

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

MILENA COSTA DA SILVA

ARCABOUÇOS QUITOSANA/CURCUMINA COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO
CONTROLADA PARA TRATAMENTO DE CÂNCER DE MAMA

CAMPINA GRANDE - PB

2015

MILENA COSTA DA SILVA

**ARCABOUÇOS QUITOSANA/CURCUMINA COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO
CONTROLADA PARA TRATAMENTO DE CÂNCER DE MAMA**

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

Orientador: Prof. Dr. MARCUS VINICIUS LIA FOOK

Agencia Financiadora: CAPES

CAMPINA GRANDE - PB

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

S586a Silva, Milena Costa da.
Arcabouços quitosana/curcumina como sistema de liberação controlada para tratamento de câncer de mama / Milena Costa da Silva. – Campina Grande, 2015.
181 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2015.

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

1. Arcabouços. 2. Quitosana. 3. Curcumina. 4. Liberação.
5. MCF-7. I. Fook, Marcus Vinicius Lia. II. Título.

CDU 62:677.473(043)

VITAE DO CANDIDATO

- Engenheiro de Materiais pela UFCG (2013).

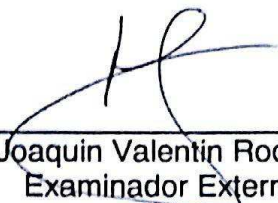
**ARCABOUÇOS QUITOSANA/CURCUMINA COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO
CONTROLADA PARA TRATAMENTO DE CÂNCER DE MAMA**

MILENA COSTA DA SILVA

Dissertação aprovada em 19/08/2015 pela banca examinadora constituída dos seguintes membros:



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



Dr. Joaquin Valentin Rodrigues
Examinador Externo
CAIC



Dr. Aron José Fazin de Andrade
Examinador Externo
CEAC-IDPC-SP

“O temor do Senhor é o princípio da sabedoria...”

(Provérbios 1:7)

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente pelo dom da vida, por estar comigo em todos os momentos me dando força e vigor, me mostrando o caminho certo e por me fazer trilhar esse caminho difícil, porém prazeroso.

A minha família por toda a paciência, por entender meus momentos de ausência e por me encorajar nos momentos de tristeza, por sempre acreditar, me apoiar e orar sempre por meus desejo e anseios.

A minha irmã Mirele, por ser bem mais que uma irmã, uma amiga e por as vezes cuidar de mim como uma mãe. Por seu companheirismo nos momentos tristes e alegres e por todo incentivo, por suas palavras de encorajamento e por sempre ter sido um espelho de lealdade e fidelidade. Ela é o meu orgulho, aquela que sei que sempre posso confiar.

Aos meus pais Joás e Eurice por toda confiança, por todo o cuidado e toda a contribuição financeira educacional a mim dispensada.

Ao meu namorado Nilton Júnior, por sempre acreditar em mim e me incentivar em todos os momentos, por todo o seu apoio emocional e material. Mesmo quando longe sempre acreditava em mim e me impulsionava a enfrentar os novos desafios.

Ao meu orientador, Professor Dr. Marcus Vinicius Lia Fook, pelo exemplo que tem me dado a cada dia como líder, por todo apoio e confiança. Pelas maravilhosas oportunidades a mim confiadas. Pela paciência e dedicação prestada, meu muito obrigado professor.

Ao Pós-Doc. Thiago Fideles, meu imensurável agradecimento por todo apoio, por toda a sua ajuda e contribuição científica, por todas suas correções e observações detalhadas, por acatar as minhas ideias e aperfeiçoá-las, por acreditar em mim e no meu trabalho, meus sinceros agradecimentos.

As minha irmãs-amigas, carinhosamente chamadas de “xuxinhas”, Michele, Thais, Jucélia, Mayeli, Valéria, Bianca, Flávia, Rafaela Menezes, Glória, Greyce, Isabel, Lívia, Rita, Mayrle, Dayanna por todos momentos que passamos juntas, por toda ajuda, por cada palavra de incentivo, por cada dúvida compartilhada, por cada

momento de descontração, por cada abraço e por cada “bom dia”, meu muitíssimo obrigado.

Em especial a Suelem por esta comigo trilhando esses momentos com fidelidade e companheirismo desde da graduação. E a Imarally, por sempre ser solícita comigo. Aos meus colegas Hugo, Willians, Hudson, Ítalo, Sandro, Samuel meu agradecimento pela companhia diária.

Ao João, aluno do professor Romualdo, por toda ajuda dispensada durante a realização dos ensaios de liberação. Meus sinceros agradecimentos.

As minhas duas mães que aqui ganhei, a Paulinha e D. Val, por todo cuidado a mim prestado e por todo abraço carinhoso recebido diariamente.

A todo o pessoal no NGI, em especial a Josilene, Toninho, Rosita, Pedro, Tânia. Meus agradecimentos também muito especial a Sr. Sérgio.

Aos professores Dr. Hugo Miguel Lisboa Oliveira, Dr. Raúl Garcia Carrodegua e Dr. Rômulo Navarro pela contribuição científica, pelas correções e ajuda.

Ao Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO) pela oportunidade e estrutura concedida, que foram essenciais para a execução deste trabalho.

A todos os Docentes do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande.

Aos funcionários da coordenação de Pós graduação em Ciências e Engenharia de Materiais, a Márcia e André por toda ajuda e paciência para resolver todas documentações.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo suporte financeiro.

RESUMO

A curcumina é um fármaco natural que apresenta propriedades medicinais dentre elas destaca-se a propriedade antineoplásica, nesta pesquisa a curcumina tem sido associada com a quitosana com a função de portador eficaz para a preparação de formulações na liberação de fármaco. Portanto o objetivo deste trabalho foi desenvolver arcabouços de quitosana/curcumina, pelo método de agregação de esferas, através da solução de gelatina (5%) com e sem reticulação. O fármaco foi incorporado na quitosana empregando a técnica de reação de soluções e adsorção. As esferas foram caracterizadas por Espectroscopia na Região Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Difração de Raios X (DRX), Microscopia Ótica (MO), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Termogravimetria (TG), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Grau de Intumescimento (GI). E os arcabouços por MO, MEV, Porosidade por três diferentes métodos, propriedade mecânica de resistência a compressão e GI, também foram realizadas a validação do método analítico e a liberação da curcumina por UV/VIS, modelos matemáticos de cinética de liberação também foram aplicados, seguido dos ensaios de citotoxicidade com linha celular de fibroblastos (L929) e câncer de mama (MCF-7). As análises morfológicas de MO e MEV mostraram a presença do fármaco no interior das esferas, e nos arcabouços a adesão das esferas a partir da gelatina. Por FTIR sugeriu-se a interação da quitosana com a curcumina. Os resultados de DRX e TG mostraram que a presença do fármaco na matriz de quitosana, não alterou de forma significativa a cristalinidade e nem a estabilidade térmica do material, respectivamente. Por DSC verificou-se na amostra quitosana/curcumina, o desaparecimento do pico de fusão da curcumina. Constatou-se ainda que os arcabouços obtidos com gelatina reticulada apresentaram menor absorção de água no ensaio de GI, menor tamanho de poros e menor porosidade, como também um perfil prolongado de liberação de fármaco. A partir do ensaio de compressão observou-se que todos os sistemas apresentaram valores semelhantes de resistência a compressão do tecido adiposo humano. Na análise dos modelos matemáticos observou-se que os modelos de Korsmeyer-Peppas e de Higuchi foram os que mais adequaram aos sistemas e pelos resultados de citotoxicidade com a linha celular L929 verificou-se que os arcabouços não apresentaram toxicidade, já a amostra quitosana/curcumina(adsorção)-reticulada, apresentou perfil tóxico para a linha celular MCF-7. Dessa forma, constatou-se que o arcabouço de quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada é promissor para o estudo em tratamento de câncer de mama, por apresentar, estrutura, tamanho de poro e perfil de liberação adequada para o tratamento, como também maior toxicidade nas células cancerígenas MCF-7.

Palavras-chave: Arcabouços. Quitosana. Curcumina. Liberação. MCF-7.

ABSTRACT

Curcumin is a natural drug that has medicinal properties, among which are the anti-cancer property, thus, in this research, curcumin has been studied associated with chitosan that is an effective carrier for the preparation of formulations of drug delivery. Therefore the aim of this study was to develop scaffolds of chitosan/curcumin, by the ball aggregation method through gelatin solution (5%) with and without crosslinking. The drug was incorporated in chitosan employing the solutions reaction technique and adsorption. The beads were characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD), Optical Microscopy (OM), Scanning Electron Microscopy (SEM), Thermogravimetry (TG), Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Degree of Swelling (DS). And the scaffolds by OM, SEM, porosity by three different methods, mechanical properties by Compressive Strength and DS. The validation of the analytical method and the release of curcumin by UV / VIS were carried out, mathematical models of release kinetics were also applied, followed by cytotoxicity tests with fibroblast cell line (L929) and breast cancer (MCF-7). Morphological analysis of OM and SEM showed the presence of the drug inside the spheres, and in the scaffolds, the adhesion of the spheres from the gelatin. From the FTIR technique it was noticed the probable interaction of chitosan with curcumin. The results of XRD and TG showed that the drug present in the chitosan matrix did not significantly change neither the crystallinity nor the thermal stability of the material, respectively. By DSC, it was found in the chitosan / curcumin sample, the disappearance of the melting peak of curcumin. It was also found that the scaffolds obtained from cross-linked gelatin had lower water absorption in the GI assay, smaller pore size and lower porosity as well as an extended drug release profile. From the compression test it was observed that all systems had similar amounts of adipose tissue compression strength. Analyzing the mathematical models, it was observed that the Korsmeyer-Peppas and Higuchi models were the ones best adapted to most systems, and from the cytotoxicity results with the L929 cell line it was found that the scaffolds did not show toxicity, while the chitosan / curcumin (adsorption)-crosslinked sample showed toxicity profile for the cell line MCF-7. Thus, it was found that the chitosan / curcumin (adsorption) - crosslinked scaffolds is promising for the study in treating breast cancer, because it presented structure, pore size and adequate release profile for the treatment, as well as greater toxicity in cancer cells MCF-7

Keywords: Scaffolds. Chitosan. Curcumin. Release. MCF-7.

PUBLICAÇÕES

Periódicos

SILVA, M. C.; FIDELES, T. B.; FOOK, M.V.L. Esferas de Quitosana e Quitosana/Curcumina pelo Método de Gelificação Ionotrópica: Influência da Incorporação do Fármaco. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**. v. 10, p. 21-28, 2015.

SILVA, M. C.; FIDELES, T. B.; OLIVEIRA, S. S. L. and FOOK, M.V.L. Development and Characterization of Scaffolds Obtained by Aggregation of Balls of Chitosan and Chitosan/Curcumin. **Journal of Chitin and Chitosan Science**. v. 3, p.1-8, 2015.

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

SILVA, M. C.; OLIVEIRA, S. S. L.; LEITE, M. D. R.; FIDELES, T. B.; FOOK, M. V. L. **Análise das propriedades térmicas e mecânica de estruturas tridimensionais de quitosana com a inclusão do fármaco Curcumina**. In: 21 Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2014, Cuiabá.

SILVA, M. C.; OLIVEIRA, S. S. L.; GUIMARAES, P. Q.; FIDELES, T. B.; FOOK, M. V. L. **Avaliação do Comportamento Morfológico de esferas e do pó de quitosana/curcumina, na presença do solvente**. In: 21 Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2014, Cuiabá.

SILVA, M. C.; BARBOSA, W. T.; FIDELES, T. B.; OLIVEIRA, S. L.; FOOK, M. V. L. **Avaliação da Porosidade em Scaffolds de Quitosana com Fármaco Curcumina**. 4ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais, 2015, Paraíba.

SILVA, M. C.; OLIVEIRA, S. L.; LEITE, M. R; FIDELES, T. B.; FOOK, M. V. L.; **Avaliação da adsorção do fármaco curcumina em esferas de quitosana**. 4ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais, 2015, Paraíba.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Fisiologia da mama.....	25
Figura 2 - Esquema representativo do processo de carcinogênese ou oncogênese.	28
Figura 3 - Esquema da trajetória da liberação de fármacos e da descoberta de novos compostos terapêuticos	30
Figura 4 - Ilustração da (a) Planta Curcuma longa (b) da Curcumina em pó, (c) e do corte recente do rizoma.....	33
Figura 5 - Estrutura química dos curcuminóides (Curcumina, Demetoxicurcumina e Bis- demetoxicurcumina).....	34
Figura 6 - Áreas de pesquisas com a curcumina	37
Figura 7- Perfis plasmáticos em diferentes condições de administração.	43
Figura 8 - Mecanismo de difusão a partir de um (a) reservatório, (b) e de uma matriz, (c) no mecanismo por ação química ou pela clivagem do fármaco de uma estrutura de polímero e (d) degradação do polímero por hidrólise, em mecanismos ativados pelo solvente (e) pressão osmótica (f) absorção de água.....	47
Figura 9 - Equações de fluxo unidimensional (a) retangular, (b) cilíndrica e (c) esférica	50
Figura 10 - Estrutura química da quitosana	55
Figura 11 - Reação da produção da quitosana a partir da quitina.....	57
Figura 12 - Célula unitária ortorrômbica da quitosana.....	58
Figura 13 - Fluxograma dos arcabouços de quitosana e quitosana/ curcumina.	69
Figura 14 - Fluxograma dos arcabouços quitosana/curcumina (adsorção).....	70
Figura 15 - Processo de obtenção da solução de quitosana/curcumina, (Figura 15 (a)) solução de curcumina, (Figura 15 (b)) solução de quitosana e (Figura 15 (c)) solução de quitosana/curcumina.	71
Figura 16 - Solução de gelatina com genipina.	73
Figura 17 - Esquema representativo da produção dos arcabouços quitosana e quitosana/curcumina.	74
Figura 18 - Esquema representativo da produção dos arcabouços quitosana/ curcumina (adsorção), pelo método de adsorção.	75

Figura 19 - Curva de tensão-deformação de compressão de um sólido celular (Ashby, 2006).	80
Figura 20 - Imagens obtidas por microscopia ótica das (a) esferas de quitosana aumento de 60x e (b) quitosana/curcumina aumento de 60x.	84
Figura 21 - Imagens obtidas por microscopia ótica da seção transversal das (a) esferas de quitosana aumento de 100x e (b) quitosana/curcumina aumento de 100x.	85
Figura 22 - Imagens obtidas por microscopia ótica referente a região externa (a) esferas de quitosana/curcumina (adsorção) aumento de 60x e (b) com aumento de 350x.	86
Figura 23 - Imagens obtidas por microscopia ótica referente a região interna das esferas de quitosana/curcumina (adsorção) (a) com aumento de 100x e (b) com aumento de 350x.	86
Figura 24 - Imagens obtidas por microscopia ótica (a) do pó de quitosana/curcumina(adsorção), com aumento de 700x, e (b) imagem da esfera de quitosana/curcumina(adsorção) na presença do solvente (metanol), com aumento de 350x.	87
Figura 25 - Micrografias do pó da curcumina. (a) aumento de 100x e (b) aumento de 10000X.	88
Figura 26 - Micrografias (a) da esfera de quitosana (aumento de 120x), (b) superfície da esfera de quitosana (aumento de 1000X), (c) da esfera de quitosana/curcumina (aumento de 120x), (d) superfície da esfera de quitosana/curcumina (aumento de 1000X), (e) da esfera de quitosana/curcumina (adsorção) (aumento de 130x), (f) superfície da esfera de quitosana/curcumina (adsorção) (aumento de 1000x), e (g) parte interna da esfera de quitosana/curcumina (adsorção) (aumento de 10000x).	90
Figura 27 - FTIR da (a) quitosana em pó, (b) esfera quitosana, (c) curcumina em pó (d) esfera quitosana/curcumina e do (e) esfera quitosana/curcumina (adsorção).	92
Figura 28 - Difratoograma da (a) quitosana em pó, (b) esferas quitosana, (c) curcumina em pó, do (d) sulfato de sódio em pó, do (e) esfera de quitosana/curcumina e da (f) esfera de quitosana/curcumina (adsorção).	96
Figura 29 - Curva TG da quitosana em pó, da esfera de quitosana, da curcumina em pó, da esfera quitosana/curcumina e da esfera quitosana/curcumina (adsorção).	98
Figura 30 - Termograma da quitosana em pó, da esfera de quitosana, da curcumina em pó, esfera de quitosana/curcumina, sulfato de sódio em pó e esfera de quitosana/curcumina (adsorção).	103

Figura 31 - Perfil de absorção de PBS nas esferas de quitosana e quitosana/curcumina, quitosana/curcumina (adsorção).	106
Figura 32 - Imagens obtidas por microscopia ótica da região externa dos arcabouços com aumento de 40X de (a) quitosana, (b) quitosana reticulada, (c) quitosana/curcumina, (d) quitosana/curcumina-reticulada, (e) quitosana /curcumina (adsorção) e (f) quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada.	108
Figura 33 - Imagens obtidas por microscopia ótica da região interna dos arcabouços com aumento de 40x (a) de quitosana, (b) quitosana reticulada, (c) quitosana/curcumina, (d) quitosana/curcumina-reticulada, (e) quitosana/ curcumina (adsorção) e (f) quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada.	110
Figura 34 - Micrografias da seção transversal dos arcabouços de (a) quitosana (aumento de 100x), (b) (aumento de 300X), (c) da parte externa do arcabouço de quitosana (aumento de 60X) e (d) da região de interligação das esferas de quitosana (aumento de 400X).....	111
Figura 35 - Micrografias da seção transversal dos arcabouços de (a) quitosana-reticulada (aumento de 120x), (b) (aumento de 300X), (c) da parte externa do arcabouço de quitosana-reticulada (aumento de 130X) e (d) da região de interligação das esferas de quitosana- reticulada (aumento de 300X).	112
Figura 36 - Micrografias da seção transversal dos arcabouços de (a) quitosana/curcumina (aumento de 100x), (b) (aumento de 120X), (c) da parte externa do arcabouço de quitosana/curcumina (aumento de 40X) e (d) da região de interligação das esferas de quitosana/ curcumina (aumento de 300X).	113
Figura 37 - Micrografias da seção transversal dos arcabouços de (a) quitosana/curcumina-reticulada (aumento de 120x), (b) (aumento de 300X), (c) da parte externa do arcabouço de quitosana/curcumina- reticulada (aumento de 125X) da região de interligação das esferas de quitosana/curcumina- reticulada (aumento de 300X).....	114
Figura 38 - Micrografias da seção transversal dos arcabouços de (a) quitosana/curcumina (adsorção) (aumento de 120x), (b) (aumento de 300X), (c) da parte externa do arcabouço de quitosana/curcumina (adsorção) (aumento de 120X) e (d) da região de interligação das esferas de quitosana/curcumina (adsorção) (aumento de 300X).....	115
Figura 39 - Micrografias da seção transversal dos arcabouços de (a) quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada (aumento de 120x), (b) (aumento de	

300X), (c) da parte externa do arcabouço de quitosana/curcumina(adsorção)-reticulada (aumento de 125x) e (d) da região de interligação das esferas de quitosana/curcumina-reticulada (aumento de 300x).....	116
Figura 40 - Gráfico das porcentagens de tamanhos de poros por MEV, dos arcabouços de quitosana, quitosana-reticulada, quitosana/curcumina, quitosana/curcumina-reticulada, quitosana/curcumina (adsorção) e quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada.	117
Figura 41 - Porosidade obtidas pelos métodos 1, 2 e 3 para os arcabouços de quitosana, quitosana-reticulada, quitosana/curcumina, quitosana/curcumina-reticulada, quitosana/curcumina (adsorção) e quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada.....	119
Figura 42 - Curvas de intumescimento para os arcabouços de quitosana, quitosana -reticulada, quitosana/curcumina, quitosana/curcumina-reticulada, quitosana/curcumina (adsorção) e quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada.....	120
Figura 43 - Gráfico da deformação máxima dos arcabouços de quitosana, quitosana-reticulada, quitosana/curcumina, quitosana/curcumina-reticulada, quitosana/curcumina (adsorção) e quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada.....	123
Figura 44 - Gráfico da Tensão máxima dos arcabouços de quitosana, quitosana reticulada, quitosana/curcumina, quitosana/curcumina-reticulada, quitosana/curcumina (adsorção) e quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada.....	123
Figura 45 - Gráfico Tensão x Deformação do arcabouço de quitosana.	124
Figura 46 - Gráfico Tensão x Deformação do arcabouço de quitosana-reticulada..	125
Figura 47 - Gráfico Tensão x Deformação do arcabouço de quitosana/curcumina.	125
Figura 48 - Gráfico Tensão x Deformação do arcabouço de quitosana/curcumina reticulado.....	126
Figura 49 - Gráfico Tensão x Deformação do arcabouço de quitosana/curcumina (adsorção).....	126
Figura 50 - Gráfico Tensão x Deformação do arcabouço de quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada.	127
Figura 51 - Gráfico do Módulo de Elasticidade dos arcabouços de quitosana, quitosana reticulada, quitosana/curcumina, quitosana/curcumina-reticulada, quitosana/curcumina (adsorção) e quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada.....	129

Figura 52 - Espectro da solução de curcumina (5µg/mL), apresentando a absorção máxima em 422nm.....	130
Figura 53 - Espectro de emissão (a) amostra do arcabouço com o fármaco, a quitosana e o reticulante, (b) da solução padrão de curcumina 4µg/mL.	131
Figura 54 - Curva de calibração da curcumina em metanol, obtida pelo método espectrofotométrico UV/VIS.	132
Figura 55 - Gráfico do perfil de liberação dos arcabouços de quitosana/curcumina, quitosana/curcumina-reticulada, quitosana/curcumina (adsorção), quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada obtidas por um espectrofotômetro UV/Vis.....	136
Figura 56 - Gráfico de avaliação citológica com células L929, dos arcabouços de quitosana, quitosana reticulada, quitosana/curcumina, quitosana/curcumina-reticulada, quitosana/curcumina (adsorção) e quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada.....	142
Figura 57 - Gráfico de avaliação citológica com células MCF-7, dos arcabouços de quitosana, quitosana reticulada, quitosana/curcumina, quitosana/curcumina-reticulada, quitosana/curcumina (adsorção) e quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada.....	144

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Utilização de plantas em alguns tipos de câncer.	32
Tabela 2 - Melhoria das propriedades da curcumina proporcionada pelo emprego de sistemas de liberação.....	36
Tabela 3 - Vantagens dos sistemas de liberação controlada de fármacos.	44
Tabela 4 - Equações de fluxo unidimensional de diferentes geometrias.....	51
Tabela 5 - Expoente “n” do modelo de Korsmeyer-Peppas e os mecanismos de liberação de fármacos de diferentes geometrias.....	53
Tabela 6 - Valores da perda de massa referentes aos eventos de decomposição para a quitosana em pó, esfera de quitosana, curcumina em pó, da esfera quitosana/curcumina e da esfera de quitosana/curcumina (adsorção).	101
Tabela 7 - Valores para verificação da exatidão do método.....	133
Tabela 8 - Valores para a verificação da precisão (repetibilidade).....	134
Tabela 9 - Valores para a verificação da precisão (precisão intermediária).	134
Tabela 10 - Valores para a verificação da robustez do método.	135
Tabela 11 - Valores das constantes e do coeficiente de correlação para as equações de Higuchi, Korsmeyer-Peppas e equação de Ordem Zero.....	139

ÍNDICE DE EQUAÇÕES

Equação 1- Cálculo da Biodisponibilidade.	35
Equação 2- Cálculo da Exatidão.	40
Equação 3- Cálculo de Precisão.	41
Equação 4- Cálculo Limite de Detecção.	41
Equação 5- Cálculo Limite de Quantificação.	41
Equação 6- Cálculo Primeira Lei de Fick.	49
Equação 7- Cálculo Segunda Lei de Fick.	50
Equação 8- Cálculo modelo cinética de Ordem Zero	51
Equação 9- Cálculo do modelo de Higuchi	52
Equação 10- Cálculo do modelo da Lei de Potência.	52
Equação 11- Cálculo do modelo de Peppas & Sahlin	53
Equação 12- Cálculo da Porosidade Modelo I.	78
Equação 13- Cálculo da Porosidade Modelo II.	78
Equação 14- Cálculo da Porosidade Modelo III.	78
Equação 15- Cálculo do Grau de Intumescimento.	80

SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

μm - Microméetro

ρ - Densidade

a.C - Antes de Cristo

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASTM - American Society for Testing and Materials

CERTBIO - Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste

CMD - Concentração Média Determinada

Da - Dalton (unidade de massa atômica)

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DP - Desvio Padrão

DPR - Desvio Padrão Relativo

DRX - Difração de Raio - X

DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial

E - Módulo de Elasticidade

FTIR - Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier

GI - Grau de Intumescimento

IC - Coeficientes Angulares

INCA - Instituto Nacional de Câncer

ISO - International Organization for Standardization

LD - Limite Detecção

LQ - Limite Quantificação

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MCF-7 - Linha celular de câncer de mama humano

MO - Microscopia Ótica

MPa - Mega Pascal

MTT- Brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS - Tampão de Fosfato Salino

PCL - Poli caprolactona

PEG - Poli (etileno glicol)

Ph - Potencial Hidrogeniônico

PLA - Poli ácido láctico

PLGA - Poli (láctido-co-glicólido)

PU - Poliuretano

r - Coeficiente de Correlação

r² - Coeficiente de Determinação

RE – Resolução Anvisa

TG - Termogravimetria

TPP - Tripolifosfato de Sódio

UFCG - Universidade Federal de Campina Grande

UV-Vis - Espectroscopia UV/visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1	Mama	25
2.1.1	Propriedade Mecânica da Mama	27
2.2	Câncer.....	27
2.2.1	Câncer de Mama	29
2.2.2	Fármacos Naturais Anticancerígenos.....	30
2.3	Curcumina.....	33
2.4	Validação de Métodos Analíticos	39
2.4.1	Seletividade e Especificidade	40
2.4.2	Linearidade e Intervalo	40
2.4.3	Exatidão.....	40
2.4.4	Precisão.....	40
2.4.5	Robustez	41
2.4.6	Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	41
2.5	Liberação Controlada de Fármacos	42
2.5.1	Sistema de Liberação Controlada de Fármacos.....	45
2.5.2	Modelos Matemáticos utilizados na Liberação Controlada de Fármacos.....	49
2.6	Polímeros Biodegradáveis	54
2.6.1	Quitosana	55
2.6.2	Esferas de Quitosana	60
2.6.3	Coacervação (Separação de fases)	62
2.6.4	Técnica de evaporação/extração de solventes.....	62
2.6.5	Secagem por pulverização (Spray drying).....	62
2.6.6	Reticulação por Emulsão.....	63
2.6.7	Geleificação Ionotrópica	63

2.7	Arcabouços	64
2.7.1	Estrutura Tridimensional dos Arcabouços	65
2.7.2	Técnicas de Fabricação dos Arcabouços	66
2.7.3	Método de Agregação de Partícula	66
3	MATERIAIS E MÉTODOS	68
3.1	Materiais.....	68
3.2	Metodologia.....	69
3.2.1	Preparação da solução de quitosana	71
3.2.2	Preparação da solução de quitosana/curcumina.....	71
3.2.3	Preparação das esferas de quitosana e quitosana/curcumina.....	72
3.2.4	Preparação das esferas de quitosana/curcumina obtidas pelo método de adsorção.....	72
3.2.5	Preparação da solução de gelatina	72
3.2.6	Preparação da solução de gelatina reticulada.....	73
3.2.7	Preparação dos arcabouços.....	73
3.2.8	Normas Utilizadas.....	76
3.2.9	Caracterizações Realizadas	77
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
4.1	Resultados das Esferas	84
4.1.1	Microscopia Ótica	84
4.1.2	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	88
4.1.3	Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier.....	91
4.1.4	Difração de raios X - DRX	95
4.1.5	Análise Termogravimétrica	98
4.2	Calorimetria Exploratória Diferencial	102
4.2.1	Grau de Intumescimento	105
4.3	Resultados dos Arcabouços.....	107

4.3.1	Microscopia Ótica	107
4.3.2	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	111
4.4	Porosidade	118
4.5	Grau de Intumescimento	120
4.6	Ensaio de Resistência a Compressão.....	122
4.7	Validação do Método Analítico para a Quantificação da Curcumina.....	130
4.7.1	Determinação do Comprimento de onda da Curcumina.....	130
4.7.2	Especificidade e Seletividade	131
4.7.3	Linearidade e Intervalo	131
4.7.4	Exatidão.....	132
4.7.5	Precisão.....	133
4.7.6	Robustez	134
4.7.7	Limite de Quantificação	135
4.7.8	Limite de Detecção	135
4.8	Liberação da curcumina a partir dos arcabouços de quitosana.	136
4.9	Cinética de Liberação.....	139
4.9.1	Modelo de Korsmeyer-Peppas	140
4.9.2	Modelo de Higuchi.....	141
4.9.3	Modelo de Ordem zero	141
4.10	Citotoxicidade.....	141
5	CONCLUSÃO	145
6	SUGESTOES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	147
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	148
	APÊNDICE.....	170

1 INTRODUÇÃO

A necessidade da recuperação do tecido humano ocorre devido à perda ou debilidade de um órgão ou tecido, causado por doenças genéticas ou acidentes. A área da saúde apresenta problemas no que se refere à doação de tecidos e órgãos, devido ao déficit de doadores de tecidos e a repulsão imunológica entre doadores e receptores e ainda a limitação por auto enxerto e/ou impossibilidade funcional. Com o objetivo de atenuar esse problema, pesquisas na área de Engenharia de Tecidos combinam as propriedades dos materiais, os princípios de adesão e proliferação de células *in vitro* em um biomaterial adequado como os arcabouços, com a finalidade de permitir o crescimento tecidual. Dependendo do local e do tipo de tecido a ser reparado (osso, cartilagem ou tecido mole), estas estruturas são fabricadas satisfazendo requisitos específicos, em relação as propriedades mecânicas, porosidade entre outros (UPADHYAYA et al., 2014; SOUSA et al., 2013; FURTH & ATALA, 2014; JIANG et al., 2014). Segundo Biondi et al. (2008) e Dorj et al. (2014), o potencial regenerativo nos arcabouços pode ser melhorado pela utilização de sistemas de liberação controlada de fármaco, pois o carregamento de moléculas terapêuticas nas estruturas tridimensionais proporciona o crescimento do tecido ao mesmo tempo que trata a região. Neste contexto, tem-se utilizado como componente bioativo, a curcumina, que é encontrada em vários tipos de ervas especialmente no açafrão, apresentando propriedades interessantes dentre elas anti-inflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes, de cicatrização, proteção de lesões hepáticas e principalmente antineoplásicas. Devido ao crescente número de casos de câncer, tem-se um aumento nas pesquisas referente ao tratamento de neoplasias englobando os diversos tipos de materiais, fármacos e técnicas utilizadas que melhorem a disponibilidade dos fármacos no organismo do paciente. A partir de então, estudos vêm sendo desenvolvidos no que se refere ao sistema de liberação controlada de fármaco, pois neste sistema o fármaco é disponibilizado no organismo em uma taxa predeterminada, a liberação pode ser prolongada reduzindo a frequência das dosagens como também dos efeitos colaterais. De acordo com estudos realizados em animais e seres humanos mesmo em dosagens elevadas a curcumina é segura e eficaz no tratamento de algumas doenças mortais incluindo o câncer, porém o seu

potencial terapêutico é dificultado pela sua fraca solubilidade em água, má absorção e metabolismo rápido.

Diante disto, alternativas vem sendo pesquisadas para diminuir essas limitações, dentre elas tem-se a utilização deste fármaco com microesferas poliméricas, e como matriz polimérica tem-se a quitosana que é um biomaterial utilizado na preparação de arcabouços por apresentar propriedades biológicas que incluem a biocompatibilidade, biodegradabilidade e a mucoadesividade (POPAT et al., 2014; LI & ZHANG, 2014; ZHANG et al., 2013). Portanto, nesta pesquisa a curcumina tem sido estudada associada com a quitosana, com a função de portador eficaz para a preparação de sistemas para a liberação controlada de fármaco.

Contudo o principal objetivo deste trabalho é desenvolver arcabouços de quitosana com o fármaco curcumina, como sistema de liberação controlada. Onde os arcabouços serão obtidos com a finalidade de serem implantados na mama após a mastectomia, onde o fármaco será liberado de maneira controlada tratando a região, ao mesmo tempo que o tecido irá crescer sobre o arcabouço. Para este fim os arcabouços de quitosana/curcumina serão obtidos pelo método de agregação de esferas. Serão avaliadas a incorporação e a interação entre a quitosana e a curcumina, bem como a relação morfológica dos arcabouços com as propriedades estudadas, na perspectiva do efeito do fármaco. O comportamento da cinética de liberação dos arcabouços será avaliado a partir da liberação "*in vitro*" e de modelos matemáticos. E o potencial citológico dos arcabouços serão analisados frente a linha celular L929 e MCF-7 (câncer de mama).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Mama

A complexidade da fisiologia da mama (Figura 1), deve ser considerada quando se investiga estratégias relacionadas a engenharia do tecido mamário. A mama localiza-se no topo dos músculos grande peitoral, na parte superior da caixa torácica, composta por tecido adiposo e glandular, apresentando uma forma cônica ou pendular, variando de acordo com as características biológicas corporais e com a idade da pessoa. Apresentam também vasos sanguíneos, linfáticos e elementos nervosos. A circulação arterial é proveniente da artéria torácica interna e das artérias intercostais posteriores. Na região central tem-se a aréola e a papila, onde localizam-se internamente 15 a 20 orifícios ductais, que os levam até os lobos mamários, de forma que cada um tem a sua via de drenagem. Ainda na parte interna da mama tem-se os ligamentos de Cooper, que são expansões fibrosas que se projetam na glândula mamária, responsáveis pela retração cutânea nos casos de câncer de mama (LANZA et al. 2014; ZAEIMDAR, 2014).

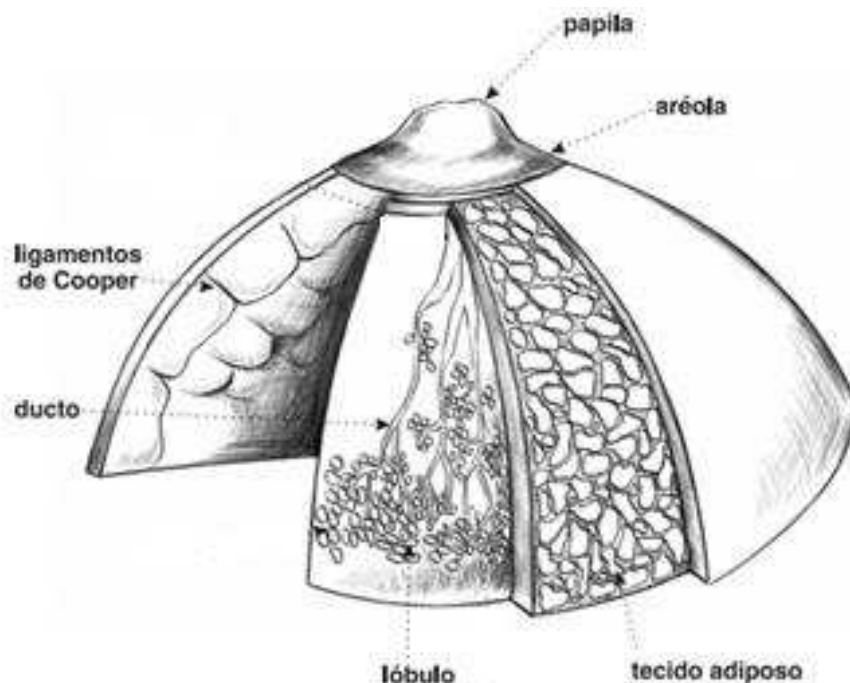


Figura 1 - Fisiologia da mama (INCA, 2002).

O tecido adiposo rodeia a glândula mamária em forma de cone, separando a camada superficial e a pele, com uma espessura de 0,5-2,5 cm. O tecido conjuntivo dentro do seio rodeia as glândulas mamárias (lóbulos e ductos) e forma os ligamentos da mama em determinadas áreas, a fim de apoiar a estabilidade estrutural da mama. O tamanho e forma da mama é determinado pela pele e o tecido adiposo presente em torno dos tecidos conjuntivos e glandulares. O seio é conectado a pele através de ligamentos, que fornecem suporte adicional e contribui para a forma da mama (LANZA et al.2014; ZAEIMDAR, 2014).

Várias mudanças ocorrem na mama quando a mulher passa pela puberdade e menopausa. Durante a puberdade, os hormônios liberados fazem com que o tecido pare de crescer, formando estruturas ductais maduras. Durante a menopausa, quando os hormônios não são mais produzidos pelos ovários, a diminuição da mama ocorre devido aos lóbulos encolherem. O seio da mulher é tipicamente mais denso antes da menopausa (LANZA et al. 2014).

Contudo, intervenções como a mastectomia total ou parcial, é um procedimento cirúrgico que remove o elemento de volume da mama obliterando o contorno feminino. Uma das técnicas utilizadas para solucionar o problema da mama ausente após mastectomia seria um método que restaurasse ou adicionasse um certo volume de tecido mole para o peito, sem morte local ou riscos associados com implantes. O tecido adiposo é o tecido mais adequado para ser utilizado nesta função, não só porque ele permanece com a principal fração do volume removido, mas é também o mais compatível com os outros tecidos (SHENAQ & YUKSEL, 2002).

Segundo Beahm et al. 2003, o tamanho de poro ideal para crescimento interno celular varia com o tipo de tecido, de 5 a 15 mm melhora o crescimento interno de fibroblastos. Os arcabouços devem também demonstrar as propriedades mecânicas favoráveis, a resistência mecânica deve ser adequada para os tecidos que está sendo projetado.

2.1.1 Propriedade Mecânica da Mama

Tecidos moles, incluindo o tecido mamário pode ser assumido como material incompressível durante a compactação, sendo mais que 70% do tecido é mole, como resultado o volume que permanece é praticamente constante quando comprimido (ZAEIMDAR, 2014). Além disso, a complexidade real do tecido mamário (anisotropia, falta de homogeneidade, o número e a distribuição dos ligamentos) dificulta o cálculo com precisão das propriedades do tecido mamário de um paciente (AZAR et al. 2002).

De acordo Lanza et al. 2014, a criação de uma mama funcional com capacidade de lactação não é necessária, de fato pode ter-se o risco de câncer de mama em uma mulher, através da introdução de células epiteliais mamárias que podem ser predispostas ao desenvolvimento de câncer. O principal objetivo, imediato da reconstrução da mama é produzir uma massa de mama com todas as propriedades estéticas de uma mama normal.

Azar et al. 2002, elaborou um modelo de mama deformável, capaz de prever razoavelmente as deformações internas de uma verdadeira mama.

2.2 Câncer

A palavra câncer é originada do grego karkínos, e significa, em uma tradução literal, caranguejo. Ela foi utilizada pela primeira vez por Hipócrates, o pai da medicina, que viveu entre 460 e 377 a.C. O câncer não é uma doença nova, há relatos de ter sido detectado em múmias egípcias, o que comprova que ele já comprometia o homem há mais de 3 mil anos antes de Cristo (ALMEIDA et al., 2005; ABC DO CÂNCER, 2011).

O processo de formação do câncer é chamado de carcinogênese ou oncogênese (Figura 2). Em geral, acontece lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerígena se prolifere, passando por vários estágios antes de chegar a um tumor identificável (ABC DO CÂNCER, 2011).

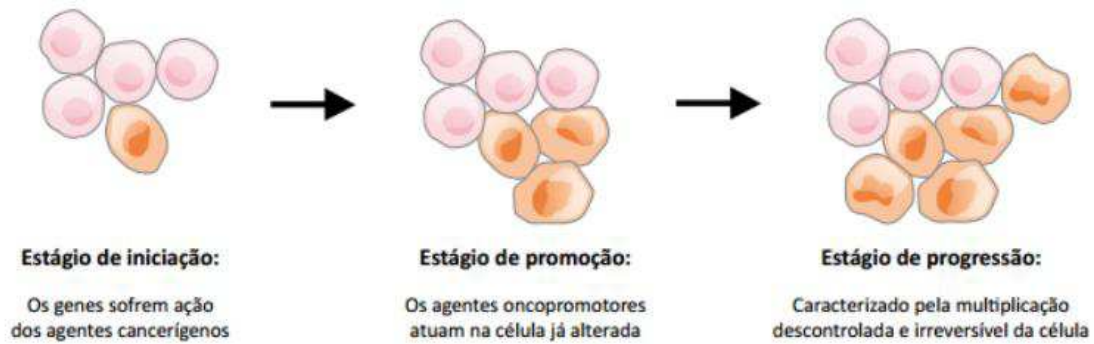


Figura 2 - Esquema representativo do processo de carcinogênese ou oncogênese (ABC do Câncer, 2011).

Conforme apresentado da Figura 2, o estágio de iniciação é o primeiro estágio da carcinogênese. Nele, as células sofrem o efeito de um agente carcinogênico (agente oncoiniciador) que provoca modificações em alguns de seus genes. Nesta fase, as células encontram-se geneticamente alteradas, porém ainda não é possível detectar um tumor clinicamente. No estágio de promoção, as células geneticamente alteradas sofrem o efeito dos agentes cancerígenos classificados como oncopromotores. A célula iniciada é transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual, para que ocorra essa transformação é necessário um longo e contínuo contato com o agente cancerígeno promotor. A suspensão do contato muitas vezes interrompe o processo nesse estágio. Já o estágio de progressão, que é o terceiro e último estágio, caracteriza-se pela multiplicação descontrolada, sendo um processo irreversível. Neste último estágio, o câncer já está acomodado, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença (ALMEIDA et al., 2005; SALES, 2012).

O câncer advém de um processo patológico que se inicia quando uma célula anormal é transformada por mutação genética do ácido desoxirribonucleico (DNA) celular. A célula anormal forma um clone que começa a se proliferar e disseminar, processo denominado metástase. As células cancerígenas são geralmente, menos especializadas nas suas funções que suas correspondentes normais (ALMEIDA et al., 2005; SALES, 2012).

2.2.1 Câncer de Mama

De acordo com dados do Ministério da Saúde de 2014, o câncer é a segunda causa de óbitos no país, com tendência de crescimento nos próximos anos, o câncer de mama é o tipo de câncer que mais acomete as mulheres em todo o mundo, sendo também a maior causa de morte por câncer nas mulheres em todo o mundo. No Brasil, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados (ABC DO CÂNCER, 2011; INCA, 2014a).

Este tipo de câncer é relativamente raro antes dos 35 anos e acima desta faixa etária sua incidência cresce de forma rápida. Estatísticas indicam o aumento de sua incidência tanto nos países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), nas décadas de 60 e 70 registrou-se um aumento de 10 vezes nas taxas de incidência ajustadas por idade nos Registros de Câncer de Base Populacional de diversos continentes (INCA, 2014a).

O câncer de mama quando descoberto em sua fase inicial tem grande possibilidade de cura, com baixa morbidade decorrente do tratamento. Cerca de 30% dos casos de câncer de mama podem ser evitados quando algumas medidas são adotadas como; uma alimentação saudável, prática de atividade física regular, a amamentação e manutenção do peso ideal. Por outro lado, tem-se alguns fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama como; envelhecimento, fatores relacionados à vida reprodutiva da mulher, histórico familiar de câncer de mama, consumo de álcool, excesso de peso, sedentarismo, exposição à radiação ionizante e alta densidade do tecido mamário (razão entre o tecido glandular e o tecido adiposo da mama), e a idade que continua sendo um dos mais importantes fatores de risco. As taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos. Após essa idade, o aumento ocorre de forma mais lenta, o que reforça a participação dos hormônios femininos na etiologia da doença (INCA, 2014b; OSHIRO et al., 2014).

A opção mais usada para o tratamento de câncer é a quimioterapia, porém apresenta desvantagens, como: distribuição não seletiva de drogas, resistência a múltiplas drogas, efeito colateral indesejável para o tecido normal e a inerente falta de resposta benéfica de droga (MOHANTY & SAHOO, 2010).

Para esse efeito, a não toxicidade e a eficácia de novos medicamentos podem abrir um novo caminho para futuras terapias contra o câncer. Neste sentido, a utilização de droga antineoplásica a base de ervas naturais, como a curcumina, dá uma possível solução para os obstáculos envolvidos na quimioterapia, pois não apresenta efeito colateral ao tecido normal (MOHANTY & SAHOO, 2010).

2.2.2 Fármacos Naturais Anticancerígenos

A descoberta dos fármacos surgiu com a necessidade de desenvolver e inovar métodos da liberação efetivamente terapêutica. A Figura 3 apresenta a trajetória da descoberta e do desenvolvimento dos fármacos.

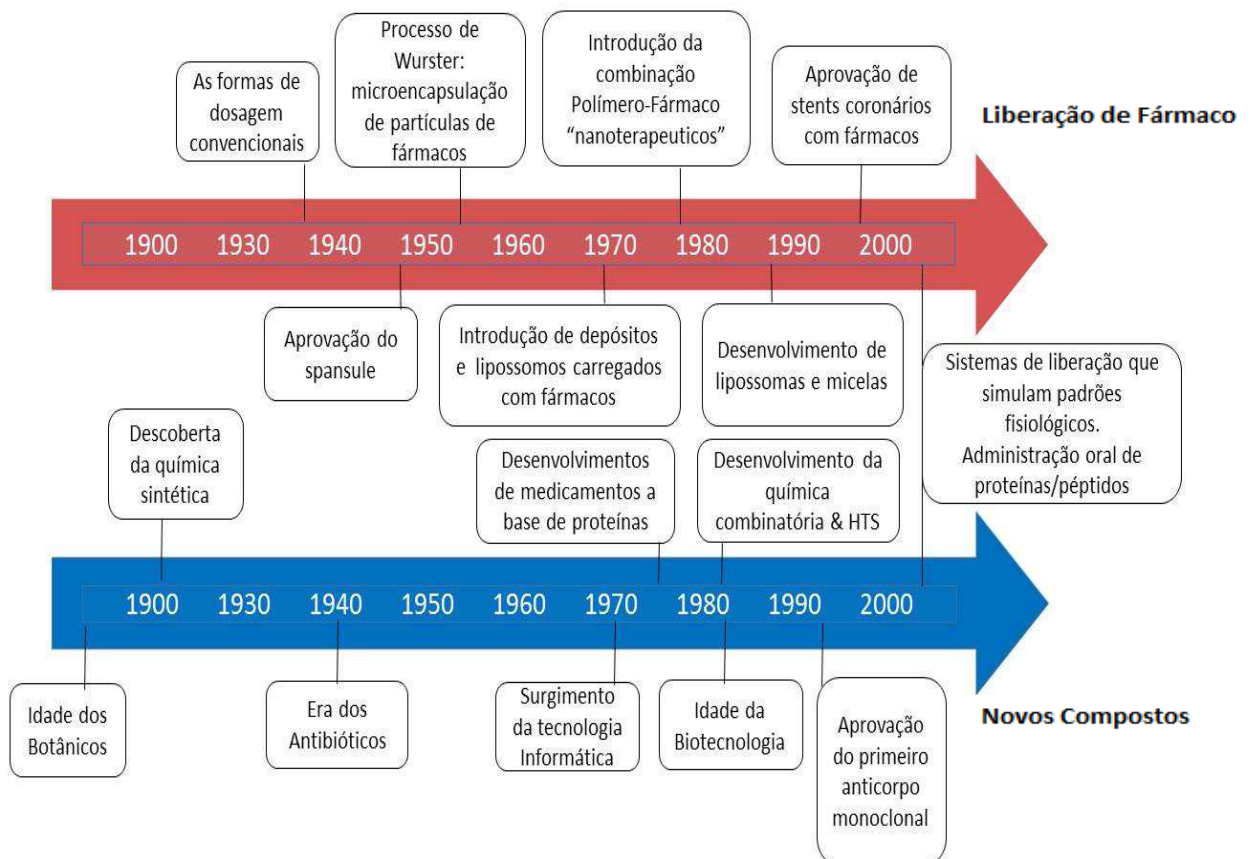


Figura 3 - Esquema da trajetória da liberação de fármacos e da descoberta de novos compostos terapêuticos (Bader & Putnam, 2014) Adaptado.

Registros de cerca de 2600 a.C., documentam o uso de aproximadamente 1000 substâncias derivadas de plantas, na Mesopotâmia, incluindo os óleos de espécies de *Cedrus* (cedro) e *Cupressus sempervirens* (ciprestes), *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz), espécies de *Commiphora* (mirra) e *Papaver somniferum* (suco de papoula), todas são usadas ainda hoje para o tratamento de doenças (MELO et al., 2006; CRAGG & NEWMAN, 2013).

A descoberta de drogas a base de plantas, resultou no desenvolvimento de muitos fármacos anticancerígenos (Tabela 1). Além disto, as plantas também fornecem uma plataforma para criação de remédios inovadores e seguros, através da interação sinérgica de vários complexos constituintes de ervas anticâncer. O uso de plantas para a terapia não é recente, pois, as plantas têm sido consideradas uma importante fonte de compostos bioativos para o tratamento de muitas doenças, incluindo o câncer, em quase todas as culturas e comunidades durante milhares de anos (OCHWANG'I et al., 2014; KHAZIRA et al., 2014).

De acordo com Li & Leung 2014, atualmente mais de 60% das drogas anticancerígenas utilizadas são originalmente desenvolvidas a partir de produtos naturais. Medicamentos fitoterápicos e produtos naturais tem sido bastante pesquisado no tratamento do câncer como a capsaicina, que é um composto que tem demonstrado efeitos anticâncer.

Zhong et al. 2012, analisaram estudos clínicos prévios, que sugeriram que as ervas da medicina Chinesa podem ser efetivas para o tratamento de câncer em três aspectos principais. Em primeiro lugar, podem melhorar as funções imunológicas dos pacientes e prevenir a reincidência e metástases. Em segundo lugar, pode prevenir e/ou reduzir a toxicidade de agentes anticancerígenos, e atuar prevenindo ou reduzindo o risco do desenvolvimento de câncer. Em terceiro lugar, pode melhorar a taxa de sobrevivência e qualidade de vida do paciente.

Diante disto, a atividade anticancerígena da curcumina, que é um curcuminóide obtido a partir do açafrão, tem sido estudada como agente terapêutico para a prevenção e tratamento de diferentes tipos de câncer.

Tabela 1 - Utilização de plantas em alguns tipos de câncer.

PRODUTOS NATURAIS	TIPOS DE CÂNCER	REFERÊNCIAS
<i>TRIPTERYGIUM WILFORDII</i> GANCHO F. (TROVÃO VINE) TRIPTOLIDE	Próstata e melanoma; Pâncreas; Colo-retal.	(MOU et al., 2011). (CHEN et al., 2014a). (LIU et al., 2012).
<i>TAXUS BREVIFOLIA</i> NUTT (TAXACEAE) PACLITAXEL	Mama, ovário e pulmão.	(BU et al., 2014).
<i>CAPSICUM</i> (CAPSAICINA)	Pâncreas; Osteossarcoma.	(DATTA et al., 2014). (CHIEN et al., 2013).
<i>LITHRAEA MELLOIDES</i> (ANACARDIACEAE)	Mama, pulmão, próstata e melanoma.	(RUSSO et al., 2009)
<i>TRYPTEGYGIUM WILFORDII</i> HOOK F (CELASTROL)	Cervical; Próstata; Mama.	(HU et al., 2013). (DAI et al., 2009). (YANG et al., 2011).
<i>PIPER NIGRUM; PIPER LONGUM</i> (PIPERINA)	Próstata; Reto; Mama; Pulmão.	(OUYANG et al., 2013). (YAFFEA et al., 2013). (DO et al., 2013). (SELVENDIRAN et al., 2003).
<i>CURCUMA LONGA</i> (CURCUMINA)	Mama; Próstata; Colo-retal; Ovário; Tireóide.	(CHEN et al, 2014b). (ADITYA et al, 2014). (ANITHA et al, 2014). (ABOUZEID et al, 2014). (XU et al, 2014).
<i>COPTIS CHINENSIS, HYDRASTIS CANADENSIS E BERBERIDACEAE (BERBERINE)</i>	Colo-retal; Mama; Bexiga; Pulmão.	(MURTHY et al., 2012). (MA et al., 2013). (YAN et al., 2011). (PENG et al., 2006).

2.3 Curcumina

A curcumina é um componente polifenólico da *Curcuma longa* L., que pertence à família Zingiberaceae, distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo amplamente cultivado em países asiáticos, principalmente na Índia e China. Seus rizomas são longos e ovais muitas vezes de curtas ramificações (ARAUJO & LEON, 2001; PRASAD et al., 2014; JARDIM et al., 2013).

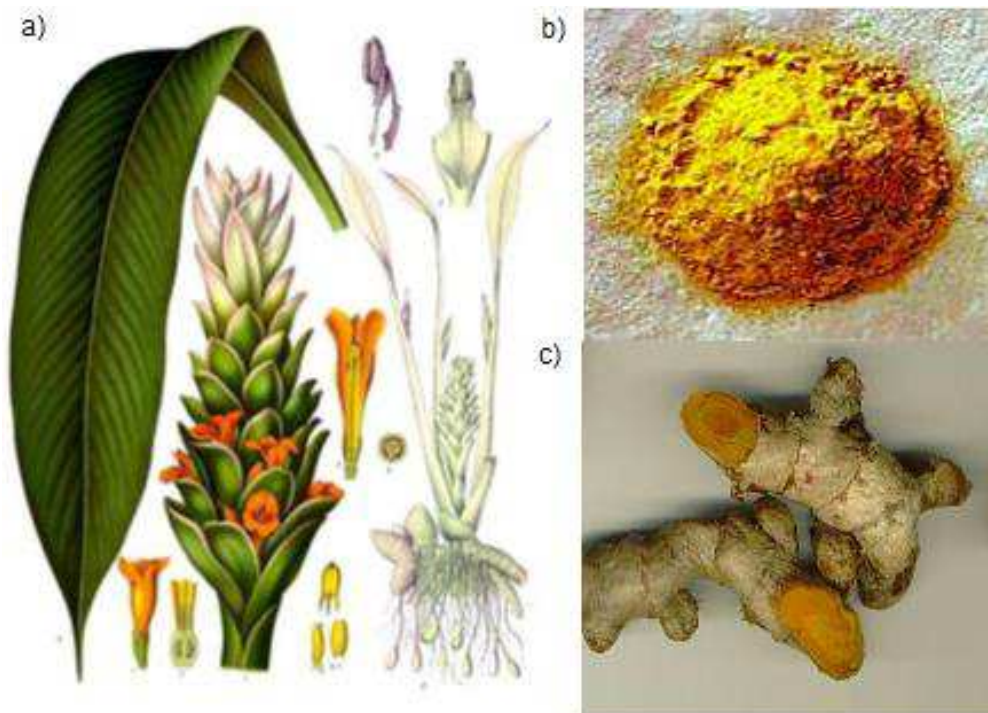


Figura 4 - Ilustração da (a) Planta *Curcuma longa* (b) da Curcumina em pó, (c) e do corte recente do rizoma (Jardim et al., 2013; Mercola, 2014; Basnet & Skalko-Basnet, 2011).

A curcumina apresenta cor amarelada (Figura 4), e tem sido utilizada em medicamentos asiáticos, para o tratamento de acne, psoríase, dermatite, assaduras e também fornece uma ampla gama de benefícios de saúde, incluindo a atividade anticancerígena, sendo considerada como uma alternativa adequada para os agentes quimioterápicos (MAHESHWARI et al., 2006; DAS et al., 2010; LI & ZHANG, 2014; MOORTHY & KATHIRESAN, 2013).

É comercialmente disponível como um extrato de raízes de *Curcuma longa*, onde o seu conteúdo é estimado na soma do teor dos curcuminóides, com tipicamente 77% de curcumina, 17% de demetoxicurcumina e 6% de bis-demetoxicurcumina (Figura 5).

Apresentando uma composição atômica $C_{21}H_{20}O_6$ com massa molecular de 368,39g/mol e ponto de fusão de 183°C (GRYNKIEWICZ & ŚLIFIRSKI, 2012; MAHESHWARI et al., 2006).

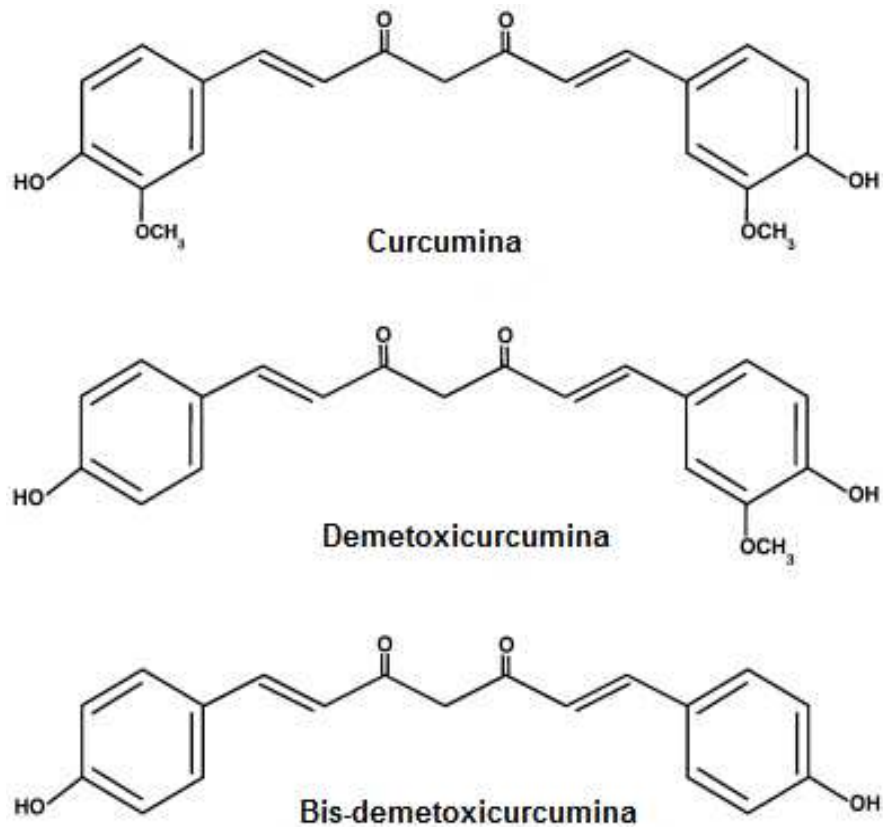


Figura 5 - Estrutura química dos curcuminóides (Curcumina, Demetoxicurcumina e Bis-demetoxicurcumina) (Akhtar et al., 2012) Adaptado.

A dose diária tolerada em seres humanos é de até 12g, segundo ensaios clínicos de fase I, com o selo de segurança da GRAS (Generally Regarded As Safe), por United States Food and Drug Administration (MOORTHI & KATHIRESAN, 2013).

Apesar de extensas pesquisas e desenvolvimento de novos sistemas, a fraca solubilidade da curcumina em água, conduz a uma fraca biodisponibilidade, sendo um grande obstáculo para sua utilização. Em termos quantitativos, a biodisponibilidade é definida da seguinte maneira:

$$\text{Biodisponibilidade} = \frac{\text{Quantidade de fármaco que alcança a circulação sistêmica}}{\text{Quantidade de fármaco administrado}} \quad (1)$$

Essa definição de biodisponibilidade (Equação 1), baseia-se no fato importante de que a maioria dos fármacos alcança seus locais de ação moleculares e celulares diretamente a partir da circulação sistêmica (YADAV et al., 2012; GOLAN et al., 2011).

Sendo de natureza hidrofóbica, a curcumina é insolúvel em soluções aquosas, mas solúvel em solventes orgânicos tais como dimetilsulfóxido (DMSO), acetona, metanol, e etanol, sendo que o máximo de absorção (λ_{max}) de curcumina ocorre em metanol por volta de 430 nm. Para utilizar as atividades farmacêuticas da curcumina e superar a sua fraca disponibilidade no local de ação no corpo, outras formas de utilização desta, têm sido desenvolvidas tais como; a utilização de micelas, complexos fosfolipídios, ciclodextrina, lipossomas, nanopartículas, macromoléculas, hidrogéis, conforme mostrado na Tabela 2. Adjuvantes, tais como a piperina, também são utilizados para melhorar a biodisponibilidade da curcumina (YADAV et al., 2012; DAS et al., 2010; RAO et al., 2014).

A curcumina apresenta propriedades do ponto de vista farmacológico como; antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, antiparasitários, antimalárica e atividades anticancerígenas. A atividade anticancerígena da curcumina tem sido sugerida como um agente terapêutico para a prevenção e tratamento de diferentes tipos de câncer incluindo de mama, oral, de esôfago, linfoma, gástrico, intestinal, hepático, de pâncreas, leucemia, colo retal, de bexiga, melanoma de rins, de ovário, próstata, sarcoma, uterino, de pele, neurológico, ósseo, no cérebro e cabeça e carcinoma de células escamosas pescoço (CHUAH et al., 2014; YADAV et al., 2012; NAKSURIYA et al., 2014; MOORTHY & KATHIRESAN, 2013).

Tabela 2 - Melhoria das propriedades da curcumina proporcionada pelo emprego de sistemas de liberação.

SISTEMA DE LIBERAÇÃO	EFEITOS BENÉFICOS RELATADOS
MICELAS	Aumenta a solubilidade aquosa, mantém a atividade citotóxica e aumenta a possibilidade de administração oral e parenteral como liberação controlada.
COMPLEXOS FOSFOLIPÍDIOS	Aumenta a atividade hepatoprotetora <i>in vivo</i> , aumenta a concentração plasmática após administração oral e mantém a concentração plasmática efetiva por maior tempo.
CICLODEXTRINAS	Aumenta a solubilidade aquosa e aumenta a estabilidade frente à hidrólise alcalina.
LIPOSSOMAS	Obtenção de sistemas aquosos dispersos aplicáveis à administração intravenosa, aumenta ou mantém a atividade antiproliferativa e antiangiogênica sobre células tumorais <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> em relação ao fármaco livre, aumenta a estabilidade em tampão fosfato, reduz a dose, obtém efeito sinérgico inibitório com oxaliplatina e promove o transporte mais efetivo do fármaco para o interior da célula.
NANOPARTÍCULAS	Facilita a dispersão em meio aquoso, possui atividade citotóxica similar ao fármaco livre, prolonga a liberação de curcuminóides, aumenta a estabilidade, produz efeito sobre a hidratação, possui firmeza e elasticidade da pele e ampla distribuição nos tecidos contendo macrófagos.
NANO E MICROEMULSÕES	Aumenta a atividade anti-inflamatória, promove a liberação controlada, aumenta a solubilidade e a absorção oral do fármaco.

Fonte: Mazzarino, (2009). Adaptado

A Figura 6 apresenta as diferentes doenças para as quais a curcumina vem sendo pesquisada.



Figura 6 - Áreas de pesquisas com a curcumina (Naksuriya, et al., 2014) Adaptado.

Pesquisas indicam que os efeitos biológicos da curcumina são derivados principalmente de sua capacidade de se ligar diretamente a várias proteínas, tais como ciclo-oxigenase-2 (COX-2), lipoxigenase, GSK3b e várias outras enzimas reguladoras ou pela sua capacidade de modular o estado redox intracelular. E com relação a atividade anti-inflamatória a curcumina modula eficazmente a função das células T, células B, células dendríticas, monócitos, macrófagos e de neutrófilos (SRIVASTAVA et al., 2011).

Estudos recentes demonstraram que a curcumina e seus análogos pode inibir o crescimento de células de câncer pancreático humano, diminuindo a fosforilação de STAT3 e AKT, duas vias de sinalização celular com atividade persistente neste tipo de câncer (LI & LEUNG, 2014).

Shoba et al. 1998, avaliaram em animais e seres humanos a influência da piperina na curcumina. Foi observado que a piperina aumentou a extensão e a biodisponibilidade da curcumina tanto em ratos como em seres humanos, sem causar efeitos adversos.

Mishra & Palanivelu 2008, estudaram o efeito da curcumina sobre a doença de Alzheimer, concluindo que devido aos vários efeitos de curcumina, tais como a diminuição placas beta-amilóide, a degradação retardada dos neurónios, as propriedades anti-inflamatória, anti-oxidantes ocorreu a diminuição na formação da micróglia e na memória total em doentes com doença de Alzheimer melhorou.

Zhou et al. 2014, utilizou um derivado da curcumina conhecido como hydrazinebenzoy/curcumina, para induzir a formação celular A549 (adenocarcinoma de pulmão humano), onde inibiu a viabilidade celular para 76,68% após 24 horas de tratamento. Popat et al. 2014, preparam nanoesferas ocas carregadas de curcumina, curcumina/ γ -hidroxipropil ciclodextrina e nanopartículas curcumina/ γ -hidroxipropil ciclodextrina/ quitosana a fim de explorar sua eficácia em células de câncer de pele, onde observou-se que as nanopartículas curcumina/ γ -hidroxipropil ciclodextrina/ quitosana são mais eficazes do que o curcumina livre e curcumina/ γ -hidroxipropil ciclodextrina, induzindo a prisão de fase S e fase G2/M do ciclo celular, seguido por apoptose completo (~99.9%). Já Zhang et al. 2013, desenvolveram um sistema de liberação de fármacos, de microesferas de curcumina/Phytosome/quitosana, com objetivo de melhorar a biodisponibilidade e prolongar o tempo de retenção da curcumina no corpo, utilizando a técnica de gelificação ionotrópica. Os estudos de farmacocinética em ratos com doses de curcumina/Phytosome/quitosana mostrou um aumento de 1,07 vezes na absorção da curcumina em comparação com curcumina/Phytosome e curcumina /quitosana, respectivamente. Parize et al. 2012, encapsularam a curcumina em quitosana, usando tripolifosfato de sódio (TPP) como um agente de reticulação iônica pelo método de secagem por atomização. As micropartículas apresentaram uma morfologia esférica (0,5-20 μ m) sem porosidade ou trincas.

Além disso, a curcumina foi encontrada no estado amorfo e dispersa ao nível molecular em micropartículas, promovendo um aumento da sua solubilidade em soluções aquosas.

Ma'mani et al. 2014, sintetizaram a guanidina funcionalizada a base de PEG em nanopartículas de sílica mesoporosa como um sistema de entrega de drogas, utilizando a curcumina. Este novo sistema exibiu elevada capacidade de carga do fármaco, com perfil de liberação prolongada, e elevada e longa duração da eficácia anticancerígena em linhas celulares de câncer humano. Obtendo resultados satisfatórios *in vitro* terapia do câncer de mama.

Kumar et al. 2002, obtiveram microesferas de albumina e quitosana preparadas pelo método de evaporação de emulsão-solvente, juntamente com a curcumina como sistema de liberação de fármaco. A curcumina foi encapsulada com eficiência de 79,49 e 39,66%, respectivamente, com albumina e quitosana. A partir do presente estudo concluiu-se que as microesferas biodegradáveis podem ser empregadas com sucesso para uma liberação prolongada de entrega de fármaco.

Mondal et al. 2013, desenvolveram uma formulação lipossomal da curcumina contendo um lipopéptido com o grupo RGDK-cabeça e duas caudas. Utilizando uma solução de curcumina (10 mg/mL em 1:1 clorofórmio: metanol). Obtendo propriedades significativas de inibição de crescimento tumoral.

2.4 Validação de Métodos Analíticos

Com objetivo de garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser validado. Para registro de novos produtos, os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação da metodologia analítica.

Segundo ISO/MEC 17025 a validação é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos. De acordo com a RE nº 899/2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para registro de produtos com fármacos, deve-se apresentar a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

Para tanto, deve apresentar seletividade, especificidade, linearidade, intervalo, exatidão, precisão, robustez, limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ), adequados à análise (BRASIL, 2003).

2.4.1 Seletividade e Especificidade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003).

2.4.2 Linearidade e Intervalo

A linearidade pode ser definida como a capacidade de se obter resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um determinado intervalo (BUZANELLO, 2013; BRASIL, 2003).

2.4.3 Exatidão

A exatidão do método é estabelecida por meio da relação da concentração média experimental com a teórica, conforme apresentada na Equação 2.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração Teórica}} \times 100 \quad (2)$$

2.4.4 Precisão

A precisão de um procedimento analítico expressa o grau de concordância (grau de dispersão) entre uma série de medidas obtidas a partir de amostragem múltipla de uma mesma amostra homogênea nas condições prescritas (BUZANELLO, 2013). A precisão pode ser determinada por análises de métodos: repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade (precisão intra-corrída), refere-se a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação, já a precisão intermediária (precisão inter-corrídas), a concordância ocorre entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes (BRASIL, 2003).

A precisão pode ser analisada a partir do Desvio Padrão Relativo (DPR%), Equação 3, onde DP é o desvio padrão e o CMD a concentração média determinada, das amostras de concentração conhecida,

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100 \quad (3)$$

2.4.5 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analítico (BRASIL, 2003).

2.4.6 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O Limite de detecção, o LD representa a menor concentração de analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. O limite de detecção (LD), Equação 4, é calculado por meio da divisão entre o desvio padrão (DP) dos coeficientes lineares das três curvas de calibração do ensaio de linearidade pela média dos coeficientes angulares (IC) das curvas multiplicados por 3 (NUNES, 2015).

$$\text{LD} = 3 \times \frac{\text{DP}}{\text{IC}} \quad (4)$$

Já o Limite de Quantificação, LQ, é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas e foi determinada de acordo com a Equação 5.

$$\text{LQ} = 10 \times \frac{\text{DP}}{\text{IC}} \quad (5)$$

2.5 Liberação Controlada de Fármacos

O sistema de liberação controlada de fármaco tem como objetivo minimizar a frequência das dosagens através da liberação do fármaco nos locais específicos do organismo e/ou contínuos por um longo período de tempo (BADER & PUTNAM, 2014).

A concepção e o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos envolvem conhecimentos multidisciplinares que utilizam os mais recentes avanços nas ciências biológicas, farmacêuticas, químicas, físicas e das engenharias sendo vitais para o sucesso do desenvolvimento de produtos (DEL VALLE et al., 2009).

Nos métodos convencionais de liberação, o nível de fármaco é liberado rapidamente após a administração, sendo empregados nesses sistemas diluentes solúveis, desintegrantes e/ou outros recursos que favorecem os processos de liberação e dissolução do fármaco (KLAUSS, 2010; PEZZINI et al., 2007).

Já em sistemas de liberação controlada, o fármaco pode ser liberado através do dispositivo de maneira sustentada, retardada, pulsátil e prolongada, (Figura 7) oferecendo várias vantagens quando comparados a liberação convencional, permitindo que o agente terapêutico seja administrado em intervalos regulares, a fim de manter a sua concentração no plasma dentro da janela terapêutica, mantendo-se constante entre os níveis máximo e mínimo (KLAUSS, 2010; PEZZINI et al., 2007; BADER & PUTNAM, 2014; JUNIOR, 2007).

Em sistemas com liberação sustentada o fármaco mante-se constante por um período maior que na forma convencional. Já na liberação retardada o intervalo de tempo entre a administração e a detecção do fármaco na corrente sanguínea é prolongado. Na forma pulsátil, ocorre a liberação de uma dose individual logo após a sua administração, e uma segunda ou terceira doses liberadas de 4 a 6 horas após a ingestão. Essas formas possibilitam a manutenção do efeito terapêutico por um maior período de tempo em relação a forma convencional, substituindo uma nova administração do fármaco. E no sistema de liberação prolongada, são disponibilizadas duas doses do fármaco, a primeira, chamada de dose inicial de liberação imediata, necessária para produzir o efeito farmacológico desejado sem causar danos ao organismo. A segunda, chamada dose de manutenção, é liberada de modo gradual, com a finalidade de prolongar a extensão da resposta farmacológica (Figura 7), (Albanez, 2012).

A Figura 7 apresenta o comportamento dos níveis plasmáticos de um fármaco liberado a partir dos principais tipos de liberação de fármacos.

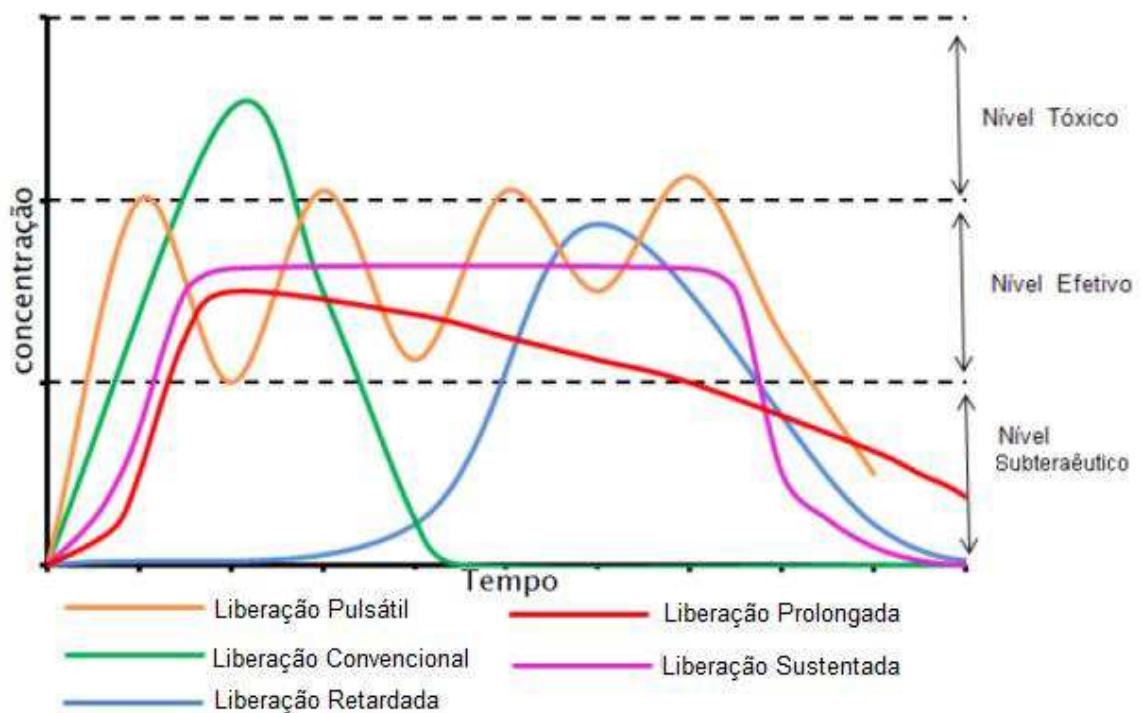


Figura 7- Perfis plasmáticos em diferentes condições de administração (Albanez, 2012).

Cada fármaco possui uma faixa de ação terapêutica acima da qual ele é tóxico e abaixo da qual ele é ineficaz, os níveis plasmáticos são dependentes das dosagens administradas, isso se torna mais crítico se a dose efetiva estiver próxima da dose tóxica. Neste fato reside uma das grandes vantagens dos sistemas de liberação controlada sobre os métodos convencionais, com a manutenção da concentração terapêuticamente efetiva dos fármacos no sistema circulatório por um extenso período de tempo (VILLANOVA et al., 2010). A Tabela 3, apresenta de forma resumida algumas dessas vantagens. Certos tipos de dispositivos médicos contendo fármacos representam uma tecnologia emergente, explorada pelas áreas médica e farmacêutica. Alguns exemplos de dispositivos contendo fármacos são: implantes ortopédicos, implantes oftálmicos, cateteres venosos e urinários. Os antibióticos, anti-inflamatórios, imunossupressores e antineoplásicos são as principais classes terapêuticas utilizadas na preparação ou recobrimento de dispositivos (VILLANOVA et al., 2010).

Tabela 3 - Vantagens dos sistemas de liberação controlada de fármacos.

TIPO	VANTAGENS
FARMACOLÓGICA	<ul style="list-style-type: none"> • Manter o nível terapêutico com baixa oscilação;
	<ul style="list-style-type: none"> • Impedir níveis tóxicos e efeitos colaterais locais e sistêmicos;
	<ul style="list-style-type: none"> • Evitar subníveis terapêuticos;
	<ul style="list-style-type: none"> • Aumentar concentrações plasmáticas de princípios ativos de meia-vida plasmática relativamente curta;
	<ul style="list-style-type: none"> • Maior segurança na utilização de alguns fármacos de elevada potência.
EFICÁCIA DO TRATAMENTO	
	<ul style="list-style-type: none"> • Maior comodidade pela diminuição do número de administrações diárias;
	<ul style="list-style-type: none"> • Facilita a adesão do paciente ao tratamento;
	<ul style="list-style-type: none"> • Administração noturna pode ser evitada; • Efeitos indesejáveis reduzidos.

Fonte: LYRA et al., 2007.

Nos últimos anos, pesquisas tem sido desenvolvida no que se refere à preparação de microesferas de polímeros biodegradáveis para a liberação controlada de fármacos. A administração do fármaco via tais sistemas é vantajosa porque as microesferas podem ser ingeridas ou injetadas, podem ainda ser adaptadas para o perfil de liberação desejada em alguns casos, e podem até mesmo permitir a liberação em regiões específicas do organismo. O termo “liberação controlada” implica na predição e na reprodutibilidade da cinética de liberação de um fármaco, atuando dentro da faixa terapêutica.

A incorporação de fármacos nos sistemas na forma de partículas pode ser feita durante a obtenção das partículas, ou depois de sua formação, ficando o fármaco adsorvido na matriz ou na superfície da partícula. O encapsulamento de fármacos hidrofóbicos em sistemas de partículas aquosas tem sido estudado de modo a liberar tais drogas com o seu pleno potencial (JUNIOR, 2007; TAVARES, 2009; DAS et al., 2010).

2.5.1 Sistema de Liberação Controlada de Fármacos

No tratamento de disfunções relacionadas à saúde, é desejável que o medicamento alcance o seu local de ação a uma concentração particular e que esta dose terapêutica permaneça constante em um período suficientemente longo para alterar o processo. No entanto, a ação de agentes farmacêuticos é limitada por vários fatores, incluindo a sua degradação, a sua interação com outras células e a sua incapacidade para penetrar nos tecidos como resultado da sua natureza química. Por estas razões, novas formulações são estudadas para alcançar uma resposta farmacológica maior, entre estes os sistemas poliméricos de transportadores de fármaco são de grande interesse. O mecanismo envolvido na liberação controlada exige polímeros com variedade de propriedades físico-químicas. Assim, vários tipos de dispositivos formados por matrizes poliméricas têm sido utilizados em formas farmacêuticas como; comprimidos, cápsulas, grânulos, sistemas transdérmicos e implantes. Estes dispositivos poliméricos apresentam mecanismos que governam a liberação do fármaco (VILAR et al., 2012; KLAUSS, 2010, COIMBRA, 2010).

Estes mecanismos são os sistemas de liberação controlados por difusão; matriciais e reservatório; sistemas de liberação ativados pelo solvente, pressão osmótica e absorção de água (intumescimento), sistemas de liberação controlados por ação química; cadeias pendentes e sistemas biodegradáveis (Figura 8). A liberação controlada por difusão pode ser dividida em duas categorias: sistemas reservatórios e sistemas matriciais, podendo ser constituídos por diversos tipos de polímeros, devido às vantagens inerentes a estes materiais como: versatilidade, eficácia, baixo custo e produção que recorre em equipamentos e técnicas convencionais (LYRA et al., 2007; BADER & PUTNAM, 2014).

Os sistemas reservatório consiste em um núcleo contendo o fármaco, que é revestido por uma membrana polimérica (Figura 8(a)). Uma vez que o fármaco é concentrado dentro do núcleo da partícula, ele pode difundir-se uniformemente para fora a uma taxa constante. Nestes sistemas, o fármaco é liberado por difusão através da membrana de revestimento, que pode ser microporosa ou não apresentar poros. Quando uma membrana não-porosa é utilizada, a liberação é governada pela difusão da substância ativa através do polímero e assim, pode ser modulada pela seleção de um polímero no qual ela apresente a difusividade adequada. No caso de membranas microporosas, a difusão do fármaco no meio que estiver preenchendo os poros determinará o processo de liberação. Em um sistema de reservatório o medicamento não precisa de ser dissolvido para ser carregado dentro do implante, apenas “encaixado” dentro do dispositivo. Uma desvantagem deste sistema de liberação é quanto maior a quantidade de fármaco, mais lenta será a taxa de liberação. Além disso, se a membrana do implante é rompida, uma liberação “total do fármaco” pode ocorrer, o que pode ser fatal para o paciente (PEZZINI et al., 2007; BADER & PUTNAM, 2014).

Nos sistemas do tipo matricial (Figura 8(b)), o fármaco encontra-se distribuído homogeneamente ou solubilizado na matriz, sendo a taxa de liberação controlada pela taxa de difusão do fármaco através dessa mesma matriz. Em matrizes hidrofílicas o processo é regulado por intumescimento do polímero, difusão e erosão (física ou química) da matriz. Nas matrizes hidrofóbicas, o fármaco é liberado essencialmente por difusão. Porém na quitosana a presença de grupos substituintes com diferente densidade eletrônica exerce a mudança na força das ligações de hidrogênio que o polímero é capaz de fazer, e por isso a quitosana e seus derivados intumescem em água, mesmo com a alta hidrofobicidade de suas cadeias. (KLAUSS, 2010; COIMBRA, 2010; PEZZINI et al., 2007; BADER & PUTNAM, 2014; AZEVEDO et al. 2007).

Os sistemas baseados em reação química são projetados para se decompor com o passar do tempo. A decomposição pode ser causada por uma reação química ou enzimática. Em alguns modelos, as ligações covalentes que unem o fármaco a um polímero são clivadas no corpo por enzimas endógenas (Figura 8(c)).

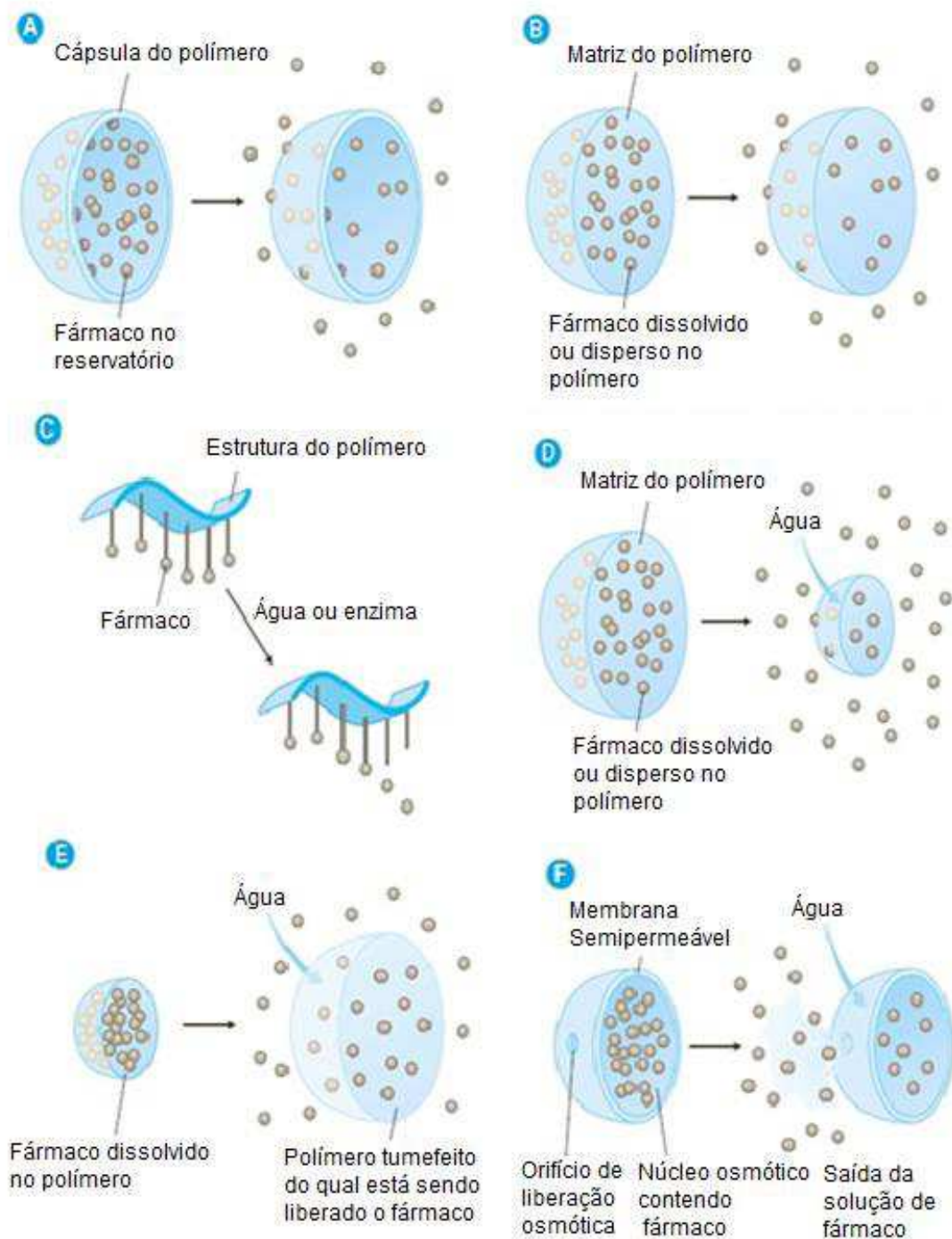


Figura 8 - Mecanismo de difusão a partir de um (a) reservatório, (b) e de uma matriz, (c) no mecanismo por ação química ou pela clivagem do fármaco de uma estrutura de polímero e (d) degradação do polímero por hidrólise, em mecanismos ativados pelo solvente (e) pressão osmótica (f) absorção de água (Golan et al., 2011). Adaptado.

Em sistemas de cadeias pendentes, as moléculas de fármaco encontram-se quimicamente ligadas à cadeia de polímero e estas ligações são quebradas por hidrólise (Figura 8d), ou por ação enzimática, originando assim a liberação do fármaco a uma taxa controlada. Nos sistemas biodegradáveis, o fármaco é disperso ou dissolvido numa matriz polimérica biodegradável, sendo a taxa de liberação controlada pela desintegração da matriz, provocada pela biodegradação do polímero, a degradação do polímero pode ocorrer através de uma degradação enzimática, hidrólise, ou uma combinação de ambos. Porém o corpo pode degradar as partículas levando a uma perda da eficácia terapêutica do fármaco (GOLAN et al., 2011; COELHO, 2007; PEZZINI et al., 2007; BADER & PUTNAM, 2014).

Os sistemas de liberação ativados pelo solvente são divididos em duas categorias; os sistemas ativados pela pressão osmótica (Figura 8(e)), e os sistemas liberados pela absorção de água (Figura 8(f)). Os sistemas osmóticos (Figura 8(e)), baseiam-se no princípio da pressão osmótica para promover a liberação controlada de fármacos por períodos prolongados, independentemente da necessidade de energia elétrica, do pH fisiológico, das propriedades químicas do fármaco, da ingestão de alimentos, e de outros fatores fisiológicos. A pressão osmótica, formada devido à diferença de concentrações do fármaco no exterior e interior da membrana semi-permeável, origina um fluxo de fluido (água) do exterior para interior do dispositivo, forçando desta forma a solução saturada no interior a sair pelo orifício presente na membrana. Os sistemas osmóticos apresentam diversas vantagens como: a possibilidade de liberar o fármaco de forma pulsátil ou prolongada e com velocidades superiores aos sistemas de difusão controlada e a capacidade de programar a velocidade de liberação do fármaco através da modulação dos seus parâmetros de liberação (LOPES, 2012; COIMBRA, 2010). Nos sistemas de liberação controlado pela absorção de água o fármaco encontra-se disperso ou dissolvido numa matriz polimérica constituída por um polímero hidrofílico reticulado (hidrogel). A água difunde-se através da membrana semipermeável para o material segundo o gradiente osmótico, causando tumefação do centro osmótico dentro do comprimido, forçando a saída da solução do fármaco pelo orifício. Estas matrizes têm a capacidade de absorver uma grande quantidade de água sem se dissolverem sendo que, a taxa de liberação do fármaco é controlada pela taxa de absorção de água da matriz polimérica (COIMBRA, 2010; GOLAN et al., 2011).

A partir de então, tem-se que o uso de modelos matemáticos é um fator bastante importante para identificação do tipo de liberação controlada de fármaco em dispositivos farmacêuticos (LYRA et al., 2007).

2.5.2 Modelos Matemáticos utilizados na Liberação Controlada de Fármacos

Algumas das equações clássicas que são úteis para o desenvolvimento de modelos de sistemas de liberação são apresentadas a seguir.

2.5.2.1 Leis de difusão de Fick

O transporte de massa por difusão é quase sempre envolvido no controle da liberação do fármaco a partir de fatores como a geometria do material. As leis de difusão de Fick são utilizadas a fim de quantificar o transporte de massa por difusão (SIEPMANN & SIEPMANN, 2012).

A Primeira Lei de Fick descreve a taxa de difusão por unidade de área no estado estacionário, ou seja, o gradiente de concentração ($\frac{\delta c}{\delta x}$), não altera com o tempo. A concentração é dependente apenas de posição, como descrito na Equação (6), onde **F** é o fluxo de difusão, isto é, a quantidade de partículas do fármaco que passa através de uma unidade de área por unidade de tempo, **c** é a concentração do fármaco dependente da posição na matriz, **D** é o coeficiente de difusão do fármaco e **x** é a posição normal em relação ao plano central do material (KLAUSS, 2010; LAO et al., 2011).

$$F = -D \frac{\delta c}{\delta x} \quad (6)$$

A Segunda Lei de Fick, Equação (7), determina que a concentração em função do tempo em uma determinada região seja proporcional à alteração no gradiente de concentração naquela região do sistema. Todos os parâmetros da Equação (6) têm os mesmos significados da Equação (7), exceto o **C** que é a concentração do fármaco dependente da posição na matriz e **t** é o tempo. A principal diferença entre as duas equações reside no fato de que a concentração é só função da posição na Primeira Lei (Equação 4), enquanto que a concentração é uma função tanto da posição e do tempo na Segunda Lei (Equação 7).

Ambas as equações formaram a base no desenvolvimento de vários modelos de liberação do fármaco teóricos e empíricos (LAO et al., 2011; SIEPMANN & SIEPMANN, 2012; SANTIS, 2008).

$$\frac{\delta c}{\delta x} = D \left(\frac{\delta^2 c}{\delta x^2} + \frac{\delta^2 c}{\delta y^2} + \frac{\delta^2 c}{\delta z^2} \right) \quad (7)$$

Embora a Segunda Lei de Fick seja derivada de um modelo de sistema de coordenadas de fluxo retangular, Figura 9 (a), esses conceitos podem ser estendidos para sistemas esféricos e cilíndricos, Figura 9 (b) e (c). As equações para um fluxo dimensional em geometrias diferentes estão apresentadas resumidamente na Tabela 4 (BADER & PUTNAM, 2014).

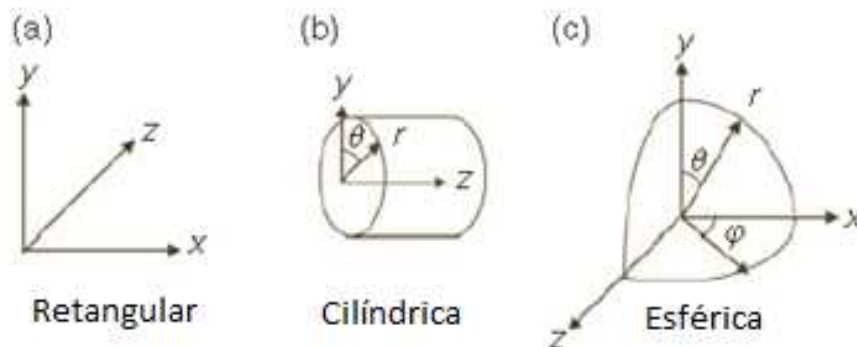


Figura 9 - Equações de fluxo unidimensional (a) retangular, (b) cilíndrica e (c) esférica (Bader & Putnam, 2014).

Usando um sistema de coordenadas esféricas e assumindo que a difusão ocorre apenas na direção radial, a segunda Lei de Fick, Equação 7, é utilizada para prever alteração na concentração do fármaco dentro da cápsula ao longo do tempo. As seguintes condições de contorno podem ser aplicadas assumindo que o raio da cápsula mantém-se constante, que a cápsula possui simetria radial, e que o fármaco é imediatamente arrastado para fora da superfície da cápsula para liberação (BADER & PUTNAM, 2014).

Tabela 4 - Equações de fluxo unidimensional de diferentes geometrias.

RETANGULAR	$D_1 \frac{\partial^2 c_1}{dz^2} = \frac{\partial c_1}{\partial t}$
CILÍNDRICO	$D_1 \left[\frac{\partial^2 c_1}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial c_1}{\partial r} \right] = \frac{\partial c_1}{\partial t}$
ESFÉRICO	$D_1 \left[\frac{\partial^2 c_1}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c_1}{\partial r} \right] = \frac{\partial c_1}{\partial t}$

Fonte: Bader & Putnam, 2014.

2.5.2.2 Cinética de Ordem Zero

O modelo designado por cinética de ordem zero (Equação 8), baseia-se na liberação lenta da substância ativa. Esta relação pode ser usada para descrever a dissolução de fármacos de vários tipos de formas de dosagem farmacêutica de liberação modificada, tal como no caso de alguns sistemas transdérmicos, bem como comprimidos de matriz com fármacos pouco solúveis, formas revestidas, sistemas osmóticos, etc. As formas de dosagem farmacêuticas utilizam este perfil de liberação da mesma quantidade de fármaco por unidade de tempo e é o método ideal para a liberação do fármaco a fim de assegurar uma ação farmacológica prolongada (LOPES et al., 2005; COSTA & LOBO, 2001).

Este modelo pode ser expresso pela seguinte expressão:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_0 t + b \quad (8)$$

Onde:

M_t - Representa a quantidade absoluta de fármaco liberada no tempo t ;

M_∞ - Quantidade total de fármaco liberado num tempo infinito, a qual deverá corresponder à quantidade total de fármaco incorporado ao sistema polimérico no $t=0$;

K_0 - Constante cinética;

b - Quantidade inicial de fármaco na solução.

2.5.2.3 Equação de Higuchi

Higuchi, desenvolveu vários modelos teóricos para estudar a liberação de fármacos solúveis em água e fármacos pouco solúveis incorporados em matrizes semi-sólidas e/ou sólidas.

O modelo de Higuchi é uma das teorias mais bem sucedidas na previsão de liberação de fármacos a partir de um sistema monolítico no qual as partículas de fármacos são dispersas uniformemente por toda a matriz (LAO et al., 2011; COSTA & LOBO, 2001).

Para estudar a dissolução a partir de um sistema planar com uma matriz homogênea, tem-se a seguinte relação, Equação (9), onde K_H , corresponde à constante de liberação de Higuchi, que reflete as características da formulação (COSTA & LOBO, 2001).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_H \sqrt{t} + b \quad (9)$$

2.5.2.4 Modelo de Korsmeyer-Peppas (Lei de Potência)

O modelo de Korsmeyer-Peppas, apresenta um modelo matemático com uma equação mais abrangente e simples, que descreve a liberação do fármaco a partir de sistemas poliméricos, Equação (10) (LYRA et al, 2007).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n \quad (10)$$

Onde,

M_t - Quantidade do fármaco em função do tempo;

M_∞ - Quantidade total do fármaco;

k - Uma constante incorporando características estruturais e geométricas do dispositivo;

n - Expoente de liberação, o que indica o mecanismo de liberação do fármaco.

Na Equação (10) quando $n=0,5$ (para filmes), indica a liberação controlada de fármaco em difusão e em $n=1,0$ a equação corresponde à cinética de liberação (Caso tipo II), onde a liberação do fármaco é independente do tempo. Os valores de n entre 0,5 e 1,0 podem ser considerados como um indicador para a sobreposição de ambos os fenômenos de difusão e erosão (transporte anômalo). Os valores de $n>1$ são atribuídos à associação dos mecanismos de difusão, erosão, relaxamento das cadeias e intumescimento. Os dois valores extremos para o expoente $n=0,5$ e 1,0 são válidos apenas para a geometria plana. Para esferas e cilindros, diferentes valores foram derivados, conforme indicado na Tabela 5 (SIEPMANN & PEPPAS, 2012; LOPES et al., 2005; KLAUSS, 2010).

Tabela 5 - Expoente “n” do modelo de Korsmeyer-Peppas e os mecanismos de liberação de fármacos de diferentes geometrias.

Expoente, n			Mecanismo de Liberação
Filmes	Cilindro	Esferas	
0,5	0,45	0,43	Difusão Fickiana
0,5<n<1,0	0,45<n<0,89	0,43<n<0,85	Transporte anômalo
1,0	0,89	0,85	Transporte Caso II

Fonte: Siepmann & Peppas, 2012.

2.5.2.5 Equação de Peppas & Sahlin

Peppas & Sahlin, 1989 apresentaram uma expressão exponencial simples Equação (11), que pode ser utilizada para analisar o comportamento de liberação controlada de diversos sistemas de produtos farmacêuticos dentre outros.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_1 t^m + K_2 t^{2m} \quad (11)$$

Este modelo matemático leva em consideração a difusão Fickniana (primeiro termo da equação) e a contribuição do relaxamento e intumescimento da matriz polimérica (K_1 e K_2 , no segundo termo da equação).

Onde m é o expoente de difusão Fickiana da preparação farmacêutica que apresenta uma liberação modificada, qualquer que seja a sua forma (SIEPMANN & PEPPAS, 2012; LOPES et al., 2005; LYRA et al., 2007). A partir disto, numerosos polímeros biodegradáveis estão disponíveis e tem sido estudado para aplicações na liberação controlada de fármacos. Estes polímeros são sistemas aptos para controlar a taxa de liberação do fármaco, evitando a necessidade da retirada da matriz após a exaustão do fármaco e possuem solubilidade limitada em pH ácido, sendo portanto, solúvel em pH neutro (LYRA et al., 2007; BALAN & VERESTIUC, 2014; BERNKOP-SCHNÜRCH & DÜNNHAUPT, 2012).

2.6 Polímeros Biodegradáveis

Nos últimos anos, vários polímeros naturais e sintéticos foram usados em aplicações biomédicas, incluindo no desenvolvimento de órgãos artificiais, dispositivos médicos biodegradáveis ou descartáveis, aparelho clínico como próteses vasculares, válvulas cardíacas, bombas de sangue, dialisadores, separadores de plasma entre outros. Os polímeros naturais são cada vez mais utilizados em muitas aplicações tecnológicas por ser obtidos de recursos renováveis e ecológicos (BIERBRAUER et al., 2014; DASH et al., 2011; SINHA & TREHAN, 2003).

A utilização de polímeros não biodegradáveis gera problemas para o sistema de liberação controlada de fármaco, pois estes sistemas podem apresentar toxicidade, sendo também necessária a sua remoção por meio de cirurgia. Outra desvantagem é que a liberação controlada pode não ser alcançada a partir de dispositivos que utilizam estes polímeros. Portanto, há um interesse na utilização de polímeros biodegradáveis, pois, além de apresentar propriedades como: biocompatibilidade, não toxicidade, taxas de degradação controladas, não há necessidade de remoção cirúrgica dos sistemas de liberação (SINHA & TREHAN, 2003; GHANBAR et al., 2013).

Com isso, tem-se utilizado bastante a quitosana que é um polímero biocompatível, recomendado para uma grande variedade de aplicações biomédicas (BIERBRAUER et al., 2014; DASH et al., 2011).

2.6.1 Quitosana

Na década de 1970, foram descobertas várias propriedades interessantes da quitina e quitosana. Em particular, a sua biocompatibilidade e propriedades de cicatrização foram atrativos para uma variedade de aplicações biomédicas, incluindo curativos, fios de suturas, arcabouços de engenharia de tecidos e dispositivos biocompatíveis. A história da quitosana remonta ao século passado, quando se discutia a forma desacetilada da quitina em 1859 (ROLANDI & ROLANDI, 2014; SHUKLA et al., 2013).

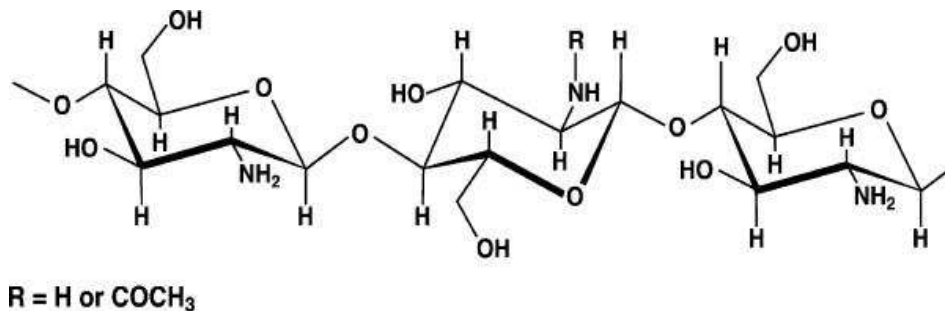


Figura 10 - Estrutura química da quitosana (Mukhopadhyay et al., 2012).

A quitosana é um copolímero composto por N-acetil-2-desoxi-D-glucosamina e 2-amino-2-desoxi-D-glucosamina, (Figura 10), onde os dois tipos de unidades de repetição estão ligadas por (1→4)-β-glicosídica. Estas unidades estão distribuídas em diferentes graus, dependendo das porções acetiladas. A cadeia polimérica da quitosana é do tipo linear e para determinadas aplicações tem sido utilizado agentes reticulantes como; ácido sulfúrico, glutaraldeído, tripolifosfato, genipina entre outros. Assim como a maioria dos polissacarídeos e proteínas, a quitosana é um termoplástico, pois é constituído de cadeias poliméricas individuais que são mantidas juntas por ligações relativamente fracas, como ligações dipolo-dipolo e forças de Van der Waals, podendo ser processado por técnicas usuais como: ser dissolvido em solventes, formar filmes e outros dispositivos (FIDELES, 2010; LAUS et al., 2006; PIAI et al., 2006; TORRES et al., 2006; JAYAKUMAR et al., 2011; DASH et al., 2011).

É uma fibra natural derivada de exoesqueletos de insetos, artrópodes, tais como cascas de crustáceos, mariscos como camarões, caranguejos, e bicos de cefalópodes, bem como as paredes celulares de fungos, sendo assim de grande importância econômica e ambiental, pois as carapaças de crustáceos são resíduos abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira que, em muitos casos, as consideram poluentes. Sua utilização reduz o impacto ambiental causado pelo acúmulo nos locais onde é gerado ou estocado (JAYAKUMAR et al., 2011; DASH et al., 2011; SHUKLA et al., 2013; MENDES et al., 2011).

A quitosana é produzida pela desacetilação da quitina, ou seja, pela remoção de uma porção dos grupos acetamidas por meio da hidratação da quitina (a hidrólise de amida em condições alcalinas (NaOH concentrado) ou por meio de hidrólise enzimática na presença de quitina deacetilase). As condições utilizadas para a desacetilação determinam o peso molecular do polímero e o grau de desacetilação que pode variar entre 70 e 95%, dependendo da metodologia utilizada. Desta forma, quanto à estrutura química, a principal diferença entre a quitina e a quitosana diz respeito à presença do radical acetato, ligado ao radical amino, no carbono 2 que compõe o anel principal da estrutura (CAMPANA-FILHO et al., 2007; SHUKLA et al., 2013).

A Figura 11 apresenta a reação de produção da quitosana através da reação da molécula de quitina com NaOH. Trata-se de uma reação de hidrólise básica de amida, em que a hidroxila da base ataca o carbono da amida (a). Como a reação ocorre em meio aquoso, o nitrogênio captura o íon H^+ do meio, quebrando a ligação entre carbono e nitrogênio (b). Assim, forma-se a estrutura da quitosana, hidróxido de sódio e ácido acético (c) (HENNIG, 2009).

Na quitosana, existe a predominância dos grupos amino caracterizados por ligações covalentes (NH_2) onde a eletronegatividade das ligações gera regiões de alta polaridade. Essa característica estrutural, associada aos grupos acetamida, que também são polares e estão presentes na cadeia polimérica, caracteriza um material com alto grau de afinidade e retenção de água (ASSIS & SILVA, 2003).

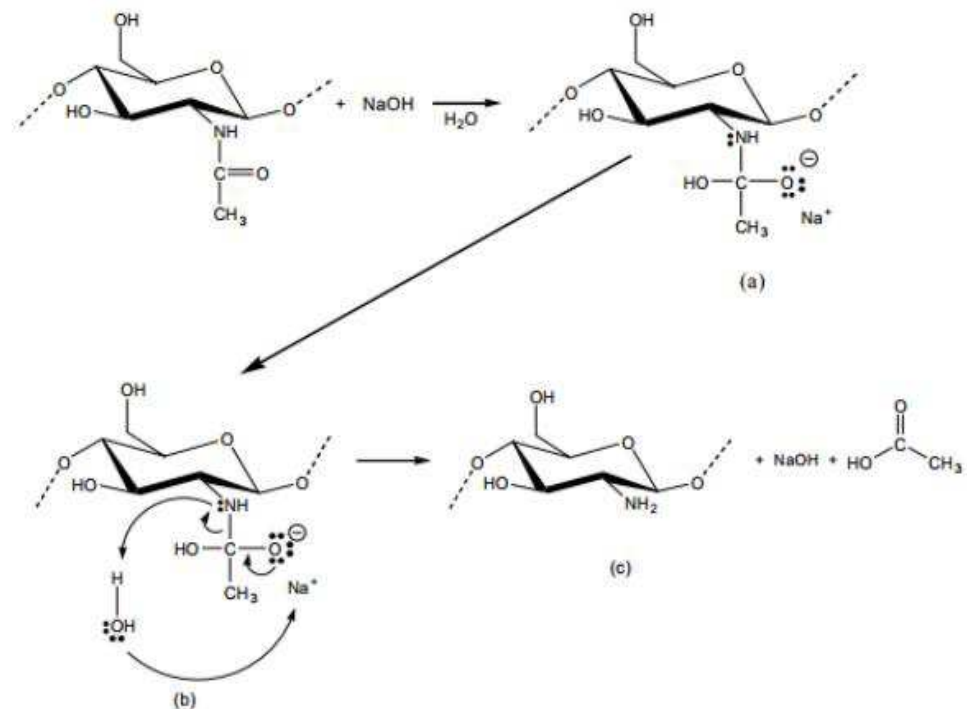


Figura 11 - Reação da produção da quitosana a partir da quitina (Hennig, 2009).

Os grupos amino primários (NH₂) na quitosana são muito úteis em aplicações farmacêuticas, em comparação com outros polímeros naturais. No que diz respeito à solubilidade, a quitosana é facilmente solúvel em soluções ácidas diluídas (pH < 6,0), pois nesta faixa de pH apresenta aminas protonadas e torna-se positivamente carregada tornando a quitosana um polieletrólito catiônico solúvel em soluções aquosas, à medida que o pH aumenta acima de 6, as aminas de quitosana são desprotonadas e o polímero torna-se insolúvel (DAMIAN et al., 2005; DASH et al., 2011).

A transição solúvel e insolúvel ocorre com o pKa em torno de pH entre 6 e 6,5. O ácido acético e o fórmico são os mais usados para a solubilização da quitosana. Alguns ácidos inorgânicos diluídos, tais como: ácido nítrico, clorídrico, perclórico e fosfórico, também podem ser usados para preparar uma dispersão da quitosana, mas somente depois de prolongada agitação e aquecimento (SHUKLA et al., 2013; BALAN & VERESTIUC, 2014).

A quitosana tem sido descrita como semi-cristalina apresentando polimorfismo, dependendo do estado físico. No estado sólido, a quitosana apresenta estrutura semi-cristalina rígida, através de ligações de hidrogênio intra e intermolecular.

A célula unitária ortorrômbica da quitosana com parâmetros de rede $a=0,807\text{nm}$; $b=0,844\text{nm}$ e $c=1,034\text{nm}$ (Figura 12), contém duas cadeias de quitosana antiparalelas. A cristalinidade da quitosana também pode variar consideravelmente dependendo do tratamento do polímero durante a extração e a origem, a quitosana obtida da carapaça de caranguejo possui cristalinidade maior do que a extraída da carapaça de lagosta, que por sua vez é maior do que a de camarão (JÚNIOR, 2008; AZEVEDO et al., 2007; ARANAZ, 2009; RINAUDO, 2006).

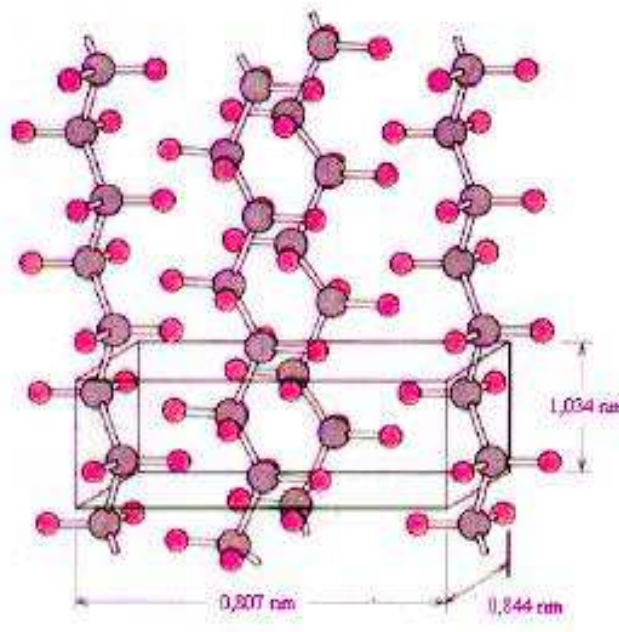


Figura 12 - Célula unitária ortorrômbica da quitosana (Azevedo et al., 2007).

A quitosana pode ser classificada segundo o peso molecular como quitosana de baixa massa molar, menor que 150 KDa, de média massa molar de 150 a 700 KDa e de alta massa molar de 700 a 1000 KDa. A quitosana também é bastante atraente por apresentar características como; biodegradabilidade, funcionalidade, capacidade de processamento, adesão e proliferação de células, atividade anticoagulante, não-tóxica e biologicamente compatível. As modificações feitas na quitosana podem torná-la mais ou menos tóxicas e quaisquer reagentes residuais devem ser cuidadosamente removidos (JAYAKUMAR et al., 2010; YUE, 2014; KEAN & THANOU, 2010).

A atividade antimicrobiana e antifúngica da quitosana ocorre devido a sua natureza policatiônica, a sua ação antimicrobiana pode ser medida pelas forças eletrostáticas entre seus grupos amino protonado (NH_3^+) e os resíduos na superfície das células (ELSABEE & ABDU, 2013).

O número de grupos amino protonados (NH_3^+) presentes na quitosana aumenta com o grau crescente de desacetilação, o que influencia a atividade antimicrobiana (ELSABEE & ABDU, 2013).

Este biopolímero pode ser encontrado em várias formas no que se refere ao peso molecular médio e o grau de desacetilação, e esta diversidade é aumentada exponencialmente pela fácil modificação química da quitosana, que permite sua otimização para diversas aplicações (GNAVI et al., 2013).

Na área biomédica, a quitosana tem sido investigada na cicatrização de ferimentos, curativos, administração de medicamentos, na área de nanobiotecnologia, cirurgia cardiovascular, terapia gênica e engenharia de tecidos. Estudos da quitosana em engenharia de tecidos, tem sido relatada em diversos tecidos, como por exemplo; tecido nervoso, tecido hepático, cartilaginosa e óssea (GNAVI et al., 2013; PARK et al., 2013; THEIN-HAN & MISRA, 2009).

Na área farmacêutica, no contexto de liberação de fármacos, a quitosana tem sido utilizada como um transportador potencial para administração controlada de fármacos específicos e macromoléculas, e em formulações de administração oral, nasal, transdérmica e tópica, e na obtenção de nanopartículas para veiculação de proteínas, vacinas e DNA. A quitosana pode ser obtida na forma de géis, membranas, nanofibras, micropartículas, nanopartículas, arcabouços e esponjas. As micropartículas e nanopartículas à base de quitosana são amplamente utilizadas na concepção de sistemas terapêuticos e tem sido utilizada com sucesso em vários fármacos, como por exemplo; amoxicilina e tetraciclina (KEAN & THANOU, 2010; SINHA et al., 2004; BALAN & VERESTIUC, 2014; LOURENÇO, 2006; JAYAKUMAR, et al, 2010; YUE, 2014; DASH et al., 2011).

No intuito de aumentar a estabilidade química e física da quitosana, têm sido empregadas técnicas de modificação química, dentre elas tem-se a reticulação, onde através dessa técnica pode-se obter um material quimicamente mais resistente ao meio ácido, uma redução da sua capacidade de retenção de água, estabilidade química e térmica, rigidez estrutural, permeabilidade, cor, capacidade de imobilização protéica e celular. As reações envolvidas na reticulação por agentes bifuncionais ocorrem entre os grupos amino e hidroxilas da quitosana (MENDES et al., 2011).

Agentes reticulantes, tais como glutaraldeído, genipina, epícloridrina e ácido sulfúrico, são usados para aumentar a sua estabilidade química e a resistência mecânica (GONSALVES et al., 2011; MENDES et al., 2011; LARANJEIRA & FÁVERE, 2009).

Poon et al., 2014 investigaram o efeito do pH, temperatura e da reticulação na capacidade de adsorção da quitosana reticulada com glutaraldeído.

Já Vimal et al., 2013 estudaram nanopartículas de quitosana/tripolifosfato como uma alternativa para liberação de gene viral por via oral. Li et al., 2015 reticularam membranas de quitosana com genipina com o objetivo de obter um novo suporte para tecidos oculares em cirurgia de reconstrução da superfície.

Kim et al, 2012 obtiveram partículas de quitosana reticulada com epícloridrina, que foram usadas para a remoção do Reactive Black 5.

Cui et al., 2008 investigaram a evolução dinâmica da reação de reticulação quitosana-ácido sulfúrico, e a escala de tempo do tratamento com ácido sulfúrico.

2.6.2 Esferas de Quitosana

Esferas de polímeros biodegradáveis e não biodegradáveis têm sido amplamente utilizadas em aplicações médicas e farmacêuticas como transportadoras eficazes de fármacos encapsulados (BIERBRAUER et al., 2014; DASH et al., 2011).

O uso de fármacos associados a uma matriz baseada em esferas e microesferas permitem a sua liberação no lugar específico do tratamento, através de fatores-chave, que podem ser manipulados para atingir o desejado perfil de liberação como a escolha da formulação de várias combinações do fármaco/polímero, a quantidade do fármaco, a cinética de liberação, o método de microencapsulação, o peso molecular do polímero, a morfologia da partícula (tamanho e forma) e etc. As esferas fabricadas de polímero biodegradável permitem que o fármaco encapsulado seja liberado de maneira controlada, mantendo uma concentração terapêutica constante nos fluidos corporais ao longo de um período desejável (horas ou dias) desde o momento da administração (SINHA et al., 2004; LACERDA et al., 2014; GHANBAR et al., 2013).

Esferas de quitosana são bastante estudadas para liberação de fármaco, obtendo resultados satisfatórios.

Li et al. 2013, obtiveram esferas ocas com base do copolímero quitosana/poli(N-isopropilacrilamida), preparadas para a liberação controlada do fármaco Fluorouracil, onde obteve-se um sistema que pode servir para a liberação controlada de fármacos hidrofílicos a longo prazo.

Yan et al. 2012, estudaram o efeito da liberação de fármacos em microcápsulas nanoporosas fabricados pelo método de camada-a-camada de PLGA e quitosana, com o fármaco Fluorouracil, onde as microcápsulas assumiram uma liberação sustentada, especialmente numa solução ácida, podendo chegar a liberação de 93% para cerca de 53 horas a pH fisiológico.

Shanmuganathan et al. 2008, desenvolveram microesferas de quitosana carregadas com doxiciclina, utilizando a técnica de água-em-óleo envolvendo também a técnica de gelificação iônica, onde obtiveram uma liberação brusca de 42% em 6 horas e mantida uma concentração de equilíbrio de 72% em 24 horas.

Alguns fatores afetam a eficácia de encapsulação do fármaco nas esferas de quitosana como: a natureza do fármaco; a concentração de quitosana; a relação de polímero/fármaco; a velocidade de mistura e etc. Geralmente, a quitosana de baixa massa molar apresenta uma menor eficiência de encapsulação. No entanto, as concentrações mais elevadas tornam as soluções altamente viscosas sendo difíceis de processar. Normalmente, a carga do fármaco é adicionada em sistemas a partir de um dos dois métodos; a incorporação do fármaco durante a preparação das partículas e, após a formação das partículas por incubação do fármaco com as partículas. Em ambos os sistemas, o fármaco é fisicamente incorporado na matriz, bem como adsorvida à superfície. Os fármacos solúveis em água são geralmente incorporados através da mistura com uma solução aquosa de quitosana para formar uma mistura homogênea, seguindo-se a produção de partículas tal como descrito. Fármacos insolúveis em água e os que precipitam em soluções ácidas são geralmente carregados por incubação que envolve a imersão das partículas pré-formadas em uma solução saturada do fármaco (SINHA et al., 2004; MITRA & DEY, 2011; DASH et al., 2011).

Diferentes métodos têm sido utilizados para preparar esferas de quitosana, dentre eles tem-se; separação de fase (coacervação), técnica de evaporação/extração de solventes, a técnica de reticulação por emulsão, secagem por pulverização e gelificação ionotrópica.

2.6.3 Coacervação (Separação de fases)

A coacervação é definida como a separação dos sistemas coloidais em duas fases líquidas, podendo ser distinguida a partir de precipitação, a qual é observada sob a forma de produto coagulado ou flocos e ocorre em sistemas coloidais instáveis. Entretanto, este processo apresenta algumas desvantagens como: presença de solvente residual nas microesferas, várias etapas de processamento e o pouco controle sobre a distribuição do diâmetro das partículas, podendo também existir aglomeração caso não haja um estabilizador (JAEGHERE et al., 2013; MARTIN, 2014; GHANBAR et al., 2013).

2.6.4 Técnica de evaporação/extração de solventes

A preparação de microesferas, pela técnica de extração/evaporação do solvente, consiste basicamente em quatro etapas principais. A primeira consiste inicialmente na dissolução ou dispersão do composto bioativo, que ocorre geralmente num solvente orgânico contendo o material que irá formar a matriz, seguida da segunda etapa que consiste na emulsificação desta fase orgânica em uma fase contínua (geralmente aquosa), a terceira parte da extração do solvente da fase dispersa, para a fase contínua, que pode ou não haver a evaporação do solvente, resultando na precipitação das partículas do polímero, na quarta e última etapa as micropartículas são separadas da fase contínua através da filtração, e em seguida são lavadas com um solvente adequado (FREITAS et al., 2005; NILKUMHANG & BASIT, 2009).

2.6.5 Secagem por pulverização (Spray drying)

A técnica de secagem por pulverização, envolve a evaporação do solvente, a partir de uma solução ou suspensão que contém os sólidos utilizando um gás quente para transformar as gotículas em partículas secas. A secagem por pulverização é realizada em uma torre, em que a solução ou suspensão é pulverizada em pequenas gotículas. As gotículas entram em contato com uma corrente ou fluxo de gás quente em contracorrente e, simultaneamente, muda o calor, a massa e a força, o que resulta na formação de partículas sólidas (DASH et al., 2011).

As principais desvantagens dessa técnica é a grande perda de material, devido a adesão do mesmo na parede da câmara de evaporação e a formação de muitos agregados, resultados da viscosidade que a microesferas apresentam antes da remoção total do solvente (MARTIN, 2014).

2.6.6 Reticulação por Emulsão

Este método, utiliza o grupo reativo funcional (amina) da quitosana para reticular com os grupos reativos disponíveis no agente de ligação cruzada. Um surfactante adequado é usado para estabilizar as gotículas aquosas, posteriormente a emulsão estável é reticulada por meio de um agente de reticulação adequado para enrijecer as gotículas. As microesferas são filtradas e lavadas várias vezes com álcool e em seguida, são secas. Este método é útil para controlar o tamanho das partículas (DASH et al., 2011; LOURENÇO 2006).

2.6.7 Geleificação Ionotrópica

Uma propriedade interessante da quitosana é sua capacidade de formar gel ao entrar em contato com ânions especiais, um processo conhecido como gelificação ionotrópica. Este processo de gelificação ocorre devido à formação de ligações cruzadas inter e intramolecular nas cadeias do polímero (HAMIDI et al., 2008).

Na técnica de gelificação ionotrópica, a quitosana é dissolvida numa solução ácida aquosa, tornando-a solúvel. Esta solução é então injetada através de uma seringa com agulha, gota a gota, e ficam dispersas numa solução coagulante, sob agitação constante. A reação entre as espécies de cargas opostas faz com que a quitosana se submeta a gelificação iónotrópica, precipitando na forma de partículas esféricas na solução coagulante (DASH et al., 2011). No método de gelificação ionotrópica, a solução de coagulante é um dos parâmetros importantes. O glutaraldeído, etileno-glicol éter diglicidílico e TPP, são utilizados como agentes de reticulação para a formação de microesferas de quitosana. Os resultados revelaram que o etileno-glicol éter diglicidílico e o glutaraldeído não são agentes de ligação ideal, devido à sua toxicidade fisiológica (MA & LIU, 2010).

Em contraste, o TPP é um agente de ligação cruzada não-tóxico, onde os grupos de moléculas negativamente carregadas de TPP pode reagir com grupos amino de quitosana carregadas positivamente (MA & LIU, 2010).

Ma & Liu 2010, obtiveram pelo método de gelificação ionotrópica, microesferas de quitosana carregadas com albumina de soro bovino. Onde os resultados apresentaram que as microesferas mostraram boa esfericidade e dispersibilidade, quando a mistura de tripolifosfato de sódio (TPP) e etanol foi aplicado como solução coagulante. Os resultados indicaram que o método de gelificação ionotrópica é um método eficaz para a fabricação de microesferas de quitosana para a liberação prolongada de proteínas.

A técnica de gelificação iónotropica para preparar microesferas de quitosana tem atraído muita atenção, uma vez que o processo é muito simples, por isso, muitos pesquisadores têm explorado o seu potencial farmacêutico (FREITAS et al., 2005).

2.7 Arcabouços

Os dois componentes essenciais para a regeneração de novos tecidos são as células e as estruturas tridimensionais. As células com os arcabouços constituem o “protótipo” do tecido vivo para gerar e sintetizar matrizes. Os arcabouços fornecem um ambiente propício para facilitar o desenvolvimento celular (adesão, proliferação e diferenciação) conseqüentemente, permitem que as células realizem sua função de forma eficaz (LIU et al, 2007; ZHAO, 2013).

Nos últimos anos, arcabouços para a engenharia de tecidos têm atraído cada vez mais atenção na medicina, devido à sua capacidade de permitir que células humanas saudáveis possam crescer em sua estrutura, *in vitro* ou *in vivo*, para efeitos de reparação, restauração ou manutenção das funções de tecidos danificados ou doentes. Como definição, pode-se dizer que os arcabouços são sólidos tridimensionais que fornecem o suporte necessário para a fixação, proliferação, diferenciação e orientação das células, a fim de permitir o crescimento do tecido semelhante. Estas estruturas mimetizam o comportamento de uma matriz extracelular para proporcionar o meio biomecânico apropriado para a diferenciação celular e o crescimento do tecido (CUI et al., 2012; MITSUISHI et al., 2013; BERNER et al., 2014).

Arcabouços para engenharia de tecidos são geralmente feitos de materiais biocompatíveis, biodegradáveis e bioabsorvíveis com estruturas porosas e interligadas para transporte de nutrientes e resíduos. A quitosana e o colágeno desnaturado (gelatina) são utilizados como materiais porosos para a fabricação de arcabouços na reparação de tecidos, devido a sua abundância em tecidos vivos, o colágeno é utilizado em várias aplicações de restauração ao longo da história médica, porém, hoje tem sido muito utilizado na engenharia de tecidos e na medicina regenerativa (CUI et al., 2012; LIU et al., 2007; WALTERS & STEGEMANN, 2014). Vários tipos de polímeros sintéticos também são utilizado para a fabricação dos arcabouços como; o Poli ácido láctico-(PLA) (SERRA et al., 2013), Poli (ácido láctico-ácido glicólico) (PLAGA) (JIANG et al., 2006), Quitosana (LI et al., 2014a), Poliuretano-(PU) (SIN et al., 2010), Poli (etileno glicol)-(PEG) (NIU et al., 2014), Poli caprolactona-(PCL) (JEONG & HOLLISTER, 2010) e Poli (láctido-co-glicólido) - (PLGA) (QIAN et al., 2014), que apresenta biocompatibilidade semelhantes a do PLA e PGA, mas uma taxa de degradação mais baixa. Estes materiais são aplicáveis em diversas áreas regenerativas por oferecem uma menor resposta inflamatória no hospedeiro, e degradarem em componentes não-citotóxicos que são reabsorvidos e eliminados pelo organismo (MARTIN et al., 2014; PAWELEC et al., 2014).

2.7.1 Estrutura Tridimensional dos Arcabouços

Para ser utilizado *in vivo*, os arcabouços devem apresentar características como: ser biocompatível e biodegradável, apresentar características mecânicas adequadas ao meio de implantação a fim de fornece o suporte necessário para que as células possam aderir e proliferar, levando a uma maior regeneração de tecidos, deve ter uma boa quantidade e interligação dos poros. A interação entre as células e o arcabouço regula a formação e regeneração do tecido, facilitando a taxa de sobrevivência celular por migração, proliferação e diferenciação (CHOA et al., 2014; JAYAKUMAR, et al., 2011; BERNER et al., 2014). Durante o processo de regeneração, as células aderem e começa o processo de proliferação, inicia a divisão e a produção da nova matriz extracelular, a porosidade e a rugosidade da superfície são benéficas para o crescimento e adesão celular (CHOA et al., 2014; JAYAKUMAR, et al., 2011; BERNER et al., 2014; SOUSA et al., 2013).

A arquitetura dessas estruturas é um fator que deve ser analisado pois define a estrutura do biomaterial a uma certa escala de comprimento do tecido, esta estrutura também desempenha um papel significativo na determinação da taxa e o grau de crescimento do tecido, as características de poros (porosidade, tamanho, forma e orientação) promove a migração de células através dos poros, com espaço suficiente para o transporte de nutrientes, infiltração de tecido e vascularização final. Assim, é importante analisar não apenas a interação entre células e o material utilizado, mas também a arquitetura da estrutura formada, a fim de obter uma melhor estrutura para a cultivação e crescimento de células e sua posterior utilização na engenharia de tecidos (BERNER et al., 2014; WANG et al., 2013, PAWELEC et al., 2014). A estrutura do poro dos arcabouços geralmente afeta a migração celular, e todo o processo de formação do tecido. E além disso, cada célula apresenta um tamanho diferente, e conseqüentemente, necessita de um tamanho de poros maior ou menor (DU et al., 2014).

2.7.2 Técnicas de Fabricação dos Arcabouços

Arcabouços de quitosana vem sendo fabricados por diversas técnicas como: pelo método de liofilização, formação de espumas, lixiviação, separação de fase, por eletrospinning e pelo método de agregação de partículas que baseia-se na aglomeração de esferas de quitosana.

2.7.3 Método de Agregação de Partícula

O processo de fabricação consiste inicialmente na extrusão das esferas, seguida da formação do arcabouço por aglomeração das esferas, que ocorre pelo enchimento aleatório de esferas pré-fabricadas (KUCHARSKA et al., 2010; KHANG et al., 2006).

A estabilidade mecânica é assegurada pela aderência de partículas e pela interface entre as partículas obtidas. O tamanho dos poros e a porosidade pode ser manipulada através do controle do diâmetro das esferas (KUCHARSKA et al., 2010; KHANG et al., 2006).

Malafaya et al., 2009 utilizaram a metodologia de agregação das partículas na obtenção de arcabouços em bicamada, com objetivo de ter uma melhoria da interface do osso e da cartilagem, utilizando um biocompósito de quitosana com hidroxiapatita.

Cruz et al., 2013 desenvolveram arcabouços tridimensional a partir da aglomeração de micropartículas à base de gelatina por meio de um processo de centrifugação suave.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

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

3.1 Materiais

- Quitosana em pó, de médio peso molecular, adquirido pela Sigma-Aldrich, com grau de desacetilação entre 75 – 85%;
- Curcumina Longa, adquirido pela Sigma-Aldrich;
- Sulfato de Sódio; adquirido pela Nuclear (Na_2SO);
- Ácido Acético Glacial, P.A. ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$), peso molecular 60,05 g/mol, adquirido pela Sigma-Aldrich;
- Metanol, adquirido pela Neon;
- Tampão de Fosfato Salino (PBS), adquirido pela Sigma-Aldrich;
- Gelatina Porcina tipo A, adquirido pela Sigma-Aldrich;
- Genipina, adquirido pela Sigma-Aldrich.

3.2 Metodologia

As Figuras 13 e 14 ilustram os fluxogramas das metodologias utilizada para adição do fármaco, nas esferas de quitosana.

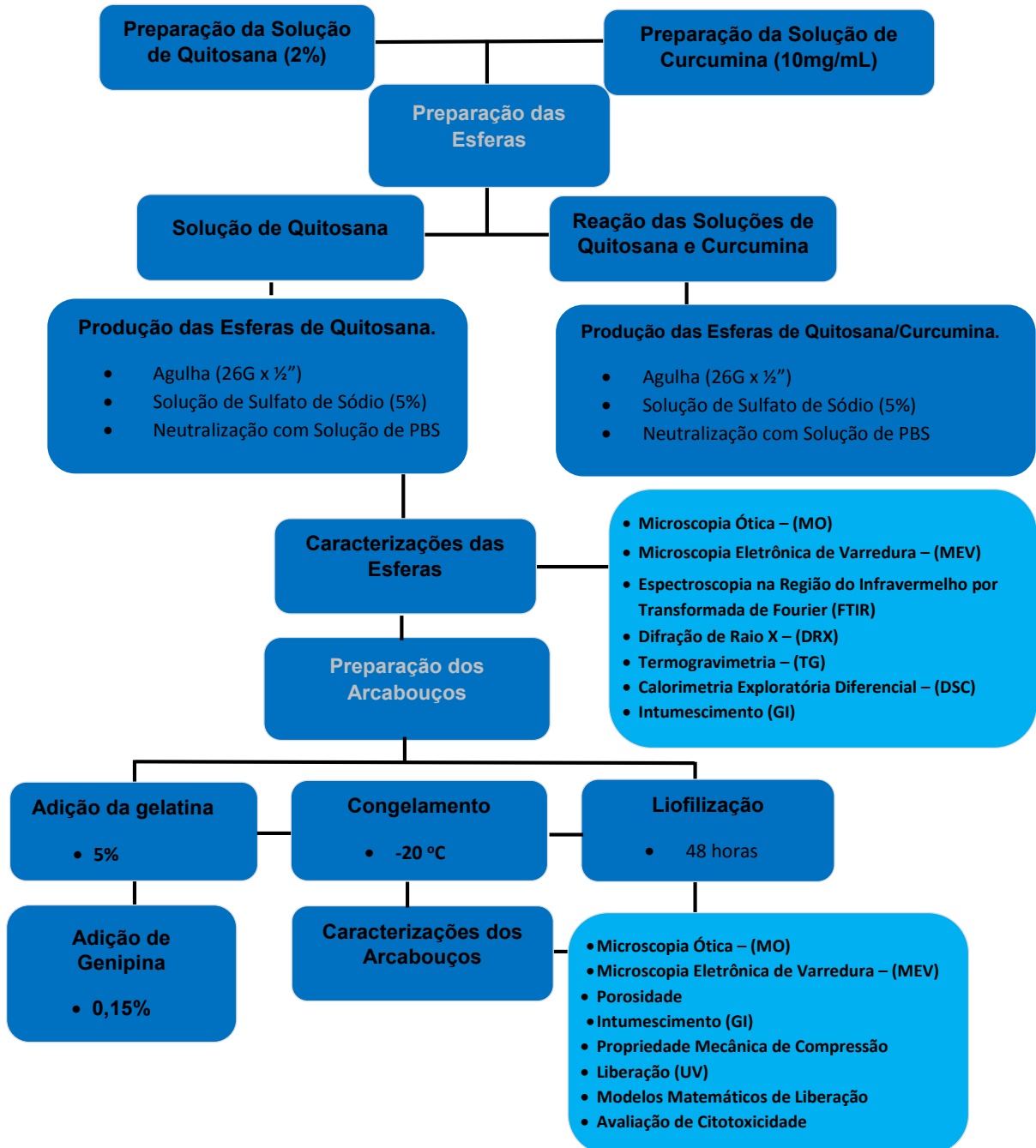


Figura 13 - Fluxograma dos arcabouços de quitosana e quitosana/curcumina.

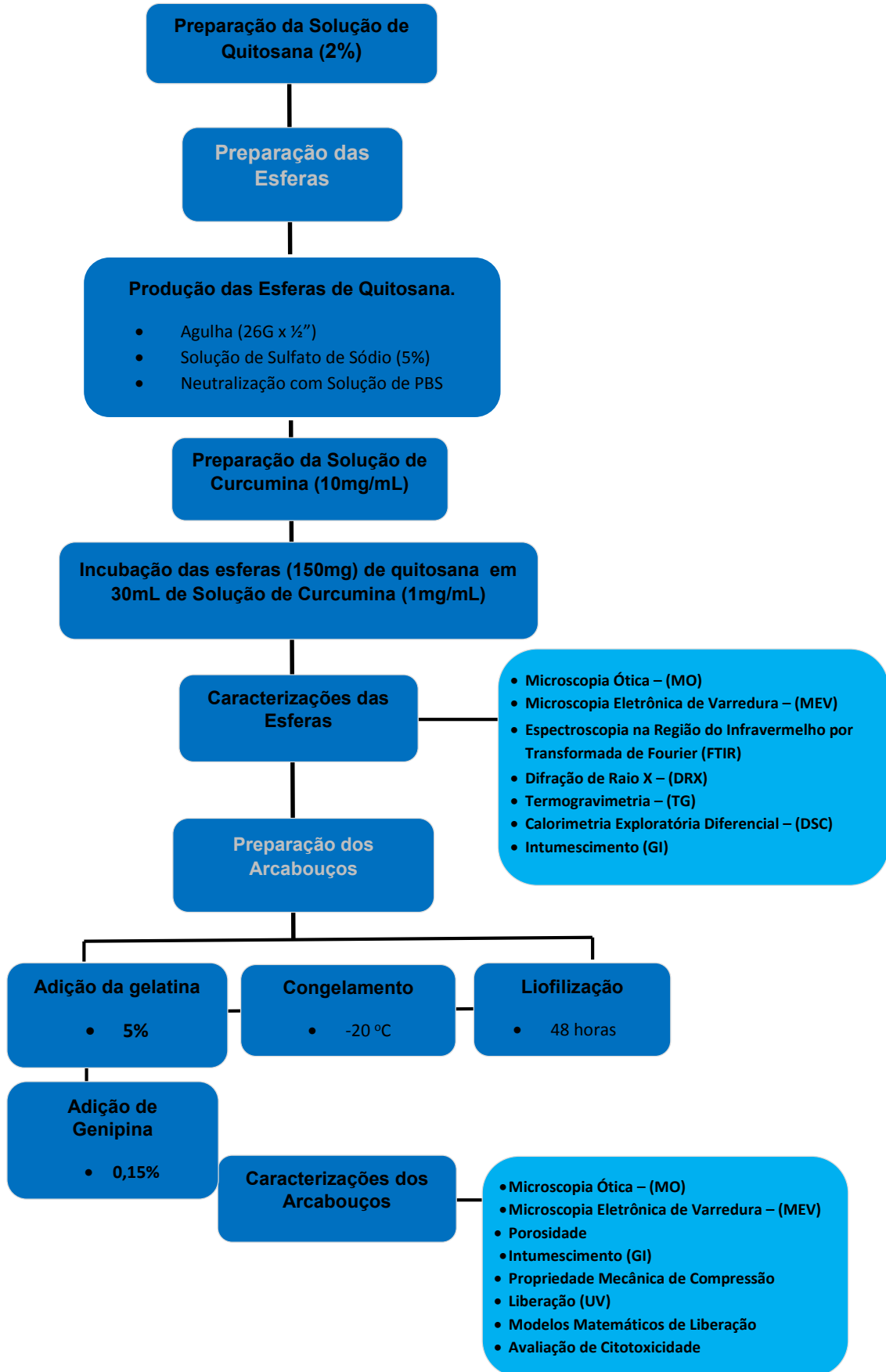


Figura 14 - Fluxograma dos arcabouços quitosana/curcumina (adsorção).

3.2.1 Preparação da solução de quitosana

A solução de quitosana (2%) foi preparada por meio da dissolução do polímero na forma de pó com uma solução de ácido acético (1%), com agitação mecânica constante a temperatura ambiente por cerca de 24 horas.

3.2.2 Preparação da solução de quitosana/curcumina.

Para se obter a solução de quitosana/curcumina, o pó de curcumina foi inicialmente dissolvido em metanol (10 mg/mL), com agitação mecânica por 1 hora, após isto, a solução permaneceu por 3 hora no banho de ultrassom, (Figura 15 (a)). Em seguida, a solução de curcumina (10 mL), foi incorporada à solução de quitosana (50mL), (Figura 15 (b)), sob agitação mecânica constante por 30 minutos até se obter a homogeneidade do sistema.

A quantidade de fármaco utilizada nesta metodologia de reação de quitosana/curcumina, foi baseada e adaptada de acordo com a utilizada por Mondal et al. 2013, que desenvolveram uma formulação, utilizando uma solução de curcumina (10 mg/mL), obtendo propriedades significativas de inibição de crescimento de tumor

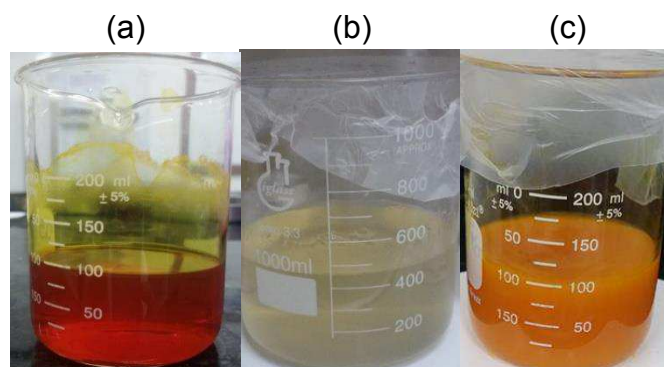


Figura 15 - Processo de obtenção da solução de quitosana/curcumina, (Figura 15 (a)) solução de curcumina, (Figura 15 (b)) solução de quitosana e (Figura 15 (c)) solução de quitosana/curcumina.

3.2.3 Preparação das esferas de quitosana e quitosana/curcumina.

As esferas foram obtidas a partir do método de gelificação ionotrópica, a partir do gotejamento da solução de quitosana ou quitosana/curcumina, por meio de uma seringa de 5 mL acoplada com uma agulha de dimensões 0,45 mm x 13 mm (26Gx $\frac{1}{2}$ "). O gotejamento ocorreu com o auxílio de uma bomba de infusão, com uma razão de 26 mL/h em uma solução coagulante de sulfato de sódio (5%*m/v*). Após a produção as esferas ficaram imersas por cerca de 1 hora. Em seguida as esferas foram lavadas com uma solução de PBS.

De acordo com Catão 2012, este método utilizando agulha de 0,45 mm x 13 mm (26 Gx $\frac{1}{2}$ "), resulta em esferas com diâmetro menor, (quando comparada com os métodos utilizando bureta, seringa sem agulha e bomba peristáltica), uma vez que quanto menor a área superficial relativa a uma mesma massa, maior a interação (adsorção).

3.2.4 Preparação das esferas de quitosana/curcumina obtidas pelo método de adsorção.

Neste método, a incorporação da curcumina nas esferas de quitosana ocorreu pelo método de adsorção. Após a preparação da solução alcoólica de curcumina, as esferas de quitosana foram pesadas (150 mg), e adicionadas em 30 mL de solução de curcumina (1 mg/mL), protegidas da luz, por 24 horas, sob agitação constante de 80 rpm, em temperatura ambiente. Após o tempo de contato com a solução, as esferas foram filtradas e o excesso de fármaco presente na superfície da esfera foi retirado. Em seguida as esferas foram acomodadas em tubos falcon de 50 mL, e congeladas a aproximadamente -20°C e liofilizadas por 48 horas.

3.2.5 Preparação da solução de gelatina

Para a preparação de 5% de gelatina porcina foi preparada uma solução a partir de 5g de gelatina em pó dissolvidos em 100 mL de água destilada em um agitador magnético por cerca de 30 minutos a 60°C.

3.2.6 Preparação da solução de gelatina reticulada

Foi utilizada a genipina para reticular a gelatina utilizada na agregação das esferas para obtenção dos arcabouços, com o objetivo de observar a influência da reticulação nas propriedades mecânicas, grau de intumescimento, porosidade e principalmente no perfil de liberação do fármaco. Para isto utilizou-se 0,15% de genipina na gelatina porcina (Figura 16). A solução permaneceu em agitação magnética por aproximadamente de 12 horas a 50°C. O indicativo que a reação de reticulação ocorreu é a mudança para a coloração azul da solução.



Figura 16 - Solução de gelatina com genipina.

3.2.7 Preparação dos arcabouços

Para a obtenção dos arcabouços, as esferas de quitosana, quitosana/curcumina e quitosana/curcumina (adsorção) produzidas, foram transferidas para tubos falcon de 50 mL, seguida da adição de uma solução de gelatina (5%) com e sem genipina (0,15%), para ocorrer a adesão entre as partículas. Em seguida foram congeladas a aproximadamente -20°C, liofilizadas por 48 horas, produzindo o arcabouço.

As Figuras 17 e 18 apresentam um esquema representativo da produção dos arcabouços.

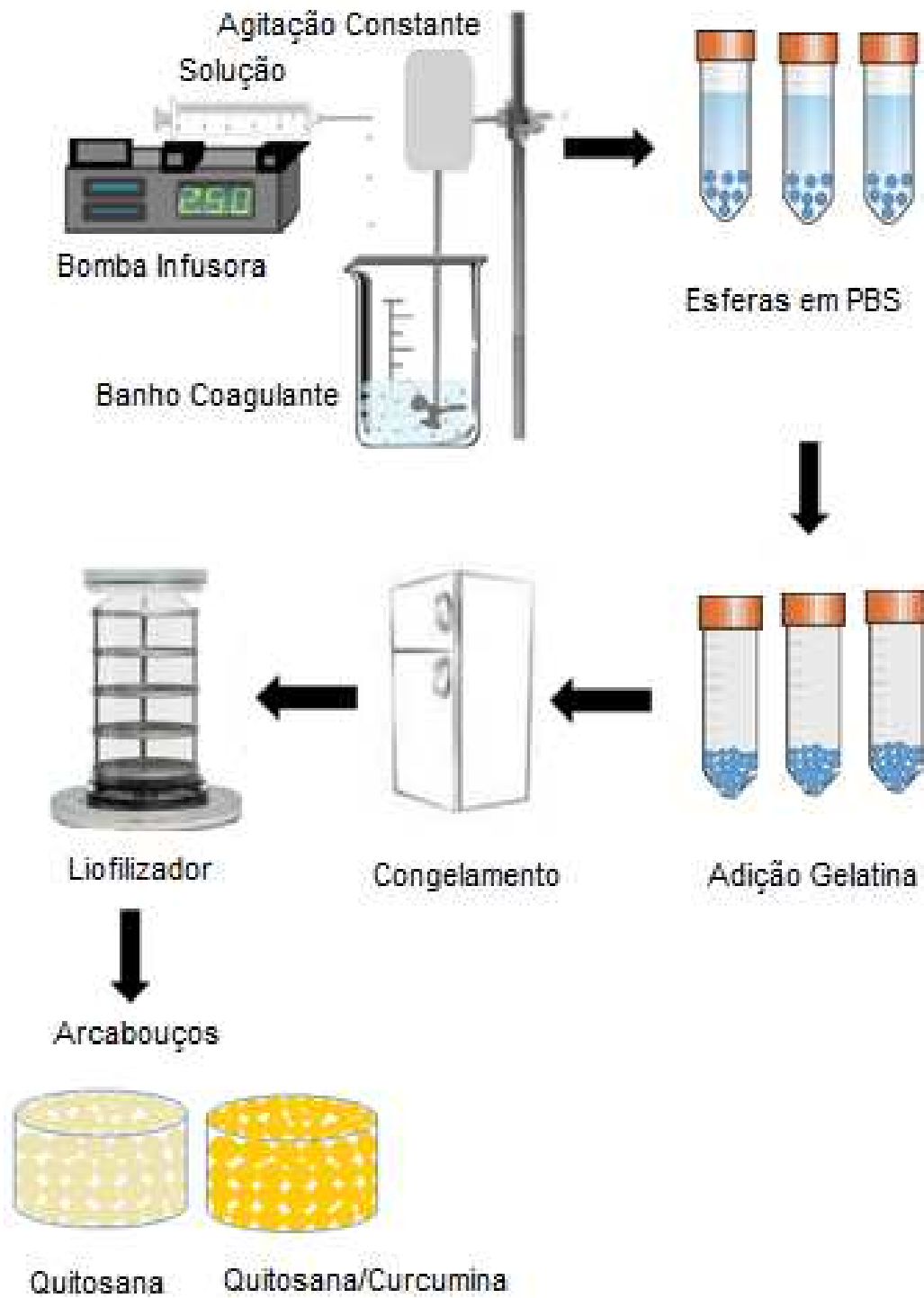


Figura 17 - Esquema representativo da produção dos arcabouços quitosana e quitosana/curcumina.

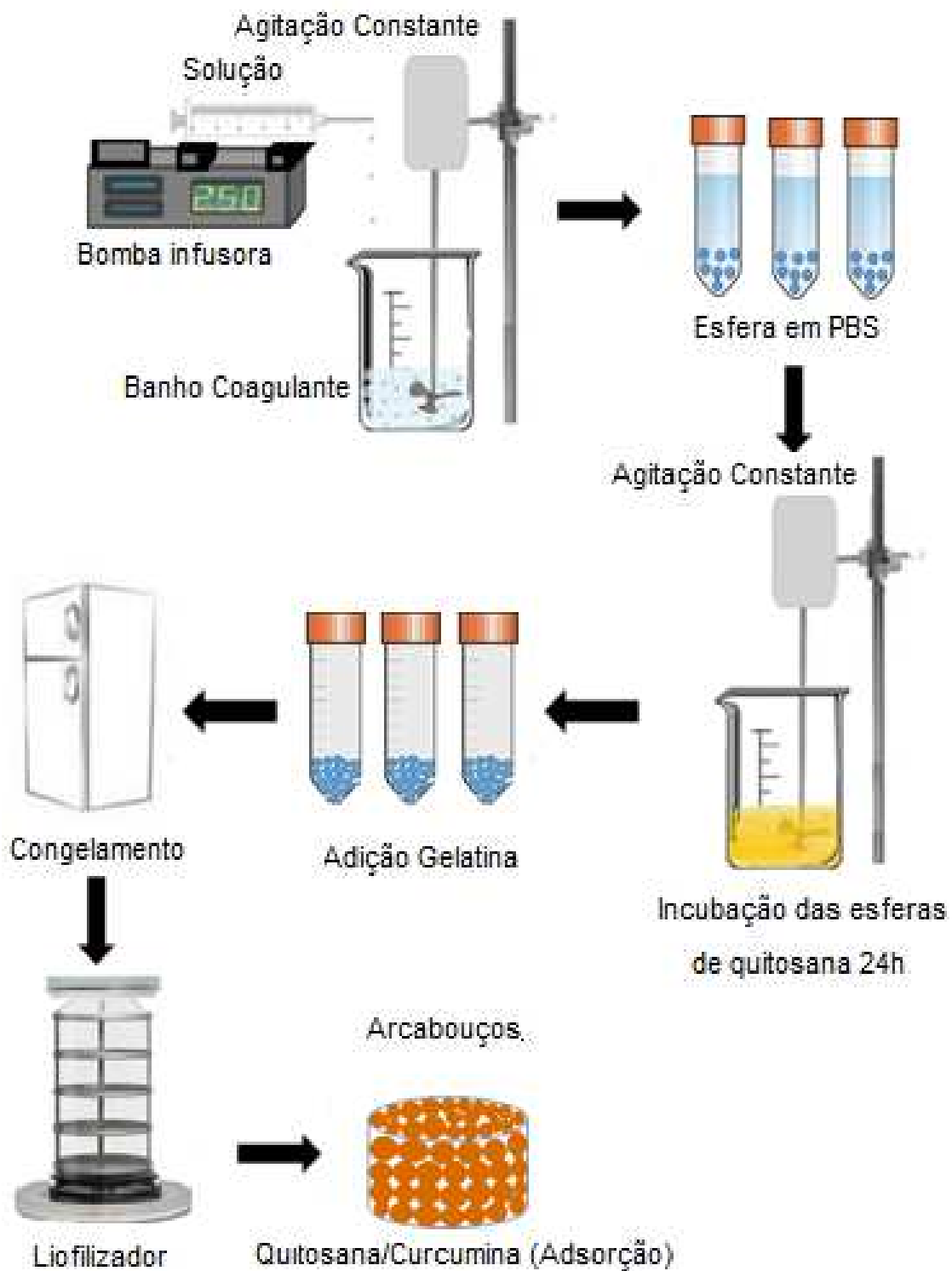


Figura 18 - Esquema representativo da produção dos arcabouços quitosana/ curcumina (adsorção), pelo método de adsorção.

3.2.8 Normas Utilizadas

Para a obtenção dos arcabouços e realização das caracterizações foram utilizadas as seguintes normas:

- **ASTM F2150 - 13:** Standard Guide for Characterization and Testing of Biomaterial Scaffolds Used in Tissue-Engineered Medical Products.
- **ASTM F2450 - 10:** Standard Guide for Assessing Microstructure of Polymeric Scaffolds for Use in Tissue-Engineered Medical Products.
- **ASTM D570:** Standard Test Method for Water Absorption of Plastics.
- **ASTM D695:** Standard Test Method for Compressive Properties of Rigid Plastics.
- **ASTM D1621-10:** Standard Test Method for Compressive Properties of Rigid Cellular Plastics.
- **ISO 10993-5:2009:** Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity
- **Resolução ANVISA:** RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

3.2.9 Caracterizações Realizadas

3.2.9.1 Microscopia Ótica (MO)

A técnica por microscopia ótica, foi utilizada para avaliar a morfologia das esferas e dos arcabouços obtidos, em um Microscópio Óptico Hirox de reflexão e transmissão com acessórios 2D e variação de 50X-400X, acoplado a uma estação de análise de imagens.

3.2.9.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para realização das análises foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura de bancada, modelo TM-1000, marca Hitachi, com aumento de até 10000x, profundidade de foco de 1mm, resolução de 30nm, 15KV, baixo vácuo e pressão variada (1 a 270Pa), sem recobrimento metálico. O MEV foi utilizado para identificar a morfologia da superfície e da estrutura formada o tamanho, a forma e a distribuição dos poros.

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

As amostras foram submetidas a técnica de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), em temperatura ambiente, o equipamento utilizado foi o Spectrum 400 da Perkin Elmer. A técnica FTIR foi realizada para identificar as bandas características dos grupos funcionais presentes nas amostras, utilizando a faixa de varredura de 4000 a 650 cm^{-1} . As amostras foram classificadas granulometricamente em #325. Utilizou-se o dispositivo ATR (attenuated total reflectance), que se traduz por um emissor de infravermelho na ponta de um diamante que é comprimido no material, dispensando assim a produção de pastilhas de KBr.

3.2.9.4 Porosidade

As porosidades de todos os arcabouços foram determinadas a partir de três métodos. O primeiro método foi calculado a partir da Equação (12), utilizando a densidade do arcabouço e da quitosana (ρ =Densidade da quitosana 0,3g/cm³ – SIGMA ALDRICH), conforme apresentado por Ikeda et al., 2009.

O método descrito pela Equação (13) apresenta m_1 , referente a massa úmida do arcabouço, e m_2 a massa seca em função do volume calculado da estrutura e V_{cal} , corresponde ao volume da estrutura (OLAD & AZHAR, 2014). O outro método, Equação (14), foi utilizado por Guan, 2005, onde a porosidade foi determinada utilizando um método de deslocamento de líquido, utilizou-se água destilada como líquido de deslocamento, o arcabouço foi imerso em um cilindro com um volume conhecido de água V_1 . A amostra foi mantida durante 20 minutos, e em seguida, pressionado para forçar o ar permitindo que a água penetrasse nos poros. O volume total de água com o arcabouço foi registrado como V_2 . O material impregnado com água foi retirado do cilindro e o volume residual foi registado como V_3 .

$$\pi = 1 - \frac{\rho_{arcabouço}}{\rho_{quitosana}} \quad (12)$$

$$P\% = \frac{m_1 - m_2}{V_{cal}} \quad (13)$$

$$p = \frac{V_1 - V_3}{V_2 - V_3} \times 100 \quad (14)$$

3.2.9.5 Difração de Raios X (DRX)

A difração de raios X foi utilizada com o objetivo de visualizar as fases presentes nos arcabouços da quitosana e quando adicionado o fármaco, as amostras foram classificadas granulometricamente em #325. A análise foi realizada em um difratômetro da SHIMADZU (modelo XRD 7000) com varredura angular $5^\circ < 2\theta < 60^\circ$, tensão de 40kV e corrente de 30mA, utilizando-se radiação de $K\alpha$ do Cobre ($\lambda = 1,5418$).

3.2.9.6 Termogravimetria (TG)

A análise de termogravimetria foi utilizada com o objetivo de avaliar a estabilidade térmica dos arcabouços, e o comportamento da quitosana quando adicionado a curcumina. As amostras foram trituradas e classificadas granulometricamente em #325. As análises foram realizadas em uma taxa de aquecimento 10°C/min até 600°C, atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50mL.min¹, utilizando cadinho de alumínio, no equipamento TGA 50H, Shimadzu.

3.2.9.7 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise de Calorimetria Exploratória Diferencial, foi realizada no equipamento DSC 8500 Perkin Elmer, com o objetivo de observar as transições de fases, e avaliar as possíveis mudanças nas propriedades das amostras de quitosana e quitosana/curcumina e se ocorreram interações químicas entre a quitosana e a curcumina.

As amostras foram trituradas e classificadas granulometricamente em #325. Utilizou-se para a realização do ensaio uma faixa de temperatura de 0 a 400°C, com razão de aquecimento de 10°C/min, em atmosfera de nitrogênio, com fluxo de 10 mL/min. Foi utilizada massa de 1,5 ± 0,10 mg acondicionada em cadinho alumínio.

3.2.9.8 Propriedades Mecânicas (Compressão)

Os arcabouços foram ensaiados através de testes de compressão, obtendo o limite máximo de resistência e o percentual de deformação máxima. O ensaio foi realizado no equipamento de ensaio universal INSTRON 3366. As matrizes cilíndricas com dimensões de 20 mm de diâmetro e 10 mm de altura foram submetidas ao ensaio, utilizando uma célula de carga de 500 N, com velocidade de ensaio de 1,3 mm/min.

Como não foi encontrada uma norma específica para as amostras, utilizou-se a norma ASTM D695 (Standard Test Method for Compressive Properties of Rigid Plastics) e com algumas adaptações, conforme Mendonça et al., 2012 e Lemos et al., 2012 e a norma ASTM D1621-10 (Standard Test Method for Compressive Properties of Rigid Cellular Plastics).

A Figura 19 apresenta a curva de tensão-deformação de compressão de um sólido celular.

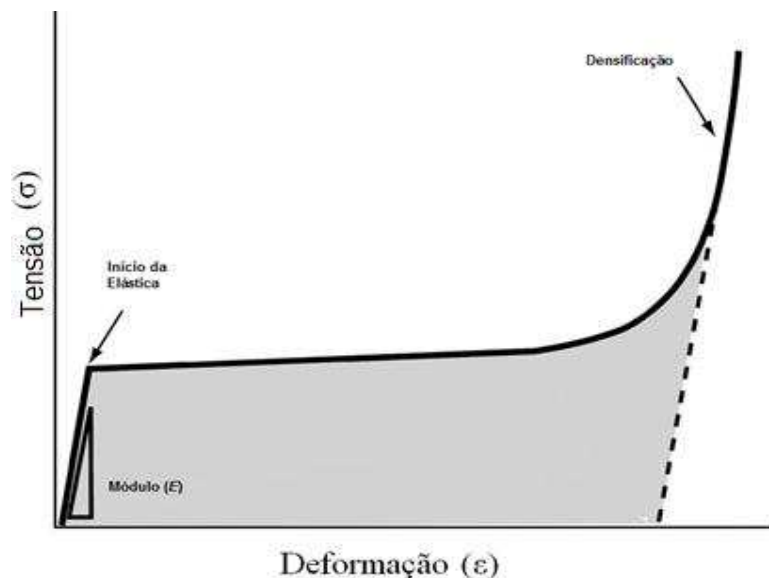


Figura 19 - Curva de tensão-deformação de compressão de um sólido celular (Ashby, 2006).

De acordo com a Figura 19, é possível observar a região elástica linear, com um módulo (E) até ao seu limite elástico, no ponto em que as arestas do sólido celular deformam plasticamente, ou fraturam. Na região seguinte a estrutura continua a entrar em colapso com uma tensão quase constante (“tensão platô”) até que os lados opostos dos poros colidam. A última região é caracterizada pelo aumento acentuado da tensão (“região de densificação”), onde os poros são completamente colapsados (ASHBY, 2006).

3.2.9.9 Grau de Intumescimento (GI)

Este ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar a absorção do PBS em meio fisiológico pelas esferas e os arcabouços de quitosana, quitosana/curcumina e quitosana/curcumina (adsorção). As esferas e os arcabouços foram inicialmente pesados e mantidos no PBS. Em intervalos de tempo pré-determinado as amostras foram retiradas da solução e secas superficialmente em papel filtro, para retirar o excesso de solução e pesadas novamente. O grau de intumescimento de cada amostra no tempo t , foi calculado, de acordo com a Equação (15).

$$GI = \frac{W_t - W_o}{W_o} \times 100 \quad (15)$$

Onde; Wt: é o peso da amostra no tempo t

Wo: é o peso inicial da amostra.

3.2.9.10 Validação do Método

Para a validação foi utilizado espectrofotômetro de UV/Vis da Perkin-Elmer, modelo Lambda 35, empregando-se uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 1,0 cm, com o objetivo de validação do método apresentado.

Inicialmente preparou-se uma solução-mãe dissolvendo 1 mg de curcumina em 1 mL de metanol. Esta solução foi então diluída diferentes soluções: 0,0015; 0,031; 0,062; 0,125; 0,5; 3; 5; 7; 8 e 10 µg/mL em metanol, com objetivo de preparar a curva de calibração.

Para validação do método verificou-se as características de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ), adequados à análise, conforme RE nº 899/2003.

3.2.9.10.1 Seletividade e Especificidade

Estes parâmetros foram analisados a partir da leitura em UV/VIS dos arcabouços, comparando o comprimento de onda das amostras com e sem o fármaco, com o objetivo de verificar que os comprimentos de onda dos excipientes presentes nos arcabouços não interferiam no comprimento de onda do fármaco.

3.2.9.10.2 Linearidade e Intervalo

Obteve-se estes parâmetros de linearidade através do coeficiente de correlação obtido pela a curva padrão.

3.2.9.10.3 Exatidão

A exatidão do método foi obtida através da Equação 2.

3.2.9.10.4 Precisão

A precisão foi calculada a partir da Equação 3.

3.2.9.10.5 Robustez

A robustez foi avaliada a partir da mudança das condições analíticas, contudo foi utilizado solvente, (metanol) de dois fabricantes diferentes e outro tipo de solvente (acetona).

3.2.9.10.6 Limite de Quantificação e Detecção

Os limites de quantificação e detecção foram determinados a partir das Equações 4 e 5.

3.2.9.11 Liberação da Curcumina

Para o ensaio de liberação, os arcabouços com 0,35 g cada, foram imersos em 60 mL de PBS, decorridos os intervalos de tempo pré-determinados alíquotas da solução foram retiradas, e analisada no equipamento de UV-VIS da Perkin-Elmer, modelo Lambda 35, foi utilizado empregando-se uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 1,0 cm.

3.2.9.12 Cinética de Liberação

A cinética de liberação do fármaco e os mecanismos foram investigados a partir dos modelos matemáticos, de Ordem Zero (Equação 8), Modelo de Higuchi (Equação 9) e modelo de Korsmeyer-Peppas (Equação 10), com o auxílio do programa Excel.

3.2.9.13 Citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade foram realizados com a finalidade avaliar a resposta celular dos arcabouços de quitosana, quitosana reticulada, quitosana/curcumina, quitosana/curcumina-reticulada, quitosana/curcumina (adsorção) e quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada, que foram avaliadas seguindo a norma ISO 10993-

5, através da determinação da porcentagem da viabilidade celular, utilizando o método da redução do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], que estabelece uma correlação entre a atividade metabólica celular e o número de células viáveis em cultura in vitro.

Neste ensaio, o MTT é acumulado pelas células por endocitose e a redução do anel tetrazólico deste sal resulta na formação de cristais de formazan de cor azul que se acumulam em compartimentos endossomais e/ou lisossomais, sendo depois transportados para fora das células por exocitose.

Sendo a endocitose um mecanismo fundamental das células vivas, o ensaio do MTT tem sido usado frequentemente como ensaio de viabilidade celular.

Para avaliação da citotoxicidade de todos os arcabouços estudados, foram utilizados a linha celular L929 e a linha celular cancerígena MCF-7. Foi utilizada uma concentração de 5×10^5 células/mL RPMI e adicionados 100 μ L em uma placa de 96 poços. A placa foi transferida para a estufa de CO₂ (5%) a 37 °C por 1 hora. Após este período, foram adicionadas as amostras e mais 200 μ L de RPMI 1640-C. RPMI 1640-C foi utilizado como controle negativo. A placa foi incubada novamente em estufa de CO₂ (5%) a 37°C por 24 horas. Após as 24 horas, foram adicionados 100 μ L de solução de MTT (0,5mg/mL) em RPMI 1640-C. Novamente, as placas foram incubadas em estufa de CO₂ (5%) a 37°C por 3 horas. Depois disso, o sobrenadante foi descartado e adicionado 100 μ L de álcool isopropílico. A leitura da densidade ótica foi determinada em um leitor de microplacas (Victor3 – PerkinElmer), a 540 nm com filtro de referência de 620 nm. A viabilidade celular foi calculada em porcentagem, considerando o controle negativo com 100% de viabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.

4.1 Resultados das Esferas

4.1.1 Microscopia Ótica

A técnica de Microscopia Ótica foi utilizada com objetivo de avaliar macroscopicamente as esferas. As Figuras 20 (a) e (b) mostram as análises das esferas de quitosana e quitosana/curcumina, respectivamente, que foram obtidas a partir do método de geleificação ionotrópica.

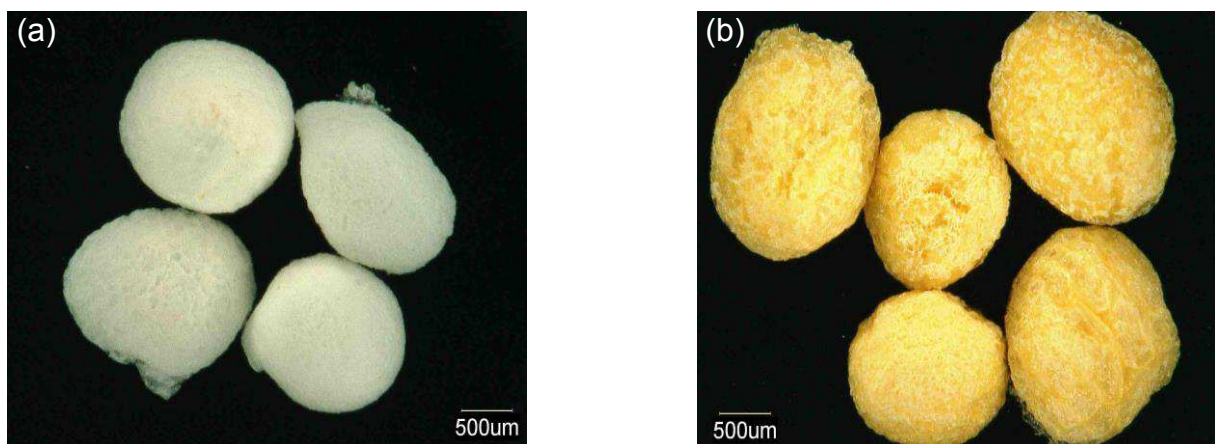


Figura 20 - Imagens obtidas por microscopia ótica das (a) esferas de quitosana aumento de 60x e (b) quitosana/curcumina aumento de 60x.

É possível observar que as esferas com o fármaco incorporado, apresentam uma maior rugosidade superficial do que as esferas de quitosana.

Verifica-se também que provavelmente a inclusão do fármaco (curcumina) ocasionou um discreto aumento do diâmetro das partículas. Pois se considerado o desvio, os tamanhos das esferas são praticamente iguais. Sendo o diâmetro médio de $1490,63 \mu\text{m} \pm 119,05$ para as esferas de quitosana e de $1592,66 \mu\text{m} \pm 171$ para as esferas de quitosana/curcumina. Morais et al. 2008, obteve esferas de quitosana, produzidas pelo método de gelificação ionotrópica com diâmetro médio de 2000-3000 μm , utilizando uma agulha hipodérmica ($0,7 \times 25 \text{ mm}^2$), onde as gotículas formadas foram coletadas em uma solução de NaOH (10%) e em seguida reticuladas com glutaraldeído.

Análogo aos resultados obtidos neste trabalho, Santos et al. 2003, em seu trabalho incorporou o fármaco (insulina) em esferas de quitosana, e observou um aumento no diâmetro das esferas com a insulina. Outra afirmação importante apresentada em seu trabalho é que o aumento na concentração da solução de quitosana gera partículas com um diâmetro médio maior, resultando também em partículas esféricas mais definidas e com aspecto menos rugoso, contribuindo para o aspecto menos poroso. De acordo com Bitencourt 2013, a incorporação de substâncias ativas pode influenciar na estrutura superficial e interna dos materiais devido a diversos fatores como, tamanho, peso molecular, interações com a matriz polimérica, dentre outros.

A Figura 21 apresenta as imagens obtidas pela microscopia ótica das esferas de quitosana e quitosana/curcumina.

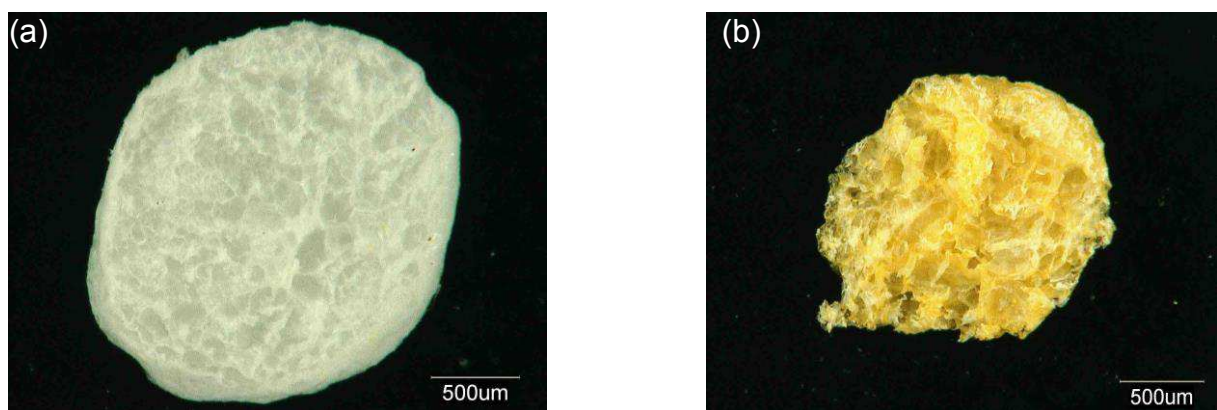


Figura 21 - Imagens obtidas por microscopia ótica da seção transversal das (a) esferas de quitosana aumento de 100x e (b) quitosana/curcumina aumento de 100x.

Imagens do corte da seção transversal (Figura 21) de uma esfera foi obtida para as amostras de quitosana (Figura (a)) e quitosana/curcumina (Figura (b)), onde verificou-se poros internos de maior dimensão para a amostra de quitosana/curcumina, e poros mais homogêneos e menores foram vistos na amostra de quitosana.

A Figura 22, apresenta a Microscopia Ótica da região externa, e a Figura 23, da região interna, das esferas de quitosana/curcumina (adsorção).

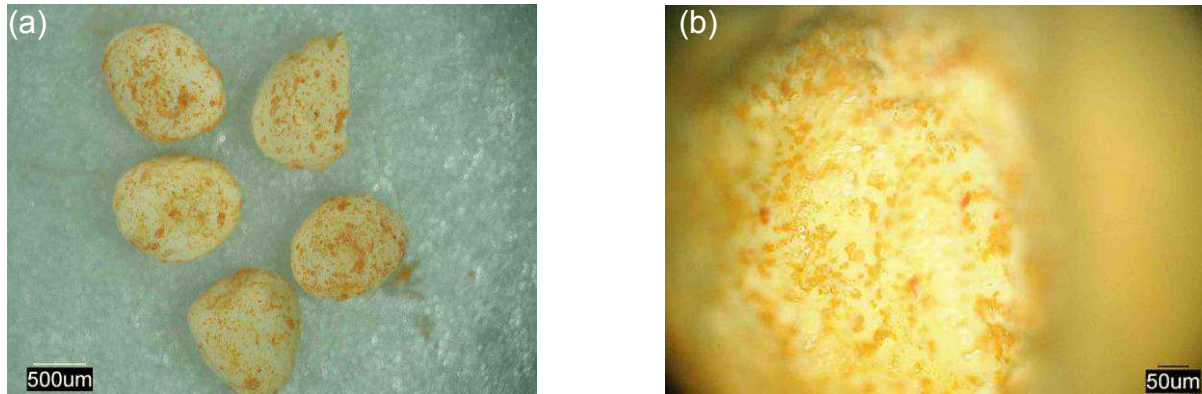


Figura 22 - Imagens obtidas por microscopia ótica referente a região externa (a) esferas de quitosana/curcumina (adsorção) aumento de 60x e (b) com aumento de 350x.

A partir da Figura 22 (a) é possível perceber a superfície das esferas com pontos alaranjados, correspondente ao fármaco adsorvido. Ainda é possível verificar que estes pontos contendo o princípio ativo, estão bem dispersos, Figura 22(b).

Tem-se o diâmetro médio das partículas de $1155,8 \mu\text{m} \pm 125,13$. Portanto tem-se que a inclusão do fármaco pelo método de adsorção nas partículas de quitosana ocasionou numa diminuição discreta no diâmetro das esferas, quando comparada com as esferas de quitosana.

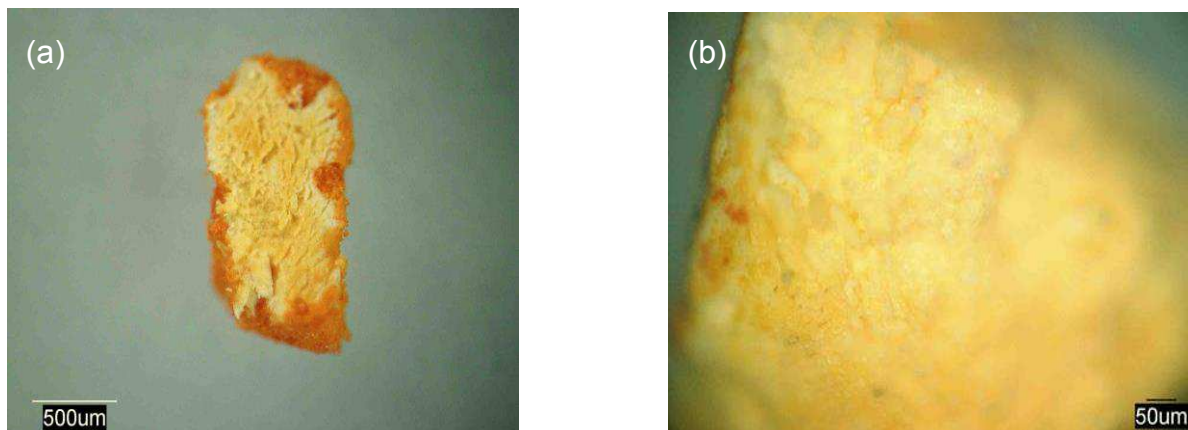


Figura 23 - Imagens obtidas por microscopia ótica referente a região interna das esferas de quitosana/curcumina (adsorção) (a) com aumento de 100x e (b) com aumento de 350x.

Na imagem da região interna da esfera (Figura 23(a e b)), obtida a partir do corte na seção transversal, verifica-se o núcleo com cor alaranjada menos intensa e mais homogênea do que a coloração apresentada na superfície onde o fármaco se encontra de forma pontual, confirmando assim a presença e a boa distribuição do fármaco no interior das esferas. Estes resultados comprovam que a técnica de adsorção utilizada para introduzir a curcumina em esferas de quitosana foi efetiva. Observa-se também a presença de poros de tamanhos variados no interior da esfera (Figura 23 (b)).

Na Figura 24 (a), tem-se a imagem das esferas de quitosana/curcumina (adsorção), (na forma de pó #325), onde observa-se pontos de cor alaranjada, devido a presença do fármaco. Verifica-se de forma detalhada a presença da curcumina envolvida na quitosana, indicando assim uma boa interação entre a o fármaco e a quitosana. Já na Figura 24 (b), percebe-se que a introdução do solvente em grande quantidade provocou o intumescimento, seguido da ruptura da esfera. Ocasionalmente assim, posteriormente a liberação do fármaco, observa-se que o extravasamento da curcumina ocorreu pela região fissurada da esfera. Corroborando assim com dados obtidos na literatura onde a liberação do fármaco em microesferas ocorre em duas etapas.

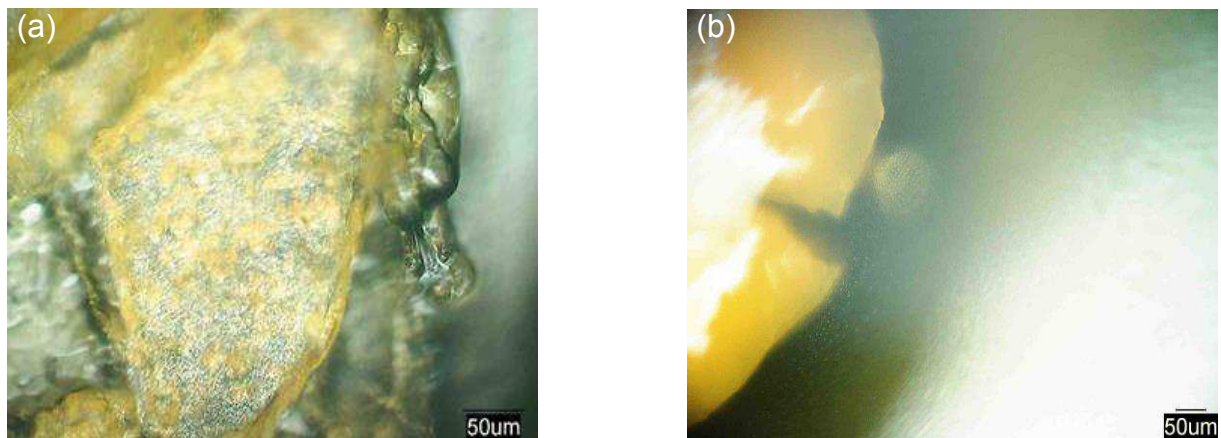


Figura 24 - Imagens obtidas por microscopia ótica (a) do pó de quitosana/curcumina(adsorção), com aumento de 700x, e (b) imagem da esfera de quitosana/curcumina(adsorção) na presença do solvente (metanol), com aumento de 350x.

Onde a primeira etapa é caracterizada pelo intumescimento da esfera, posteriormente com o relaxamento e intumescimento da matriz polimérica, ocorre o segundo estágio que é a difusão do fármaco presente nas partículas (PARIZE, 2009).

4.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi utilizada para avaliar a forma e a superfície do pó da curcumina e das esferas de quitosana, quitosana/curcumina e quitosana/curcumina (adsorção).

A morfologia do pó de curcumina foi observada por Microscopia Eletrônica de Varredura (Figura 25), onde foi possível verificar uma estrutura retangular na forma de agulhas com bordas irregulares de tamanhos variados, tem-se também a presença de aglomerados de partículas menores, conforme relatado por Arun et al, 2012 e Arya & Pathak 2014.

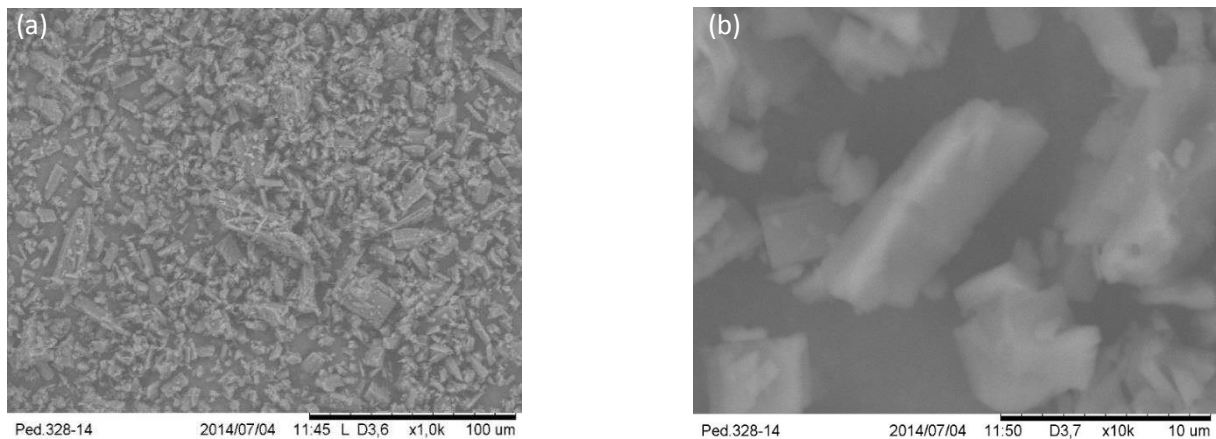


Figura 25 - Micrografias do pó da curcumina. (a) aumento de 100x e (b) aumento de 10000X.

Na Figura 26, tem-se a micrografia das esferas de quitosana e quitosana/curcumina obtidas pelo método de gelificação ionotrópica, onde a partir desta técnica é possível obter partículas esféricas.

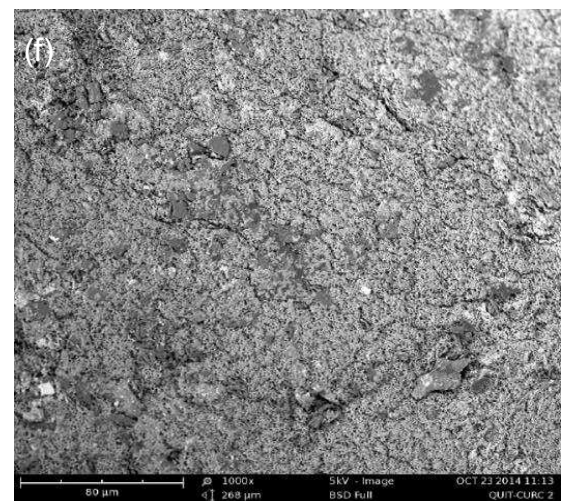
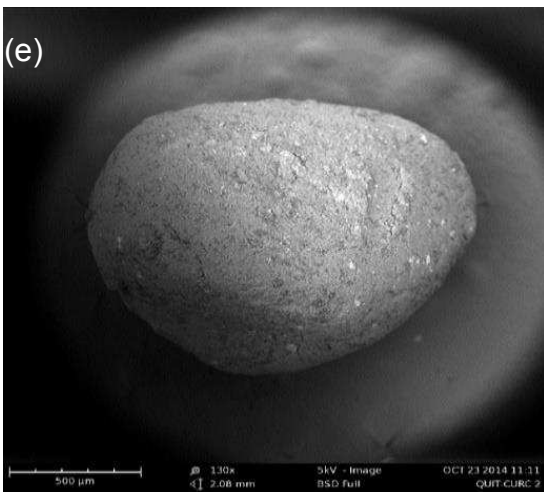
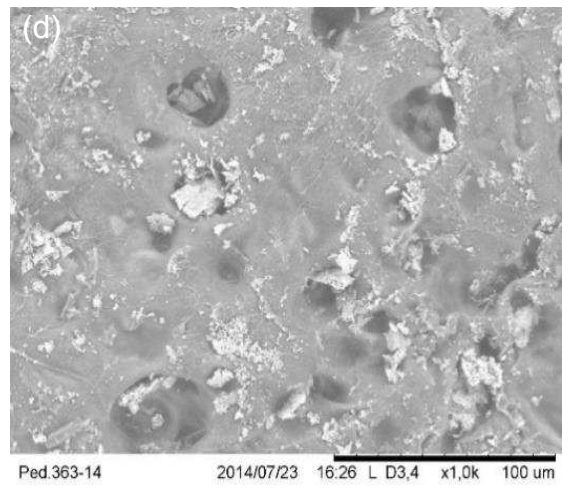
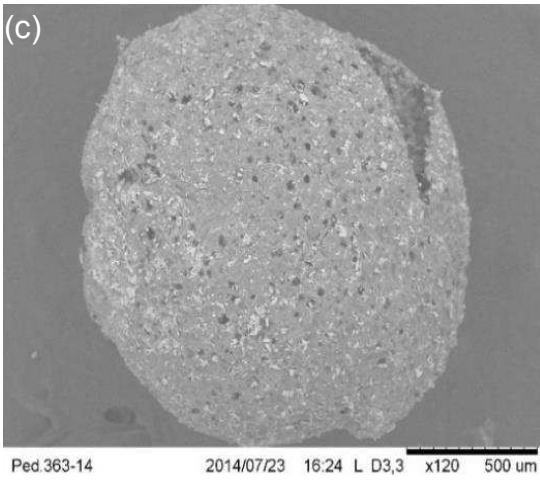
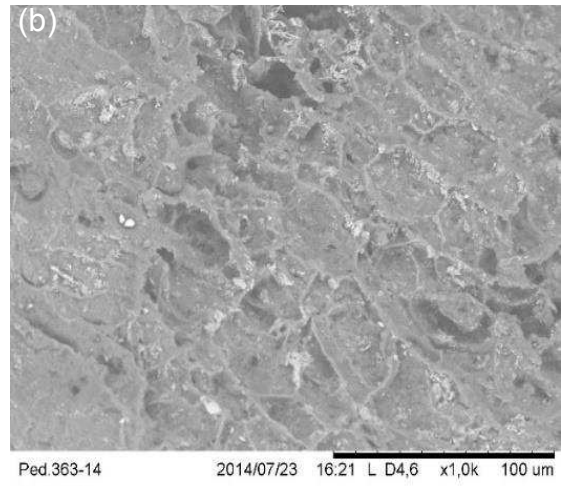
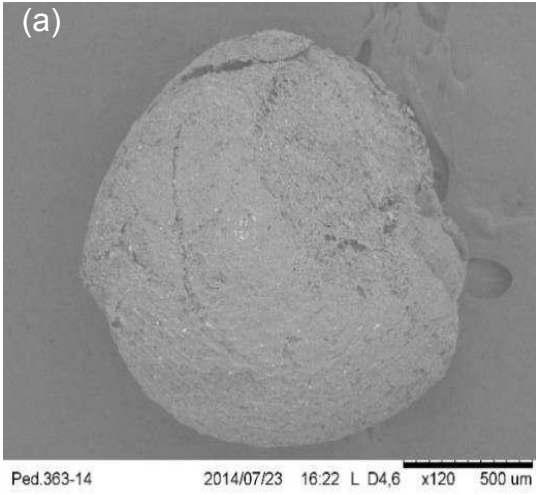




Figura 26 - Micrografias (a) da esfera de quitosana (aumento de 120x), (b) superfície da esfera de quitosana (aumento de 1000X), (c) da esfera de quitosana/curcumina (aumento de 120x), (d) superfície da esfera de quitosana/curcumina (aumento de 1000X), (e) da esfera de quitosana/curcumina (adsorção) (aumento de 130x), (f) superfície da esfera de quitosana/curcumina (adsorção) (aumento de 1000x), e (g) parte interna da esfera de quitosana/curcumina (adsorção) (aumento de 10000x).

A partir da micrografia das esferas de quitosana (Figura 26 (a)), verifica-se esferas com diâmetro médio de $1480 \mu\text{m} \pm 90,0$ ($n=6$), corroborando com os diâmetros obtidos por Microscopia Ótica, verifica-se também a presença de rugosidade em sua superfície.

Para as esferas de quitosana/curcumina obtida pela mistura de soluções (Figura 26 (c)), foi observada a imagem ampliada de uma única esfera, onde percebe-se a esfericidade da partícula com diâmetro médio igual a $1520 \mu\text{m} \pm 66,7$ ($n=6$), corroborando também com as imagens de Microscopia ótica.

É possível observar ainda, uma superfície rugosa apresentando vários poros dispersos com diâmetros médio de $25,40 \mu\text{m} \pm 3,03$ ($n=6$), provavelmente o surgimento desses poros, ocorreram devido a evaporação da solução alcoólica utilizada na preparação da solução de curcumina. A presença destes poros poderá ocasionar uma liberação mais rápida (Figura 26 (d)). Setthacheewakul et al. 2010, obtiveram partículas esféricas de curcumina, obtidas por microemulsões de água em óleo, onde observaram que a superfície das esferas apresenta pequenos orifícios, o que provavelmente permite a entrada de uma fase aquosa para dentro da matriz, e/ou permitir a difusão do líquido aprisionado, para fora da superfície.

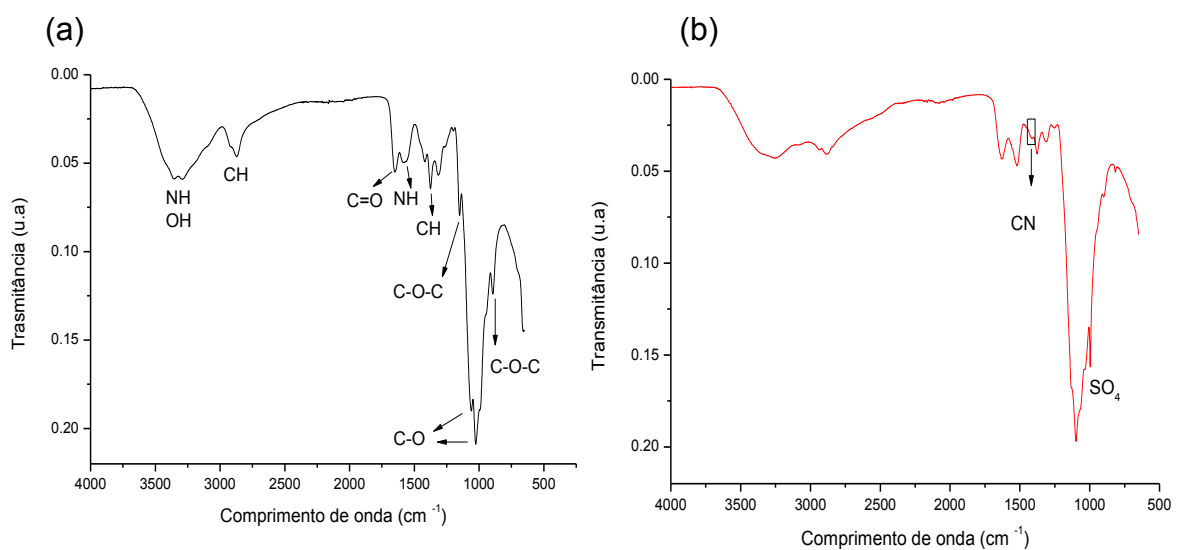
As Figuras 26 (e) e (f) apresentam as esferas de quitosana/curcumina obtidas pelo método de adsorção, onde é possível observar partícula esférica com formato achatado, apresentando diâmetro médio de $1255 \mu\text{m} \pm 140,6$ ($n=6$). Verifica-se também na Figura 26 (f) uma superfície bastante porosa e rugosa com a presença de pontos escuros, atribuído à curcumina, conforme visto pela Microscopia ótica.

Ao comparar o diâmetro médio das esferas tem-se que o menor diâmetro foi encontrado para as esferas obtidas pelo método de absorção, conforme os valores obtidos pela Microscopia Ótica.

A partir da Figura 26 (g) verifica-se a parte interna da esfera onde tem-se a presença da curcumina com estrutura retangular na forma de agulhas, conforme apresentado na micrografia do pó da curcumina (Figura 27).

4.1.3 Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier

Na Figura 27, tem-se o espectro de FTIR da quitosana em pó, da esfera de quitosana, curcumina em pó, da esfera quitosana/curcumina e da esfera quitosana/curcumina (adsorção), respectivamente.



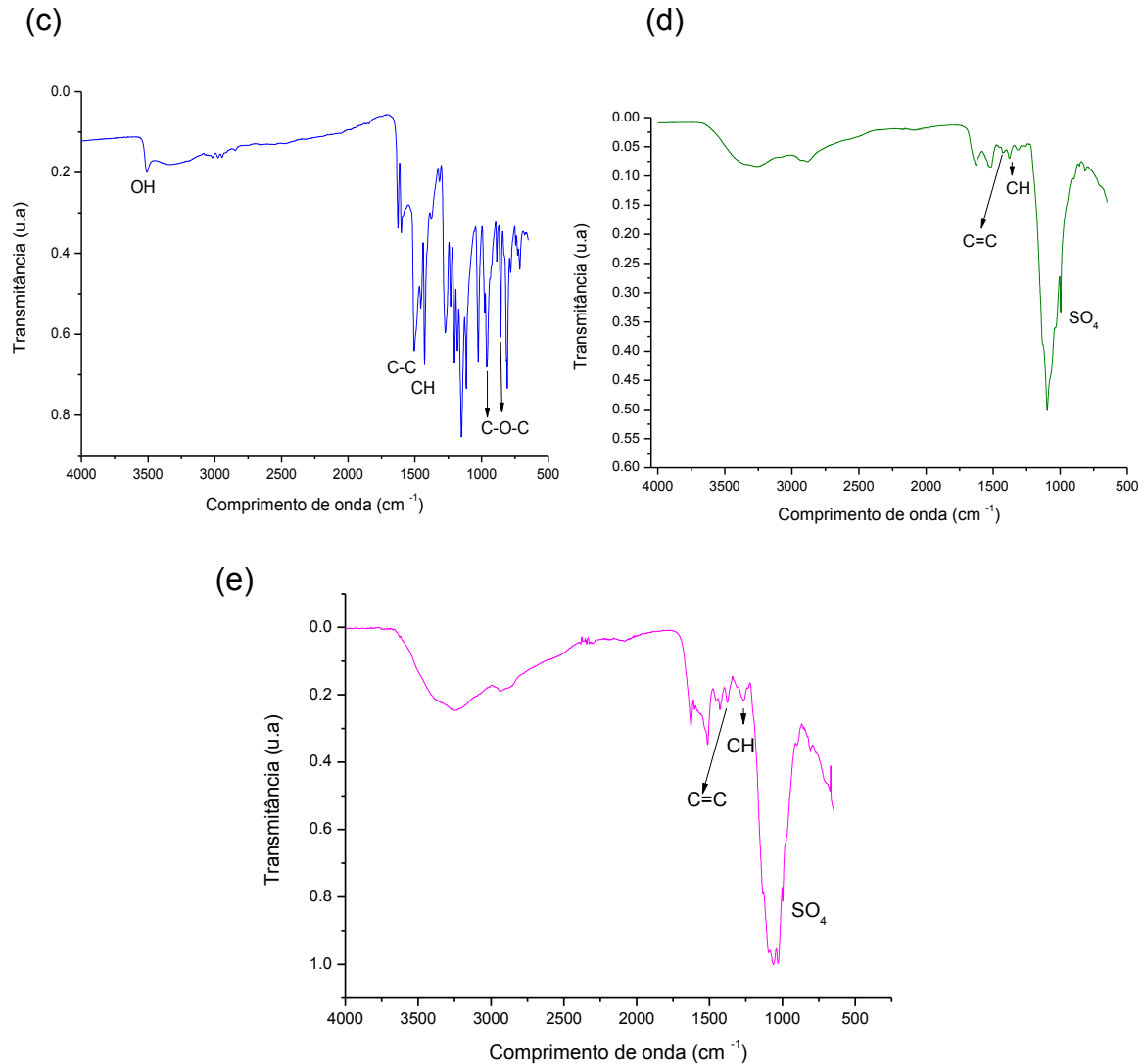


Figura 27 - FTIR da (a) quitosana em pó, (b) esfera quitosana, (c) curcumina em pó (d) esfera quitosana/curcumina e do (e) esfera quitosana/curcumina (adsorção).

No espectro da quitosana em pó (Figura 27 (a)), as principais bandas observadas foram: as bandas nas regiões de 890 e 1146 cm^{-1} atribuídas ao alongamento C-O-C; 1020 a 1100 cm^{-1} amino (CN) correspondente as aminas alifáticas; as regiões em 1065 e 1022 cm^{-1} refere-se ao grupo (C-O); as deformações axiais de grupos entre 1323 a 1379 cm^{-1} e deformação angular simétrica do CH_3 em 1379 cm^{-1} . Na região da banda 1411 cm^{-1} e 1599 cm^{-1} a vibração é atribuída à deformação do grupo amina (NH); e amida em 1600-1670 cm^{-1} .

A banda localizada na região de 1646 cm^{-1} corresponde a absorção do C=O da amida, relativas ao alongamento dos grupos carbonilas ($-\text{NHCOCH}_3$), indicando que a quitosana não está completamente desacetilada; em 1568 cm^{-1} tem-se a banda

referente ao grupo amina (NH_2), em 1380 cm^{-1} tem-se a região que corresponde ao grupo (CH); em 2900 cm^{-1} a vibração é atribuída ao estiramento CH. A região localizada entre 3665 a 3000 cm^{-1} é atribuída as vibrações de estiramento dos grupos OH e NH. Na região de 3264 a 2918 cm^{-1} ao estiramento axial do OH, sobreposta a banda de estiramento e NH, devido à formação de pontes de hidrogênio (BEPPU et al., 1999; BARROS et al., 2006; SOUZA et al., 2010; JOSUÉ et al., 2000; SAMPAIO, 2012). A Figura 27 (b) mostra os espectros obtidos a partir da esfera de quitosana, onde percebe-se regiões com vibrações características da quitosana (3000 a 3665 cm^{-1}). As bandas em 1323 a 1379 cm^{-1} e 3264 a 2918 cm^{-1} , permaneceram nas mesmas regiões, porém com intensidade ligeiramente menor, destacando a banda em 1411 cm^{-1} correspondente ao grupo amina (NH), que quase desapareceu.

É possível observar que as bandas nas regiões de 1020 a 1100 cm^{-1} correspondentes as aminas alifáticas, foram deslocadas para 1095 , 170 cm^{-1} , e as bandas em 1647 e 1568 cm^{-1} , foram deslocadas para 1624 e 1511 cm^{-1} .

Fideles (2010), em seu trabalho desenvolveu filmes de quitosana reticulados com ácido sulfúrico, e observou que este deslocamento para 1511 cm^{-1} , ocorre devido a protonação com os íons H^+ que são liberados durante a dissociação do ácido. Segundo Laus et al. 2006, a presença do grupo amina protonado proporciona um meio para ocorrer interações iônicas na quitosana. Evidenciando assim a provável reticulação da quitosana. Ribeiro 2007, obteve o espectro FTIR de partículas de quitosana reticuladas com sulfato de sódio, onde verificou-se o deslocamento e a redução de intensidade da banda de 1558 cm^{-1} para 1535 cm^{-1} , e o pico relacionado a C-N (1414 cm^{-1}) quase desapareceu. Estas observações ocorrem devido a interação dos íons sulfato com os grupos amina primários da quitosana, o que resulta na formação da reticulação das partículas de quitosana (processo de reticulação).

No FTIR obtido a partir do pó de curcumina (Figura 27(c)) é notório a região em 3500 cm^{-1} , que podem ser atribuídos a vibração de alongamento do grupo fenólico (OH). Além disso, bandas de absorção nítidas em 1605 cm^{-1} são correspondentes as vibrações do alongamento do anel de benzeno da curcumina. A banda 1510 cm^{-1} ocorre devido a vibração de estiramento de C-C do anel de benzeno.

A banda em 1463 cm^{-1} correspondente ao modo de vibração de C-O alongamento dos grupos álcool e fenol.

Em 1426 cm^{-1} a flexão da vibração do grupo (CH) ligado ao anel benzeno da curcumina. Na região de 1272 cm^{-1} tem-se o modo de vibração de C - O. A região de 1025 a 840 cm^{-1} corresponde ao estiramento do grupo C - O - C. As bandas na região de 962 , 815 e 719 cm^{-1} foram atribuídas às vibrações de flexão da ligação CH dos grupos alcenos ($\text{RCH}=\text{CH}_2$) (SAMPATH et al., 2014; MOHAN et al., 2012; BUZANELLO, 2013; KIM et al., 2013; YALLAPU et al., 2010a).

A partir do gráfico de FTIR da esfera de quitosana/curcumina, obtida pela reação das soluções (Figura 27(d)), verifica-se que as bandas apresentam uma menor intensidade, quando comparada com as bandas características da curcumina, e regiões com maior intensidade quando comparadas com o gráfico da esfera de quitosana (Figura 27(a)), permanecendo assim as bandas características da quitosana.

Já para o gráfico do FTIR para a esfera de quitosana/curcumina (adsorção) (Figura 27 (a)), obtida pelo método de adsorção, observa-se o espectro semelhante ao da esfera de quitosana/curcumina obtida pela reação das soluções, porém, tem-se uma maior intensidade de transmitância de todas as bandas presentes na amostra quitosana/curcumina (adsorção), evidenciando uma maior quantidade de curcumina presente na esfera, em comparação com as esferas obtidas pelo método de mistura de soluções. Em ambas as amostras tem-se a região de 1025 cm^{-1} correspondente a presença do grupo cetona da curcumina, em 1620 cm^{-1} tem-se a banda referente ao estiramento C=O da cetona, a região em 1420 cm^{-1} refere-se ao estiramento C=C do anel alifático, a banda em 1380 cm^{-1} refere-se ao estiramento dos grupos CH_3 presentes na estrutura da curcumina, observa-se também a presença do grupo amina (que foi deslocado) pertencente a quitosana na região entre 1485 e 1577 cm^{-1} (PARIZE, 2009).

Segundo Parize 2009, as bandas em torno de 1615 e 1514 cm^{-1} refere-se ao estiramento do grupo NH_3^+ , indicando que a utilização do ácido acético como solvente, resulta em acetato de quitosana, onde os grupos $-\text{COO}^-$ do ácido e o grupo $-\text{NH}_3^+$ da quitosana estão associadas devido a uma interação iônica. As mudanças de intensidade das bandas de absorção no espectro da esfera de quitosana/curcumina e quitosana/curcumina (adsorção), bem como os deslocamentos de bandas, quando comparadas com o espectro da quitosana e da curcumina em pó, sugerem a existência de interações físicas entre a quitosana e o fármaco.

De acordo com Anitha et al. 2014, a interação entre os grupos cetona da curcumina e os grupos amina protonados da quitosana, causaram provavelmente o carregamento do fármaco no polímero, e esta interação pode ajudar na redução da taxa de liberação da curcumina auxiliando assim na liberação controlada.

Já Buzanello 2013, afirma que a banda do grupamento OH em 3500 cm^{-1} é frequentemente utilizada para avaliar as interações entre a curcumina e os materiais encapsulantes.

Nota-se que tanto nos gráficos das esferas de quitosana como no de quitosana/curcumina e quitosana/curcumina (adsorção), a presença de pequenas bandas em 1015 e 1123 cm^{-1} que segundo Rodríguez-Páeza et al. 2001, é característico de grupos sulfatos (SO_4). Do mesmo modo Anitha, 2011 a região vibracional entre 1220 e 1228 cm^{-1} é características desses grupos sulfatos confirmando assim a presença do sulfato de sódio.

4.1.4 Difração de raios X - DRX

Estudos de Difração de raios X foram realizados para a quitosana, curcumina e sulfato de sódio na forma de pó, e para as esferas de quitosana, quitosana/curcumina e quitosana/curcumina (adsorção), a fim de compreender a influência da curcumina na esfera de quitosana (Figura 28).

O difratograma da quitosana em pó (Figura 28) apresenta dois picos característicos de polímeros semicristalinos, sendo um em torno de $12,8^\circ$ e outro por volta de $21,0^\circ$, que evidenciam a parte mais cristalina do material. Segundo Vieira et al. 2014, estes picos correspondem aos planos de difração (020) e (110), respectivamente. Constata-se também uma ampla faixa abaixo dos picos, variando de aproximadamente 8 a 35° , onde predomina a fase amorfa do material (YIN et al. 2004). Segundo Oliveira 2011, a quitosana possui uma região semicristalina devido às fortes interações intra e intermolecular, caracterizado pelas pontes de hidrogênio formadas entre os grupamentos amino, hidroxila, amida e outros grupos funcionais presentes na molécula de quitosana, fornecendo certa organização à estrutura cristalina da quitosana. Porém a região semi-cristalina da quitosana constitui a menor fração do material, uma vez que este polímero é caracteristicamente amorfo.

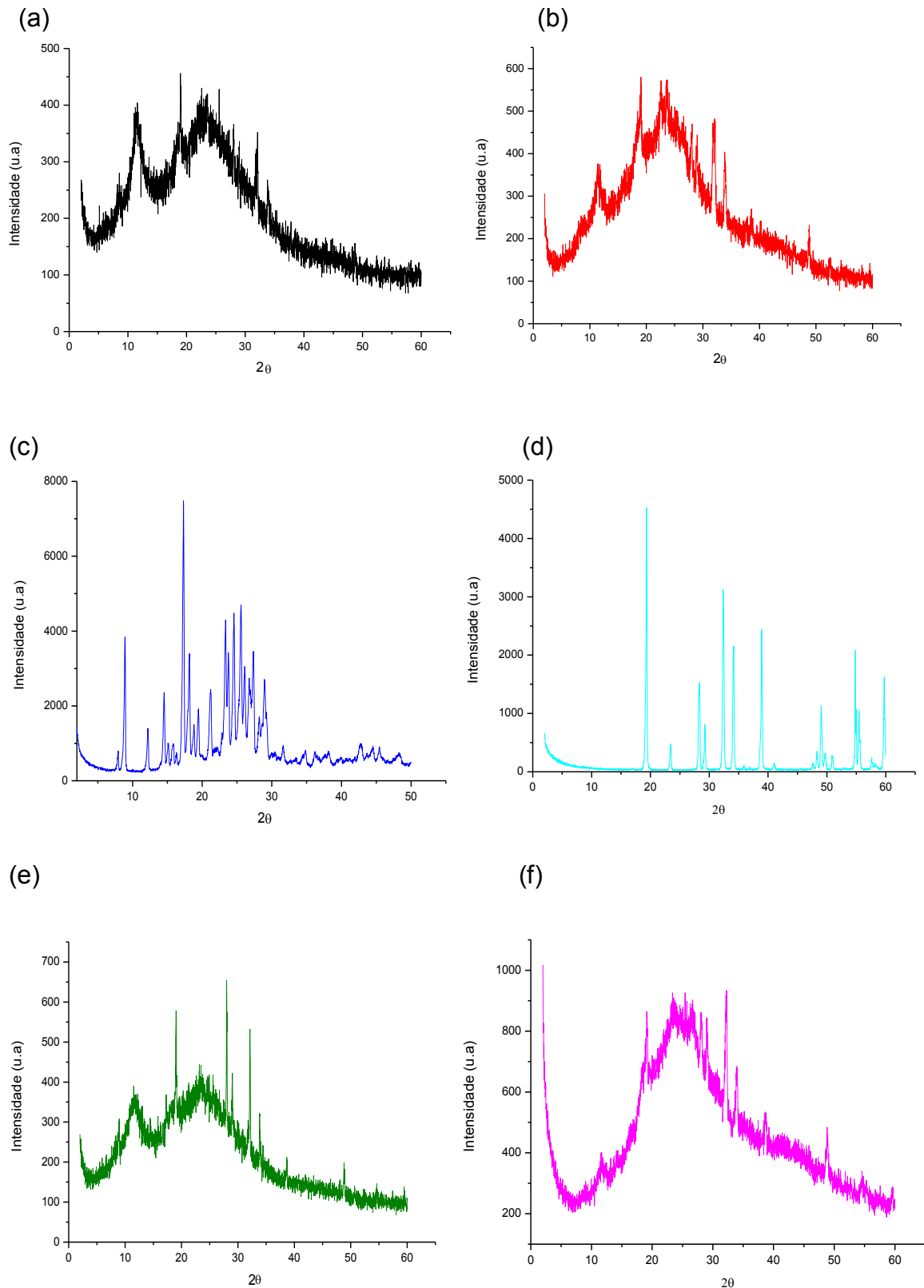


Figura 28 - Difratogramas das (a) quitosana em pó, (b) esferas quitosana, (c) curcumina em pó (d) sulfato de sódio em pó, (e) esfera de quitosana/curcumina e (f) esfera de quitosana/curcumina (adsorção).

As esferas de quitosana (Figura 28) apresentaram um padrão semelhante ao difratograma da quitosana em pó, porém, observa-se a intensificação dos picos $19,10^\circ$; $23,46^\circ$; $32,21^\circ$; $33,83^\circ$ e o aparecimento de outros picos em $28,02^\circ$ e $48,72^\circ$, característicos do sulfato de sódio utilizado como coagulante, durante a produção da amostra, conforme apresentado na Figura 28 (d). Isto provavelmente ocorreu devido à uma maior organização das cadeias de quitosana, conferida pelo sulfato de sódio. Holanda et al. 2011, obteve em sua pesquisa, membranas de quitosana contendo tripolifosfato, onde observou-se um discreto aumento na cristalinidade, atribuído à cristalinidade do sal (Tripolifosfato), quando comparada com a quitosana em pó.

É possível verificar pelo difratograma da curcumina em pó (Figura 28 (c)) dois picos estreitos de maior intensidade e bem definidos em $2\theta = 8,95^\circ$ e $17,26^\circ$, indicando que a curcumina em pó encontra-se na forma semicristalina. De acordo com Kumar et al. 2014, os picos característicos da curcumina são observados no intervalo de $10-30^\circ$, onde tem-se uma série de picos nos ângulos $7,84^\circ$, $12,12^\circ$, $14,45^\circ$, $18,12^\circ$, $21,27^\circ$, $23,36^\circ$, $24,51^\circ$, $25,65^\circ$, $26,73^\circ$, $28,23^\circ$, $28,9^\circ$. Conforme observado por Mohan et al, 2012; Chen et al., 2013; Yallapu et al., 2010a, Anitha et al., 2011, Donsi et al., 2010 e Song et al., 2014. A Figura 28 (d) mostra o difratograma do sulfato de sódio, onde tem-se picos intensos e bem definidos, que são característicos deste material, identificado pela ficha padrão 37-1465. A Figura 28 (e) apresenta o difratograma da esfera de quitosana/curcumina, e a Figura 28 (f) da esfera de quitosana/curcumina(adsorção), onde verifica-se um perfil semelhante em ambos difratogramas, porém a amostra de quitosana/curcumina/(adsorção), apresentou uma maior intensidade dos picos, relacionado provavelmente a maior quantidade de fármaco presente na superfície das esferas. Observa-se a permanência das bandas entre $2\theta=10^\circ$ a $2\theta=35^\circ$, relativa a quitosana, percebe-se também o pico característico da curcumina em $17,26^\circ$, porém com intensidade bem reduzida quando comparado com o difratograma da curcumina em pó. Nota-se ainda a presença dos picos $19,1^\circ$; $28,02^\circ$ e $32,21^\circ$ que também são apresentados no difratograma da esfera de quitosana, estes picos são relativos ao sulfato de sódio, conforme apresentado na Figura 28 (d). Portanto, tem-se que a presença do fármaco na quitosana, não ocasionou mudança significativa na cristalinidade do material, pois nos difratogramas das amostras quitosana/curcumina e quitosana/curcumina (adsorção), os picos característicos da curcumina não estão presentes em intensidade considerável.

Porém, verifica-se uma maior intensidade dos picos para a amostra quitosana/curcumina (adsorção).

Segundo Song et al. 2011, isto sugere que a curcumina foi dispersa molecularmente na quitosana, ou seja, através de interação química entre estes. De acordo com Song et al. 2014, isto é benéfico para a difusão de moléculas do fármaco através da matriz polimérica, o que leva a uma liberação controlada do fármaco encapsulado (VASCONCELLOS et al. 2011).

4.1.5 Análise Termogravimétrica

Na Figura 29, estão apresentadas as curvas de análise termogravimétrica da quitosana em pó, da esfera de quitosana, da curcumina em pó, da esfera quitosana/curcumina e da esfera quitosana/curcumina (adsorção).

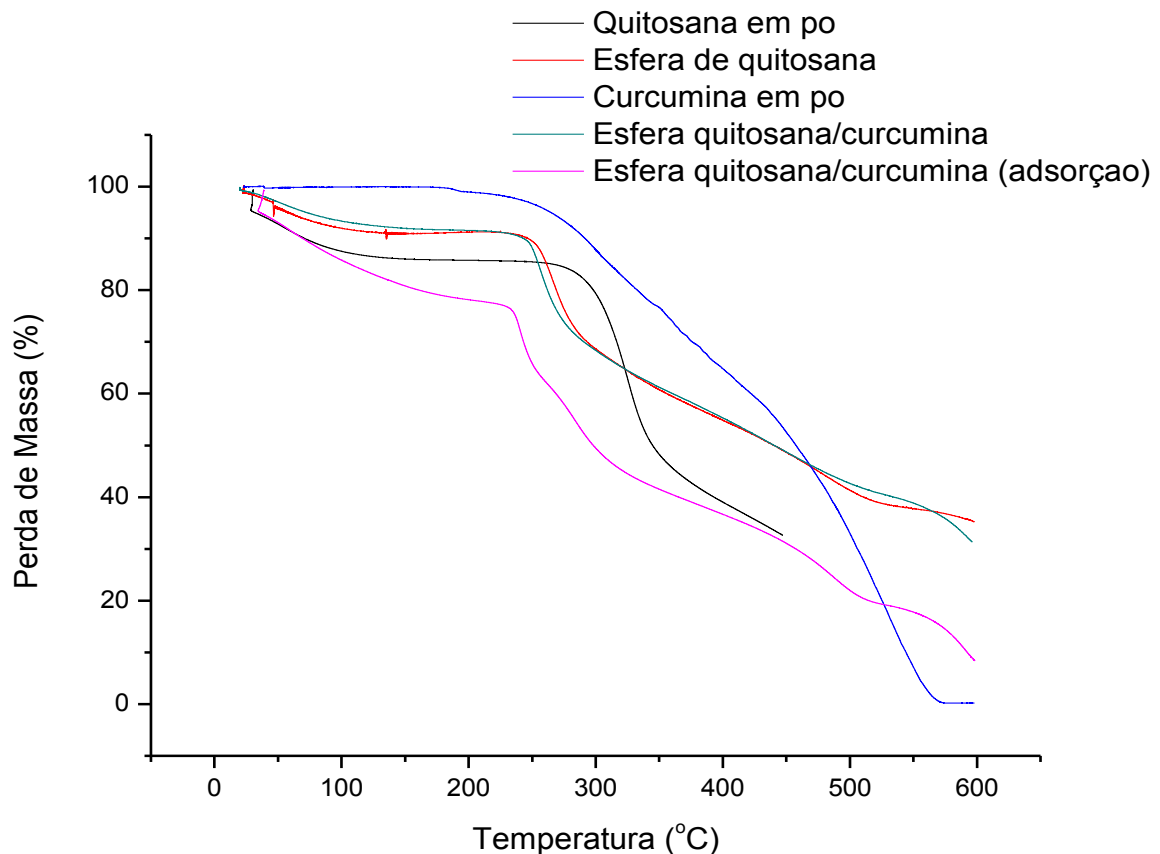


Figura 29 - Curva TG da quitosana em pó, da esfera de quitosana, da curcumina em pó, da esfera quitosana/curcumina e da esfera quitosana/curcumina (adsorção).

Para a quitosana em pó é possível verificar que a decomposição ocorre em dois eventos. O primeiro evento ocorre de 29,3 a 177,5°C, com perda de massa de 9,7%, sendo esta perda correspondente ao processo de desidratação, ou seja, a perda de água, que se encontra ligada a molécula de quitosana (grupos hidroxilas e grupo amino), (Tabela 6). Já no segundo evento tem-se uma perda de massa de 53,2% entre 207,4 a 446,5°C, referente a decomposição do polímero. Resultados semelhantes foram reportados por Horst, 2009 onde observou-se dois eventos de degradação na curva da análise termogravimétrica para a quitosana, sendo o primeiro estágio referente à desidratação em 53,33°C, e o segundo estágio referente à degradação do polímero com perda de massa em torno de 330°C, com uma redução de aproximadamente 56% de massa.

Para a curva TG da esfera de quitosana (Figura 29), o primeiro evento ocorre de 24 a 148°C, com perda de massa de 7,7%. Segundo Lima 2006, este evento é característico da perda de moléculas de água associadas aos grupos aminos e hidroxilas do polímero, através das pontes de hidrogênio. Já no segundo evento a perda de massa foi de 22,5% entre 235 e 301,2°C, corresponde a evaporação da água ligada internamente na estrutura da esfera. O terceiro evento ocorre entre 301,2 e 598°C, com perda de massa de 33,3% sendo referente a decomposição da amostra, que inicia-se pela quebra aleatória das ligações glicosídicas seguida de decomposições das unidades acetiladas e desacetiladas do polímero (Tabela 6).

Comparando o termograma da quitosana em pó com da esfera verifica-se que a esfera de quitosana apresentou redução de perda de massa no primeiro evento, ou seja, as esferas tiveram uma menor capacidade de absorção de água, do que a quitosana em pó. De acordo com Lima 2006, isto acontece devido alguns grupos aminos, que funcionavam como regiões de absorção de água, e agora estão protonadas.

Na curva TG da curcumina em pó, observa-se que a curcumina perdeu 100% da sua massa, ou seja, ocorreu a decomposição total. A perda da massa inicia-se em 180,8°C e termina em 588,8°C. Verifica-se que toda a decomposição ocorre em três eventos, o primeiro em 180,8°C a 197,2°C onde a perda de massa foi de 1,1% e o segundo com 39,7% de perda de massa de 230,0°C até 425,4°C e o terceiro de 425,4°C a 588,8°C, com 59,2% de perda de massa (Tabela 6).

Percebe-se também que depois do segundo evento a degradação ocorre a uma taxa mais rápida até a perda total da massa em 588,8°C.

De acordo com Jasin & Talib 2012, o primeiro evento ocorre devido a presença de impurezas voláteis, já o segundo refere-se à decomposição dos grupos substituintes da curcumina, e o terceiro ocorre devido à decomposição dos dois grupos benzeno presentes na estrutura da curcumina (CHEN et al. 2014c).

Parize et al. 2012, encontrou para o padrão curcumina, três fases de perda de massa, o primeiro a 67°C relacionada com a desumidificação, e o segundo e o terceiro em 321 e 402°C, respectivamente, em relação à degradação da curcumina. Já Chen et al. 2014a, encontrou na curva TG da curcumina o início de perda de massa em 94°C e o término em 533°C, e a presença de dois eventos o primeiro de 94 a 357°C com perda de massa de 33,77%, e o segundo evento com perda de massa de 66,23%, de 357 a 533°C.

Nas curvas TG da esfera de quitosana e quitosana/curcumina respectivamente observa-se que ambas as amostras possuem o mesmo perfil, sendo degradadas em três eventos. Verifica-se também que as esferas de quitosana e quitosana/curcumina apresentam uma menor estabilidade térmica, quando comparado com a quitosana em pó. A curva TG da esfera de quitosana/curcumina também apresenta três eventos sendo o primeiro em 24,3 a 138,2°C, o segundo de 219,1 a 302,4°C e o terceiro de 302,4 a 596,1°C com perda de massa de 7,7; 22,3 e 37,7%, para o primeiro, segundo e terceiro evento respectivamente (Tabela 6).

Análogo a descrição das etapas das esferas de quitosana, a primeira etapa refere-se a volatilização da água residual, e o segundo a água ligada na estrutura interna da amostra, porém o terceiro evento refere-se a degradação do polímero e do fármaco. Portanto, os resultados da análise termogravimétrica para a esfera obtida pelo método de reação do fármaco com a quitosana, indica que a presença do fármaco não provocou mudanças significativas nas estabilidades térmica dos mesmos.

Não houve alterações térmicas significativas com a adição do fármaco na quitosana, devido provavelmente ao fármaco estar disperso a nível molecular interagindo com a quitosana pelas pontes de hidrogênios (PARIZE 2009), corroborando com os resultados obtidos pelo DRX e DSC.

Já a curva para a amostra de quitosana/curcumina (adsorção), apresenta o mesmo perfil das curvas de quitosana e quitosana/curcumina, sendo os seus eventos referentes a evaporação da água residual, a volatização da água ligada internamente na estrutura e a degradação polimérica e do fármaco, para os três eventos presentes, respectivamente.

Porém, observa-se que no primeiro evento a perda de massa foi de 19% para a esfera de quitosana/curcumina (adsorção), ou seja, este sistema apresentou uma maior perda de massa neste evento, quando comparado com as demais esferas, e ocorreu em temperaturas de 35 a 185°C.

Tabela 6 - Valores da perda de massa referentes aos eventos de decomposição para a quitosana em pó, esfera de quitosana, curcumina em pó, da esfera quitosana/curcumina e da esfera de quitosana/curcumina (adsorção).

	1º Evento		2º Evento		3º Evento		Resíduo
	Δm (%)	T(°C)	Δm (%)	T(°C)	Δm (%)	T(°C)	Δm (%)
Quitosana pó	9,7	29,3-177,5	53,2	207,4-446,5	-		37,1
Esfera de Quitosana	7,7	24,0-148,0	22,5	235,0-301,2	33,3	301,2-598,0	36,5
Curcumina pó	1,1	180,8-197,2	39,7	230,0-425,4	59,2	425,4-588,8	-
Esfera de Quitosana/Curcumina	7,7	24,3-138,2	22,3	219,1-302,4	37,7	302,4-596,1	32,3
Esfera de Quitosana/Curcumina (adsorção)	19	35,0-185	34,0	240,3-335,2	35,0	336,8-598,8	12,0

No segundo evento, a perda de massa foi de 34% em temperatura de 240,3 a 335,2°C, e para o terceiro evento teve-se uma perda de massa de 35% (de 336,8 a 598,8°C), apresentando também um menor resíduo.

Provavelmente, está maior perda de massa está relacionada a maior quantidade de massa presente na superfície do material, conforme apresentado pelo Mo, MEV e DRX da amostra.

4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial

A Figura 30 mostra os resultados obtidos pelas análises de Calorimetria Exploratória Diferencial da quitosana em pó, da esfera de quitosana, da curcumina em pó, da esfera de quitosana/curcumina, do sulfato de sódio em pó e da esfera de quitosana/curcumina (adsorção).

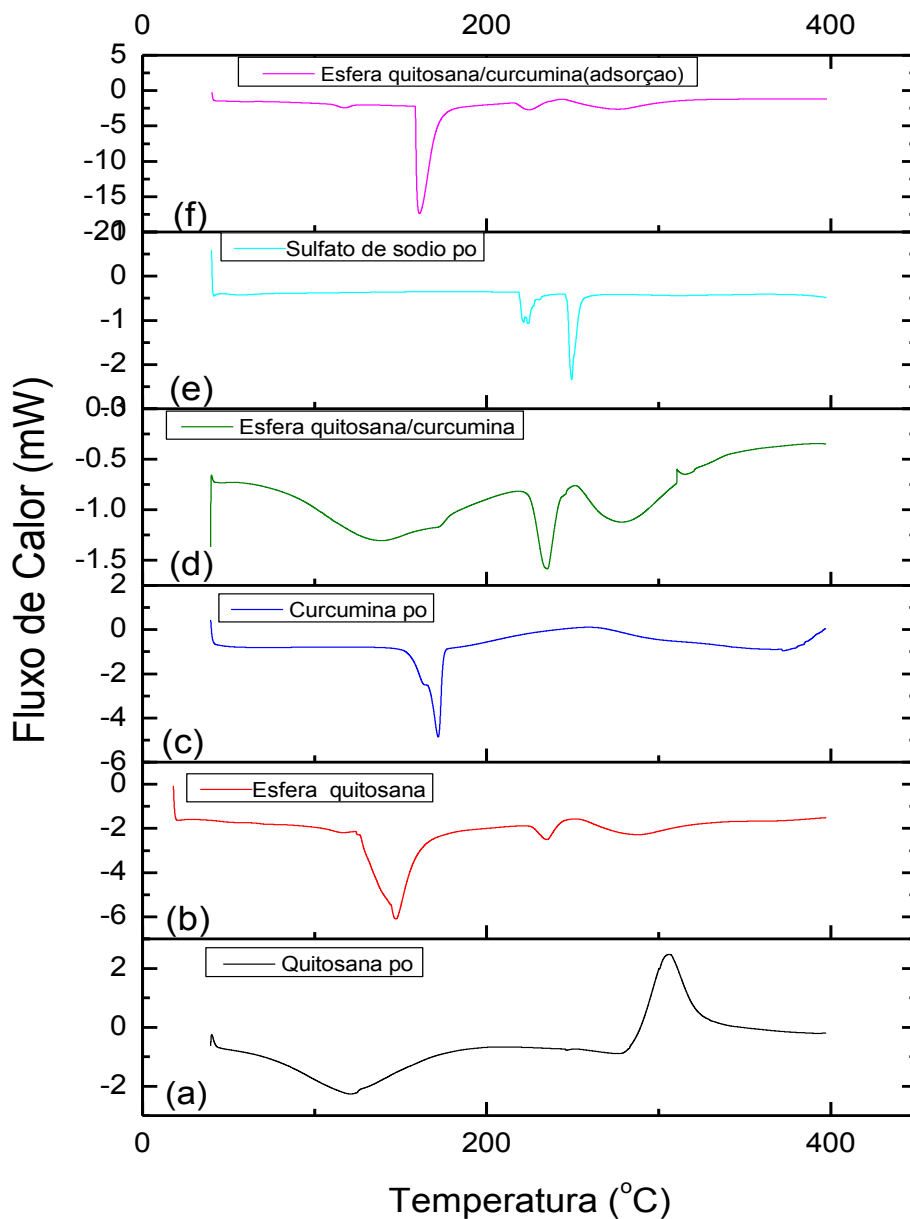


Figura 30 - Termograma da (a) quitosana em pó, da (b) esfera de quitosana, da (c) curcumina em pó, da (d) esfera de quitosana/curcumina, do (e) sulfato de sódio em pó e da (f) esfera de quitosana/curcumina (adsorção).

A partir da curva DSC da quitosana em pó (Figura 30) é possível visualizar a presença de um pico endotérmico e um pico exotérmico, sendo o pico endotérmico localizado em aproximadamente $120,5^{\circ}\text{C}$ referente à evaporação de substâncias voláteis, como água ligada as pontes de hidrogênio com os grupos hidroxila da quitosana. Já pico exotérmico localiza-se em $305,8^{\circ}\text{C}$ e corresponde à degradação da quitosana, conforme também observado por Torres et al. 2005. Porém a partir da curva não é possível observar a T_g e a T_m da quitosana. Segundo Rotta 2008, a T_g da quitosana ainda é objeto de controvérsia no meio científico, pois, por se tratar de um polímero natural, algumas propriedades como cristalinidade, massa molar e grau de desacetilação, podem apresentar variações conforme a fonte e/ou método de extração e isto certamente irá influenciar no valor da T_g .

Santos et al. 2003, encontrou a temperatura de transição vítrea (T_g) em aproximadamente 30°C para as duas amostras de quitosana comerciais e em torno de 10°C uma terceira amostra também de origem comercial. Já Sakurai et al. 2000, encontrou a T_g da quitosana em 203°C . Na Figura 30 e tem-se a curva do sulfato de sódio, onde observa-se a presença de dois picos endotérmicos, sendo o primeiro de menor intensidade em $219,14^{\circ}\text{C}$ e o segundo em $246,95^{\circ}\text{C}$ apresentando uma maior intensidade de pico. Observa-se a presença desses picos nas esferas, confirmando assim a presença do sulfato nas amostras conforme visto pelo FTIR e DRX.

A partir do termograma do esfera de quitosana (Figura 30), observa-se picos endotérmicos em $146,9^{\circ}\text{C}$; $235,5^{\circ}\text{C}$; e $285,53^{\circ}\text{C}$, é notório que o pico endotérmico presente na curva da quitosana em pó foi deslocado para $146,9^{\circ}\text{C}$ sendo atribuído à perda de componentes voláteis ou a possibilidade de relaxamento da cadeia, os picos endotérmicos em cerca de 235°C e 285°C provavelmente estão relacionados com as interações eletrostáticas entre o polímero e os íons do sulfato, ocorrendo também desvios para temperaturas maiores, conforme observado no termograma do sulfato de sódio onde os picos característicos do sulfato de sódio foram identificados em 219 e 246°C (MÜLLER et al., 2011; RIBEIRO 2007).

Piai et al. 2006, por meio das análises dos hidrogéis de quitosana reticulada com sulfato de condroitina, verificou um pico de base maior em $246,3^{\circ}\text{C}$, atribuindo as interações entre a quitosana e o sulfato. Observa-se também o início de um pico largo exotérmico em aproximadamente $305,09^{\circ}\text{C}$, provavelmente referente à degradação do material.

De acordo com Zohuriaan & Shokrolahi 2004, neste estágio em altas temperaturas, ocorre a desidratação, despolimerização e decomposição pirolítica, as quais resultam na formação do NH_3 .

O termograma da curcumina em pó (Figura 30 (e)), apresenta um pico agudo endotérmico a $172,74^\circ\text{C}$ indicando a natureza cristalina do fármaco puro, confirmando os resultados de difração de raios X. Estes resultados corroboram com Buzanello, 2013; Mohan et al., 2012; Yallapu et al., 2010a. Verifica-se também a entalpia de fusão (ΔH_f) de $135,7\text{J/g}$, onde é possível observar um pico exotérmico, que se inicia em aproximadamente $199,5^\circ\text{C}$, indicando o início da sua decomposição térmica. Paramera et al. 2011, avaliou a estabilidade térmica da curcumina em relação aos fatores ambientais como a luz, umidade e calor, obtendo no termograma da curcumina em pó o ponto de fusão em 183°C , e um pico exotérmico com início em 204°C indicando a decomposição térmica do fármaco. Kaewnopparat et al. 2009, estudou algumas proporções de curcumina/Polivinilpirrolidona (K-30), com o objetivo de aumentar a solubilidade e a dissolução da curcumina, e obteve também pela técnica de DSC, o pico endotérmico da curcumina em pó a $181,4^\circ\text{C}$ e a entalpia de fusão (ΔH_f) de $119,8\text{J/g}$.

A partir do perfil da curva de DSC do esfera de quitosana/curcumina, (Figura 30 (d)), tem-se a presença de três picos endotérmicos, sendo o primeiro a $138,7^\circ\text{C}$, onde observa-se também o deslocamento deste pico, quando comparado com o termograma da quitosana em pó, o segundo a cerca de $234,4^\circ\text{C}$, e o terceiro em $278,8^\circ\text{C}$, como descrito anteriormente o primeiro pico é apresentado devido à perda de componentes voláteis, o segundo e terceiro pico refere-se as interações eletrostáticas da quitosana com os íons sulfato, e em $310,4^\circ\text{C}$ tem-se o início da degradação do esfera (RIBEIRO, 2007; MÜLLER et al., 2001).

Pode-se observar que a presença da curcumina na esfera de quitosana/curcumina, proporcionou a redução da intensidade do pico endotérmico, e por consequência da quantidade de energia necessária para romper os cristais, comparando com a amostra da esfera de quitosana. Sendo a entalpia de fusão (ΔH_f) da quitosana/curcumina de $152,5\text{ J/g}$, e da esfera de quitosana de $272,9\text{ J/g}$, essa baixa entalpia da amostra com a introdução da curcumina, indica que houve uma alteração da estrutura dos cristais, ocorridas ao nível molecular.

Verifica-se também total desaparecimento do pico de fusão característico da curcumina. Indicando assim, que a curcumina foi essencialmente encapsulada na quitosana no estado amorfo, ou seja, provavelmente ocorreu a formação de uma mistura sólida homogênea do biopolímero com o fármaco, onde a curcumina encontra-se no interior das partículas conforme relatado por BUZANELLO, 2013; CHEN et al., 2013; MOHAN et al., 2012). Corroborando com os resultados obtidos no DRX. Porém não é possível identificar a Tg do material no termograma. Parize 2009, sugeriu em sua pesquisa que a adição da curcumina, tende a se localizar entre as cadeias do polímero, aumentando a mobilidade do sistema e conseqüentemente diminuindo a Tg do material.

Já na curva DSC de quitosana/curcumina obtidas pelo método de adsorção (Figura 30), tem-se a presença de quatro picos endotérmicos, sendo o primeiro em 117°C característico da desumidificação, o segundo pico está localizado em aproximadamente 160°C, sendo este pico agudo e de grande intensidade referente do padrão da curcumina em pó, observa-se que este foi deslocado para temperatura menor, já que na curva da curcumina em pó, este encontra-se em volta de 170°C, o terceiro e o quarto referente a interação eletrostática da quitosana com a curcumina, e em 310°C verifica-se o início da degradação do material. Tem-se que a entalpia de fusão (ΔH_f) da quitosana/curcumina (adsorção) é de 395,7 J/g, sendo bem maior que as apresentadas pelas amostras de quitosana e de quitosana/curcumina obtidas pela reação entre as soluções. Provavelmente este aumento ocorreu, devido à presença dos cristais do fármaco na superfície da esfera, conforme visto pela Microscopia Ótica. Portanto, tem-se que pelo método de adsorção, o fármaco não se encontra apenas no interior da esfera de quitosana, (conforme apresentado no método de adição do fármaco na quitosana), mas verifica-se também a presença dos cristais de curcumina na superfície.

4.2.1 Grau de Intumescimento

O fenômeno de intumescimento é provocado pelo afastamento da rede polimérica na presença de pressão osmótica (PASPARAKIS & BOUROPOULOS, 2006).

Segundo SKOP et al. 2013, o intumescimento de materiais *in vivo* pode causar efeitos adversos ao tecido nativo circundante ou aumento da pressão intracraniana, resultando possivelmente em danos ao paciente, sendo portanto, importante determinar a estabilidade das microesferas.

A Figura 31 apresenta o gráfico do perfil de absorção de PBS nas esferas de quitosana e quitosana/curcumina, quitosana/curcumina (adsorção).

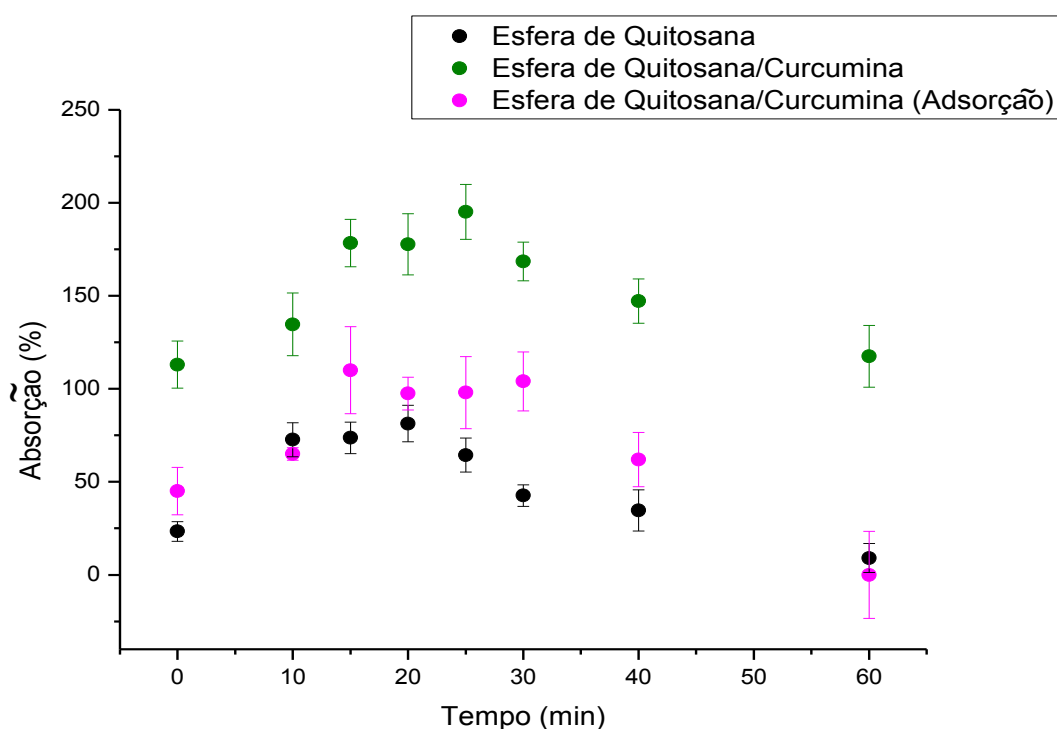


Figura 31 - Perfil de absorção de PBS nas esferas de quitosana e quitosana/curcumina, quitosana/curcumina (adsorção).

Para a realização do ensaio utilizou-se a solução de PBS (Solução tampão de fosfato salino), onde as esferas de quitosana e quitosana/curcumina e quitosana/curcumina (adsorção), foram submetidas a imersão e as pesagens ao longo de 60 minutos. A partir da Figura 31, verifica-se que a curva do grau de intumescimento inicia-se em 10 minutos, porém por volta de 30 minutos, para as esferas de quitosana e quitosana/curcumina e 40 minutos para as esferas de quitosana/curcumina (adsorção) respectivamente.

Observa-se também que a absorção nas esferas começa a diminuir, devido provavelmente ao início da degradação das esferas. De acordo com HOFFMAN et al. 2012, quando um material começa a absorver água, inicialmente as moléculas dos grupos hidrofílicos mais polares hidratam, seguindo dos grupos hidrofóbicos, que também interagem com as moléculas de água. Por consequência ocorre a absorção de água adicional, devido à força motriz osmótica das cadeias da rede. Assim, o material atinge um nível de equilíbrio de intumescimento. O intumescimento da água adicional que é absorvido pelos grupos iônicos, polares e hidrofóbicos tornam-se saturados de água, preenchendo o espaço entre as redes e/ou macroporos. À medida que a rede aumenta de volume, se as redes ou ligações cruzadas são degradáveis, o material começa a dissolver-se e desintegrar-se, a uma taxa em função da sua composição. Observa-se que o grau de intumescimento para as esferas de quitosana/curcumina é mais elevada ($\cong 200\%$), seguido das esferas de quitosana/curcumina (adsorção) ($\cong 105\%$), e de quitosana ($\cong 82$). Esta maior absorção pelas esferas de quitosana/curcumina, provavelmente ocorre devido a presença de microporos nestas esferas, conforme visto por MEV.

4.3 Resultados dos Arcabouços

A solução de gelatina foi utilizada para agregação das esferas durante a obtenção dos arcabouços, também foi utilizada a gelatina reticulada com genipina (0,15%), com o objetivo de avaliar a influência da gelatina reticulada nas propriedades dos arcabouços.

4.3.1 Microscopia Ótica

Os arcabouços de quitosana, quitosana reticulada, quitosana/curcumina, quitosana/curcumina-reticulada, quitosana/curcumina (adsorção) e quitosana/curcumina (adsorção) – reticulada, foram analisados por microscopia ótica por meio das imagens da estrutura interna e externa dos sistemas (Figura 32 e 33).

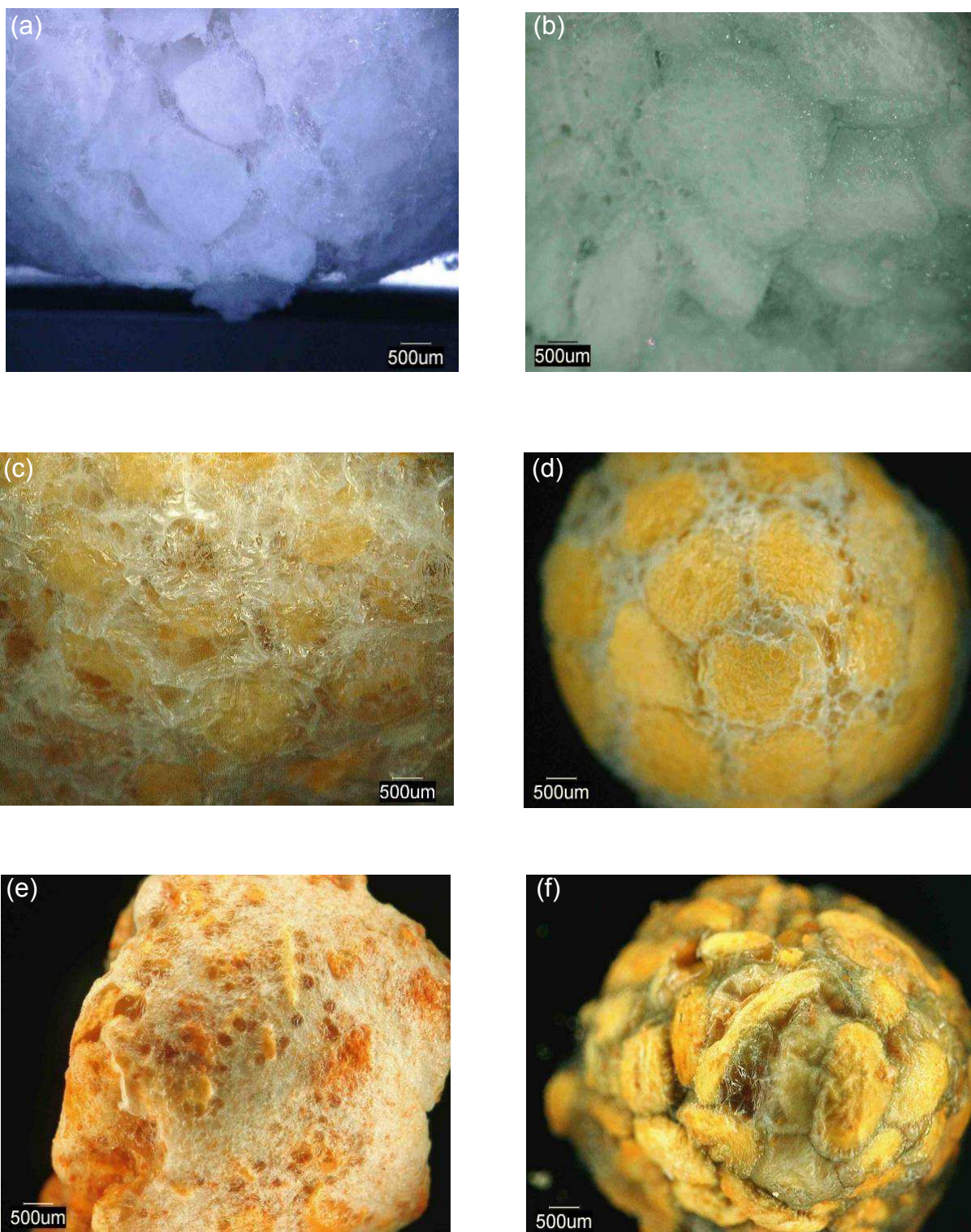


Figura 32 - Imagens obtidas por microscopia ótica da região externa dos arcabouços com aumento de 40X de (a) quitosana, (b) quitosana reticulada, (c) quitosana/curcumina, (d) quitosana/curcumina-reticulada (e) quitosana/curcumina (adsorção) e (f) quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada.

Pelas imagens da estrutura externa (Figura 32), é possível observar em todos os tipos de estruturas a presença da gelatina, que atua como uma rede interconectando uma esfera a outra e envolvendo-as com uma fina camada.

Nota-se também que os arcabouços de quitosana/curcumina, obtido pela reação de soluções, reticulados e não (Figuras 32 (c) e (d)), apresentaram maior homogeneidade com poros mais esféricos, haja visto que a adição da curcumina, pelo método de reação de soluções, alterou a morfologia deixando-a mais homogênea.

Já nas demais amostras de quitosana (Figura 32 (a) e (b)) e quitosana/curcumina (adsorção), reticuladas e não (Figura (e), (f)), tem-se uma morfologia mais irregular, podendo observar distorções nas estruturas. Para a amostra de quitosana/curcumina obtida pelo método de reação de soluções (Figura 32(c)) e pelo método de adsorção (Figura 32(e)) não reticuladas, verifica-se que a solução de gelatina, além de interligar as esferas recobriu as partículas dos arcabouços.

Nas estruturas interna dos arcabouços de quitosana (Figuras 33 (a) e (b)) e quitosana/curcumina (Figuras 33 (c) e (d)) reticulados e não reticulados, respectivamente, tem-se uma estrutura interna com característica esponjosa, formada provavelmente pelo processo de liofilização.

De acordo com Anandharamakrishnan et al. 2010, durante a liofilização, estruturas porosas são obtidas pela formação dos cristais de gelo durante a fase de congelamento que sublima durante a secagem.

Já para as amostras de quitosana/curcumina (adsorção) reticuladas e não reticuladas, (Figura 33 (e) e (f)), percebe-se estruturas, onde as esferas não apresentam boa aderência umas com as outras. Observa-se uma maior heterogeneidade na morfologia das partículas e dos poros.

Segundo Fernandes et al. 2011, um arcabouço ideal usado para a engenharia de tecidos deve possuir abertura dos poros adequados e alta porosidade. Os arcabouços devem ser porosos para permitir o crescimento das células e a migração do tecido vascular.

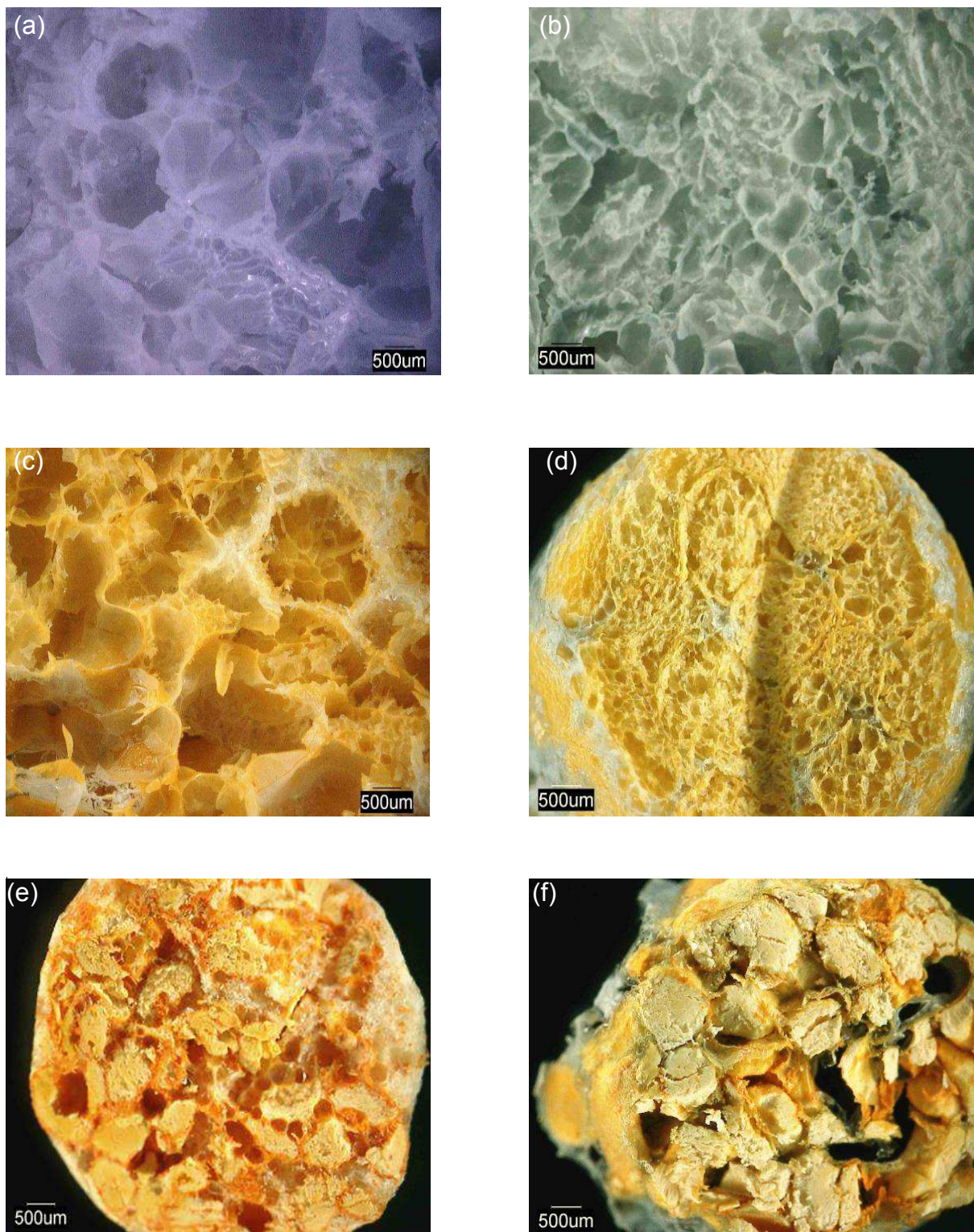


Figura 33 - Imagens obtidas por microscopia ótica da região interna dos arcabouços com aumento de 40x (a) de quitosana, (b) quitosana reticulada, (c) quitosana/curcumina, (d) quitosana/curcumina-reticulada, (e) quitosana/ curcumina (adsorção) e (f) quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada.

4.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

Os arcabouços de quitosana, quitosana reticulada, quitosana/curcumina, quitosana/curcumina reticulada, quitosana/curcumina (adsorção) e quitosana/curcumina (adsorção) reticulada, foram submetidos à análise no MEV com o objetivo de observar possíveis alterações morfológicas após a incorporação do fármaco. As Figuras 34, 35, 36, 37, 38 e 39 apresentam as micrografias (a) e (b) da seção transversal, (c) da região externa e (d) da região de interligação das esferas. Para os arcabouços de quitosana, quitosana-reticulada, quitosana/curcumina, quitosana/curcumina-reticulada, quitosana/curcumina (adsorção), e quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada, respectivamente.

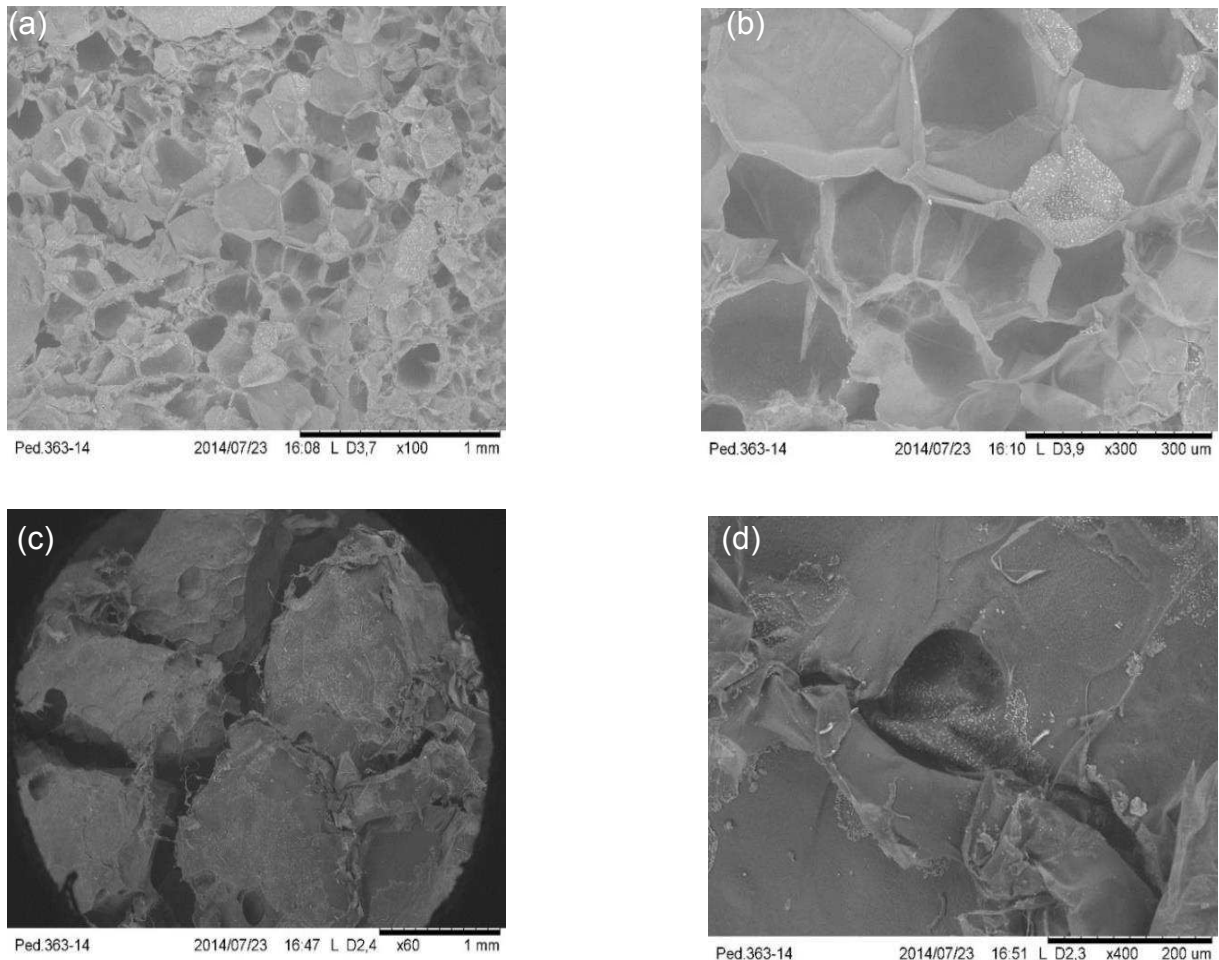


Figura 34 - Micrografias da seção transversal dos arcabouços de (a) quitosana (aumento de 100x), (b) (aumento de 300X), (c) da parte externa do arcabouço de quitosana (aumento de 60X) e (d) da região de interligação das esferas de quitosana (aumento de 400X).

A análise da micrografia interna do arcabouço de quitosana (Figura 34 (a) e (b)), apresenta poros de tamanhos variados. Averiguou-se também uma porcentagem maior de poros com dimensão de 30-60 μm , com tamanho de poros mais regulares, apresentando formato hexagonal. Na Figura 34 (c), tem-se a parte externa dos arcabouços onde é possível observar a perda na esfericidade das partículas, provavelmente durante a interligação dos poros ocorreu uma distorção na morfologia das esferas. Por outro lado, na (Figura (d)) observa-se o detalhe da interface gerada pela ligação de uma esfera a outra por meio da solução de gelatina.

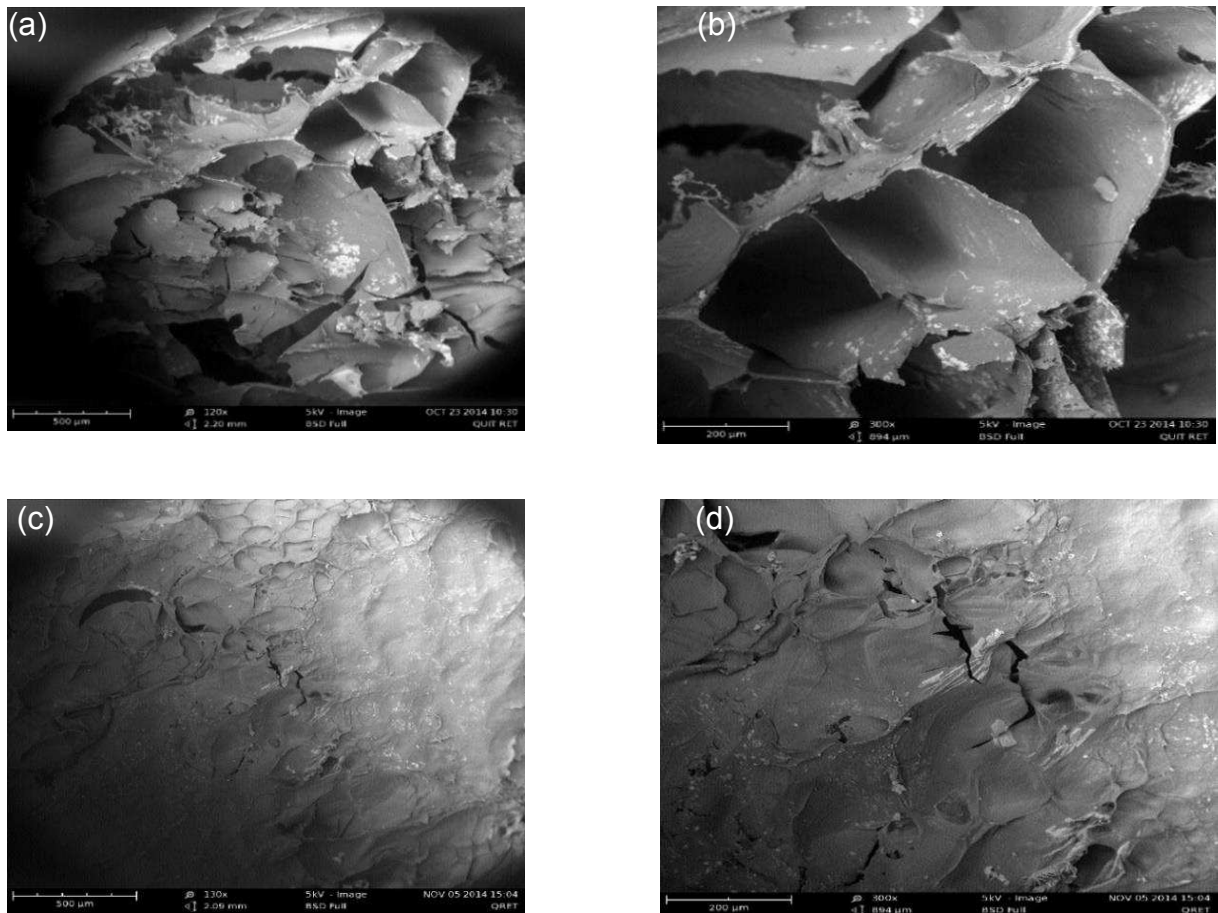


Figura 35 - Micrografias da seção transversal dos arcabouços de (a) quitosana- reticulada (aumento de 120x), (b) (aumento de 300X), (c) da parte externa do arcabouço de quitosana- reticulada (aumento de 130X) e (d) da região de interligação das esferas de quitosana- reticulada (aumento de 300X).

A Figura 35 mostra os arcabouços de quitosana reticulada, onde observa-se na estrutura interna (Figura a e b) a presença de poros com geometria não definida e de tamanhos heterogêneos, onde os poros de 10-30 μm encontram-se em maior quantidade, sendo 67,7% de toda estrutura.

Na parte externa dos arcabouços Figura 35 (c e d), tem-se que a gelatina reticulada atuou envolvendo todo o arcabouço, e não apenas interligando as esferas. A partir da interface apresentada na Figura 35 (d), nota-se o ponto de divisão de três esferas e presença de fissura nesta região.

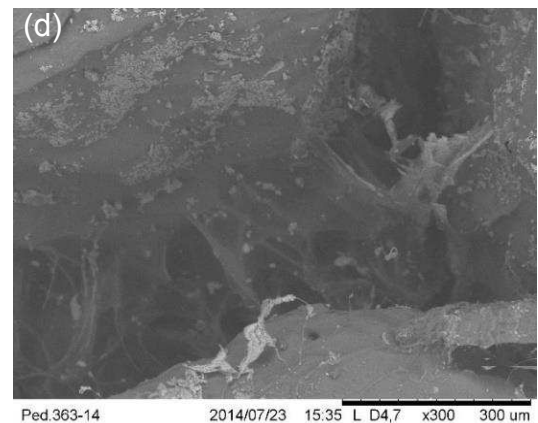
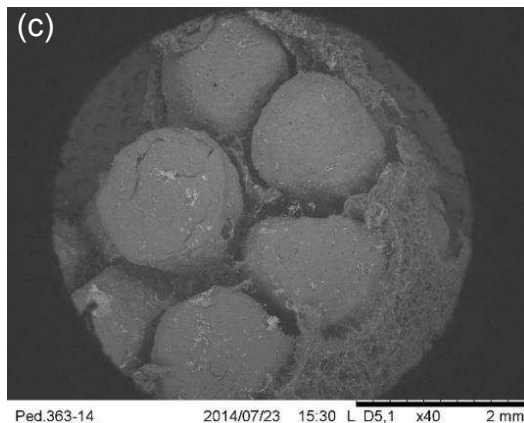
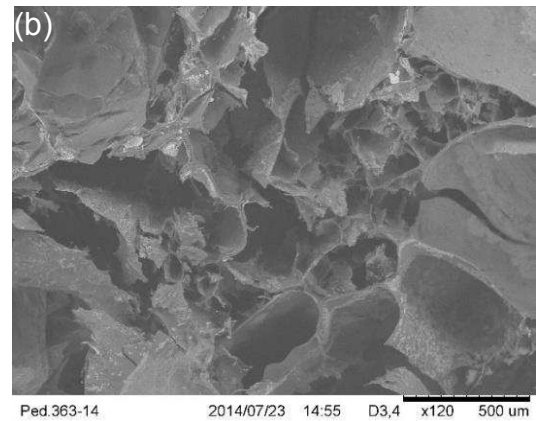
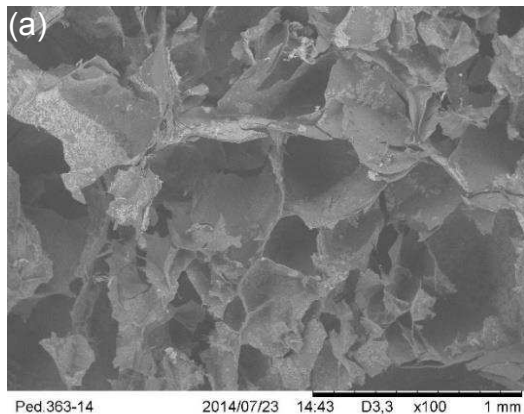


Figura 36 - Micrografias da seção transversal dos arcabouços de (a) quitosana/curcumina (aumento de 100x), (b) (aumento de 120X), (c) da parte externa do arcabouço de quitosana/curcumina (aumento de 40X) e (d) da região de interligação das esferas de quitosana/ curcumina (aumento de 300X).

Na micrografia interna dos arcabouços de quitosana/curcumina, Figura 36 (a) e (b), percebe-se que os poros em maiores porcentagens são os com diâmetros de 30-60 μm , apresentando formato heterogêneos. Na micrografia da parte externa, verifica-se uma maior homogeneidade e regularidade na esfericidade e no tamanho das partículas para as amostras (Figura 36(c)).

É possível notar no detalhe (Figura 36 (d)) a interconexão de uma esfera a outra, esta ligação entre as partículas foi obtida por meio da solução de gelatina, que atua ao redor das esferas resultando assim na estrutura tridimensional. Visualiza-se também a presença de poros nesta região.

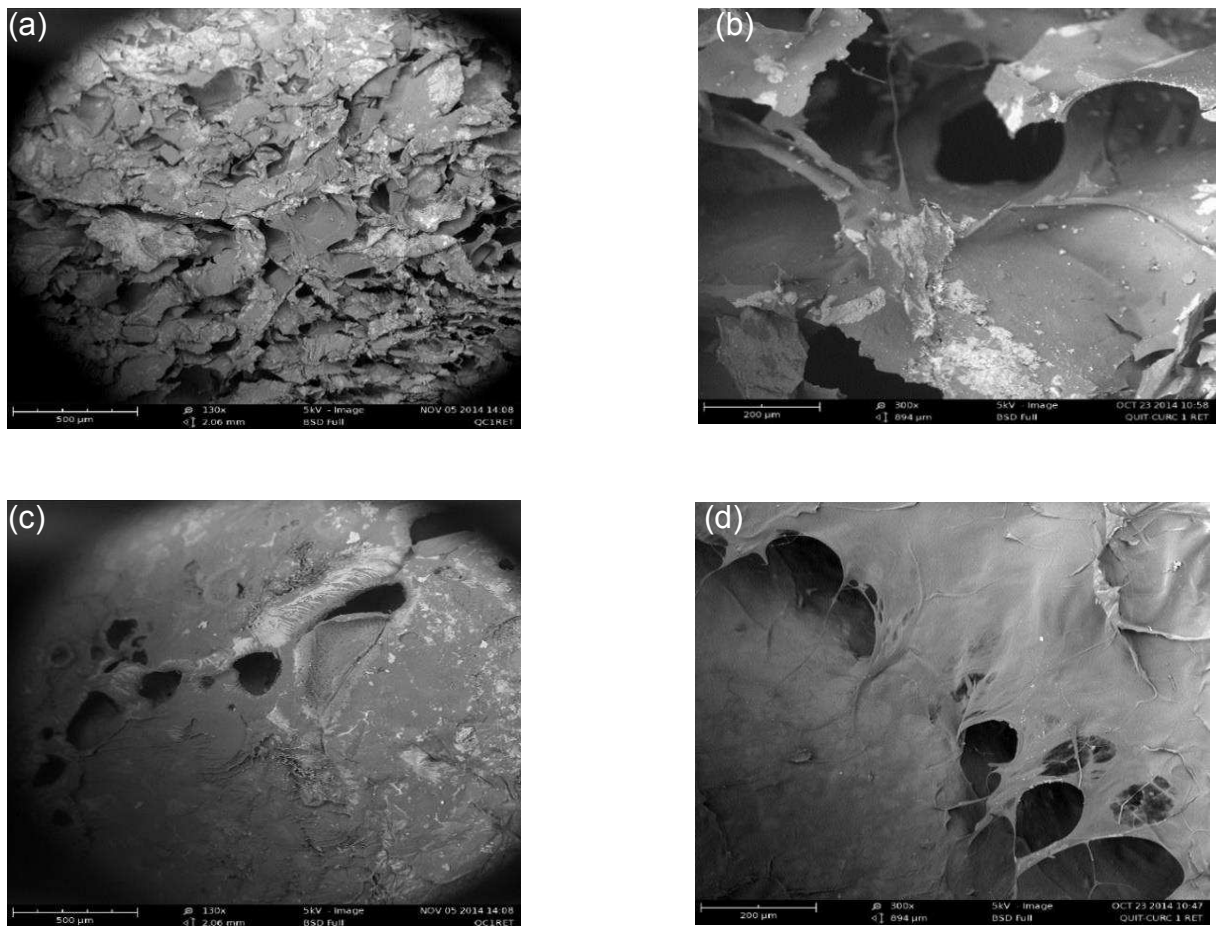


Figura 37 - Micrografias da seção transversal dos arcabouços de (a) quitosana/curcumina-reticulada (aumento de 120x), (b) (aumento de 300X), (c) da parte externa do arcabouço de quitosana/curcumina- reticulada (aumento de 125X) (d) e da região de interligação das esferas de quitosana/curcumina- reticulada (aumento de 300X).

Com base na Figura 37 (a) e (b), percebe-se que os arcabouços obtidos apresentam maior quantidade de poros com diâmetros de 10-30 e 30-60 μm , com estrutura mais compacta que os sistemas não reticulados, tem-se poros mais heterogêneos e interligados (Figura 37b).

Segundo Malafaya et al. 2008, a interconectividade tem relação direta e influencia no crescimento celular, migração celular, no fluxo de nutrientes e crescimento de tecido nos arcabouços. A Figura 34 (c) e (d), apresenta a interligação das esferas a partir da gelatina, observa-se também a presença de poros nessa região.

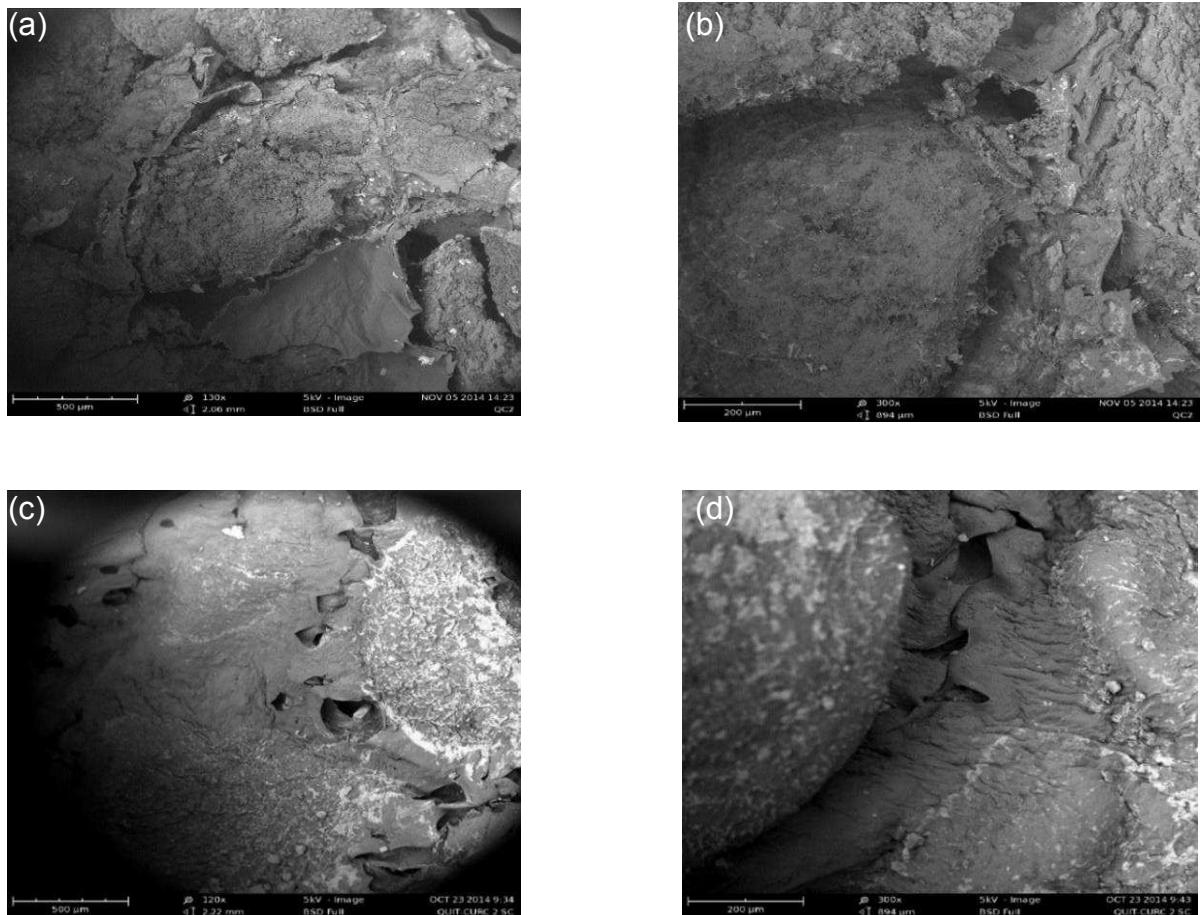


Figura 38 - Micrografias da seção transversal dos arcabouços de (a) quitosana/curcumina (adsorção) (aumento de 120x), (b) (aumento de 300X), (c) da parte externa do arcabouço de quitosana/curcumina (adsorção) (aumento de 120X) e (d) da região de interligação das esferas de quitosana/curcumina (adsorção) (aumento de 300X).

Na Figura 38 (a) e (b), tem-se o corte da seção transversal do arcabouço de quitosana/curcumina (adsorção), onde percebe-se falta aderência entre as partículas. Nota-se a superfície bastante áspera, sendo também possível visualizar a presença de pontos mais escuros na superfície de corte das esferas relacionado a distribuição do fármaco, conforme visto pela Microscopia Ótica. Verifica-se também que poros com diâmetros de 30 a 60 μm foram os que apresentaram maiores porcentagens. Já as Figura (c) e (d) mostra a parte externa da estrutura e detalha a interligação das esferas pela gelatina, porém nota-se que a região de interligação ocorre de forma diferente, há uma região mais espessa de gelatina ligando as esferas.

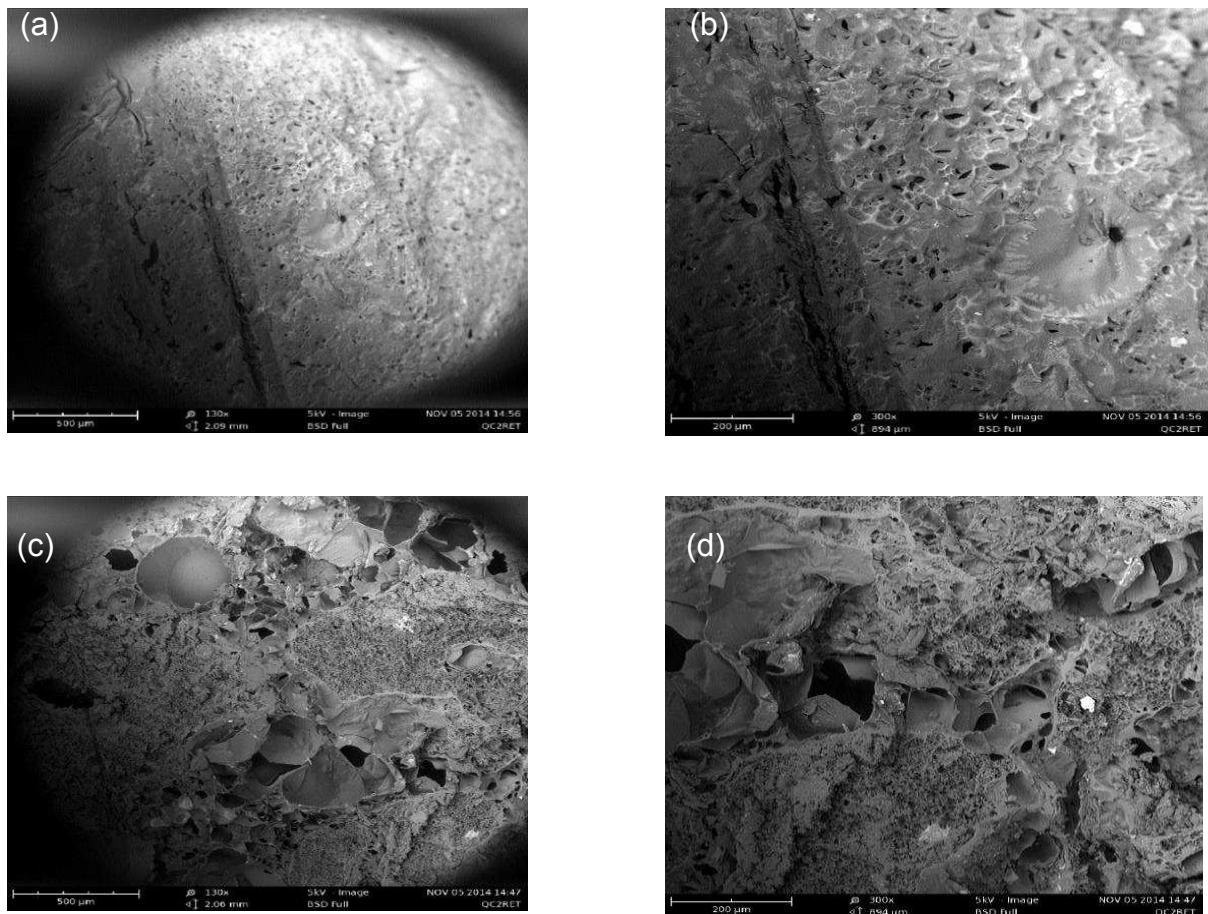


Figura 39 - Micrografias da seção transversal dos arcabouços de (a) quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada (aumento de 120x), (b) (aumento de 300X), (c) da parte externa do arcabouço de quitosana/curcumina(adsorção)-reticulada (aumento de 125x) e (d) da região de interligação das esferas de quitosana/curcumina-reticulada (aumento de 300x).

Já para a amostra de quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada, tem-se que a parte interna do arcabouço apresenta uma região recoberta de gelatina reticulada com genipina, com a maior presença de poros com diâmetro médio de 10-30 μm , não sendo possível observar a interligação entre as esferas. Nas Figuras 39 (c) e (d), é possível observar a interligação das esferas através da gelatina, com a presença de poros maiores na interface, e na superfície tem-se uma região toda porosa com aspecto rugoso.

Com auxílio do programa ImageJ, foi possível verificar as porcentagens de distribuição de tamanho de poros, avaliando a influência da introdução do fármaco, e da reticulação da gelatina no tamanho dos poros, conforme apresentado na Figura 40.

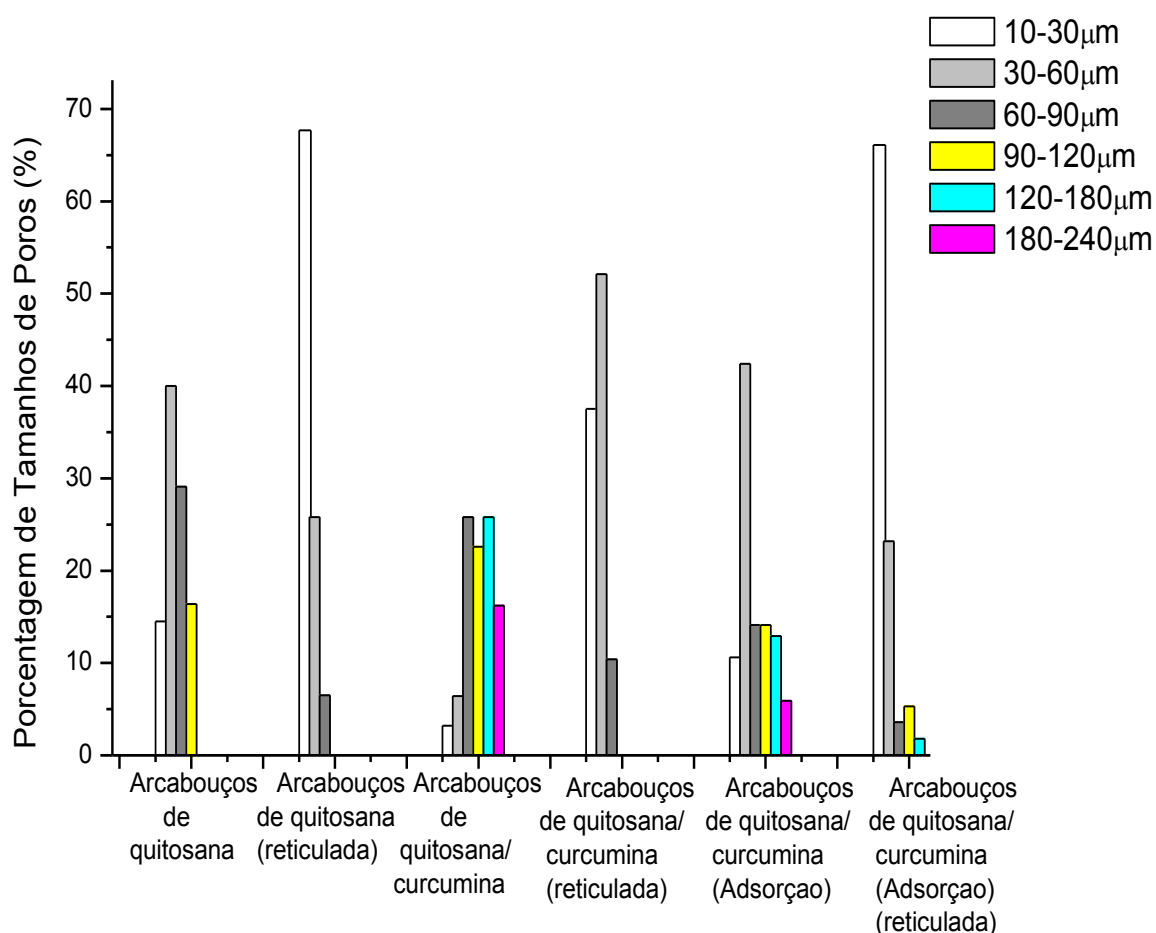


Figura 40 - Gráfico das porcentagens de tamanhos de poros por MEV, dos arcabouços de quitosana, quitosana-reticulada, quitosana/curcumina, quitosana/ curcumina-reticulada, quitosana/curcumina (adsorção) e quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada.

A partir da Figura 40, é possível observar que os arcabouços com gelatina reticulada, apresentam menores tamanhos de poros, e que todos os arcabouços possuem poros com diâmetros de 10 a 90 μm . Várias pesquisas têm sido relatadas considerando o tamanho de poro apropriado para o crescimento de determinado tipo de tecido.

Yannas et al. 1989, observou que o diâmetro médio de poros variando entre 20 e 125 μm de uma estrutura é satisfatório para a regeneração da pele. Zhang et al. 2013, obtiveram arcabouços poroso com 150-250 μm de diâmetro, promovendo o aumento na produção de colágeno. Murphy et al. 2010, analisou arcabouços com tamanhos médios de poros de 85 a 325 μm sobre a adesão dos osteoblastos. Já Yang et al 2001, verificou que tamanhos de poro de 5-15 μm para fibroblastos, cerca de 20 μm para o crescimento de hepatócitos, 20-125 μm para a regeneração da pele da mama de um adulto, 40-100 μm para o crescimento interno de osteóide, e 100-350 μm para a regeneração do osso. E Frydrych et al. 2015, verificaram que tamanho de poros 109 -141 μm são adequados para o crescimento do tecido adiposo.

4.4 Porosidade

A Figura 41, apresentam as porosidades obtida para os arcabouços de quitosana, quitosana-reticulada, quitosana/curcumina, quitosana/curcumina-reticulada, quitosana/curcumina (adsorção) e quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada, pelos métodos 1, 2 e 3 (Equações 12,13 e 14).

Como pode ser observado na Figura 41, os valores de porosidade aparente obtida pelos três métodos apresentaram perfil semelhante para todas as curvas. Porém, o método 2 apresentou uma maior porosidade, chegando a 44% para a amostra de quitosana, já os métodos 1 e 3 apresentaram valores próximos de porosidade.

De acordo com Simbara et al. 2014, essa porosidade ligeiramente maior obtida pelo método 2, pode ser atribuída pela imersão destes arcabouços em um líquido, o que aumenta de forma significativa seus valores de porosidade.

Resultados semelhantes foram expostos por Kucharska et al. 2010, que obteve arcabouços pelo método de agregação de partículas com porosidade volumétrica (método de "submersão em líquidos") em torno de 40%.

E Fideles 2014, utilizando também o método de agregação de partículas, obteve arcabouços de quitosana com diâmetro de poros que variam de 40-262 μm com porosidade média de 55%.

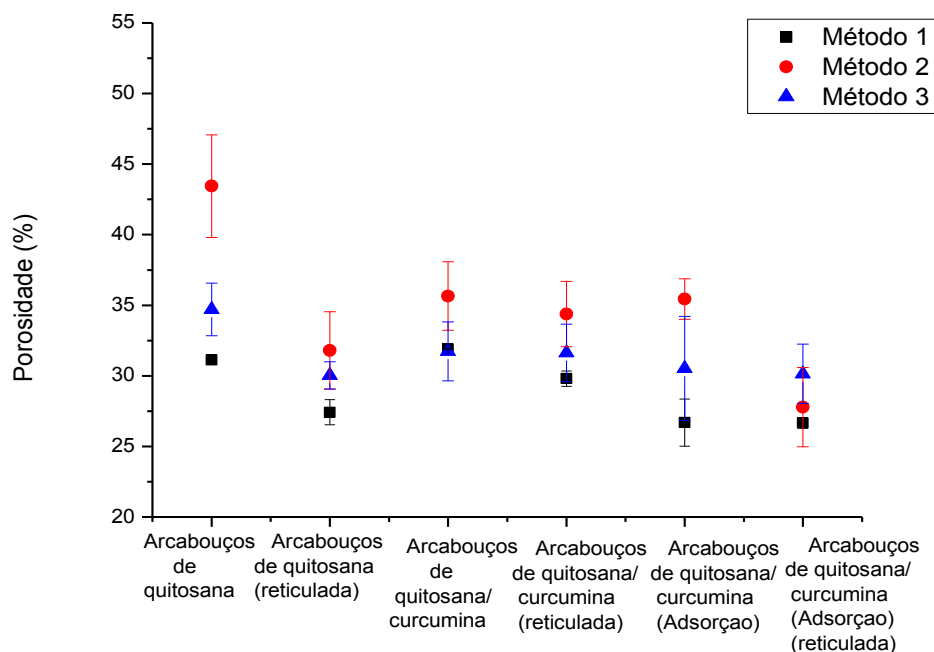


Figura 41 - Porosidade obtidas pelos métodos 1, 2 e 3 para os arcabouços de quitosana, quitosana-reticulada, quitosana/curcumina, quitosana/curcumina-reticulada, quitosana/curcumina (adsorção) e quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada.

Ainda é possível observar que as estruturas com a gelatina reticulada exibiram uma menor porosidade quando comparada com as estruturas agregadas apenas com gelatina. Confirmando assim os resultados apresentados pelo tamanho de poros, observado pelo MEV, onde as estruturas com gelatina reticulada expuseram maiores porcentagens de poros com tamanhos menores, quando comparadas com as estruturas com gelatina não reticuladas. E no que se refere a introdução do fármaco tem-se pelo método de adsorção uma menor porosidade, quando comparada com o outro método de introdução do fármaco, fato já esperado pois pelo MEV, observou-se porcentagens maiores para tamanhos de poros menores nas estruturas obtidas pelo método de adsorção. A liberação de um fármaco a partir de material é controlada pela fração de volume de poros, as dimensões dos poros e as suas interligações, o tamanho da molécula do fármaco, e o tipo e intensidade das interações do fármaco com as cadeias de polímeros que formam a rede do material (HOFFMAN et al., 2012).

4.5 Grau de Intumescimento

A capacidade de intumescimento é fortemente dependente do tamanho, da interligação dos poros, do volume da estrutura e muito importante para a absorção de fluidos do corpo e para transferência de nutrientes celulares. O intumescimento facilita a infiltração das células para os suportes tridimensionais durante a cultura de células, e também aumenta o tamanho dos poros e a porosidade total (OLAD & AZHAR, 2014). A Figura 42 apresenta as curvas de intumescimento para os arcabouços de quitosana, quitosana/curcumina e quitosana/curcumina obtidas (adsorção), reticuladas e não reticuladas.

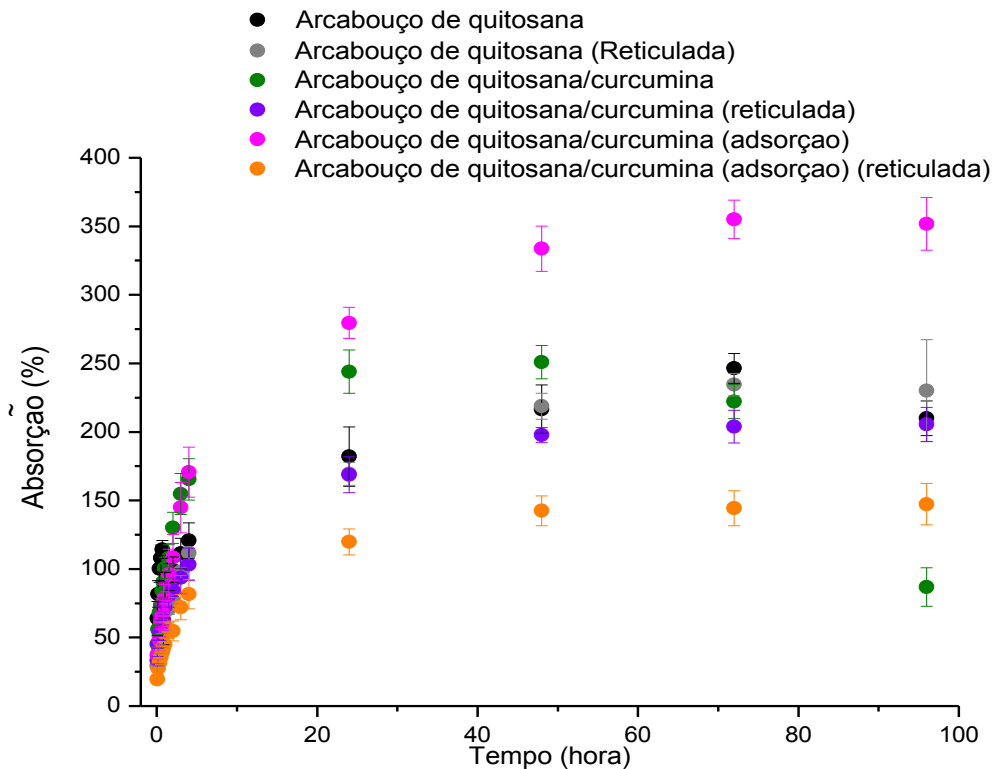


Figura 42 - Curvas de intumescimento para os arcabouços de quitosana, quitosana - reticulada, quitosana/curcumina, quitosana/curcumina-reticulada, quitosana/curcumina (adsorção) e quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada.

A partir da curva de intumescimento (Figura 42), é possível verificar que todos os sistemas sem reticulação (arcabouços de quitosana, quitosana/curcumina e quitosana/curcumina (adsorção)), atingiram a absorção máxima em 72 horas, e após esse período, em 96 horas, ocorreu uma perda gradativa do peso, ocasionada provavelmente pelo início da degradação.

De acordo com Gorczyca et al. 2014, esta perda de peso está relacionada, principalmente, pela dissolução de gelatina, ou seja, a degradação dos arcabouços inicia-se devido à dissolução da gelatina.

Com relação aos arcabouços com a gelatina reticulada, no período máximo observado, 96 horas, tem-se que valores praticamente semelhantes aos obtidos em 72 horas, ou seja, a presença do reticulante na gelatina ocasionou no retardamento da suposta degradação do arcabouço, como também na diminuição do grau de intumescimento das amostras. Tem-se que os sistemas reticulados, com genipina (0,15%), apresentaram menor grau de intumescimento em comparação com os arcabouços não reticulados, sendo menor para as amostras reticuladas de quitosana/curcumina (adsorção) obtidas pelo método de adsorção. Os valores de intumescimento, para a quitosana/curcumina (adsorção) chegaram a aproximadamente 350% enquanto os reticulados a 150%.

Perfis semelhantes foram relatados por Bispo 2009, onde apresentou valores de grau de intumescimento maiores para os suportes de quitosana pura, chegando a aproximadamente 780%, enquanto os reticulados com 1% de genipina obtiveram aumento de apenas 300%. Já Neto 2008, obteve esferas de gelatina reticulada com genipina onde estas apresentaram menor capacidade de intumescimento quando comparada com as esferas não reticuladas.

De acordo com Bispo 2009, a genipina reage com os grupos mais hidrofílicos, as aminas, e isso também favorece a redução do intumescimento nos materiais reticulados, as cadeias presas por ligações cruzadas também perdem a mobilidade. Isto dificulta a entrada de solvente ou expansão do material. Observa-se também que a redução no grau de intumescimento depende da quantidade de agente reticulante, porém, esta redução na absorção de solvente não é simplesmente inversamente proporcional à quantidade de agente reticulante.

Segundo Taghizadeh & Davari 2006, o comportamento de intumescimento de sistemas de quitosana depende de fatores como a composição química, a massa molecular, a cristalinidade e do grau de desacetilação da quitosana. Observou-se que com o aumento da quantidade de água retida nos arcabouços a sua textura apresentava um aspecto gelatinoso para todos os sistemas.

4.6 Ensaios de Resistência a Compressão

Segundo Oliveira et al. 2007, as propriedades mecânicas compreendem a resposta dos materiais às influências mecânicas externas, manifestadas pela capacidade de desenvolverem deformações reversíveis e irreversíveis, e resistirem à fratura. Essas características dos materiais são geralmente avaliadas por meio de ensaios, que indicam dependências tensão-deformação.

As propriedades mecânicas dos arcabouços utilizados na engenharia de tecidos são de grande importância em virtude da necessidade da estabilidade estrutural para resistir à manipulação, adesão e proliferação celular. As propriedades mecânicas dos arcabouços dependem das propriedades mecânicas inerentes dos materiais e são altamente influenciadas pela estrutura e tamanho dos poros. Um arcabouço de engenharia de tecidos é projetado para servir como uma matriz extracelular temporária, de modo que a estrutura deve ter propriedades mecânicas e estruturas porosas, semelhantes ao tecido que ele substitui (SHIMOJO et al. 2012; JIANG et al. 2006).

As amostras dos arcabouços de quitosana, quitosana reticulada, quitosana/curcumina, quitosana/curcumina - reticulada, quitosana/curcumina (adsorção) e quitosana/curcumina (adsorção) - reticulada, foram ensaiadas por compressão, onde observou-se a deformação máxima, tensão máxima (limite máximo de resistência a compressão em 90% de deformação), e o módulo de elasticidade (calculado em 5% de deformação devido a esta região elástica ser observada em valores baixos).

A Figura 43 apresenta o gráfico de deformação dos arcabouços, onde observa-se que a presença do reticulante aumentou o percentual de deformação das amostras, alcançando valores média de 90%.

Já a Figura 44 apresenta o gráfico da tensão máxima dos arcabouços de quitosana que foi de $0,37 \text{ MPa} \pm 0,017$; de quitosana reticulada $1,06 \text{ MPa} \pm 0,012$; de quitosana/curcumina de $0,33 \text{ MPa} \pm 0,045$; de quitosana/curcumina reticulada $0,33 \text{ MPa} \pm 0,03$ de quitosana/curcumina (adsorção) $1,40 \text{ MPa} \pm 0,055$ e de quitosana/curcumina (adsorção) reticulada $1,44 \text{ MPa} \pm 0,11$.

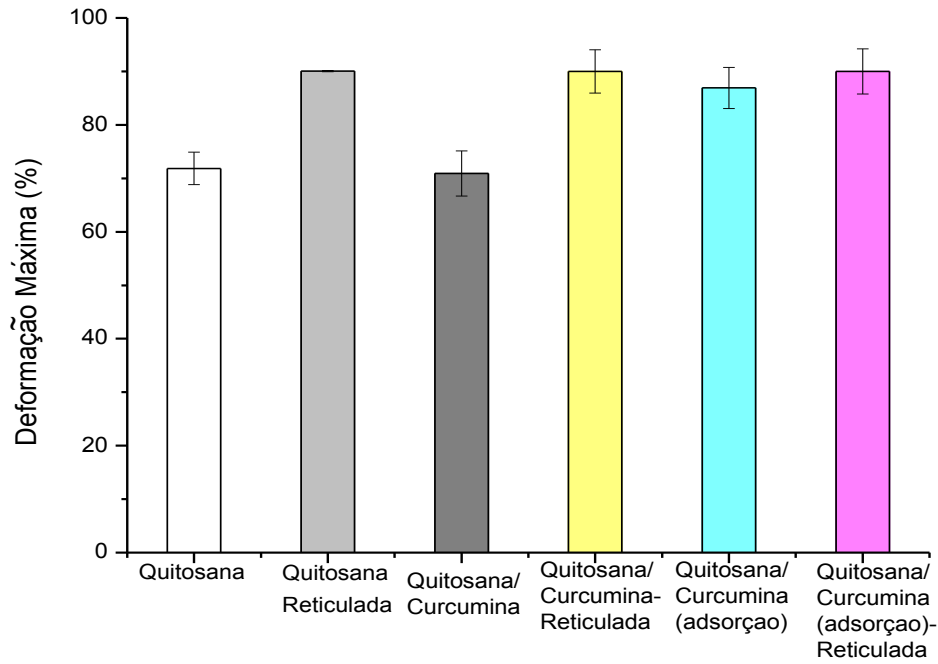


Figura 43 - Gráfico da deformação máxima dos arcabouços de quitosana, quitosana-reticulada, quitosana/curcumina, quitosana/curcumina-reticulada, quitosana/ curcumina (adsorção) e quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada.

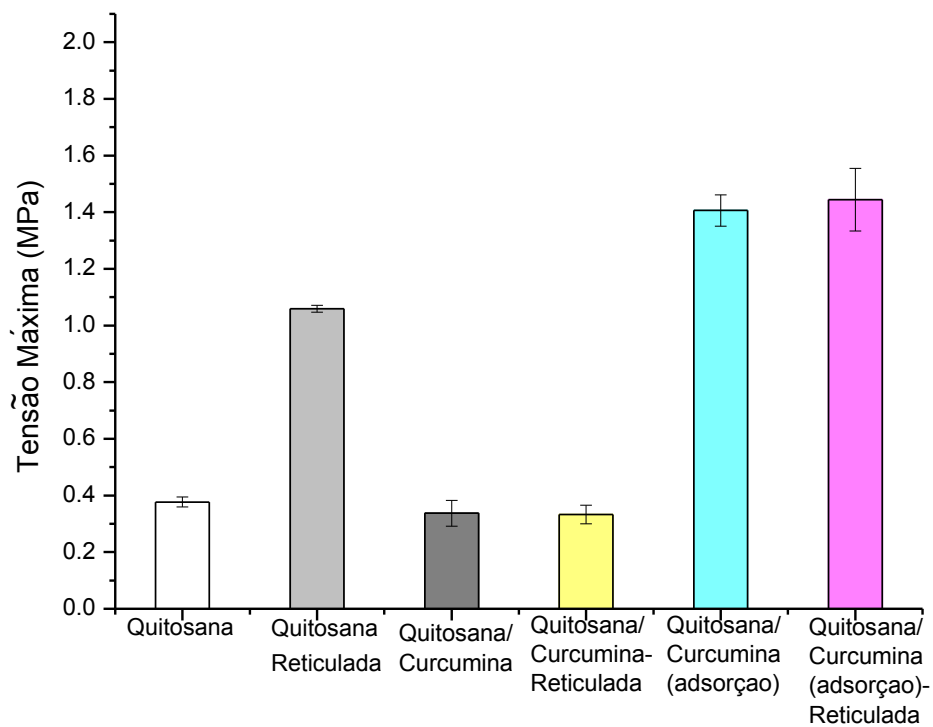


Figura 44 - Gráfico da Tensão máxima dos arcabouços de quitosana, quitosana reticulada, quitosana/curcumina, quitosana/curcumina-reticulada, quitosana/ curcumina (adsorção) e quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada.

Tem-se que o arcabouço de quitosana com gelatina reticulada, apresenta uma maior tensão (Figura 44), do que o arcabouço de quitosana não reticulada. Já nos sistemas de quitosana/curcumina e de quitosana/curcumina (adsorção), verifica-se que a reticulação da gelatina não influenciou de forma significativa na tensão máxima do sistema. Portanto, observa-se que a gelatina reticulada ocasionou o aumento da tensão máxima apenas para o arcabouço de quitosana, proporcionando um aumento de quase três vezes quando comparado com os arcabouços de quitosana com gelatina não reticulada.

Nas Figuras, 45, 46, 47, 48, 49 e 50 tem-se os gráficos de tensão x deformação das amostras dos arcabouços de quitosana, quitosana-reticulada, quitosana/curcumina, quitosana/curcumina reticulada, quitosana/curcumina (adsorção) e quitosana/curcumina (adsorção) reticulada, respectivamente.

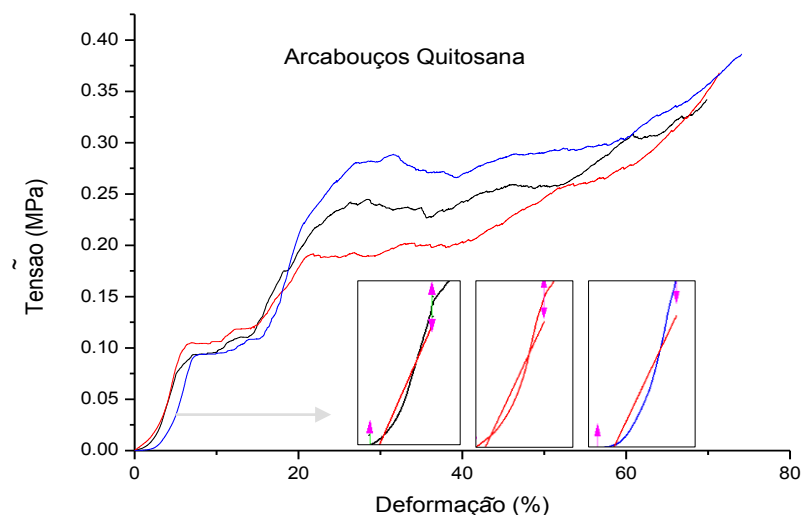


Figura 45 - Gráfico Tensão x Deformação do arcabouço de quitosana.

A partir dos gráficos de tensão x deformação de quitosana e quitosana/curcumina (Figuras 45 e 47) pode-se observar, que os poros influenciaram de forma relativa na aplicação da carga, pois provavelmente as camadas dos poros dos arcabouços são rompidas em sequência, haja vista que a curva apresenta pequenas vibrações.

Observa-se em todos os gráficos de tensão x deformação que a fase inicial é linear, caracterizada pelo módulo de elasticidade E . Isto ocorre provavelmente devido ao fechamento dos poros, ou seja, a compactação do material.

Percebe-se também que não há região longa de platô na curva tensão-deformação para as amostras de quitosana e quitosana/curcumina, ou seja, não há uma grande absorção de energia pelo material. Para as demais amostras é possível observar a região de longo platô e de densificação do material bem definida (BAO et al., 2012).

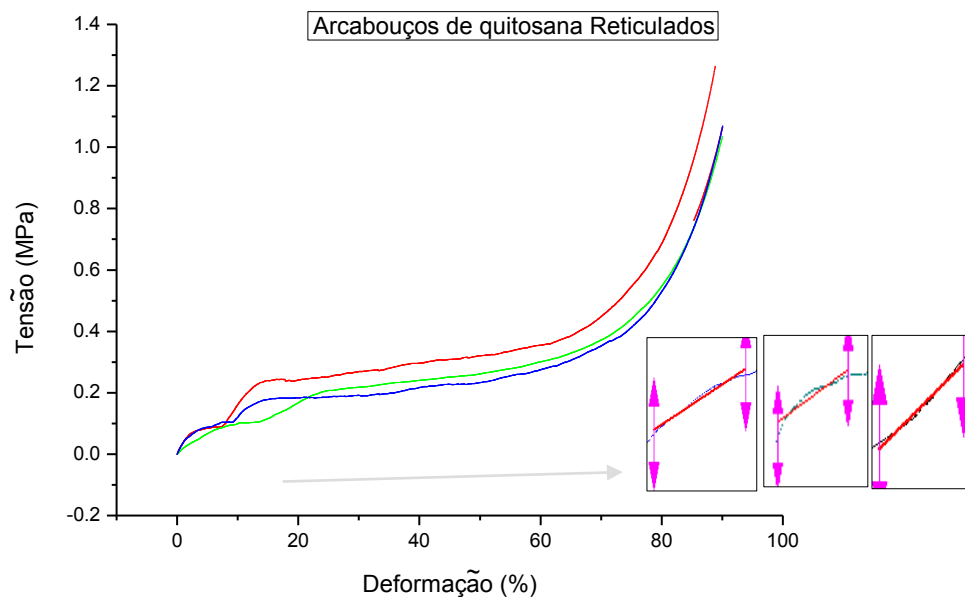


Figura 46 - Gráfico Tensão x Deformação do arcabouço de quitosana-reticulada.

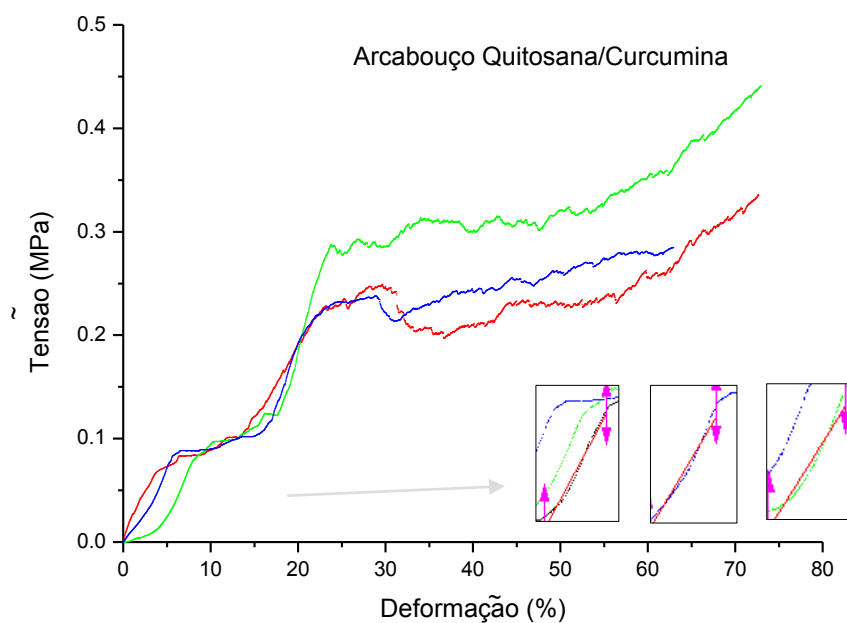


Figura 47 - Gráfico Tensão x Deformação do arcabouço de quitosana/curcumina.

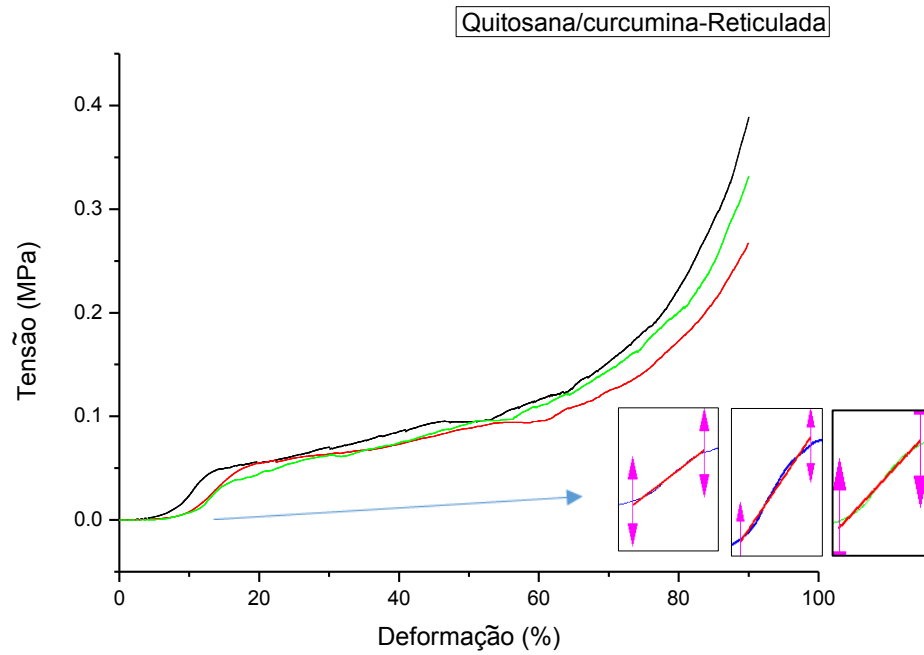


Figura 48 - Gráfico Tensão x Deformação do arcabouço de quitosana/curcumina reticulado.

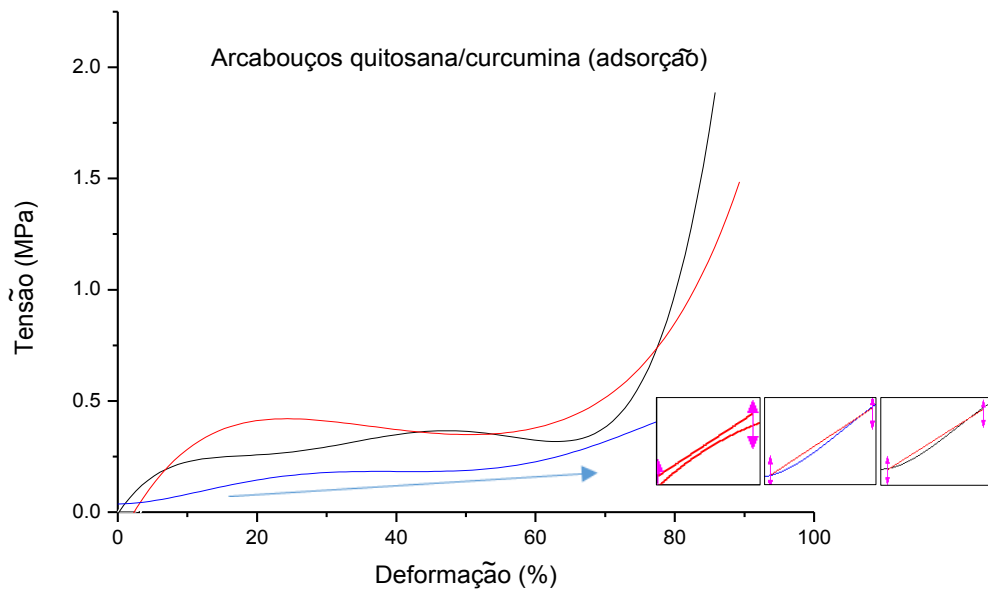


Figura 49 - Gráfico Tensão x Deformação do arcabouço de quitosana/curcumina (adsorção).

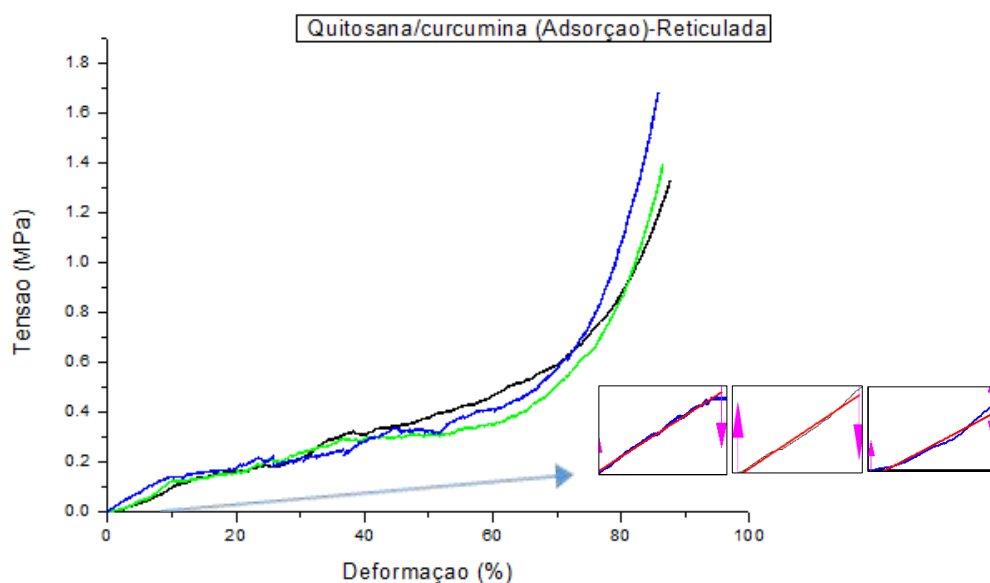


Figura 50 - Gráfico Tensão x Deformação do arcabouço de quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada.

De acordo com o gráfico das amostras reticuladas observa-se que ocorreu uma melhora significativa no comportamento da curva, provavelmente o reticulante introduzido na gelatina atuou preenchendo melhor os vazios intensificando a região platô e a densificação nas curvas.

Sendo o módulo de elasticidade numericamente igual ao valor do coeficiente angular da reta ajustada aos dados do diagrama tensão-deformação. A partir da região elástica das curvas tensão x deformação, obtiveram-se os módulos de elasticidade dos sistemas, apresentado na Figura 51.

De acordo com a Figura 51, a resistência à compressão média dos arcabouços de quitosana, quitosana reticulada, quitosana/curcumina, quitosana/curcumina-reticulada, quitosana/curcumina (adsorção) e quitosana/curcumina (adsorção) - reticulada, foram determinadas como sendo de $0,0161 \text{ MPa} \pm 0,0015$; $0,0117 \text{ MPa} \pm 0,0028$; $0,0146 \text{ MPa} \pm 0,0014$; $0,0054 \text{ MPa} \pm 0,0087$; $0,0048 \text{ MPa} \pm 0,0013$, $0,0126 \text{ MPa} \pm 0,0015$ respectivamente.

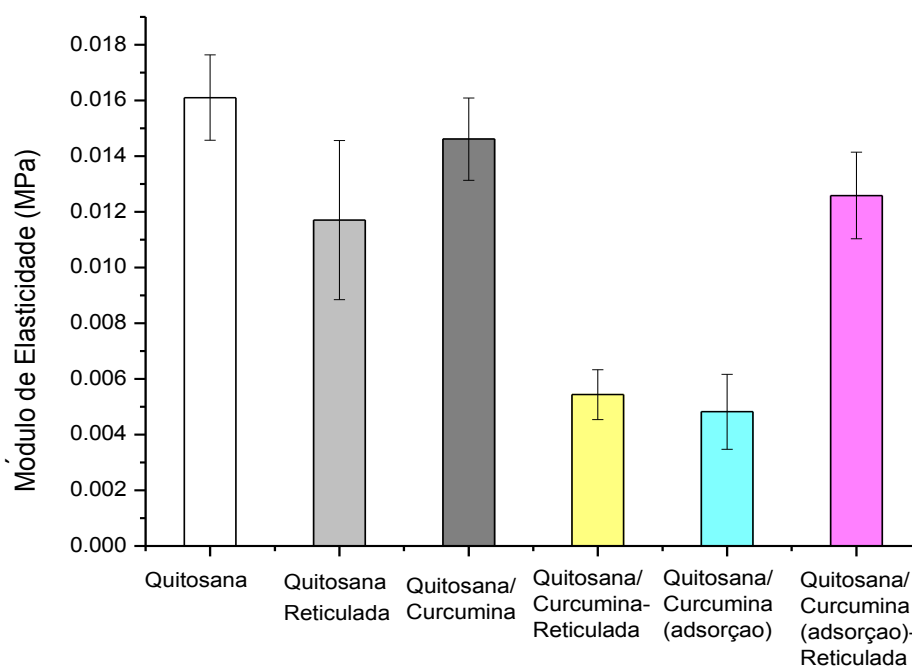


Figura 51 - Gráfico do Módulo de Elasticidade dos arcabouços de quitosana, quitosana reticulada, quitosana/curcumina, quitosana/curcumina-reticulada, quitosana/ curcumina (adsorção) e quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada.

Ainda segundo o gráfico do Módulo de Elasticidade (Figura 51), verifica-se que a resistência a compressão dos arcabouços de quitosana/curcumina (adsorção) – reticulada, foi a única composição reticulada que apresentou aumento, no módulo de elasticidade quando comparada com a amostra não reticulada.

Verifica-se também que todas as amostras com fármaco apresentaram redução do módulo. Fideles 2014, obteve arcabouços de quitosana obtidos também pela técnica de agregação de partículas apresentando uma resistência a compressão de 0,0529 MPa. Provavelmente este maior valor de módulo, comparando com os resultados obtidos nesta pesquisa, deve-se a utilização do TPP como agente reticulante durante a formação das esferas. Segundo Martins et al. 2012, o TPP interage com a quitosana através de forças eletrostáticas, os grupos amina protonados da quitosana interage com os íons carregados negativamente sobre TPP através de interações iônicas criando redes iônicas. O que ocasionou uma maior resistência a compressão.

No que se refere as estruturas tridimensionais obtidas para a regeneração do tecido da mama, tem-se de acordo com Wellman et al. 1999, que o tecido gorduroso é quase incompressível devido a ser linear e extremamente macio. Isto implica que o coeficiente de Poisson é de 0,5 e que apenas o módulo de elasticidade é necessário para caracterizar este tecido. Também afirma que o tecido da mama pode ser descrito principalmente como elástico, pois suas propriedades são independentes da taxa de deformação. Apresentando um Módulo de Yong de $0,0048 \text{ MPa} \pm 0,0025$, para o tecido adiposo da mama.

Samani et al. 2007, desenvolveram técnicas especializadas para medir a elasticidade dos tecidos normais da mama, sendo de $0,00325 \text{ MPa} \pm 0,00091$, o Módulo de Yong encontrado para as amostras de tecido adiposo.

Ramião et al. 2012, avaliaram que os módulos de elasticidade do tecido fibroso, glandular e cancerosos, são significativamente mais elevados do que o tecido adiposo. O tecido gorduroso exibe uma resposta linear maior do que os outros tecidos descritos.

Já Sinkus et al., (2000) e Tanner et al., (2006), apresentaram também valores semelhantes de resistência a compressão do tecido adiposo mamário sendo $0,0005$ a $0,001 \text{ MPa}$ e de $0,00025$ a $0,001 \text{ MPa}$ respectivamente.

A partir de então, verifica-se que os valores de Módulo de Elasticidade para o tecido adiposo obtidos por Wellman et al. (1999); Samani et al. (2007); Sinkus et al. (2000); Tanner et al. (2000), são similares e até menores quando comparados com os valores dos arcabouços obtido nesta pesquisa, onde a partir da Figura 51, verifica-se que o menor valor de módulo de Elasticidade obtidos pelos sistemas, foi de $0,0048 \text{ MPa}$ para o arcabouço de quitosana/curcumina (adsorção).

Contudo, tem-se que os arcabouços obtidos pelo método de agregação de partículas com e sem o fármaco, apresentam-se propriedade mecânica de compressão satisfatórias, tornando o material promissor para o uso como regeneração de tecido mamário, após a remoção de um certo volume de tecido por meio da mastectomia, sendo este efeito potencializado através da liberação do fármaco curcumina que apresenta propriedades anticancerígenas satisfatórias.

4.7 Validação do Método Analítico para a Quantificação da Curcumina

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

4.7.1 Determinação do Comprimento de onda da Curcumina

Inicialmente foi realizada uma varredura na concentração de 5 µg/mL de solução de curcumina, entre 200 e 800 nm com o objetivo de verificar o comprimento de onda do fármaco. Obtendo o pico de absorção máxima do fármaco em 422 nm, conforme apresentado na Figura 52.

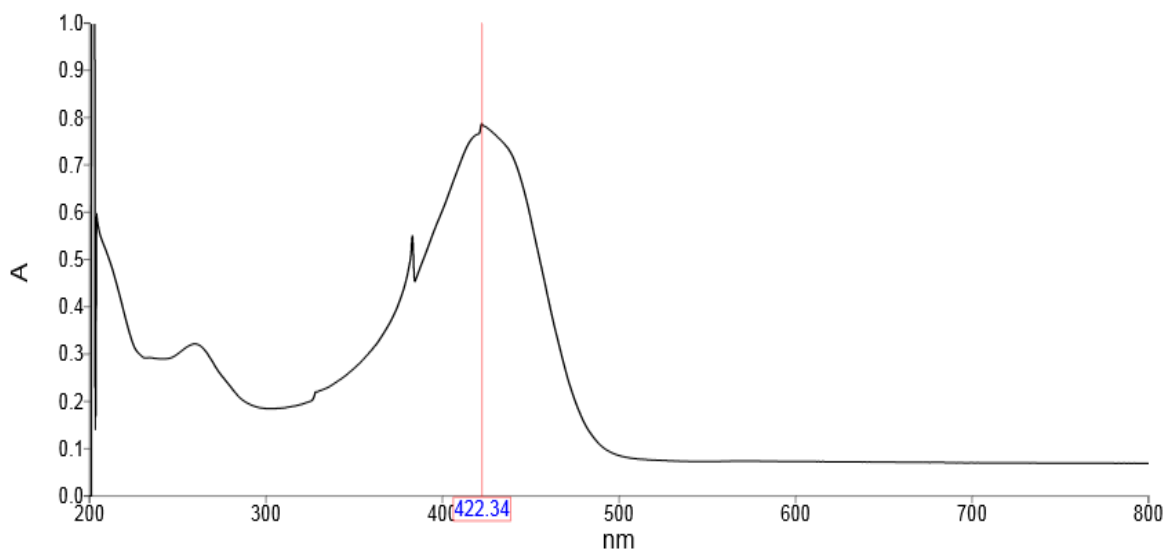


Figura 52 - Espectro da solução de curcumina (5 µg/mL), apresentando a absorção máxima em 422nm.

Corroborando com os resultados apresentados por Martins, 2012. De acordo com a literatura os curcuminóides apresentam um comprimento de onda de aproximadamente 420 nm (SHIMADZU APPLICATION NEWS, 2015).

4.7.2 Especificidade e Seletividade

A fim de provar a especificidade do método, verificou-se o comprimento de onda da liberação da amostra do arcabouço com o fármaco, com a quitosana e gelatina reticulada, comparando com o espectro na curcumina pura (Figura 53). Demonstra-se portanto, a seletividade da metodologia, haja vista que não houve o surgimento de novos picos referentes os demais materiais utilizados, observou-se apenas o pico em 422 nm referente a curcumina.

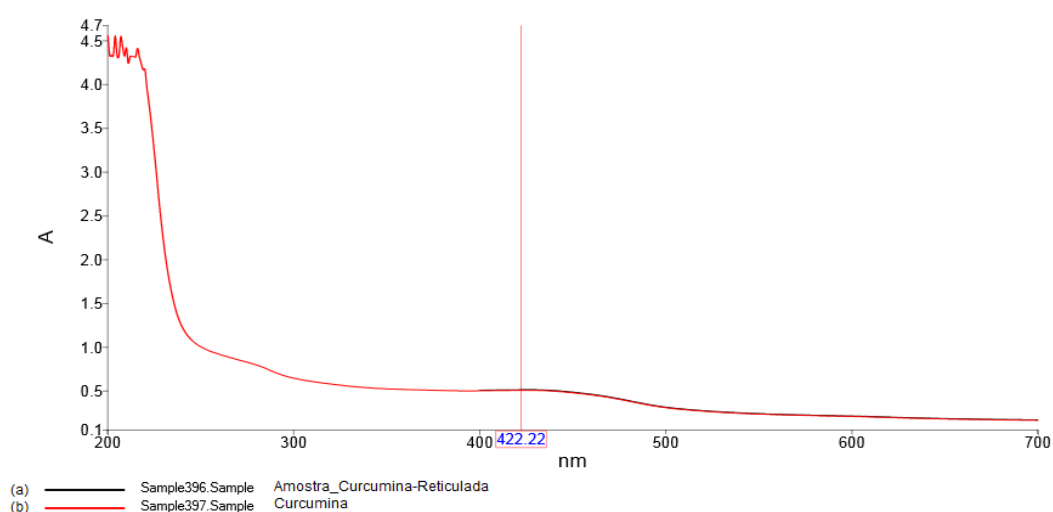


Figura 53 - Espectro de emissão (a) amostra do arcabouço com o fármaco, a quitosana e o reticulante, (b) da solução padrão de curcumina 4 $\mu\text{g/mL}$.

4.7.3 Linearidade e Intervalo

A linearidade foi estudada utilizando soluções de curcumina, utilizando 10 pontos, com concentrações variando de 0,015 $\mu\text{g/mL}$ a 10 $\mu\text{g/mL}$. Onde obteve-se uma curva de origem linear (Figura 54), pelo método dos mínimos quadrados, apresentando o coeficiente de correlação de 0,995636 corroborando assim com o critério descrito na RE 899/2003 ANVISA, que determina um coeficiente de correlação mínimo de $r = 0,99$.

Logo, as soluções preparadas, dentro do intervalo especificado, apresentaram leituras de absorção diretamente proporcionais à concentração do analito, confirmando a linearidade do método.

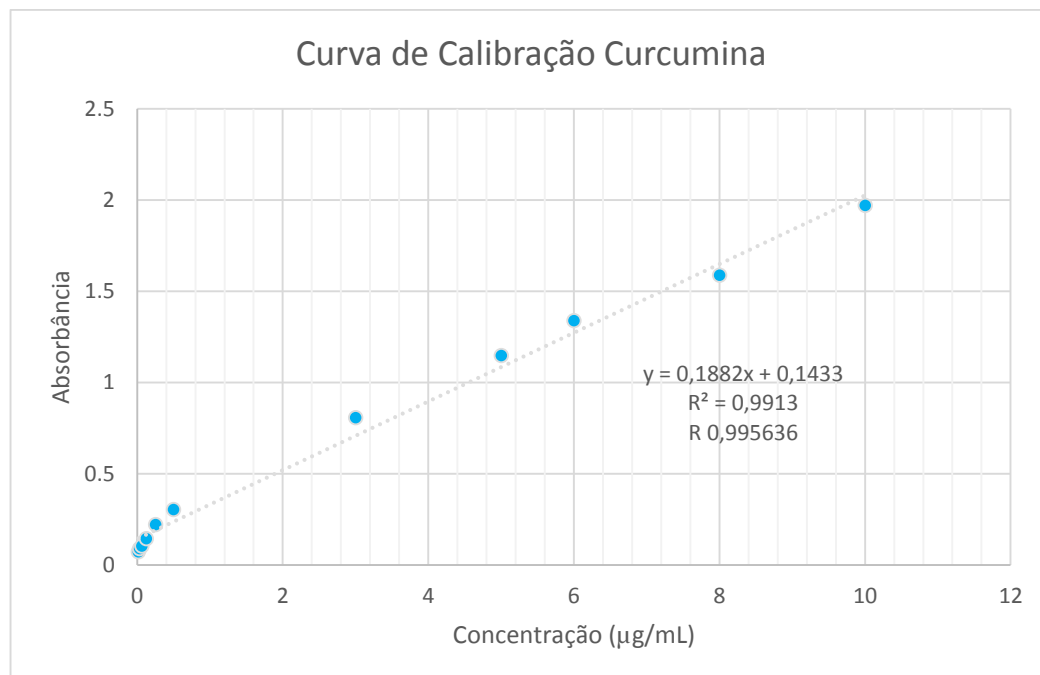


Figura 54 - Curva de calibração da curcumina, obtida pelo método espectrofotométrico UV/VIS.

4.7.4 Exatidão

Os dados apresentados na Tabela 7 foram obtidos por triplicata das 3 concentrações de alta, média e baixa (0,015; 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) para a verificação da exatidão do método.

A partir da Tabela 7 verifica-se que o método é considerado exato em relação as concentrações analisadas conforme as especificações estabelecidas pela ANVISA RE 899/03, onde os valores de DPR% foram menores que o máximo permitido pela ANVISA que é de 5%.

Tabela 7 - Valores para verificação da exatidão do método.

Concentração Teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração Obtida($\mu\text{g/mL}$) (n=6)	Exatidão (%) (n=6)
0,015	0,015342	102,2767
0,015	0,015263	101,7513
0,015	0,015394	102,6270
0,015	0,015313	102,0893
0,015	0,015297	101,9808
0,015	0,015375	102,5013
	Média	102,2044
	DPR(%)*	0,43
5	5,04360	100,8720
5	5,05609	101,1218
5	5,05543	101,1086
5	5,05543	101,1086
5	5,05490	101,0980
5	5,05500	101,1000
	Média	101,0682
	DPR(%)*	0,10
10	9,89404	98,9404
10	9,98721	99,8721
10	10,30355	103,0355
10	10,18460	101,8460
10	9,87997	98,7997
10	10,12035	101,2035
	Média	100,6162
	DPR(%)*	1,69

DPR*= Desvio Padrão Relativo

4.7.5 Precisão

A Tabela 8 apresenta os dados obtidos pelo ensaio de precisão (repetibilidade) e a Tabela 9 mostra os dados obtidos pelo ensaio de precisão (intermediária).

A repetibilidade do método foi avaliada a partir da leitura (n=6) do ponto médio da curva de calibração (5 $\mu\text{g/mL}$) e a precisão intermediária foi também avaliada a partir do ponto médio da curva (n=6), porém em dois dias e com analistas distintos.

Tabela 8 - Valores para a verificação da precisão (repetibilidade).

Concentração Teórica (µg/mL)	Concentração Obtida(µg/mL) (n=6)	Precisão (DPR%)*
5	5,0306 ± 0,03	0,5

Tabela 9 - Valores para a verificação da precisão (precisão intermediária).

Analista	Dia	Concentração Teórica (µg/mL)	Concentração Obtida(µg/mL) (n=6)	Precisão (DPR%)*
A	1	5	4,9413±0,1134	2,294
A	2	5	4,9555±0,1673	3,398
B	1	5	5,0933±0,0881	1,730
B	2	5	4,9937±0,0489	0,980

DPR*= Desvio Padrão Relativo

A partir dos resultados apresentados nas Tabela 8 e 9, tem-se que o método é preciso uma vez que os resultados obtidos estão de acordo com o padrão da ANVISA, ou seja, com DPR% inferior a 5%.

4.7.6 Robustez

A robustez do método foi analisada a partir de mudanças nos parâmetros das condições analíticas como, utilização de diferentes solventes. Conforme apresentada na Tabela 10.

A partir da Tabela 10 verifica-se que o método apresentado é robusto. Haja visto que os resultados apresentaram uma precisão, DPR (%) menor do que 5% para todas as variações das condições analíticas analisadas.

Tabela 10 - Valores para a verificação da robustez do método.

Modificações	Concentração Teórica (µg/mL)	Concentração Obtida(µg/mL) (n=6)	Exatidão (%)	Precisão (DPR%)*
Solvente Acetona	5	5,08107±0,0717	98,404	1,4118
Solvente Metanol (F1)	5	5,0297±0,0358	99,407	0,7014
Solvente Metanol (F2)	5	5,0955±0,0449	98,976	3,7647

DPR*= Desvio Padrão Relativo

F1= Metanol - NEON

F2= Metanol - VETC

4.7.7 Limite de Quantificação

De acordo com a ANVISA o limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003). Neste trabalho verificou-se que a concentração de 2,88 µg/mL foi a que apresentou menor nível com precisão e exatidão aceitáveis.

4.7.8 Limite de Detecção

Para o limite de detecção que refere-se a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas, obteve-se uma concentração de 2,79 µg/mL. Portanto tem-se que o método apresentado é exato, preciso e reprodutível sendo capaz de quantificar a curcumina nos arcabouços de quitosana.

4.8 Liberação da curcumina a partir dos arcabouços de quitosana.

A Figura 55, apresenta o gráfico com o perfil de liberação dos arcabouços de quitosana/curcumina, quitosana/curcumina-reticulada, quitosana/curcumina (adsorção), quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada

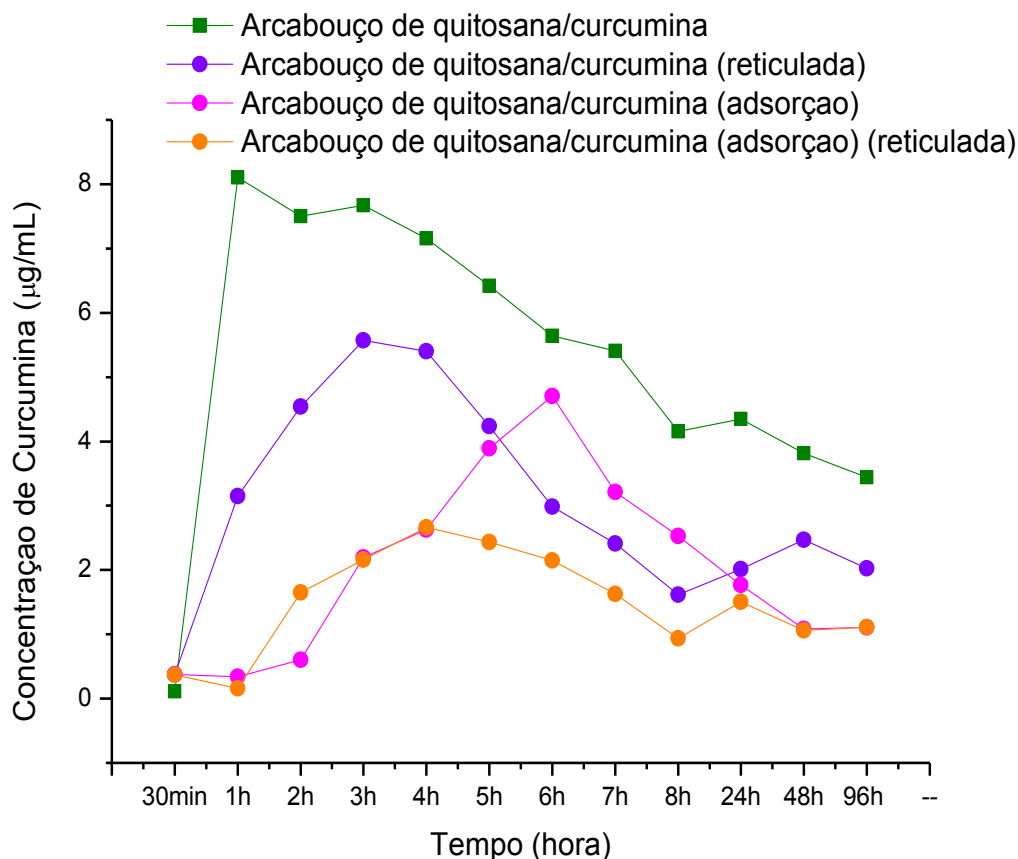


Figura 55 - Gráfico do perfil de liberação dos arcabouços de quitosana/curcumina, quitosana/curcumina-reticulada, quitosana/curcumina (adsorção), quitosana/ curcumina (adsorção)-reticulada obtidas por um espectrofotômetro UV/Vis.

No ensaio de liberação *in vitro* da curcumina utilizou-se 0,35 g dos arcabouços de quitosana/curcumina, quitosana/curcumina-reticulada, quitosana/curcumina (adsorção), quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada, em 60 mL de PBS em um agitador magnético (80 rpm) em temperatura ambiente.

A liberação da curcumina foi determinada a partir de alíquotas de 2 mL que foram retiradas em um tempo pré-determinado, em seguida alíquotas com o mesmo volume de PBS eram colocadas na solução. As concentrações de curcumina nas soluções foram determinadas a partir das leituras em um espectrofotômetro UV-Vis.

A Figura 55 apresenta o gráfico do perfil de liberação *in vitro* da curcumina a partir dos arcabouços de quitosana/curcumina, quitosana/curcumina-reticulada, quitosana/ curcumina (adsorção), quitosana/ curcumina (adsorção)-reticulada.

A liberação máxima das amostras ocorreu em diferentes tempos, sendo a liberação máxima da curcumina/quitosana (8 $\mu\text{g/mL}$), em 1 hora, da quitosana/curcumina-reticulante (5,5 $\mu\text{g/mL}$), em 3 horas, da quitosana/curcumina (adsorção) (4,7 $\mu\text{g/mL}$), em 6 horas, e da amostra de quitosana/curcumina (adsorção)-reticulante (2,6 $\mu\text{g/mL}$), em 4 horas. Verifica-se que maiores perfis de liberação foram apresentados para amostras obtidas pelo método de reação de solução (quitosana/curcumina), sendo maior para a amostra sem reticulação, onde a liberação máxima foi de aproximadamente 8 $\mu\text{g/mL}$, observada em 1 hora, após esse tempo verifica-se que a concentração começa a diminuir. Esses maiores perfis de liberação para as amostras de quitosana/curcumina e quitosana/curcumina-reticulada já eram esperadas devido aos resultados apresentados pelas curvas de DSC (Figura 39), onde verifica-se a perda de cristalinidade da amostra, indicando que a curcumina se encontra no estado amorfo do sistema, o que acarreta numa maior facilidade de liberação do fármaco no arcabouço.

Observa-se ainda na amostra de quitosana/curcumina, que a curcumina foi liberada no primeiro instante rapidamente, isso ocorreu provavelmente devido a presença da curcumina ligada fracamente na superfície da esfera conforme também apresentado por Nunes, 2013.

De acordo com Bajpai et al. 2015, a baixa liberação da curcumina a partir dos arcabouços obtidos é atribuído ao fato da baixa solubilidade em água da curcumina, como também da sua baixa biodisponibilidade.

Manju & Sreenivasan 2011, apresentaram um perfil de liberação crescente de esferas carregadas de curcumina sendo esta liberação em 24 horas de 0,26 $\mu\text{g/mL}$, chegando a 0,64 $\mu\text{g/mL}$ em 7 dias.

As amostras reticuladas (quitosana/curcumina-reticulante e quitosana/curcumina (adsorção)-reticulante), apresentam um perfil semelhante de liberação controlada conforme apresentado por Albanez 2012, o reticulante atuou possivelmente impedindo a liberação rápida do fármaco, haja visto que as amostras reticuladas apresentaram um perfil mais prolongado de liberação, conforme apresentado no gráfico, Figura 55. A liberação da amostra de quitosana/curcumina

(adsorção) apresentou perfil de crescimento regular até as 6 horas de liberação após esse período a concentração de curcumina começou a decair, chegando a aproximadamente 1 µg/mL, em 96 horas.

A amostra quitosana/curcumina apresenta também um perfil de liberação prolongada porém com uma liberação máxima na primeira hora, decaindo a concentração no decorrer do tempo. Já a amostra quitosana/curcumina (adsorção), apresenta um perfil de liberação provavelmente de aspecto lento (liberação retardada), uma vez que a liberação máxima ocorre apenas em 6 horas.

Maiti et al. 2007, estudaram um complexo de curcumina em combinação com fosfolipídios utilizando 1g de curcumina e obtiveram uma concentração máxima de liberação de curcumina (1,2µg/mL) em 1,5 hora. Já a curcumina pura teve sua concentração máxima em 1hora, com uma concentração bem menor de 0,5 µg/mL. Yallapu et al. 2010b, obtiveram nano partículas de PLGA/PVA com curcumina e verificou-se pelo ensaio de liberação que o aumento da quantidade de PVA nas partículas, retardava a liberação da curcumina, ou seja, a introdução do PVA aprisionava o fármaco nas nanopartículas. As nanopartículas sem adição do PVA obtiveram a liberação máxima de 98,92% ± 2,46 de curcumina em 25 dias, porém as amostras com 1% de PVA obtiveram apenas 64,37% ± 0,2 neste mesmo período.

Vimala et al. 2011, avaliaram a liberação da curcumina em filmes de Quitosana/PVA e em filmes de Quitosana/PVA com nanopartículas de prata, e verificou-se um perfil de liberação da curcumina semelhante para ambas amostras, porém a amostra de filmes de Quitosana/PVA alcançou a liberação acumulativa de 100% em 600 minutos, e no mesmo tempo a amostra de filmes de Quitosana/PVA com nanopartículas de prata apresentou uma liberação de aproximadamente 90%.

Sutaria et al. 2012, estudaram a liberação da curcumina a partir de nanopartículas preparadas utilizando ácido esteárico como lipídios e 100 mg de curcumina, durante um período de 5 dias. A liberação da curcumina foi observada a partir de 24 horas, e verificou-se um perfil lento de liberação, liberando cerca de 6,5 mg da droga aprisionada, em 120 horas. Jithan et al. 2012, observou que a solubilidade da curcumina, em nano partículas obtidas com soro de albumina bovino, foi cerca de quatro vezes maior, que a curcumina livre. Sendo que para a curcumina livre obteve-se uma concentração de aproximadamente 0,0003 µg/mL e para as nano partículas esta concentração foi de 0,0012 µg/mL.

Por ainda não possuir na literatura uma faixa terapêutica de liberação para a curcumina, não é possível verificar o tipo de liberação controlada obtidas para os sistemas estudados. Porém segundo Cheng et al. 2001, a curcumina ministrada na forma oral é tolerada em seres humanos, em altas doses de até 8000 mg ao dia.

Além de avaliar o perfil de liberação do fármaco, é importante verificar e compreender o mecanismo através do qual o fármaco é liberado a partir do dispositivo aplicado de liberação controlada. Segundo Pereira et al. 2013, a liberação do fármaco a partir de uma matriz polimérica é nada mais do que uma transferência de massa de um soluto para o meio (solvente) e existem vários fatores que afetam este processo (a geometria do material, o meio de imersão, o tamanho do soluto, etc).

4.9 Cinética de Liberação

A Tabela 11 apresenta os valores das constantes e do coeficiente de correlação para as equações de Higuchi, de Korsmeyer-Peppas e equação de Ordem Zero para todos os arcabouços com fármaco estudados.

Tabela 11 - Valores das constantes e do coeficiente de correlação para as equações de Higuchi, Korsmeyer-Peppas e equação de Ordem Zero.

ARCABOUÇOS	Higuchi	MODELOS			Ordem Zero
		0,43	0,60	0,85	
	R*	R*	R*	R*	R*
Quitosana/Curcumina	0,9680	0,9751	0,9881	0,9984	0,9710
Quitosana/Curcumina-reticulada	0,9914	0,9681	0,9701	0,9976	0,9680
Quitosana/Curcumina (adsorção)	0,9720	0,9727	0,9749	0,9980	0,9727
Quitosana/Curcumina(adsorção)-reticulada	0,9888	0,9688	0,9879	0,9984	0,9681

R*= Coeficiente de correlação

De acordo com Rodrigues et al. 2006, o modelo cinético utilizado para uma forma farmacêutica é avaliado através da linearização dos dados, de acordo com parâmetros dependentes do tempo e/ou porcentagem de fármaco liberado. A escolha do modelo cinético mais adequado ocorre através da avaliação do coeficiente de correlação, onde o modelo mais ajustado é aquele próximo da perfeita linearidade, ou seja, maiores valores de coeficiente de correlação (R^2).

4.9.1 Modelo de Korsmeyer-Peppas

Para o modelo de Korsmeyer-Peppas (Equação 10), utilizou-se os expoentes $n=0,45$; $0,43 < n < 0,85$ e $n=0,85$, que significa o expoente de liberação, que indica o mecanismo de liberação do fármaco.

Obteve-se para todas as amostras valores maiores de R^2 para o expoente $n=0,85$, que para formato esférico (configuração das partículas que compõem o arcabouço-Tabela 5), refere-se ao mecanismo de liberação do fármaco Transporte Caso II, ou seja, tem-se um sistema pouco solúvel.

De acordo com Siepmann & Siepmann 2012, para esferas com $n=0,85$ ocorre o intumescimento do polímero (relaxamento da matriz ou liberação mediante erosão), que envolve a transição de um estado semi-rígido a outro mais flexível. Este modelo de Korsmeyer-Peppas não leva em consideração apenas o intumescimento como processos determinantes na liberação do fármaco, mas também a difusão (Lopes et al., 2005).

Sampath et al. 2014, avaliaram o melhor modelo matemático, a partir do coeficiente de regressão, para os modelos de Higuchi e Korsmeyer-Peppas, e verificaram que é o modelo mais adequado para a liberação da curcumina em nanofibras de PLGA obtidas pela técnica de electrospinning, foi o de Korsmeyer-Peppas. Siswanta 2014, avaliou a liberação da curcumina a partir de nanopartículas de quitosana pelos modelos de ordem zero, primeira ordem, modelo de Higuchi e modelo Korsmeyer-Peppase e verificou que as nanopartículas curcumina-quitosana tendem a seguir modelos Korsmeyer-Peppas. Já Nguyen et al. 2014, avaliaram o perfil de liberação de curcumina em esferas de pectina, e verificou-se que suas amostras apresentaram boa linearidade ($R^2=0,985$) para o modelo Korsmeyer-Peppas.

4.9.2 Modelo de Higuchi

Nas amostras de quitosana/curcumina reticulada e quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada (Tabela 11), verificou-se que os valores de (R^2) também são satisfatórios para o modelo de Higuchi, o que já era esperado, uma vez que este modelo se adapta melhor a sistemas de liberação prolongada, o que foi apresentado por estes sistemas reticulados, de acordo com o gráfico de liberação (Figura 55). Higuchi descreve o mecanismo de liberação dos fármacos como um processo de difusão baseado na lei de Fick, estando dependente da raiz quadrada no tempo (Lopes et al., 2005). Liu et al. 2015, avaliaram a liberação da curcumina a partir de amostras de curcumina/lipossomas e quitosana/curcumina/lipossomas a 23°C, e verificaram que estes sistemas apresentaram maiores valores de coeficiente de correlação (R^2) para o modelo de Higuchi, ou seja, essa liberação é governada pelo processo de difusão.

4.9.3 Modelo de Ordem zero

Verifica-se também a partir dos dados obtidos (Tabela 11), que nenhuma amostra apresentou valores maiores para o modelo de Ordem zero. Pois este modelo é caracterizado por possui um perfil cinético de liberação independentemente da quantidade de fármaco presente na formulação, isto é, uma liberação de ordem zero. Indicando assim que a taxa de liberação da curcumina nos arcabouços estudados, é dependente da concentração do fármaco, conforme exposto por Xiao et al. 2015, quando verificou o perfil de liberação da curcumina a partir de nanopartículas de karifin com quitosana era dependente da concentração utilizada. Diante do exposto, verificou-se que os mecanismos cinéticos que mais se adequam os arcabouços obtidos foram os modelos de Korsmeyer-Peppas e de Higuchi.

4.10 Citotoxicidade

A biocompatibilidade é o requisito principal para utilização farmacológica de sistemas poliméricos. A “*International Organization for Standardization*” ISO 10993-5 apresenta um guia para avaliação da biocompatibilidade de materiais para aplicação

médica, com prioridade dada a estudos *in vitro* baseados em cultivo celular, através de contato direto e indireto (KOOP, 2012).

O ensaio de citotoxicidade é de grande importância nesta pesquisa, a fim de preencher um dos requisitos para a utilização dos arcabouços como sistemas de liberação controlada de fármaco. Diante disso, essas estruturas não devem conter substâncias tóxicas e nem causar reações adversas (VEIGA, 2012).

A Figura 56 apresenta o gráfico da avaliação citológica, a partir das células L929, de todos os arcabouços obtidos.

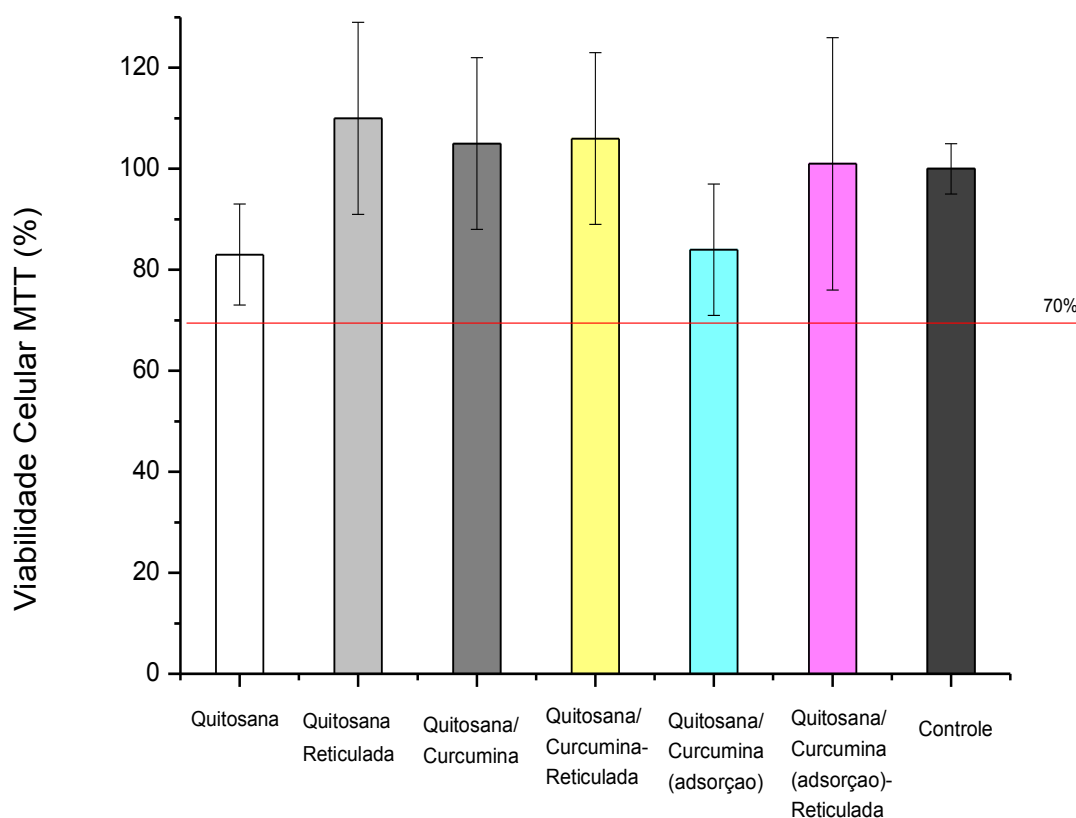


Figura 56 - Gráfico de avaliação citológica com células L929, dos arcabouços de quitosana, quitosana reticulada, quitosana/curcumina, quitosana/curcumina-reticulada, quitosana/curcumina (adsorção) e quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada.

É possível observar pela Figura 56, que as atividades metabólicas celulares dos arcabouços foram de $83\% \pm 10$ para a quitosana, $110\% \pm 19$ quitosana-reticulada, $105\% \pm 17$ quitosana/curcumina, $106\% \pm 17$ quitosana/curcumina-reticulada, $84\% \pm 13$ quitosana/curcumina-reticulada (adsorção) e $101\% \pm 25$ quitosana/curcumina-reticulada (adsorção)-reticulada. De acordo com ISO 10993-5, quando a viabilidade celular do material for maior que 70%, ele é considerado não citotóxico.

Portanto tem-se que as amostras com e sem fármaco, apresentaram viabilidade celular acima do índice de citotoxicidade (70%), indicando que estas amostras não exibem efeitos citotóxicos em contato com a linha celular L929.

Corroborando com os resultados de Anitha et al. 2001, que obteve nanopartículas de quitosana/sulfato de dextrano com curcumina e verificou para as células L929 uma viabilidade celular de 82,3 e 80,5%, para 24 e 48 horas, respectivamente. E Huang & Kuo 2015, que desenvolveram nanopartículas de quitosana/ fucoidano-O carboximetil para liberação da curcumina, onde observou-se que até 60µg de curcumina, as nanopartículas não possuem citotoxicidade com células de fibroblastos L929.

Já a Figura 57, apresenta a viabilidade celular dos arcabouços em células MCF-7.

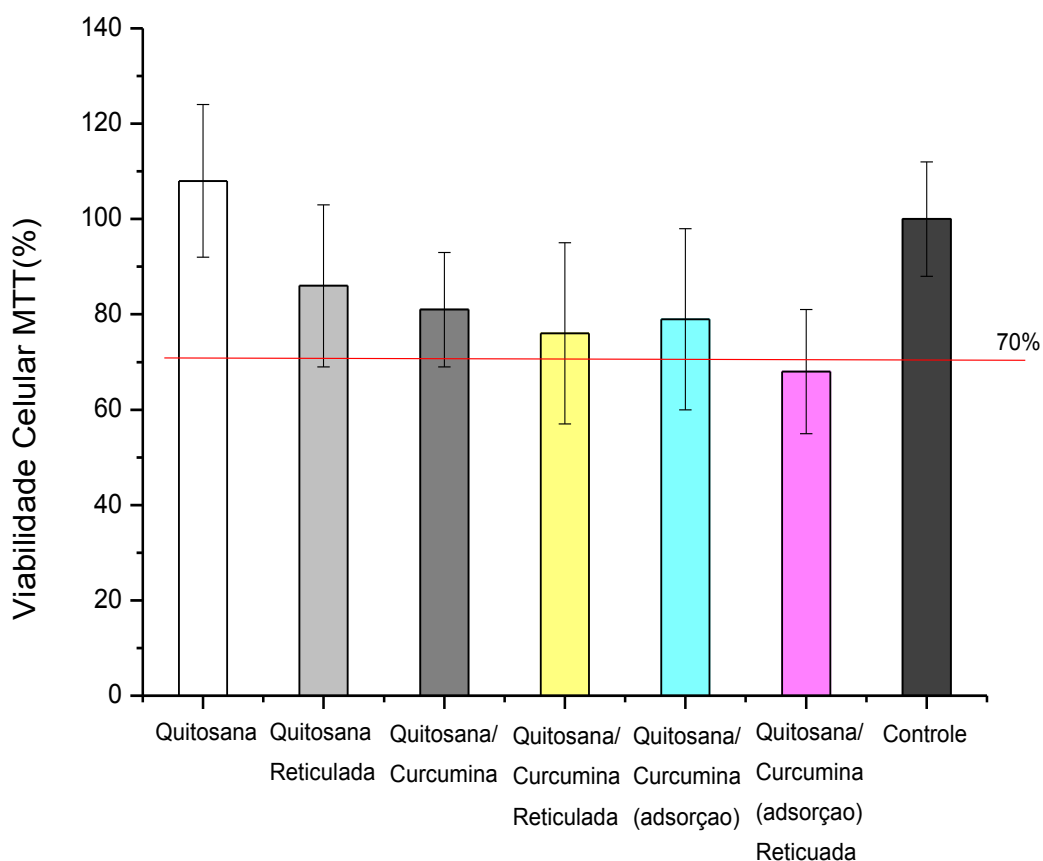


Figura 57 - Gráfico de avaliação citológica com células MCF-7, dos arcabouços de quitosana, quitosana reticulada, quitosana/curcumina, quitosana/curcumina-reticulada, quitosana/curcumina (adsorção) e quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada.

A Figura 57, apresenta a viabilidade celular para as células de câncer de mama-MCF-7, para todos os arcabouços obtidos na pesquisa. Onde conclui-se que a amostra de quitosana/curcumina(adsorção)-reticulada, é o único sistema que apresentou perfil tóxico para as células tumorais da mama, uma vez que apresentou viabilidade celular abaixo de 70%, indicando os efeitos anticancerígenos da curcumina. De acordo com a ISO 10993-5, se a viabilidade celular é reduzida a 70%, tem-se um potencial citotóxico.

Verificou-se ainda que as amostras de quitosana e quitosana-reticulada apresentaram menor alteração significativa da viabilidade celular para estas células, o que já se esperava, uma vez que estes sistemas não apresentam o fármaco.

Xia et al. 2007, estudaram os efeitos inibidores do crescimento de curcumina, e a partir dos estudos in vitro concluíram que a curcumina inibe o crescimento celular e induz a apoptose em células MCF-7, uma linha celular de carcinoma da mama humano.

Kumar et al. 2014, preparou e avaliou a eficácia in vitro de nanopartículas de poli-hidroxiethyl metacrilato (PHEMA)/ácido esteárico/curcumina, em células MCF-7. Mostrando que as nanopartículas obtiveram uma alta atividade apoptótica em células de câncer de mama MCF-7.

Holly 2002, verificou que o tratamento com uma dose única de 10-20 μM curcumina bloqueia eficazmente a síntese de DNA e proliferação de células MCF-7 de câncer da mama. E que as concentrações de curcumina de 40 μM ou superior resultou em valores significativos de morte celular após 2 dias de tratamento.

Simon et al. 1998, investigou o mecanismo de ação dos curcuminóides, examinando seus efeitos sobre a proliferação de células MCF-7 de câncer de mama de humanos. Onde realizou um ensaio de MTT mostrando que a curcumina é um inibidor potente de células de crescimento de câncer de mama (MCF-7), induzindo também a apoptose dessas células cancerígenas.

Diante dos ensaios de citotoxicidade realizados com as células L929 (fibroblastos) e MCF-7 (câncer de mama), observou-se que as células não-cancerígenas foram significativamente menos afetadas toxicamente, do que as células cancerígenas. E que os efeitos tóxicos na linha celular MCF-7, foram maiores para a amostra quitosana/curcumina(adsorção)-reticulada, indicando assim que a curcumina é um promissor agente tóxico em células tumorais de câncer de mama.

5 CONCLUSÃO

A partir do objetivo geral desta pesquisa, que foi desenvolver arcabouços de quitosana como sistema de liberação controlada do fármaco curcumina, realizaram-se caracterizações e estudos comparativos a fim de observar a estrutura, propriedade e perfil de liberação do fármaco no material obtido. Para isto dois métodos de incorporação do fármaco, foram avaliados. O primeiro que baseia-se no método de reação entre a quitosana e a curcumina, e o segundo que refere-se ao método de adsorção onde a esfera de quitosana pré-formada, permanece em contato com a solução de curcumina.

Ambos os métodos de inclusão do fármaco nas esferas de quitosana, conseqüentemente nos arcabouços, foram analisados, confirmando a incorporação e a interação do fármaco com a matriz polimérica (quitosana).

Verificou-se que a escolha do método de inclusão do fármaco, afetou as propriedades térmicas e morfológicas. Fatores como porosidade, tamanho de poros e a reticulação ou não da gelatina influenciaram de maneira significativa na resistência a compressão dos arcabouços obtidos.

A partir dos ensaios de liberação, verificou-se que a metodologia utilizada e a reticulação da gelatina, afetaram o perfil de liberação. Neste contexto, o grau de intumescimento do material também é influenciável.

A amostra quitosana/curcumina-reticulada e quitosana/ curcumina-(adsorção)-reticulada, foram as amostras que apresentaram um perfil mais desejado de liberação prolongada. Mostrando assim a influência direta da reticulação da gelatina na cinética de liberação do fármaco. E através da análise dos modelos matemáticos, foi evidenciado que os mecanismos cinéticos que mais se adequaram foram os modelos de Korsmeyer-Peppas e o de Higuchi.

Ainda é importante ressaltar, que a metodologia utilizada para introdução do fármaco influencia no perfil de liberação, e a reticulação da gelatina tem influência de maneira satisfatória onde é possível obter um perfil de liberação prolongada.

Todos os seis sistemas utilizados, analisando a viabilidade celular, foram consideráveis viáveis. Quanto a ação dos sistemas em meio de células cancerígenas a amostra de quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada, foi a que demonstrou maior efetividade.

Deste modo, no que diz respeito à estrutura tridimensional, pode-se ser aplicada para adesão dos osteoblastos, fibroblastos, crescimento de hepatócitos, regeneração do tecido da mama, crescimento interno de osteóide e crescimento de tecido adiposo. Com relação ao fármaco foi verificado que o mesmo é liberado predominantemente a partir do processo de intumescimento e difusão, o que permitiu a obtenção de três sistemas de liberação com perfil prolongando, podendo ser utilizadas em patologias que requerem menor frequência de administração, como em doenças crônicas como câncer, hipertensão, epilepsia, diabetes tipo II, e um perfil de liberação retardada. E por fim, foram avaliados os sistemas com a finalidade de conferir sua aplicabilidade no tratamento de câncer de mama, onde foi constatado que o arcabouço de quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada é o mais promissor para esta aplicação, por apresentar um perfil de liberação prolongada mais regular, como também maior toxicidade nas células cancerígenas MCF-7.

6 SUGESTOES PARA TRABALHOS FUTUROS

No decorrer desta pesquisa surgiram algumas ideias e possíveis avanços referente a melhoria nas principais propriedades dos arcabouços. Logo, sugere-se:

Mudar o calibre da agulha, com o objetivo de variar o tamanho das esferas e conseqüentemente o tamanho dos poros do arcabouço, viabilizando assim o crescimento de diversos tecidos na estrutura;

Utilizar blendas poliméricas, por exemplo gelatina/quitosana com o fármaco, com o objetivo de avaliar agregação das esferas já durante o processamento, não necessitando de incorporar a gelatina após a produção das esferas. Outra característica que pode ser adquirida a partir da utilização da blenda e uma melhor encapsulação do fármaco o que mudará o perfil de liberação;

Adicionar uma carga cerâmica a quitosana, com objetivo de obter melhores propriedades mecânicas e um tempo de liberação mais prolongado;

Avaliar outras concentrações de curcumina no sistema, observando o perfil de liberação da mesma, e o seu comportamento citológico em células MCF-7, como também avaliar o perfil citotóxico por mais tempo;

Verificar o comportamento de fármaco antineoplásicos, que possuam faixa terapêutica, no arcabouço de quitosana;

Constatar a citotoxicidade dos arcabouços quitosana/curcumina diante a presença de outros tipos de células cancerígenas, e avaliar os componentes do arcabouço de forma isolada frente as estas células;

E utilizar reticulante nas esferas com objetivo de avaliar a sua influência na liberação do fármaco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABC DO CÂNCER: **Abordagens Básicas para o Controle do Câncer**. Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, 2011.

ABOUZEID, A. H.; PATEL, N. R.; TORCHILIN, V. P. Polyethylene glycol-phosphatidylethanolamine (PEG-PE)/vitamin E micelles for co-delivery of paclitaxel and curcumin to overcome multi-drug resistance in ovarian cancer. *Pharmaceutical Nanotechnology*. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 464, n. 1–2, p. 178–184, 2014.

ADITYA, N.P.; SHIM, M.; YANG, H.; LEE, Y.; KO, S. Antiangiogenic effect of combined treatment with curcumin and genistein on human prostate cancer cell line. **Journal of Functional Foods**. v. 8, p. 204–213, 2014.

AKHTAR, F.; RIZVI, M. M. A.; KAR, S. K. Oral delivery of curcumin bound to chitosan nanoparticles cured *Plasmodium yoelii* infected mice. **Biotechnology Advances**. v. 30, n.1, p. 310–320, 2012.

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

ALMEIDA, V.; LEITÃO, A.; REINA, L.; MONTANARI, C.; DONNICI, C. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**. v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ANANDHARAMAKRISHNAN, C.; RIELLY, C. D.; STAPLEY, A. G. F. Spray-freeze-drying of whey proteins at sub-atmospheric pressures. **Dairy Science and Technology**. v. 90, n. 2-3, p. 321-334, 2010.

ANITHA, A.; DEEPA, N.; CHENNAZHI, K.P.; LAKSHMANAN, V.; JAYAKUMAR, R. Combinatorial anticancer effects of curcumin and 5-fluorouracil loaded thiolated chitosan nanoparticles towards colon cancer treatment. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**. v.1840, n.9, p. 2730-2743, 2014.

ANITHA, A.; MAYA, S.; DEEPA, N.; CHENNAZHI, K.P.; NAIR, S.V.; TAMURA, H.; JAYAKUMAR, R. Efficient water soluble O-carboxymethyl chitosan nanocarrier for the delivery of curcumin to cancer cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n.2 ,p.452–461, 2011.

ARANAZ, I.; MENGÍBAR, M.; HARRIS, R.; PAÑOS, I.; MIRALLES, B.; ACOSTA, N.; GALED, G.; HERAS, Á. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. **Current Chemical Biology**, v.3, n. 2, p. 203-230, 2009.

ARAUJO, C. A. C.; LEON, L. L. Biological Activities of Curcuma Longa L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 5, p. 723-728, 2001.

ARUN G.; SHWETA P.; UPENDRA K. J. Formulation and evaluation of ternary solid dispersion of curcumin. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 5, p. 360-365, 2012.

ARYA, P.; PATHAK, K. Assessing the viability of microsponges as gastro retentive drug delivery system of curcumin: Optimization and pharmacokinetics. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 460, n.1-2, p. 1-12, 2014.

ASHBY, M.F. The properties of foams and lattices. **Philosophical Transactions of the Royal Society A**. v. 364, n. 1838, p.15-30, 2006.

ASSIS, O. B. G.; SILVA, V. L. da. Caracterização Estrutural e da Capacidade de Absorção de Água em Filmes Finos de Quitosana Processados em Diversas Concentrações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 223-228, 2003.

AZAR, F. S.; METAXAS, D. N.; SCHNALL, M. D. Methods for modeling and predicting mechanical deformations of the breast under external perturbations. **Medical Image Analysis**. v.6, n.1, p. 1-27, 2002.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA. M. V.; FOOK, M. V. L.; COSTA, A. C. F. M.: Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**. v.2, n.3, p. 27-34, 2007.

BADER, R. A.; PUTNAM, D. A. **Engineering Polymer Systems for Improved Drug Delivery**. Wiley. New Jersey. 2014

BAJPAI, S. K.; CHAND, N.; AHUJA, S. Investigation of curcumin release from chitosan/cellulose micro crystals (CMC) antimicrobial films. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.79, n. p.440-448, 2015.

BALAN, V.; VERESTIUC, L. Strategies to improve chitosan hemocompatibility: A review. **European Journal Polymer**. v. 53 , p. 171-188, 2014.

BAO, T.; FRANCO, R. A.; LEE, B. Preparation and characterization of a novel 3D scaffold from poly(ϵ -caprolactone)/biphasic calcium phosphate hybrid composite microspheres adhesion. **Biochemical Engineering Journal**. v. 64, p.76-83, 2012.

BARROS, F. C. F.; CAVALCANTE, R. M.; CARVALHO, T. V.; DIAS, F. S.; QUEIROZ, D. C.; VASCONCELLOS, L. C. G.; NASCIMENTO, R. F. Produção e Caracterização de Esfera de Quitosana Modificada Quimicamente. **Revista Iberoamericana de Polímero**. v. 7, n. 4, p. 232-246, 2006.

BASNET, P.; SKALKO-BASNET, N. Curcumin: An Anti-Inflammatory Molecule from a Curry Spice on the Path to Cancer Treatment. **Molecules**, v.16, n.6, p. 4567-4598, 2011.

BEAHM, E. K; WALTON, R. L; PATRICK JR, C. W. Progress in adipose tissue construct development. **Clinics in Plastic Surgery**. v.30, n.4, p. 547-558, 2003.

BEPPIU, M. M. ; ARRUDA E. J.; SANTANA C. C. Síntese e Caracterização de Estruturas Densas e Porosas de Quitosana. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.9, n.4, p.163-169. 1999.

BERNER, A.; WOODRUFF, M.A.; LAM, C.X.F.; ARAFAT, M.T. ; SAIFZADEH, S.; STECK, R.; REN, J.; NERLICH, M.; EKAPUTRA, A.K.; GIBSON, I.; HUTMACHER, D.W. Effects of scaffold architecture on cranial bone healing. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v.43, n.4, p.506–513. 2014.

BERNKOP-SCHNÜRCH, A.; DÜNNHAUPT, S. Chitosan-based drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 81, n.3, p.463–469, 2012.

BIERBRAUER, K. L.; ALASINO, R. V.; MUÑOZ, A.; BELTRAMO, D. M.; STRUMIA, M. C. Characterization and bacterial adhesion of chitosan-perfluorinated acid films. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 114. p. 201– 208, 2014.

BIONDI, M.; UNGARO, F.; QUAGLIA, F.; NETTI, P. A. Controlled drug delivery in tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 60, n.2, p. 229–242, 2008.

BISPO, V. M. **Estudo do Efeito da Reticulação por Genipin em suportes biocompatíveis de Quitosana-PVA**. 2009.(Tese de doutorado). Pós Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

BITENCOURT, C.M. **Desenvolvimento e aplicação de filmes á base de gelatina aditivados com extrato etanólico de cúrcuma (*Curcuma longa L.*)**. 2013. (Dissertação Mestrado). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo. Ciência da Engenharia de Alimentos. Pirassununga.

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

BU, H.; HE, X.; ZHANG, Z.; YIN, Q.; YU, H.; LI, Y. A TPGS-incorporating nanoemulsion of paclitaxel circumvents drug resistance in breast cancer. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 471, n. 1–2, p.206–213, 2014.

BUZANELLO, R. A. da S. **Nanoencapsulação de curcumina em polímeros biodegradáveis/biocompatíveis**. 2013. (Dissertação Mestrado). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão.

CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITTO, D. DE; CURTI, E.; ABREU, F. R.; BATTISTI, C.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. L. Extração, Estruturas e Propriedades de α - e β -Quitina. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p.644-650, 2007.

CATÃO, A. J. L. **Estudo de Adsorção de íons Cobre (II) em Esferas de Quitosana e Esferas de quitosana Reticulada**. 2012. (TCC). Universidade Estadual de Goiás. Trabalho de Conclusão de Curso. Anápolis.

CHEN, J., DAI W.T., HE, Z.M ; GAO, L; HUANG, X; GONG, J.M; XING, H.Y ; CHEN, W.D. Fabrication and evaluation of curcumin-loaded nanoparticles based on solid lipid as a new type of colloidal drug delivery system. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 75, n. 2, p. 178-184. 2013.

CHEN, Z.; SANGWAN, V.; BANERJEE, S.; CHUGH, R.; DUDEJA, V.; VICKERS, S. M.; SALUJA, A. K. Triptolide sensitizes pancreatic cancer cells to TRAIL-induced activation of the Death Receptor pathway. **Cancer Letters**. v. 348, n. 1–2, p. 156–166, 2014a.

CHEN, B.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; RAO, J.; JIANG, X.; XU, Z. Curcumin inhibits proliferation of breast cancer cells through Nrf2-mediated down-regulation of Fen1 expression. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. v. 143, p. 11–18, 2014b.

CHEN, Z.; XIA, Y. ; LIAO, S.; HUANG, Y.; LI, Y.; HE, Y.; TONG, Z. ; LI, B. Thermal degradation kinetics study of curcumin with nonlinear methods. **Food Chemistry**. v.155, p.81–86, 2014c.

CHENG, A. L.; HSU, C.H. ; LIN, J.K. ; HSU, M.M.; HO, Y.F.; SHEN, T.S. ; KO, J.Y.; LIN, J.T.; LIN, B.R.; MING-SHIANG, W.; YU, H.S. ; JEE, S.H.; CHEN, G.S.; CHEN, T.M.; CHEN, C.A.; LAI, M.K.; PU, Y.S.; PAN, M.H.; WANG, Y.J.; TSAI, C.C.; HSIEH, C.Y. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. **Anticancer Research**. v. 21, n.4, p. 2895–2900, 2001.

CHIEN, C.; MA, K.; LEE, H.; LIU, P.; LI, Y.; HUANG, Y.; CHUEH, S. Dual effect of capsaicin on cell death in human osteosarcoma G292 cells. Molecular and cellular pharmacology. **European Journal of Pharmacology**. v.718, n.1–3, p.350–360, 2013.

CHOA Y.S.; KIMC, B.S.; YOUB, H.K.; CHOA, YOUNG-S. A novel technique for scaffold fabrication: SLUP (salt leaching using powder). **Current Applied Physics**. v.14, n.3, p. 371-377. 2014.

CHUAH, L. H.; ROBERTS, C. J.; BILLA, N.; ABDULLAH, S.; ROSLI, R. Cellular uptake and anticancer effects of mucoadhesive curcumin-containing chitosan nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 116, p. 228–236, 2014.

COELHO, P. M. B. S. **Desenvolvimento de Formulações de Liberação Modificada de Ranitidina**. 2007. (Dissertação Doutorado). Faculdade de Farmácia. Universidade do Porto. Porto.

COIMBRA, P. M. A. **Preparação e Caracterização de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos com base em Polímeros de Origem Natural**. 2010. (Dissertação Mestrado). Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. Coimbra.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 13, n 2, p. 123–133, 2001.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**. v. 1830, n.6, p. 3670–3695, 2013.

CRUZ, D.M. G.; SARDINHA, V.; IVIRICO, J.L.E.; MANO, J.F.; RIBELLES, J.L.G. Gelatin microparticles aggregates as three-dimensional scaffolding system in cartilage engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. v. 24, n.2, p. 503-513, 2013.

CUI, Z.; NELSON, B.; PENG, Y.; LI, K.; PILLA, S.; LI, W.; TURNG, L.; SHEN, C. Fabrication and characterization of injection molded poly (ϵ -caprolactone) and poly (ϵ -caprolactone)/hydroxyapatite scaffolds for tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v.32, n.6, p.1674–1681, 2012.

CUI, Z.; XIANG, Y.; SI, J.; YANG, M.; ZHANG, Q.; ZHANG, T. Ionic interactions between sulfuric acid and chitosan membranes. **Carbohydrate Polymers**. v.73, n.1, p.111 - 116, 2008.

DAI, Y.; DESANO, J. T.; MENG, Y.; JI, Q.; LJUNGMAN, M.; LAWRENCE, T. S.; XU, L. Celastrol Potentiates Radiotherapy by Impairment of DNA Damage Processing in Human Prostate Cancer. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**. v. 74, n. 4, p. 1217–1225, 2009.

DAMIAN, C.; BEIRÃO, L. H.; FRANCISCO, A.de; SANTO, M. L. P. E.; TEIXEIRA, E. Quitosana: Um Amino Polissacarídeo com Características Funcionais. **Alimentos e Nutrição**. v. 16, n. 2, p. 195-205, 2005.

DAS, R. K.; KASOJU, N.; BORA, U. Encapsulation of curcumin in alginate-chitosan-pluronic composite nanoparticles for delivery to cancer cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. v.6, n.1, p.153–160, 2010.

DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R.M.; CHIELLINI, E. Progress in Polymer Science. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Special Issue on Biomaterials**. v. 36, n. 8, p. 981–1014, 2011.

DATTA, P.; PRAMANIK, K. C.; MEHROTRA, S.; SRIVASTAVA, S. K. Chapter 23 – Capsaicin Mediated Oxidative Stress in Pancreatic Cancer. **Cancer. Oxidative Stress and Dietary Antioxidants**. p. 241–246, 2014.

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

DO, M. T.; KIM, H. G.; CHOI, J. H.; KHANAL, T.; PARK, B. H.; TRAN, T. P.; JEONG, T. C.; JEONG, H. G. Antitumor efficacy of piperine in the treatment of human HER2-overexpressing breast cancer cells. **Food Chemistry**. v. 141, n. 3, p. 2591–2599, 2013.

DONSI, F.; WANG, Y; LI, J.; HUANG, Q. Preparation of Curcumin Sub-micrometer Dispersions by High-Pressure Homogenization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.58, n.5, p. 2848–2853, 2010.

DORJ, B.; WON, J.; PUREVDORJ, O.; PATEL, K. D.; KIM, J.; LEE, E.; KIM, H. A novel therapeutic design of microporous-structured biopolymer scaffolds for drug loading and delivery. **Acta Biomaterialia**. v.10, n.3, p.1238–1250, 2014.

DU, Y.; CHEN, X.; KOH, Y. H.; LEI, B. Facilely fabricating PCL nanofibrous scaffolds with hierarchical pore structure for tissue engineering. **Materials Letters**. v.122, p. 62–65. 2014.

ELSABEE, M. Z.; ABDOU, E. S. Chitosan based edible films and coatings: A review. **Materials Science and Engineering: C**. v. 33, n. 4, p. 1819–1841, 2013.

FERNANDES, L. L.; RESENDE, C. X.; TAVARES, D. S.; SOARES, G. A.; CASTRO, L. O.; GRANJEIRO, J. M. Citocompatibilidade de quitosana e colágeno-quitosana scaffolds para engenharia de tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v.21, n.1, 2011.

FIDELES, T.B. **Filmes Reticulados de Quitosana para Aplicação como Biomaterial**. 2010. (Dissertação Mestrado). Programa de pós-graduação em Ciência e engenharia de Materiais. Universidade Federal de Campina Grande. Paraíba.

FIDELES, T. B. **Desenvolvimento de Scaffolds de Quitosana para Aplicação na Engenharia de Tecidos**. 2014. (Tese Doutorado). Ciência e Engenharia de Materiais Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais. Campina Grande. Paraíba.

FOLKMAN, J.; LONG, D.M. The use of silicone rubber as a carrier for prolonged drug therapy. **Journal of Surgical Research**. v. 4, n. 3, p.139–142, 1964.

FRYDRYCH, M.; ROMÁN, S.; MACNEIL, S.; CHEN, B. Biomimetic poly(glycerol sebacate)/poly(L-lactic acid) blend scaffolds for adipose tissue engineering. **Acta Biomaterialia**. v.18, p.40-49, 2015.

FURTH, M. E.; ATALA, A. **Principles of Tissue Engineering**. Fourth Edition. Chapter 6. Tissue Engineering: Future Perspectives. Academic Press. p. 83-123, 2014.

GHANBAR, H.; LUO, C.J.; BAKHSHI, P.; DAY, R.; EDIRISINGHE, M. Preparation of porous microsphere-scaffolds by electrohydrodynamic forming and thermally induced phase separation. **Materials Science and Engineering: C**. v.33, n.5, p. 2488-2498, 2013.

GNAVI, S.; BARWIG, C.; FREIER, T.; HAASSTERT-TALINI, K.; GROTHE, C.; GEUNA, S. Chapter One – The Use of Chitosan-Based Scaffolds to Enhance Regeneration in the Nervous System. **International Review of Neurobiology**. v.109, p.1–62, 2013.

GOLAN, D. E.; JR, A. H. T.; ARMSTRONG, E. J.; ARMSTRONG, A. W. Principles of Pharmacology: **The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy**. Lippincott Williams & Wilkins. p. 876-882, 3^o Ed. 2011.

GONSALVES, A. de A.; ARAÚJO, C. R. M.; SOARES, N. A.; GOULART, M. O. F.; ABREU, F. C. de. Diferentes Estratégias para a Reticulação de Quitosana. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p.1215-1223, 2011.

GORCZYCA, G.; TYLINGO, R.; SZWEDA, P.; AUGUSTIN, E.; SADOWSKA, M.; MILEWSKI, S. Preparation and characterization of genipin cross-linked porous chitosan–collagen–gelatin scaffolds using chitosan–CO₂ solution. **Carbohydrate Polymers**. v.102, p. 901-911, 2014.

GRYNKIEWICZ, G.; ŚLIFIRSKI, P. Curcumin and curcuminoids in quest for medicinal status. **Acta Biochimica Polonica**. v. 59, n. 2, p. 201–212, 2012.

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Hydrogel Nanoparticles in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 60, n.15, p. 638-1649, 2008.

HENNIG, E. L. **Utilização de Quitosana Obtida de Resíduos de Camarão para Avaliar a Capacidade de Adsorção de Íons Fe³⁺**. 2009. (Dissertação Mestrado). Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental. Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande.

HOFFMAN, A. S. The origins and evolution of “controlled” drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**. v. 132, n. 3, p. 153–163, 2008.

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

HORST, B. L. **Microencapsulação do Corante Natural Antocianina em Matriz Polimérica de Quitosana e Quitosana/Alginato Através das Técnicas de Impregnação, Coacervação e Spray Drying**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. Florianópolis, 2009.

HU, Y.; QI, Y.; LIU, H.; FAN, G.; CHAI, Y. Effects of celastrol on human cervical cancer cells as revealed by ion-trap gas chromatography–mass spectrometry based metabolic profiling. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**. v. 1830, n.3, p. 2779–2789, 2013.

HUANG, Y.; KUO, T. O-carboxymethyl chitosan/fucoidan nanoparticles increase cellular curcumin uptake. **Food Hydrocolloids**. p. 1-9, 2015.

HURYN, D. M.; WIPF, P. **Cancer Drug Design and Discovery**. Chapter 5 – Natural Product Chemistry and Anticancer Drug Discovery. p.107-130, 2008.

HURYN, D. M.; WIPF, P. **Cancer Drug Design and Discovery**. Second Edition. Chapter 3 – Natural Product Chemistry and Cancer Drug Discovery. p. 91-120, 2014.

IKEDA, R., FUJIOKA, H.; NAGURA, I.; KOKUBU, T.; TOYOKAWA, N.; INUI, A.; MAKINO, T.; KANEKO, H.; DOITA, M.; KUROSAKA, M. The effect of porosity and mechanical property of a synthetic polymer scaffold on repair of osteochondral defects. **International Orthopaedics**, v.33, n.3, p.821–828, 2009.

INCA. **Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>>. Acesso em: Junho de 2014a.

INCA. **Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2014: Síntese de Resultados e Comentários**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp>>. Acesso em: Junho de 2014b.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância – (Conprev). Falando sobre câncer de mama. Rio de Janeiro 2002. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/falando_cancer_mama1.pdf>. Acesso em: Junho de 2015.

JAEGHERE, W.; GEEST, B.G.; VAN BOCXLAER, J.; REMON, J.P.; VERVAET, C.; FONSECA, A. A. Formulation of poorly water-soluble drugs via coacervation – A pilot study using febantel. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.85, n.3, p. 930-935, 2013.

JARDIM, K. V. **Desenvolvimento de Nanopartículas de Quitosana/Sulfato de Condroitina para Nanoencapsulação da Curcumina Visando sua Liberação Controlada e Avaliação se sua Atividade Antitumoral**. 2013. (Tese Mestrado) Ciências de Materiais. Programa de Pós-Graduação em Ciências de Materiais da Universidade de Brasília. Brasília.

JASIM, F.; TALIB, T. Some Observations on the Thermal Behaviour of Curcumin Under air and Argon Atmospheres. **Journal of Thermal Analysis**. v. 38, n.11, p.2549-2552, 1992.

JAYAKUMAR, R. ; PRABAHARAN, M. ; KUMAR, P.T. S.; NAIR, S.V. ; TAMURA, H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. **Biotechnology Advances**. v. 29, n.3, p. 322–337, 2011.

JEONG, C. G.; HOLLISTER, S. J. A comparison of the influence of material on *in vitro* cartilage tissue engineering with PCL, PGS, and POC 3D scaffolds architecture seeded with chondrocytes. **Biomaterials**. v.31, n. 15, p. 4304–4312, 2010.

JIANG, B.; AKAR, B.; WALLER, T.M.; LARSON, J.C.; APPEL, A.A.; BREY, E.M. Design of a composite biomaterial system for tissue engineering applications. **Acta Biomaterialia**. v.10, n.3, p. 1177-1186, 2014.

JIANG, T.; ABDEL-FATTAH, W. I.; LAURENCIN, C. T. In vitro evaluation of chitosan/poly (lactic acid-glycolic acid) sintered microsphere scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**. v. 27, n. 28, p. 4894–4903, 2006.

JITHAN, A.V.; MADHAVI, K. ; MADHAVI, M. ;PRABHAKAR, K. Preparation and characterization of albumin nanoparticles encapsulating curcumin intended for the treatment of breast cancer. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**. v. 1, n. 2, p.119-125, 2011.

JOSUÉ, A.; LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T.; KIMURA, I. Y.; PEDROSA, R. C. Liberação Controlada da Eosina Impregnada em Microesferas de Copolímero de Quitosana e Poli(ácido acrílico). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.10, n 3, p. 116-121, 2000.

JUNIOR, G.A.M. **Esferas de goma do cajueiro e quitosana para liberação de fármacos**. (Dissertação Mestrado). 2007. Química Inorgânica. Centro de Ciências. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza.

KAEWNOPPARAT, N.; KAEWNOPPARAT, S.; JANGWANG, A.; MANEENAUN, D.; CHUCHOME, T.; PANICHAYUPAKARANANT, P. Increased Solubility, Dissolution and Physicochemical Studies of Curcumin-Polyvinylpyrrolidone K-30 Solid Dispersions. World Academy of Science, **Engineering and Technology**. v.31, n.7, 2009.

KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 62, n.1, p. 3–11, 2010.

KHANG, G.; KIM, M. S.; LEE, H. B. A Manual for Biomaterials/Scaffold Fabrication Technology. **Manuals in Biomedical Research**, v. 4, 2006.

KHAZIRA, J.; MIRB, B. A.; PILCHERA, L.; RILEYA, D. L. Role of plants in anticancer drug discovery. **Phytochemistry Letters**. v. 7, p. 173–181, 2014.

KIM, H.; KIM, D.; KARTHICK, S.N.; HEMALATHA, K.V.; RAJ, C. J.; SUNSEONG; YOUNGSON. Curcumin Dye Extracted from *Curcuma longa* L. Used as Sensitizers for Efficient Dye-Sensitized Solar Cells. **International Journal of Science Electrochemical**. v.8, p. 8320 – 8328, 2013.

KIM, T.; PARK, S.; CHO, S. Adsorption characteristics of Reactive Black 5 onto chitosan beads cross-linked with epichlorohydrin. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**. v. 18, n.4, p.1458-146, 2012.

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

KOOP, H. S.; **Hidrogéis Binários de Xantana e Galactomananas com Incorporação de Curcumina Visando Uso Tópico**. 2012. A curcumina auto-encapsulado em caseínas tem a actividade melhorada contra as células cancerosas colorectal HCT-116. (Tese de Doutorado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

KUCHARSKA, M.; WALENKO, K.; BUTRUK, B.; BRYNK, T.; HELJAK, M.; CIACH, T. Fabrication and characterization of chitosan microspheres agglomerated scaffolds for bone tissue engineering. **Materials Letters**. v. 64, n. 9, p. 1059–1062, 2010.

KUMAR, S. S. D.; MAHESH, A.; MAHADEVAN, S.; MANDAL, A. B. Synthesis and characterization of curcumin loaded polymer/lipid based nanoparticles and evaluation of their antitumor effects on MCF-7 cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**. v. 1840, n. 6, p.1913-1922, 2014.

KUMAR, V.; LEWIS, S.A; MUTALIK, S.; SHENOY, D.B; VENKATESH, U. N. Biodegradable microspheres of curcumin for treatment of inflammation. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**. v.46, n.2, p. 209-217, 2002.

LACERDA, L.; PARIZE, A. L.; FÁVERE, V.; LARANJEIRA, M. C. M.; STULZER, H. K. Development and evaluation of pH-sensitive sodium alginate/chitosan microparticles containing the antituberculosis drug rifampicin. **Materials Science and Engineering: C**. v. 39, p. 161–167. 2014.

LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J.P. **Principles of Tissue Engineering**. 2014. Fourth Edition, 2014.

LAO, L. L.; PEPPAS, N. A.; BOEY, F. Y. C.; VENKATRAMAN, S. S. Modeling of drug release from bulk-degrading polymers. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 418, n. 1, p. 28–41, 2011.

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

LAUS, R.; LARANJEIRA, M. C. M.; MARTINS, A. O.; FÁVERE, V. T.; PEDROSA, R. C.; BENASSI, J. C.; GEREMIAS, R. Microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato utilizadas para remoção da acidez, ferro(III) e manganês(II) de águas contaminadas pela mineração de carvão. **Química Nova**, v. 29, n.1, p. 34-39, 2006.

LEMO, E. M. F.; MAGALHÃES, M. M.; OLIVEIRA, J. S. Liofilização de Matrizes 3D Compósita de Quitosana, Vidro Bioativo e PVA: Avaliação da Morfologia e das Propriedades Mecânicas. 2012. **Anais VII Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais – COLAOB**. Natal.

LI, G.; GUO, L.; WEN, Q.; ZHANG, T. Thermo- and pH-sensitive ionic-crosslinked hollow spheres from chitosan-based graft copolymer for 5-fluorouracil release. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 55, p. 69-74, 2013.

LI, G.; ZHANG, L.; CAIPING, W.; ZHAO, X.; ZHU, C.; ZHENG, Y.; WANG, Y.; ZHAO, Y.; YANG, Y. Effect of silanization on chitosan porous scaffolds for peripheral nerve regeneration. **Carbohydrate Polymers**. v.101, p.718–726, 2014a.

LI, L.; LEUNG, P. S. Use of herbal medicines and natural products: An alternative approach to overcoming the apoptotic resistance of pancreatic cancer. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 53, p. 224–236, 2014.

LI, Y.; CHENG, C.; WANG, N.; TAN, H.; TSAI, Y.H.SIAO, C.; MA, D.H.; YEH, L. Characterization of the modified chitosan membrane cross-linked with genipin for the cultured corneal epithelial cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 126, p. 237- 244, 2015.

LI, Y.; ZHANG, T. Targeting cancer stem cells by curcumin and clinical applications. **Cancer Letters**. v.346, n.2, p. 197-205, 2014.

LI, Z.; WANG, X.; LUO, Z.; XUE, Y.; SHI, Z. Hierarchically macro/mesoporous hybrid silica spheres for fast capture of heavy metal ions. **Materials Letters**. v. 128, p.140-143, 2014b.

LIMA, M. do S. P. de. **Preparo e Caracterização de Membranas de Quitosana Modificadas com Poli (ácido acrílico)**. 2006. (Dissertação Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal.

LIU, C.; XIA, Z.; CZERNUSZKA, J. T. Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. **Chemical Engineering Research and Design**. v.85, n. 7, p. 1051–1064. 2007.

LIU, J.; SHEN, M.; YUE, Z.; YANG, Z.; WANG, M.; LI, C. ; XIN, C.; WANG, Y.; MEI, Q.; WANG, Z. Triptolide inhibits colon-rectal cancer cells proliferation by induction of G1 phase arrest through upregulation of p21. **Phytomedicine**. v. 19, n. 8–9, p.756–762, 2012.

LIU, Y.; LIU, D.; ZHU, L.; GAN, Q.; LE, X. Temperature-dependent structure stability and in vitro release of chitosan-coated curcumin liposome. **Food Research International**. v.74, p.97-105, 2015.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 41, n. 2, p.143- 154, 2005.

LOPES, J. R. T. **Novos Sistemas Farmacêuticos para Administração Oral**. 2012. (Dissertação Mestrado) Universidade Fernando Pessoa. Faculdade Ciências da Saúde. Porto.

LOURENÇO, V. A. **Desenvolvimento e avaliação de micropartículas de quitosana para a veiculação de dimetilaminoetanol (DMAE) na pele**. Universidade de São Paulo. 2006. (Dissertação Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Ribeirão Preto.

LYRA, M. A. M.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; BRASILEIRO, M. T.; LA ROCA, M. F. de; BARRAZA, J. A.; VIANA, O. de S.; ROLIM-NETO, P.J. Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**. v.26, n. 5, p.784-93, 2007.

MA, L.; LIU, C. Preparation of chitosan microspheres by ionotropic gelation under a high voltage electrostatic field for protein delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 75, n. 2, p. 448–453, 2010.

MA, X.; ZHOU, J.; ZHANG, C.; LI, X.; LI, N.; JU, R.; SHI, J.; SUN, M. ; ZHAO, W.; MU, L.; YAN, Y.; LU, W. Modulation of drug-resistant membrane and apoptosis proteins of breast cancer stem cells by targeting berberine liposomes. **Biomaterials**. v. 34, n. 18, p. 4452–4465, 2013.

MA, X.; WANG, Z. Anticancer drug discovery in the future: an evolutionary perspective. **Drug Discovery Today**. v. 14, n. 23–24, p. 1136–1142, 2009.

MAHESHWARI, R. K.; SINGH, A.K.; GADDIPATI, J.; SRIMAL, R. C. Multiple biological activities of curcumin: A short review. **Life Sciences**. v. 78, n. 18, p. 2081–2087, 2006.

MAITI, K.; MUKHERJEE, K.; GANTAIT, A.; SAHA, B. P.; MUKHERJEE, P. K. Curcumin–phospholipid complex: Preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. **International Journal of Pharmaceutics**. v.330, n.1–2, p. 155-163, 2007.

MALAFAYA, P. B.; REIS, R. L. Bilayered chitosan-based scaffolds for osteochondral tissue engineering: Influence of hydroxyapatite on in vitro cytotoxicity and dynamic bioactivity studies in a specific double-chamber bioreactor. **Acta Biomaterialia**, v.5, n. 2, p. 644-660, 2009.

MALAFAYA, P. B.; SANTOS, T. C.; VAN GRIENSVEN, M.; REIS, R. L. Morphology, mechanical characterization and in vivo neo-vascularization of chitosan particle aggregated scaffolds architectures. **Biomaterials**. v.29, n. 29, p. 3914-3926, 2008.

MA'MANI, L.; NIKZAD, S.; KHEIRI-MANJILI, H.; AL-MUSAWI, S.; SAEEDI, M.; ASKARLOU, S.; FOROUMADI, A.; SHAFIEE, A. Curcumin-loaded guanidine functionalized PEGylated I3ad mesoporous silica nanoparticles KIT-6: Practical strategy for the breast cancer therapy. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 83, p. 646-654, 2014.

MANJU, S.; SREENIVASAN, K. Hollow microcapsules built by layer by layer assembly for the encapsulation and sustained release of curcumin. **Colloids Surf B Biointerfaces**. v.82, n.2, p.588-93, 2011.

MARTIN, J. R.; GUPTA, M. K; J. M; YU, F.; DAVIDSON, J. M.; GUELCHER, S. A.; DUVALL, C. L. A porous tissue engineering scaffold selectively degraded by cell-generated reactive oxygen species. **Biomaterials**. v.35, n.12, p.3766-3776. 2014.

MARTINS, A.; OLIVEIRA, D.M.; PEREIRA, A.G.B.; RUBIRA, A.K.; MUNIZ, E.C. Chitosan/TPP microparticles obtained by microemulsion method applied in controlled release of heparin. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 51, n.5, p. 1127-1133, 2012.

MARTINS, J. F. N. **Síntese, Caracterização e Estudo de Complexos de Neodímio Utilizando Curcuminóides como Ligantes**. (2012). Universidade Federal de Uberlândia. Instituto de Química. Programa de Pós Graduação em Química. Uberlândia-MG.

MAZZARINO, L. **Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados contendo Curcumina e avaliação *In Vitro* e *In Vivo* em modelo de Melanoma Murino B16-F10**. 2009. (Dissertação Mestrado), Programa de Pós Graduação em Farmácia. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.

MAURO, C. P. **Comprimidos de Liberação Controlada**. Trabalho de Conclusão de Curso do Curso de Farmácia. Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas. São Paulo. 2007.

MELO, D. O. DE; RIBEIRO, E.; STORPIRTIS, S. A importância e a história dos estudos de utilização de medicamentos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, n. 4, p. 475-485, 2006.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C. de; CASTRO, H. F. de; GIORDANO, R. de LC. Aplicação de quitosana como suporte de para uma imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**. v.34, n.5, p. 831-840. 2011.

MENDONÇA, R. H.; COSTA, M. F. D.; THIRÉ, R. M. S. M. Produção de Arcabouços Tridimensionais Bioativos para Bioengenharia Óssea. 2012. **Anais VII Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais - COLAOB**. Natal.

MERCOLA. **Make Mincemeat of Cancer Cells With This Breakthrough Spice**. Disponível em: <http://articles.mercola.com/sites/articles/archive/2012/05/16/antioxidant-resveratrol-on-cancer.aspx>. Acesso em: Abril 2014.

MISHRA, S.; PALANIVELU, K. The effect of curcumina (turmeric) on Alzheimer's disease: Na overview. **Annals of Indian Academy of Neurology**. v.11, n.1, p. 13-19, 2008.

MITRA, A.; DEY, B. Chitosan microspheres in novel drug delivery systems. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 74, n. 4, p. 355-366. 2011.

MITSUISHI, M.; CAO, J.; BÁRTOLO, P.; FRIEDRICH, D.; SHIH, A. J.; RAJURKAR, K.; SUGITA, N; HARADA, K. Biomanufacturing. **CIRP Annals - Manufacturing Technology**. v. 62, n.2, p.585–606. 2013.

MOHAN, P.R. K.; SREELAKSHMI, G.; MURALEEDHARAN, C.V.; JOSEPH R. Water soluble complexes of curcumin with cyclodextrins: Characterization by FT-Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**. v. 62, p.77-84. 2012.

MOHANTY, C.; SAHOO, S. K. The *in vitro* stability and *in vivo* pharmacokinetics of curcumin prepared as an aqueous nanoparticulate formulation. **Biomaterials**. v. 31, n.25, p. 6597–6611, 2010.

MONDAL, G.; BARUI, S.; SAHA, S.; CHAUDHURI, A. Tumor growth inhibition through targeting liposomally bound curcumin to tumor vasculature. **Journal of Controlled Release**, v. 172, n. 3, p. 832-840, 2013.

MOORTHY, C.; KATHIRESAN, K. Curcumin–Piperine/Curcumin–Quercetin/ Curcumin –Silibinin dual drug-loaded nanoparticulate combination therapy: A novel approach to target and treat multidrug-resistant cancers. **Journal of Medical Hypotheses and Ideas**. v. 7, n.1, p.15–20, 2013.

MORAIS, W.A.; ALMEIDA, A.L.P.; PEREIRA, M.R.; FONSECA, J.L.C. Equilibrium and kinetic analysis of methyl orange sorption on chitosan spheres. **Carbohydrate Research**. v. 343, n. 14, p. 2489–2493, 2008.

MOU, H.; ZHENG, Y.; ZHAO, P.; BAO, H.; FANG, W.; XU, N. Celastrol induces apoptosis in non-small-cell lung cancer A549 cells through activation of mitochondria- and Fas/FasL-mediated pathways. **Toxicology in Vitro**. v. 25, n. 5, p. 1027–1032, 2011.

MUKHOPADHYAY, P.; MISHRA, R.; RANA, D.; KUNDU, P. P. Strategies for effective oral insulin delivery with modified chitosan nanoparticles: A review. **Progress in polymer science**. v. 37, n.11, p. 1457 -1475, 2012.

MÜLLER, V.; PIAI, J. F.; FAJARDO, A. R.; FÁVARO, S. L.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. Preparation and Characterization of Zein and Zein-Chitosan Microspheres with Great Prospective of Application in Controlled Drug Release. **Journal of Nanomaterials**. v. 2011, n.10, p. 1-6, 2011.

MURPHY, C. M.; HAUGH, M. G.; O'BRIEN, F. J. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**. v.31, n.3, p. 461-466. 2010.

MURTHY, K. N. C.; JAYAPRAKASHA, G. K.; PATIL, B. S. The natural alkaloid berberine targets multiple pathways to induce cell death in cultured human colon cancer cells. **European Journal of Pharmacology**. v. 688, n. 1–3, p.14–21, 2012.

NAKSURIYA, O.; OKONOGI, S.; SCHIFFELERS, R. M.; HENNINK, W. E. Curcumin nanoformulations: A review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment. **Biomaterials**. v. 35, n. 10, p. 3365–3383, 2014.

NETO, E. M. **Desenvolvimento de Novos Materiais á base de Goma do Cajueiro (*Anacardium Occidentale*): Derivados e Microesferas com Gelatina**. 2008. (Dissertação Mestrado). Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós Graduação em Química Inorgânica. Ceará.

NILKUMHANG, S.; BASIT, A. W. The robustness and flexibility of an emulsion solvent evaporation method to prepare pH-responsive microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 377, n. 1–2, p.135–141, 2009.

NIU, Y.; CHEN, K. C.; HE, T.; YU, W.; HUANG, S.; XU, K. Scaffolds from block polyurethanes based on poly(ϵ -caprolactone) (PCL) and poly(ethylene glycol) (PEG) for peripheral nerve regeneration. **Biomaterials**. v. 35, n.14, p. 4266–4277, 2014.

NGUYEN, A.; WINCKLER, P.; LOISON, P.; WACHE, Y.; CHAMBIN, O. Physico-chemical state influences in vitro release profile of curcumin from pectin beads. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v.121, p.290-298, 2014.

NUNES, A. M. **Validação de Métodos Analíticos**. Laboratório de Metrologia Química Departamento de Química Analítica e Inorgânica – UFPel. Pelotas, 2010. Disponível em: http://www.cpact.embrapa.br/eventos/2010/met/palestras/26/261010_PALESTRA3_ADRIANE_NUNES.pdf. Acesso em: Abril de 2015.

NUNES, A. R. **Liberação Controlada de Curcumina Ancorada em Sílica Hexagonal Mesoporosa**. Universidade de Brasília Instituto de Química. Brasília. 2013.

OCHWANG'I, D.O.; KIMWELE, C. N.; ODUMA, J. A.; GATHUMBI, P.K.; MBARIA, J. M.; KIAMA, S. G. Medicinal plants used in treatment and management of cancer in Kakamega County, Kenya. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 151, n. 3, p. 1040–1055, 2014.

OLAD, A.; AZHAR, F. F. The synergetic effect of bioactive ceramic and nanoclay on the properties of chitosan–gelatin/nanohydroxyapatite–montmorillonite scaffold for bone tissue engineering. v.40, n.7, **Part A**, p.10061-10072, 2014.

OLIVEIRA, A. A. R. DE; OLIVEIRA, J. E. DE; ORÉFICE, R. L.; MANSUR, H. S.; PEREIRA, M. DE M. Avaliação das Propriedades Mecânicas de Espumas Híbridas de Vidro Bioativo/Álcool Polivinílico para Aplicação em Engenharia de Tecidos. **Revista Matéria**. v. 12, n. 1, p. 140 – 149, 2007.

OLIVEIRA, R. A. **Síntese e caracterização de compósito quitosana com carbonato de cálcio extraído de casca de ovo para possíveis aplicações como curativo**. 2011. Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba,

OSHIRO ML, BERGMANN A, SILVA RG, COSTA KC, TRAVAIM IEB, SILVA GB, THULER LCS. Câncer de Mama Avançado como Evento Sentinela para Avaliação do Programa de Detecção Precoce do Câncer de Mama no Centro-Oeste do Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v.60, n.1, p.15-23, 2014.

OUYANG, D.; ZENG, L.; PAN, H.; XU, L.; WANG, Y.; LIU, K.; HE, X. Piperine inhibits the proliferation of human prostate cancer cells via induction of cell cycle arrest and autophagy. **Food and Chemical Toxicology**. v. 60, p. 424–430, 2013.

PARAMERA, E. I.; KONTELES, S. J.; KARATHANOS, V. T. Stability and release properties of curcumin encapsulated in *Saccharomyces cerevisiae*, β -cyclodextrin and modified starch. **Food Chemistry**. v. 125, n.3, p. 913–922, 2011.

PARIZE. A. L. **Desenvolvimento de sistemas microparticulados e de filmes a base de quitosana e corante natural cúrcuma**. 2009. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina.

PARIZE. A. L.; STULZER, H. K.; LARANJEIRA, M. C. M.; BRIGHENTE, I. M. DA C.; SOUZA, T. C. R. de. Evaluation of chitosan microparticles containing curcumin and crosslinked with sodium tripolyphosphate produced by spray drying. **Química Nova**, v.35, n. 6, p.1127-1132, 2012.

PARK, H.; CHOI, B.; HU, J.; MIN, L. Injectable chitosan hyaluronic acid hydrogels for cartilage tissue engineering. **Acta Biomaterialia**. v.9, n.1, p.4779–4786, 2013.

PASPARAKIS, G.; BOUROPOULOS, N. Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate–chitosan beads. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 323, n.1–2, p. 34 - 42, 2006.

PAWELEC, K.M; HUSMANN, A.; BEST, S.M; CAMERON, R.E. Understanding anisotropy and architecture in ice-templated biopolymer scaffolds. **Materials Science and Engineering: C**. v. 37, p.141-147, 2014.

PENG, P.; HSIEH, Y.; WANG, C.; HSU, J.; CHOU, F. Inhibitory effect of berberine on the invasion of human lung cancer cells via decreased productions of urokinase-plasminogen activator and matrix metalloproteinase-2. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 214, n. 1, p. 8–15, 2006.

PEPPAS, N. A.; SAHLIN, J. J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 57, n. 2, p. 169–172, 1989.

PEREIRA, A. G.B.; FAJARDO, A. R.; NOCCHI, S.; NAKAMURA, C. V.; RUBIRA, A.F.; MUNIZ, E. C. Starch-based microspheres for sustained-release of curcumin: Preparation and cytotoxic effect on tumor cells. **Carbohydrate Polymers**. v. 98, n. 1, p. 711-720, 2013.

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

PIAI, J. F. **Preparação e caracterização de complexos Polieletrólitos de Quitosana/Sulfato de condroitina e estudos de liberação controlada**. 2006. (Dissertação Mestrado). Universidade Estadual de Maringá. Maringá.

POON, L.; WILSON, L. D.; HEADLEY, J. V. Chitosan-glutaraldehyde copolymers and their sorption properties. **Carbohydrate Polymers**. v.109, p.92-101, 2014.

POPAT, A.; KARMAKAR, S.; JAMBHRUNKAR, S.; XU, C.; YU, C. Curcumin-cyclodextrin encapsulated chitosan nanoconjugates with enhanced solubility and cell cytotoxicity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 117, p. 520-527, 2014.

PRASAD, S.; GUPTA, S. C.; TYAGI, A. K.; AGGARWAL, B. B. Curcumin, a component of golden spice: From bedside to bench and back. **Biotechnology Advances**. v. 32, n. 6, p. 1053–1064, 2014.

QIAN, J.; XU, W.; YONG, X.; JIN, X.; ZHANG, W. Fabrication and in vitro biocompatibility of biomorphic PLGA/Nha composite scaffolds for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**. v. 36, p. 95–101, 2014.

RAMIÃO, N.; MARTINS, P.; FERNANDES, A. A State of the art Review on the Mechanical Properties of Breast Tissue. **Journal of Biomechanics**. Congress of the European Society of Biomechanics. v.45, p.574, 2012.

RAO,W.; ZHANG, W.; POVENTUD-FUENTES, I.; WANG, Y.; LEUS, Y.; AGARWAL, P. ; WEEKES, B.; LI, C. ; LU, X.; YU, J. ; HE, X. Thermally responsive nanoparticle-encapsulated curcumin and its combination with mild hyperthermia for enhanced cancer cell destruction. **Acta Biomaterialia**. v.10, n. 2, p. 831-842, 2014.

RIBEIRO, O. M. F. B. **O Uso de Nanopartículas de Quitosano, Revestidas com Alginato como Adjuvante do Antígeno da Hepatite B na Vacinação através das Mucosas Oral e Nasal**. 2007. (Dissertação Mestrado). Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

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

RODRIGUES, P. O.; STULZER, H. K.; CRUZ, A. P.; FOPPA, T.; CARDOSO, T. M.; SILVA, M. A. S. Equivalência Farmacêutica entre Comprimidos de Propranolol Comercializados no Mercado Nacional. **Infarma**, v.18, n. 5/6, p. 3-7, 2006.

RODRÍGUEZ-PÁEZA, J. E.; VILLAQUIRÁNA, C.; COBOB, J. Estudio de la Formacion de los Complejos Intermedios Durante la Sintesis de Alumina. **Materials Research**. v.4 n.4, p. 255-264, 2001.

ROLANDI, M.; ROLANDI, R. Self-assembled chitin nanofibers and applications. **Advances in Colloid and Interface Science**. v. 207, p. 216–222, 2014.

ROTTA, J. **Propriedades Físico-Químicas de Soluções Formadoras e de Filmes de Quitosana e Hidroxipropilmetilcelulose**. 2008. (Dissertação Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Florianópolis.

RUSSO, A.; CARDILE, V.; DE IOANNES, A.; GARBARINO, J. Effect of litreol on the viability of human cancer cells. **Chemico-Biological Interactions**. v. 179, n. 2–3, p. 178–184, 2009.

SAKURAI, K.; MAEGAWA, T.; TAKAHASHI, T. Glass transition temperature of chitosan and miscibility of chitosan/poly (N-vinyl pyrrolide) blends. **Polymer**. v. 41, n.19, p.7051. 2000.

SALES, C. R. G. **Qualidade de Vida dos Pacientes Oncológicos sob Cuidados Paliativos de um Centro Ambulatorial de Tratamento de Câncer no Município de Dourados/MS**. 2012. (Dissertação Mestrado) em Psicologia. Universidade Católica Dom Bosco (UCDB). Campo Grande-MS.

SAMANI, A.; ZUBOVITS, J.; PLEWES, D. Elastic moduli of normal and pathological breast tissues: an inversion technique based investigation of 169 samples. v. 52, n.6, p.1565–1576, 2007.

SAMPAIO, G. Y. H. **Desenvolvimento de Esferas Biodegradáveis para Regeneração de Tecidos Cartilagosos**. 2012. (Dissertação Mestrado). Universidade Federal de Campina Grande. Ciências e Engenharia de Materiais. Campina Grande.

SAMPATH, M.; LAKRA, R.; KORRAPATI, P.; SENGOTTUVELAN, B. Curcumin loaded poly (lactic-co-glycolic) acid nanofiber for the treatment of carcinoma. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 117, p.128–134, 2014.

SANTIS, A. K. de. **Formas Farmacêuticas Semi-Sólidas de uso Tópico Contendo Nifedipina: Desenvolvimento Galênico e Avaliação Biofarmacotécnica**. 2008. (Dissertação Mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Faculdade de Farmácia. Rio de Janeiro.

SANTOS, J. V.; MOURA, T. F. A.; RAFFIN, F. N. Otimização dos Parâmetros de Secagem por Aspersão de Micropartículas de Quitosana como Carreadores de Insulina. **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 22, n.4, p. 327-33, 2003.

SELVENDIRAN, K.; SINGH, J.P. V.; KRISHNAN, K.B.; SAKTHISEKARAN, D. Cytoprotective effect of piperine against benzo[a]pyrene induced lung cancer with reference to lipid peroxidation and antioxidant system in Swiss albino mice. **Fitoterapia**. v. 74, n.1–2, p. 109–115, 2003.

SERRA, T.; PLANELL, J.A.; NAVARRO, M. High-resolution PLA-based composite scaffolds via 3-D printing technology. **Acta Biomaterialia**. v. 9, n. 3, p.5521–5530. 2013.

SETTHACHEEWAKUL, S.; MAHATTANADUL, S.;PHADOONGSOMBUT, N.; PICHAYAKORN, W.; WIWATTANAPATAPEE, R. Development and evaluation of self-microemulsifying liquid and pellet formulations of curcumin, and absorption studies in rats. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 76, n. 3, p. 475–485, 2010.

SHANMUGANATHAN, S.; SHANUMUGASUNDARAM, N.; ADHIRAJAN, N.; RAMYAA LAKSHMI, T.S.; BABU, M. Preparation and characterization of chitosan microspheres for doxycycline delivery. **Carbohydrate Polymers**. v. 73, n. 2, p. 201–211, 2008.

SHIMADZU APPLICATION NEWS. **Liquid Chromatography Mass Spectrometry. Ultra Fast Analysis (Part 2) Analysis of Impurities in Curcumin**. No. C59. Disponível em: <http://www2.shimadzu.com/applications/lcms/c059.pdf>. Acesso em: 22 de Abril de 2015.

SHIMOJO, A. A. M.; PEREZ, A. G. M.; RODRIGUES, A. A.; LANA, J. F. S. D. LUZO, Â. C. M.; BELANGERO, W.D.; SANTANA, M. H. A. Preparação e Caracterização de Complexos Polieletrólitos de Ácido Hialurônico-Quitossana para Aplicação como Scaffolds do Plasma Rico em Plaquetas. 2012. **Anais VII Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais - COLAOB**. Natal.

SHOBA, G.; JOY, D.; JOSEPH, T.; MAJEED, M.; RAJENDRAN, R.; SRINIVAS, P. S. Influence of Piperine on the Pharmacokinetics of Curcumin in Animals and Human Volunteers. **Planta Med**. v. 64, n. 4, p. 353-356. 1998.

SHUKLA, S. K.; MISHRA, A. K.; AROTIBA, O. A.; MAMBA, B. B. Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 59, p. 46–58, 2013.

SIEPMANN, J. P; PEPAS. N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery**. v. 64, p. 163–174, 2012.

SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. Modeling of diffusion controlled drug delivery. **Journal of Controlled Release**. v. 161, n. 2, p. 351–362. 2012.

SIIMON, K.; REEMANN, P.; PÖDER, A.; POOK, M.; KANGUR, T.; KINGO, K.; JAKS, V.; MÄEORG, U. JÄRVEKÜLG, M. Effect of glucose content on thermally cross-linked fibrous gelatin scaffolds for tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**. v.42, n.1, p. 538–545, 2014.

SIMBARA, M. M. O.; LINS, E. C. E MALMONGE, S. M. **Porosidade de Scaffolds: Picnometria X Processamento de Imagens Centro de Engenharia, Modelagem e Ciências Sociais Aplicadas**. XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica – CBEB. p. 1538-1541, 2014.

SIN, D.; MIAO, X.; LIU, G.; WEI, F.; CHADWICK, G.; YAN, C.; FRIIS, T. Polyurethane (PU) scaffolds prepared by solvent casting/particulate leaching (SCPL) combined with centrifugation. **Materials Science and Engineering: C**. v. 30, n.1, p.78–85. 2010.

SINHA, V.R.; SINGLA, A.K.; WADHAWAN, S.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; BANSAL, K.; DHAWAN, S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. Review. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 274, n. 1-2, p.1–33, 2004.

SINHA, V.R.; TREHAN, A. Biodegradable microspheres for protein delivery. **Journal of Controlled Release**. v.90, n.3, p. 261–280, 2003.

SINKUS, R.; LORENZEN, J.; SCHRADER, D.; LORENZEN, M.; DARGATZ, M.; HOLZI, D. In vivo tensor MR-elastography - anisotropy of mamma-carcinoma. **Proceedings of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine**. Denver, Colorado. v.8, p. 493, 2000.

SKOP, N. B.; CALDERON, F.; LEVISON, S. W.; GANDHI, C. D.; CHO, C. H. Heparin crosslinked chitosan microspheres for the delivery of neural stem cells and growth factors for central nervous system repair. **Acta Biomaterialia**. v. 9, n. 6, p. 6834-6843. 2013.

SONG, L.; SHEN, Y.; HOU, J.; LEI, L.; GUO, S.; QIAN, C. Polymeric micelles for parenteral delivery of curcumin: Preparation, characterization and in vitro evaluation. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects** v. 390, n.1-3, p. 25– 32, 2011.

SONG, Z.; ZHU, W. LIU,N. YANG, F.; FENG, R. Linolenic acid-modified PEG-PCL micelles for curcumin delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 471, n.1-2, p. 312–321. 2014.

SOUSA, I.; MENDES, A.; BÁRTOLO, P. J. PCL scaffolds with collagen bioactivator for applications in Tissue Engineering. **Procedia Engineering**. v. 59. p. 279 – 284, 2013.

SOUZA, K. V. DE; ZAMORA,P. G. P.; ZAWADZKI, S. F. Esferas de Quitosana/Fe na Degradação do Corante Azul QR-19 por Processos Foto-Fenton Utilizando Luz Artificial ou Solar. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v. 20, n. 3, p. 210-214, 2010.

SRIVASTAVA, R. M.; SINGH, S.; DUBEY, S. K.; MISRA, K.;KHAR, A. Immunomodulatory and therapeutic activity of curcumin. **International Immunopharmacology**. v. 11, n. 3, p.331–341, 2011.

SUTARIA, D.; GRANDHI, B. K.; THAKKAR, A. ; WANG, J.; PRABHU, S. Chemoprevention of pancreatic cancer using solid-lipid nanoparticulate delivery of a novel aspirin, curcumin and sulforaphane drug combination regimen. **International Journal Of Oncology**. v.41, n.6, p. 2260-2268, 2012.

TAGHIZADEH, S.M.; DAVARI, G. Preparation, characterization, and swelling behavior of N-acetylated and deacetylated chitosans. **Carbohydrate Polymers**. v.64, n.1, p. 9-15, 2006.

TANNER, C.; SCHNABEL, J.A.; HILL, D.L.; HAWKES, D.J.; LEACH, M.O.; HOSE, D.R. Factors influencing the accuracy of biomechanical breast models. **Medical Physics**. v. 33, n. 6, p.1758-69, 2006.

TAVARES, I. S. **Obtenção e Caracterização de Nanopartículas de Quitosana**. Dissertação (Mestrado). 2009. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Programa de Pós-graduação em Química. Natal-RN.

THAKUR, R. R. S.; MCMILLAN, H. L.; JONES, D. S. Solvent induced phase inversion-based *in situ* forming controlled release drug delivery implants. **Journal of Controlled Release**. v. 176, p. 8–23, 2014.

THEIN-HAN, W. W; MISRA, R. D. K. Biomiméticos scaffolds compósitos de quitosana-nanohydroxyapatite para engenharia de tecido ósseo. **Acta Biomaterialia**. v. 5, n. 4 , p. 1182-1197, 2009.

TORRES, M. A.; VIEIRA, R. S.; BEPPU, M. M.; SANTANA, C. C. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. **Polímeros**, v.15, n.4, p.306-312, 2005.

TORRES, M.C. **Produção e caracterização de microesferas de quitosana natural e modificada quimicamente e o seu uso na adsorção das proteínas BSA e lisozima**. 2006. (Tese Doutorado). Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. Campinas –SP.

UPADHYAY, L.; SINGH, J.; AGARWAL, V.; TEWARI, R. P. The implications of recent advances in carboxymethyl chitosan based targeted drug delivery and tissue engineering applications. Review. **Journal of Controlled Release**, v. 186, p. 54-87, 2014.

VASCONCELLOS, F. C.; GOULART, G. A. S.; BEPPU, M. M. Production and characterization of chitosan microparticles containing papain for controlled release applications. **Powder Technology**. v. 205, n. 1–3, p. 65–70, 2011.

VEIGA, I. G. **Produção e Caracterização de Membranas de Quitosana Associada com outros Biopolímeros para Liberação Controlada de Anti-Inflamatórios**. 2012. (Tese de Doutorado). Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. Campinas.

VIEIRA, E. F. S.; CESTARIA, A. R.; CHAGAS, R. A.; CORTES, G. K. DA R. Obtenção e caracterização de matriz apropriada para sistemas de liberação prolongada – estudos de liberação dos herbicidas atrazina e diuron. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 398-403, 2014.

VILAR, G.; TULLA-PUCHE, J.; ALBERICIO, F. Polymers and Drug Delivery Systems. **Current Drug Delivery**, v. 9, n. 4, p. 1-28, 2012.

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

VIMAL, S.; MAJEED, A. S.; TAJU, G.; NAMBI, K.S.N.; RAJ, S. N.; MADAN, N.; FAROOK, M.A.; GOPINATH, D.; HAMEED, S. A.S. Chitosan tripolyphosphate (CS/TPP) nanoparticles: Preparation, characterization and application for gene delivery in shrimp. **Acta Tropica**. v. 128, n. 3, p. 486 - 493, 2013.

VIMALA, K.; MOHAN, Y. M. ; VARAPRASAD, K.; REDD, N. N.; RAVINDRA, S.; NAIDU, N. S. ; RAJU, K. M. Fabrication of Curcumin Encapsulated Chitosan-PVA Silver Nanocomposite Films for Improved Antimicrobial Activity. **Journal of Biomaterials e Nanobiotecnologia**. v.2, n.1, p.55-64, 2011.

WALTERS, B.D.; STEGEMANN, J.P. Strategies for directing the structure and function of three-dimensional collagen biomaterials across length scales. **Acta Biomaterialia**. v.10, n.4, p.1488-1501. 2014.

WANG, H.; ZHI , W.; LU , X.; LI, X.; DUAN, K.; DUAN, R.; MU, Y.; WENG, J. Estudos comparativos sobre a formação óssea ectópica em andaimes de hidroxiapatita porosa com estruturas de poros complementares. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n.9 , p. 8413-8421. 2013.

WELLMAN, P. P.; HOWE, D. R.; DALTON, E.; KERN,K.A. Breast tissue stiffness in compression is correlated to histological diagnosis. **Harvard BioRobotics**, p.1–15, 1999.

XIAO, J.; NIAN, S.; HUANG, Q. Assembly of kafirin/carboxymethyl chitosan nanoparticles to enhance the cellular uptake of curcumin. **Food Hydrocolloids**. v.51, p.166-175, 2015.

XU, X.; QIN, J.; LIU, W. Curcumin inhibits the invasion of thyroid cancer cells via down-regulation of PI3K/Akt signaling pathway. **Gene**. v.546, n.2, p. 226-232, 2014.

YADAV, A.; LOMASH, V.; SAMIM, M.; FLORA, S. JS. Curcumin encapsulated in chitosan nanoparticles: A novel strategy for the treatment of arsenic toxicity. **Chemico-Biological Interactions**. v. 199, n.1, p. 49–61, 2012.

YAFFEA, P. B.; DOUCETTEB, C. D.; WALSHA, M.; HOSKINA, D. W. Piperine impairs cell cycle progression and causes reactive oxygen species-dependent apoptosis in rectal cancer cells. **Experimental and Molecular Pathology**. v. 94, n.1, p.109–114, 2013.

YALLAPU, M. M.; JAGGI, M.; CHAUHAN, S. C. β -Cyclodextrin-curcumin self-assembly enhances curcumin delivery in prostate cancer cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 79, n.1, p. 113–125, 2010a.

YALLAPU, M. M.; GUPTA, B. K.; JAGGI, M.; CHAUHAN, S. C. Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells. **Journal of Colloid and Interface Science**. v.351, n.1, p. 19-29, 2010b.

YAN, K.; ZHANG, C.; FENG, J.; HOU, L. ; YAN, L.; ZHOU, Z.; LIU, Z.; LIU, C.; FAN, Y.; ZHENG, B.; XU, Z. Induction of G1 cell cycle arrest and apoptosis by berberine in

bladder cancer cells. **European Journal of Pharmacology**. v.661, n.1–3, p.1–71, 2011.

YAN, S.; RAO, S.; ZHU, J.; WANG, Z.; ZHANG, Y.; DUAN, Y.; CHEN, X.; YIN, J. Nanoporous multilayer poly(L-glutamic acid)/chitosan microcapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. v.427, n.2, p. 443–451, 2012.

YANG, H.; KIM, J.; LEE, J.; LEE, B.; PARK, K.; SHIM, K.; LEE, M.; SEO, K. Celastrol isolated from *Tripterygium regelii* induces apoptosis through both caspase-dependent and -independent pathways in human breast cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**. v. 49, n. 2, p. 527–532, 2011.

YANG, S; LEONG, K.; DU, Z.; CHUA, C. The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors. **Tissue Engineering**. v.7, n. 6, p.679-689, 2001.

YANNAS, I.V., LEE, E., ORGILL, D.P., SKRABUT, E.M., MURPHY, G.F. Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.86, n.3. p. 933-937, 1989.

YIN, X.; ZHANG, X.; LIN, Q.; FENG, Y.; YU, W.; ZHANG, Q. Metal-coordinating controlled oxidative degradation of chitosan and antioxidant activity of chitosan-metal complex. **ARKIVOC**. v. 9, p. 66-78, 2004.

YUE, W. Prevention of browning of depolymerized chitosan obtained by gamma irradiation. **Carbohydrate Polymers**. v. 101. p. 857–863, 2014.

ZAEIMDAR, S. Mechanical Characterization of Breast Tissue Constituents for Cancer Assessment. 2014. **Universidad de Birmingham**. Canada.

ZHANG, J.; TANG, Q.; XU, X.; LI, N. Development and evaluation of a novel phytosome-loaded chitosan microsphere system for curcumin delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 448, n. 1, p.168–174, 2013.

ZHAO, C.; TAN, A.; PASTORIN, G.; HO, H. K. Nanomaterial scaffolds for stem cell proliferation and differentiation in tissue engineering. **Biotechnology Advances**. v.31, n. 5, p.654–668. 2013.

ZHONG, L. L.D.; CHEN, H.; CHO, W. C.S.; MENG, X.; TONG, Y. The efficacy of Chinese herbal medicine as an adjunctive therapy for colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. **Complementary Therapies in Medicine**. v.20, n.4, p.240–252, 2012.

ZHOU, G.Z; ZHANG, L.; SUN, G.C; CHEN, X.B. The synthetic curcumin derivative hydrazinobenzoylcurcumin induces autophagy in A549 lung cancer cells. **Pharmaceutical Biology**, v. 52, n.1, p. 111-116. 2014.

ZOHURIAAN, M.J; SHOKROLAHI, F. Thermal studies on natural and modified gums. **Polymer Testing**. v. 23, n. 5, p. 575–579, 2004.

APÊNDICE A

Cálculo da quantidade de curcumina presente na solução de Quitosana/Curcumina obtida pelo método de reação de soluções.

Para obtenção da solução de 2% de quitosana

2% (m/v) Quitosana-----→ 1g Quitosana/50mL

Para obtenção da solução de Curcumina (10mg/mL)

0,1g de Curcumina -----→ 1mL de Metanol

Para obtenção da solução de quitosana/curcumina (50mL/10mL(Metanol))

50mL Solução de Quitosana-----→ 1g Quitosana

10mL Solução de Curcumina -----→ 0,1g de Curcumina

∴

60mL de Solução (Quitosana+Curcumina) = 1,1g (1g Quitosana+0,1g Curcumina)

$$\frac{(0,1g \text{ Curcumina})}{(1,0g \text{ Quitosana} + 0,1g \text{ Curcumina})} \times 100 = 9,09\% \text{ de Curcumina}$$

Logo, em 60mL de Solução Quitosana/curcumina tem-se 9,09% de curcumina.

APÊNDICE B

Cálculo da quantidade de curcumina em cada esfera de quitosana, obtida pelo método de reação de soluções.

6,6mL de Solução Quitosana/Curcumina----- 533 esferas

6,6mL de Solução Quitosana/Curcumina	→ 5,0 mL Quitosana
	→ 1,6 mL Solução Curcumina

Se,

10mL de Solução de Curcumina----- 0,10g de Curcumina

1,6mL de Solução de Curcumina-----0,016g de Curcumina

∴

$$\frac{0.016g \text{ de curcumina}}{533 \text{ esferas}}$$

= 0.0000300188g ou 0.0300188 mg ou 30.0188 µg, de curcumina em cada esferas

APÊNDICE C

Cálculo da quantidade de curcumina presente na solução de Quitosana/Curcumina obtida pelo método de adsorção.

Para estimar a quantidade de solução de curcumina adsorvida na esfera pré formada de quitosana, utilizou-se 5mL da solução de curcumina (1mg/mL), e adicionou uma esfera de quitosana na solução em agitação por 24 horas. (O experimento foi realizado em triplicata).

Após este período verificou-se que a quantidade de 0,053mL (n=3) de solução de curcumina, foi adsorvida pela esfera de quitosana.

Portanto tem-se que em;

0,053mL de Solução de Curcumina -----0,053mg de curcumina

0,053mL de Solução de Curcumina -----0,000053g de curcumina

Logo,

Esfera de Quitosana/Curcumina(Adsorção)-----0,000053g de curcumina

APÊNDICE D

Massa das Esferas Obtidas

Massa da Esfera de Quitosana/Curcumina-----0,000329g

Massa da Esfera de Quitosana/Curcumina (Adsorção)-----0,000571g

Amostras utilizada na liberação

- Arcabouços de Quitosana/curcumina

0,35g-----1063,83 esferas

1 esfera ----- 0,0000300188g curcumina

∴ Tem-se 0,0319349g de curcumina no arcabouço.

- Arcabouços de Quitosana/curcumina- Reticulada

0,35g-----1063,83 esferas

1 esfera ----- 0,0000300188g curcumina

∴ Tem-se 0,0319349g de curcumina no arcabouço.

- Arcabouços de Quitosana/curcumina (adsorção)

0,35g----- 612,96 esferas

1 esfera ----- 0,000053g curcumina

∴ Tem-se 0,03248688g de curcumina no arcabouço.

- Arcabouços de Quitosana/curcumina (adsorção)

0,35g----- 612,96 esferas

1 esfera ----- 0,000053g curcumina

∴ Tem-se 0,03248688g de curcumina no arcabouço.

APÊNDICE E

Porcentagem do fármaco curcumina liberado em porcentagem a partir da quantidade total de fármaco adicionado ao sistema.

Conforme apresentado no APENDICE D, cada amostra dos arcabouços utilizados para o ensaio de liberação, apresentam aproximadamente 0,032g de curcumina.

Logo tem-se;

- Arcabouços de Quitosana/curcumina

$$\% \text{ de liberação}_{(\text{máxima})} = \frac{8 \mu\text{g}}{32 \mu\text{g}} = 0,025\%$$

- Arcabouços de Quitosana/curcumina- Reticulada

$$\% \text{ de liberação}_{(\text{máxima})} = \frac{5,5 \mu\text{g}}{32 \mu\text{g}} = 0,0017\%$$

- Arcabouços de Quitosana/curcumina (adsorção)

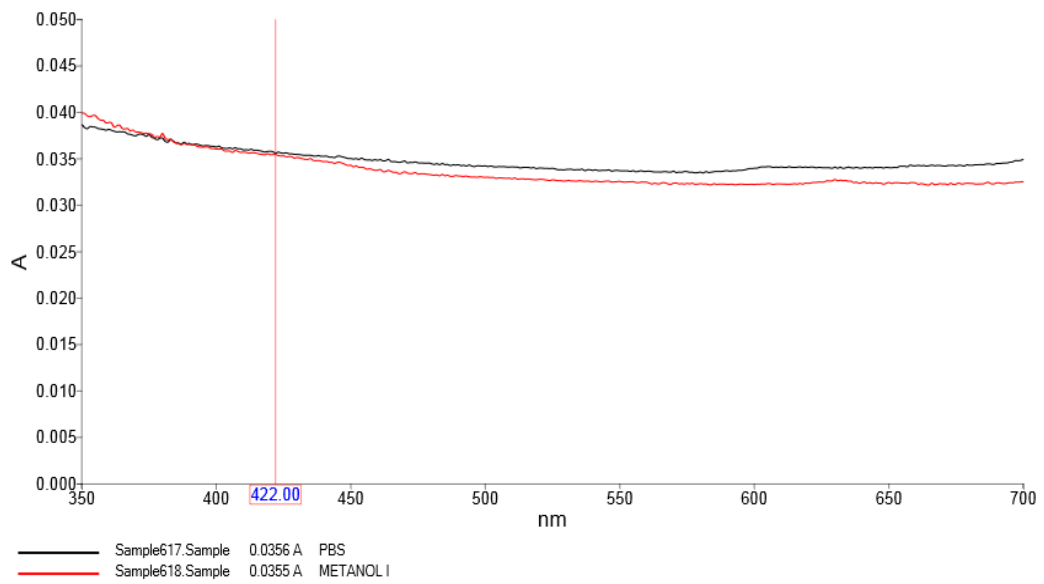
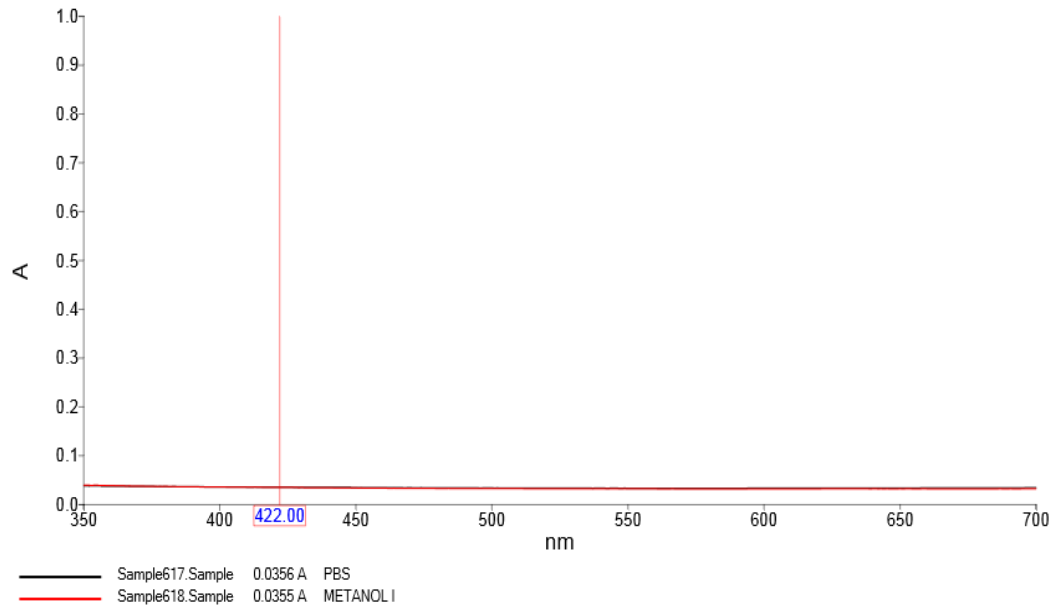
$$\% \text{ de liberação}_{(\text{máxima})} = \frac{4,7 \mu\text{g}}{32 \mu\text{g}} = 0,015\%$$

- Arcabouços de Quitosana/curcumina (adsorção)- Reticulada

$$\% \text{ de liberação}_{(\text{máxima})} = \frac{2,6 \mu\text{g}}{32 \mu\text{g}} = 0,008\%$$

APÊNDICE F

Gráfico U.V. (Absorbância x Comprimento de onda) do Metanol e do PBS

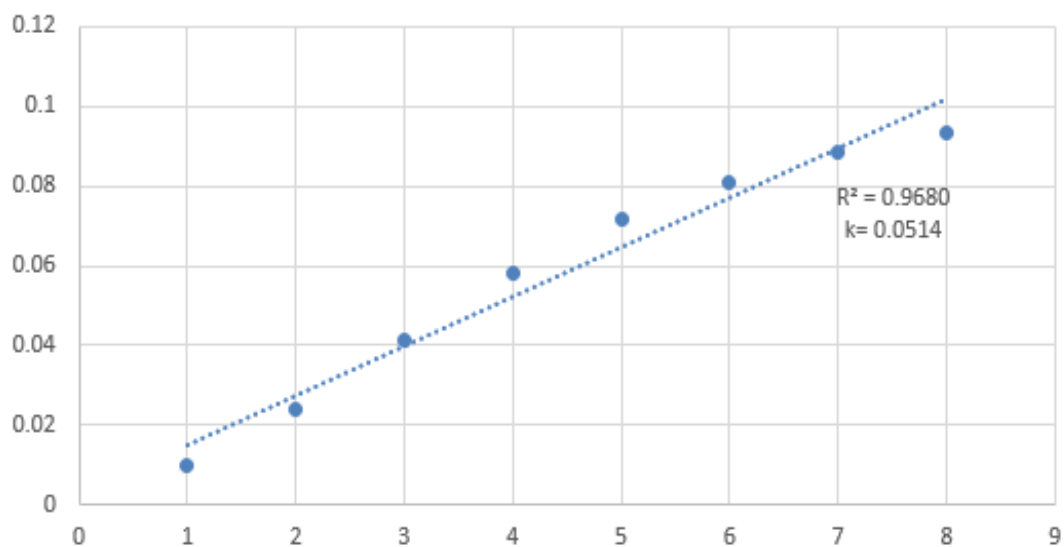


APÊNDICE G

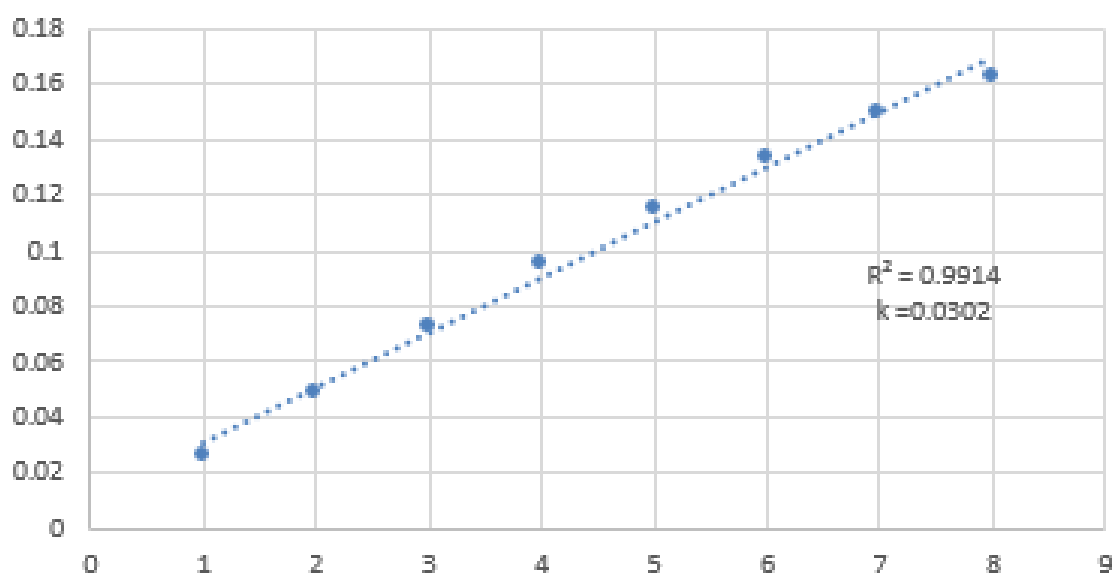
Gráficos dos modelos matemáticos

Higuchi

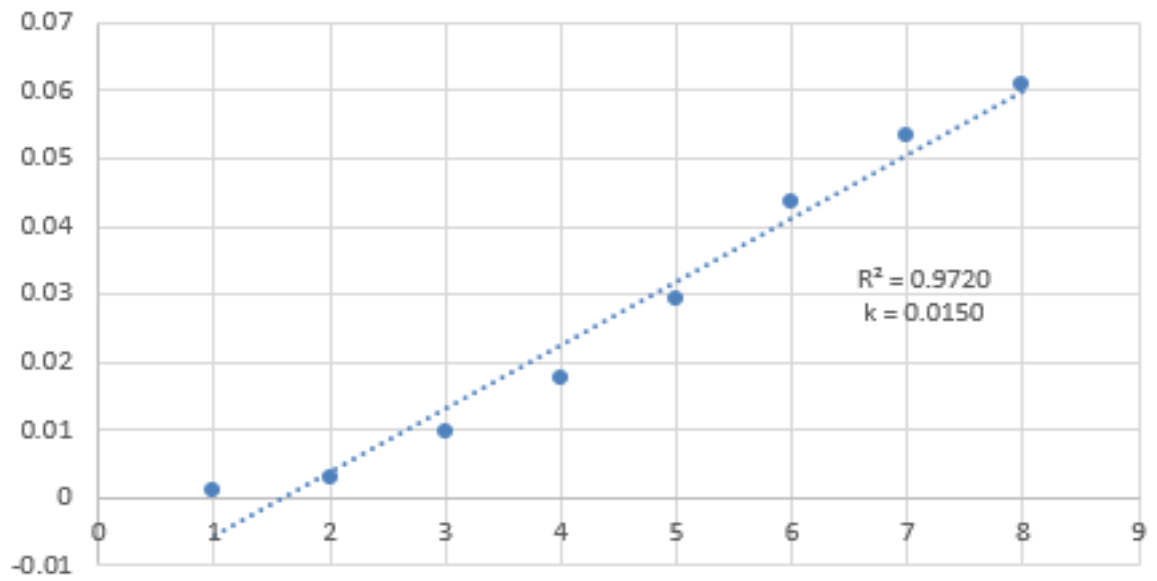
Quitosana/Curcumina



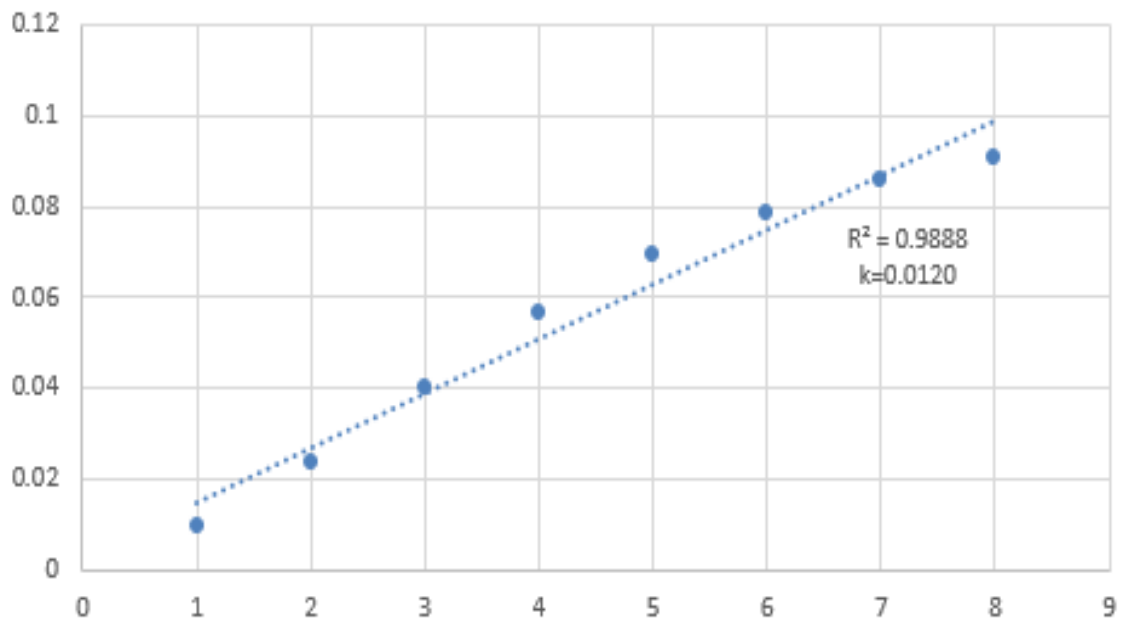
Quitosana/curcumina- reticulada

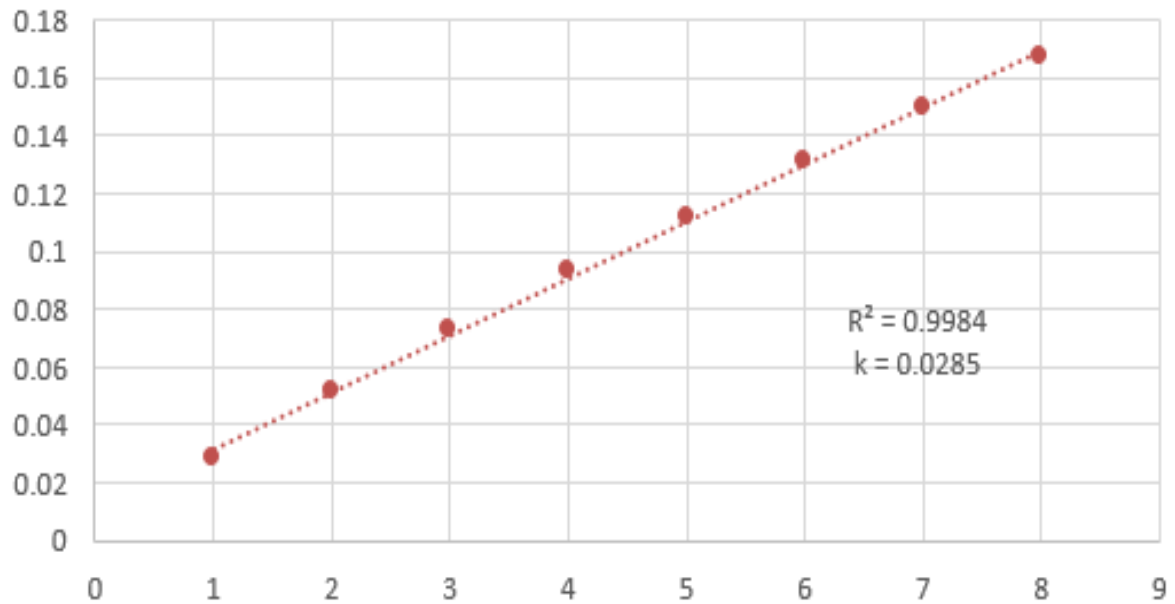
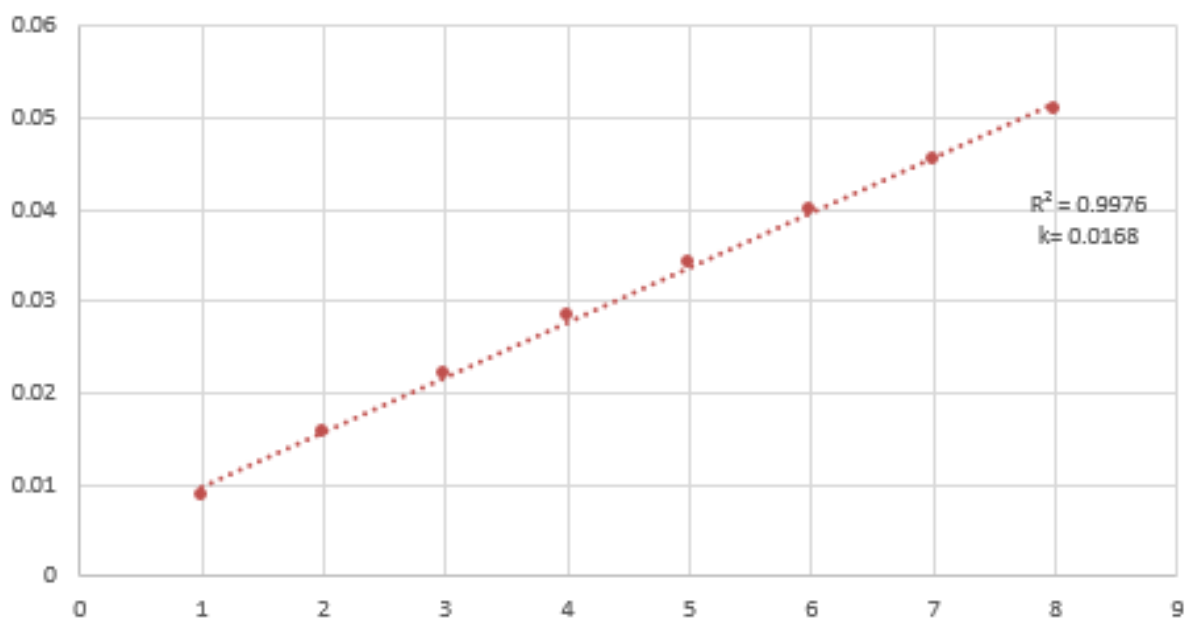


Quitosana/curcumina (adsorção)

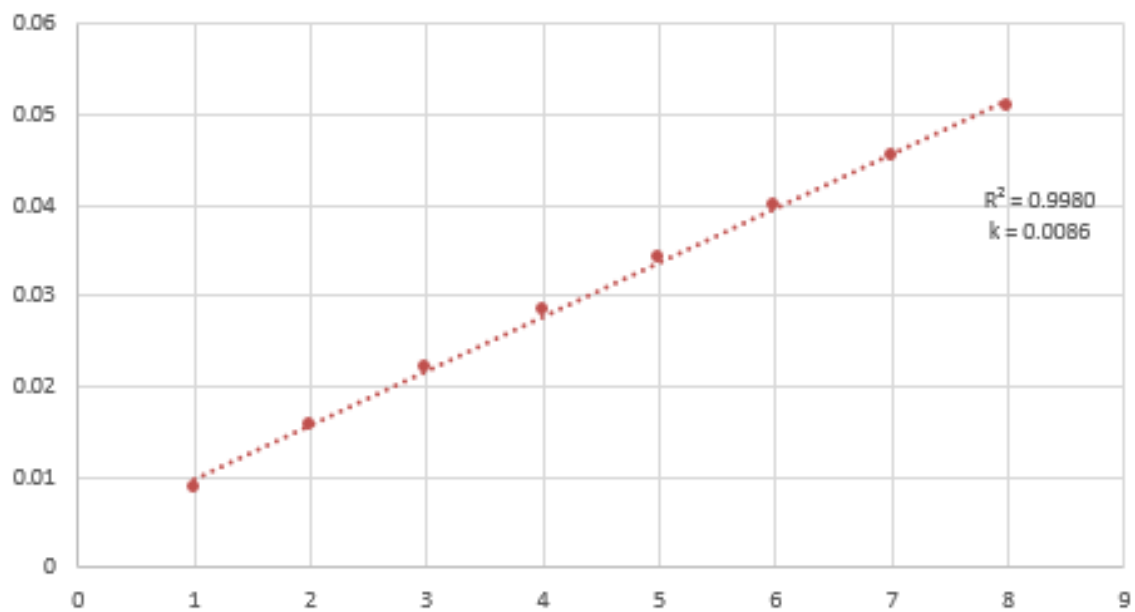


Quitosana/Curcumina (adsorção)-reticulada

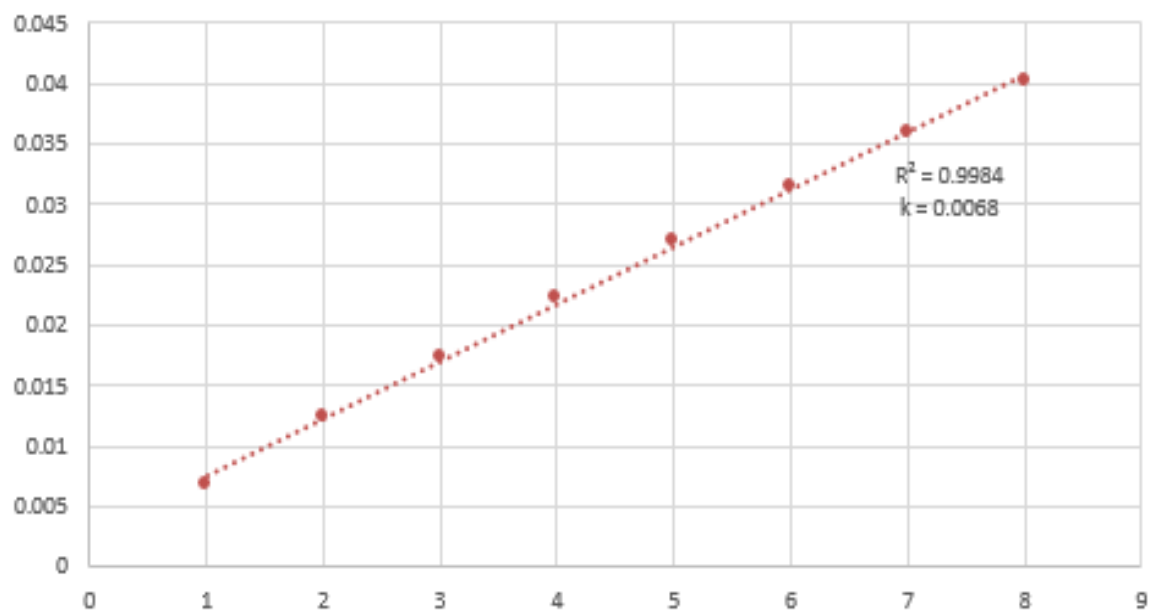


Korsmeyer-Peppas - (Lei as Potências)**Quitosana/Curcumina****Quitosana/curcumina - reticulada**

Quitosana/curcumina (adsorção)

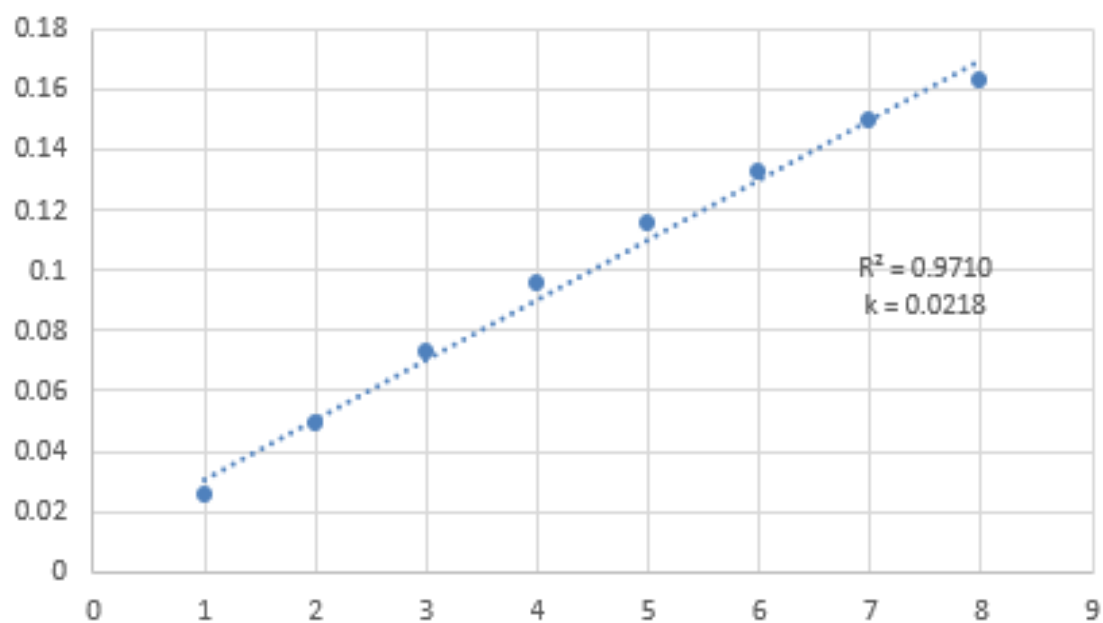


Quitosana/curcumina (adsorção)-reticulada

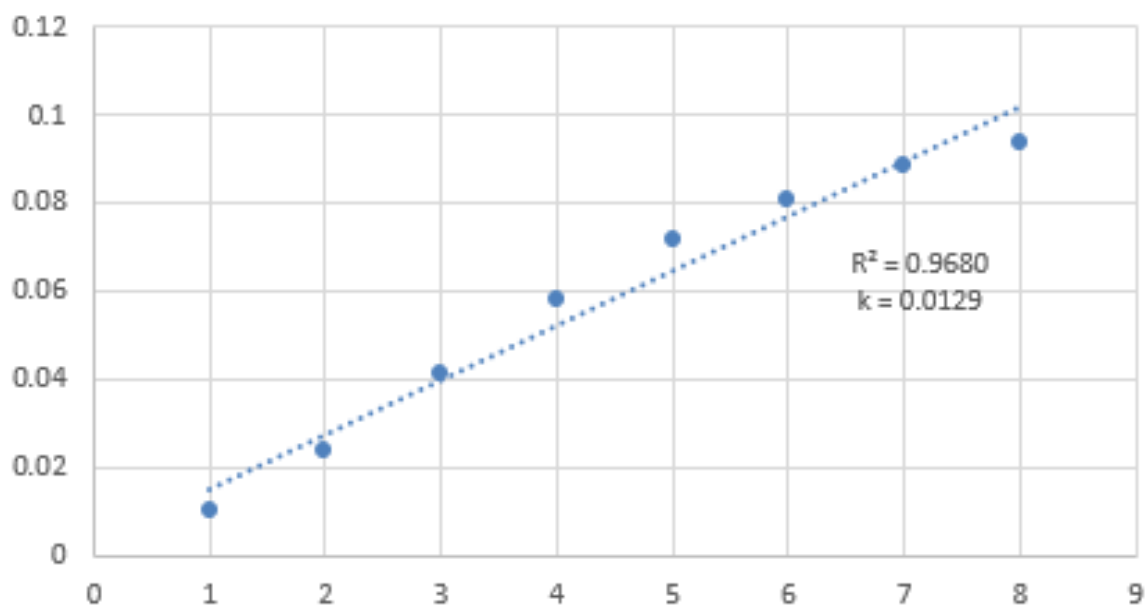


Ordem Zero

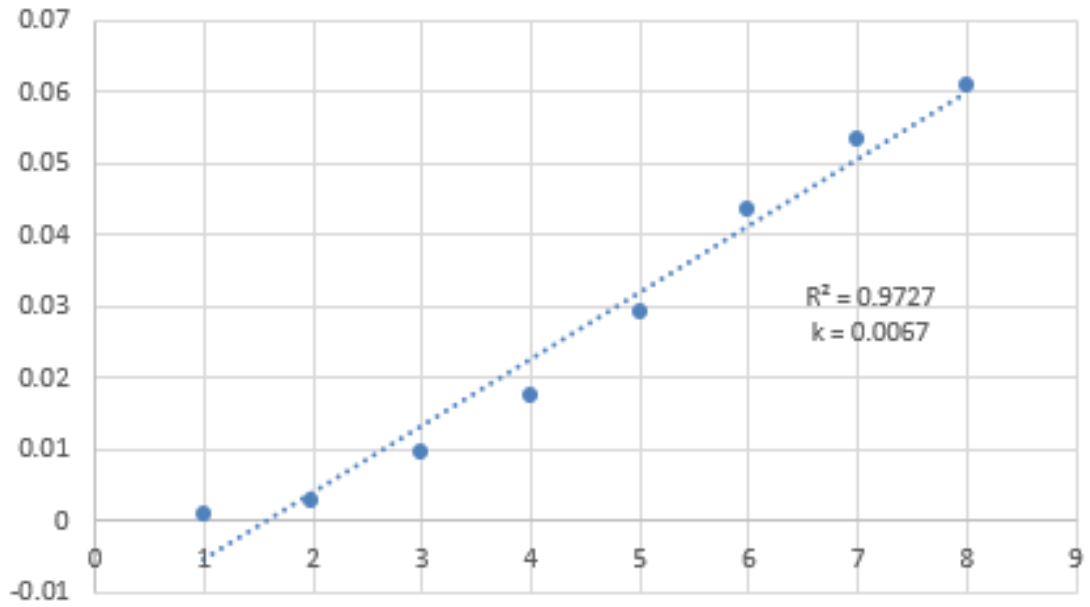
Quitosana/Curcumina



Quitosana/Curcumina-reticulada



Quitosana/Curcumina-adsorção



Quitosana/Curcumina-adsorção-reticulada

