



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



DISSERTAÇÃO

**QUITOSANA/CURCUMINA: MEMBRANAS DE LIBERAÇÃO
CONTROLADA PARA TRATAMENTO DE MELANOMA**

GLÓRIA TAMIRIS FARIAS DA SILVA FURTADO

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCUS VINICIUS LIA FOOK

CAMPINA GRANDE
AGOSTO/2014

GLÓRIA TAMIRIS FARIAS DA SILVA FURTADO

**QUITOSANA/CURCUMINA: MEMBRANAS DE LIBERAÇÃO
CONTROLADA PARA TRATAMENTO DE MELANOMA**

**Dissertação de Mestrado
apresentado ao Departamento de
Ciência e Engenharia de Materiais
da Universidade Federal de
Campina Grande como exigência
final para obtenção do título de
mestre.**

Orientador: PROF. DR. MARCUS VINICIUS LIA FOOK

**CAMPINA GRANDE - PB
AGOSTO/2014**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

F992q Furtado, Glória Tamiris da Silva.
Quitossana / curcumina : membranas de liberação controlada para tratamento de melanoma / Glória Tamiris da Silva Furtado. – Campina Grande, 2014.
79 f. : il. color.

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

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

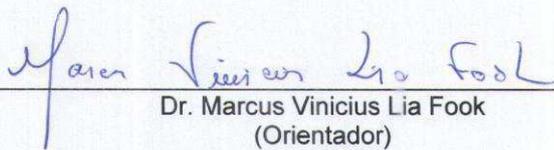
1. Biomateriais. 2. Melanoma. 3. Sistemas de Liberação Controlada. 4. Membranas. 5. Quitossana - Curcumina. I. Fook, Marcus Vinícius Lia. II. Título.

CDU 620.1(043)

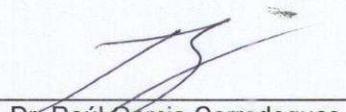
**QUITOSANA/CURCUMINA: MEMBRANAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA
PARA O TRATAMENTO DE MELANOMA**

GLORIA TAMIRIS FARIAS DA SILVA FURTADO

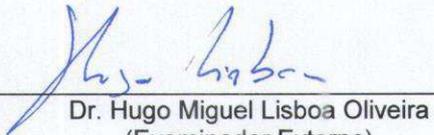
Dissertação Aprovada em 28/08/2014 pela banca examinadora constituída dos seguintes membros:



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



Dr. Raúl García Carrodegua
(Examinador Externo)
CERTBIO/UFCG



Dr. Hugo Miguel Lisboa Oliveira
(Examinador Externo)
UAEA/UFCG

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Minervino e Marinalva, a minha irmã Jéssica e minha avó Maria da Glória pelo amor, apoio, educação e fontes de motivação. E ao meu noivo Thiago pelo amor e apoio.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me dar força, coragem e capacidade para superar todos os desafios que encontrei e serão encontrados por toda a minha vida.

A meus pais **Minervino** e **Marinalva**, pelo amor, paciência e apoio incondicional em todas as etapas da minha vida.

A toda a minha família, em especial a minha irmã **Jéssica**, que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional sempre me apoiando em todos os momentos.

Ao meu AMIGO e noivo, **Thiago**, por participar intensamente de cada desafio superado, me ajudando, incentivando, sempre com muito amor, e principalmente paciência.

Ao Professor Dr. **Marcus Vinicius Lia Fook**, pela orientação e oportunidade, dada desde da graduação, confiança a mim dirigida e por ter sempre acreditado na minha capacidade para as realizações dos desafios proposto por ele. Agradeço por sua sinceridade e confiança depositada em mim.

Aos queridos, amados e grandes amigos **Paulinha, Dona Val, Rafaela Meneses, Rafaela Quinto, Natália Guedes, Milena, Suelem, Italo Macedo, Rayane Santa Cruz, Hugo Lisboa, Ana Carolina, Greyce Sampaio, Ivna Daniele, Anna Silvia, Isabel Rabello, Hugo Yves, Luciane, Josilene, Sr. Sergio, Willams e Thiago** pelo o apoio, incentivo, companheirismo, ajuda, contribuição, de cada um, na realização deste trabalho.

A todos os colegas do **Grupo de Biomateriais** em especial, Sr.Sergio, Joselene, Dona Val, Dailma, Tania, Paulinha, Bruno, Thais, Luciane, Italo, Paulo, Rayane, Silvia, Daniel e Kludson por todo o auxílio prestado durante o desenvolvimento deste trabalho e por todos esses anos de convivência.

À coordenação do curso de Pós-Graduação, na pessoa do Professor Dr.
Romualdo Menezes.

Ao Proad, SUS e Hospital Samaritano.

"Devemos ser a mudança que queremos ver no mundo"

(Mahatma Gandhi)

RESUMO

O câncer vem crescendo nas estatísticas da saúde pública, e o melanoma é um dos tipos mais letais. Tem-se pesquisado substâncias que sejam menos tóxicas e que possam ser liberadas de forma controlada através de sistemas farmacêuticos. Para desenvolver os sistemas farmacêuticos utilizam-se materiais polímeros, os quais serão responsáveis pelo o controle de liberação da droga in situ desejado. A quitosana tem sido estudada por apresentar propriedades como atividade antimicrobiana, analgésico, pode ser modificada quimicamente, fácil acesso e de baixo custo. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e avaliar membranas de quitosana para o uso em sistemas de liberação controlada da curcumina para o tratamento de melanoma. As amostras foram preparadas pelo método de evaporação de solvente, utilizando uma solução de ácido acético (1% v/v), para obter uma solução de quitosana a 2% (m/v). As membranas de quitosana/curcumina foram obtidas a partir da dissolução da curcumina em etanol (1,2 mg/ml), vertendo-a na solução de quitosana, As membranas de quitosana com e sem curcumina, foram caracterizadas por FTIR, DRX, MEV, TG, DSC, GI, biodegradação enzimática, citotoxicidade (MCF-7), e como também realizado o desenvolvimento e validação do método analítico, e determinação do teor de curcumina na membrana desenvolvida. A partir das caracterizações ficou evidenciado que o método de processamento usado na obtenção da membrana quitosana/curcumina é adequado, tendo em vista que não houve degradação da curcumina. As membranas de quitosana/curcumina apresentaram menor intumescimento e degradação, e maior estabilidade quando comparadas às membranas de quitosana. Para o ensaio de citotoxicidade as membranas de quitosana/curcumina apresentaram potencial para o tratamento de câncer. O método analítico desenvolvido está conforme a RE Nº 899/2003 da ANVISA. Logo, o método utilizado foi adequado para identificação e quantificação da curcumina na membrana de quitosana/curcumina. Diante dos resultados obtidos, o sistema desenvolvido apresenta potencial para aplicações em liberação controlada de drogas.

PALAVRAS CHAVES: Melanoma, sistemas de liberação controlada, membranas, quitosana e curcumina.

ABSTRACT

The cancer is growing in public health statistics, and the melanoma is one of the most lethal types. Research has focused on substances that are less toxic and can be released in a controlled way through the development of pharmaceutical systems. To develop pharmaceutical systems are used polymer materials, which will be responsible for the drug release control *in situ*. Chitosan has been studied for having properties such as antimicrobial, analgesic, may be chemically modified, easy and inexpensive. The aim of this study was to develop and evaluate chitosan membranes for curcumin controlled release systems for treating melanoma. Samples were prepared by solvent casting, using a solution of acetic acid (1% v/v) to obtain a chitosan solution at 2% (w/v). The membranes of chitosan/curcumin was obtained from the dissolution of curcumin in ethanol (1.2 mg / ml) pouring the solution of chitosan, chitosan membranes with and without curcumin were characterized by FTIR, XRD, SEM, TG, DSC, SD, enzymatic degradation, cytotoxicity (MCF-7), and also performed as the development and validation of the analytical method, and determination of curcumin in membrane developed. From the characterizations became evident that the processing method used in obtaining the chitosan membrane/curcumin is appropriate, considering there was no degradation of curcumin. The membranes of chitosan/curcumin showed lower swelling ratio and degradation, and increased stability as compared to the chitosan membranes. For the cytotoxicity assay the membranes of chitosan/curcumin showed potential for the treatment of cancer. The developed analytical method is according to the ANVISA resolution No. RE 899/2003. Therefore, the method was suitable for identification and quantification of curcumin in chitosan/curcumin membranes. Based on these results, the system developed has potential for applications in controlled release of drugs.

KEYWORDS: Melanoma, controlled release systems, membranes, chitosan and curcumin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Os cinco tipos mais frequentes de câncer no Brasil	11
Figura 2: Formação e tipos de câncer.....	12
Figura 3: Estatística sobre as principais causas de câncer.....	14
Figura 4: Camadas da pele.	15
Figura 5: Crescimento do Melanoma.	16
Figura 6: Comparação ilustrativa das variações de concentração de fármacos: (a) administrados por métodos convencionais de multidosagem;(b) sistema de liberação controlada.	18
Figura 7: Mecanismos de liberação do fármaco em SLC.....	22
Figura 8: Estrutura química da quitosana.....	26
Figura 9: Estrutura química da curcuminolonga.....	29
Figura 10: Constituintes do corante cúrcuma.....	29
Figura 11: Principais produtos gerados a partir da degradação da Curcumina.....	30
Figura 12: Etapas de obtenção da membrana de quitosana.....	35
Figura 13: Etapa de obtenção da membrana de quitosana/curcumina	35
Figura 14: Membrana de quitosana (a); membrana de quitosana/curcumina (b)	45
Figura 15: Espectros de FTIR:(a) Membrana de quitosana;(b)curcumina e (c) quitosana/curcumina.	46
Figura 16: Difractogramas: (a) membrana de quitosana; (b) pó da curcumina e (c) membrana quitosana/curcumina.	48
Figura 17: Micrografias: (a) membrana de quitosana, pó da curcumina, membrana quitosana/ curcumina, respectivamente: (a) 500X; (b) 1000 X; (c) 5000 X.....	50
Figura 18: Micrografias do corte transversal das membranas de quitosana e quitosana/ curcumina. (a) 500 X; (b) 1000 X; (c) 5000 X, respectivamente. ...	51
Figura 19. Curvas TG/DTG para membrana de quitosana, pó da curcumina e membrana de quitosana/curcumina	52
Figura 20. Curvas de DSC: (a) membrana de quitosana, (b) pó da curcumina, (c) membrana quitosana/curcumina.	55
Figura 21: Grau de intumescimento (%) das membranas de quitosana e quitosana/curcumina: (a) pH 7,4; (b) pH 5,8; (c) pH 4,6.....	57
Figura 22: Biodegradação da membrana de quitosana.....	59
Figura 23: Biodegradação para as membranas de quitosana/curcumina	60
Figura 24: Viabilidade celular do sistema quitosana/curcumina.	61
Figura 25: Cromatograma da curcumina.....	62

Figura 26: Cromatogramas das soluções-padrão da curcumina (A) e quitosana (B) obtido por CLAE-UV a 425nm.	63
Figura 27 – Curva de Calibração para curcumina.	64
Figura 28: Teor real de curcumina na membrana de quitosana/curcumina.	68

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Modelos Matemáticos.	23
Tabela 2: Expoente difusional e mecanismo de liberação para sistemas de liberação controlada.	24
Tabela 3: Eventos térmicos para membrana de quitosana, pó da curcumina e membrana de quitosana/curcumina.	53
Tabela 4: Resultados do ensaio para verificação da exatidão do método.	64
Tabela 5: Resultados do ensaio para verificação da precisão (precisão intermediária).	65
Tabela 6: Resultados do ensaio para verificação da precisão (repetibilidade).	66
Tabela 7: Resultados do ensaio para verificação da robustez do método.	67

Fluxograma

Fluxograma 1: Etapas de desenvolvimento e caracterização das membranas de quitosana e quitosana/curcumina.....	44
---	----

ABREVIATÓES

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASTM-American Society for Testing and Materials

CLUE- cromatógrafo líquido de ultra eficiência

CTAB-cetiltrimetilamóniobrometo

DRX- Difração de Raios X

DSC- Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial

FTIR- Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier

GI-Grau de Intumescimento INCA-Instituto Nacional de Câncer José Alencar

ISO-International Organization for Standardization

MBCSPs-fibroblastos dérmicos humanos

MCF7- Câncer de mama humano

MEV- Microscopia Eletrônica de Varredura

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

PBS-Phosphate Buffered Saline

PLGA- poli (ácido láctico-co - glicólico)

RE- Resolução da ANVISA

SLC- Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos

TG-Termogravimetria

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS	9
2.1 Objetivo geral	9
2.2 Objetivos específicos	9
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
4.1 Câncer	10
4.1.1 Pele	14
4.1.2 Câncer de pele: Melanoma	15
4.2 Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos(SLC)	17
4.2.1 Classificação dos Sistemas de Liberação Controlada	20
4.3 Biopolímeros: Quitosana	25
4.4 Curcumina	28
4.5 Quitosana/Curcumina	31
5. MATERIAIS E MÉTODOS	34
5.1 Local da Pesquisa	34
5.2 Reagentes e Materiais	34
5.3 Procedimentos experimentais	34
5.3.1 Preparação das membranas de quitosana	34
5.3.2 Preparação das membranas de quitosana/curcumina	35
5.4 Caracterizações das membranas	36
5.4.1 Caracterização Parcial	36
5.4.1.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier - (FTIR)	36
5.4.1.1.2 Difração de Raios X - (DRX)	36
5.4.1.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV	37
5.4.1.1.4 Termogravimetria (TG)	37
5.4.1.1.5 Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	37
5.4.1.1.6. Grau de Intumescimento (GI)	38
5.3.2.4 Biodegradação enzimática	38
5.3.2.5 Citotoxicidade	39
5.3.2.6 Desenvolvimento e Validação do método analítico para quantificação da curcumina	40
5.3.2.6.1 Determinação do comprimento de onda de detecção	41
5.3.2.6.2 Validação do método analítico	41
5.3.2.6.3 Determinação do teor de curcumina nas membranas	43
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
6.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier - (FTIR)	46
6.2 Difração de Raios X- DRX	48
6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura- MEV	49
6.4 Termogravimetria (TG)	52
6.5 Calorimetria Exploratória Diferencial- DSC	54
6.6 Grau de Intumescimento (GI%)	57
6.7 Biodegradação enzimática	59
6.8 Citotoxicidade	61
6.9 Desenvolvimento e Validação do método analítico para quantificação da curcumina	62
6.9.1 Determinação do comprimento de onda de detecção para curcumina	62

6.9.2 Validação do método analítico para quantificação da curcumina	62
6.9.3 Determinação do teor de curcumina nas membranas	67
7. CONCLUSÕES	69
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	70
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1. INTRODUÇÃO

Uma ampla gama de doenças e lesões tem afetado tecidos e órgãos de uma maneira que resultam em perda parcial ou total de função. Essencialmente, essas condições são classificadas em lesões agudas ou crônicas e mudanças degenerativas. Dentre estas doenças, o câncer vem ganhando destaque nas estatísticas da saúde pública. Em países desenvolvidos e em desenvolvimento, é responsável por mais de seis milhões de óbitos a cada ano, representando cerca de 12% de todas as causas de morte no mundo. Embora as maiores taxas de incidência de câncer sejam encontradas em países desenvolvidos, dos dez milhões de casos novos anuais de câncer, cinco milhões e meio são diagnosticados nos países em desenvolvimento (GUERRA, 2005). De acordo com o Instituto Nacional de Câncer José Alencar (INCA) a situação do câncer no Brasil, para o ano 2012/2013, é estimado 518.510 novos casos (INCA 2010)

Dentre os vários tipos de casos de câncer no Brasil, o câncer de pele é o segundo mais frequente. Dentre estes, o melanoma figura entre os mais letais, com cerca de 75% de mortalidade na espécie humana, no ano de 2012, foram registrados 6.230 casos (INCA, 2014).

O câncer de pele surge devido à exposição solar na infância e na adolescência a qual está associado ao aparecimento de melanoma cutâneo na idade adulta (INCA_b, 2010), por fatores ambientais ou herança genética. O melanoma maligno é uma forma de câncer de pele muito agressivo que frequentemente torna-se resistente aos tratamentos atuais como, quimioterapia e radioterapia. Estes métodos são destinados a eliminar células de rápido crescimento, porém acabam afetando células saudáveis, que também têm características de se multiplicar rapidamente acarretando efeitos colaterais fortes como quedas de cabelo, feridas na boca, náuseas, vômitos e dores. Além de se mostrarem insuficientes, uma vez que, as células cancerígenas tornam-se resistentes aos agentes quimioterápicos. Em virtude disso, torna-se primordial o desenvolvimento de novos agentes que não desencadeiem quimiorresistência (CARNEIRO, 2007), que sejam menos tóxicos e que possam ser liberados de forma controlada através de sistemas farmacêuticos.

Um agente de destaque por ter uma ampla variedade de propriedades farmacológicas é a curcumina, derivado do rizoma do açafrão (*Curcuma longa Linn*). Dentre as suas diversas propriedades pode-se destacar ações anti-inflamatória, antioxidante, anti-metastática, antiangiogênica, cicatrizante da pele e, principalmente, por ser antiproliferativa e antitumoral. Para desenvolver os sistemas farmacêuticos geralmente utilizam-se polímeros, os quais serão responsáveis pelo o controle de liberação da droga in situ desejado. Desta forma, a quitosana se sobressai por ser um biomaterial polimérico com grande variedade de propriedades físicas e químicas e de biodegradação controlada. Pode ser processada varias formas (esferas, filmes, esponjas, etc), também apresenta capacidade de ser modificada químicamente, de fácil acesso e de baixo custo. Portanto, a curcumina é um agente farmacológico não toxico as células saudáveis, logo esta droga associada a quitosana torna-se uma nova perspectiva terapêutica para o câncer.

Neste contexto, tem-se a perspectiva de iniciar os estudos de um sistema farmacêutico que utilize uma droga juntamente com um biopolímero para o tratamento de melanoma.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e avaliar membranas de quitosana para o uso em sistema de liberação controlada da curcumina para o tratamento de melanoma.

2.2 Objetivos específicos

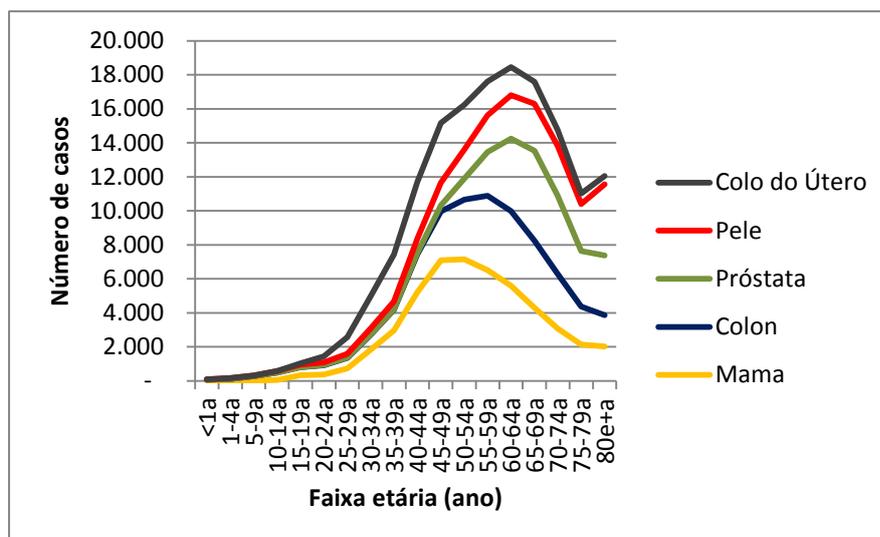
- Obter a membrana quitosana/curcumina.
- Avaliar a incorporação e interação da curcumina com a quitosana.
- Analisar, comparativamente, as propriedades físico-químicas e estruturais das membranas de quitosana e quitosana/curcumina.
- Avaliar o grau de intumescimento e biodegradação das membranas.
- Estudar a citotoxicidade das membranas.
- Desenvolver e validar o método analítico para quantificação da curcumina a fim de estabelecer o teor real da curcumina na membrana de quitosana/curcumina.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Câncer

O câncer é responsável por mais de 12% de todas as causas de óbito no mundo: mais de 7 milhões de pessoas morrem anualmente desta doença. Como a esperança de vida no planeta tem melhorado gradativamente, a incidência de câncer, estimada em 2002 em 11 milhões de casos novos, alcançará mais de 15 milhões em 2020. A explicação para este crescimento está na maior exposição dos indivíduos a fatores de risco cancerígenos, à redefinição dos padrões de vida, a partir da uniformização das condições de trabalho, nutrição e consumo desencadeado pelo processo global de industrialização. As alterações demográficas, com redução das taxas de mortalidade e natalidade, indicam o prolongamento da expectativa de vida e o envelhecimento populacional, levando ao aumento da incidência de doenças crônico-degenerativas, especialmente as cardiovasculares e o câncer (INCA,2012).

Entre as várias doenças atribuídas à mortalidade dos seres humanos em todo o mundo, o câncer é uma das principais causas (NAAMA, AL-TEMIMI & AL-AMIER,2010), isso pode ser atribuído a mutações somáticas e o declínio da imunocompetência que acompanha o envelhecimento dos humanos o que intensifica o desenvolvimento de câncer (ROBBINS & COTTRAN, 2010). Segundo o Ministério da Saúde (2012), os cinco tipos de câncer mais frequentes no Brasil são: Colo do útero, Pele, Próstata, Colon e Mama, tendo com mais frequência na faixa etária entre 40 a 69 anos. Observa-se na Figura 1 que o câncer de pele é o segundo mais frequente no Brasil em ambos os sexos no ano de 2012 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). Dentre os diversos tipos de câncer no Brasil, os melanomas no ano de 2012 foram apenas 6.230 casos. No entanto, este figura entre os mais letais, com cerca de 75% de mortalidade na espécie humana (INCA_a, 2010).

Figura 1: Os cinco tipos mais frequentes de câncer no Brasil .

Fonte: DATASUS/ Ministério da Saúde, 2012.

Muito embora o câncer tenha recebido destaque nas estatísticas nas últimas décadas, o câncer não é uma doença do mundo moderno. Estudos mostram que seres humanos apresentavam câncer desde tempos antigos. Como por exemplo, no Egito antigo, em 1932, Louis Leakey descobriu um maxilar, a partir de *Australopithecus* ou o *Homo erectus*, o qual apresentava um tumor. Especialistas examinaram-no e sugeriram que o tumor era decorrente do linfoma de Burkitt, um tipo de câncer que afeta o sistema imunológico. Outras múmias foram estudadas e revelaram estruturas tumorais que descrevem câncer de mama e câncer ósseo, comprovando que o câncer já comprometia o homem há mais de 3 mil anos antes de Cristo (INCA, 2012; SO &BOZZONE , 2008)

A palavra câncer foi utilizada pela primeira vez por Hipócrates, o pai da medicina, que viveu entre 460 e 377 a.C. A palavra câncer tem origem a partir do grego - *karkínos*, que quer dizer caranguejo, a qual foi atribuída por apresentar uma capacidade de aderir a estruturas adjacentes e se espalharem várias direções simultaneamente (ROBBINS & COTTRAN, 2010).

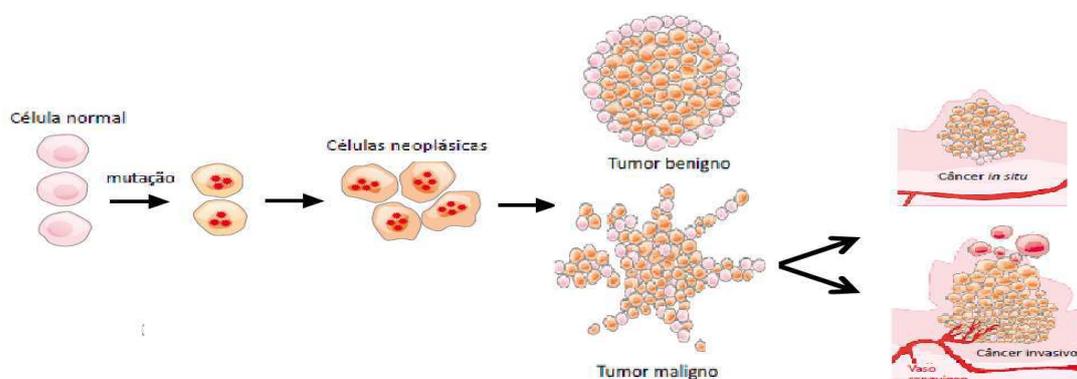
O câncer pode ser definido como um crescimento anormal de células, causado por alterações genéticas que conduzem ao desequilíbrio na proliferação celular. Por fim, evolui para uma população de células que podem invadir os tecidos, se disseminar para locais distantes ocasionando as

metástases (Figura 2). Essa proliferação celular desordenada é responsável por uma morbidade significativa e, se não for tratada, pode levar a morte do hospedeiro (RAYMOND & RUDDON, 2007).

A proliferação excessiva e não controlada das células é chamada de neoplasia. Outro termo usado como sinônimo de neoplasia é tumor, que é uma massa anormal de tecido, cujo crescimento é excessivo e não coordenado com aqueles dos tecidos normais. Esta proliferação persiste mesmo com a interrupção do estímulo que o originou. As neoplasias (câncer *in situ* e câncer invasivo), na prática, são denominadas tumores que podem ser benignas ou malignas (INCA, 2012; ROBBINS & COTTRAN, 2010).

As neoplasias benignas possuem um crescimento de forma organizada, lenta, expansiva e com limites nítidos. Apesar de dificilmente serem responsáveis por metástases, o seu crescimento pode comprimir órgãos e tecidos adjacentes. Porém, pode ser removido por cirurgia local e o paciente geralmente sobrevive. Exemplo de neoplasias benignas são os miomas, os lipomas e os adenomas. Já as neoplasias malignas, que são referidas como *cânceres* podem invadir e destruir estruturas adjacentes e se disseminar para sítios distantes (metástase). Também podem resistir ao tratamento e causar a morte do paciente. Entretanto, nem todos os cânceres seguem um curso mortal. Alguns são descobertos precocemente e são tratados com sucesso. (INCA, 2012; ROBBINS & COTTRAN, 2010). Atualmente, câncer é o nome geral dado a um conjunto de mais de 100 doenças (INCA, 2012)

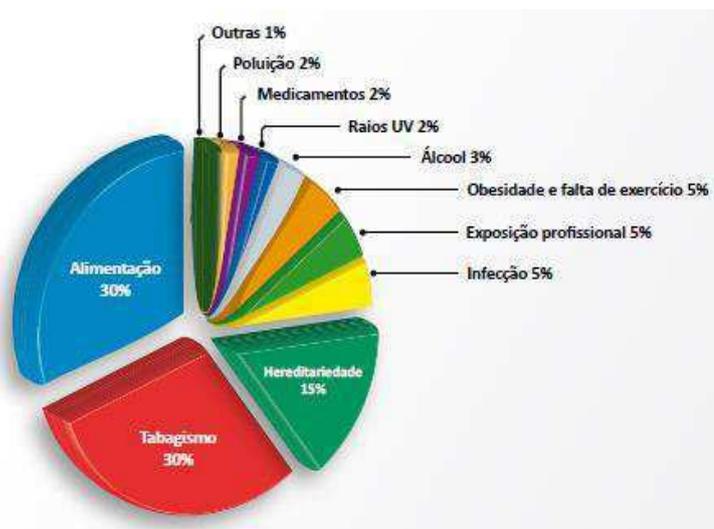
Figura 2: Formação e tipos de câncer.



Fonte: Adaptada (INCA, 2012).

No estágio atual do conhecimento clínico não há meios para se estabelecer explicações das razões do desenvolvimento do câncer em um determinado grupo de pessoas e outros não. Existem determinados fatores de risco que, geralmente, influenciam na incidência de câncer. Contudo, não causam câncer de forma direta. De forma geral, a herança genética e fatores ambientais têm influência sobre o risco de desenvolver esta doença. Dentre os fatores ambientais, tem-se tabaco, álcool, radiação, toxinas relacionadas ao trabalho, infecções, má alimentação, falta de exercícios físicos e drogas (INCA, 2012; SO & BOZZONE, 2008). Em termos genéticos, o câncer pode ser hereditário ou esporádico (não-hereditário). As alterações genéticas apresentam papel decisivo no aparecimento de várias neoplasias humanas. Na maioria, essas alterações genéticas ocorrem em uma única célula somática, que então se divide e continua se desenvolvendo até formar um câncer. Mais raramente, quando a neoplasia maligna ocorre como parte de uma síndrome de câncer hereditário, as alterações iniciais são herdadas por meio de linhagem germinativa e, portanto, estão presentes em todas as células do organismo. Algumas características estão associadas ao câncer hereditário, como: idade precoce ao diagnóstico, mais de uma neoplasia em um mesmo indivíduo, vários membros de uma mesma família apresentando a mesma neoplasia ou neoplasias relacionadas e múltiplas gerações acometidas (ROBBINS & COTTRAN, 2010).

O envelhecimento é outro fator que está diretamente relacionado ao aumento da incidência de câncer. À medida que as células envelhecem, ocorre uma diminuição na capacidade de reparo às lesões sofridas pelo DNA, bem como dos mecanismos imunológicos responsáveis por impedir a replicação de células defeituosas. Dessa forma, verifica-se um aumento destas, favorecendo a proliferação de células pró-cancerígenas (ROBBINS & COTTRAN, 2010). A Figura 3 ilustra as principais causas de câncer.

Figura 3: Estatística sobre as principais causas de câncer.

Fonte: INCA, 1997(INCA, 2012)

O câncer pode surgir em qualquer parte do corpo. Alguns órgãos são mais afetados do que outros; e cada órgão, por sua vez, pode ser acometido por tipos diferenciados de tumor, mais ou menos agressivos (INCA,2012).

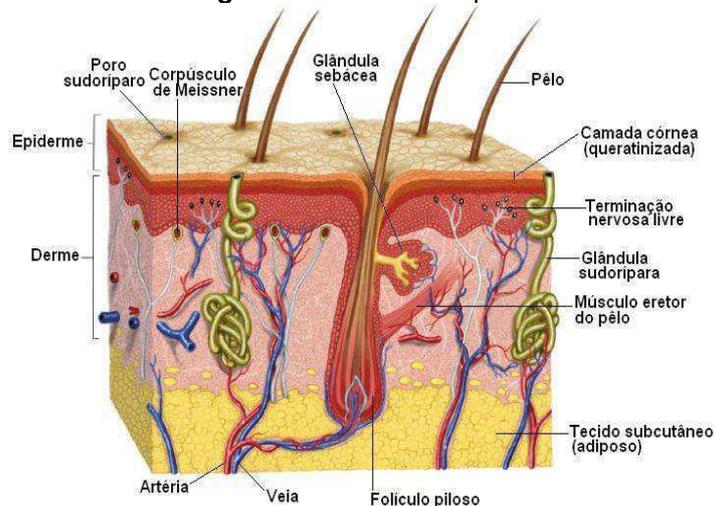
4.1.1Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano cobrindo-o completamente, unindo todos os componentes deste de forma compacta, apresentando vários tons de cor. Trata-se de um órgão versátil, atuando sobre a proteção contra agentes físicos, químicos e patógenos (vírus, bactérias e fungos); a termorregulação; o metabolismo de nutrientes (vitamina D). Também apresenta funções neurossensoriais (SAMPAIO &RIVITTI, 2008).

A pele é composta por três grandes camadas de tecidos (Figura4): a mais externa delas, a epiderme, é uma camada translúcida que é visível e está em contato direto com o meio ambiente. Esta camada é formada principalmente por células epiteliais, as quais formam uma barreira intacta e impermeável. A camada intermediária, a derme, consiste de terminações nervosas, vasos sanguíneos, contendo óleo, glândulas sebáceas e folículos pilosos. Esta camada contém ainda as proteínas colágenas e elastina, que conferem a pele resistência e elasticidade, respectivamente. E a camada mais profunda,o tecido celular subcutâneo (hipoderme), é composta principalmente de células de gordura, contém as raízes de folículos capilares e vasos

sanguíneos, e também protege contra o frio e age como amortecedor de pressão (SAMPAIO & RIVITTI, 2008; SO & BOZZONE , 2008).

Figura 4: Camadas da pele.



Fonte: ANATOMIA E FISIOLOGIA HUMANA, 2013.

Na epiderme existem vários tipos de células não epiteliais como os melanócitos. Estas células produzem o pigmento melanina, que é a substância que confere a cor da pele. Desta forma, as pessoas que são albinas, por produzirem pouca melanina, apresentam hipopigmentação da pele, cabelos e olhos. A melanina é de extrema importância, pois, fornece proteção contra a radiação ultravioleta (SO & BOZZONE , 2008).

4.1.2 Câncer de pele: Melanoma

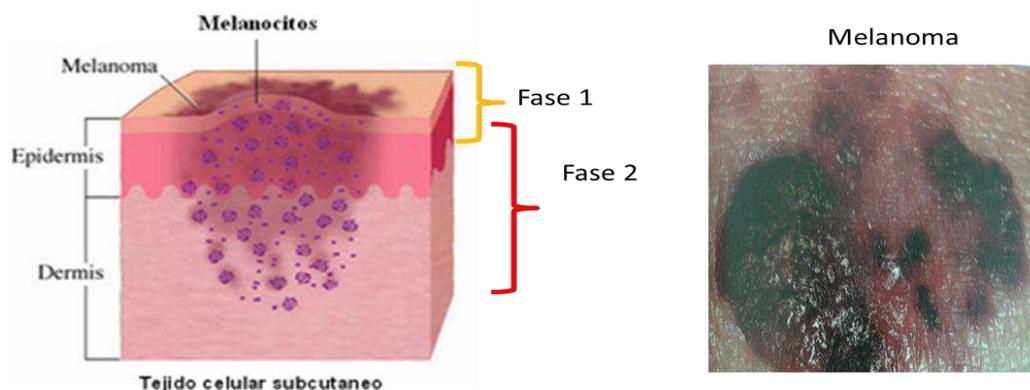
O câncer de pele é bastante frequente no Brasil e corresponde a 25% de todos os tumores malignos registrados no país. Dentre eles, tem-se o melanoma que apesar de representar apenas 4% das neoplasias malignas do órgão, torna-se importante o seu estudo, por ser o mais grave dos cânceres de pele devido, à sua alta possibilidade de metástase (INCA, 2012). O melanoma é uma neoplasia bastante incomum e quando não percebida no estágio inicial pode ser fatal. Esta neoplasia surge geralmente na pele, porém podem surgir na superfície da mucosa oral e anogenital, esôfago e olho. A principal causa de melanoma, em quatro dos cinco casos, é a exposição excessiva à radiação ultravioleta que afeta as células de pigmentação, os melanócitos, cuja função é

produzir o pigmento melanina (ROBBINS & COTTRAN, 2010; SO & BOZZONE, 2008).

Este tipo de câncer ocorre geralmente em pessoas de pele clara, sendo, dez vezes mais prevalente em caucasianos do que em afro-americanos, e possui variações entre populações caucasianas em relação à proximidade ao equador já que, nesta região a incidência de radiação é maior (RAYMOND & RUDDON, 2007). É um tipo câncer que evolui com o tempo, passando de lesões cutâneas para tumores agressivos, que sofrem metástase e são resistentes a terapias. É assintomático, embora o prurido (coceira) ou a dor possam manifestar-se precocemente. Em uma mesma lesão, geralmente, apresenta heterogeneidade na sua coloração (tons pretos, marrom vermelho, azul-escuro e cinza), no tamanho e na forma, e possui diâmetros maiores que 10 mm. A borda geralmente é irregular, não lisa, e esférica (ROBBINS & COTTRAN, 2010).

O crescimento do melanoma é dividido em duas fases: crescimento radial e crescimento vertical conforme ilustrado na Figura 5. Na primeira, ocorre uma disseminação horizontal (Fase 1), localizada na epiderme e na derme superficial. Durante esta fase dificilmente ocorre metástase. Posteriormente, pode-se verificar a fase de crescimento vertical (Fase 2). Nesta, as células tumorais invadem as camadas dérmicas mais profundas. Esta fase é frequentemente, marcada pelo aparecimento de um nódulo. Além disso, está relacionada ao surgimento de células com potencial metastático (ROBBINS & COTTRAN, 2010).

Figura 5: Crescimento do Melanoma.



Fonte: Adaptação. (ROBBINS & COTTRAN, 2010; PORTAL DE SALUD COMUNIDADE DEL MADRID, 2013)

Atualmente, as modalidades terapêuticas convencionalmente utilizadas no tratamento do melanoma abrangem a cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Entretanto, esses métodos apresentam algumas desvantagens. Para a cirurgia pode surgir complicações pós-operatórias, que podem gerar sequelas físicas e funcionais e, em casos extremos, a morte. A radioterapia pode provocar muitos efeitos colaterais e aumentar a probabilidade de desenvolvimento de cânceres secundários. Já a quimioterapia afeta direta ou indiretamente as moléculas de DNA de células saudáveis em divisão, possui efeito tóxico sobre as células normais do organismo, apresenta baixa especificidade da droga ao sítio patológico e necessita de elevada dosagem para atingir concentração adequada no local desejado. Devido à toxicidade das drogas empregadas, o paciente apresenta diarreia, vômito, náuseas, perda de cabelo e comprometimento da imunidade. Dessa forma, o tratamento quimioterápico apresenta ainda muitas limitações para a curabilidade das neoplasias (CARNEIRO, 2007).

Apesar dos esforços consideráveis nas pesquisas oncológicas grande parte das terapias contra o câncer permanecem impróprias devido à elevada toxicidade geral dos agentes anticancerígenos e quimioresistência. O melanoma maligno é uma forma de câncer de pele muito agressivo que frequentemente torna-se resistente aos agentes quimioterápicos. Em virtude da baixa eficácia dos agentes empregados atualmente, torna-se primordial o desenvolvimento de novos agentes que não desencadeiem quimioresistência (CARNEIRO, 2007 MICHEL, 2012). Para resolver algumas destas questões substanciais, estudos promissores foram realizados no desenvolvimento de sistemas de liberação de drogas, no quais está bem estabelecido que o fornecimento de drogas específicas é mais eficaz e menos prejudicial do que a entrega sistemática convencional de drogas quimioterapêuticas (WADAJKAR, 2012).

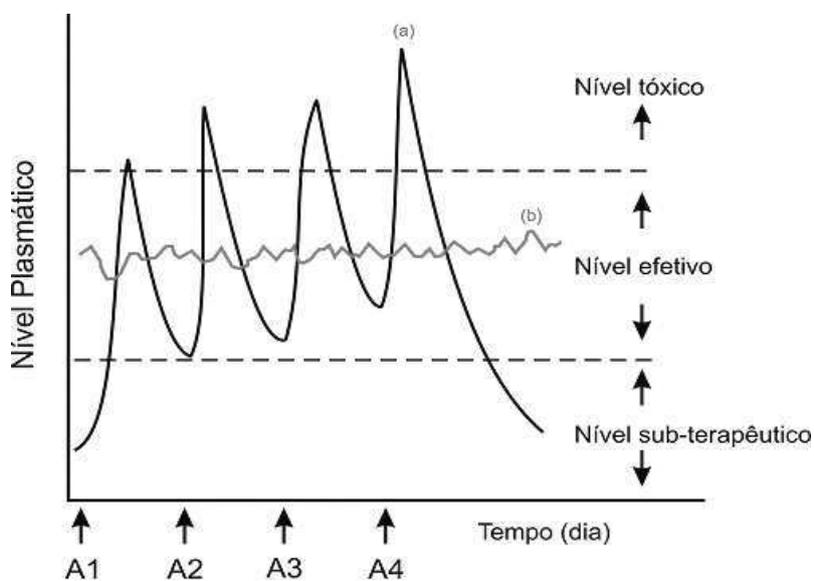
4.2 Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos(SLC)

O desenvolvimento de novas tecnologias na modificação de liberação de fármacos, a partir de formas farmacêuticas sofreu um acréscimo notório nas últimas décadas na tentativa de maximizar suas vantagens com relação aos

métodos convencionais. Assim, a indústria farmacêutica tem investido fortemente no desenvolvimento de medicamentos de liberação controlada com a geração de novas patentes, o que do ponto de vista empresarial representa retorno financeiro a longo prazo (HOLANDA, 2011; JAIN, 2008). Um sistema de liberação de Controlada (SLC) é definido como uma formulação ou um dispositivo que permite a introdução de uma substância terapêutica no corpo e melhora a sua eficácia e segurança através do controle da taxa, tempo e local de liberação de drogas no corpo (JAIN, 2008).

Ao comparar os SLC com os sistemas convencionais, observa-se na Figura 6, que a curva (a) referente aos métodos convencionais, está longe do ideal, proporcionando variações consideráveis na concentração do fármaco no plasma sanguíneo, podendo não havendo o efeito farmacológico ou ocasionar intoxicação, pois há uma faixa de concentração efetiva para a ação no organismo. Já o método de liberação controlada a curva (b) proporciona uma pequena variação na concentração do fármaco com o tempo, impossibilitando inefetividade ou toxicidade (HOLANDA, 2011).

Figura 6: Comparação ilustrativa das variações de concentração de fármacos: (a) administrados por métodos convencionais de multidosagem; (b) sistema de liberação controlada.



Fonte: LYRA. et al, 2007

As principais vantagens ao desenvolver e utilizar os sistemas de liberação controlada são:

- Manter nível terapêutico com baixa oscilação;
- Impedir níveis tóxicos e efeitos colaterais locais e sistêmicos;
- Evitar subníveis terapêuticos, aumentar concentrações plasmáticas de princípios ativos de meia-vida plasmática relativamente curta;
- Maior segurança na utilização de alguns fármacos de elevada potência;
- Maior comodidade pela diminuição do número de administrações diárias;
- Facilita adesão do paciente ao tratamento, administração noturna pode ser evitada, efeitos indesejados reduzidos.

Estas vantagens são obtidas através de sistemas farmacêuticos tais como lipossomas, bombas osmóticas, revestimentos entéricos, sistemas transdérmicos, pró-fármacos, os sistemas matriciais poliméricos, entre outros (LOPES. LOBO & COSTA, 2005; LYRA. et al, 2007).

Para se obter um Sistema de liberação controlada ideal deve-se cumprir os seguintes requisitos (JAIN, 2008):

- Deve aumentar a biodisponibilidade do fármaco.
- Deve proporcionar a entrega da droga de forma controlada.
- Deve transportar a droga intacta para o sítio de ação, evitando alteração nos tecidos sadios do hospedeiro.
- O dispositivo deve ser estável e, deve ser mantido sob as variáveis fisiológicas.
- Um alto grau de dispersão do medicamento.
- O mesmo método deverá ser aplicável em varias drogas.
- Deve ser fácil de administrar aos pacientes.
- Deve ser seguro e confiável.
- Deve ser rentável.

A obtenção de um SLC é bastante difícil, pois o sistema deve transportar o fármaco para seu sítio de ação, tornando-o disponível na concentração eficaz, em um tempo apropriado, para uma duração de ação adequada. Para se obter tais requisitos são necessários conhecimentos e integrações de uma série de aspectos de natureza diversa, tais como: propriedades físico-químicas,

farmacocinéticas e farmacodinâmicas do fármaco; via de administração e as consequentes barreiras fisiológicas e bioquímicas impostas à absorção das propriedades físico-químicas, biocompatibilidade, comportamento *in vivo* fármaco; propriedades do material/materiais base do SLC, interações com o fármaco, etc; métodos e tecnologias envolvidas na produção do SLC. Estas várias vertentes envolvem o domínio de conhecimentos associados a áreas científicas como a medicina, farmácia, bioquímica, química, engenharia e outras, tornando-se uma área interdisciplinar (COIMBRA, 2010).

4.2.1 Classificação dos Sistemas de Liberação Controlada

Estes sistemas são frequentemente obtidos por materiais poliméricos, pela sua variedade, versatilidade e propriedades. Uma grande variedade de polímeros sintéticos, naturais ou semi-sintéticos, os quais podem ser hidrofílicos ou hidrofóbicos, biodegradáveis ou não. Os polímeros podem atuar como barreira realizando o controle da liberação da droga. E estes podem existir na forma de microesferas, matrizes e membranas, podendo ser administrados por via parenteral, oral, transdérmica, implante, dentre outros (COIMBRA, 2010; GOTHOSKAR, 2013; LEONG & LANGER, 1987).

Ao utilizar um material polimérico para a obtenção do SLC podem ser classificados como matriciais e podem ser divididos em: monolítico e reservatório.

O sistema monolítico é definido como um sistema que possui um ou mais agentes terapêuticos homogeneamente, dispersos ou dissolvidos, em uma matriz polimérica, onde a liberação do fármaco é controlada pela a difusão da matriz. Esta matriz pode ser inerte, não intumescível ou totalmente intumescível, e não degradável (RATNER, 2004; LYRA. et al, 2007; PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007). Já o sistema reservatório é composto por um núcleo de droga (sólido ou líquido) encapsulado ou adsorvido por uma membrana polimérica e a liberação é controlada através da difusão da droga pela membrana (RATNER, 2004; LEONG & LANGER, 1987).

Os SLC preparados a partir de materiais poliméricos podem apresentar um mecanismo/princípio de liberação do fármaco da seguinte forma: difusão

(a); ativados pelo solvente (b): osmose (i) e absorção de água (ii); ação química (c): sistema de cadeias pendentes (iii) e sistemas biodegradáveis (iv)(COIMBRA, 2010).

Nos sistemas de difusão (a) a taxa de liberação da droga é determinada pela sua difusão através de um polímero (Figura 7). O comportamento de liberação por difusão é altamente dependente das propriedades físicas do fármaco na adição do nível de carregamento e tamanho de partícula dos solutos, solubilidade da droga no polímero e difusividade da droga no polímero, outros parâmetros importantes são: forma do dispositivo, área superficial e o comprimento do percurso de difusão (LEONG & LANGER, 1987).

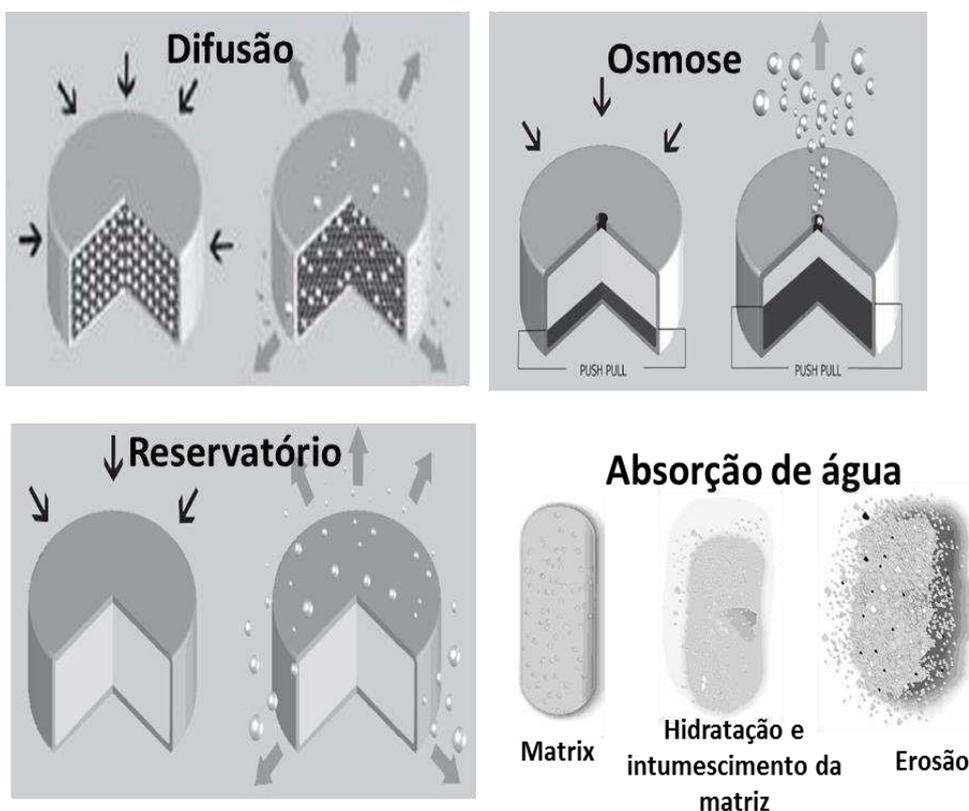
Os SLC ativados pelo solvente (b) são divididos em dois tipos: sistemas de liberação controlados pela pressão osmótica (i) e sistemas controlados (ii) pela absorção de água (*swelling*) (COIMBRA, 2010).

O SLC controlado pela pressão osmótica (i) consiste num reservatório de volume constante, constituído por um invólucro de uma membrana polimérica semi-permeável (permeável ao solvente mas não ao soluto), com um orifício, e com o interior cheio, com o fármaco no estado sólido e uma solução saturada de fármaco (Figura 7). 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. Já nos dispositivos controlados pela absorção de água (ii) o fármaco encontra-se disperso ou dissolvido numa matriz polimérica constituída por um polímero hidrofílico reticulado (hidrogel). Estas matrizes têm a capacidade de absorver uma grande quantidade de água sem se dissolverem. Ao entrar em contato com a água ou com os fluidos biológicos a superfície da matriz, absorvem pequenas quantidades de água e a liberação do fármaco passa a ser controlado pela sua dissolução e difusão polimérica no meio aquoso interno, até o exterior da matriz (Figura 7). A alta viscosidade da dispersão polimérica nos poros reduz a velocidade no transporte do fármaco através da formação de uma camada de gel. Desta forma, a quantificação do grau de erosão da superfície da matriz intumescida ou a definição das taxas de absorção de água na interface entre o gel e o meio que o cerca podem ser

bastante importantes para determinação das taxas de liberação do fármaco (LEONG & LANGER, 1987; LYRA. et al, 2007;).

Na ação química (c), sistemas de cadeias pendentes (iii), as moléculas de fármaco encontram-se quimicamente ligadas à cadeia de polímero e estas ligações são quebradas por hidrólise ou por ação enzimática, originando assim a liberação do fármaco a uma taxa controlada. Nos sistemas biodegradáveis (iv), 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 (LEONG & LANGER, 1987; PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007; COIMBRA, 2010)

Figura 7: Mecanismos de liberação do fármaco em SLC.



Fonte: Adaptado. (LYRA et al,2007; PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007)

Na prática, alguns SLC não encaixam perfeitamente em nenhuma destas três categorias, pois em muitos casos não existe um mecanismo dominante responsável pela liberação do fármaco, sendo esta determinada por uma combinação dos vários mecanismos possíveis envolvendo processos de

intumescimento do polímero, difusão do fármaco e erosão da matriz. Tem-se como exemplo alguns sistemas matriciais biodegradáveis em que a liberação do fármaco é controlada tanto pela difusão do fármaco como pela biodegradação do polímero ou, em alguns hidrogéis, em que a liberação do fármaco é determinada tanto pela taxa de absorção de água como pela taxa de difusão do polímero através da matriz intumescida pelo solvente (COIMBRA, 2010; PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007).

Portanto, têm-se desenvolvido modelos matemáticos que contribuí para determinar o tipo de mecanismo de liberação predominante a cinética de liberação do fármaco. Esses modelos também podem contribuir na descrição de equações de dissolução de fármacos, além de explicar a resistência da liberação do fármaco na presença da barreira de gel formada em torno da matriz. Existem atualmente diversos modelos matemáticos aplicados ao controle dos sistemas matriciais de liberação controlada de fármacos, alguns destes estão demonstrados na Tabela 1 (LYRA et al, 2007; LOPES, 2005)

Tabela 1: Modelos Matemáticos.

$\frac{dQ}{dt} = \frac{DS\Delta C}{e}$	<p>Equação 1 - Lei de Fick Aplicado quando a difusão fickiniana é o único mecanismo de liberação do fármaco. dQ/dt é a velocidade ao atravessar a membrana; D é o coeficiente de difusão; S é a superfície de contato entre solução e membrana; (C é a diferença de concentração do fármaco entre os dois lados da membrana; e é a espessura da membrana.</p>
$\frac{Mt}{M\infty} = Kt^n$	<p>Equação 2 Modelo matemático simples que descreve a liberação do fármaco a partir de um sistema polimérico. Esta equação pode ser utilizada para analisar os primeiros 60% de fármaco liberado, a partir da curva onde a liberação é linear. Mt é a quantidade do fármaco em função do tempo. $M\infty$ é a quantidade total da droga; K é a constante cinética da liberação e n é o expoente para cinética de liberação.</p>
$\frac{Mt}{M\infty} = K_1t^m + K_2t^{2m}$	<p>Equação 3 Modelo matemático que leva em consideração a difusão fickniana (primeiro termo da equação) e a contribuição do relaxamento e intumescimento da matriz polimérica (segundo termo da equação), onde m é o expoente para a cinética de liberação.</p>

Fonte: LYRA et al, 2007.

Para as matrizes poliméricas de acordo com os critérios para cinética de liberação de solutos a partir de sistemas intumescíveis, o coeficiente difusional

depende da geometria da partícula e fornece informações sobre o mecanismo de liberação. Para sistemas com geometria esférica, um valor de coeficiente difusional $n < 0,43$, indica que o mecanismo de liberação observado é o de difusão do soluto através de camadas da matriz, também conhecido como mecanismo de liberação Fickiano ou “Caso I”. Um valor de $n = 0,85$ indica que a liberação do soluto é controlada apenas pelo intumescimento/relaxação da cadeia polimérica, isto é, independente do tempo, mecanismo este, também conhecido como “Caso II” de transporte. Quando $0,43 < n < 0,85$, obtém-se um transporte não-Fickiano ou anômalo, onde ocorre a superposição dos dois fenômenos, sendo que a liberação é controlada pela difusão e intumescimento, simultaneamente. Para valores de $n > 0,85$ têm-se um Super Caso II de transporte, no qual ocorre a contribuição simultânea de processos como difusão, intumescimento, relaxação e erosão da matriz polimérica (LOPES, 2005; PARIZE, 2009, COIMBRA, 2010).

Tabela 2: Expoente difusional e mecanismo de liberação para sistemas de liberação controlada.

Expoente difusional, n			Mecanismo de liberação
Filmes	Cilindros	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 (não-Fickiano)
1,0	0,89	0,85	Caso II de transporte
$> 1,0$	$> 0,89$	$> 0,85$	Super Caso II de transporte

Fonte: PARIZE, 2009

Dentre os polímeros utilizados na confecção de SLC, os biopolímeros estão sendo bastante utilizados na indústria farmacêutica por sua versatilidade e por possuírem a capacidade de liberar a droga efetivamente no alvo desejado, potencializando os benefícios terapêuticos do tratamento. Entre os polímeros naturais os polissacarídeos e seus derivados estão sendo largamente utilizados em formas farmacêuticas, devido à baixa toxicidade, baixo custo e disponibilidade. Aliado a isto, a biodegradabilidade, as

características filmogênicas e a facilidade de derivatização têm constituído um elemento de elevado interesse e destaque nas investigações voltadas para os sistemas farmacêuticos (HOLANDA, 2011). Portanto, nos últimos vinte anos, a quitosana é um dos polímeros orgânicos mais estudados para aplicação em liberação controlada de fármacos (BERNKOP-SCHNÜRCH & DÜNNHAUPT, 2012).

4.3 Biopolímeros: Quitosana

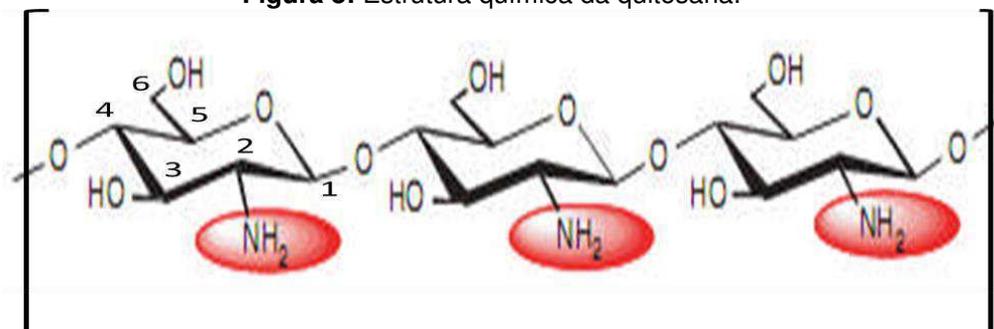
Vários trabalhos, recentes, têm enfatizado o desenvolvimento de um sistema terapêutico multifuncional para o câncer com capacidades de diagnóstico e de tratamento por incorporação de vários polímeros, materiais orgânicos e inorgânicos (WADAJKAR, 2012). A quitosana tem sido bastante estudada nos campos da medicina e da farmácia por ser um copolímero não tóxico, biocompatível e biodegradável. É reconhecida por células tumorais (KUMAR et al., 2004), além de exibir comportamento biológico favorável, tais como bioadesão, permeabilidade, mucoadesividade. Apresentam características físico-químicas interessantes, onde a quitosana possui grupos funcionais potencialmente reativos como grupamentos amina (-NH₂). Além disso, é amplamente aplicada na área farmacêutica, pois podem ser empregados na forma de implantes, esponjas, filmes, grânulos, xerogéis, micro e nanopartículas o que o tornam um material único para *design* de sistemas de liberação de fármaco. (CAMPANA FILHO, 2007; LI, 2008; VIVEK, 2009; MOHAMMADPOUR, 2012; HOLANDA, 2011)

Além das propriedades apresentadas acima, este biopolímero possui atividade antimicrobiana, analgésica, coagulante e cicatrização, o que potencializa a utilização em diversas áreas tais como: indústria de cosméticos, agricultura, indústria de alimentos e na medicina (HOLANDA, 2011; FIDELES, 2010).

A quitosana é um copolímero semicristalino, formado a partir de unidades de 2-desoxi-N-acetil-D-glucosamina e 2-desoxi-D-glucosamina ligadas por meio de glicosídeo β (1 \rightarrow 4) (Figura 8), o qual é obtido a partir da hidólise alcalina da quitina, que é extraída através da casca do camarão, do caranguejo e da parede celular de leveduras. A quitosana comercial contém

cerca de 10-30% de unidades 2-acetamido-2-desoxi-Dglicopirranose (CAMPANA FILHO, 2007; WANG, 2011).

Figura 8: Estrutura química da quitosana.



Fonte: Adaptado (FIDELES, 2010)

A quitosana é um polímero insolúvel em água e solúvel em ácidos orgânicos fracos, sendo os mais usados: ácidos acético e ácido fórmico. Devido a quitosana ser um polímero que em condições de pH neutro e alcalino apresenta, agrupamentos amino livres. Já em pH ácido (pH <6) os grupamentos amino são protonados (NH³⁺), tornando o polissacarídeo solúvel. Portanto, quitosana pode formar complexos eletrostáticos com espécies carregadas negativamente incluindo proteínas, polímeros, fármacos e outros ânions de baixa massa molar (CAMPANA FILHO, 2007; WANG, 2011).

A quitosana apresenta grupos funcionais potencialmente reativos como grupamentos amina (-NH₂), vários grupos hidroxilas primários e secundários nas posições C-3 e C-6 que (Figura 8), por sua vez, apresentam forte afinidade com a água. Modificações feitas nestes grupamentos produzem diferentes materiais que podem ser utilizados em diversas aplicações (HOLANDA, 2011).

Outra propriedade que a quitosana possui é a biodegradabilidade. Ela pode ser degradada de duas formas: quando submetida a uma temperatura (i) de 60°C, já que os átomos de hidrogênio na molécula do polímero diminuem a energia entre a ligação C-C favorecendo a hidrólise. A outra forma, é por catálise enzimática, (ii) através da lisozima, que está presente em tecidos, órgãos e fluidos corporais de mamíferos. Os produtos de degradação da quitosana são oligômeros de n-acetil-D-glicosamina os quais são totalmente absorvidos pelo organismo, e não são tóxicos (CAMPANA FILHO, 2007;

HOLANDA, 2011). A biodegradação da quitosana pode ser influenciada pelo: grau de desacetilação, peso molecular, grau de cristalinidade e também pela a forma e estado da superfície do material (FIDELES, 2010; WANG, 2011).

Estudos recentes revelam que nanopartículas de quitosana são capazes conduzir o DNA no interior de células humanas com resultados muito encorajadores no controle e na diminuição do crescimento desregulado de células cancerígenas (GASPAR et al., 2011). Adicionalmente, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram atividade anti-tumoral, atuando diretamente sobre as células tumorais e interferindo no metabolismo, inibindo o crescimento das células, e induzir a apoptose celular (WANG et al., 2011)

Um exemplo do uso da quitosana em estudos para o tratamento do câncer é através da droga doxorrubicina e seus derivados bioativos. A eficácia deste último é limitada devido à toxicidade do fármaco. Portanto, uma maneira de solucionar este problema foi produzir nanopartículas de quitosana como um sistema de liberação controlada desse fármaco. De fato, estudos realizados com nanopartículas de quitosana mostram que a complexação do doxorrubicina com quitosana é possível e adequada para o tratamento de tumores cancerígenos (CAMPANA FILHO, 2007).

Outra forma de utilizar a quitosana é a produção de filmes onde a liberação do fármaco acontece por via transdérmica. A liberação ocorre a partir da matriz polimérica de forma contínua, sem atingir níveis tóxicos no organismo e danificar as células da membrana epitelial (MOURA, 2012). A administração por via transdérmica do cloridrato oxprenolololol β -bloqueador a partir de filmes de quitosana em ratos, mostrou um efeito sistêmico, reduzindo a pressão arterial. Portanto, a eficácia farmacológica da droga não é modificada pela forma de liberação, facilitando a administração transdérmica de medicamentos para o efeito sistêmico. A quitosana pode ser utilizada por apresentar uma capacidade de auxiliar a permeação de várias drogas em toda a pele excisadas, através do aumento da permeabilidade do estrato córneo, possivelmente por oclusão. Este novo modelo pode fornecer uma nova direção de investigação do uso da quitosana na obtenção de sistemas de liberação de entrega de drogas administrado por via transdermica (KUMAR, 2004).

Portanto, baseado nos casos de sucesso citados acima, inúmeras substâncias terapêuticas têm sido estudadas para este fim. Dentre elas, a curcumina.

4.4 Curcumina

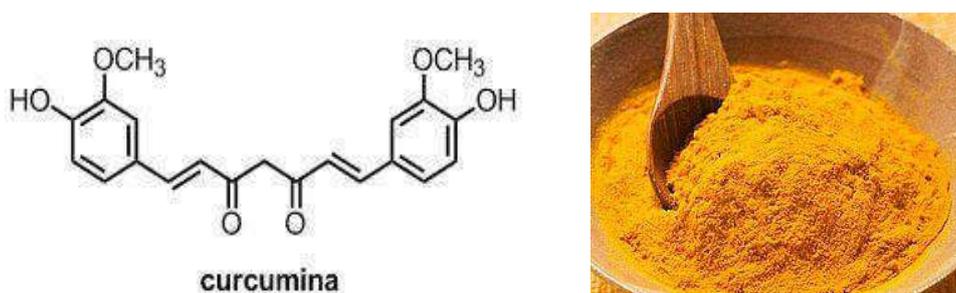
A curcumina tem sido investigada devido à sua capacidade de matar seletivamente células transformadas em quase todos os tipos de tumores, bem como por apresentar características antioxidante, anti-inflamatória, anti-proliferativa, anti-metastática, antiangiogênica, antidiabética, antitrombótica, anti-aterosclerótica, antiartrítica e hepatoprotetora, por uso de anti-séptico e cicatrizante (SRIVASTAVA, 2011, MOHAMMADPOUR, 2012).

Estudos recentes têm mostrado que a curcumina, de forma isolada, como em combinação com outros agentes, tem potentes efeitos anticancerígenos. Estudos *in vivo e in vitro*, demonstraram que a curcumina é capaz de inibir a carcinogênese em três estágios: a promoção do tumor, angiogênese e o crescimento tumoral. Isto foi evidenciado por seus efeitos inibitórios em o crescimento de um número de linhas de células tumorais *in vitro e in vivo*, incluindo melanoma, linfomas, hepáticas, próstata, ovário e pancreático (MAHESHWARI, 2006; DUAN, et al, 2010). Esta substância é excelente para o tratamento de câncer, pois apresenta propriedades pleiotrópicas, as quais permitem atuar no genoma (DNA), RNA mensageiros e enzimas (proteínas) dentro das células. As ações podem ser sequenciais ou simultâneas. Especificamente, ao contrário de outros agentes quimioterapêuticos, a curcumina exibe propriedades pleiotrópicas que inibe o fator nuclear kappaB (NF-kB). O fator nuclear kaapB é sensibilizado e/ou inativado processos de células tumorais (YALLAPU; JAGGI; CHAUHAN, 2012; ZANOTTO FILHO, 2012).

Esta substância (Figura 9), [1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) -1, 6-heptadieno-3, 5-diona], com fórmula química $C_{21}H_{20}O_6$, é um polifenol hidrofóbico que exibe tautomerismo na ligação cetona-enólica, tendo predominância em soluções ácidas e neutras forma cetona e, em meio alcalino forma de enol (ANAND, 2008). A curcumina é derivada dos rizomas de cúrcuma (*Curcuma longa Linn*) e do açafrão, possui baixo peso molecular

(368.37g/mol), ponto de fusão variando entre 170°C – 183°C (VIVEK, 2009; SRIVASTAVA, 2011, PARIZE et al, 2012; BUZANELLO, 2013, CURR PROBL CANCER, 2013).

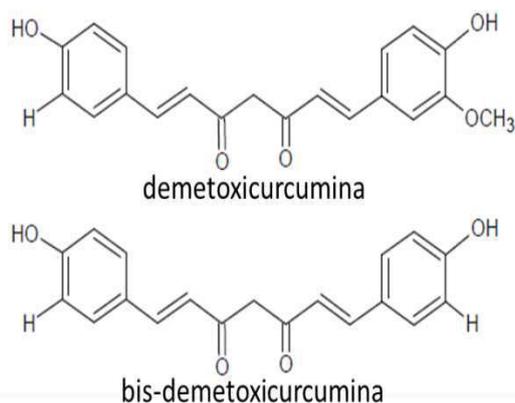
Figura 9: Estrutura química da curcumina longa.



Fonte: SRIVASTAVA, 2011.

Além da curcumina, outros componentes podem ser encontrados nos rizomas da *Curcuma Longa L*, dentre eles destacam-se a demetoxicurcumina e a bis-demetoxicurcumina (Figura 10). Logo a curcumina comercial é uma mistura de curcuminóides, contendo aproximadamente 77% curcumina, 18% demetoxicurcumina, e 5% bis-demetoxicurcumina (PARIZE, 2009; ANAND, 2008, CURR PROBL CANCER, 2013).

Figura 10: Constituintes do corante cúrcuma.

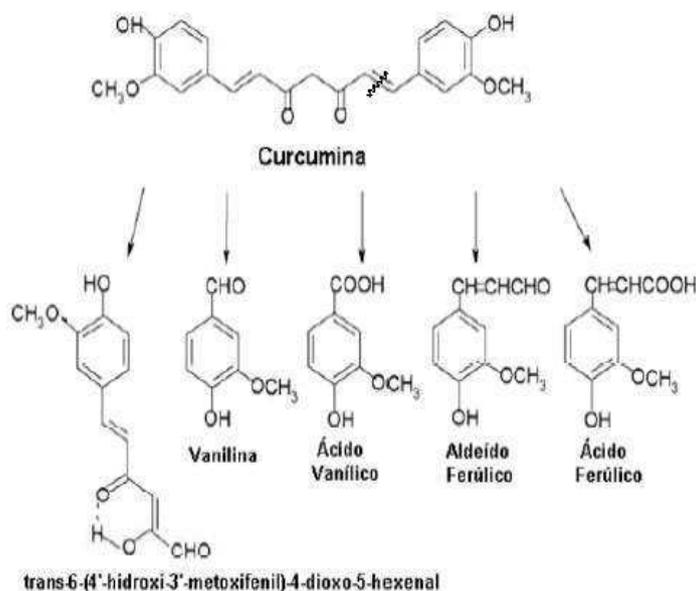


Fonte: AKHTAR; RIZ.M.; KAR, 2012

Esta substância é insolúvel em água e soluções aquosas ácidas. No entanto, tem boa solubilidade em meio básico e em solventes como etanol, acetona, dimetilsulfóxido e clorofórmio. A solubilidade da curcumina pode ser

aumentada através de modificações químicas ou derivatização, tais como complexação ou interação com macromoléculas, surfactantes e a utilização de copolímeros. (PARIZE et al, 2012). Possui estabilidade em pH inferior a 6,5, mas em pH alcalino pode ser degradada. A decomposição depende do pH, com reações mais rápidas de pH neutro e básico. Ela também pode ser degradada por hidrólise ácida, oxidação e fotodegradação (BUZANELLO, 2013). Logo, vários estudos relatam o efeito da exposição à luz e das condições alcalinas na degradação do corante. A Figura 10 ilustra os principais componentes resultantes da degradação da curcumina. O primeiro composto (trans-6-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-4-dioxo-5-hexenal), formado na degradação, forma rapidamente os outros compostos citados. Na maioria dos estudos, encontram-se como principais produtos da degradação a vanilina, o ácido ferúlico, o aldeído ferúlico e o ácido vanílico. Desta forma, torna-se viável estudar métodos alternativos que viabilizem e tornem possível aumentar a solubilidade, a estabilidade e biodisponibilidade da curcumina e que possam ser aplicados em preparações farmacêuticas (PARIZE, 2009).

Figura 11: Principais produtos gerados a partir da degradação da Curcumina.



Fonte: PARIZE, 2009.

Diversos estudos têm demonstrado que a curcumina apresenta baixa absorção, com elevada taxa de metabolismo e eliminação, resultando em baixa biodisponibilidade quando administrado por via oral. Entretanto, têm-se

estudados alternativas para melhorar a biodisponibilidade utilizando outras substâncias terapêuticas, como por exemplo, a piperina, ou proteger a curcumina da degradação e do metabolismo, até atingir o tumor. Vários tipos de nanopartículas tais como polímero, micelas poliméricas, lipossomas / fosfolípido, nano/microemulsões, nanogéis, entre outros (YALLAPU; JAGGI; CHAUHAN, 2012).

Pesquisas realizadas por ODOT e colaboradores (2004), avaliaram *in vitro* a ação citotóxica da curcumina sob o melanoma B16-R. Os resultados obtidos indicam uma inibição substancial do crescimento de melanoma B16 –R.

A curcumina mostra uma elevada atividade citotóxica *in vitro* e são candidatos potenciais para o tratamento de melanoma. Michel e colaboradores (2012), utilizando-se da baixa solubilidade da curcumina, desenvolveram um agente de entrega (surfactante catiônica gemini conjugada com β -ciclodextrina) incorporado com curcumina para avaliar a eficiência de entrega da droga, o efeito citotóxico nas células de melanoma e comparando este efeito com o melfalan, é atualmente usado no tratamento deste câncer. As formulações usadas foram eficientes na inibição do crescimento de células de melanoma, apresentando resultados melhores que o melfalan.

Outro estudo realizado por Wadajkar e colaboradores (2012) utilizou o poli (N- isopropilacrilamida -acrilamida - alilamina) e um núcleo de poli (ácido láctico-co - glicólico (PLGA) carregado com curcumina, incorporado com nanopartículas de magnetita para atingir as células cancerosas de melanoma, foram realizados teste *in vitro* e *in vivo*. Os resultados obtidos não apresentaram citotoxicidade para os fibroblastos dérmicos humanos. Além disso, apresentou uma liberação sustentada da curcumina a partir do núcleo de PLGA. As nanopartículas foram acumuladas no local do tumor de melanoma B16F10 no grupo de ratos estudados. Os resultados indicam um grande potencial para tratar e monitorar melanoma.

4.5 Quitosana/Curcumina

Devido à baixa disponibilidade e estabilidade da curcumina, vêm-se pesquisando sobre as propriedades da quitosana em busca de melhorar as deficiências do fármaco. Portanto, estudos apresentaram que nanopartículas

de quitosana/curcumina não degradam rapidamente e apresentam uma melhor absorção quando comparadas com a curcumina livre (AKHTA; RIZ & KAR, 2012). Logo, a interação entre a quitosana/curcumina se dá através de forças eletrostáticas, a partir das quais o grupo hidroxiloglicosamina da quitosana pode atrair o grupo neutro ceto-enol da curcumina podendo haver formação de ligações intermolecular de pontes de hidrogênio (BORUAH, SAIKIA & DUTTA, 2012). Segundo Akhta e colaboradores (2012) esta interação depende da faixa de pH. Logo, a maior interação entre a quitosana/curcumina ocorre em pH 4.0.

Estudos realizados por Boruah e colaboradores (2012) avaliaram a extensão da ligação da curcumina com a quitosana na ausência e na presença de surfactantes catiônico e não iônico, acompanhando as mudanças na absorção e fluorescência da curcumina em pH fisiológico com diferentes concentrações de quitosana. Os resultados obtidos indicam claramente que a curcumina interage fortemente com quitosana em pH fisiológico e esta interação aumenta com a presença dos surfactantes, e que a quitosana apresenta capacidade de suprimir a degradação hidrolítica da curcumina. Por fim, os estudos termodinâmicos revelam que o processo de ligação é acionada por entalpia e entropia indicando tanto, a formação da ligação eletrostática curcumina e quitosana.

A quitosana, além de melhorar a estabilidade e a biodisponibilidade da curcumina, também pode ser utilizada para desenvolver sistemas de liberação controlada para o tratamento de câncer. Conforme estudos realizados por Rejinolde e colaboradores (2011), utilizando nanoestruturas de curcumina termosensíveis, altamente estáveis com quitosana-g-PNVCL e estabilizantes químicos, os quais avaliaram a toxicidade *in vitro*, e a viabilidade de células normais e de câncer de mama humano (MCF7), observaram que a curcumina modificada quimicamente com o tripolifosfato de sódio pode ser mais benéfica para o tratamento do câncer.

Outro estudo realizado por Duan e colaboradores (2010), utilizaram nanopartículas de poli (butil) cianoacrilato revestidas com quitosana e encapsulado com curcumina com o intuito de investigar a atividade antitumoral das nanopartículas *in vitro* e *in vivo* em células de câncer hepatocelular humano. Os resultados do teste *in vitro* indicaram que as nanopartículas

apresentaram uma ação terapêutica eficaz e no teste *in vivo* a presença das nanopartículas inibiu o crescimento do tumor. Desta forma, há potencialidade para o tratamento deste tipo de câncer.

Pesquisas mostram que derivados de quitosana também podem ser utilizados como carreadores da curcumina como, por exemplo, o-carboximetilquitosano. Estudos de citotoxicidade por MTT indicaram que curcumina -O- CMC Nps apresentou toxicidade para o câncer e não tóxico para as células normais e a liberação do fármaco *in vitro* foi eficaz, logo apresenta potencial para a liberação controlada de drogas (ANITHA, 2011).

No estado da arte atual, não foram encontradas pesquisas que apresentem perspectivas de se obter um material que possa promover a liberação da curcumina em membranas de quitosana para tratamento de melanoma.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Local da Pesquisa

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste – CERTBIO, localizado na Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais, na Universidade Federal de Campina Grande/ UFCG na Avenida Aprígio Veloso, 882, Bairro Universitário, Campina Grande - PB.

5.2 Reagentes e Materiais

- Quitosana, médio peso molecular com grau de desacetilação 75 – 85%, Sigma Aldrich
- Ácido Acético, Sigma Aldrich
- Curcumina Longa, Sigma Aldrich
- Etanol, VETC

5.3 Procedimentos experimentais

5.3.1 Preparação das membranas de quitosana

As membranas de quitosana foram preparadas através da técnica de evaporação de solvente mediante a diluição do polímero em pó, em uma solução aquosa de ácido acético (1% v/v) sob temperatura ambiente e agitação mecânica, obtendo uma solução de quitosana a 2 % m/v. A partir da solução obtida foram vertidas 20mL em cada placa petri de dimensões (60x15 mm) e posteriormente colocadas sob circulação de ar por um período de, aproximadamente, 24 horas para secagem e, em seguida o material passou para a caracterização.

Figura 12: Etapas de obtenção da membrana de quitosana.

Fonte: Própria

5.3.2 Preparação das membranas de quitosana/curcumina

Após a diluição do pó da quitosana em uma solução aquosa de ácido acético sob temperatura ambiente e agitação mecânica foi preparada a dissolução da curcumina em etanol (1,2mg/ml). Após a dissolução total da droga foi vertida na solução de quitosana sob agitação mecânica constante por 30 minutos. A partir da solução obtida foram vertidas 20mL em cada placa petri de dimensões (60x15 mm) e posteriormente colocadas sob circulação de ar por um período de, aproximadamente, 24 horas para secagem e, em seguida o material passou para a caracterização.

Figura 13: Etapa de obtenção da membrana de quitosana/curcumina .

Fonte: Própria

5.4 Caracterizações das membranas

Os ensaios para caracterização das membranas de quitosana e quitosana/curcumina foram realizados no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste- CERTBIO localizado na Universidade Federal de Campina Grande-UFCG.

5.4.1 Caracterização Parcial

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

A caracterização por FTIR foi usada para identificar os grupos funcionais presentes no fármaco, na membrana de quitosana, e na membrana de quitosana/curcumina, através das vibrações características dos grupos presentes em cada material, que correspondem aos níveis de energia da molécula. E avaliar as possíveis interações entre a quitosana e o fármaco. Utilizou-se um espectrofotômetro Spectrum 400, FT-IR/ FT-NIR Spectrometer Perkin Elmer (CERTBIO/UFCG, com resolução de 4 cm^{-1} e 20 varreduras, e com varredura de $4000\text{ a }650\text{ cm}^{-1}$, sem a necessidade de preparação de pastilhas de KBr, por via da utilização do dispositivo ATR (attenuated total reflectance)

5.4.1.1.2 Difração de Raios X - (DRX)

A caracterização por Difração de Raios X foi realizada a fim de observar o perfil cristalino da membrana de quitosana, fármaco e da membrana de quitosana/curcumina para observar se haveria interferências nesse perfil com a incorporação da droga. As amostras foram submetidas à análise por difração de raios X (DRX) em um difratômetro SHIMADZU modelo XRD 7000 (CERTBIO/UFCG) com varredura angular $5^\circ < 2\theta < 80^\circ$, na montagem de Bragg-Brentano, sistema θ - 2θ , utilizando-se radiação de Cu ($\lambda = 1,54$) com varredura no passo de $0,02$ (2θ), com intervalo de $0,5$ segundo para cada amostra.

5.4.1.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

A Microscopia Eletrônica de Varredura foi utilizada para estudar a microestrutura e morfologia dos materiais sólidos. Esta técnica foi usada para conhecer o tamanho e a forma da partícula do fármaco estudado e para observar se nas membranas existe presença de micro-macroporos, como o fármaco está distribuído na membrana, topografia e tamanho de partículas.

Para realizar o ensaio da seção transversal das membranas inicialmente passaram pela etapa de congelamento em nitrogênio líquido e posteriormente realizou-se a fratura das mesmas, em seguida foram feitas a análise.

As membranas foram caracterizadas morfologicamente por Microscopia Eletrônica de Varredura, utilizando um microscópio eletrônico de bancada, modelo TM 1000 HITACHI (CERTBIO/UFCG).

5.4.1.1.4 Termogravimetria (TG)

O ensaio de TG foi realizado para observar a perda de massa dentro de uma faixa de temperatura. As curvas termogravimétricas (TG) das membranas e do pó da curcumina foram obtidas em um módulo termogravimétrico TG modelo Q600 (TA - *Instruments*), com uma faixa de temperatura de 10 a 800 °C, com uma razão de aquecimento de 10 °C/min, em atmosfera de nitrogênio, com fluxo de 20 mL/min. Foi utilizada massa de $5,00 \pm 0,05$ mg acondicionada em cadinho de alumina para cada amostra. A calibração do SDT TG/DTA Q600 foi realizada com padrão de oxalato de cálcio. As curvas TG foram analisadas pelo programa TA Instruments Universal Analysis 2000, versão 4.7A, da TA Instruments, a fim de caracterizar as transições de fase, etapas de decomposição e perda de massa das mesmas.

5.4.1.1.5 Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foi realizada a fim de observar as transições de fase, avaliar se existem mudanças nas propriedades da membrana de quitosana e se há interações químicas entre a quitosana e a curcumina. As análises por DSC das membranas e do pó da curcumina, foram realizadas em um equipamento DSC PerkinElmer modelo

8500, com uma faixa de temperatura de 0 a 300 °C, com razão de aquecimento de 10 °C/min, em atmosfera de nitrogênio, com fluxo de 20 mL/min. Foi utilizado massa de $3,00 \pm 0,05$ mg acondicionada em cadinho de alumina para cada amostra. As curvas DSC foram analisadas com o software Pyris R10 Data Analysis

5.4.1.1.6. Grau de Intumescimento (GI)

As propriedades de intumescimento das membranas foram investigadas baseada na norma ASTM D1056-07. As membranas secas (M_0) foram cortadas em pequenos pedaços de 1,0 cm x 1,0 cm, precisamente pesado e submersos em solução de PBS (pH 7,4) durante diferentes períodos de tempo à temperatura ambiente até que o equilíbrio foi atingido. A cada intervalo de imersão, as amostras intumescidas foram removidas solução de PBS, retirado o excesso de líquido presente na membrana sobre a superfície do filtro com papel de seda e imediatamente pesados. O peso molhado das membranas (M_w) foi determinada utilizando uma balança analítica. O Grau de Intumescimento das membranas é expresso em termos de porcentagem e foi calculadas pela seguinte fórmula:

Equação 1: Grau de intumescimento

$$GI = \frac{M_w - M_0}{M_0} \times 100 (\%)$$

Essa metodologia foi repetida para a solução de PBS com o pH 4,6 e 5,8 ajustadas com ácido clorídrico tendo em vista que o pH da pele é levemente ácido com variação de pH 4,6 - 5,8 que contribui para que ocorra proteção bactericida e fungicida em sua superfície (LEONARDI, GASPAR & CAMPOS, 2002).

5.3.2.4 Biodegradação enzimática

O ensaio de biodegradação foi realizado para observar a degradação das membranas e para avaliar se a presença do fármaco influenciou na degradação das membranas.

Para realizar este ensaio usou-se como base a normas ASTM F1635-11 Standard test Method for *in vitro* Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants (2011).

As membranas foram cortadas na dimensão de 1,0 cm x 1,0cm, pesadas em balança analítica e esterilizadas com álcool a 70%. As amostras foram divididas em dois grupos para avaliação da biodegradação. O primeiro grupo contendo uma solução de Phosphate Buffered Saline – PBS com concentração de 1mg/mL como controle, o segundo grupo com a solução de PBS/ Lisozima.

Foram utilizadas três amostras para cada tipo de membrana, tanto para a solução de PBS e PBS/Lisozima com um total de 72 amostras. As membranas foram incubadas em estufa microbiológica, à temperatura de 37 °C, sendo retiradas da estufa após 7 dias, 14 dias, 21 dias e 28 dias, seguindo um procedimento de lavagem em água destilada, secagem por 24 horas em estufa a 50 °C e pesadas em balança analítica. Os resultados da biodegradação foram obtidos a partir da razão entre peso final (Mf) pelo peso inicial (Mi), como apresentando na Equação 2. O ensaio foi realizado em triplicata.

Equação 2: Massa residual

$$MR = \frac{Mf}{Mi}$$

5.3.2.5 Citotoxicidade

Em virtude de problemas técnicos não foi possível usar células de melanoma, contudo para efeito comparativo e avaliação do sistema desenvolvido utilizou-se a linhagem de células cancerígena MCF-7 (câncer de mama) pois segundo a literatura a curcumina também apresenta potencial para o tratamento de câncer de mama (célula MCF-7) ((MAHESHWARI, 2006; DUAN, et al, 2010, ANITHA, 2011) e seria de grande importância identificar como o sistema desenvolvido responderia a presença das células cancerígenas .

A citotoxicidade das membranas de quitosana e quitosana curcumina 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* (PERROT et al., 2003; SANTOS, 2009).

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 do sistema quitosana/curcumina, foi utilizado o método direto de contato entre o substrato do material e as células. A linha celular cancerígena MCF-7 foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro

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 (0,5 mg/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

5.3.2.6 Desenvolvimento e Validação do método analítico para quantificação da curcumina

A validação foi realizada conforme a RE N° 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), com o objetivo de demonstrar que o método é apropriado para a determinação quantitativa do

fármaco e assegurar a confiabilidade dos resultados (Brasil, 2003). Para definir as condições ideais para análise inicialmente definiu-se o comprimento de onda de detecção, seguido para validação do método.

5.3.2.6.1 Determinação do comprimento de onda de detecção

Os materiais utilizados foram a curcumina (Sigma Aldrich) e a quitosana (Sigma Aldrich) como padrão de trabalho. Como solventes foram empregados a acetonitrila grau HPLC (JT Backer, lote: 124821), metanol P.A. (NEON, lote: 15079) e água purificada deionizada por osmose reversa.

Foram preparadas soluções padrão de curcumina e quitosana. Para a solução de curcumina obteve uma concentração de 1mg/mL em metanol. Já para a solução de quitosana em ácido acético a 2%. As soluções-trabalho foram preparadas a partir da solução padrão, diluídas na fase móvel acetonitrila: água (80:20, v/v) até a obtenção de uma concentração de 150 µg/mL. Todas as amostras foram filtradas.

Utilizou-se cromatógrafo líquido de ultra eficiência Shimadzu (CLUE) equipado com duas bombas modelo LC-20AD, injetor automático SIL-20-A_{HT}, forno para coluna CTO-20A, detector com comprimento de onda variável UV/Vis modelo SPD-20A, controlador CBM-20A, integrador automático computadorizado com software LC Solution[®]. A fase estacionária foi composta por uma coluna C18 SHIM-PACK XR-ODS (*d.i.* 3,0mm X 50mm, 2,2 µm). A fase móvel que forneceu melhor seletividade ao método foi constituída de uma mistura isocrática de acetonitrila: água (80:20, v/v). As análises foram realizadas em temperatura controlada (30°C), utilizando um fluxo de 0,2mL/min e volume de injeção de 10µL. Todas as amostras foram filtradas com filtros de seringa 0,45µm de diâmetro.

5.3.2.6.2 Validação do método analítico

Na RE N^o 899/2003, a ANVISA determina os testes a serem realizados para a validação de um método analítico de acordo com categorias de análise I e III (BRASIL, 2003). Portanto, foram realizados os seguintes experimentos para validação do método: seletividade (especificidade), linearidade, exatidão,

precisão (repetibilidade e intermediária), robustez, limite de detecção e limite de quantificação.

Seletividade e especificidade

A seletividade do método foi avaliada pela comparação das bandas máximas de absorção obtidas da análise de uma amostra da quitosana sem o fármaco, comparadas com as bandas do sistema contendo o fármaco.

Linearidade

Partindo da solução estoque de curcumina em metanol (1 mg/mL), foram realizadas diluições em fase móvel (acetonitrila:água (80:20, v/v) para obtenção das seguintes concentrações: 5, 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL. A curva de calibração foi obtida por análise de regressão linear interpolando a concentração nominal do padrão com a área do pico cromatográfico obtida utilizando o software LC Solution®. As curvas foram obtidas em triplicata (n=3). Os dados obtidos foram tratados estatisticamente para determinação da equação da reta (método dos mínimos quadrados) e dos coeficientes de correlação (r) e de determinação (r²).

Exatidão

A exatidão do método foi determinada por intermédio de análises em três diferentes níveis de concentração (20, 30, 40 µg/mL), em três repetições e expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente. A exatidão foi expressa conforme a equação 3 abaixo:

Equação 3: Exatidão. Resolução 899/2003.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

Precisão

A precisão foi determinada por análises em cinco repetições na concentração do ponto médio da curva (30 µg/mL). A precisão do método foi avaliada em dois níveis: repetibilidade (precisão intra-corrida) e precisão intermediária (precisão inter-corridas), sendo expressas como coeficientes de variação (CV%).

Robustez

Neste parâmetro foram realizadas a análise de 3 repetições da solução de curcumina em metanol(30 µg/mL) alterando três condições: temperatura (30 ± 2 °C), fluxo (0,2mL/min ± 10%) e fase móvel (acetonitrila/água – 80:20 ±2).

Limite de detecção

O limite de detecção (LD) foi 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 3,0 (Equação 4):

Equação 4: Limite de detecção. Resolução 899/2003

$$LD = 3x \frac{DP}{IC}$$

Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) foi calculado da mesma forma que o limite de detecção, porém, multiplicando-se os valores por 10,0 (Equação 5):

Equação 5: Limite de quantificação. Resolução 899/2003.

$$LQ = 10x \frac{DP}{IC}$$

5.3.2.6.3 Determinação do teor de curcumina nas membranas

A recuperação foi determinada avaliando-se a quantidade de curcumina associada às membranas de quitosana/curcumina (0,03g de curcumina por membrana). As membranas foram particuladas e imersas em metanol em um sistema hermeticamente isolado, sob agitação magnética a 250 RPM a temperatura ambiente. Após determinados intervalos de tempo foram retiradas alíquotas de 2 ml do sistema e quantificado por CLUE. Após cada extração das alíquotas foi realizada a reposição de 2 mL de metanol. O teor de curcumina foi calculado de acordo com a fórmula abaixo:

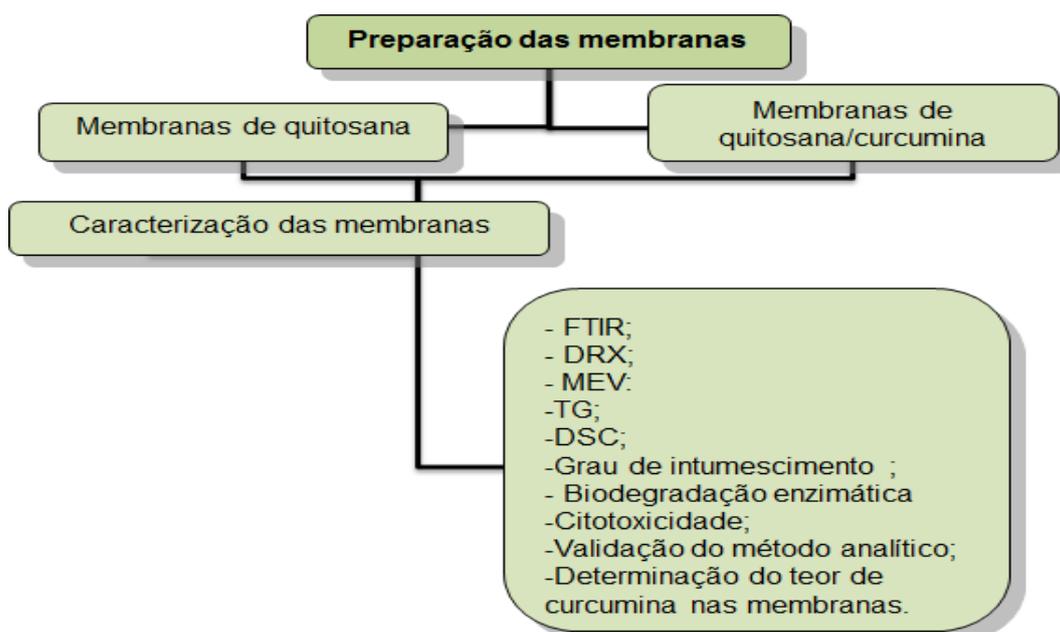
Equação 6: Determinação do teor de curcumina.

$$R\% = \frac{Valor_{quantificado}}{Valor_{total}} \times 100$$

onde: R% representa a porcentagem de curcumina retido nas membranas de quitosana, $Valor_{total}$ representa a massa de curcumina adicionada inicialmente para se obter nas membranas e $Valor_{quantificado}$ representa o valor analisado através do CLUE.

A seguir apresenta-se o fluxograma da metodologia desenvolvida.

Fluxograma 1: Etapas do desenvolvimento e caracterização das membranas de quitosana e quitosana/curcumina.

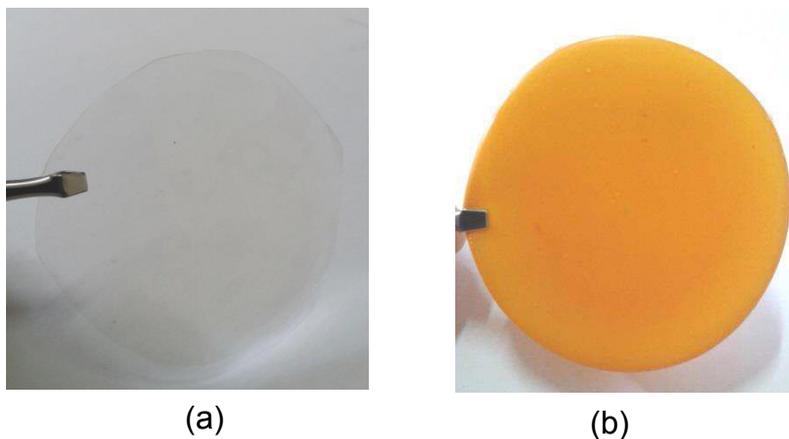


6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As membranas de quitosana e quitosana/curcumina obtidas estão apresentadas na Figura 14. Ao analisar visualmente a membrana de quitosana (Figura 14 (a)) nota-se um filme transparente, com brilho e com ausência de partículas insolúveis. Também foi avaliada a espessura das membranas coletadas no centro e nas bordas, em 5 regiões diferentes. A média das medidas obtidas referentes às espessuras da membrana de quitosana localizada no centro foram 0,164mm e na borda 0,136mm.

Ao observar a membrana de quitosana/curcumina (Figura 14 (b)) nota-se uma membrana de cor laranja, opaca e com ausência aparente de partículas aglomeradas, essa cor laranja é atribuída ao pó da curcumina como apresentando na Figura 9. Para membranas de quitosana/curcumina também foram coletadas as medidas de espessuras da mesma forma que foram realizadas para as membranas de quitosana, obtendo-se uma média de espessura no centro de 0,163mm e na borda de 0,134mm. Portanto a presença do fármaco não influenciou na espessura das membranas obtidas.

Figura 14: Membrana de quitosana (a); membrana de quitosana/curcumina (b)

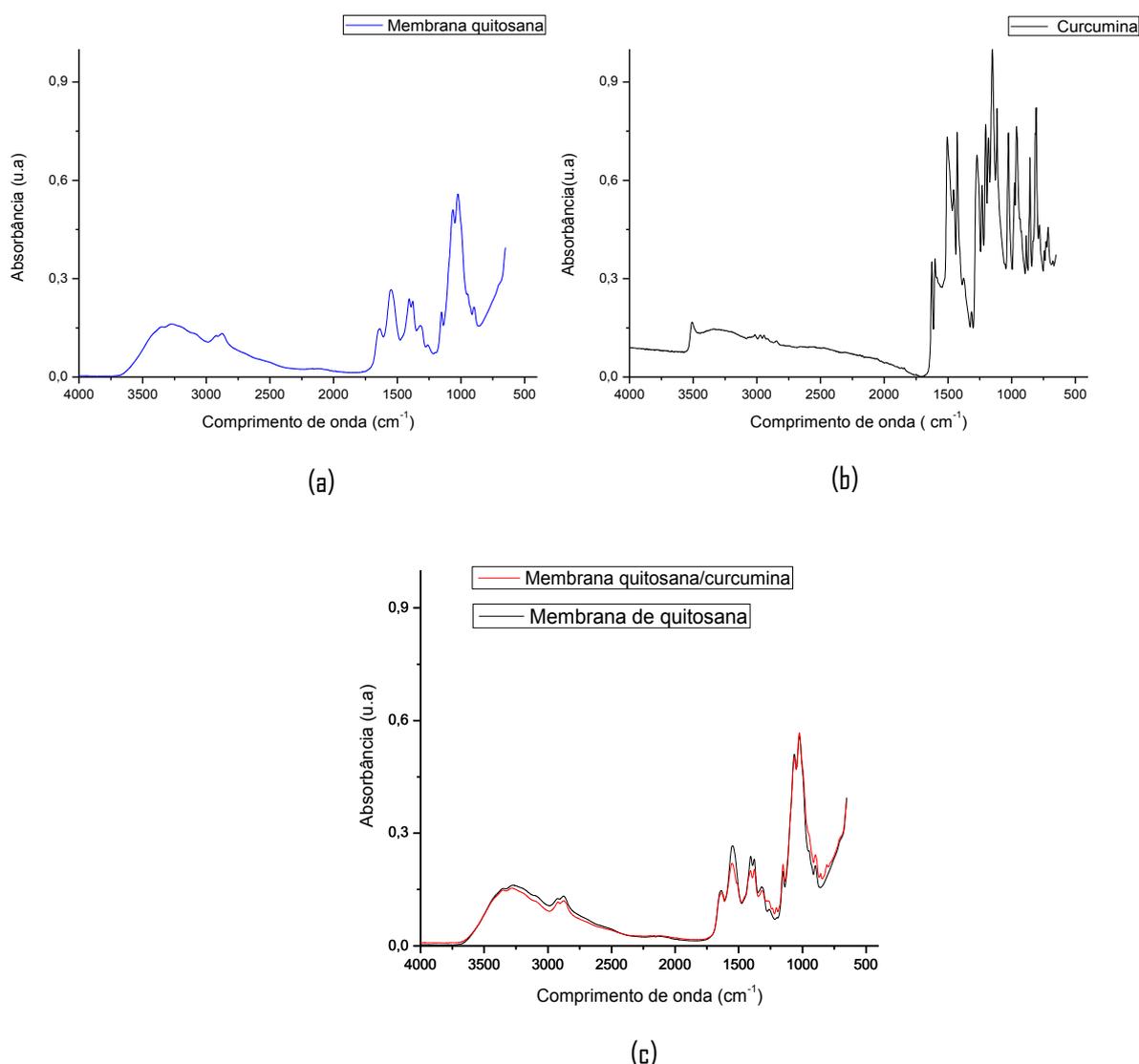


A seguir serão apresentadas as caracterizações das membranas de quitosana, o pó da curcumina e as membranas de quitosana/curcumina pelas técnicas de FTIR, DRX, MEV TG/DTG, DSC, intumescimento, biodegradação, citotoxicidade, validação do método analítico para quantificação da curcumina e determinação do teor de curcumina.

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

A Figura 15 ilustra o espectro de FTIR da membrana de quitosana, do pó da curcumina e da membrana quitosana/curcumina.

Figura 15: Espectros de FTIR:(a) Membrana de quitosana;(b)curcumina e (c) quitosana/curcumina.



Observa-se na Figura 15 (a) os espectros obtidos para as membranas de quitosana, com absorção típicas da quitosana, que estão localizada na região entre 3665 a 3000 cm^{-1} e são atribuídas as vibrações de estiramento dos grupos OH e NH. Na região de 3264 a 2918 cm^{-1} há uma sobreposição no estiramento dos grupos funcionais OH e NH_2 , devido à formação de pontes de hidrogênio. A banda localizada na região de 1646 cm^{-1} é atribuída a absorção

do C=O, relativas ao alongamento dos grupos carbonilas (-NHCOCH₃). Em 1557 cm⁻¹ corresponde ao grupo amina (NH₂), e a presença dessas duas bandas comprova que a quitosana não é completamente desacetilada. A banda na região entre 1557cm⁻¹ indica a presença do íon carboxilato já que o método de obtenção da membrana de quitosana foi através de uma solução de ácido acético e como não houve uma neutralização, formou-se o acetato de quitosana. Em 1405 cm⁻¹ é atribuída à vibração da deformação N-H do grupo amina (N-H). A banda em 1068 cm⁻¹ é referente ao álcool primário e por fim as bandas nas regiões de 1152,1022 e 901 cm⁻¹ são atribuídas ao alongamento C-O-C (BEPPU, M. M. ; ARRUDA E. J.; SANTANA, 1999; MARTIZES et al, 2010, RACHIPUDI, et al, 2013)

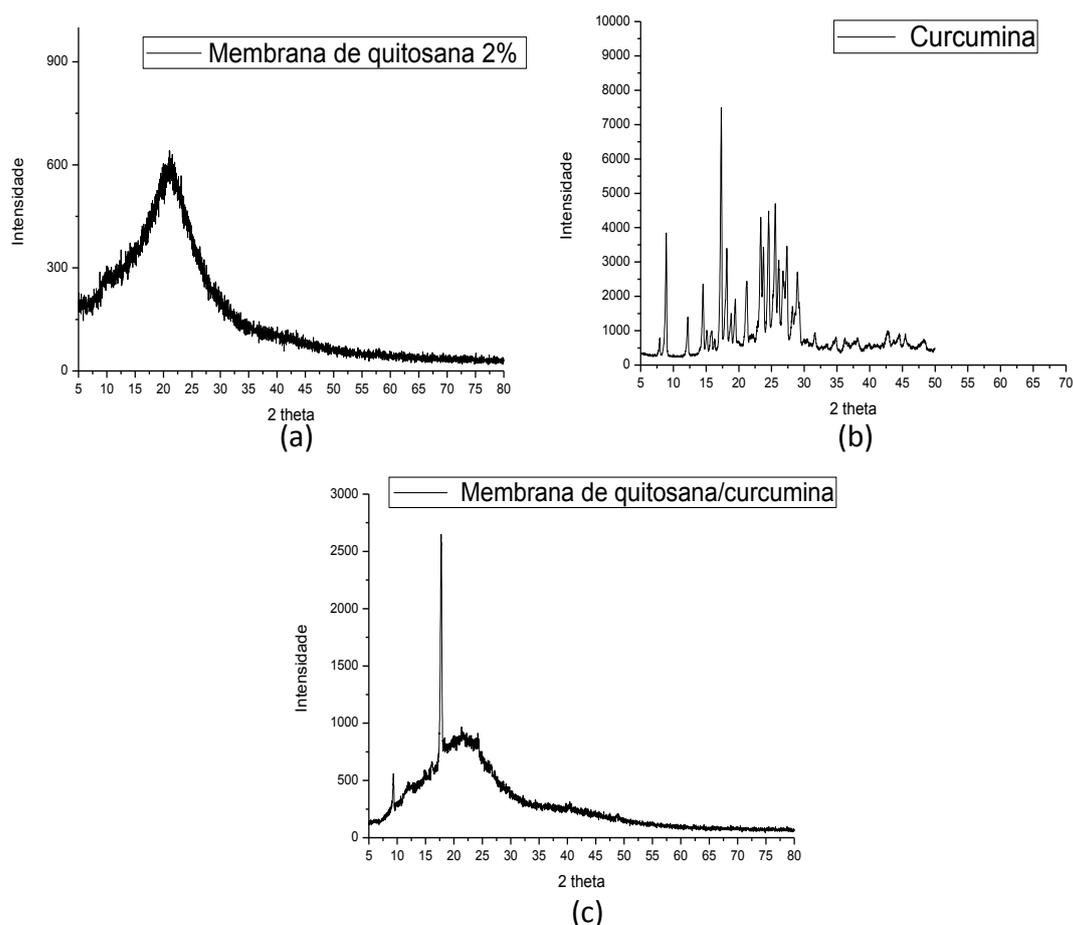
Os espectros de FTIR (Figura 15 (b)) obtidos para o pó de curcumina apresentam as bandas na região de 3500 cm⁻¹ correspondente à vibração de estiramento O-H do grupo fenol. Em 1603 cm⁻¹, a banda é atribuída à vibração de estiramento do anel benzeno. A banda em 1510 cm⁻¹ corresponde aos estiramentos C=O da cetona. A banda localizada em 1416 cm⁻¹ é referente à vibração de flexão C-H do CH₂. Para a banda localizada na região de 1277cm⁻¹ refere-se à banda C-O com o estiramento do anel benzeno. As regiões entre 1022/864 cm⁻¹ correspondem à banda de estiramento de C-O-C. Em 807 e 705 cm⁻¹ correspondem ao estiramento da banda C=C-H do grupo aromático (YADAV V. R; SURESH S.; DEVI K; YADAV 2009. ANITHA et al (a), 2011; NAAMA, ALI A & AL-TEMIMI, AL-AMIER, 2010; DAS, KASOJU & BORA, 2010; LI, Y.; et al (b), 2010; RATANAJAJAROEN., et al, 2012).

Já para os resultados das análises de FTIR para as membranas de quitosana/curcumina (Figura 15 (c)) foi possível observar uma pequena redução de intensidade nas bandas das regiões 3264 a 2918, 1557 e 1377 cm⁻¹. Estas reduções podem ser atribuídas a uma possível interação entre os grupos amina da quitosana e os grupos cetona da curcumina (BORUAH. SAIKIA e DUTTA, 2012). Entretanto, alguns autores diferem no que diz respeito às interações entre a quitosana e curcumina. Anitha et al.(b) (2011), sugeriu que a interação ocorre com os grupos OH da curcumina e Ratanajajaroen, et al, (2012), sugeriu que acontece com os grupos cetona da curcumina.

6.2 Difração de Raios X- DRX

A Figura 16 apresenta os difratogramas da membrana de quitosana, do pó da curcumina e da membrana quitosana/curcumina.

Figura 16: Difratogramas: (a) membrana de quitosana; (b) pó da curcumina e (c) membrana quitosana/curcumina.



De acordo com estudos realizados por Fideles, (2010) e Holanda (2011), as membranas de quitosana apresentam um perfil semicristalino com bandas de base largas em $2\theta = 10^\circ$ e 20° . Entretanto, os difratogramas (Figura 15 (a)), obtidos para as membranas de quitosana, apresentam um perfil amorfo, isso pode ser atribuído a presença do íon carboxilato, conforme apresentado no FTIR. A presença destes íons influenciou a organização das cadeias poliméricas causando uma desordem entre elas, e inibindo as fortes interações intra e intermolecular, caracterizado pelas pontes de hidrogênio formadas entre os grupos amina, álcool, amida e outros grupos funcionais presentes na

molécula de quitosana, que são responsáveis pelo o perfil semicristalino da quitosana. (FIDELES, 2010; HOLANDA, 2011).

Para o difratograma da Curcumina (Figura 16 (b)) observa-se pico com base estreita o que indica um perfil cristalino localizados em $2\theta = 8,85^\circ$; $9,02^\circ$; $12,21^\circ$; $14,57^\circ$; $17,27^\circ$; $18,28^\circ$; $21,32^\circ$ e $2\theta = 23,34^\circ$ a $29,07^\circ$ (KAEWNOPPARAT, 2009).

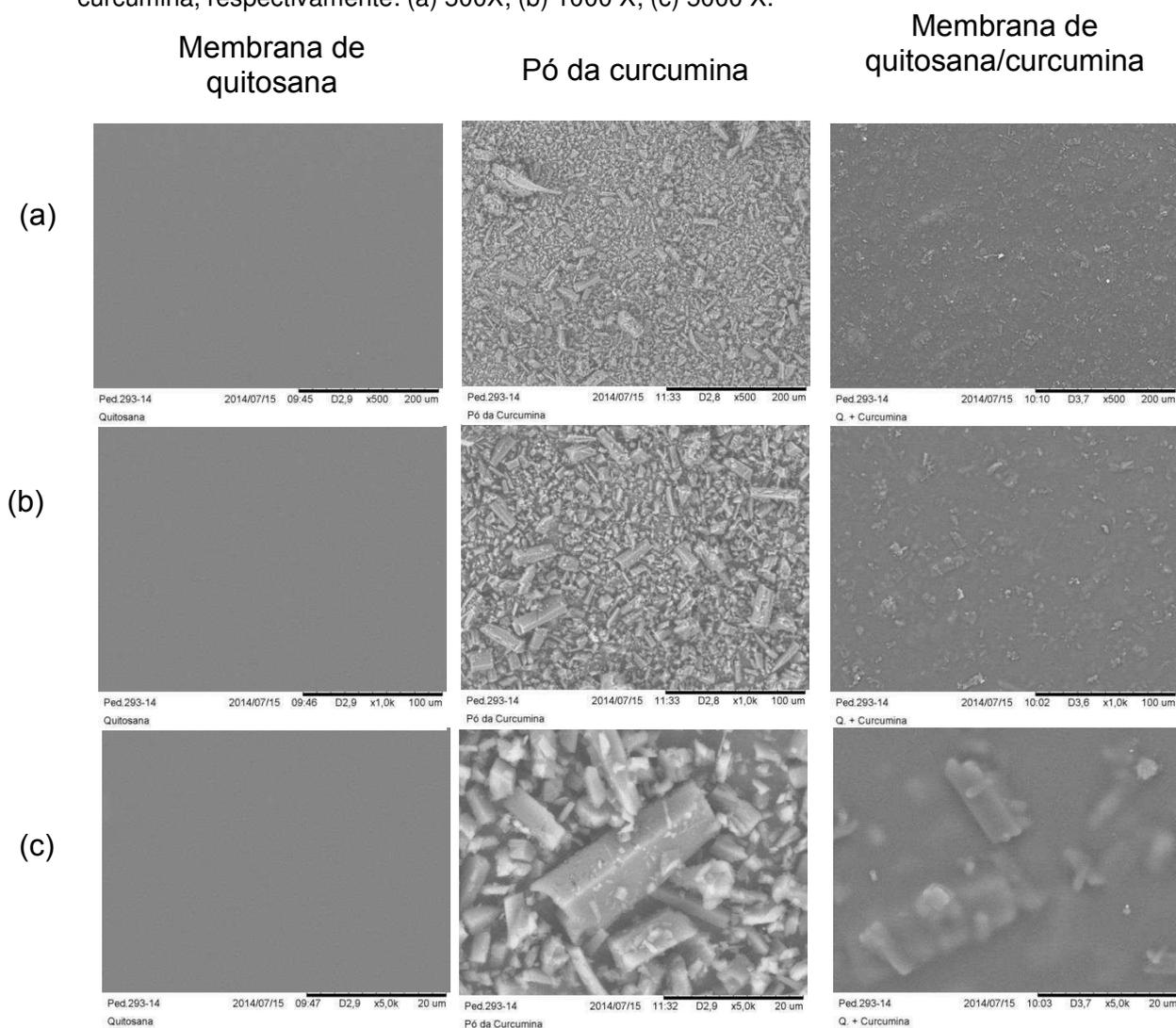
Na Figura 16 (c), está ilustrado o difratograma da membrana de quitosana/curcumina. Observa-se o deslocamento de dois picos com perfil cristalino $2\theta = 9,24^\circ$ e $17,79^\circ$, que podem ser referentes aos picos da curcumina ($2\theta = 9,02^\circ$ e $17,24^\circ$). Também pode observar uma banda de perfil amorfo $2\theta = 20^\circ$ a 30° , que pode ser atribuído a quitosana ($2\theta = 10^\circ$ a 30°) que sobrepôs os picos cristalinos da curcumina apresentando um caráter predominantemente amorfo.

Portanto, a presença de picos cristalinos pode indicar que a curcumina está presente na membrana de quitosana/curcumina(Figura 15 (c)).

6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura- MEV

Observa-se na Figura 17 as micrografias referentes às membranas de quitosana, o pó da curcumina e as membranas quitosana/curcumina.

Figura 17: Micrografias: (a) membrana de quitosana, pó da curcumina, membrana quitosana/curcumina, respectivamente: (a) 500X; (b) 1000 X; (c) 5000 X.



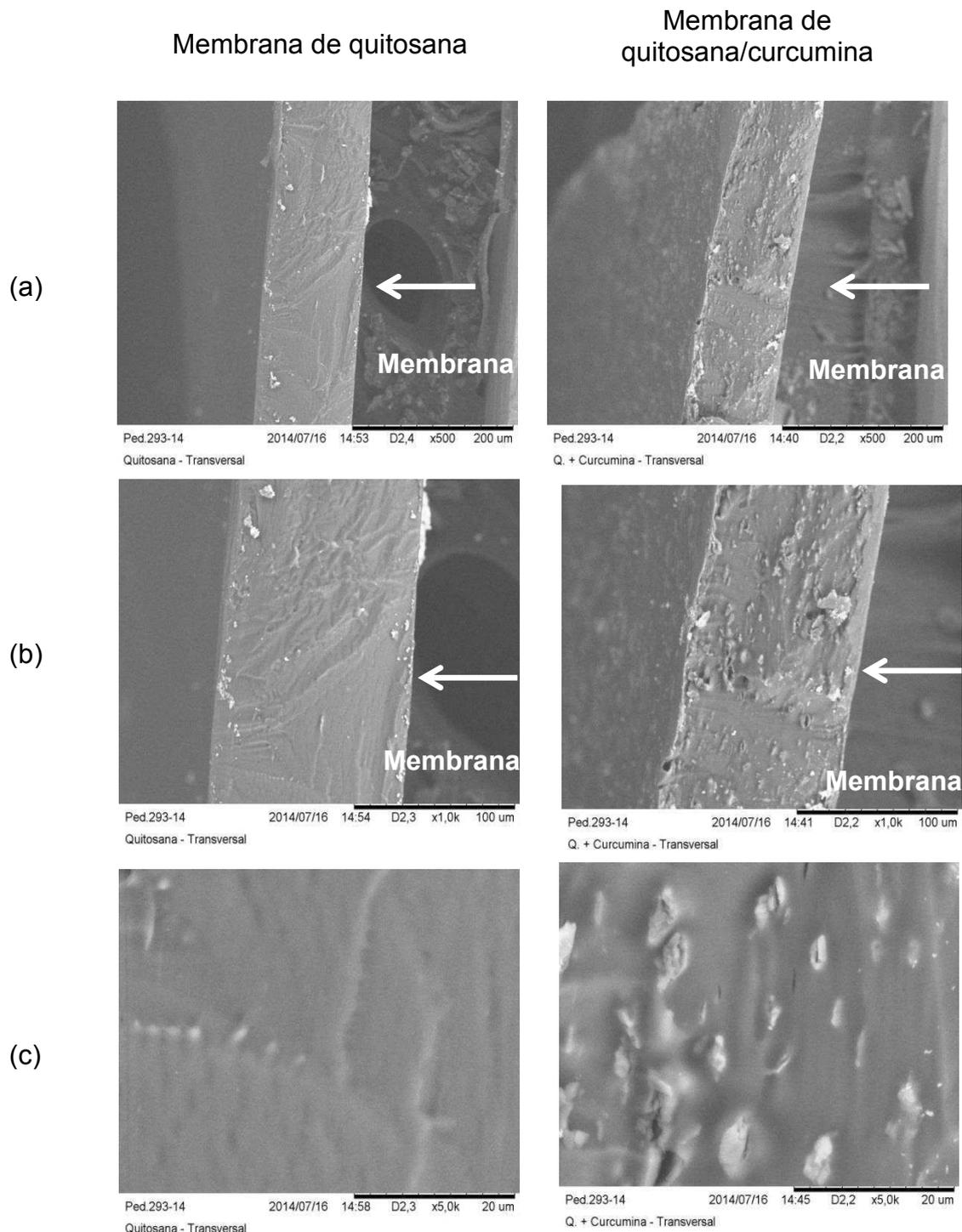
Na Figura 17 tem-se a micrografia da membrana de quitosana apresentando uma superfície lisa e plana, com ausência de poros, caracterizando como um tipo de membrana densa conforme foi obtido por e Beppu e colaboradores (1999) e Fideles (2010).

A micrografia referente ao pó da curcumina mostra partículas típicas da curcumina como apresentado por Arun, Shweta e Upendra (2012) com tamanhos de partículas entre 5 a 30 μ m.

Para as micrografias da membrana quitosana/curcumina pode-se observar uma membrana plana, densa e rugosa, com partículas dispersas ao longo da membrana, apresentando tamanhos que variam entre 2 a 10 μ m.

Observa-se na Figura 18 as micrografias referentes ao corte transversal das membranas de quitosana e quitosana/curcumina.

Figura 18: Micrografias do corte transversal das membranas de quitosana e quitosana/curcumina. (a) 500 X; (b) 1000 X; (c) 5000 X, respectivamente.



Na Figura 18 tem-se a micrografia do corte transversal da membrana de quitosana apresentando uma superfície plana, rugosa e com pequenas partículas soltas que podem ser atribuídas ao corte. Também se observa a

ausência de poros no interior da membrana, confirmando que a membrana obtida é caracterizada com densa.

Para as micrografias do corte transversal da membrana de quitosana/curcumina pode-se observar uma membrana plana, densa e rugosa, com partículas dispersas no interior da membrana, apresentando tamanhos que variam entre 2 a 5 μm .

A morfologia apresentada para as membranas de quitosana/curcumina tanto para superficial e transversal, indica que o método de incorporação da curcumina utilizado foi adequado já que as partículas estão distribuídas de forma homogênea e não há separação da interface entre a matriz polimérica e as partículas do fármaco.

6.4 Termogravimetria (TG)

A Figura 19 ilustra as curvas termogravimétricas das membranas de quitosana, o pó da curcumina e a membrana quitosana/curcumina. Para melhor visualização dos eventos térmicos, os resultados de TG foram analisados também através do cálculo da derivada (DTG).

Figura 19. Curvas TG/DTG para membrana de quitosana, pó da curcumina e membrana de quitosana/curcumina

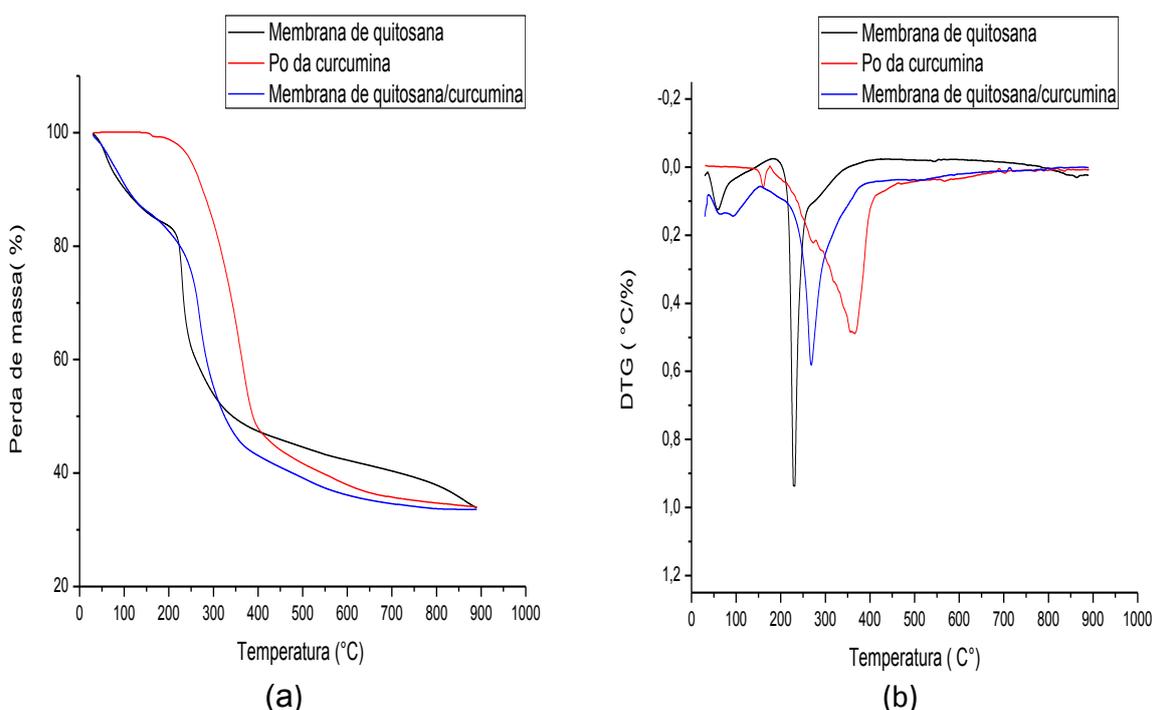


Tabela 3: Eventos térmicos para membrana de quitosana, pó da curcumina e membrana de quitosana/curcumina.

	Temperatura (°C)		Perda de massa (%)	
	I Evento	II Evento	I Evento	II Evento
Membrana de quitosana	T _{i1} = 36,43	T _{i2} = 184	7,95	37,25
	T _{p1} = 60,35	T _{p2} = 232		
	T _{f1} = 96,3	T _{f2} = 359		
Pó da curcumina	T _{i1} = 142	T _{i2} = 176	0,90	60,04
	T _{p1} = 161	T _{p2} = 362		
	T _{f1} = 176	T _{f2} = 462		
Membrana de quitosana/curcumina	T _{i1} = 39	T _{i2} = 156	12,90	49,74
	T _{p1} = 63	T _{p2} = 267		
	T _{f1} = 157	T _{f2} = 398		

Pode-se observar com os resultados de TG para as membranas de quitosana que a perda de massa ocorreu em duas etapas. A primeira etapa apresentou uma perda de massa de cerca de 7,95 % e atinge um máximo a uma temperatura de 96,3 ° C, que pode ser atribuída a volatilização do solvente e perda de água. A segunda etapa inicia a 184°C e finaliza a 560 ° C, apresentou uma perda de massa de cerca de 37,25%, que pode ser atribuída a desidratação dos anéis sacarídeos, despolimerização e a decomposição das unidades acetiladas e desacetiladas da quitosana (BALAU et al, 2004. DHAWADE & JAGTAP, 2012, LIU et al, 2014).

Os resultados de TG do pó da curcumina indicaram que ocorreram duas etapas de perda de massa. A primeira etapa iniciou a uma temperatura de 142°C apresentou uma perda de massa de cerca de 0.90% e atinge um máximo a temperatura 176 ° C, podendo ser atribuída à volatilização de impurezas (JASIM & TALIB, 1992). A segunda etapa iniciou a 176°C apresentou uma perda de massa de cerca de 60,04% e atinge um máximo a 462 ° C, podendo atribuir a decomposição dos grupos substituintes (-OH, -OHCH₃) e dos dois anéis benzenos presentes na estrutura da curcumina (CHEN, et al, 2014).

O TG das membranas de quitosana/curcumina indicou que ocorreu duas etapas de perda de massa. A primeira etapa apresentou uma perda de

massa de cerca de 12,90 % e atinge um máximo a temperatura 152 ° C. A segunda etapa apresentou uma perda de massa de cerca de 49,74% e atinge um máximo a 398 ° C.

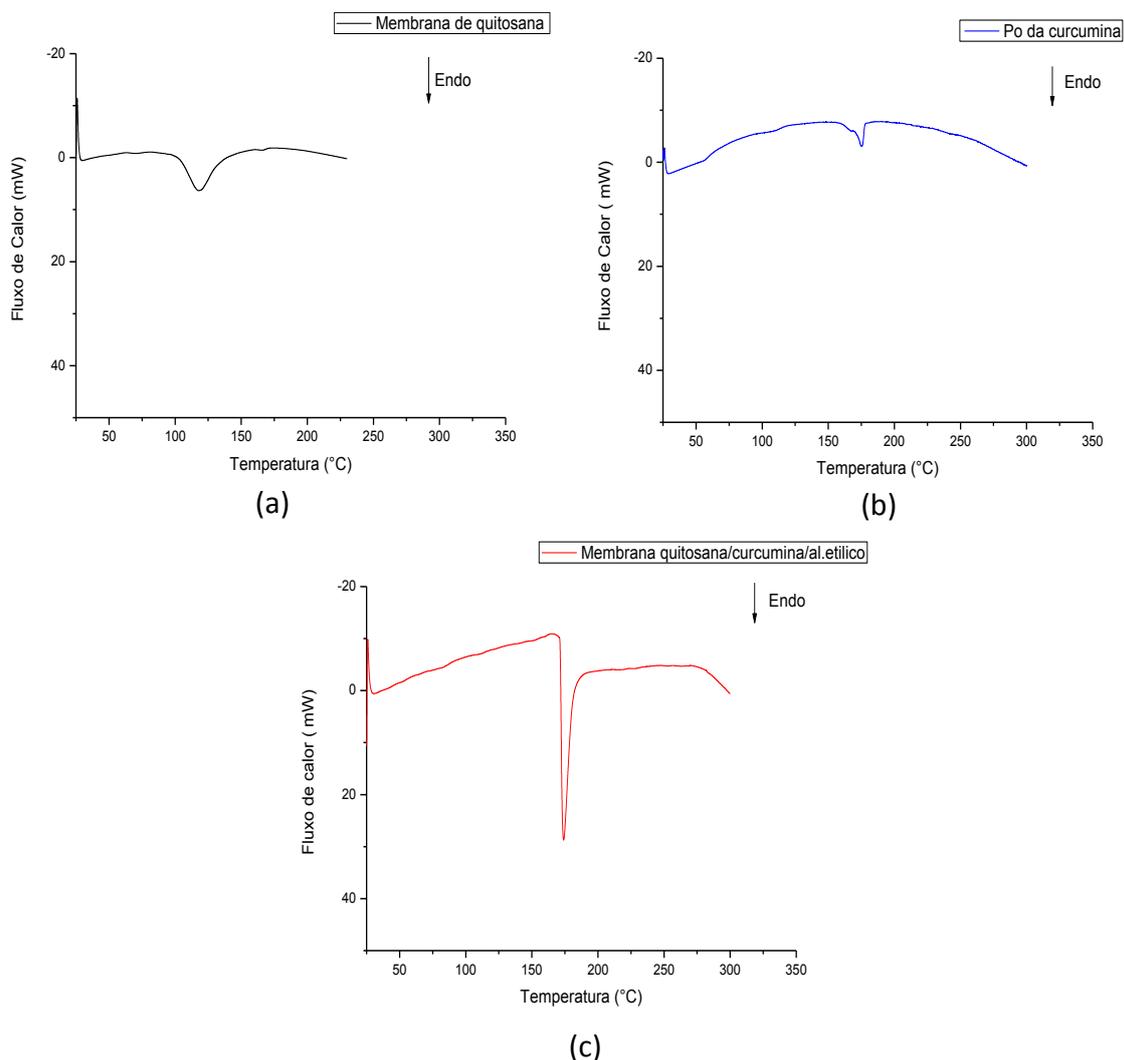
Ao comparar as curvas pode-se observar que não há mudança no perfil das curvas de TG da membrana de quitosana/curcumina, entretanto, observa-se que houve um aumento da perda de massa e temperatura na membrana de quitosana/curcumina quando comparado com a membrana de quitosana. Logo, pode-se indicar uma maior estabilidade térmica devido a presença da curcumina, já que ocorre interação entre os grupos amina da quitosana com os grupos cetona da curcumina como apresentado no FTIR (Figura 15).

Resultados semelhantes foram encontrados por Anitha e colaboradores(2011) no qual utilizou O-carboximetil quitosana e O-carboximetil quitosana com curcumina, obtendo uma maior estabilidade térmica para O-carboximetil quitosano com curcumina quando comparado ao O-carboximetil quitosano, atribuindo esse comportamento à presença da curcumina. Em particular, a complexação de um fármaco e um polímero, resulta na ausência/deslocamento dos picos endotérmicos, indicando uma mudança na estrutura de cristal, fusão, ebulição, ou sublimação (ANITHA, 2011).

6.5 Calorimetria Exploratória Diferencial- DSC

As Figuras 20 ilustram os resultados de DSC para a membrana de quitosana, pó da curcumina e membrana quitosana/curcumina, respectivamente.

Figura 20. Curvas de DSC: (a) membrana de quitosana, (b) pó da curcumina, (c) membrana quitosana/curcumina.



Nos resultados de DSC para as membranas de quitosana foram identificados dois picos endotérmicos. A primeira etapa caracteriza um pequeno pico endotérmico, em 70°C, que pode ser atribuído à perda de água e volatilização do solvente conforme apresentado no TG (Figura 19 (a)) (DHAWAD & JAGTAP, 2012; LIU et al, 2014). De acordo com Dhawade & Jagtap, a água atua como plastificante da quitosana, formando pontes de hidrogênio intermoleculares com os grupos amino e a hidroxila presentes na quitosana, na qual facilita a movimentação e a organização das cadeias poliméricas da quitosana (DHAWAD & JAGTAP, 2012). A segunda etapa caracteriza um largo pico endotérmico a 118,19 °C, que pode ser atribuído à vaporização do solvente e decomposição das cadeias do polímero.

A temperatura de transição vítrea (T_g) é geralmente obtida por esta análise para os polímeros, entretanto para a quitosana não há um valor fixo devido ser um polímero natural, e por apresentar propriedades como cristalinidade, peso molecular e grau de desacetilização que variam de acordo com o método de extração (NETO, 2005).

Nos resultados de DSC para o pó da curcumina (Figura 19 (b)) apresentou um pequeno pico endotérmico em 173°C , que pode ser atribuída à fusão dos cristais da curcumina, o que caracteriza um material cristalino, conforme apresentando no DRX (Figura 16(b)) (YALLAPU ET AL, 2009; MUKERJEE & VISHWANATHA, 2010). Segundo Yallapu e Colaboradores, Mukerje e Vishwanatha, e Parize e colaboradores (2012) encontram um pico endotérmico a 172°C os quais atribuíram a fusão dos cristais da curcumina. Também foi possível verificar que o pico obtido apresentou-se pouco uniforme, indicando que, a curcumina não é totalmente pura, pois a curcumina comercial é uma mistura de curcuminóides, contendo aproximadamente 77% curcumina, 18% demetoxicurcumina, e 5% bis-demetoxicurcumina (PARIZE, 2009; ANAND, 2008, CURR PROBL CANCER, 2013).

Na (Figura 19 (c)) observa-se os resultados de DSC para membrana de quitosana/curcumina apresentou um longo pico endotérmico a 175°C .

Ao comparar os resultados da membrana de quitosana com a membrana quitosana/curcumina pode-se observar que há um deslocamento do pico de $118, 19^\circ\text{C}$ para 175°C que pode ser atribuída à presença da curcumina, visto que a temperatura de 175°C é próxima do ponto de fusão dos cristais da curcumina (173°C). Também é possível observar, que esse deslocamento da temperatura pode estar atribuída à presença de picos cristalinos no DRX da membrana quitosana/curcumina quando comparado com a membrana de quitosana que é amorfa conforme apresentado no DRX (Figura 16). Logo, a membrana de quitosana/curcumina é mais estável termicamente corroborando com os resultados apresentado no TG (Figura 18).

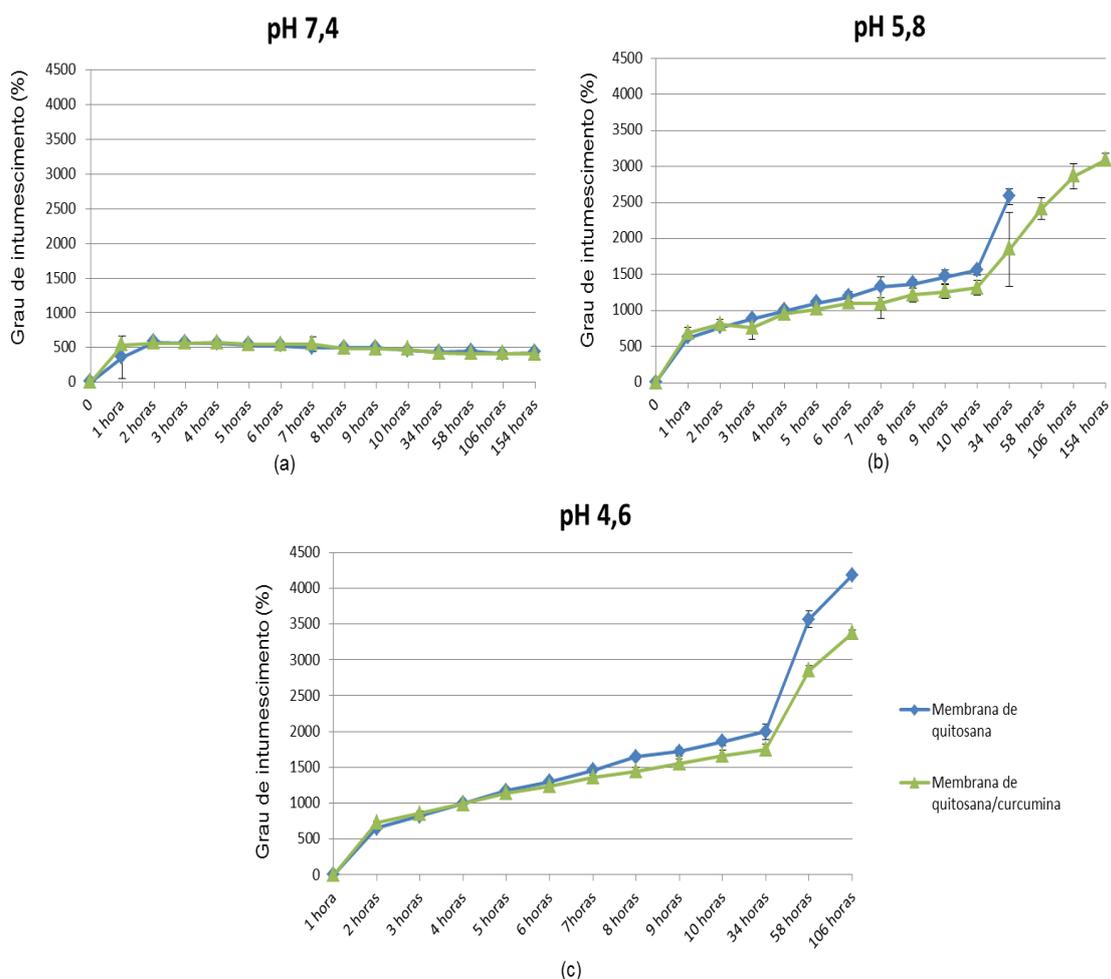
Estudos realizados por Parize e colaboradores (2012), na qual utilizaram a quitosana para encapsular curcumina, usando o tripolifosfato de sódio (TPP), como um agente reticulante, para obter micropartículas. Os resultados obtidos para as amostras quitosana/TPP apresentaram uma

temperatura de decomposição a 274°C. Já para as amostras quitosana/curcumina/TPP resultou no deslocamento do pico de fusão para uma temperatura de 293-296° C, o que sugere uma possível interação entre quitosana e curcumina, proporcionando maior estabilidade térmica (PARIZE, 2009; PARIZE, et al, 2012).

6.6 Grau de Intumescimento (GI%)

A Figura 21 ilustra os resultados de Grau de Intumescimento (GI %) para as membranas de quitosana e quitosana/curcumina com os seguintes pH: 7,4; 5,8 e 4,6.

Figura 21: Grau de intumescimento (%) das membranas de quitosana e quitosana/curcumina: (a) pH 7,4; (b) pH 5,8; (c) pH 4,6.



Na Figura 21 (a) observa-se o GI para a membrana de quitosana e quitosana/curcumina em contato com solução com pH a 7,4, observa-se um aumento no GI após 1 hora, e permanece constante até um período de 10

horas, esse fenômeno em ambas as membranas, pode ser atribuído a interação do grupo amina da quitosana com o grupo hidrofílico da água. Após o período de dez horas há uma pequena redução no GI podendo ser atribuído ao tampão ou ácido residual. É importante informar que durante esse período para ambas as amostras não apresentaram rupturas, conforme é esperado, pois os estágios iniciais do processo de intumescimento são hidratação, quebra das ligações e degradação (BASKAR & KUMAR, 2009). Logo no pH 7,4 a presença da curcumina não mudou o comportamento de intumescimento da quitosana.

Para a Figura 21(b) observa-se o GI para a membrana de quitosana e quitosana/curcumina em contato com solução com pH a 5,8. Nota-se um constante aumento no GI até 10 horas, após esse período há um aumento significativo no GI das membranas. Para as membranas de quitosana no período 58 horas, apresentou ruptura atingindo o máximo de intumescimento. As membranas de quitosana/curcumina apresentaram ruptura após o período de 154 horas.

O GI para as membranas com o pH 4,6 foi possível observar que há um aumento constante no GI para ambas as amostras até 34 horas. Após esse período observa-se que há um aumento no GI para ambas as membranas, porém, para as membranas de quitosana o GI são maiores quando comparados ao GI das membranas de quitosana/curcumina. Após o período de 106 horas ambas as membranas apresentaram rupturas.

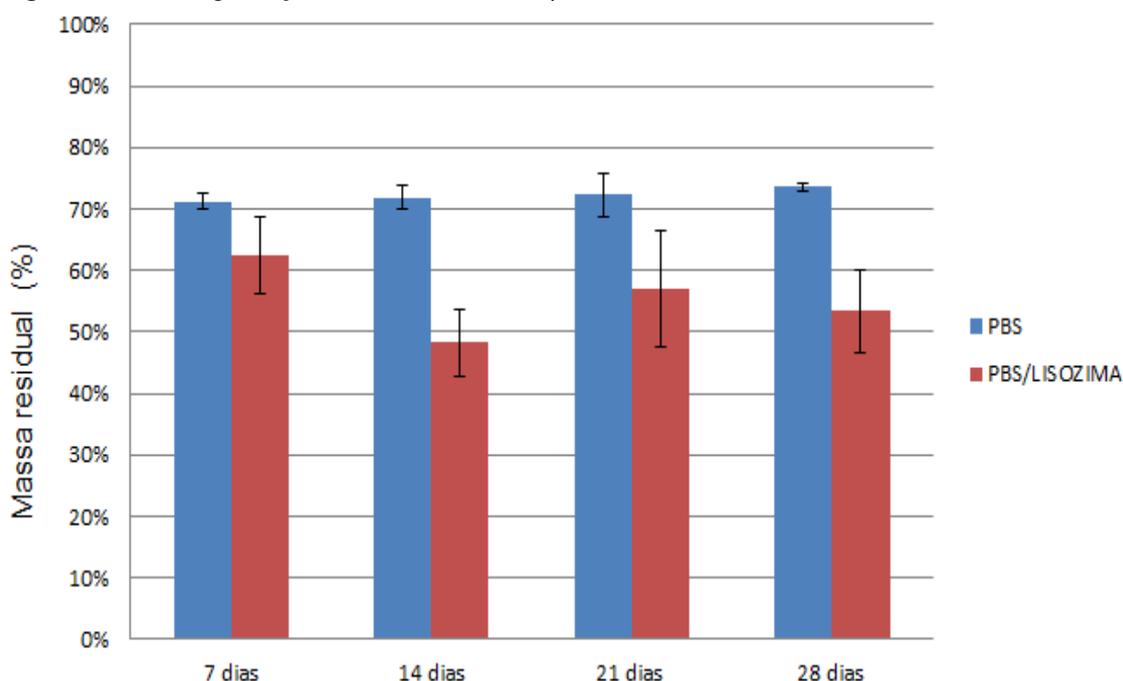
Ao comparar os gráficos da Figura 21, observa-se que o maior GI das membranas ocorreram em pH 5,8 e 4,6. Isso pode ser atribuído à presença do H^+ no sistema causando uma “desordem”, logo maior mobilidade das cadeias poliméricas e maior intumescimento até as membranas incharem ao máximo ocorrendo assim, à ruptura das mesmas. Contudo as membranas com curcumina em pHs ácidos apresentaram menor intumescimento quando comparado as membranas de quitosana isso pode ser atribuído a maior interação entre o grupo amina da quitosana com o grupo cetona da curcumina conforme apresentando no FTIR (Figura 15), pois segundo Akhta e colaboradores (2012) esta interação depende do pH e a maior interação ocorre em pH ácido (4,0) (AKHTAR, .RIZ & KAR, 2012).

Diante dos resultados apresentados a membrana de quitosana/curcumina apresenta maior intumescimento e maior estabilidade em pH 5,8, conforme verificados no resultados de análise térmica.

6.7 Biodegradação enzimática

As Figuras 22 e 23 apresentam os resultados de biodegradação da membrana de quitosana e quitosana/curcumina com a solução tampão PBS e PBS/ Lisozima nos períodos: 7 dias, 14 dias, 21 dias e 28 dias.

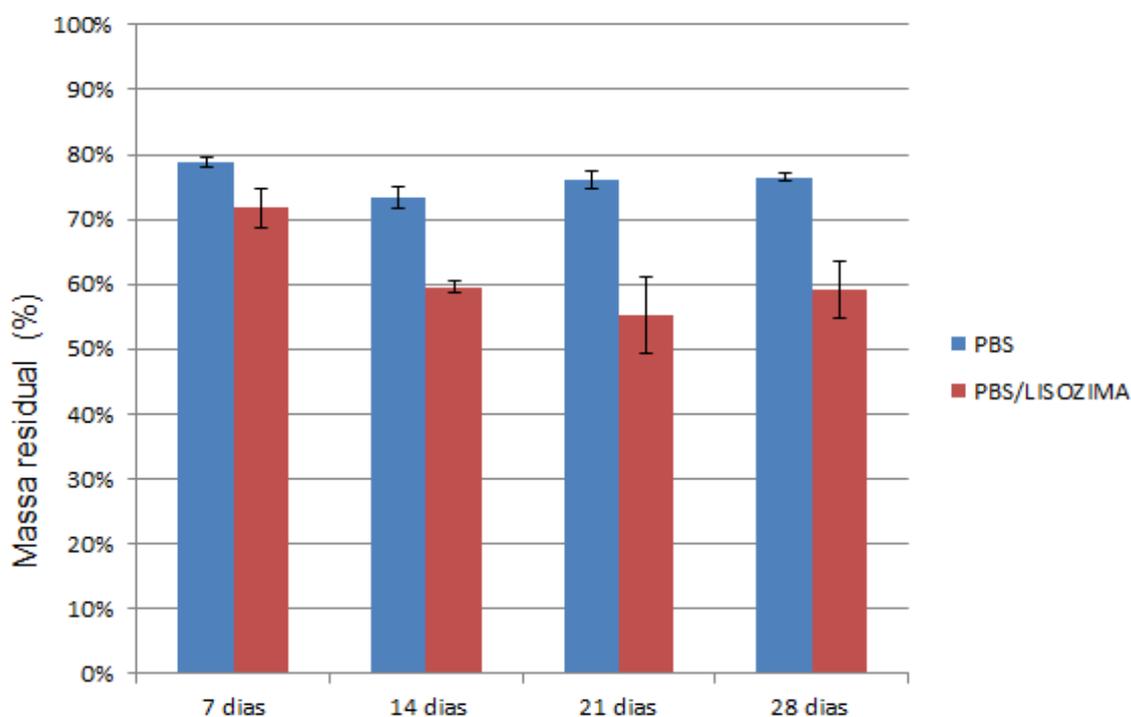
Figura 22: Biodegradação da membrana de quitosana.



Pode-se observar na Figura 22 para as colunas de cor azul o comportamento das membranas de quitosana quando submersas a uma solução de PBS em diferentes períodos, nota-se uma perda de massa de 29% praticamente independente do tempo de exposição a esta solução. Também é possível notar uma leve redução na perda de massa 28%, 27% para o período de 21 e 28 dias, respectivamente, podendo ser atribuída à presença de sais residuais do PBS. Já para os resultados de PBS/Lisozima (coluna vermelha) há uma perda de massa de 38% para o período de 7 dias, 52% para 14 dias, 44% para 21 dias e 47% para 28 dias.

A Figura 23 apresenta os resultados de biodegradação da membrana de quitosana/curcumina com a solução tampão PBS e PBS/ Lisozima nos períodos: 7 dias, 14 dias, 21 dias e 28 dias.

Figura 23: Biodegradação para as membranas de quitosana/curcumina



Pode-se observar na Figura 23 que para as membranas de quitosana/curcumina expostas à solução de PBS apresenta uma perda de massa de 22% para 7 dias, 27% para 14 dias, 24% para 21 dias e 28 dias. Apresentando maior perda de massa para o período de 14 dias podendo ser atribuída a sais residuais de PBS.

Para as membranas de quitosana/curcumina apresentam uma perda de massa 29% para o período de 7 dias, 41% para 14 dias, 45% para 21 dias e 41% para 28 dias. Para o período de 21 dias apresenta maior perda de massa podendo ser atribuída a sais residuais de PBS.

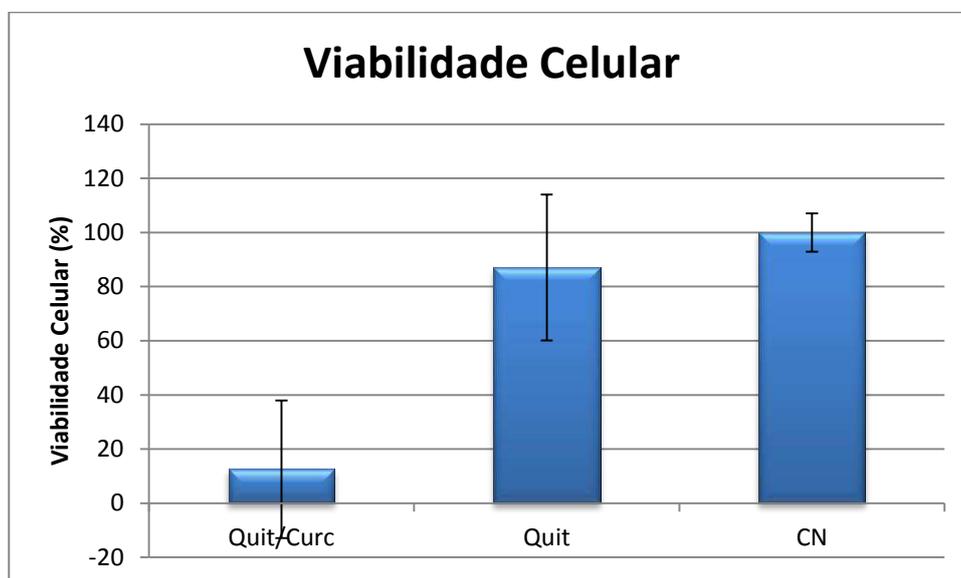
Ao comparar a perda de massa das membranas de quitosana com as membranas de quitosana/curcumina quando colocadas na solução de PBS observa que as membranas de quitosana/curcumina possuem menor perda de massa independente do período de exposição. Já para as membranas submetidas a exposição de PBS/Lisozima observa-se que a membrana de

quitosana/curcumina possui menor perda de massa podendo ser atribuída a interação entre os grupos amino da quitosana com o grupo cetona da curcumina conforme apresentados no FTIR, resultando em uma maior estabilidade conforme apresentado nos resultados de análise térmica e no intumescimento.

6.8 Citotoxicidade

A Figura 24 mostra os resultados de viabilidade celular para as membranas de quitosana e quitosana/curcumina com as células cancerígenas MCF-7.

Figura 24: Viabilidade celular do sistema quitosana/curcumina.



Observa-se na Figura 24 as células em meio de cultura (RPMI-16400) foram utilizadas como controle, equivalendo a 100 % de viabilidade e estão representadas na primeira coluna (CN=controle negativo). Para a membrana de quitosana apresentou um viabilidade para as células tumorais acima de 80%. Já para a membrana de quitosana/curcumina apresentou uma diminuição na viabilidade celular das células MCF-7, indicando que o fármaco estudado apresentou um toxicidade para células tumorais.

Resultado semelhantes foram encontrados por Anitha e colaboradores (2011) onde utilizou O-carboximetil quitosana e obtiveram uma viabilidade celular acima de 80% já para o O-carboximetil quitosana com curcumina

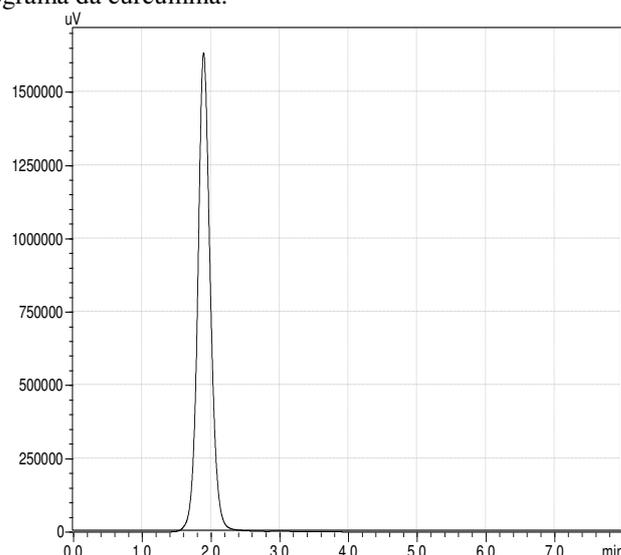
indicou baixa viabilidade celular apresentando toxicidade para as células MCF-7 (ANITHA, 2011).

6.9 Desenvolvimento e Validação do método analítico para quantificação da curcumina

6.9.1 Determinação do comprimento de onda de detecção para curcumina

A Figura 25 ilustra cromatograma para identificação da curcumina. Durante o desenvolvimento de um método analítico, faz-se necessário a otimização de diversas etapas como a preparação do material, a separação da amostra e a quantificação.

Figura 25: Cromatograma da curcumina.



Para a curcumina dissolvida em metanol o pico absorção máxima ocorreu em 425 nm, e, apresentou um tempo de retenção de 1,89 minutos.

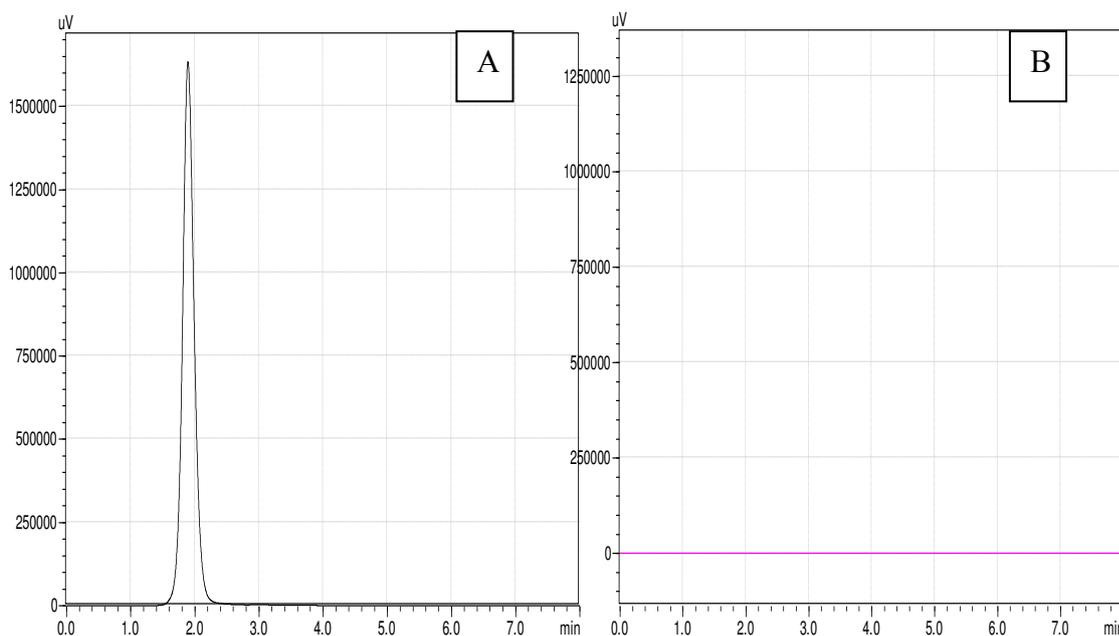
6.9.2 Validação do método analítico para quantificação da curcumina

Conforme descrito no ponto 5.3.2.6, o método desenvolvido nesse trabalho foi validado segundo os parâmetros seletividade (especificidade), linearidade, exatidão, precisão (repetibilidade e intermediária), limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

Seletividade

Entende-se como seletividade 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). A Figura 26 mostra cromatograma das soluções-padrão da curcumina e quitosana.

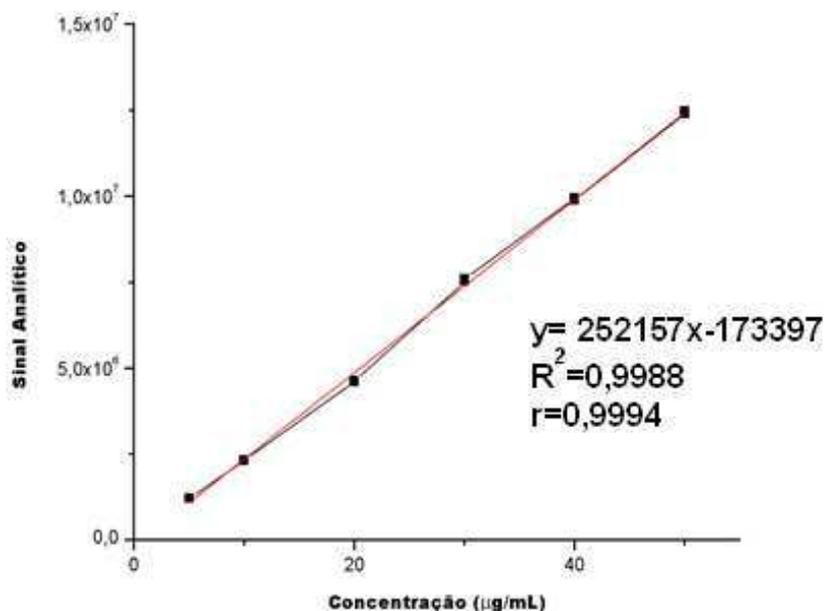
Figura 26: Cromatogramas das soluções-padrão da curcumina (A) e quitosana (B) obtido por CLAE-UV a 425nm.



Pode-se observar na Figura 26 que o método analítico desenvolvido foi seletivo e específico para a curcumina, tendo em vista, que não foi detectado pico de absorção de possíveis interferentes presentes na membrana de quitosana próximos ao tempo de retenção da curcumina.

Linearidade

A linearidade pode ser definida como a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003). A Figura 27 apresenta a curva de calibração para curcumina.

Figura 27 – Curva de Calibração para curcumina.

A linearidade do método foi avaliada a partir da curva de calibração. A equação da reta ($y = 252157x - 173397$) foi obtida através de estudos de regressão linear, obtendo assim um coeficiente de correlação (r) da curva analítica ($n=3$) de 0,9994, conforme a RE- 899/2003, onde o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser = 0,99. Portanto, o método é linear.

Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003). Na Tabela 4 mostram os resultados do ensaio para verificação da exatidão do método.

Tabela 4: Resultados do ensaio para verificação da exatidão do método.

Concentração Teórica de curcumina (µg/mL)	Concentração obtida de curcumina (µg/mL)	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
20,00	19,64	0,74	3,74
30,00	30,63	0,17	0,56
40,00	39,99	0,12	0,30

Na Tabela 4 pode-se observar que o método proposto mostrou-se exato em relação as concentrações analisadas conforme as especificações estabelecidas pela RE 899/03, que estabelecem como aceitáveis valores de exatidão com coeficiente de variação (CV %) máxima de 5% (BRASIL, 2003).

Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada nos seguintes níveis (BRASIL, 2003):

- (1) Repetibilidade (precisão intra-corrída): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação.
- (2) A precisão intermediária (precisão inter-corrídas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes (BRASIL, 2003).

A Tabela 5 e 6 apresentam os resultados do ensaio para verificação da precisão e repetibilidade do método.

Tabela 5: Resultados do ensaio para verificação da precisão (precisão intermediária).

Analista	Dia	Concentração nominal ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Concentração obtida (média \pm DP; n=5)	Precisão (CV%)
Analista	Dia 1	30	30,4280 \pm 0,08	0,26
	Dia 2	30	30,4760 \pm 0,25	0,82

Legenda: DP= Desvio Padrão; CV= Coeficiente de variação

Tabela 6: Resultados do ensaio para verificação da precisão (repetibilidade).

Concentração nominal ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Concentração obtida (média \pm DP; n=5)	Precisão (CV%)
30	30,1260 \pm 0,11	0,36

Foram determinadas a repetibilidade e a precisão intermediária. Conforme a legislação vigente no Brasil (BRASIL, 2003), a repetibilidade do método foi avaliada a partir da leitura em quintuplicata do ponto médio da curva de calibração (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e a precisão intermediária foi também avaliada a partir da quintuplicata do ponto médio da curva só que em dois dias distintos. O parâmetro legal indica que o coeficiente de variação (% CV) deve ser inferior a 5% (BRASIL, 2003).

Limite de Quantificação e Detecção

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). O limite de quantificação, equivalente ao menor nível determinado com precisão e exatidão aceitáveis, correspondeu a 3,91 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003). Para o limite de detecção foi de 2,65 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Robustez

A robustez pode ser definida como a sensibilidade de um método frente a pequenas variações nas condições analíticas, tais como a proporção dos componentes da fase móvel, o fluxo empregado na análise e a temperatura do forno. A Tabela 7 apresenta os resultados do ensaio para verificação da robustez do método.

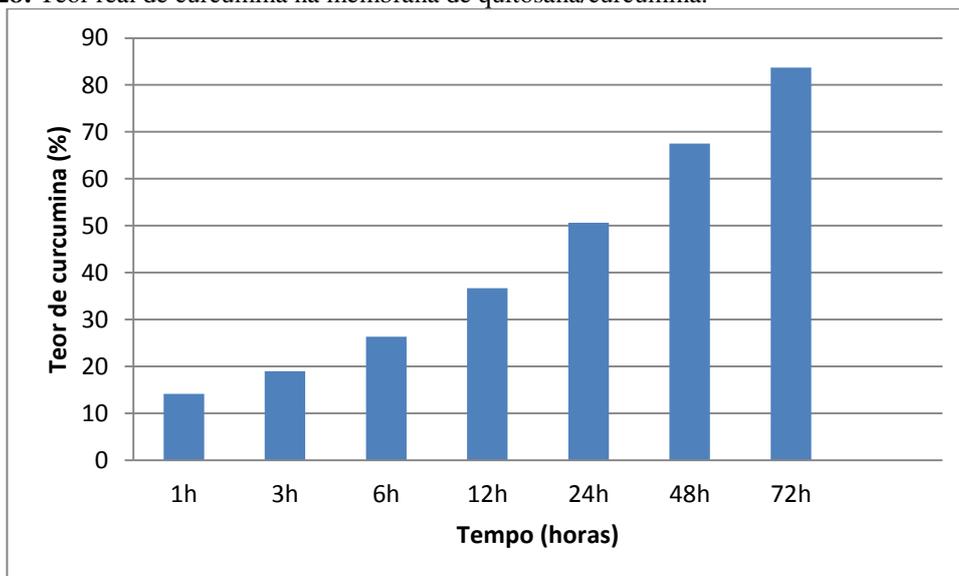
Tabela 7: Resultados do ensaio para verificação da robustez do método

Parâmetros	Concentração Teórica de curcumina ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração obtida de curcumina ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
Fluxo (mL/min)				
0,18	30,44	30,00	0,12	0,39
0,20	30,04	30,00	0,10	0,32
0,22	28,76	30,00	0,04	0,13
Composição da Fase Móvel (v/v)				
78:12	29,93	30,00	0,3	1,00
80:20	30,04	30,00	0,10	0,32
82:18	30,27	30,00	0,50	1,65'
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)				
28	30,41	30,00	0,02	0,08
30	30,04	30,00	0,10	0,32
32	30,15	30,00	0,06	0,19

Observam-se na Tabela 7 os resultados do ensaio para verificação da robustez do método onde se percebe que a precisão apresenta um CV (%) menor do que 5% para todas as variações das condições analíticas logo, o parâmetro é aceitável pela legislação vigente, e o método é robusto.

6.9.3 Determinação do teor de curcumina nas membranas

Este ensaio foi realizado para identificar o teor real do fármaco presente na membrana quitosana/curcumina. Observa-se na Figura 28 o resultado obtido para o ensaio de teor de curcumina nas membranas de quitosana/curcumina

Figura 28: Teor real de curcumina na membrana de quitosana/curcumina.

A partir do método validado foram determinadas as concentrações de curcumina nas membranas de quitosana/curcumina em diferentes tempos de extração. Observa-se que com o aumento do tempo de exposição da amostra no metanol houve um aumento da concentração do fármaco no sistema, apresentando maior recuperação às 72h com o teor de 83,7%. Portanto, foi possível confirmar que a curcumina está presente na membrana quitosana/curcumina conforme apresentado no MEV e DRX e que não há alteração na estrutura da curcumina. Também é possível observar que a curcumina é extraída de forma lenta podendo ser atribuída à interação entre o grupo amina da quitosana e cetona da curcumina conforme apresentado no FTIR. Logo o método utilizado é adequado para a identificação e quantificação do fármaco na membrana quitosana/curcumina e que a membrana obtida não modifica a estrutura da curcumina.

7. CONCLUSÕES

A partir dos estudos realizados nesta etapa pode-se concluir que:

- A partir das caracterizações ficou evidenciado que o método de processamento usado na obtenção da membrana quitosana/curcumina é adequado, tendo em vista que não houve degradação da curcumina.
- As membranas de quitosana/curcumina apresentaram menor intumescimento e degradação, e maior estabilidade quando comparadas as membranas de quitosana.
- Para o ensaio de citotoxicidade as membranas de quitosana/curcumina apresentaram potencial para o tratamento de câncer.
- O método analítico desenvolvido se mostrou seletivo, específico, preciso, exato e robusto de acordo com a RE Nº 899/2003 da ANVISA. Portanto, o método utilizado foi adequado para identificação e quantificação da curcumina na membrana de quitosana/curcumina.
- Portanto, diante dos resultados obtidos o sistema desenvolvido apresenta potencial para aplicações em liberação controlada de drogas.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho teve o objetivo de desenvolver e avaliar membranas poliméricas de quitosana para o uso em sistema de liberação controlada da curcumina para o tratamento de melanoma.

Com o objetivo realizado, considera-se que o trabalho acadêmico desenvolvido estabeleceu metodologias adequadas para aplicação de sistemas de liberação controlada e para o tratamento de câncer. Portanto, o estudo se justifica e se faz relevante.

Sob essa perspectiva de trabalhos futuros tem-se:

- Estabelecer as concentrações mais adequadas da curcumina para o tratamento de câncer e avaliar se essa variação da concentração influencia na interação da quitosana com a curcumina;
- Realizar os ensaios utilizando linhagem celulares de câncer de pele (melanoma);
- Estabelecer uma metodologia e realizar o ensaio de cinética de liberação das membranas de quitosana/curcumina, para identificar qual o perfil de liberação da membrana quitosana/curcumina quando submetidas ao meio biológico;
- Realizar ensaio *in vivo*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANAND P. et al. Curcumin and cancer: An “old-age” disease with an “age-old” solution. *Cancer Letters*., v. 267, p. 133–164, 2008.

ANITHA. A. (a) et al. Efficient water soluble O-carboxymethyl chitosan nanocarrier for the delivery of curcumin to cancer cells. *Carbohydrate Polymers*, v.83, p. 452–461, 2011.

ANITHA. A et al (b). Preparation, characterization, *in vitro* drug release and biological studies of curcumin loaded dextran sulphate–chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, v. 84, n. 3, p. 1158–1164, 2011.

ANATOMIA E FISILOGIA HUMANA. *A pele e o sentido do tato*. Disponível em <<http://www.afh.bio.br/sentidos/sentidos10.asp>> Acessado em 10 de outubro de 2013.

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, 2012.

BALAU L, LISA. G., . POPA. M.I, TURA V., MELNIG V. Physico–chemical properties of Chitosan films. *Central European Journal of Chemistry*. v.2, n.4, p. 638-647, 2004.

BASKARD. KUMAR T.S. S. Effect of deacetylation time on the preparation, properties and swelling behavior of chitosan films. *Carbohydrate Polymers*. v.78p.767–772, 2009.

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

BEPPU, M. M. ; ARRUDA E. J.; SANTANA C. C. Síntese e Caracterização de Estruturas Densas e Porosas de Quitosana. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* , 1999

BORUAH B.; SAIKIA M. P.; DUTTA R. K. Binding and stabilization of curcumin by mixed chitosan–surfactant systems: A spectroscopic study. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 245, p. 18– 27, 2012.

BRASIL. Resolução N° 899, de 29 de maio de 2003. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, 2003.

BUZANELLO. R. A. S. Nanoencapsulação de curcumina em polímeros biodegradáveis/biocompatíveis. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Paraná, 2013.

CAMPANA FILHO. S. P; SIGNINI. R CARDOSO. M. B. Propriedades e Aplicações de Quitosana. *Revista Processos Químicos / SENAI*. v.1, n. 2, p. 9-20, 2007.

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

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

CURR PROBL CANCER. Role of curcumin in câncer therapy.v.3, p. 243-305, 2007. Disponível em:
<http://cdn.elsevier.com/assets/pdf_file/0006/115719/current-problems-in-cancer-article-1.pdf> Acessado em 20 de outubro de 2013.

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

DATASUS/ Ministério da Saúde, 2012.

DHAWADE P. P, JAGTAP R N. Characterization of the glass transition temperature of chitosan and its oligomers by temperature modulated differential scanning calorimetry. *Advances in Applied Science Research*, v. 3, n. 3, p.1372-1382, 2012.

DUAN.J, et. al. Synthesis and in vitro/in vivo anti-cancer evaluation of curcumin-loaded chitosan/poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 400, p. 211–220, 2010.

FIDÉLES, T.B. Filmes reticulados de quitosana para aplicação como biomaterial. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 2010.

GASPAR, V. M.; CORREIA, I. J.; SOUSA, A.; SILVA, F.; PAQUETE, C. M.; QUEIROZ, J. A.; SOUSA, F. Nanoparticle mediated delivery of pure P53 supercoiled plasmid DNA for gene therapy. *Journal of Controlled Release*, v.156, p.212-222, 2011

GUERRA, M. R.; GALLO, C.V. M.; MENDONÇA, G. A. S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 51, n.3, p.227-234, 2005.

GOTHOSKAR A. V. Drug Delivery Systems: A Review. Disponível em: <<http://www.free-ebooks.net/ebook/Drug-Delivery-Systems-A-Review/pdf?dl&preview>> acessado em 15 de outubro de 2013.

HOLANDA. A. L. *Membranas de quitosana para uso em sistema de liberação controlada de insulina: síntese e caracterização*. Tese em Engenharia de Processos da Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2011.

INCA. ABC do câncer :abordagens básicas para o controle do câncer. Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, 2012.

INCA(a)- Brasil. Ministério da Saúde. Causalidade em câncer. Rio de Janeiro, 2010 disponível em: <http://www.inca.gov.br/situacao/arquivos/causalidade_cancer.pdf> acessado em 30 de julho de 2013

INCA(b)- Brasil. Ministério da Saúde. Jovens exposição a fatores cancerígenos. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em : <http://www.inca.gov.br/situacao/arquivos/causalidade_jovens.pdf> Acessado em 30 de julho de 2013.

INCA- Brasil. Ministério da Saúde disponível em: < http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma> Acessado em 24 de agosto de 2014.

JAIN. K. K; Drug Delivery Systems. Ed. Humana Press,. Totowa- USA, 2008

JASIM F. TALIB . T. Some observations on the thermal behavior of curcumin under air and argon atmospheres. *Jornal of thermal analysis*. V. 38, p. 2549-2552, 1992.

KAEWNOPPARAT et al. Increased solubility, dissolution and physicochemical studies of curcumin polyvinylpyrrolidone K-30 solid dispersion. *World Academy of Science, Engineering and Technology* v.31, 2009.

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

LEONARDI G. R.; GASPAR2 L.R.; CAMPOS P. M. B. G. M. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. *Investigação Clínica, Laboratorial e Terapêutica An bras Dermatol, Rio de Janeiro*, v. 77, n. 5, p.563-569, 2002.

LEONG K. W. LANGER R. Polymeric controlled drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 1, p.199-233, 1987.

LI. X. Y (a) et al. Preparation of alginate coated chitosan microparticles for vaccine delivery. *BMC Biotechnology*, v. 8, n.89,p. 1-11, 2008.

LI, Y.; et al (b). A facile approach to construct threedimensional oriented chitosan scaffolds with in-situ precipitation method. *Carbohydrate Polymers*.v. 80, p. 408-412, 2010.

LIU M., ZHOU Y., ZHANG Y., YU C., CAO S.. Physicochemical, mechanical and thermal properties of chitosan films with and without sorbitol. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014.

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, 2005

LYRA. M. A. M et al. Sistemas matriciais hidrofílicos e mucoadesivos para liberação controlada de fármacos. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 26, n. 5, p. 784-93, 2007.

MAHESHWARI R. K. et al. Multiple biological activities of curcumin: A short review. *Life Sciences* v.78, p.2081–2087, 2006

MARTÍNEZ-CAMACHO, A.P.; CORTEZ-ROCHA, M.O.; EZQUERRA-BRAUER, J.M.; GRACIANO-VERDUGO, A.Z.; RODRIGUEZ-FÉLIX, F.; CASTILLO-ORTEGA, M.M.; YÉPIZ-GÓMEZ, M.S.; PLASCENCIA- JATOMEA, M. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers*, v.82, p.305–315, 2010.

MICHEL.D; et al. Design and evaluation of cyclodextrin-based delivery systems to incorporate poorly soluble curcumin analogs for the treatment of melanoma. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.81, p. 548–556, 2012.

MOHAMMADPOUR D. N et al. Preparation and in vitro characterization of chitosan nanoparticles containing Mesobuthuseupeus scorpion venom as an antigen delivery system. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v.18, n.1, p.44-52, 2012

MOURA. M .J. Aplicações do quitosano em liberação controlada de fármacos: algumas considerações. Enciclopédia biosfera, Centro Científico, v.8, n.14; p. 1489- 1509,2012.

MUKERJEE A. VISHWANATHA J. K. Formulation, Characterization and Evaluation of Curcumin-loaded PLGA Nanospheres for Cancer Therapy. *Anticancer Research* 29: 3867-3876 (2009).

NAAMA J. H; ALI A; AL-TEMIMI. A. A; AL-AMIER. A. H. . Study the anticancer activities of ethanolic curcumin extract. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, v. 4, n, 5, p. 68-73, 2010.

NETO, C.G.T. GIACOMETTI, J.A. JOB, A.E. FERREIRA, F.C. FONSECA, J.L.C. PEREIRA M.R. Thermal Analysis of Chitosan Based Networks. *Carbohydrate Polymers*. v. 62 ,p.97–103, 2005.

ODOT J. et al. *In vitro* and *in vivo* anti-tumoral effect of curcumin against melanoma cells. *Int. J. Cancer*, v. 111, p.381–387, 2004.

PARIZE. A. L, et al. Evaluation of chitosan microparticles containing curcumin and crosslinked with sodium tripolyphosphate produced by spray drying. *Quim. Nova*, v.35, n. 6, p.1127-1132, 2012.

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

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

PORTAL DE SALUD COMUNIDADE DEL MADRID. *Cáncer de piel: Melanoma* Disponível em
:<http://www.madrid.org/cs/Satellite?cid=1142558362067&language=es&pageName=PortalSalud%2FPagina%2FPagina_pintarContenidoFinal&vest=1156329830256> acessado em 09 de outubro de 2013.

RATANAJAJAROEN P.; WATTHANAPHANIT A.; TAMURA H. TOKURA S.; RUJIRAVANIT R.; Release characteristic and stability of curcumin incorporated in β -chitin non-woven fibrous sheet using Tween 20 as an emulsifier. *European Polymer Journal*, v. 48, p. 512–523, 2012.

RACHIPUDI P.S ; KITTUR A.A; A.M, KARIDURAGANAVARM.Y. Synthesis and characterization of hybrid membranes using chitosan and 2-(3,4-epoxycyclohexyl) ethyltrimethoxysilane for pervaporation dehydration of isopropanol. *Journal of Membrane Science* 441,n.15, p.83–92, 2013,

RATNER B. D. et al. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. Elsevier Academic Press. Ed 2^o, California, 2004.

RAYMOND, W.; RUDDON, M. D. *Cancer Biology*, Oxford University Press, New York, 4^o Ed. 2007.

- REJINOLD N. S. et al. Curcumin-loaded biocompatible thermoresponsive polymeric nanoparticles for cancer drug delivery. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 360, p.39–51, 2011.
- REN D. YI H. WANG W. MA X. The enzymatic degradation and swelling properties of chitosan matrices with different degrees of N-acetylation. *Carbohydrate Research*. v. 340, p. 2403–2410, 2005.
- ROBBINS and COTTRAN. *Pathologic Basis of Disease*, Ed. Elsevier, 8^a, 2010. Tradução Fernandes. P. D. et al. Rio de Janeiro, Elsevier, 2010.
- SAMPAIO S. A. P.; RIVITTI E. A. *Dermatologia*. Artes medicas, Ed 3^o, 2008
- SRIVASTAVA. R. M; et al. Immunomodulatory and therapeutic activity of curcumin. *International Immunopharmacology*, v. 11, p. 331–341, 2011.
- SO. PO-LIN, BOZZONE. D. M. *The Biology of Cancer: skin cancer*. Chelsea House New York, 2008.
- VIVEK R. YADAV, SARASIJA SURESH, KSHAMA DEVI, SEEMA YADAV. Effect of Cyclodextrin Complexation of Curcumin on its Solubility and Antiangiogenic and Anti-inflammatory Activity in Rat Colitis Model *AAPS PharmSciTech*, v.10,n. 3, p. 752-762, 2009.
- WADAJKAR. A. S. et al. Multifunctional particles for melanoma-targeted drug delivery. *Acta Biomaterialia*, v.8, p. 2996–3004, 2012.
- WANG, J. J.; ZENG, Z. W.; XIAO, R. Z.; XIE, T.; ZHOU, G. L.; ZHAN, X. R.; WANG, S. L. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *International Journal of Nanomedicine*, v.6, p.765-774, 2011.
- YADAV V. R; SURESH S.; DEVI K; YADAV S. Effect of Cyclodextrin Complexation of Curcumin on its Solubility and Antiangiogenic and Anti-inflammatory Activity in Rat Colitis Model. *AAPS PharmSciTech*, v. 10,n. 3 2009.
- YALLAPU. M. M. ; JAGGI M.; CHAUHAN S. C. Curcumin nano formulations: a future nanomedicine for cancer. *Drug Discovery Today* . v. 17, n. 1/2, 2012.
- YALLAPU M. M., JAGGI M. , CHAUHAN S. C. Cyclodextrin-curcumin self-assembly enhances curcumin delivery in prostate cancer cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* v. 79, p. 113–125, 2010.
- ZANOTTO FILHO, A. *Inibição de NFκB como estratégia para indução de morte celular em tumores. Tese de doutorado em Ciências biológicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.*

