidade de vida e prognóstico dos pacientes oncológicos. Após décadas, os mecanismos subjacentes à patogênese da MO foram mais bem elucidados. Em 2007, o termo MO foi adotado para descrever lesões associadas aos efeitos citotóxicos da quimioterapia e/ou radioterapia para o tratamento de câncer e transplante de órgãos (Pulito et al, 2020). Atualmente, a MO é considerada a complicação não hematogênica mais grave no tratamento antitumoral (Chaveli-

López; Bagan-Sebastian, 2016), impactando a qualidade de vida dos pacientes e continuidade da terapia oncológica, visto que pode levar à interrupção do tratamento, e alterações no planejamento da quimioterapia e/ou radioterapia (Maria, et al., 2017).

Características Clínicas da Mucosite Oral

A MO pode afetar todo o trato digestório, embora o local mais afetado seja a cavidade bucal. As formas graves de MO são caracterizadas por ulcerações dolorosas, irregulares, grandes e profundas da mucosa, muitas vezes cobertas por pseudomembranas compostas por células necróticas, fibrina e microrganismos oportunistas (Miranda et al., 2016; Torre, Alfaro, 2016; Sonis, 2011). Os pacientes frequentemente requerem mudanças na dieta, dependência de alimentação parenteral ou gastrostomia e podem apresentar perda de peso, bem como infecções locais e sistêmicas. Em alguns casos, há necessidade de reduzir a dosagem de quimioterapia e/ou radioterapia, resultando no atraso do tratamento e desfecho negativo ao paciente. Adicionalmente, esses pacientes podem necessitar de internações hospitalares prolongadas, com aumento substancial no custo do tratamento oncológico em sua totalidade (Eduardo et al., 2011).

Prevalência da Mucosite Oral

Os dados epidemiológicos para MO ainda são subnotificados e contraditórios. Esse efeito adverso, na maioria das vezes é registrado apenas quando os pacientes desenvolvem a forma mais grave, para a qual é necessário tratamento clínico. Além de não existir uma escala padrão para avaliar a sua gravidade, dificultando o estadiamento e o diagnóstico da MO (Pulito et al., 2020). A prevalência de MO é cerca de 30% a 40%, para aqueles em regime quimioterápico e esse percentual sobe para 60% a 85% no caso de pacientes submetidos a transplante de células-tronco hematopoiéticas. Em pacientes submetidos à quimioterapia e/ou radioterapia de cabeça e pescoço, o percentual chega a 90% (Villa; Sonis, 2016). O desenvolvimento da MO não depende apenas do regime antineoplásico, das doses e do número de ciclos, mas também de características individuais. Os pacientes do sexo feminino apresentam maior risco de desenvolver MO na forma grave quando tratadas com 5-Fluoruracil (5-FU). O mesmo ocorre em pacientes com deficiência da dihidropirimidina desidrogenase, enzima crítica para o catabolismo do 5-FU (Pulito et al., 2020; Chansky et al., 2005). Na Tabela 1R, podemos observar alguns dos principais fatores de risco envolvidos no desenvolvimento da MO.

Tabela 1R. Fatores de risco para o desenvolvimento de mucosite oral (Adaptado de Maria, et al., 2017; Pulito et al., 2020).

Idade	Jovens tem alta taxa de renovação celular e indivíduos com idade mais avançada possuem taxa de cicatrização mais lenta
Sexo	Risco aumentado para mulheres
Higiene bucal	Bons hábitos de higiene bucal reduzem o risco de MO
Função secretora salivar	Diminuição da saliva aumenta o risco de MO
Fatores genéticos	Potencial para alto risco de MO em alguns indivíduos, ainda a ser identificado
Desnutrição	Cicatrização deficiente
Doenças pré-existentes	Doença renal, diabetes, doenças autoimunes, entre outras condições podem aumentar o desenvolvimento da MO
Tabagismo/Alcoolismo	Prejudicam a cicatrização
Tratamentos antineoplásico anteriores	Histórico de MO devido a tratamento anterior aumenta o risco

Alguns fatores de risco para MO podem, portanto, estar associados a sexo, idade avançada, peso corporal elevado, redução da depuração de drogas e suscetibilidade genética (Villa; Sonis, 2016; Pulito et al. 2020). Outros fatores a ser considerados incluem, higiene bucal precária, baixa salivagem, doenças metabólicas (e.g. *diabetes mellitus*), função renal e imune comprometidas, estado nutricional, doença periodontal pré-existente, além do uso de álcool e tabaco (Epstein, 2012; Hespanhol, 2010).

Escala de Avaliação da Mucosite Oral

Atualmente, existem diferentes escalas para graduar a MO, cujos parâmetros variam entre elas. A escala da OMS para avaliação da MO é a mais utilizada para fins de estudo clínico. Essa escala leva em consideração critérios como, a presença de eritema ou ulceração e a capacidade do paciente em deglutir alimentos (Chaveli-Lopez, 2014). Por outro lado, a escala do Instituto Nacional do Câncer (NCI, *National Cancer Institute*), dos Estados Unidos da América, é mais utilizada na prática clínica, e leva em consideração a capacidade de deglutição, o sítio anatômico da lesão, a necessidade de intervenção e o tipo de tratamento, seja quimioterapia ou radioterapia (Pulito et al., 2020; Lalla et al., 2008, 2014).

A escala do Grupo de Radioterapia Oncológica (RTOG, *Radiation Therapy Oncology Group*) foi criada no intuito de classificar a MO em pacientes submetidos somente à

radioterapia. Essa escala recomenda que, se o paciente apresentar MO de grau 3 ou grau 4 o tratamento oncológico deve ser suspenso, pois as lesões podem tornar-se permanentes (Mallick; Benson; Rath, 2015; Yucel et al., 2015). Na Tabela 2R estão listadas as escalas adotadas pela OMS, NCI e RTOG, de modo comparativo.

Tabela 2R. Classificação da toxicidade da mucosite oral (adaptado de MARIA, et al., 2017).

	Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4	Grau 5
OMS*	Sem alteração	Inflamação e eritema, com ou sem dor Sem tratamento específico	Eritema com úlceras, dor leve Possibilidade de alimentação sólida, com dificuldade Sem tratamento específico	Úlceras dolorosas, tolera apenas alimentação líquida Uso de analgésicos	Presença de necrose Alimentação parenteral	
NCI**	Sem alteração	Úlceras e eritema, dor leve Sem necessidade de intervenção	Eritema, edema/úlceras, dor moderada Sem dificuldade na alimentação ou deglutição	Eritema, edema ou úlceras que necessitam de hidratação, Sangramento com dor Intensa Necessita intervenção e alimentação parenteral	Grave ulceração com sangramento espontâneo Necessidade de suporte nutricional, enteral ou intubação profilática	Óbito, devido a toxicidade
RTOG**	Sem alteração	Irritação com dor leve Sem necessidade de analgésicos	Secreção serosa e sangramento, com dor moderada que exige intervenção com analgésicos	Úlceras confluentes, MO fibrinosa, com dor intensa Exige uso de narcóticos	Ulceração, hemorragia e necrose	

*Organização Mundial De Saúde (OMS); **National Cancer Institute (NCI); ***Radiation Therapy Oncology Group (RTOG)

Mecanismos Fisiopatológicos da Mucosite Oral

A mucosa bucal possui alta atividade mitótica e alta taxa de renovação celular, sendo necessária uma multiplicação celular constante para sua integridade (Sonis, 2011; Curra et al.,

2018). Por essa razão, a mucosa bucal responde rapidamente à radiação e quimioterápicos, visto que as fases mais sensíveis do ciclo celular são G2 e mitose. Desse modo, a mucosa é rapidamente afetada e torna-se extremamente sensível a esses tratamentos (Sawada, 2009; Santos et al., 2011). O desenvolvimento da MO consiste em uma cascata de eventos que são divididos em cinco estágios.

A fase de iniciação ocorre após a administração da quimioterapia ou radioterapia, que induzem dano tecidual causando a liberação de espécies reativas do oxigênio, diminuição da renovação celular, alteração dos vasos sanguíneos e dano ao DNA; o que culmina em morte das células epiteliais, basais e suprabasais, desencadeando o processo da MO. No segundo estágio, ocorre a ativação dos fatores de transcrição e de citocinas pró-inflamatórias, estimulando apoptose, bloqueando o crescimento e diferenciação celular e ocasionando a morte das células epiteliais (Sonis, 2004). Na terceira fase, ocorre a ativação de fatores de transcrição envolvidos na expressão de genes de modulação da resposta ao dano. Com a liberação de citocinas pró-inflamatórias, ocorre agressão adicional ao tecido previamente agredido pelo regime quimioterápico ou radiação (Logan et al., 2007; Sonis, 2004).

A quarta fase é caracterizado pela perda da integridade da mucosa, ocasionando lesões dolorosas, favorecendo infecções oportunistas, que podem ocasionar bacteremia e septicemia, principiante por estreptococos e estafilococos (Mougeot et al., 2019). Na quinta fase ocorre a cicatrização ou cura, que podem acontecer de maneira espontânea, de 2 a 3 semanas após o término da radioterapia ou por até três semanas da administração do agente quimioterápico (Kwon, 2016). O tratamento antineoplásico danifica particularmente os fibroblastos, pela ativação da proteína-1 (AP1) e secreção de metaloproteinases que degradam a matriz extracelular e a membrana basal epitelial (Sonis, 2004; Pullito et al., 2020).

Prevenção e Tratamento da Mucosite Oral

Um protocolo efetivo para prevenção da MO é de grande importância para os pacientes em tratamento antineoplásicos, pois atualmente existem apenas abordagens paliativas para diminuir a sintomatologia, o agravamento das lesões de MO e controle de eventuais infecções secundárias (Lalla, et al., 2011). Medidas para prevenção e redução da MO, incluem ações como: orientação e educação do paciente em relação à prática de higiene bucal; uso de

enxaguantes bucais salinos não medicamentosos; hidratação; nutrição adequada; controle de infecções; crioterapia e utilização de laser de baixa potência (van Seville et al., 2015).

Também podem ser empregados medicamentos opioides, anestésicos tópicos, anti-inflamatórios (Marçon et al., 2016), gel de própolis (Mendonça, 2016; Akhavan-Karbassi et al., 2016), suco de *Aloe Vera* (Miranda et al., 2016) e antibioticoterapia preventiva (Figueiredo et al., 2013). Entre os agentes utilizados no tratamento da MO estão, o cloridrato de loperamida, difenoxilato e o zinco (Lalla et al., 2014). Esse último é um elemento essencial requerido para o processo de reparo tecidual, com efeito antioxidante.

O zinco estimula proliferação epitelial, síntese de matriz extracelular e cicatrização de feridas (LALLA et al., 2014; van Seville et al., 2015). Outros agentes incluem o cloridrato de benzidamina e a clorexidina (Kazemian et al., 2009; BOSSI et al., 2014). A benzidamida apresenta atividade anti-inflamatória, analgésica, anestésica e antimicrobiana. Estudos recentes mostraram uma redução significativa na MO de grau 3 após o uso profilático de 0,15% de benzidamina em pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos a radioterapia (Kazemian et al., 2009). Entretanto, são necessários mais estudos para avaliar sua eficácia no contexto de MO induzida por quimioterapia.

O manejo da dor é uma faceta importante do tratamento da MO durante quimioterapia e/ou radioterapia. Analgésicos são recomendados para dor associada à MO e o cloridrato de doxepina, um antidepressivo tricíclico, em forma de enxaguante bucal a 0,5%, vem sendo investigado como potencial anestésico e analgésico para MO (van Seville et al., 2015). A clorexidina é um agente antimicrobiano, utilizado para o tratamento profilático da MO e, apesar de frequentemente ser usada na prática clínica, não há evidências suficientes e conflitantes para seu uso (van Seville et al., 2015). O miconazol tópico é um antifúngico de amplo espectro, utilizado no tratamento da infecção por *Candida* na MO, porém não é bem tolerado pelos pacientes, devido à dosagem diária múltipla e sabor desagradável (ORAVAIN et al., 2015).

Novas Estratégias no Manejo da Mucosite Oral

Em busca de estratégias terapêuticas alternativas e mais eficazes para o manejo da MO, novos compostos estão sendo estudados para medicamentos, como por exemplo hidrogéis e membranas mucoadesivas. Independente da sua forma de apresentação, esses compostos devem

apresentar biocompatibilidade, possuir atividade bactericida e favorecer o processo de cicatrização. Biopolímeros como a quitosana (CH) vem sendo muito utilizada para o desenvolvimento de hidrogéis e membranas, com finalidade de aumentar a capacidade de reparo tecidual. Além da CH, o óxido de grafeno (GO) tem atraído interesse de uma ampla gama de áreas, incluindo vários campos biotecnológicos e aplicações biomédicas (Maraschin, 2016), desse modo, a combinação de CH com outros polímeros, como o GO também vem sendo muito explorada para o desenvolvimento de hidrogéis e membranas para aplicação em feridas cutâneas e mucosas.

Biomateriais – Quitosana

A CH é um polissacarídeo catiônico, geralmente, obtido a partir da desacetilação da quitina, um polímero amplamente encontrado na natureza e componente estrutural dos mariscos, insetos e parede celular de fungos e bactérias (Nanda; Papaefthymiou, 2015). A quitosana é um copolímero linear com ligação β -1,4, junção entre glucosamina (2-amino-2-desoxi- β -D-glucose) e quantidades menores de N-acetilglucosamina (Nascimento et al., 2009) (Figura 1R).

A CH apresenta propriedades como biocompatibilidade, bioatividade, biodegradabilidade, baixa toxicidade, natureza policatiónica e probabilidade de várias configurações de emprego. A quitosana tem sido amplamente utilizada para recuperação tecidual, pois suas propriedades favorecem a regeneração epitelial e aceleração do processo de cicatrização, além de sua atividade antimicrobiana, anticoagulante e imunoestimulante (Ahmed, 2015; Fang, 2015; Rana, 2011). A sua ação antimicrobiana e antifúngica ocorre devido à interação de sua carga positiva com a carga negativa de resíduos celulares de fungos e bactérias, modificando a permeabilidade da parede celular, culminando com a inibição do metabolismo microbiano normal e morte celular (Maraschin, 2018).

Segundo Rinaudo (2006), quando o grau de desacetilação da quitina é maior que 50%, ela passa a ser chamada de quitosana, além disso, torna-se solúvel em solução aquosa ácida, formando um polieletrólito, viabilizando o uso em diversas aplicações, como soluções, géis, filmes e fibras. Barno et al (2017) revisaram as propriedades da quitosana e seus derivados em aplicações de reparo de feridas, ressaltando o uso como curativo com alta durabilidade, boa biocompatibilidade, boa absorção de água e a não toxicidade. Além disso, pode ajudar a acelerar

a cicatrização, atuar como hemostático, antibacteriano e analgésico. Madni et al. (2021) destacam que a CH é adequada para variadas aplicações na engenharia de tecidos, como por exemplo: desenvolvimento de scaffolds para crescimento celular. O método pode ser processado de várias maneiras, incluindo fusão, prensagem e liofilização, resultando em hidrogéis, membranas ou esponjas, com diferentes propriedades de engenharia de tecidos (Rinaudo, 2006; Barno et al., 2017; Madni et al., 2021).

Portanto, a quitosana é um biopolímero promissor para o desenvolvimento de preparações para aplicação no tratamento e recuperação tecidual, além disso, na atualidade, existem preparações a base de CH comercialmente disponíveis, como o produto HemCon (HemCon, Portland, OR), curativos dentários produzidos apenas com a CH, que proporcionam uma barreira física para a proteção da superfície da lesão, aderindo à feridas; e Chitoskin (SanguBioTechGmbH, Witten, Alemanha), curativo desenvolvido pela combinação de CH com gelatina bovina, utilizado em feridas crônicas que liberam grande quantidade de exsudato (Moghaddam et al., 2014; Haynes, Gibson, Greenwood, 2014).

Biomateriais – Óxido de Grafeno

O GO tem atraído interesse de inúmeras áreas, incluindo vários campos biotecnológicos e aplicações biomédicas (Maraschin, 2016). A matéria-prima para obtenção do grafeno e do GO é o grafite. O grafeno e seus compostos possuem propriedades químicas e físicas únicas. É um material bidimensional, formado por átomos de carbono, de hibridização sp^2 , que resultam em hexágonos com caráter apolar (Dreyer et al., 2010). O grafeno apresenta baixa afinidade de interação com outras matérias, o que o torna preferido em determinados processos. O GO possui os mesmos 17 esqueletos carbonáceos que o grafeno, a diferença se dá nos grupos funcionais contendo oxigênio, como carboxilas, hidroxilas e grupos epóxi, proporcionando característica hidrofílica ao material (Oliveira; Poletto; Severo, 2018) (Figura 2R).

O grafeno apresenta alta área de superfície, leveza, elasticidade mecânica excepcional, grande mobilidade como transportador, biocompatibilidade, capacidade de funcionalização, baixa resistividade térmica e elétrica, além de atividade antibacteriana. O GO concede viabilidade para reações com grupos amina ou hidroxila, constituindo ligações amida ou éster (Nanda; Papaefthymiou, 2015). Consequentemente, a CH pode ser inserida, por meio da formação de ligações amida entre os grupos reativos da CH e os grupos carboxílicos presentes

em GO. Além disso, os grupos funcionais ligados à superfície do grafeno podem melhorar as interações interfaciais entre a matriz de uma maneira semelhante aos sistemas compostos por nanotubos de carbono (HU, 2011; Zhang, 2016). A utilização de nanopartículas de grafeno em biomateriais pode, ainda, melhorar o desempenho da libertação de fármacos (Justin, 2015).

A combinação do óxido de grafeno com a quitosana pode compor a base para mucoadesivos e hidrogéis utilizados no tratamento de lesões variadas. Diferentes tipos de biomoléculas podem se associar as nanopartículas, com o objetivo de melhorar a biocompatibilidade e a eficiência do processo regenerativo, além disso, o fator de crescimento fibroblástico básico (FGFb ou FGF2) pode ser incorporado ao biomaterial de CH e GO. O FGFb ou FGF2 é altamente expresso durante a reparação tecidual e sua utilização em biomateriais a base de biopolímeros, como a quitosana, pode otimizar o tempo de cicatrização (Budiraharo; Neoh; Kang, 2013).

Devido aos abundantes grupos funcionais que permitem interagir uns com os outros, a CH e o GO podem facilmente formar compósitos por meio de ligações covalentes, ligações de hidrogênio ou interações eletrostáticas. Esses compósitos apresentam performance que supera as limitações observadas pelos componentes de forma individual, ou seja, os biomateriais de CH e GO têm efeito sinérgico, possuem excelentes características biológicas e ótimas propriedades físico-químicas e mecânicas (Feng; Wang, 2022).

Diante do exposto, o presente estudo propôs avaliar e estabelecer parâmetros biológicos, em relação à eficácia dos compostos bioativos preparados com quitosana associada a óxido de grafeno e FGF2, com potencial para aplicação no tratamento e recuperação de lesões de mucosa oral. Nas preparações obtidas, foram avaliadas características físico-químicas e propriedades antimicrobianas, além da biocompatibilidade das preparações e sua capacidade de promover migração celular *in vitro*, em fibroblastos da linhagem NIH/3T3.

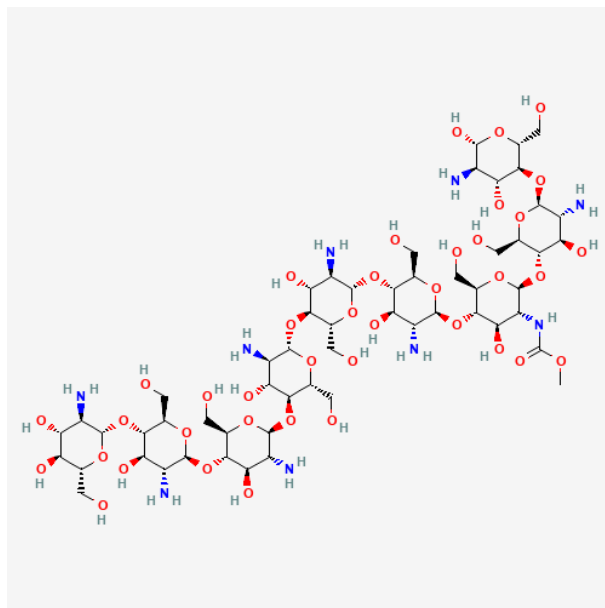


Figura 1R. Representação da estrutura química da quitosana. National Center for Biotechnology Information. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chitosan>

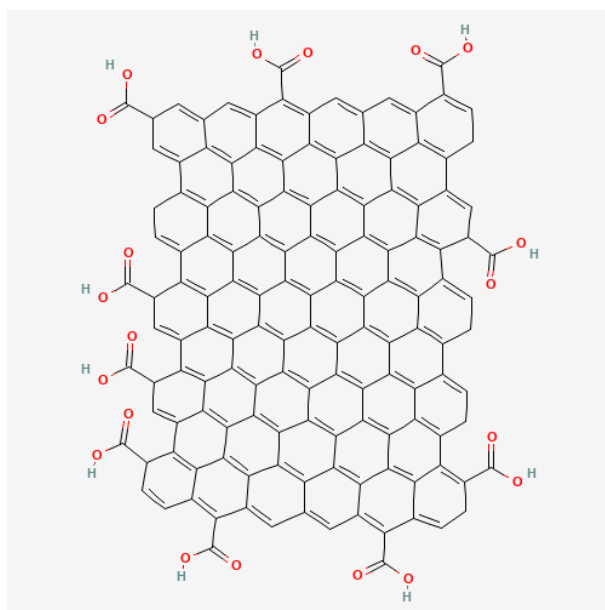


Figura 2R. Representação da estrutura química do óxido de grafeno. National Center for Biotechnology Information. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/124202900>

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AkhavanKarbassi MH, Yazdi MF, Ahadian H, SadrAbad MJ. Randomized doubleblind placebocontrolled trial of propolis for oral mucositis in patients receiving chemotherapy for head and neck cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(7):3611–4.
- Ali IH, Ouf A, Elshishiny F, Taskin MB, Song J, Dong M, et al. Antimicrobial and wound-healing activities of graphene-reinforced electrospun chitosan/gelatin nanofibrous nanocomposite scaffolds. *ACS Omega*. 2022;7(2):1838–50.
- Berkey FJ. Managing the adverse effects of radiation therapy. *Am Fam Physician*. 2010;82(4):381–8.
- Bossi P, Numico G, Santis V, Ruo Redda MG, Reali A, Belgioia L, et al. Prevention and treatment of oral mucositis in patients with head and neck cancer treated with (chemo) radiation: report of na Italian survey. *Support Care Cancer*. 2014;22(7):1889–96.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394–424.
- Budiraharjo R, Neoh KG, Kang ET. Enhancing bioactivity of chitosan film for osteogenesis and wound healing by covalent immobilization of BMP-2 or FGF-2. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2013;24(6):645–62.
- Burke JF, Yannas IV, Quinby WC Jr, Bondoc CC, Jung WK. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Ann Surg*. 1981;194(4):413–28.
- Chang YC, Tai KW, Chou MY, Tseng TH. Synergistic effects of peroxydinitrite on arecoline-induced cytotoxicity in human buccal mucosal fibroblasts. *Toxicol Lett*. 2000;118(1-2):61–8.
- Chansky K, Benedetti J, Macdonald JS. Differences in toxicity between men and women treated with 5-fluorouracil therapy for colorectal carcinoma. *Cancer*. 2005;103(6):1165–71.
- Chaveli-Lopez B, Bagan-Sebastian J. Treatment of oral mucositis due to chemotherapy. *J Clin Exp Dent*. 2016;8(2):e201–9.
- Csordas K, Lautner-Csorba O, Semsei AF, Harnos A, Hegyi M, Erdelyi DJ, et al. Associations of novel genetic variations in the folate-related and ARID5B genes with the pharmacokinetics and toxicity of high-dose methotrexate in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2014;166(3):410–20.
- Curra M, Soares LAV Jr, Martins MD, Santos OSS. Protocolos quimioterápicos e incidência de mucosite bucal. *Revisão integrativa. Einstein (São Paulo)*. 2018;16(1):eRW4007.
- Dreyer DR, Park S, Bielawski CW, Ruoff RS. The chemistry of graphene oxide. *Chem Soc Rev*. 2010;39(1):228–40.

Eduardo FP, Bezinelli LM, Orsi MCE, Rodrigues M, Ribeiro MS, Hamerschlag N, et al. The influence of dental care associated with laser therapy on oral mucositis during allogeneic hematopoietic cell transplant: retrospective study. *Einstein (São Paulo)*. 2011;9(2):201–6.

Egusa H, Okita K, Kayashima H, Yu G, Fukuyasu S, Saeki M, et al. Gingival fibroblasts as a promising source of induced pluripotent stem cells. *PLoS ONE*. 2010;5(9):e12743.

Elsner JJ, Kraitzer A, Grinberg O, Zilberman M. Highly porous drug-eluting structures. *Biomater*. 2012;2(4):239–70.

Epstein JB, Thariat J, Bensadoun RJ, Barasch A, Murphy BA, Kolnick L, et al. Oral complications of cancer and cancer therapy. *CA Cancer J Clin*. 2012;62(6):400–22.

Fang Y, Zhang D, Guo Y, Guo Y, Chen Q. Simple one-pot preparation of chitosan-reduced graphene oxide-Au nanoparticles hybrids for glucose sensing. *Sens Actuators B Chem*. 2015;221(1):265–72.

Feng W, Wang Z. Biomedical applications of chitosan-graphene oxide nanocomposites. *iScience*. 2022;25(1):103629.

Ferreira MC, Paggiaro AO, Isaac C, Teixeira Neto N, Santos GB. Skin substitutes: current concepts and a new classification system. *Rev Bras Cir Plast*. 2011;26(4):696–702.

Figueiredo ALP, Lins L, Cattony AC, Falcão AFP. Laser terapia no controle da mucosite oral: um estudo de metanálise. *Rev Assoc Med Bras*. 2013;59(5):467–74.

Hall S, Rudrawar S, Zunk M, Bernaitis N, Arora D, McDermott C, et al. Protection against radiotherapy-induced toxicity. *Antioxidants*. 2016;5(3):22.

Hespanhol FL, Tinoco EMB, Teixeira HGC, Falabella MEV, Assis NMSP. Manifestações bucais em pacientes submetidos à quimioterapia. *Cienc Saude Colet*. 2010;15 Supl 1:1085–94.

Hu H, Wang X, Wang J, Liu F, Zhang M, Xu C. Microwave-assisted covalent modification of graphene nanosheets with chitosan and its electrorheological characteristics. *Applied Surface Science*. 2011;257(7):2637–42.

Ji C, Annabi N, Khademhosseini A, Dehghani F. Fabrication of porous chitosan scaffolds for soft tissue engineering using dense gas CO₂. *Acta Biomater*. 2011;7(4):1653–64.

Justin R, Román S, Chen D, Tao K, Geng X, Grant RT, et al. Biodegradable and conductive chitosan–graphene quantum dot nanocomposite microneedles for delivery of both small and large molecular weight therapeutics. *RSC Adv*. 2015;5(64):51934–46.

Kazemian A, Kamian S, Aghili M, Hashemi FA, Haddad P. Benzydamine for prophylaxis of radiation-induced oral mucositis in head and neck cancers: a double-blind placebo-controlled randomized clinical trial. *Eur J Cancer Care*. 2009;18(2):174–8.

Kiran P, Rao OS. Development and characterization of reconstituted hydrogel from Aloe vera (*Aloe barbadensis Miller*) powder. *J Food Measurement Charact*. 2016;10(3):411–24.

Kolokythas P, Aust M, Vogt P, Paulsen F. Aktuelle Übersicht zum Dermisersatz mit Kollagen-Elastin-Matrix Matriderm bei Brandverletzungen. *Handchir Mikrochir Plast Chir.* 2008;40(6):367–71.

Krishnamoorthy K, Veerapandian M, Zhang LH, Yun K, Kim SJ. Antibacterial efficiency of graphene nanosheets against pathogenic bacteria via lipid peroxidation. *J Phys Chem C.* 2012;116(32):17280–7.

Kwon Y. Mechanism-based management for mucositis: option for treating side effects without compromising the efficacy of cancer therapy. *Onco Targets Ther.* 2016;9(1):2007–16.

Lalla RV, Bowen J, Barasch A, Elting L, Epstein J, Keefe DM, et al. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Cancer.* 2014;120(10):1453–61.

Lalla RV, Saunders DP, Peterson DE. Chemotherapy or radiation-induced oral mucositis. *Dent Clin North Am.* 2014;58(2):341–9.

Lalla RV, Sonis ST, Peterson DE. Management of oral mucositis in patients who have Cancer. *Dent Clin North Am.* 2008;52(1):61–77.

Liu Y, Song R, Zhang X, Zhang D. Enhanced antimicrobial activity and pH-responsive sustained release of chitosan/poly (vinyl alcohol)/graphene oxide nanofibrous membrane loading with allicin. *Int J Biol Macromol.* 2020;161(1):1405–13.

Mallick S, Benson R, Rath GK. Radiation induced oral mucositis: a review of current literature on prevention and management. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2016;273(9):2285–93.

Maraschin TG. Preparação de óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido e dispersão em matriz polimérica [dissertação]. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2016.

Marçon SPC, Lima FRG, Souza DM. Emergência médica devido ao agravamento da mucosite oral durante quimioterapia: relato de caso. *Rev Cien Saude.* 2016;1(1):32-6.

Maria OM, Eliopoulos N, Muanza T. Radiation-induced oral mucositis. *Front Oncol.* 2017;7:89.

Mendonça ICG. Propolis as na adjunct to prevention and treatment of radiotherapy- and chemotherapy-induced oral mucositis. *Nurs Palliat Care.* 2016;1(5):97-100.

Miranda MP, Souza DS. Glutamina na prevenção e tratamento da mucosite em pacientes adultos oncológicos: uma revisão sistemática da literatura. *Rev Bras Cancerol.* 2015;61(3):277–85.

Mougeot JLC, Stevens CB, Morton DS, Brennan MT, Mougeot FB. Oral microbiome and cancer therapy-induced oral mucositis. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2019;2019(53):lgz002.

Nanda SS, Papaefthymiou GC, Yi DK. Functionalization of graphene oxide and its biomedical applications. *Crit Rev Solid State Mater Sci.* 2015;40(5):291–315.

Nery ALV, Porter KE, Freire RF, Baptista NS, Esberard F, Souza THS, et al. Nova abordagem no tratamento de lesões complexas: uso de matriz de regeneração dérmica. *Rev Bras Queimaduras*. 2011;10(2):66–70.

Olad A, Azhar FF. The synergetic effect of bioactive ceramic and nanoclay on the properties of chitosan–gelatin/nanohydroxyapatite–montmorillonite scaffold for bone tissue engineering. *Ceram Int*. 2014;40(7):10061–72.

Oliveira M, Poletto M, Severo TC. Rota química para produção de óxido de grafeno a partir de oxidação do grafite comercial. *Rev Interdisc Cienc Apl*. 2018;3(6):16–20.

Orvain C, Moles-Moreau MP, François S, Mercier M, Moal F, Hamel JF, et al. Miconazole mucoadhesive buccal tablet in high-dose therapy with autologous stem cell transplantation (HDT/ASCT) - induced mucositis. *Support Care Cancer*. 2015;23(2):359–64.

Peinado H, Zhang H, Matei IR, Costa-Silva B, Hoshino A, Rodrigues G, et al. Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(5):302–17.

Pulito C, Cristaudo A, Porta CL, Zapperi S, Blandino G, Morrone A, et al. Oral mucositis: the hidden side of cancer therapy. *J Exp Clin Cancer Res*. 2020;39(1):1–15.

Qin H, Wang J, Wang T, Gao X, Wan Q, Pei X. Preparation and characterization of chitosan/ β -glycerophosphate thermal-sensitive hydrogel reinforced by graphene oxide. *Front Chem*. 2018;6:565.

Rana VK, Choi MC, Kong JY, Kim GY, Kim MJ, Kim SH, et al. Synthesis and drug-delivery behavior of chitosan-functionalized graphene oxide hybrid nanosheets. *Macromol Mater Eng*. 2010;296(2):131–40.

Ribeiro TS, Santos VO. Segurança do paciente na administração de quimioterapia antineoplásica: uma revisão integrativa. *Rev Bras Cancerol*. 2015;61(2):145–53.

Santos RCS, Dias RS, Giordani AJ, Segreto RA, Segreto HRC. Mucosite em pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço submetidos à radioquimioterapia. *Rev Esc Enferm USP*. 2011;45(6):1338–44.

Sawada NO, Nicolussi AC, Okino L, Cardozo FMC, Zago MMF. Avaliação da qualidade de vida de pacientes com câncer submetidos à quimioterapia. *Rev Esc Enferm USP*. 2009;43(3):581–7.

Sonis ST. Oral mucositis. *Anticancer Drugs*. 2011;22(7):607–12.

Sonis ST. The pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(4):277–84.

Suarez-Arnedo A, Torres Figueroa F, Clavijo C, Arbeláez P, Cruz JC, Muñoz-Camargo C. An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. *PLoS One*. 2020;15(7):e0232565.

van der Veen VC, van der Wal MBA, van Leeuwen MCE, Ulrich MMW, Middelkoop E. Biological background of dermal substitutes. *Burns*. 2010;36(3):305–21.

van Seville YZA, Stansborough R, Wardill HR, Bateman E, Gibson RJ, Keefe DM. Management of mucositis during chemotherapy: from pathophysiology to pragmatic therapeutics. *Curr Oncol Rep*. 2015;17(11):50.

Villa A, Sonis ST. Pharmacotherapy for the management of cancer regimen-related oral mucositis. *Expert Opin Pharmacother*. 2016;17(13):1801–7.

Zahid AA, Ahmed R, Rehman SRU, Augustine R, Tariq M, Hasan A. Nitric oxide releasing chitosan-poly (vinyl alcohol) hydrogel promotes angiogenesis in chick embryo model. *Int J Biol Macromol*. 2019;136(1):901–10.

Yucel SB, Zeynep G, Bilgehan S, Kadioglu Huseyin. Oral Mucositis: A Crucial Problem during Radiation Therapy. *J Trauma Treat*. 2014;4(1).

Zhang H, Luo X, Lin X, Lu X, Tang Y. The molecular understanding of interfacial interactions of functionalized graphene and chitosan. *Appl Surf Sci*. 2016;360(1):715–21.

CAPÍTULO II – OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O presente estudo propôs a desenvolver e caracterizar compostos bioativos preparados com quitosana associada a óxido de grafeno e FGF2, a fim de contribuir na terapêutica de cicatrização e prevenção de infecções oportunistas na mucosite oral de pacientes oncológicos.

Foram produzidos hidrogéis e membranas bioadesivas, combinados em grupos específicos para cada forma de apresentação: Quitosana (CH); Quitosana com FGF2 (CH/FGF); Quitosana com óxido de grafeno (CH/GO); Quitosana com óxido de grafeno e FGF2 (CH/GO/FGF); Controle (CTRL); Controle com FGF2 (CTRL/FGF). Os biomateriais foram avaliados em períodos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas.

Objetivos Específicos

1. Caracterizar hidrogéis de quitosana, com ou sem óxido de grafeno e FGF2 quanto a seus parâmetros físico-químicos, em testes de centrifugação e características organolépticas.
2. Caracterizar membranas de quitosana, com ou sem óxido de grafeno e FGF2 quanto a seus parâmetros físico-químicos, em testes de espessura, porosidade, absorção de líquidos e degradação de massa.
3. Avaliar as propriedades antimicrobianas dos biomateriais propostos, contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, por meio de teste de difusão em disco.
4. Avaliar *in vitro*, a capacidade dos biomateriais de promover a migração de fibroblastos NIH/3T3, por meio de Ensaio de Cicatrização de Ferida (*Scratch Wound Healing Assay*).
5. Avaliar *in vitro*, a citotoxicidade dos biomateriais propostos, por meio do ensaio colorimétrico MTT.

CAPÍTULO III – MANUSCRITO

INTRODUÇÃO

A mucosite oral é caracterizada como lesão inflamatória e/ou ulcerativa em pacientes oncológicos submetidos à quimioterapia e/ou radioterapia. (Sonis, 2011; Curra et al., 2018). Atualmente, a mucosite oral é considerada a complicação não hematogênica mais grave no tratamento antitumoral, impactando na qualidade de vida dos pacientes e na continuidade da terapia oncológica, pois pode levar à interrupção do tratamento e alterações no planejamento quimioterápico e/ou radioterápico (Chaveli-López; Bagan-Sebastian, 2016; Maria, et al., 2017).

Os pacientes com MO geralmente requerem mudanças na dieta, dependência de alimentação parenteral ou gastrostomia e podem apresentar perda de peso, bem como infecções locais e sistêmicas. Em alguns casos, pode ser necessário reduzir a dosagem da quimioterapia e/ou radioterapia, resultando em atraso no tratamento e resultados negativos para o paciente. Além disso, esses pacientes podem necessitar de hospitalizações prolongadas, ocasionando um aumento substancial no custo geral do tratamento oncológico (Eduardo et al., 2011).

Na busca por estratégias terapêuticas alternativas e mais eficazes para o tratamento de feridas, novos compostos estão sendo estudados para uso como fármacos, como hidrogéis e membranas mucoadesivas. Independentemente da forma de apresentação, esses compostos devem apresentar biocompatibilidade, possuir atividade bactericida e promover o processo cicatricial. Biopolímeros como a quitosana são amplamente utilizados para o desenvolvimento biomateriais a fim aumentar suas propriedades regenerativas, entre outras.

A quitosana é um polissacarídeo catiônico tipicamente obtido pela desacetilação da quitina, um polímero amplamente encontrado na natureza e componente estrutural de moluscos, insetos e da parede celular de fungos e bactérias (Nanda; Papaefthymiou, 2015). A quitosana tem sido amplamente utilizada para a reparação tecidual devido às suas propriedades que promovem a regeneração epitelial e aceleram o processo de cicatrização, além de sua atividade antimicrobiana, anticoagulante e imunoestimulante (Ahmed, 2015; Fang, 2015; Rana, 2011).

O interesse pelo óxido de grafeno vem crescendo em diversas áreas, incluindo biotecnologia e aplicações biomédicas (Maraschin, 2016). O grafite é a matéria-prima utilizada

para a obtenção do grafeno e do óxido de grafeno, que possuem propriedades químicas e físicas únicas. O grafeno é um material bidimensional constituído por átomos de carbono com hibridação sp^2 , formando hexágonos apolares (Dreyer et al., 2010). O óxido de grafeno possui os mesmos esqueletos de carbono do grafeno, porém com grupos funcionais contendo oxigênio, como grupos carboxila, hidroxila e epóxi, conferindo ao material características hidrofílicas (Oliveira; Poletto; Severo, 2018).

O grafeno possui alta área superficial, é leve, mecanicamente elástico, excelente transportador, biocompatível, funcionalizado, possui baixa resistividade térmica e elétrica, além de atividade antibacteriana. O óxido de grafeno possibilita reações com grupos amina ou hidroxila, levando à formação de ligações amida ou éster (Nanda; Papaefthymiou, 2015). Consequentemente, a quitosana pode ser incorporado formando ligações amida entre os grupos reativos da quitosana e os grupos carboxílicos presentes no óxido de grafeno. Além disso, os grupos funcionais ligados à superfície do grafeno podem melhorar as interações interfaciais entre a matriz de maneira semelhante aos sistemas baseados em nanotubos de carbono (Hu, 2011; Zhang, 2016).

A combinação de óxido de grafeno com quitosana pode formar a base para mucoadesivos e hidrogéis utilizados no tratamento de diversas lesões. Diferentes biomoléculas podem se associar às nanopartículas para melhorar a biocompatibilidade e a eficiência do processo regenerativo. O fator básico de crescimento de fibroblastos (FGFb ou FGF2) também pode ser incorporado ao biomaterial quitosana e óxido de grafeno. FGF2 é altamente expresso durante o reparo tecidual, e seu uso em biomateriais à base de biopolímeros como a quitosana pode otimizar o tempo de cicatrização (Budiraharo; Neoh; Kang, 2013).

O presente estudo propôs a desenvolver e caracterizar compostos bioativos preparados com quitosana associada a óxido de grafeno e FGF2, a fim de contribuir na terapêutica de cicatrização e prevenção de infecções oportunistas na mucosite oral de pacientes oncológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho Experimental

Biomateriais constituídos de hidrogel (HG) e membrana (MEMB) de quitosana (448877, Sigma-Aldrich) com óxido de grafeno (796034, Sigma-Aldrich) e fator de crescimento fibroblástico básico (FGF2) (F0291, Sigma-Aldrich), foram produzidos em ambiente laboratorial e divididos nos seguintes grupos: Quitosana (CH); Quitosana com FGF2 (CH/FGF); Quitosana com óxido de grafeno (CH/GO); Quitosana com óxido de grafeno e FGF2 (CH/GO/FGF); Controle (CTRL); Controle com FGF2 (CTRL/FGF). Os biomateriais foram avaliados em períodos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas. A análise das características organolépticas de hidrogel foi realizada ao longo de 30 dias, a cada 10 dias.

Preparo de Hidrogel

O hidrogel de CH foi produzido em condições de esterilidade, conforme descrito por Qin et al. (2018), com adaptações. Biomateriais constituídos de hidrogel (HG) e membrana (MEMB) de quitosana (CH), funcionalizados ou não, com óxido de grafeno (GO) e fator de crescimento fibroblástico básico (FGF2), foram produzidos em ambiente laboratorial e divididos nos seguintes grupos: CH, CH/FGF, CH/GO e CH/GO/FGF. Previamente, foi preparada uma solução de ácido acético a 2% obtendo um volume final de 100 ml, posteriormente, 2 g de CH foram adicionados a solução de ácido acético e agitado vigorosamente durante 1 hora em agitador magnético (Figura 1M).

Para o preparo do hidrogel de CH/GO, foi adicionado 0,1% de óxido de grafeno e levado a agitador magnético, até que o óxido de grafeno dissolvesse no hidrogel. O hidrogel de CH/FGF foi preparado acrescido de FGF2, na concentração de 2 ng/ml e foi agitado por 1 hora em agitador magnético. Assim como no grupo CH/GO/FGF, foi adicionado FGF2 na concentração de 2 ng/ml e homogeneizado em agitador magnético. Ao final do preparo de todos os hidrogéis, foi acrescido 1% de glicerol (p/p) e homogeneizado em agitador magnético por 30 minutos.

Preparo de Membrana

Cada membrana foi preparada a partir do hidrogel produzido e descrito anteriormente. As membranas foram confeccionadas pela técnica *Solvent Casting/Particulate Leaching* (SCPL) proposta por Zeng e Ruckenstein (1996) (Zeng; Ruckenstein, 1996; Liu et al., 2014). Como molde foi utilizada uma placa de Petri com diâmetro de 6 cm e adicionado 4 ml do hidrogel, foi mantida à 50 °C para a evaporação do solvente, por 24 horas. As membranas foram cortadas em formato circular, com diâmetro de 12 mm e 6 mm. Todas as membranas após o preparo foram esterilizadas em luz UV por 15 minutos antes de sua utilização.

Caracterização Físico-Química de Hidrogel

Teste de Centrifugação

O teste de centrifugação foi realizado antes de todas as demais análises, pois o objetivo deste teste é a avaliação preliminar de estabilidade. O teste de centrifugação promove aumento na força da gravidade, aumentando a mobilidade das partículas e assim, possibilita a avaliação de sinais de instabilidade do hidrogel (Brasil, 2004). O teste foi realizado por meio de 3 ciclos de centrifugação. com 2,5 g por amostra de hidrogel, em 3000 rpm (força $G = 2012$), por 30 minutos, em temperatura ambiente. Os grupos testados foram: quitosana (CH); CH com fator de crescimento fibroblástico 2 (CH/FGF); CH com óxido de grafeno (CH/GO); CH com GO e FGF2. Após a centrifugação, os hidrogéis deveriam permanecer estáveis, sem qualquer sinal de instabilidade que indique a necessidade de sua reformulação.

Análise Organoléptica

Na avaliação das características organolépticas dos hidrogéis, foi realizada a percepção do odor e sabor, através da olfação e do paladar. Além disso, foram avaliados os aspectos macroscópicos visuais, como coloração e aspecto, verificando a ausência de precipitação, turvação e mudança de cor (Brasil, 2007), por um período de 30 dias, a avaliação foi realizada uma vez a cada 10 dias.

Caracterização Físico-Química de Membrana

Teste de Espessura

A espessura foi determinada utilizando um micrômetro externo digital (0,25 mm x 0,001 mm – Mitutoyo, modelo 293-805). Foram realizadas 8 medições ao longo da extensão de cada membrana (Figura 2M). O valor foi expresso através da média $\pm$ desvio padrão.

Teste de Porosidade

Para determinação da porosidade foi utilizado o método de deslocamento de líquido, tendo o etanol como escolha, por penetrar facilmente nos poros sem afetar a estrutura das membranas. Para isso, 10 ml de etanol (V1) foram adicionados em um Becker de 50 ml e uma amostra da membrana com diâmetro de 12 mm foi submersa. O volume total do etanol mais a membrana foi anotada (V2). Após 30 minutos, a amostra foi retirada e o volume final aferido (V3). A porosidade da membrana foi determinada pela equação abaixo (Sivashankari et al., 2018):

$$P\% = \frac{(V1 - V3)}{(V2 - V3)} * 100$$

Ensaio de Absorção de Líquidos

As membranas tiveram as suas massas iniciais determinadas (Mi). Em seguida, foram imersas em solução tamponado fosfato salino (PBS) (pH = 7,4), na proporção de 1 g/10 ml, seguindo a norma ISSO 10993-13 a 37 °C por 24, 48, 72, e 96 horas. A cada 24 horas, as membranas foram retiradas da solução e levemente comprimidas entre filtro de papel para retirada do excesso de solução. Posteriormente, as massas das amostras molhadas foram estimadas (Mm) em balança analítica e a absorção de líquidos da membrana foi determinado pela equação abaixo, fornecendo os resultados referentes aos graus de hidratação dos materiais (Raza Ur Rehman et al., 2019):

$$A\% = \left(\frac{Mm - Mi}{Mi} \right) * 100$$

Ensaio de Degradação de Massa

Para o ensaio de degradação, o mesmo procedimento do teste de absorção de líquido foi empregado, porém, após os períodos determinados, as amostras foram retiradas e secas em estufa à 50 °C, por 24 horas. Em seguida, as suas massas foram calculadas novamente (Mf). O perfil de degradação da membrana foi determinado pela equação abaixo (Raza Ur Rehman et al., 2019):

$$D\% = \frac{M_i - M_f}{M_i} * 100$$

Avaliação de Potencial Hidrogeniônico (pH)

Antes e após os testes de absorção e degradação, volumes de PBS, tiveram seu pH determinados e comparados entre si. Para tanto foi utilizado pHmetro de bancada KASVI (K39-10148). O pH foi analisado com intuito de verificar se houve mudança no PBS ao longo do período em que as membranas permaneceram submersas em PBS.

Teste de Difusão em Disco

A avaliação das propriedades antimicrobianas foi realizada pelo teste de difusão com discos, tendo como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana dos hidrogéis e membranas frente a diferentes microrganismos. Os microrganismos utilizados foram *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Primeiramente, foi obtida uma solução salina estéril com uma turvação compatível com o grau 0,5 da escala Mac Farland (1.106 UFC/ml), para cada microrganismo. Posteriormente, em 3 placas de Petri distintas, cada microrganismo foi semeado na superfície do ágar Mueller-Hinton, sem deixar qualquer falha.

Para testar o hidrogel foi preparado um disco de papel filtro cortados em formato circular, com 6 mm de diâmetro, que foram mergulhados e mantidos por 1 hora em hidrogel de CH, CH/FGF, CH/GO e CH/GO/FGF, que foram colocados nas placas com os microrganismos. Em seguida, membranas com diâmetro de 6 mm foram tratadas previamente com luz UV e adicionadas às placas. O processo de incubação ocorreu com as placas invertidas sob temperatura de 37 °C por 24 horas. Foi observada a formação, ou não, de halo ao redor dos

discos com o hidrogel e das membranas cortadas em formato circular, para determinar se os microrganismos eram sensíveis, intermediários ou às preparações.

Ensaio *In Vitro*

Cultivo Celular

Este estudo utilizou linhagem celular de fibroblastos embrionários murinos, NIH/3T3 (CRL-1658. ATCC). Após descongelamento, as células foram ressuspensas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*. GIBCO), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina-estreptomicina. A densidade celular foi ajustada para 1×10^5 /poço e 1×10^4 /poço. Os fibroblastos foram divididos em grupos, semeados em placas de poliestireno de 24 poços e de 96 poços, mantidos em incubadora de CO₂ a 5%, com 95% de umidade, a 37 °C. O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas, até que se completasse todo período experimental.

Teste de Migração Celular

A capacidade de migração celular foi avaliada por meio do Ensaio de Cicatrização de Ferida (*Scratch Wound Healing Assay*), no qual os fibroblastos murinos NIH/3T3 foram cultivados em placa de 24 poços até atingirem confluência. Após 24 horas de incubação, os poços foram lavados e foi adicionado meio de cultura com restrição de soro fetal bovino a 1% (SFB), para inibir a proliferação celular.

Antes da execução das fendas, as células foram divididas em grupos que receberam tratamento com hidrogel ou membrana, compostos do seguinte modo: Quitosana (CH); Quitosana com FGF2 (CH/FGF); Quitosana com óxido de grafeno (CH/GO); Quitosana com óxido de grafeno e FGF2 (CH/GO/FGF). Foram ainda, avaliados dois grupos controle, com células não estimuladas pelos biomateriais, suplementadas ou não com FGF2: Controle (CTRL); Controle com FGF2 (CTRL/FGF).

A fenda vertical foi realizada com uma ponteira de 10 µl na região central de cada um dos poços, que foram imediatamente lavados com PBS, a fim de retirar as células não aderentes e detritos celulares. Nos grupos tratados com hidrogel, as células foram incubadas com uma

mistura 1:1 (250 μ l:250 μ l) de hidrogel e meio de cultivo com SFB 1%. Nos grupos tratados com membranas (12 mm de diâmetro), esses biomateriais foram sobrepostos às células, e cada poço preenchido com meio suplementado de SFB 1% (500 μ l).

As células tratadas, ou não, com os biomateriais foram cultivadas até 96 horas, nos tempos experimentais T0-T48-T72-T96. Posteriormente, os grupos foram fotografados para avaliar o fechando das fendas – ou “feridas” – em microscópio invertido (Olympus IX83. Objetiva:10x). As imagens foram capturas e processadas no *plugin Wound Healing Size Tool*, do *software* aberto, ImageJ 1.53t (NIH, USA). Foram então, obtidos valores quantitativos em percentual de fração de área de ferida/fenda, para análise estatística.

Teste de Citotoxicidade

Com objetivo de identificar eventual ação citotóxica dos biomateriais sobre as células NIH/3T3, foi realizada avaliação dos grupos por meio do ensaio colorimétrico MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il] -2,5- difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich, EUA). O protocolo baseou-se nos padrões estabelecidos pela ISSO 10993-5/2009, no qual, é estabelecido que a viabilidade celular inferior a 70% determina efeito citotóxico. Para a realização do ensaio foram semeadas 1×10^4 por poço, em placa de 96 e o tratamento seguiu nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas, tendo os grupos testados com membranas hidrogéis de CH, CH/FGF, CH/GO e CH/GO/FGF, além dos respectivos controles exigidos pela técnica MTT: CTRL positivo, CTRL negativo e “branco”.

Para a execução dos ensaios, foi preparado solução estoque, pesando 5 mg de MTT e diluindo-o em 1 ml PBS estéril, obtendo-se 5 mg/mL de MTT. A solução de trabalho foi diluída em 9 ml de meio DMEM no mesmo dia da análise, obtendo-se uma solução concentração de 0,5 mg/ml de MTT. Em cada tempo experimental, o meio de cultura foi removido das células e substituído por 100 μ l de solução de trabalho. As células foram então, mantidas em incubadora de CO₂ a 5%, com 95% de umidade, a 37 °C, por 2 horas. Após 2 horas, o sobrenadante foi removido e as células, incubadas com 100 μ l de DMSO por 30 minutos. A leitura foi realizada em leitor de ELISA com comprimento de onda de 540 nm. A análise foi realizada em triplicata de dois ensaios independentes.

A viabilidade celular foi quantificada pela diferença entre o valor médio de absorbância das amostras e de controles para com a do “branco”. Cálculo da viabilidade (%):

$$V\% = \frac{(\text{absorbância da amostra} - \text{absorbância “branco”})}{(\text{absorbância controle negativo} - \text{absorbância “branco”})} * 100$$

Análise Estatística

Os dados foram analisados no *software* GraphPad Prism 9.0® (GraphPad Inc. USA). As variáveis foram submetidas ao teste de Shapiro-Wilk, para verificação de distribuição de normal e ao teste de Grubbs, para avaliação de *outliers*. Em comparações acima de três grupos, foi realizada análise de variância (ANOVA), com pós-teste de Tukey para comparações múltiplas. Valores de $p < 0,05$ foram estabelecidos como estatisticamente significantes.

RESULTADOS

Características Físico-químicas Adequadas para o Desenvolvimento de Biomateriais

Os hidrogéis formulados neste estudo apresentaram-se na forma semissólida. Os grupos CH e CH/FGF mostraram coloração amarelada e translúcida, enquanto aqueles acrescidos de GO apresentaram coloração enegrecida (Figura 3M). As membranas de CH e CH/FGF tinham cor levemente amarelada e translúcida, com aspecto brilhante, enquanto o grupo GO apresentou coloração enegrecida. Ambos os grupos de membranas eram maleáveis e resistentes à manipulação, com sensação de filme de PVC ao toque. Nas membranas com GO, a superfície mostrou leve irregularidade e grânulos perceptíveis ao toque (Figura 4M).

Todas as preparações de hidrogel mantiveram-se homogêneas e sem precipitações ou separação de fases após a centrifugação (Figura 5M). Ao serem refrigeradas a 4 °C, todas as preparações mantiveram suas características organolépticas inalteradas. No entanto, quando mantidas em temperatura elevada, a 40 °C, no décimo dia todas as preparações apresentaram uma alteração no odor, ligeiramente acentuada em comparação com o início da avaliação ou com o grupo refrigerado. As demais características avaliadas não sofreram alterações ao longo de 30 dias (Tabelas 1M e 2M).

As espessuras das membranas variaram entre 0,040 e 0,079 mm, sem diferenças estatisticamente significativas entre as condições experimentais avaliadas (Figura 6M A). Os grupos CH/GO e CH/GO/FGF apresentaram tendência de aumento na espessura em relação aos grupos CH e CH/FGF, devido à irregularidade na superfície da membrana composta por GO. Em relação à porosidade, os grupos analisados variaram entre 51% e 80%, com destaque para o grupo CH, porém, sem diferenças estatisticamente significativas (Figura 6M B).

As membranas foram submetidas ao teste de absorção de líquidos por um período de 24 a 96 horas. Foi observada capacidade de absorção de líquidos entre 33% e 86% em todos os compostos analisados, com diferenças estatisticamente significativas no grupo CH entre T24 e T96 (Figura 7M A). A incorporação de GO ou FGF não interferiu na absorção de líquido. A avaliação da degradação das membranas variou de 37% a 71% em todos os grupos estudados.

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas no grupo CH nos períodos T24 e T48 em relação a T72, além do grupo CH/GO/FGF, que demonstrou diferença estatisticamente significativa entre T72 e T96 (Figura 7M B).

O pH inicial da solução tampão utilizada nos testes de absorção de líquidos e degradação foi de 7,4. Não houve alteração significativa do pH em todos os grupos, os valores mantiveram-se entre 7,45 e 7,64, demonstrando que os grupos compostos por membranas mantiveram o pH do meio estável (Tabela 3M).

Quitosana e Óxido de Grafeno Apresentam Propriedades Antimicrobianas

No teste de difusão em disco, os hidrogéis permitiram a formação de halos de inibição para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e, em menor escala, para *Candida albicans* no grupo CH. O ensaio realizado com as membranas não demonstrou formação significativa de halo nos mesmos microrganismos analisados. No entanto, após a remoção das membranas, observou-se que não houve crescimento microbiano nas áreas subjacentes, indicando inibição por contato. A capacidade de inibição por contato das membranas também foi menor para *Candida albicans* no grupo CH (Figuras 8M e 9M).

Membranas de Quitosana e Óxido de Grafeno Induzem Migração Celular

O potencial dos biomateriais em estimular a migração de fibroblastos NIH/3T3 foi investigado entre 0 e 96 horas nos grupos: Controle (CTRL); Controle com FGF2 (CTRL/FGF); Quitosana (CH); Quitosana com FGF2 (CH/FGF); Quitosana com óxido de grafeno (CH/GO); Quitosana com óxido de grafeno e FGF2 (CH/GO/FGF) (Figuras 10M, 11M, 12M, 13M, 14M). As imagens obtidas a partir do Ensaio de Cicatrização de Ferida foram processadas na ferramenta *Wound Healing Size Tool*, do *software* ImageJ 1.53t (NIH, EUA). Esse *plugin* permite o reconhecimento automático do tamanho da ferida/fenda e a quantificação de parâmetros importantes, como área (pixels²), fração de área (%), largura média da ferida e seu desvio padrão (Bahuguna, 2017). Neste estudo, a migração celular foi estimada pela fração de área da ferida/fenda (%).

Os dados a partir dos ensaios de migração celular nos hidrogéis não demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Figura 15M A, B, C, D, E). Porém,

quando os grupos de hidrogel foram avaliados individualmente, notaram-se diferenças estatisticamente significativas no decorrer do tempo (Figura 15M F). No grupo CTRL, os períodos T72 e T96 exibiram valores significativamente menores em comparação com T0 ($p = 0,001$; $0,0002$, respectivamente). No grupo CTRL/FGF, nos períodos T48, T72 e T96, também foram observadas áreas de fenda menores em relação a T0 ($p = 0,001$; $0,0004$; $0,0004$). No grupo CH/FGF, em T96, se observou diferença estatisticamente significativa em relação a T0 ($p = 0,0383$). Esses resultados sugerem que os hidrogéis promoveram diferenças de migração ao longo do período, principalmente nos grupos sem adição de biomateriais, mas estimulados por FGF2.

Nas comparações intergrupos de migração celular sobre as membranas de quitosana, os tempos iniciais, T0 e T24, não apresentaram diferenças significativas (Figura 16M A, B). No entanto, em T48, as membranas com óxido de grafeno, CH/GO e CH/GO/FGF, exibiram percentuais de áreas de fenda estatisticamente menores do que o grupo CTRL ($p = 0,047$; $0,030$, respectivamente) (Figura 16M C). Em T72, todos os grupos experimentais, CH, CH/FGF, CH/GO e CH/GO/FGF, apresentaram fendas significativamente reduzidas em comparação ao grupo CTRL ($p = 0,003$; $0,005$; $0,004$; $0,001$) e CTRL/FGF ($p = 0,019$; $0,035$; $0,022$; $0,010$) (Figura 16M D). Da mesma forma, em T96, todos os grupos experimentais demonstraram fendas reduzidas em relação aos controles CTRL ($p = 0,003$; $0,002$; $0,004$; $0,004$) e CTRL/FGF ($p = 0,016$; $0,012$; $0,020$; $0,020$) (Figura 16M E).

Ainda, quando a migração celular foi avaliada longo dos tempos experimentais nas membranas, constatou-se que na maioria dos grupos as áreas de fenda reduziram significativamente em relação ao início do experimento (Figura 16M F). Nas membranas de CH, as fendas em T48, T72 e T96 apresentaram valores reduzidos de áreas, quando comparadas a T0 ($p = 0,0005$; $< 0,0001$; $< 0,0001$) e a T24 ($p = 0,027$; $0,005$; $0,004$). Nas membranas acrescidas de óxido de grafeno, somente o grupo CH/GO/FGF apresentou redução significativa em T96, comparado a T0 ($p = 0,040$). À exemplo dos hidrogéis, os grupos sem adição de biomaterial também exibiram redução de fendas do transcorrer do tempo. No CTRL, houve redução em T72 e T96 em relação a T0 ($p = 0,001$; $0,0002$). No controle com adição de fator de crescimento, CTRL/FGF, também se observou diminuição das fendas em T48, T72 e T96, comparados a T0 ($p = 0,001$; $0,0004$; $0,0004$).

Membranas Apresentam Maior Biocompatibilidade *In Vitro* do que Hidrogéis

A biocompatibilidade dos biomateriais foi calculada a partir do método colorimétrico MTT, que estima o percentual de viabilidade celular, conforme critérios de citotoxicidade ISO 10993-5. Valores inferiores a 70% caracterizaram efeito citotóxico dos materiais avaliados sobre os fibroblastos. Os dados quantitativos foram expressos em média e desvio padrão, representando dois ensaios independentes, em triplicata (Figura 17M). As preparações de hidrogel não apresentaram diferenças estatisticamente significantes, embora nos tempos experimentais T24, T48, T72, alguns grupos tenham demonstrado médias abaixo de 70%. Entre eles, o grupo CH/GO em T24 (66,5%), CH/FGF em T72 (69,2%) e CH/GO/FGF em T24 (68,8%) e T48 (66,2%) (Figura 17M). Já as membranas de quitosana demonstraram resultados mais consistentes, com todos os grupos mantendo médias acima de 70%, exceto CH/GO/FGF em T24 (68,7%) (Figura 17M). Assim, conclui-se que a maioria das preparações de hidrogel e membranas de quitosana apresentou viabilidade celular acima do limite de citotoxicidade estabelecido.

DISCUSSÃO

O presente estudo se propôs a avaliar alternativas para o tratamento de mucosite oral, produzindo e caracterizando biomateriais veiculados em hidrogel e membrana bioadesiva, à base de quitosana (CH) e óxido de grafeno (GO) funcionalizado com FGF2. Inicialmente, foram produzidos hidrogéis e membranas bioadesivas, combinados em grupos específicos para cada forma de apresentação: Quitosana (CH); Quitosana com FGF2 (CH/FGF); Quitosana com óxido de grafeno (CH/GO); Quitosana com óxido de grafeno e FGF2 (CH/GO/FGF); Controle (CTRL); Controle com FGF2 (CTRL/FGF). Os biomateriais foram avaliados em períodos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas.

Os hidrogéis foram submetidos a testes físico-químicos de centrifugação e avaliados quanto às características organolépticas. As membranas foram testadas quanto à espessura, porosidade, absorção de líquidos e degradação de massa. As propriedades antimicrobianas dos biomateriais foram avaliadas por meio do teste de difusão em disco para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. A capacidade de promover a migração celular e a citotoxicidade dos compostos foi investigada *in vitro*, em fibroblastos da linhagem NIH/3T3, por Ensaio de Cicatrização de Ferida (*Scratch Wound Assay*) e ensaio colorimétrico MTT.

O teste de centrifugação é o primeiro a ser realizado, pois determina se a formulação pode ser submetida aos demais testes de estabilidade, sem a necessidade de novas preparações (Isaac et al., 2008). Levando em consideração que os resultados do teste de centrifugação confirmaram a estabilidade do material, sem precipitações ou separação de fases, não foi necessário reformular nenhum dos grupos de hidrogel preparados. A avaliação organoléptica realizada nos grupos de hidrogéis também confirmou a estabilidade do material quando armazenado em refrigeração, mantendo-se inalterado. Portanto, as preparações obtidas foram consideradas estáveis (Brasil, 2004).

O potencial hidrogeniônico foi medido nos diferentes grupos deste estudo, antes e depois dos testes de absorção de líquidos e degradação. Os resultados indicaram que o material bioativo proposto não altera significativamente o pH do meio. A manutenção desse parâmetro é relevante, pois o descontrole do pH pode agravar o quadro clínico de lesões ulceradas (Feitosa, 2014). As espessuras das membranas variaram entre 40µm e 79µm, sendo que as membranas

formuladas com óxido de grafeno foram discretamente mais espessas do que preparadas apenas com quitosana, com ou sem FGF2. Isso se deveu à incorporação de óxido de grafeno em sua composição, causando uma pequena irregularidade na superfície de cada membrana. Na literatura não há uma espessura ideal pré-definida, pois essa característica varia conforme a região do corpo a ser tratada.

Existem vários tipos de substitutos cutâneos utilizados para acelerar a reparação tecidual, como o Integra® (composto por colágeno bovino e condroitina-6-sulfato, e recoberto por uma fina camada de *silastic*), Matriderm® (formado principalmente por elastina e colágeno) e Pelnac® (matriz de colágeno liofilizado derivado do atelocolágeno do tendão porcino) (Kolokythas et al., 2008; Ferreira et al., 2011; Nery et al., 2011). Considerando as diferentes espessuras dos substitutos dérmicos comerciais, as membranas obtidas neste estudo apresentaram-se dentro de padrões que as qualificam para potencial uso terapêutico.

Além de espessura apropriada, a porosidade das membranas para aplicação na reparação de tecidos deve estar acima de 50%, pois tamanhos adequados de poros permitem a vascularização, migração e proliferação de células (Elsner et al., 2012; Olad; Farshi Azhar, 2014), além de facilitar o transporte de nutrientes e a remoção de resíduos, ou seja, regula um processo importante na reparação de tecidos, permitindo o crescimento de novos tecidos (JI et al., 2011). Os resultados deste estudo variaram de 51% a 80%, também qualificando as membranas aqui propostas para futura utilização clínica.

No tratamento de lesões ulcerativas, a capacidade de absorção de líquidos de um biomaterial é um fator determinante, em vista da necessidade de controlar o exsudato inflamatório nessas circunstâncias. Esse atributo promove um microambiente equilibrado para o processo de reparo, evitando desidratação, morte celular e diminuição da inflamação (Zahid et al., 2019). O teste de absorção de líquidos qualificou todas as membranas deste estudo como biomateriais promissores para o tratamento de úlceras, pois foram obtidos valores entre 33% e 86%, com diferenças estatisticamente significativas no grupo CH, entre 24 e T96.

O uso de materiais biodegradáveis para cicatrização de feridas proporciona um ambiente favorável para o crescimento e reorganização celular (Ma et al., 2001). Por outro lado, a redução da taxa de degradação indica alta densidade em uma membrana bioadesiva, dificultando a passagem de fluidos e afetando a absorção de ativos (Feitosa, 2014). Os valores de

biodegradabilidade em todos os grupos aqui estudados variaram entre 37% e 71%, sendo considerados satisfatórios em comparações na literatura.

Ainda quanto à degradabilidade das membranas, foram observadas diferenças estatisticamente significativas no grupo CH nos períodos T24 e T48 em relação a T72, além do grupo CH/GO/FGF, que demonstrou diferença estatisticamente significativa entre T72 e T96. Os resultados mostraram que ao longo de 96 horas, as membranas de diferentes composições não se degradaram completamente. Nas membranas acrescidas de óxido de grafeno, notou-se ligeira queda na biodegradabilidade, uma característica esperada para esse tipo de composto. A diminuição da biodegradabilidade, *in vitro*, dos grupos contendo óxido de grafeno pode ser considerada como característica conveniente, pois permite que a membrana seja mantida no local da lesão por um período maior (Ali et al., 2022).

Para análise das propriedades antimicrobianas, as preparações foram submetidas ao teste de difusão em disco. Os resultados demonstraram que os hidrogéis permitiram a formação de halos de inibição para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e, em menor escala, para *Candida albicans* no grupo CH. O ensaio realizado com as membranas não demonstrou formação de halo significativo nos mesmos microrganismos analisados. No entanto, após a remoção das membranas observou-se que não houve crescimento microbiano nas respectivas áreas subjacentes, indicando inibição por contato. A capacidade de inibição por contato das membranas também foi menor para *Candida albicans*, no grupo CH. A quitosana e o óxido de grafeno são considerados materiais antimicrobianos, e quando utilizados em combinação parecem apresentar efeito antimicrobiano sinérgico (Feng; Wang, 2020).

Os fibroblastos são células-chave durante o processo de cicatrização, produzindo nova matriz extracelular, fibras colágenas e elásticas, que atraem e ancoram demais células envolvidas no processo de reparo tecidual. Este estudo investigou o potencial das membranas de quitosana e óxido de grafeno funcionalizado com FGF2, em induzir a migração celular *in vitro*. A comparação entre os grupos mostrou diferenças estatisticamente significantes a partir de 48 horas nas membranas CH/GO e CH/GO/FGF, onde as áreas de fenda foram menores do que o grupo CTRL ($p = 0,047$; $0,030$). Após 72 horas, os fibroblastos 3T3/NIH apresentaram redução significativa das fendas em todas as membranas, CH, CH/FGF, CH/GO e CH/GO/FGF, quando comparadas aos dois controles, CTRL ($p = 0,003$; $0,005$; $0,004$; $0,001$) e CTRL/FGF ($p = 0,019$; $0,035$; $0,022$; $0,010$). Após 96 horas *in vitro*, todos os grupos experimentais também

demonstraram fendas reduzidas em relação aos controles CTRL ($p = 0,003$; $0,002$; $0,004$; $0,004$) e CTRL/FGF ($p = 0,016$; $0,012$; $0,020$; $0,020$).

Quando cada grupo foi avaliado isoladamente, constatou-se que maioria das fendas reduziu no final do período em relação ao início do experimento. Nas membranas contendo apenas quitosana, as fendas de T48, T72 e T96 reduziram significativamente em relação a T0 ($p = 0,0005$; $< 0,0001$; $< 0,0001$) e T24 ($p = 0,027$; $0,005$; $0,004$). Nas membranas acrescidas de óxido de grafeno, apenas o grupo contendo FGF2 mostrou redução em T96, comparado a T0 ($p = 0,040$). Os grupos sem adição dos biomateriais (CTRL e CTRL/FGF) também apresentaram alguma redução de fendas do transcorrer do tempo. No CTRL, houve redução em T72 e T96 em relação a T0 ($p = 0,001$; $0,0002$). Em CTRL/FGF houve diminuição das fendas em T48, T72 e T96, comparados a T0 ($p = 0,001$; $0,0004$; $0,0004$). Apesar dos grupos controle apresentarem resultados positivos ao longo do tempo, fica claro que as membranas de quitosana e óxido de grafeno são superiores em estimular a migração de fibroblastos, em relação aos controles.

Previamente ao desenvolvimento de estudos clínicos, é importante analisar a citotoxicidade em ensaios pré-clínicos. Os compostos sugeridos neste estudo tiveram sua biocompatibilidade avaliada por meio do teste de citotoxicidade celular, conforme os padrões preconizados pela norma ISO 10993-13. O ensaio MTT foi utilizado como ferramenta para determinação de viabilidade celular, sendo realizado em todas as condições experimentais, além de controle não estimulado. Os resultados de MTT mostraram que a maioria das preparações de hidrogel e membranas de quitosana apresentou viabilidade celular acima do limite de citotoxicidade estabelecido. Alguns grupos de hidrogel, no entanto, demonstraram médias abaixo de 70% nos tempos experimentais T24, T48, T72, indicando um possível efeito citotóxico desses materiais sobre os fibroblastos.

Diversos estudos têm explorado o desenvolvimento e a aplicação de nanocompósitos e nanomateriais à base de carbono para cicatrização de feridas, mostrando seu potencial na promoção da reparação de tecidos, atividade antimicrobiana e melhores resultados terapêuticos. Uma revisão recente explorou as aplicações biomédicas de nanomateriais de carbono, incluindo fulerenos, pontos quânticos, nanotubos, nanofibras e grafeno. Esses nanomateriais de carbono mostraram grande potencial para entrega de drogas, bioimagem, biossensores e engenharia de tecidos (Gaur et al., 2021). Em outra revisão abrangente, os autores também enfatizam que

nanomateriais de carbono, como óxido de grafeno, pontos de carbono, nanotubos de carbono e nanodiamantes, vêm se destacando na biomedicina devido à sua biocompatibilidade, propriedades antibacterianas e capacidade de melhorar a cicatrização de feridas (Sadat et al., 2022).

Taher et al. (2023), desenvolveram um nanofilme multifuncional para aplicações em cicatrização de feridas, composto por acetato de celulose, ortovanadato de magnésio, óxido de magnésio e óxido de grafeno. O filme promoveu alta viabilidade celular e exibiu hidrofiliabilidade, rugosidade superficial e porosidade, aumentando a atividade biológica das células estimuladas (Taher et al., 2023). Foram também desenvolvidos estudos sobre curativos reforçados pela incorporação de curcumina em nanoaglomerados de prata biocompatível, associados a lisozima. Os achados desses estudos demonstraram que esses curativos apresentaram atividade bactericida sinérgica e de longo prazo contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, além de promover cicatrização de feridas pela inibição de fatores inflamatórios e deposição excessiva de colágeno (Fu et al., 2021; Wang et al., 2022).

Prema et al. (2021), demonstraram ampla atividade antimicrobiana de nanocompósitos de óxido de grafeno/óxido de zinco, por meio de fotoindução. Esses biomateriais geraram espécies reativas de oxigênio sob irradiação de luz, levando à inibição bacteriana e melhorando o potencial de cicatrização de feridas (Prema et al., 2021). Adicionalmente, uma nanoplataforma de óxido de grafeno modificada com ftalocianina de zinco, exibiu propriedades antibacterianas aprimoradas para a cicatrização de feridas infectadas, em modelo de ferida de rato (Mei et al., 2021).

Apesar do grande número de trabalhos publicados envolvendo aplicações com óxido de grafeno e quitosana em reparo tecidual/cicatrização de feridas, ainda são necessários estudos adicionais sobre a segurança e eficácia desses compostos na prática clínica. É, por exemplo, importante avaliar o potencial alergênico da quitosana, além da necessidade de buscar alternativas para potencializar o efeito antimicrobiano de compostos baseados em biopolímeros e nanomateriais de carbono, sem provocar toxicidade celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ali IH; Ouf A, Elshishiny F, Taskin MB, Song, J, Dong M, Chen M, Siam R, Mamdouh W. Antimicrobial and wound-healing activities of graphene-reinforced electrospun chitosan/gelatin nanofibrous nanocomposite scaffolds. *ACS Omega* 2022, 7, 1838–1850.

Ahmed S, Ikram S. Chitosan & Its Derivatives: A Review in Recent Innovations. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2014 Dec 25;6(1):14–30.

Bahuguna A, Khan I, Bajpai VK, Kang SC. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 2017 Apr 8;12(2):8.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos. Brasília: Anvisa, 2007.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. Brasília: Anvisa, 2004.

Budiraharjo R, Neoh KG, Kang ET. Enhancing bioactivity of chitosan film for osteogenesis and wound healing by covalent immobilization of BMP-2 or FGF-2. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2012 Aug 13;24(6):645–62.

Burke JF, Yannas IV, Quinby WC, Bondoc CC, Jung WK. Successful Use of a Physiologically Acceptable Artificial Skin in the Treatment of Extensive Burn Injury. *Annals of Surgery*. 1981 Oct;194(4):413–28.

Chaveli-Lopez B, Bagan-Sebastian J. Treatment of oral mucositis due to chemotherapy. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*. 2016;8(2).

Dreyer DR, Park S, Bielawski CW, Ruoff RS. The chemistry of graphene oxide. *Chem Soc Rev*. 2010;39(1):228–40.

Eduardo F de P, Bezinelli LM, Orsi MCE, Rodrigues M, Ribeiro MS, Hamerschlag N, et al. The influence of dental care associated with laser therapy on oral mucositis during allogeneic hematopoietic cell transplant: retrospective study. *einstein (São Paulo)*. 2011;9(2):201–6.

Elsner JJ, Kraitzer A, Grinberg O, Zilberman M. Highly porous drug-eluting structures. *Biomatter*. 2012 Oct;2(4):239–70.

Fang Y, Zhang D, Guo Y, Guo Y, Chen Q. Simple one-pot preparation of chitosan-reduced graphene oxide-Au nanoparticles hybrids for glucose sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2015 Dec 31;221(1):265–72.

Feitosa LF. Síntese e caracterização de matriz porosa quitosana/fentanil para implementação como sistema de liberação controlada de fentanil [Dissertação de Mestrado]. [Universidade Federal de Campina Grande]; 2014.

Feng W, Wang Z. Biomedical applications of chitosan-graphene oxide nanocomposites. *iScience*. 2022 Jan;25(1):103629.

Ferreira MC, Paggiaro AO, Isaac C, Teixeira Neto N, Santos GB dos. Skin substitutes: current concepts and a new classification system. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica*. 2011 Dec 1;26(4):696–702.

Fu C, Qi Z, Zhao C, Kong W, Li H, Guo W, Yang X. Enhanced wound repair ability of arginine-chitosan nanocomposite membrane through the antimicrobial peptides-loaded polydopamine-modified graphene oxide. *J Biol Eng*. 2021 May 22;15(1):17.

Gaur M, Misra C, Yadav AB, Swaroop S, Maolmhuaidh FÓ, Bechelany M, Barhoum A. Biomedical Applications of Carbon Nanomaterials: Fullerenes, Quantum Dots, Nanotubes, Nanofibers, and Graphene. *Materials (Basel)*. 2021 Oct 11;14(20):5978.

Hu H, Wang X, Wang J, Liu F, Zhang M, Xu C. Microwave-assisted covalent modification of graphene nanosheets with chitosan and its electrorheological characteristics. *Applied Surface Science*. 2011 Jan 15;257(7):2637–42.

International Standard ISO 10993- 5. Biological evaluation of medical devices-Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. Geneva: International Organization for Standardization, 2009.

Isaac VLB. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. *Rev ciênc farm básica apl*. 2008;29(1):81–96.

Kiran P, Rao PS. Development and characterization of reconstituted hydrogel from Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) powder. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2016 Mar 3;10(3):411–24.

Kolokythas P, Aust M, Vogt P, Paulsen F. Aktuelle Übersicht zum Dermisersatz mit Kollagen-Elastin-Matrix Matriderm® bei Brandverletzungen. *Handchirurgie Mikrochirurgie Plastische Chirurgie*. 2008 Jul 15;40(06):367–71.

Liu Y, Song R, Zhang X, Zhang D. Enhanced antimicrobial activity and pH-responsive sustained release of chitosan/poly (vinyl alcohol)/graphene oxide nanofibrous membrane loading with allicin. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020 Oct;161(1):1405–13.

Maraschin TG. Preparação de óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido e dispersão em matriz polimérica. [Dissertação de Mestrado]. [Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul]; 2016.

Maria OM, Eliopoulos N, Muanza T. Radiation-Induced Oral Mucositis. *Frontiers in Oncology*. 2017 May 22;7(89).

Mei L, Shi Y, Miao Z, Cao F, Hu K, Lin C, Li X, Li J, Gao J. Photo-initiated enhanced antibacterial therapy using a non-covalent functionalized graphene oxide nanoplateform. *Dalton Trans*. 2021 Jun 22;50(24):8404-8412.

Nanda SS, Papaefthymiou GC, Yi DK. Functionalization of Graphene Oxide and its Biomedical Applications. *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences*. 2015 Apr 28;40(5):291–315.

Nery ALV, Porter KE, Freire RF, Baptista NS, Esberard F, Souza THS, et al. Nova abordagem no tratamento de lesões complexas: uso de matriz de regeneração dérmica. *Rev bras queimaduras*. 2011;10(2):66–70.

Olad A, Farshi Azhar F. The synergetic effect of bioactive ceramic and nanoclay on the properties of chitosan–gelatin/nanohydroxyapatite–montmorillonite scaffold for bone tissue engineering. *Ceramics International*. 2014 Aug;40(7):10061–72.

Oliveira M, Poletto M, Severo TC. Rota química para produção de óxido de grafeno a partir de oxidação do grafite comercial. *Revista Interdisciplinar de Ciência Aplicada*. 2018 Dec 22;3(6):16–20.

Prema D, Binu NM, Prakash J, Venkatasubbu GD. Photo induced mechanistic activity of GO/Zn (Cu)O nanocomposite against infectious pathogens: Potential application in wound healing. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2021 Jun;34: 102291.

Qin H, Wang J, Wang T, Gao X, Wan Q, Pei X. Preparation and Characterization of Chitosan/ β -Glycerophosphate Thermal-Sensitive Hydrogel Reinforced by Graphene Oxide. *Frontiers in Chemistry*. 2018 Nov 22;6(565).

Rana VK, Choi MC, Kong JY, Kim GY, Kim MJ, Kim SH, et al. Synthesis and Drug-Delivery Behavior of Chitosan-Functionalized Graphene Oxide Hybrid Nanosheets. *Macromolecular Materials and Engineering*. 2010 Dec 22;296(2):131–40.

Rehman SR ur, Augustine R, Zahid AA, Ahmed R, Tariq M, Hasan A. Reduced Graphene Oxide Incorporated GelMA Hydrogel Promotes Angiogenesis for Wound Healing Applications. *International Journal of Nanomedicine*. 2019 Dec; 14(1):9603–17.

Sadat Z, Farrokhi-Hajiabad F, Lalebeigi F, Naderi N, Ghafori Gorab M, Ahangari Cohan R, Eivazzadeh-Keihan R, Maleki A. A comprehensive review on the applications of carbon-based nanostructures in wound healing: from antibacterial aspects to cell growth stimulation. *Biomater Sci*. 2022 Dec 6;10(24):6911–6938.

Sivashankari PR, Moorthi A, Abudhahir KM, Prabakaran M. Preparation and characterization of three-dimensional scaffolds based on hydroxypropyl chitosan-graft-graphene oxide. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018 Apr 15;110(1):522–30.

Suarez-Arnedo A, Torres Figueroa F, Clavijo C, Arbeláez P, Cruz JC, Muñoz-Camargo C. An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. Chirico G, editor. *PLOS ONE*. 2020 Jul 28;15(7): e0232565.

Taher FA, Gouda M, Khalaf MM, Shaaban S, Al Bosager AYA, Algaflly DAA, Mahfouz MK, Abou Taleb MF, Abd El-Lateef HM. Magnesium Ortho-(2023) Vanadate/Magnesium Oxide/Graphene Oxide Embedded through Cellulose Acetate-Based Films for Wound Healing Applications. *Materials (Basel)*. 2023 Apr 11;16(8):3009.

Wang T, Li Y, Liu Y, Xu Z, Wen M, Zhang L, Xue Y, Shang L. Highly biocompatible Ag nanocluster-reinforced wound dressing with long-term and synergistic bactericidal activity. *J Colloid Interface Sci*. 2023 Mar; 633:851–865.

Zahid AA, Ahmed R, Raza Ur Rehman S, Augustine R, Tariq M, Hasan A. Nitric oxide releasing chitosan-poly (vinyl alcohol) hydrogel promotes angiogenesis in chick embryo model. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019 Sep 1;136(1):901–10.

Zhang H, Luo X, Lin X, Lu X, Tang Y. The molecular understanding of interfacial interactions of functionalized graphene and chitosan. *Applied Surface Science*. 2016 Jan;360(1):715–21.

FIGURAS

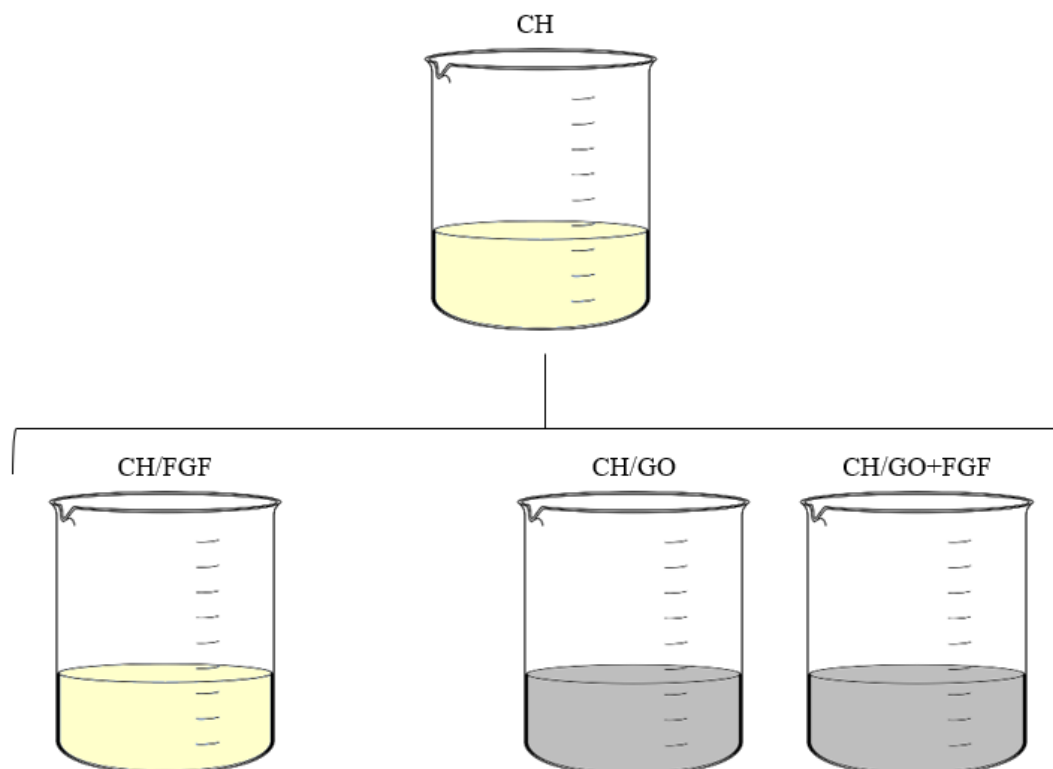


Figura 1M. Preparações de hidrogel. Representação esquemática da divisão dos hidrogéis de quitosana 2%, para preparo dos demais grupos experimentais. (A) quitosana (CH); (B) CH com fator de crescimento fibroblástico 2 (CH/FGF); (C) CH com óxido de grafeno (CH/GO); (D) CH com GO e FGF

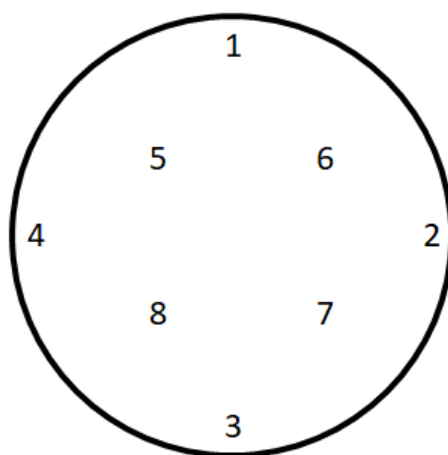


Figura 2M. Determinação da espessura de membrana. Representação esquemática dos pontos utilizados na determinação do valor médio de espessura das membranas fracionadas em discos

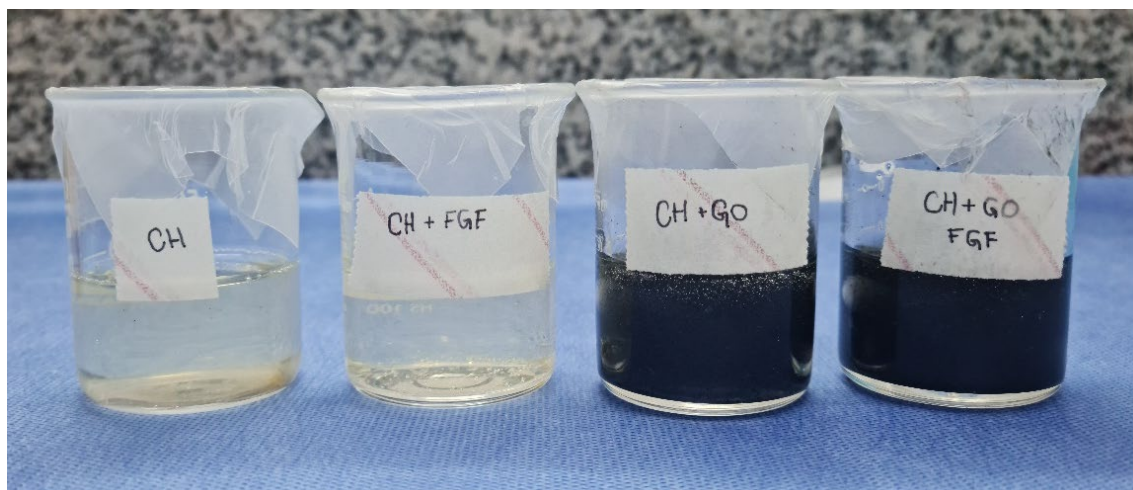


Figura 3M. Preparações de hidrogel. Aspecto visual dos hidrogéis nos grupos experimentais, (A) quitosana (CH); (B) CH com fator de crescimento fibroblástico 2 (CH/FGF); (C) CH com óxido de grafeno (CH/GO); (D) CH com GO e FGF2 (CH/GO/FGF)

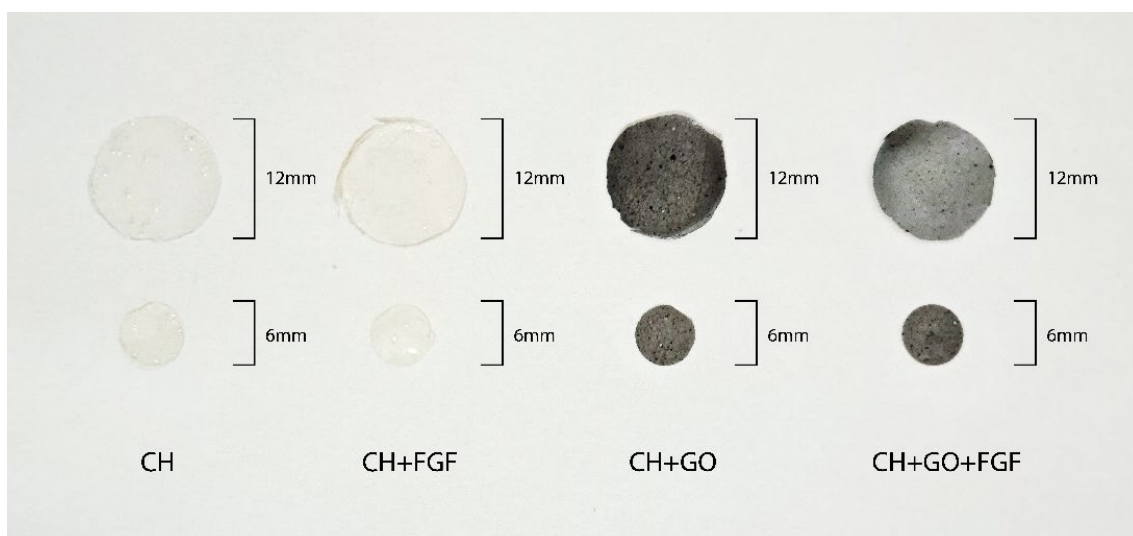


Figura 4M. Aspecto e dimensões de membrana. Características macroscópicas das membranas, após fracionamento em diâmetros de 12 mm e 6 mm. (A) quitosana (CH); (B) CH com fator de crescimento fibroblástico 2 (CH/FGF); (C) CH com óxido de grafeno (CH/GO); (D) CH com GO e FGF2 (CH/GO/FGF)

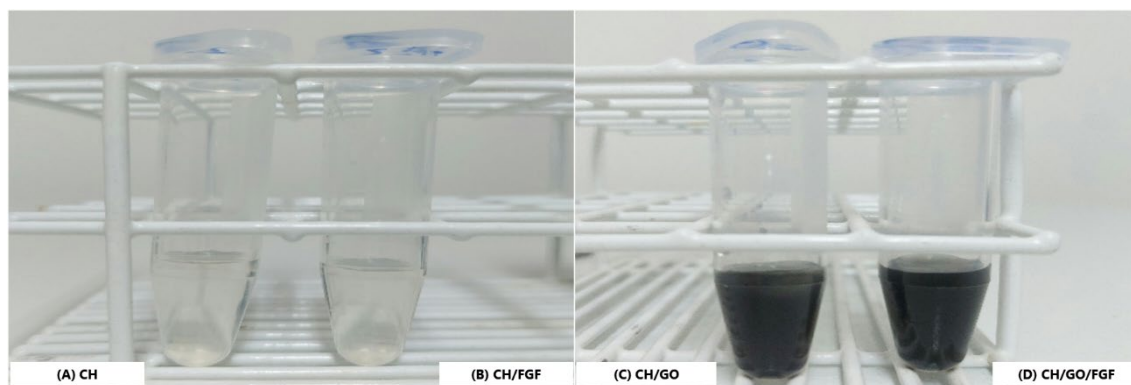


Figura 5M. Teste de centrifugação. Aspecto visual dos hidrogéis após 3 ciclos de centrifugação com 2,5 g por amostra de hidrogel, em 3000 rpm (força $G = 2.012$), por 30 minutos, em temperatura ambiente. (A) quitosana (CH); (B) CH com fator de crescimento fibroblástico 2 (CH/FGF); (C) CH com óxido de grafeno (CH/GO); (D) CH com GO e FGF2 (CH/GO/FGF)

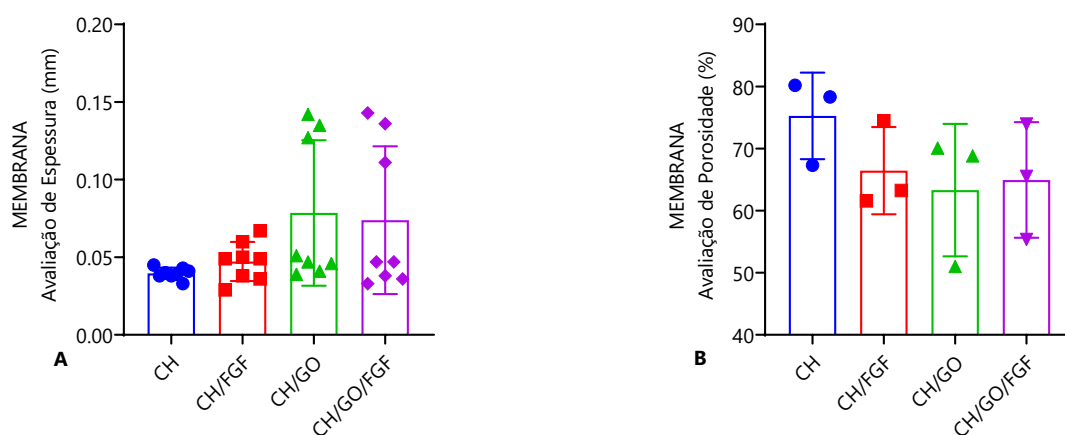


Figura 6M. Análise de espessura e porosidade de membrana. (A) Espessura e (B) Porosidade, avaliadas nos grupos experimentais: quitosana (CH); CH com fator de crescimento fibroblástico 2 (CH/FGF); CH com óxido de grafeno (CH/GO); CH com GO e FGF2 (CH/GO/FGF). Teste estatístico ANOVA, com pós-teste de Tukey. Resultados expressos como média e desvio padrão, obtidos de um ensaio/grupo, com cinco replicatas para (A) e três para (B). Valores de $p < 0,05$ indicam significância estatística

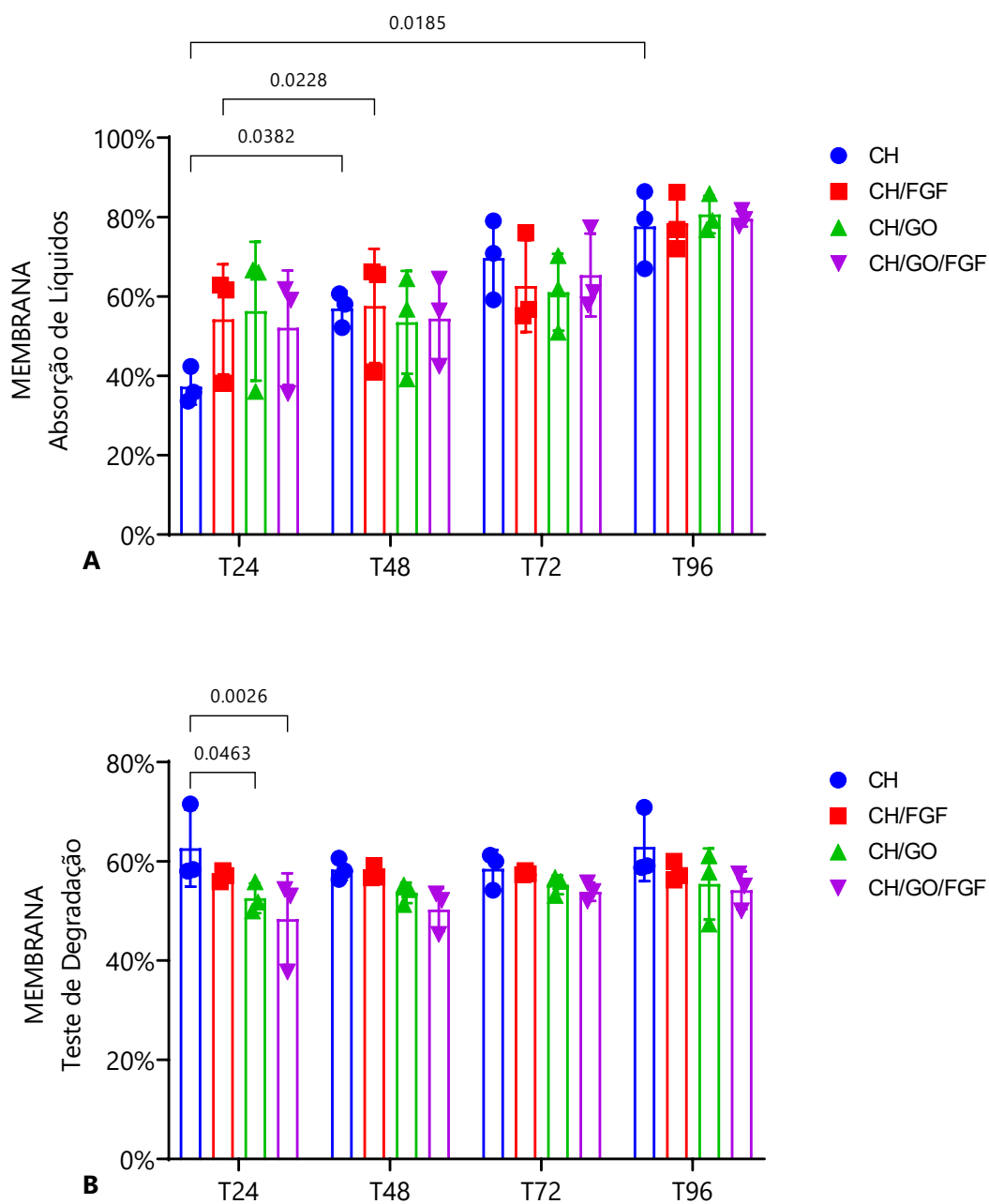


Figura 7M. Análise de absorção de líquidos e degradação de membrana. (A) Absorção e (B) degradação, avaliadas nos grupos experimentais: quitosana (CH); CH com fator de crescimento fibroblástico 2 (CH/FGF); CH com óxido de grafeno (CH/GO); CH com GO e FGF2 (CH/GO/FGF). Teste estatístico ANOVA, com pós-teste de Tukey. Resultados expressos como média e desvio padrão, obtidos de um ensaio/grupo, com três replicatas para (A) e (B). Valores de $p < 0,05$ indicam significância estatística

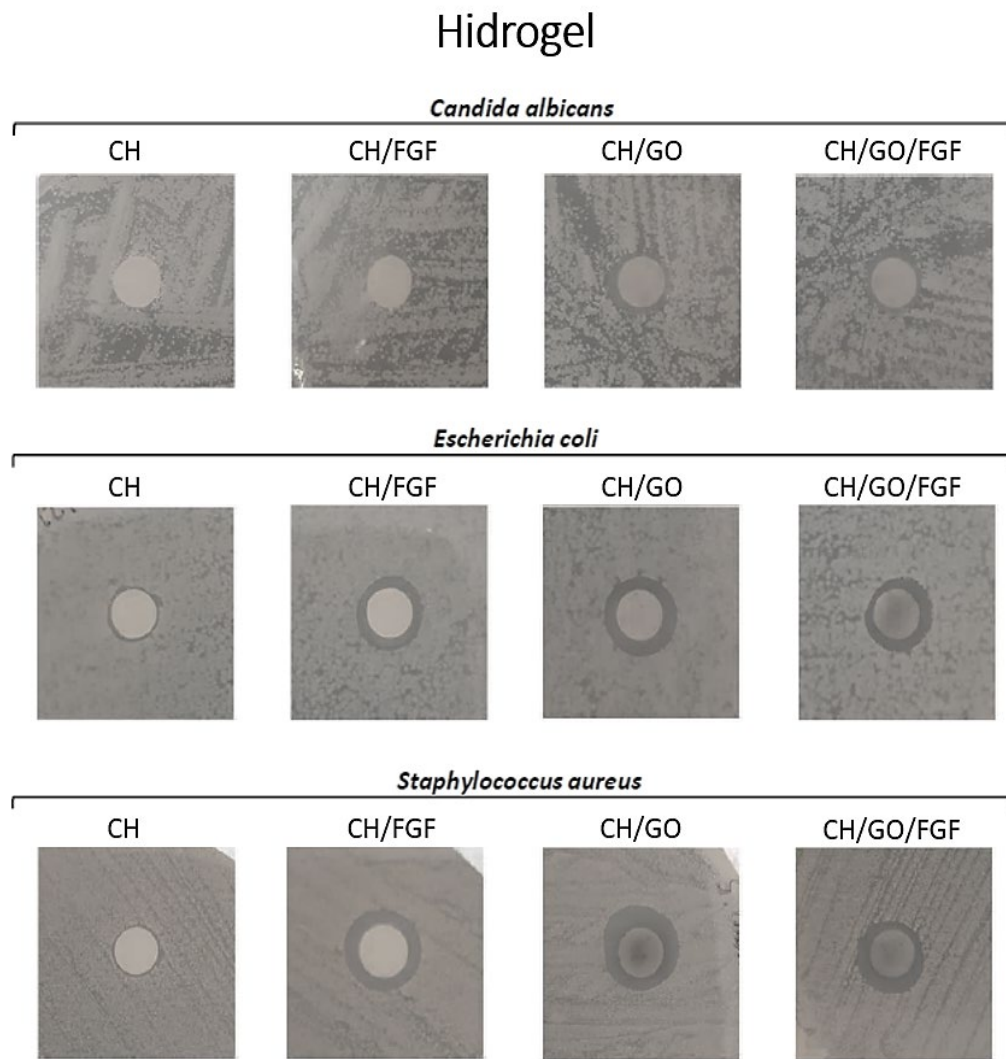


Figura 8M. Avaliação de propriedades antimicrobianas em hidrogel. Antibiógramas testados em *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* em papel filtro embebido em hidrogel, para os grupos CH, CH/FGF, CH/GO e CH/GO/FGF

Membrana

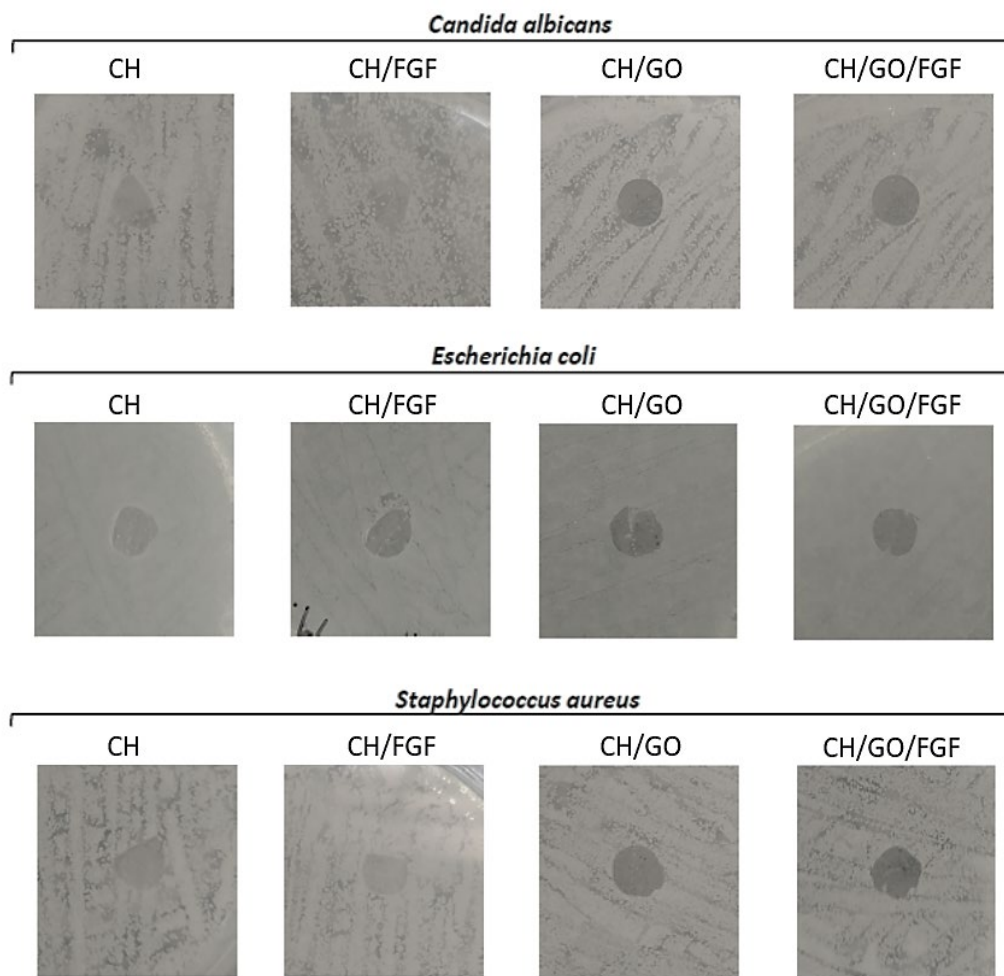


Figura 9M. Avaliação de propriedades antimicrobianas em membrana. Antibiógramas testados em *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* em membranas, nos grupos CH, CH/FGF, CH/GO e CH/GO/FGF

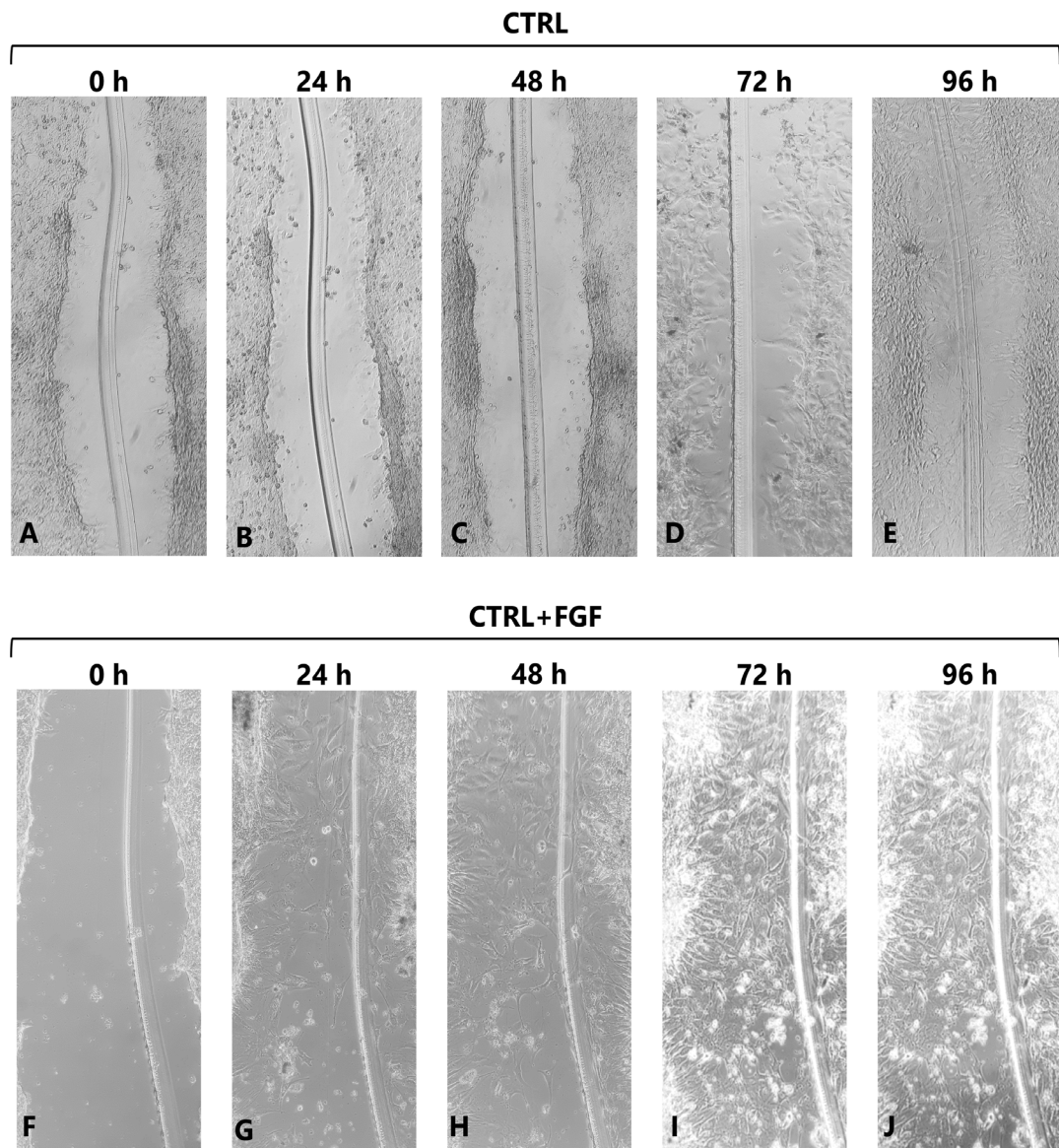


Figura 10M. Ensaio controle de migração celular, sem hidrogel ou membrana. Avaliação do potencial de aumento na migração de fibroblastos (NIH/3T3), sem tratamento por quitosana e óxido de grafeno, entre 0 e 96 horas: Controle (CTRL); Controle com FGF2 (CTRL/FGF). Aumento: 100 X

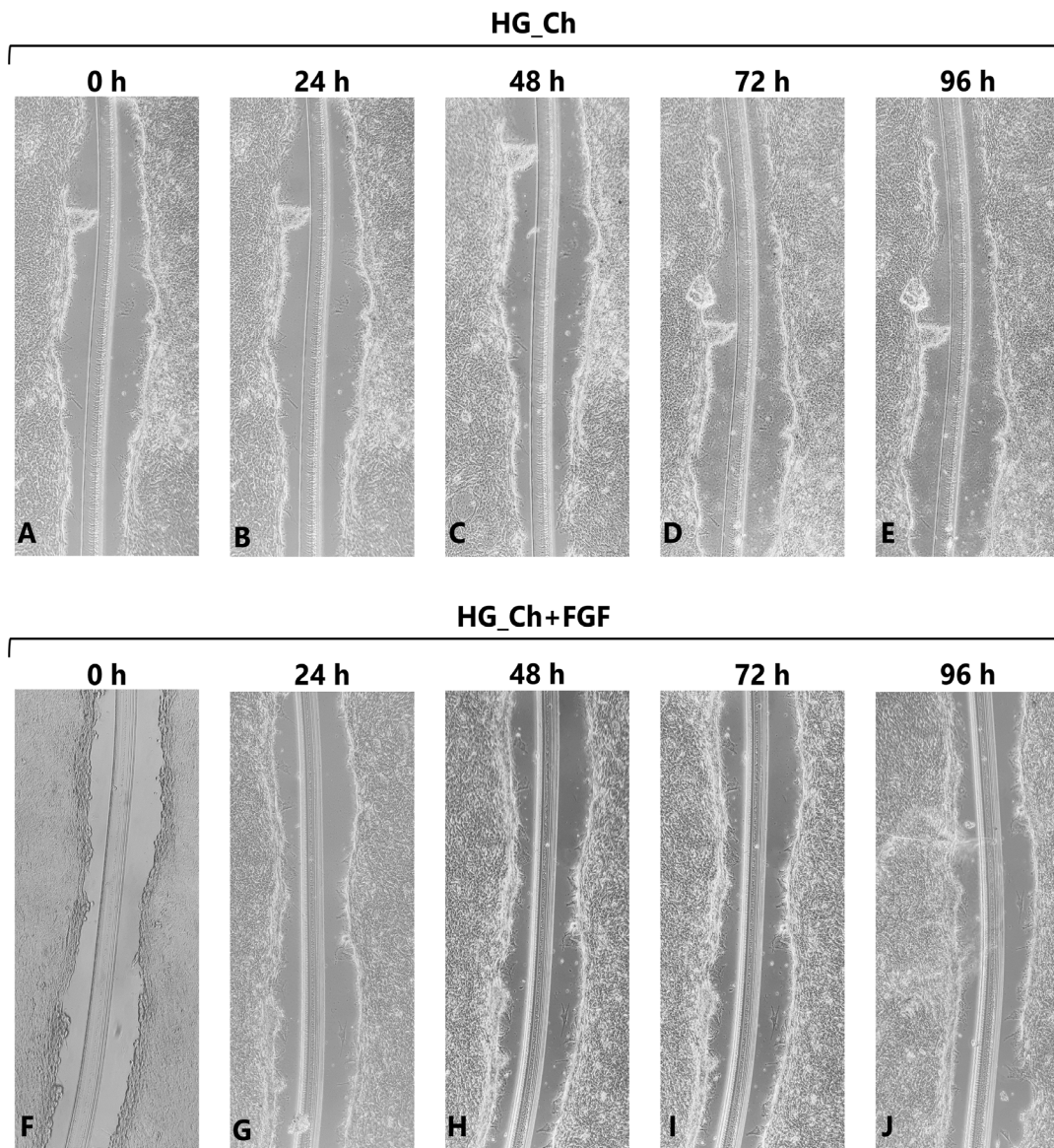


Figura 11M. Ensaio de migração celular em hidrogel de quitosana, com ou sem FGF2. Avaliação do potencial de aumento na migração de fibroblastos NIH/3T3, entre 0 e 96 horas. Imagens representativas dos grupos experimentais: Quitosana (CH); Quitosana com FGF2 (CH/FGF). Aumento: 100 X

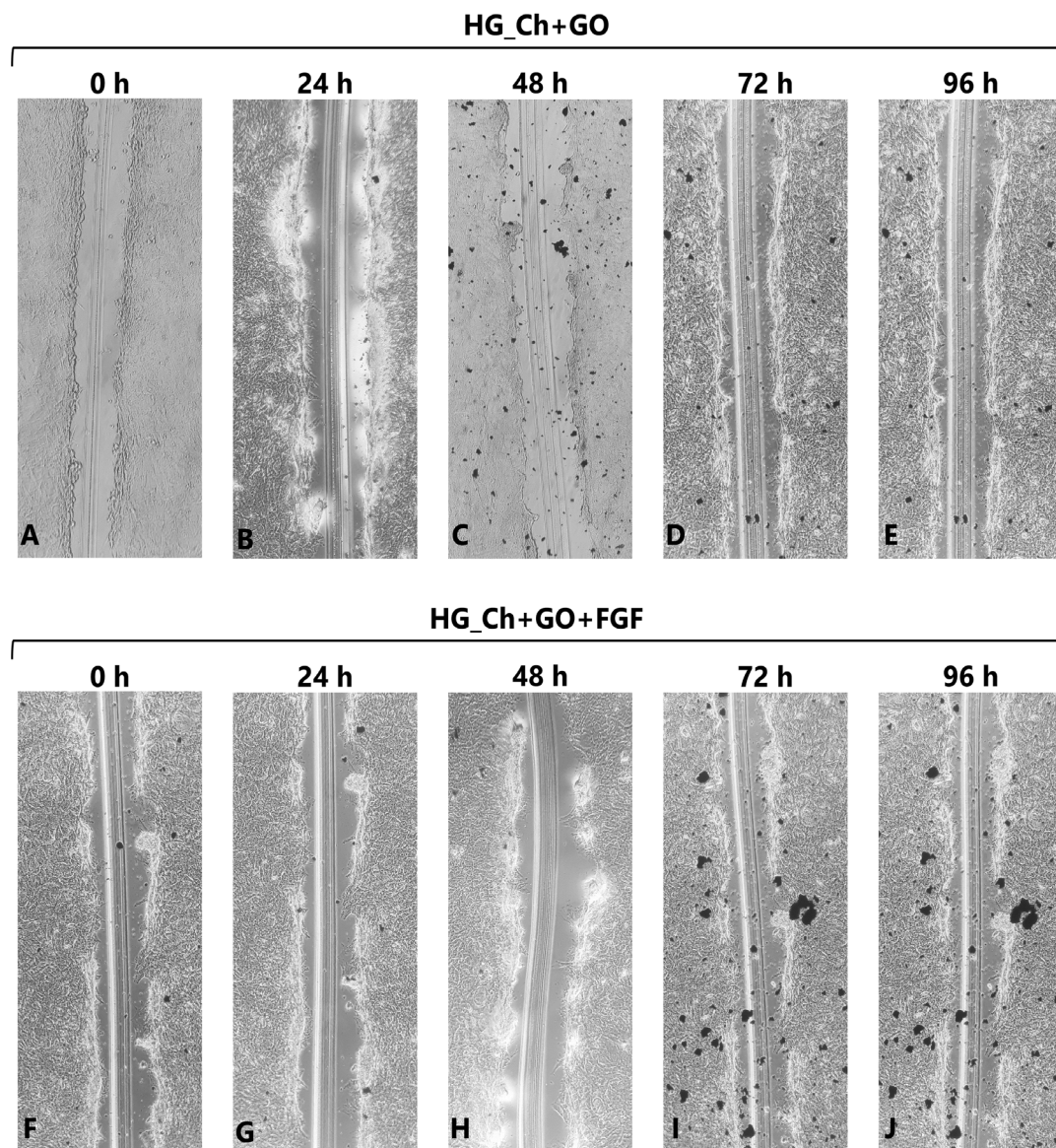


Figura 12M. Ensaio de migração celular em hidrogel de quitosana com óxido de grafeno e/ou FGF2. Avaliação do potencial de aumento na migração de fibroblastos NIH/3T3, entre 0 e 96 horas. Imagens representativas dos grupos experimentais: Quitosana com óxido de grafeno (CH/GO); Quitosana com óxido de grafeno e FGF2 (CH/GO/FGF). Aumento: 100 X

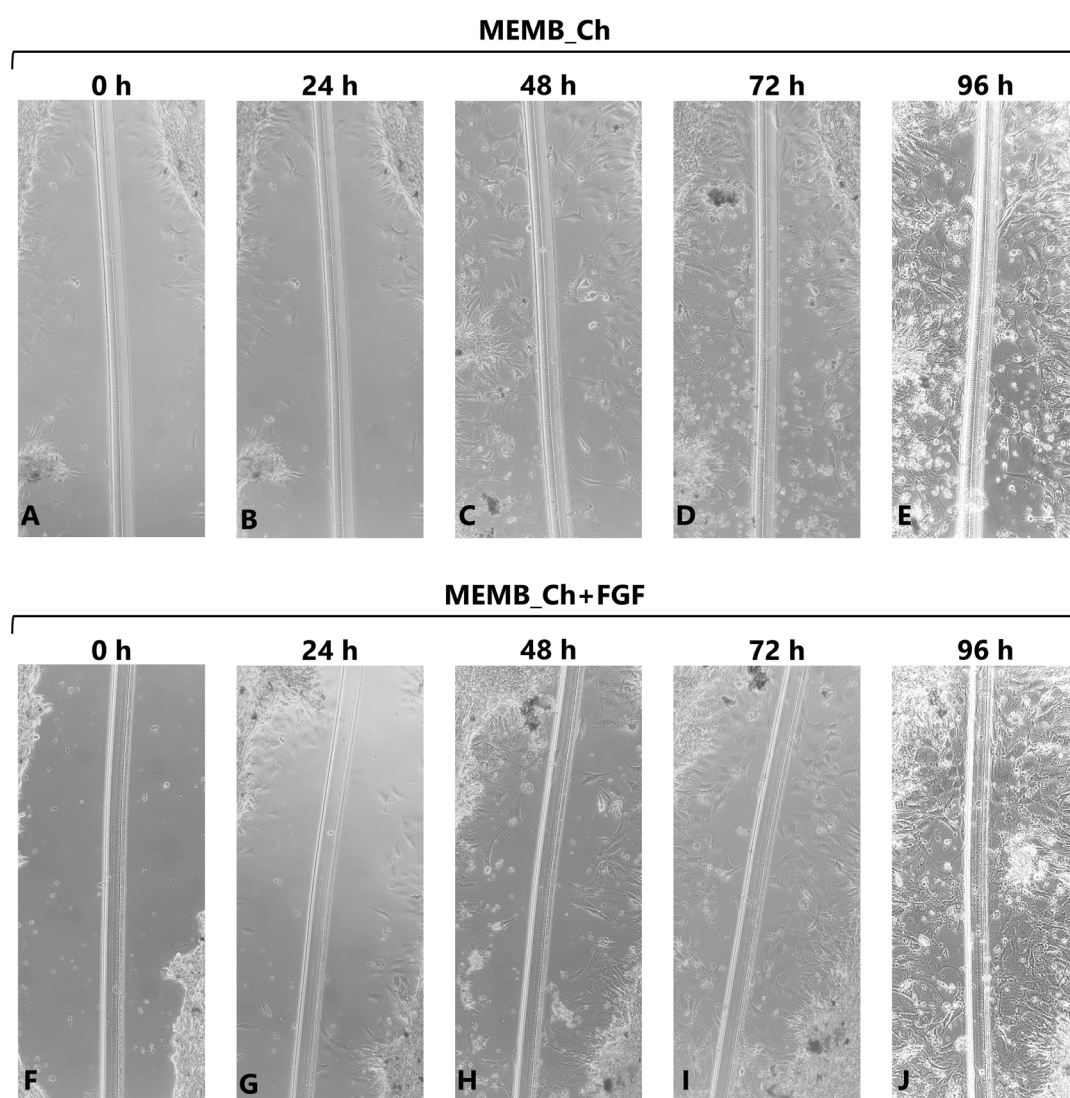


Figura 13M. Ensaio de migração celular em membrana de quitosana, com ou sem FGF2. Avaliação do potencial de aumento na migração de fibroblastos NIH/3T3, entre 0 e 96 horas. Imagens representativas dos grupos experimentais: Quitosana (CH); Quitosana com FGF2 (CH/FGF). Aumento: 100 X

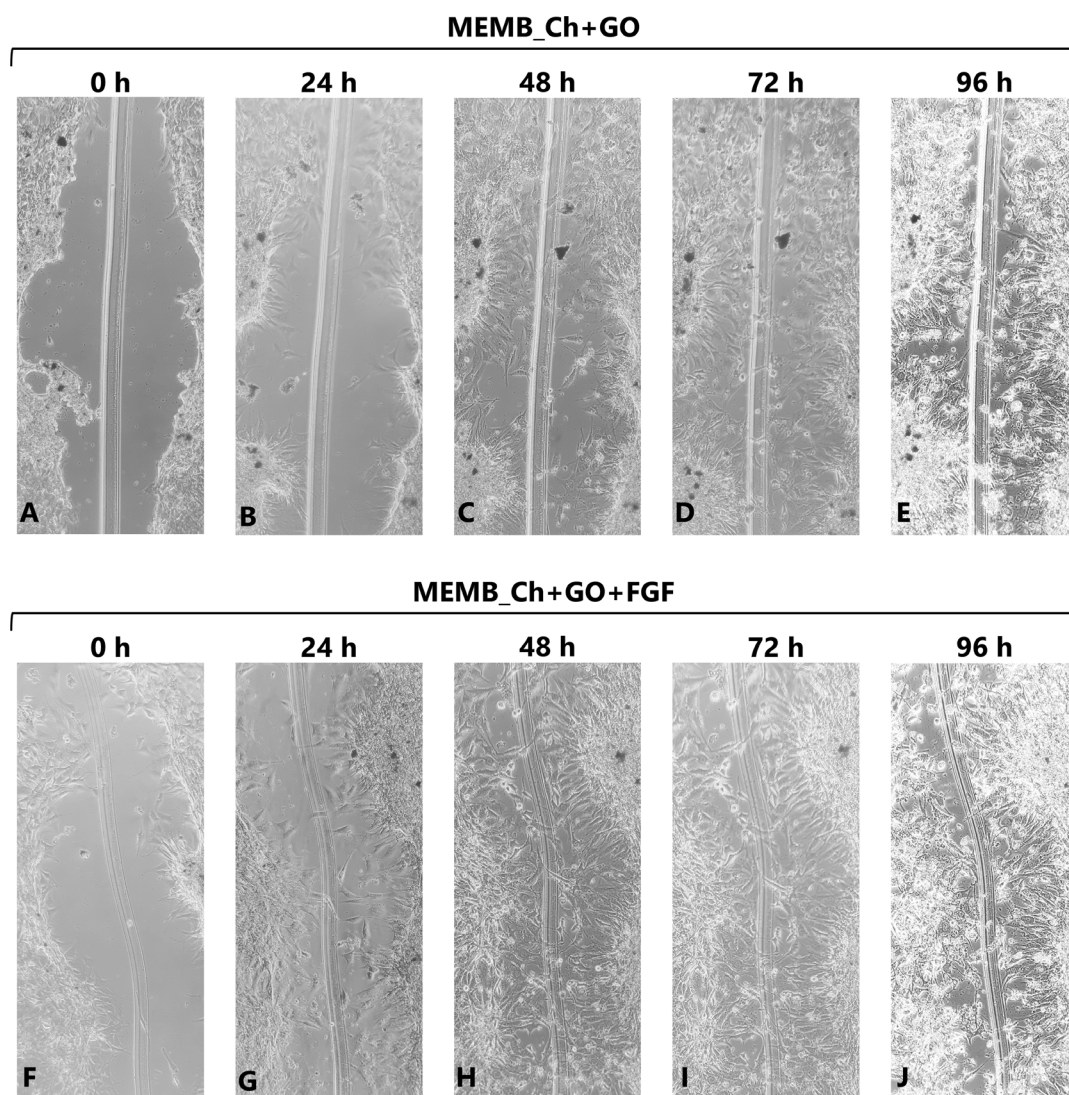


Figura 14M. Ensaio de migração celular em membrana de quitosana, com óxido de grafeno e/ou FGF2. Avaliação do potencial de aumento na migração de fibroblastos NIH/3T3, entre 0 e 96 horas. Imagens representativas dos grupos experimentais: Quitosana com óxido de grafeno (CH/GO); Quitosana com óxido de grafeno e FGF2 (CH/GO/FGF). Aumento: 100 X

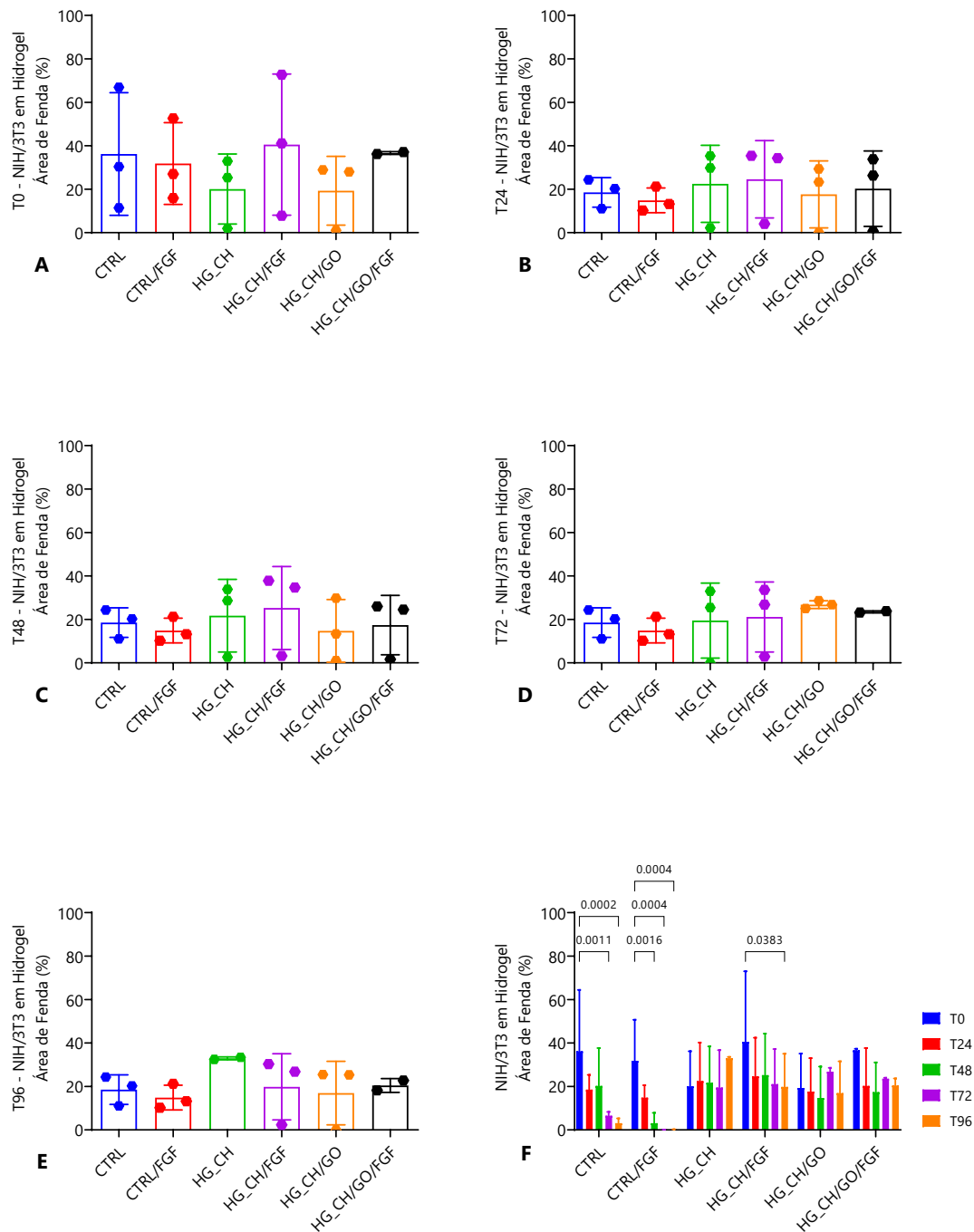


Figura 15M. Migração celular em hidrogel de quitosana, com ou sem óxido de grafeno e FGF2. Percentual de área de fenda em fibroblastos NIH/3T3, avaliado nos grupos: Controle (CTRL); Controle com FGF2 (CTRL/FGF); Quitosana (CH); Quitosana com FGF2 (CH/FGF); Quitosana com óxido de grafeno (CH/GO); Quitosana com óxido de grafeno e FGF2 (CH/GO/FGF). (A) Tempo inicial (T0), (B) 24 horas (T24), (C) T48, (D) T72, (E) T96, (F) Dados intragrupo. Teste estatístico ANOVA, com pós-teste de Tukey. Valores de $P < 0,05$ indicam significância estatística. Dados expressos em média e desvio padrão, representativos de dois ensaios independentes, um deles em duplicata

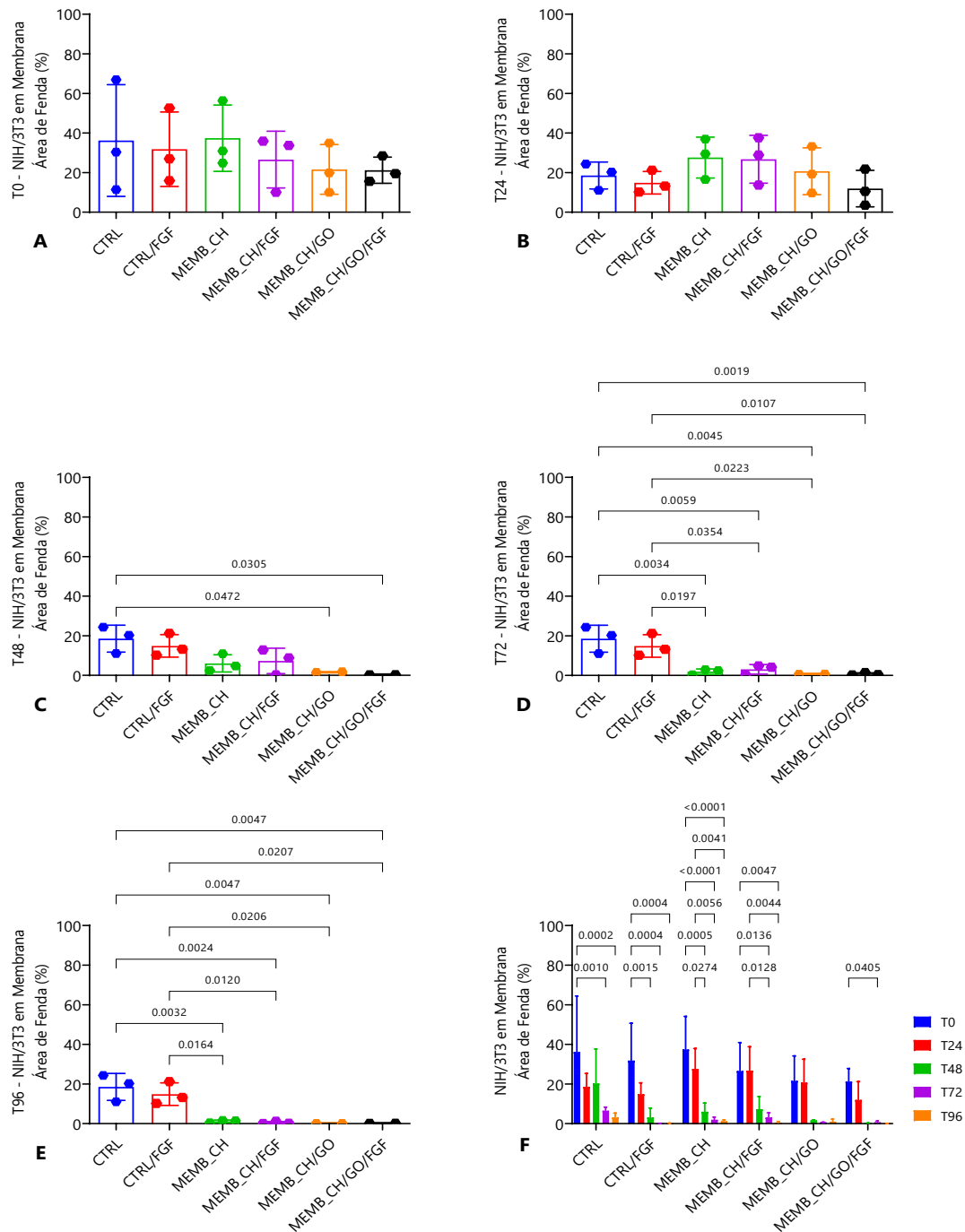


Figura 16M. Migração celular em membrana de quitosana, com ou sem óxido de grafeno e FGF2. Percentual de área de fenda em fibroblastos NIH/3T3, avaliado nos grupos: Controle (CTRL); Controle com FGF2 (CTRL/FGF); Quitosana (CH); Quitosana com FGF2 (CH/FGF); Quitosana com óxido de grafeno (CH/GO); Quitosana com óxido de grafeno e FGF2 (CH/GO/FGF). (A) Tempo inicial (T0), (B) 24 horas (T24), (C) T48, (D) T72, (E) T96, (F) Dados intragrupos. Teste estatístico ANOVA, com pós-teste de Tukey. Valores de $P < 0,05$ indicam significância estatística. Dados expressos em média e desvio padrão, representativos de dois ensaios independentes, um deles em duplicata

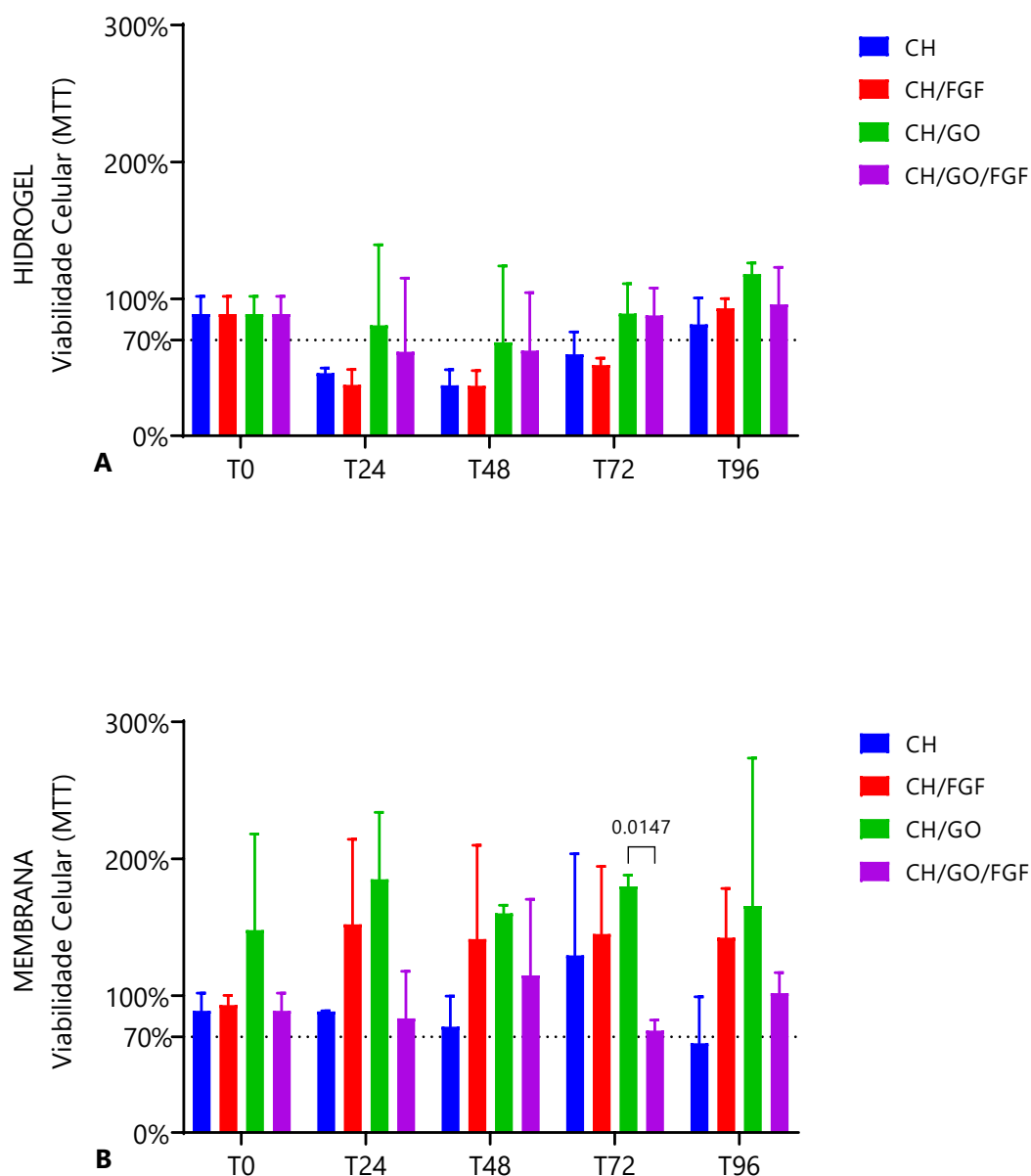


Figura 17M. Percentual de viabilidade celular dos biomateriais de quitosana e/ou óxido de grafeno e FGF2. (A) Hidrogéis e (B) membranas, avaliados entre 0 e 96 horas nos grupos: Quitosana (CH); Quitosana com FGF2 (CH/FGF); Quitosana com óxido de grafeno (CH/GO); Quitosana com óxido de grafeno e FGF2 (CH/GO/FGF). Teste estatístico ANOVA, com pós-teste de Tukey. Valores de $P < 0,05$ indicam significância estatística. Dados expressos em média e desvio padrão, representativos de dois ensaios independentes, em triplicata

TABELAS

Tabela 1M. Análise organoléptica ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Avaliação das características das preparações de hidrogel em função da temperatura, tempo e condições de armazenamento.

Temperatura		Geladeira ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$)		
Tempo	0	10	20	30
CH				
Cor	Amarelo claro	Amarelo claro	Amarelo claro	Amarelo claro
Aspecto	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo
Precipitado	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Turbidez	Translúcido	Translúcido	Translúcido	Translúcido
Odor	Característico	Característico	Característico	Característico
Sabor	Ácido	Ácido	Ácido	Ácido
CH/FGF				
Cor	Amarelo claro	Amarelo claro	Amarelo claro	Amarelo claro
Aspecto	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo
Precipitado	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Turbidez	Translúcido	Translúcido	Translúcido	Translúcido
Odor	Característico	Característico	Característico	Característico
Sabor	Ácido	Ácido	Ácido	Ácido
CH/GO				
Cor	Preto	Preto	Preto	Preto
Aspecto	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo
Precipitado	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Turbidez	Opaco	Opaco	Opaco	Opaco
Odor	Característico	Característico	Característico	Característico
Sabor	Ácido	Ácido	Ácido	Ácido
CH/GO/FGF				
Cor	Preto	Preto	Preto	Preto
Aspecto	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo
Precipitado	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Turbidez	Opaco	Opaco	Opaco	Opaco
Odor	Característico	Característico	Característico	Característico
Sabor	Ácido	Ácido	Ácido	Ácido

Tabela 2M. Análise organoléptica ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Avaliação das características das preparações de hidrogel em função da temperatura, tempo e condições de armazenamento.

Temperatura		Estufa ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$)		
Tempo	0	10	20	30
CH				
Cor	Amarelo claro	Amarelo claro	Amarelo claro	Amarelo claro
Aspecto	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo
Precipitado	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Turbidez	Translúcido	Translúcido	Translúcido	Translúcido
Odor	Característico	Levemente alterado	Levemente alterado	Levemente alterado
	Ácido	Ácido	Ácido	Ácido
CH/FGF				
Cor	Amarelo claro	Amarelo claro	Amarelo claro	Amarelo claro
Aspecto	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo
Precipitado	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Turbidez	Translúcido	Translúcido	Translúcido	Translúcido
Odor	Característico	Levemente alterado	Levemente alterado	Levemente alterado
Sabor	Ácido	Ácido	Ácido	Ácido
CH/GO				
Cor	Preto	Preto	Preto	Preto
Aspecto	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo
Precipitado	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Turbidez	Opaco	Opaco	Opaco	Opaco
Odor	Característico	Levemente alterado	Levemente alterado	Levemente alterado
Sabor	Ácido	Ácido	Ácido	Ácido
CH/GO/FGF				
Cor	Preto	Preto	Preto	Preto
Aspecto	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo
Precipitado	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Turbidez	Opaco	Opaco	Opaco	Opaco
Odor	Característico	Levemente alterado	Levemente alterado	Levemente alterado
Sabor	Ácido	Ácido	Ácido	Ácido

Tabela 3M. Potencial hidrogeniônico de solução tampão utilizada em testes de absorção de líquidos e degradação.

pH	CH	CH/FGF	CH/GO	CH/GO/FGF
24h	7,55	7,60	7,53	7,60
48h	7,61	7,52	7,59	7,53
72h	7,53	7,53	7,50	7,57
96h	7,56	7,45	7,57	7,64

CAPÍTULO IV – CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

O presente estudo concluiu que os compostos bioativos produzidos com quitosana, óxido de grafeno e FGF2 têm potencial terapêutico para tratar lesões de mucosite oral. As membranas de quitosana com óxido de grafeno e FGF2, apresentaram melhor desempenho físico-químico do que as preparações em hidrogel, além de serem menos citotóxicas e mais eficazes na promoção da migração celular. Ambas as formas de apresentação demonstraram propriedades antimicrobianas, especialmente quando adicionado óxido de grafeno.