

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

Suelem Sonaly Lima Oliveira

**DESENVOLVIMENTO DE ARCABOUÇOS DE QUITOSANA/HIDROXIAPATITA
PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS**

Campina Grande – PB

Agosto- 2015

Suelem Sonaly Lima Oliveira

**DESENVOLVIMENTO DE ARCABOUÇOS DE QUITOSANA/HIDROXIAPATITA
PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook

Co-orientador: Prof. Dr. Hugo Miguel Lisboa Oliveira

Agência Financiadora: CAPES

Campina Grande – PB

Agosto- 2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

O56d

Oliveira, Suelem Sonaly Lima.

Desenvolvimento de arcabouços de quitosana/hidroxiapatita para liberação controlada de fármacos / Suelem Sonaly Lima. – Campina Grande, 2015.

165 f. : color.

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

"Orientação: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook, Prof. Dr. Hugo Miguel Lisboa Oliveira".

Referências.

1. Hidroxiapatita. 2. Quitosana. 3. Liberação Controlada de Fármacos. 4. Curcumina. 5. Dexametasona. I. Fook, Marcus Vinicius Lia. II. Oliveira, Hugo Miguel Lisboa. III. Título.

CDU 678.7(043)

Suelem Sonaly Lima Oliveira

Nascimento: 13/01/1990

Naturalidade: Campina Grande, PB, Brasil.

Filiação: Genivaldo da Silva Oliveira

Sônia Maria Lima Oliveira

Formação acadêmica/titulação:


- 2008 - 2013: Graduação em Engenharia de materiais, pela Universidade Federal de Campina Grande, UFCG, Brasil.
- 2013 - 2015: Pós- Graduação, nível de mestrado, em Ciência e Engenharia de materiais, pela Universidade Federal de Campina Grande, UFCG, Brasil.

Suelem Sonaly Lima Oliveira

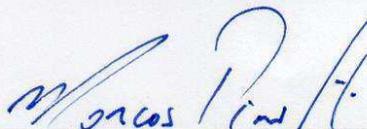
**DESENVOLVIMENTO DE ARCABOUÇOS DE QUITOSANA/HIDROXIAPATITA
PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS**

SUELEM SONALY LIMA OLIVEIRA

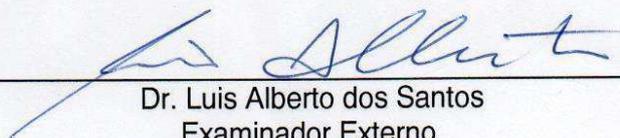
Dissertação aprovada em 19/08/2015 pela banca examinadora constituída dos seguintes membros:



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



Dr. Marcos Pinott Barbosa
Examinador Externo
DEM/UFMG



Dr. Luis Alberto dos Santos
Examinador Externo
UFRGS

Dedico este trabalho a minha família, em especial aos meus pais Sônia e Genivaldo, e minhas irmãs Sâmala e Sandriely.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** pelo infinito amor e bondade possibilitando a capacidade e a força necessária para conclusão deste trabalho.

A **minha família**, meus pais Sônia e Genivaldo, e minhas irmãs Sâmalá e Sandriely, pelo amor e apoio incondicional oferecido ao longo da minha vida. Ao meu namorado, João Paulo, por todo amor, apoio e companheirismo.

Ao **professor Dr. Marcus Vinícius Lia Fook** pela orientação e as oportunidades de desenvolver trabalhos com o compromisso de crescimento profissional e pessoal.

Ao **professor Dr. Hugo Miguel Lisboa Oliveira**, e o **Dr. Thiago Bezerra Fidéles** pelas contribuições no desenvolvimento e revisão deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Ao **Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO)**, pela oportunidade e estrutura oferecida, que foram essenciais para execução deste trabalho; como também a todos os colegas e funcionários do grupo CERTBIO.

Ao corpo docente e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais.

As minhas amigas de graduação e hoje companheiras de mestrado Jucélia, Mayelli, Michele, Milena e Thaís, pela crescente amizade e todas as contribuições pessoais e acadêmicas.

RESUMO

Os estudos voltados para o desenvolvimento de arcabouços compreendem inovações tecnológicas, como a inserção de fármacos para liberação controlada. O objetivo desta pesquisa foi desenvolver arcabouços constituídos por esferas de hidroxiapatita/quitosana, carregadas com fármaco, curcumina ou dexametasona, para estudo em liberação controlada de fármacos. Utilizando para isso, o método de gelificação ionotrópica para obtenção das esferas biocompósitas, e posteriormente o método de agregação de partículas para formação dos arcabouços. A pesquisa foi dividida em três etapas: a Etapa I se deteve ao desenvolvimento de arcabouços formados por esferas de quitosana/hidroxiapatita, foram testadas três diferentes concentrações de hidroxiapatita; nas Etapas II e III ocorreu à inserção de fármacos, na concentração escolhida a partir da Etapa I, e investigação do perfil de liberação, na Etapa II utilizou-se a curcumina e, na Etapa III a dexametasona. Os arcabouços desenvolvidos foram caracterizados por Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Difração de Raios X (DRX), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Microscopia Ótica (MO), Porosidade (%), Ensaio de Grau de Intumescimento (%GI), Ensaio de Citotoxicidade, Ensaio de compressão (Etapa I), e em função da presença de fármacos nos arcabouços das Etapas II e III, foram realizados ensaios por meio de Espectrofotômetro (UV- VIS). Na Etapa I foi possível observar a formação de arcabouços com estruturas tridimensionais porosas, com poros interconectados e de tamanhos variados. Os resultados indicam que os arcabouços formados têm seus resultados influenciados pelas diferentes concentrações de hidroxiapatita. Com o aumento da fração cerâmica observa-se a densificação da superfície, e pequeno aumento no diâmetro das esferas, afetando: a porosidade dos arcabouços; o %GI e o comportamento mecânico, semelhante a elastômeros. Além disso, estes arcabouços apresentaram boa viabilidade celular com resultados em torno de 70% para todos os arcabouços, independentemente da concentração de HA. As caracterizações realizadas nos arcabouços contendo fármaco, Etapas II e III, indicam que ocorreu uma possível interação entre os grupos ativos da quitosana e dos fármacos. Nos arcabouços formados nessa etapa não foram observadas diferenças significativas na sua morfologia. A porosidade sofreu interferência em relação à concentração do fármaco de modo que, quanto maior a concentração do fármaco menor a porosidade; além disso, estes apresentaram menor %GI que pode ser atribuído as ligações entre a quitosana e os fármacos. Observou-se diminuição na viabilidade celular tanto para os arcabouços de curcumina quanto para os de dexametasona, isso é proporcional ao aumento da concentração de fármacos, e percebe-se que a dexametasona apresentou-se mais citotóxica que a curcumina, pois ela apresentou maior taxa de liberação quando comparada com a curcumina. A partir dos modelos matemáticos, percebe-se que a liberação é controlada pelo processo de difusão e pelo intumescimento/relaxação da cadeia polimérica para os dois fármacos mesmo que em taxas diferentes. O estudo sugere que os arcabouços desenvolvidos necessitam de reajustes para serem aplicados em regeneração óssea, entretanto, apresentam potencial para sistemas de liberação controlada dos dois tipos de fármacos estudados.

Palavras-chave: Hidroxiapatita. Quitosana. Arcabouços. Liberação controlada de fármacos. Curcumina. Dexametasona.

ABSTRACT

The studies aimed at the development of scaffolds comprehend to technological innovations, with the insertion of drugs for controlled release. The goal of this research was to develop scaffolds consisting of hydroxyapatite/chitosan, loaded with drug, curcumine or dexamethasone, for the study in controlled drug release. For that purpose, it was used the ionotropic gelation method for obtaining the biocomposite spheres, and, subsequently, the particle aggregation method for the formation of the scaffolds. The research was divided into three steps: the Step I consisted in the development of scaffolds formed by chitosan/hydroxyapatite spheres, with three different concentrations of hydroxyapatite tested; on the Steps II and III occurred the insertion of drugs, in the concentration chosen from the Step I, and investigation of the release profile. On the step II was used curcumine, and on the Step III, dexamethasone. The developed scaffolds were characterized by Fourier Transform Infrared Region Spectroscopy (FTIR), X-Ray Diffraction (XRD), Scanning Electron Microscopy (SEM), Optical Microscopy (OM), Porosity (%), Swelling Degree Assay (%SD), Cytotoxicity Assay, Compression Assay (Step I), and, because of the presence of drugs in the scaffolds of the Steps II and III, assays were done by Spectrophotometer (UV-VIS). On the Step I could be observed the formation of scaffolds with porous tridimensional structures, with interconnected pores and with varying sizes. The results indicate that the formed scaffolds have their results influenced by the different concentrations of hydroxyapatite. With the increase of the ceramic fraction, it is observed the densification of the surface, and a small increase in the spheres diameter, affecting: the porosity of the scaffolds; the %SD and the mechanical behavior, similar to elastomers. Furthermore, these scaffolds presented good cell viability with results around 70% for all scaffolds, regardless of the concentration of HA. The characterizations done in the scaffolds containing drug, Steps II and III, indicate that occurred a possible interaction among the amino groups of the chitosan and the drugs. For the scaffolds formed on this step, it were not observed significant differences in their morphology. The porosity suffered interference in relation to the drug concentration, such that, the higher the concentration of the drug, the lower the porosity; moreover, they showed lower %SD, which can be attributed to the hydrophobic nature of the drugs. It was observed a reduction of the cell viability both for curcumine and dexamethasone scaffolds, which is proportional to the increase of the concentration of drugs, and is noted that the dexamethasone was more cytotoxic than the curcumine, since it showed larger release rate when compared to the curcumine. From the mathematical models, it is perceived that the release is controlled by the diffusion process and by the swelling/relaxation of the polymer chain for both drugs, even in different rates. The study suggests that the developed scaffolds need readjustments for application in bone regeneration, however, they exhibit potential for controlled release systems of the two kinds of drug studied.

Keywords: Hydroxyapatite. Chitosan. Scaffolds. Controlled drug release. Curcumine. Dexamethasone

PUBLICAÇÕES

Trabalhos publicados em anais de congressos (Completo)

1. SILVA, M. C. ; OLIVEIRA, S. S. L. ; LEITE, M. D. R. ; FIDELES, T. B. ; FOOK, M. V. L. . **Análise das propriedades térmicas e mecânicas, de estruturas tridimensionais de quitosana com a inclusão do fármaco Curcumina.** In: 21 Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2014, Cuiabá- MT. Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2014. v. 1. p. 7469-7479.
2. SILVA, M. C. ; GUIMARAES, P. Q. ; OLIVEIRA, S. S. L. ; FIDELES, T. B. ; FOOK, M. V. L. . **Avaliação do Comportamento Morfológico de esferas e do pó de quitosana/curcumina, na presença do solvente.** In: 21 Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2014, Cuiabá - MT. Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2014. v. 1. p. 7480-7488.

Trabalhos publicados em anais de congressos (Resumos)

1. OLIVEIRA, S. S. L. ; SILVA, M. C. ; DANTAS, M. J. L. ; FIDELES, T. B. ; PINHEIRO, I. M. F. ; FOOK, M. V. L. . **Avaliação de Metodologias Baseadas em Gelificação Ionotrópica para desenvolvimento de esferas de Quitosana/Hidroxiapatita.** In: 21 Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2014, Cuiabá - MT. Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2014, 2014. v. 1. p. 3198.
2. OLIVEIRA, S. S. L. ; SILVA, M. C. ; DANTAS, M. J. L. ; FIDELES, T. B. ; FOOK, M. V. L. ; PINHEIRO, I. M. F. . **Desenvolvimento de scaffolds de quitosana/hidroxiapatita por método de agregação de partículas.** In: 21 Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2014, Cuiabá - MT. Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2014. v. 1. p. 3199.
3. OLIVEIRA, S. S. L. ; DANTAS, M. J. L. ; FIDELES, T. B. ; FOOK, M. V. L. ; PINHEIRO, I. M. F. . **Chitosan/hydroxyapatite beads produced by ionotropic gelation method.** In: 8 Congresso Latinoamericano de Organos Artificiales, Biomateriales e Ingeniería de Tejidos, 2014, Rosario - Argentina. 8 COLAOB, 2014. v. 1. p. 74.

Premiação:

2014 - Mejor Poster del 8 Congreso Latinoamericano de Organos Artificiales, Biomateriales e Ingeniería de Tejidos, SLABO- UNR- CAIC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Imagem do osso humano obtida por microscópio electrónico. (Site: Central da Fisioterapia, assessment 2014).....	25
Figura 2- Estrutura do osso trabecular e compacto. (Adaptado de Fontes, 2010). ...	26
Figura 3- Arranjo de Hidroxiapatita e do colágeno no tecido ósseo e semelhança dos padrões de difração de raios X do componente inorgânico do tecido ósseo e da HA.(Guastaldi & Aparecida, 2010).	30
Figura 4- Representação esquemáticas da estrutura cristalina da hidroxiapatita $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ (Fontes, 2010).....	30
Figura 5- Estrutura da quitina e quitosana. (Silva et. al, 2006).....	33
Figura 6- Representação esquemática da engenharia de tecidos, onde populações de células específicas são isoladas e cultivadas em um arcabouço biodegradável (Barbanti et. al, 2005).	37
Figura 7- Estrutura química da dexametasona. (Ferrony, 2009).....	42
Figura 8- Estrutura química da curcumina. (Rodríguez et al., 2014).	45
Figura 9- Estrutura química dos pigmentos curcuminóides da <i>Cúrcuma longa</i> L. (Almeida et al, 2008).	46
Figura 10- Comparação entre as variações de concentração de fármacos administrados por: (a) métodos convencionais de multidose e, (b) sistemas de liberação controlada. (A: administração do fármaco). (Berwig, 2006).	49
Figura 11- Mecanismo de liberação de um fármaco a partir de um sistema reservatório: a água penetra na forma farmacêutica e dissolve o fármaco, e ocorre a difusão através do filme, seguindo para partição e eluição para o meio receptor. (Adaptado de Berwig, 2006 e Pzzini et al., 2007).....	52
Figura 12- Mecanismos de liberação de um fármaco a partir de um sistema monolítico: (a) Matriz insolúvel: dissolução na matriz, difusão, transporte a partir da superfície; (b) Matriz hidrofílica: difusão através da matriz, transporte a partir da superfície. (Adaptado de Berwig, 2006 e Pzzini et al., 2007).	53
Figura 13- Sistema para formação das esferas de quitosana/hidroxiapatita.....	60
Figura 14- Representação esquemática da metodologia para obtenção das esferas por gelificação ionotrópica e formação dos arcabouços de QHC1, QHC5 e QHC10, por meio de agregação das partículas. (Fonte própria).....	63
Figura 15- Representação esquemática da metodologia para obtenção das esferas por gelificação ionotrópica e formação dos arcabouços de QHD1 e QHD5 por meio de agregação das partículas. (Fonte própria).....	65
Figura 16- Fluxograma experimental da pesquisa.	75
Figura 17- Espectros de FTIR: (a) Hidroxiapatita, (b) Quitosana, (c) Arcabouço QH1 (d) Arcabouço QH3, (e) Arcabouço QH5.....	77
Figura 18- Difratoograma para: (a) Hidroxiapatita, (b) Quitosana, (c) Arcabouço QH1, (d) Arcabouço QH3, (e) Arcabouço QH5.....	80

Figura 19- Micrografias das esferas EQH1: superfície externa em aumento de (a)100x, (b)500x, (c)1000x; superfície interna em aumento de (d)100x, (e)1000x e (f)EDS da superfície indicada.....	82
Figura 20- Micrografias das esferas EQH3: superfície externa em aumento de (a)100x, (b)500x, (c)1000x; superfície interna em aumento de (d)100x, (e)1000x e (f)EDS da superfície indicada.....	83
Figura 21- Micrografias das esferas EQH5: superfície externa em aumento de (a)100x, (b)500x, (c)1000x; superfície interna em aumento de (d)100x, (e)1000x e (f)EDS da superfície indicada.....	84
Figura 22- Histograma de Distribuição de poros. Vermelho EQH1, Verde EQH3, Azul EQH5.	85
Figura 23- Gráfico da Porosidade (%) dos arcabouços: QH1 (HA1%); QH3 (HA3%); QH5 (HA5%).	86
Figura 24- Imagens obtidas por microscopia óptica, em aumento de 50x, para: (a) EQH1; (b) QH1; (c) EQH3; (d) QH3; (e) EQH5; (f) QH5.	88
Figura 25- Curvas tensão-deformação dos arcabouços: (a) QH1 (b) QH3 (c) QH5..	91
Figura 26- Curva típica de tensão-deformação uniaxial de um sólido elastomérico celular em compressão apresentando as regiões elástica linear, platô (colapso) e densificação, assim como o módulo elástico linear (E^*) e tensão elástica na região de colapso. (Adaptado de Fook, 2012).	91
Figura 27- Esquema do comportamento dos poros durante o ensaio de compressão (OLIVEIRA et. al, 2007).....	92
Figura 28- Corpos de prova após ensaio de compressão: (a) QH1 (b) QH3 (c) QH5.	94
Figura 29- Gráfico do Grau de Intumescimento(%) dos arcabouços: QH1; QH3; QH5.	94
Figura 30- Gráfico do Ensaio de Citotoxicidade (%) dos arcabouços: QH1; QH3; QH5.....	95
Figura 31- Espectros de FTIR: (a) Hidroxiapatita, (b) Quitosana, (c) curcumina (d)Arcabouço QH3, (e) Arcabouço QHC1 (f) arcabouço QHC5 (g) arcabouço QHC10.	97
Figura 32- Difratoogramas: (a) Quitosana, (b) Hidroxiapatita, (c) curcumina, (d) Arcabouço QH3, (e) Arcabouço QHC1 (f) arcabouço QHC5 (g) arcabouço QHC10.	100
Figura 33- Micrografias das esferas EQHC1: superfície externa em aumento de (a)100x, (b)500x, (c)1000x; superfície interna em aumento de (d)100x, (e)1000x e (f) EDS da superfície indicada.	102
Figura 34- Micrografias das esferas EQHC5: superfície externa em aumento de (a)100x, (b)500x, (c)1000x; superfície interna em aumento de (d)100x, (e)1000x e (f) EDS da superfície indicada.	103
Figura 35- Micrografias das esferas EQHC10: superfície externa em aumento de (a)100x, (b)500x, (c)1000x; superfície interna em aumento de (d)100x, (e)1000x e (f) EDS da superfície indicada.	104

Figura 36- Gráfico da Porosidade (%) para arcabouços: QH3; QHC1; QHC5; QHC10.	105
Figura 37- Imagens obtidas por microscopia óptica, para: (a) esferas EQHC1; aumento de 50x, (b) esferas EQHC1, aumento de 100x (c) arcabouços QHC1, aumento de 50x (d) arcabouços QHC1, aumento de 100x.	107
Figura 38- Imagens obtidas por microscopia óptica, para: (a) esferas EQHC5; aumento de 50x, (b) esferas EQHC5, aumento de 100x (c) arcabouços QHC5, aumento de 50x (d) arcabouços QHC5, aumento de 100x.	107
Figura 39- Imagens obtidas por microscopia óptica, para: (a) esferas EQHC10; aumento de 50x, (b) esferas EQHC10, aumento de 100x (c) arcabouços QHC10, aumento de 50x (d) arcabouços QHC10, aumento de 100x.	108
Figura 40- Gráfico do Grau de Intumescimento (%) dos arcabouços: QH3; QHC1; QHC5; QHC10.	110
Figura 41- Gráfico do Ensaio de Citotoxicidade (%) dos arcabouços de QH3; QHC1; QHC5; QHC10.	111
Figura 42- Espectro de absorção da curcumina (1 mg/mL), e detecção do comprimento de onda em 422,34 nm.	112
Figura 43- Representação gráfica da curva de calibração da curcumina obtida por espectrofotometria UV ($\lambda=422,34$ nm).....	114
Figura 44- Representação gráfica da curva de liberação da curcumina nos arcabouços QHC1, QHC5, QHC10, obtida por espectrofotometria UV ($\lambda=422,34$ nm).	117
Figura 45- Espectros de FTIR: (a) Hidroxiapatita, (b) Quitosana, (c) dexametasona (d) Arcabouço QH3; (e) QHD1; (f) QHD5.....	121
Figura 46- Difractogramas: (a) Quitosana, (b) Hidroxiapatita, (c) dexametasona (d)Arcabouço QH3; (e) Arcabouço QHD1; (f) Arcabouço QHD5.....	123
Figura 47- Micrografias das esferas EQD1: superfície externa em aumento de (a)100x, (b)500x, (c)1000x; superfície interna em aumento de (d)100x, (e)1000x e (f) EDS da superfície indicada.	125
Figura 48- Micrografias das esferas EQD5: superfície externa em aumento de (a)100x, (b)500x, (c)1000x; superfície interna em aumento de (d)100x, (e)1000x e (f) EDS da superfície indicada.	126
Figura 49- Gráfico da Porosidade (%) dos arcabouços: QH3; QHD1; e QHD5.	127
Figura 50- Imagens obtidas por microscopia óptica, para: (a) EQHD1; aumento de 50x, (b) EQHD1 aumento de 100x (c) QHD1, aumento de 50x (d) arcabouços QHD1, aumento de 100x.....	128
Figura 51- Imagens obtidas por microscopia óptica, para: (a) EQHD5; aumento de 50x, (b) EQHD5 aumento de 100x (c) QHD5, aumento de 50x (d) arcabouços QHD5, aumento de 100x.....	129
Figura 52- Gráfico do Grau de Intumescimento (%) dos arcabouços de: QH3; QHD1; e QHD5.	130
Figura 53- Gráfico do Ensaio de Citotoxicidade (%)para os arcabouços: QH3; QHD1; e QHD5.	132

Figura 54- Espectro de absorção da dexametasona (1 mg/mL), e detecção do comprimento de onda em 236,9 nm.	133
Figura 55- Representação gráfica da curva de calibração da dexametasona obtida por espectrofotometria UV ($\lambda=236,9$ nm).	134
Figura 56- Representação gráfica da curva de liberação da dexametasona nos arcabouços QHC1, QHC5, QHC10, obtida por espectrofotometria UV ($\lambda=422,34$ nm).	137

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Ocorrência dos fosfatos de cálcio em sistemas biológicos.	29
Tabela 2- Classificação dos sistemas matriciais.	54
Tabela 3- Modelos matemáticos.	56
Tabela 4- Correlação entre o expoente difusional (n) e o mecanismo de liberação..	57
Tabela 5- Composição dos arcabouços de quitosana/hidroxiapatita/ gelatina.....	62
Tabela 6- Propriedades mecânicas de compressão.	92
Tabela 7- Determinação da exatidão do método.....	115
Tabela 8- Coeficiente de variação das amostras empregadas no teste de precisão por repetibilidade e de precisão intermediária.....	116
Tabela 9- Coeficiente de correlação (R ²) para os modelos matemáticos Cinética de Ordem zero, Higuchi e Korsmeyer-Peppas aplicados a QHC1, QHC5 e QHC10. ..	119
Tabela 10- Determinação da exatidão do método.....	135
Tabela 11- Coeficiente de variação das amostras empregadas no teste de precisão por repetibilidade e de precisão intermediária.....	136
Tabela 12- Coeficiente de correlação (R ²) para os modelos matemáticos Cinética de Ordem zero, Higuchi e Korsmeyer-Peppas, aplicados a QHD1, e QHD5.	139

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1- Porosidade (%)	67
Equação 2- Grau de Intumescimento.....	69
Equação 3- Exatidão	73
Equação 4- Determinação do teor de fármaco liberado.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACP - Fosfato de cálcio amorfo
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASTM - American Society for Testing and Materials
CPPD - Pirofosfato de cálcio di-hidratado
DCPD - Mono-hidrogênio fosfato de cálcio di-hidratado
DRX - Difração de raios X
DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial
EDS - Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X
EG - Etileno glicol
FTIR - Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier
GD- Grau de desacetilação
GI- Grau de Intumescimento
GPa - Giga pascal
HAC - Ácido acético
HA- Hidroxiapatita
ISO - International Organization for Standardization
MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura
MO - Microscopia Ótica
Mpa - Mega pascal
MTT- brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
OCP - Fosfato octacálcico
OH - Grupo Hidroxila
TCP - Fosfato tricálcio
TPP - Tripolifosfato de Sódio
3D – Três dimensões

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
2.1	Tecido ósseo	24
2.2	Biomateriais.....	27
2.3	Hidroxiapatita.....	28
2.4	Quitosana	32
2.5	Biocompósitos de Quitosana e Hidroxiapatita	35
2.6	Arcabouços.....	37
2.7	Métodos de fabricação de arcabouços e agregação de partículas.....	40
2.8	Dexametasona	42
2.9	Curcumina	44
2.10	Liberção controlada de fármacos.....	48
2.11	Sistemas de Liberção Controlada de fármacos	51
2.12	Cinética de Liberção	55
3	MATERIAIS E MÉTODOS	58
3.1	Materiais	58
3.2	Procedimento Experimental.....	58
3.2.1	Etapa I.....	59
3.2.1.1	Preparação da Quitosana	59
3.2.1.2	Preparação das esferas quitosana/hidroxiapatita.....	59
3.2.1.3	Agregação de partículas e obtenção dos arcabouços.....	61
3.2.2	Etapa II	62
3.2.2.1	Obtenção dos arcabouços de quitosana/hidroxiapatita/curcumina	62
3.2.3	Etapa III	63
3.2.3.1	Obtenção dos arcabouços de quitosana/hidroxiapatita/ dexametason ..	64
3.3	Caracterizações.....	65
3.3.1	Espectroscopia da Região de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	66
3.3.2	Difração de raios X (DRX)	66
3.3.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDS)	67
3.3.4	Microscopia ótica (MO).....	68
3.3.5	Ensaio Mecânico de Compressão	68

3.3.6	Grau de Intumescimento	69
3.3.7	Citotoxicidade	70
3.3.8	Espectrofotômetro (UV- VIS)	71
3.3.8.1	Validação do método analítico	72
3.4	Fluxograma.....	75
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
4.1	Etapa I.....	76
4.1.1	Espectroscopia na Região de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	76
4.1.2	Difração de raios X (DRX)	79
4.1.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDS)	81
4.1.4	Microscopia Ótica (MO)	87
4.1.5	Ensaio de Compressão	89
4.1.6	Grau de Intumescimento	94
4.1.7	Citotoxicidade	95
4.2	Etapa II	96
4.2.1	Espectroscopia na Região de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	96
4.2.2	Difração de raios X (DRX)	99
4.2.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDS)	102
4.2.4	Microscopia Ótica (MO)	106
4.2.5	Grau de Intumescimento	109
4.2.6	Citotoxicidade	111
4.2.7.2	Validação do método analítico por Espectrofotômetro (UV- VIS) para o fármaco curcumina	112
4.2.7.3	Quantificação do teor de curcumina liberado dos arcabouços	117
4.2.7.4	Análise dos modelos matemáticos para os mecanismos de liberação da curcumina nos arcabouços	118
4.3	Etapa III	120
4.3.1	Espectroscopia na Região de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	120
4.3.2	Difração de raios X (DRX)	123
4.3.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDS)	125
4.3.4	Microscopia Ótica (MO)	128

4.3.5	Grau de Intumescimento	130
4.3.6	Citotoxicidade	131
4.3.7	Desenvolvimento e Validação do método analítico para o fármaco curcumina por Espectrofotômetro (UV- VIS)	133
4.3.7.1	Determinação do comprimento de onda de detecção	133
4.3.7.2	Validação do método analítico por Espectrofotômetro (UV- VIS) para o fármaco dexametasona.....	133
4.3.7.3	Quantificação do teor de dexametasona liberado dos arcabouços	136
4.3.7.4	Análise dos modelos matemáticos para os mecanismos de liberação da dexametasona nos arcabouços	138
5	CONCLUSÕES	140
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	142
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	143
	APÊNDICE	154

1 INTRODUÇÃO

Estudos propondo o desenvolvimento de materiais como alternativa para substituir ou restaurar a função de ossos traumatizados, danificados ou perda de massa óssea é uma importante necessidade clínica e socioeconômica, uma vez que é grande a incidência de pacientes, principalmente idosos, que sofrem devido à ausência de um substituto ósseo ideal. As estratégias de produção de substitutos ósseos, embora atraente, ainda não produziram um material com competência funcional e mecânica. Sendo interessante uma abordagem biomimética e a possibilidade de ação terapêutica que permita interação com o tecido, como em sistemas de liberação controlada de fármacos (Li et al., 2007; Almeida & Bártolo, 2014).

Os arcabouços são estruturas tridimensionais, biocompatíveis e biodegradáveis, com composição e morfologia pré-determinada, em que células podem ser implantadas e capazes de suportar a formação de tecido em três dimensões, podendo ser substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar as funções de tecidos, como o tecido ósseo. Para tanto, um dos grandes desafios no campo da engenharia de tecidos é o desenvolvimento de arcabouços que permitam a adesão, proliferação e produção de matriz extracelular à medida que ocorre sua degradação, além de ser necessário estabelecer um equilíbrio adequado entre a porosidade (estrutura de poros e distribuição apropriada) e o desempenho mecânico dos arcabouços (Fontes, 2010; Almeida e Bártolo, 2014; Mainard, 2014; Fook et al., 2010; Barroca, 2008).

Sendo o osso natural um composto inorgânico/orgânico, com fração majoritária da fase inorgânica, onde é encontrada uma fase apatítica com estrutura cristalográfica e composição química semelhante à hidroxiapatita, fórmula química $[Ca_{10} (PO_4)_6 (OH)_2, HA]$. Faz com que, as pesquisas em relação a substitutos ósseos, se concentrem cada vez mais em biomateriais compósitos seguindo uma estratégia biomimética (Landi et al., 2008; Chen et al., 2002; Guastaldi e Aparecida, 2010). O desenvolvimento de biomateriais compósitos, formados por fases inorgânica/orgânica, como por exemplo, compostos à base de fosfatos de cálcio com polímeros, pode proporcionar vantagens como a otimização das propriedades mecânicas, químicas, morfológicas e biológicas, possibilitando aumento do potencial

osteogênico. E, os estudos nesta área têm mostrando resultados consideráveis em substituição óssea e aplicações periodontais e ortopédicas (Chen et al., 2002; Matos et al., 2013; Khor & Lim, 2003).

Muita atenção tem sido dada a hidroxiapatita por suas propriedades biodegradáveis, biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade. E, muitos estudos têm sido direcionados para o uso dela combinada com polímeros, tais como poliácido lático, colágeno, quitosana e polietileno. Dentre estes polímeros, os biopolímeros, como a quitosana, têm recebido maior atenção, devido à sua considerável biocompatibilidade e biodegradabilidade (Li et al., 2007; Chen et al., 2002; Rusu et al., 2005; Martino et al., 2005; Guastaldi e Aparecida, 2010).

A quitosana é um tipo de polissacarídeo extraído de crustáceos, e originado da desacetilação da quitina, que possui características para aplicações biomédicas, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, natureza antibacteriana intrínseca, capacidade de ser moldada em várias geometrias e formas, tais como: géis, membranas, nanofibras, micropartículas, e arcabouços com estruturas porosas, adequadas para manipular e reconstituir a estrutura e função do tecido, facilitando o crescimento dentro das células, podendo promover osteocondução. Além disso, a quitosana pode proporcionar fatores morfogênicos e liberação de agentes farmacêuticos, de forma controlada, devido à sua favorável propriedade gelificante, não-toxicidade, mucoadesividade, tendo capacidade de manipular e reconstituir a estrutura e função do tecido, apresentando consideráveis implicações clínicas. (Martino et al., 2005; Fidèles, 2010; Laus et al., 2006; Piai, 2008; Torres, 2006).

O desenvolvimento dos arcabouços envolve um grande número de tecnologias e as técnicas dependem das propriedades dos materiais envolvidos e da função desejada. A produção de arcabouços tem se dirigido para o desenvolvimento de materiais e o seu uso em novas aplicações, como em sistemas de liberação controlada de fármacos, uma vez que, os dispositivos desempenham um papel não apenas no suporte físico, mas também na proliferação e diferenciação celular (Fontes, 2010; Murphy e Mikos, 2009; Martino et. al., 2005; Duarte, 2009).

Em relação a fármacos, para serem utilizados em aplicações de engenharia de tecidos ósseos, tem-se a dexametasona, que é um glicocorticoide, e tem sido um composto bioativo relevante por ser utilizado em meios osteogênicos para dirigir a diferenciação de células estaminais no sentido da linhagem osteogênica, e agir como substância imunossupressora na tentativa de reduzir a reação inflamatória ou

rejeição de enxertos ósseos produzidos por biomateriais. Outro fármaco que vem sendo investigado é a curcumina, que é um componente polifenólico da *Curcuma longa*, apresenta propriedades antioxidante, anti-inflamatório, antibacteriana, antiparasitários, antimalárica e anticancerígenas. Sendo utilizada como agente terapêutico para prevenção e tratamento de uma grande variedade de diferentes tipos de câncer, incluindo o câncer ósseo (Duarte, 2009; Silva et al., 2008; Yadav et al., 2012; Moorthi et al., 2013; Naksuriya et al., 2014; Morais et al., 2008; Chuah et al., 2014; Dang et al., 2013).

Este trabalho teve como principal objetivo o desenvolvimento de arcabouços constituídos por quitosana/hidroxiapatita/gelatina carregado com curcumina e dexametasona, para estudo em liberação controlada de fármacos. Utilizando estes componentes, buscou-se mimetizar, em termos de composição, o tecido biológico e promover a liberação de fármacos, com o intuito de aplicação em regeneração óssea. Com isto, foi proposta uma metodologia que combina gelificação ionotrópica, para obtenção das esferas, com agregação de partículas, para formação dos arcabouços. Os arcabouços desenvolvidos foram caracterizados em aspecto físico-químico e morfológicos; bem como avaliados em sua viabilidade celular, por meio do Ensaio de Citotoxicidade; e, em função da presença de fármaco nos arcabouços foram realizados ensaios por meio de Espectrofotômetro (UV- VIS) para fornecer a investigação da Liberação dos fármacos, bem como permitir realização da validação do método analítico para quantificação dos fármacos conforme a Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Tecido ósseo

O osso humano é um tecido complexo que vive em constante transformação e exerce funções importantes para o corpo, tais como: suporte estrutural; reservatório mineral; proteção dos órgãos vitais internos e através da medula óssea permite o desenvolvimento do sistema imunitário. Além disso, o osso possui características morfológicas e mecânicas específicas, de modo que, a compreensão das suas propriedades é essencial para a criação artificial de produtos de engenharia de tecidos ósseos. (Fontes, 2010).

O osso humano é um material natural composto por duas fases, uma fase inorgânica entre 50% a 70% de minerais e uma fase orgânica composta por matriz extra celular (colágeno) que representa 30% a 40% do tecido ósseo, além disso, adicionalmente o osso possui cerca de 10% de água. Na fase orgânica, as moléculas de colágeno estão ligadas em cadeias lineares arranjadas em fibras, entre estas moléculas há pequenos compartimentos intersticiais regularmente espaçados, onde estão presentes nano cristais de um sólido inorgânico, que representa cerca de 65% da massa total do osso. Apesar, do componente mineral do tecido ósseo não apresentar composição definida e mostrar variações entre os estágios de maturação e envelhecimento, sua estrutura cristalina e razão Ca/P assemelhavam-se às da hidroxiapatita. No entanto, o osso também é composto por tecido vivo, cerca de 15% da matriz orgânica contem células que incluem: osteócitos, células achatadas na superfície do osso chamadas de células de revestimento; osteoclastos, células de reabsorção que dissolvem os minerais e digerem a matriz óssea; osteoblastos, células progenitoras de osso que produzem matriz óssea (Mota et al., 2008; Guastaldi & Aparecida, 2010).

Macroscopicamente, o osso de um esqueleto completamente desenvolvido, consiste em 80% de osso cortical (ou compacto) e 20% de osso esponjoso (trabecular), Figura 1. O osso compacto distingue-se do osso trabecular pela orientação espacial dos seus componentes minerais e orgânicos, pelas posições características no esqueleto, sendo muito mais denso que o osso trabecular (Fontes, 2010).

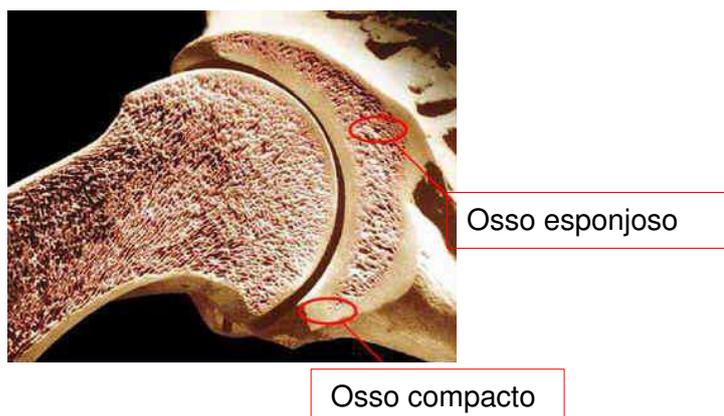


Figura 1- Imagem do osso humano obtida por microscópio electrónico. (Site: Central da Fisioterapia, assessment 2014).

O osso compacto consiste numa parte exterior tubular dos ossos longos e da superfície externa dos ossos pequenos e ossos chatos, figura 2. A unidade estrutural do osso compacto é chamada de ósteons, que são lamelas de matriz óssea concêntricas em torno de um canal central chamado canal de Havers. Cada ósteon é um cilindro paralelo orientado ao longo eixo do osso, e têm cerca de 200-250 μ m de diâmetro. O osso compacto ocupa grande parte do esqueleto humano e possui alta densidade e uma baixa área de superfície. A densidade deste tipo de osso situa-se entre 1800-2000 kg/m³. E, as propriedades mecânicas são fortemente influenciadas pelo nível de mineralização, porosidade e organização da matriz sólida, que por sua vez variam com a posição no esqueleto. O comportamento mecânico do osso compacto já foi sujeito a vários estudos em testes de compressão, efetuados ao osso compacto da tíbia e fémur o módulo de rigidez varia entre 8,7 a 14,1 GPa (Dorozhkin, 2007; Fontes, 2010; Guastaldi & Aparecida, 2010).

Ao contrário do osso compacto, o osso trabecular possui uma aparência esponjosa, ilustrada nas figuras 1 e 2. O diâmetro do osso trabecular varia entre 50-300 μ m e possui uma maior área superficial. Constituído por uma repetição de hastes e suportes chamado trabéculas pouco organizadas, o osso trabecular tem uma estrutura aleatória. O osso trabecular é mais ativo metabolicamente, significando que é remodelado mais vezes e por consequência é mais novo que o osso compacto. Deve-se notar que as propriedades mecânicas dos ossos variam de acordo com a idade. Variando em relação a localização no corpo, a densidade aparente do osso trabecular chega a estar de 14 entre 100 e 900 Kg/m³. A sua tensão de compressão

varia entre 4 a 12 MPa e o seu módulo de rigidez pode ir de 0,02 a 0,5 GPa (Fontes, 2010; Guastaldi & Aparecida, 2010) .

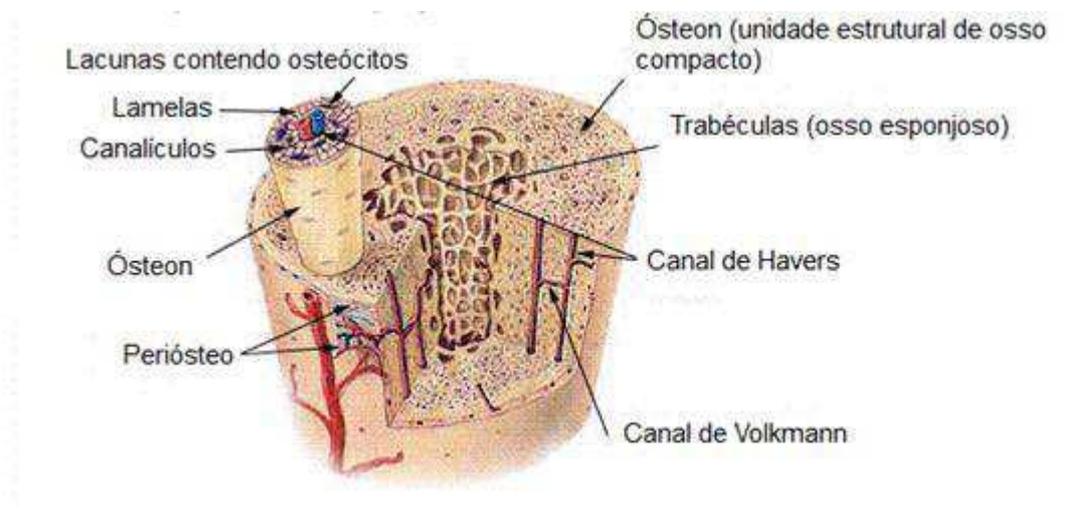


Figura 2- Estrutura do osso trabecular e compacto. (Adaptado de Fontes, 2010).

O osso humano tem grande capacidade de crescimento, regeneração e remodelação. E, o ambiente mecânico em que está envolvido tem grande influência nesses processos. As cargas solicitadas pelo osso têm implicações fisiológicas significativas e ligação direta com a modelação óssea, uma vez que, a falta de cargas promove atrofia dos tecidos e a perda de densidade óssea, pois durante o crescimento e desenvolvimento o esqueleto aperfeiçoa a sua estrutura conforme as cargas a que está sujeito no dia-a-dia (Bohner, 2000).

A reparação e a regeneração óssea são consideradas como uma sequência de atividade celular, começando com uma resposta inflamatória aguda, ocorrendo com base de sinais mecânicos e biológicos. O sucesso da reparação e regeneração do osso dependerá de uma série de processos que envolvem: acoplamento mecânico, ou seja, conversão de forças mecânicas locais em sinais que iniciam uma resposta das células ósseas; acoplamentos bioquímicos, ou seja, transformação do sinal mecânico para um bioquímico, resposta envolvendo percursos dentro da membrana celular e do citoesqueleto; sinalização entre células, seguindo das células sensor (osteócitos) para células remodeladoras (osteoblastos e osteoclastos), utilizando prostaglandinas e óxido nítrico como sinalização de moléculas; formação ou reabsorção óssea para causar as mudanças adequadas na arquitetura óssea,

essas mudanças tendem a ajustar e melhorar a estrutura óssea ao seu ambiente mecânico (Fuchs, et al., 2001; Bohner, 2000; Fontes, 2010).

2.2 Biomateriais

O conceito de Biomaterias é motivo de várias discussões entre autores, diante disso, têm-se várias definições, incluindo que os Biomateriais são materiais sintéticos ou naturais usados para substituir partes individuais do organismo ou utilizados em dispositivos médicos que ficam em contato com sistemas biológicos, objetivando o tratamento ou substituição de tecidos individuais, órgãos inteiros ou algumas funções exercidas por eles. Outras definições incluem uma substância sistemática e farmacologicamente inerte projetada para implantação ou incorporação em sistemas vivos, ou materiais de origem sintética ou natural em contato com tecido, sangue e líquidos biológicos e destinados para uso em aplicações protéticas, diagnósticas, terapêuticas e de armazenamento, sem afetar o organismo vivo e seus componentes. Podem também ser definidos como "toda a substância (à exceção de fármacos) ou combinação de substâncias, sintéticas ou naturais, que podem ser usadas por qualquer período de tempo, no conjunto ou como uma parte de um sistema que trate, aumente, ou substitua tecidos, órgãos, ou funções do corpo" (Amaral et al., 2003; Park & Bronzino, 2002; Rangel, 2012).

A evolução dos biomateriais é relativamente recente, no entanto, é possível dividi-la em três gerações: (i) primeira geração de biomateriais, implantes ósseos (primeira articulação do quadril em 1961); (ii) segunda geração de biomateriais, dispositivos bioativos (iniciou-se nos anos 70) e (iii) terceira geração, engenharia de tecidos (até a atualidade). A área de biomateriais engloba o conhecimento e a colaboração de diversas especialidades, desde o comportamento mecânico até funções biológicas a nível molecular nos tecidos, passando pela engenharia de materiais, onde são desenvolvidos sistemas com propriedades adequadas a determinadas aplicações no organismo. A evolução atual dos biomateriais depende dos avanços das diversas áreas, e de maneira global da biotecnologia e da ciência dos materiais (Amaral, et al., 2003; Rangel, 2012).

De fato, os biomateriais são materiais desenvolvidos com o intuito de melhorar a qualidade de vida dos seres humanos, possibilitando o tratamento,

substituição e regeneração de alguma parte do corpo para a qual este material foi projetado, de forma que possa interagir sem vir a causar qualquer tipo de dano ao corpo. Assim, materiais utilizados para a substituição e regeneração da estrutura óssea enquadram-se na classe de materiais denominados biomateriais. Estes materiais devem apresentar um conjunto de propriedades físicas, químicas e biológicas que permitam desempenhar a função desejada, além de estimular uma resposta adequada dos tecidos vivos. (Guastaldi & Aparecida, 2010)

A pesquisa em questão envolve um biopolímero (Quitosana) e uma biocerâmica (Hidroxiapatita). Os biopolímeros constituem uma importante fonte de materiais com grande versatilidade química e elevado potencial de aplicações. As suas propriedades podem ser facilmente alteradas por diferentes métodos químicos e físicos e permitindo a otimização e seleção de propriedades importantes (Rangel, 2012). Já as biocerâmicas são materiais biocompatíveis mono ou policristalinos, que apresentam fortes ligações químicas entre os átomos constituintes, que se traduzem em elevada dureza, elevada temperatura de fusão, com fraca resistência a forças de tração, mas moderada resistência a forças de compressão e boa resistência ao desgaste. Estes materiais podem ser de ocorrência natural ou sintética e estão entre os mais promissores biomateriais para arcabouços de tecidos duros (Fontes, 2010; Guastaldi & Aparecida, 2010).

2.3 Hidroxiapatita

Os fosfatos de cálcio apresentam-se hoje como os principais materiais estudados e empregados como biomaterial para a reposição e regeneração do tecido ósseo, pois apresentam como principais características: semelhança com a fase mineral de ossos, dentes e tecidos calcificados; excelente biocompatibilidade; bioatividade; ausência de toxicidade; taxas de degradação variáveis; osteocondutividade (indicam o caminho para o crescimento ósseo, fazendo que ocorra sobre a superfície ou através dos poros) (Fontes, 2010). A tabela 1, relaciona diversos fosfatos de cálcio e suas ocorrências em sistemas biológicos.

Tabela 1- Ocorrência dos fosfatos de cálcio em sistemas biológicos.

Fosfato de cálcio	Ocorrências
Hidroxiapatita (HA)	Esmalte, dentina, osso, cálculo dentário e urinário
Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	Cálculo dentário e urinário
Fosfato octacálcico (OCP)	Cálculo dentário e urinário
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio di-hidratado (DCPD)	Cálculo dentário e ossos decompostos
Fosfato tricálcio (TCP)	Cálculo dentário e urinário, pedras salivares, cáries dentárias. Calcificação de tecido mole
Pirofosfato de cálcio di-hidratado (CPPD)	Depósitos de pseudo-gotas em fluidos

Fonte: (Guastaldi & Aparecida, 2010).

A hidroxiapatita é um fosfato de cálcio, e a biocerâmica mais utilizada na área médica e ocupa lugar de destaque por apresentar-se quimicamente e estruturalmente muito similar à fase mineral do osso, preenchendo pré-requisitos biológicos importantes para sua interação com meios orgânicos. Além de ser o constituinte mineral natural encontrado no osso representando de 30 a 70% da massa dos ossos e dentes (55% da composição de ossos, 96% da composição do esmalte dentário e 70% da dentina), correspondendo a cerca de 5% do peso total de um indivíduo adulto (Camargo et al., 2009; Libonati et. al, 2014; Mavropoulos,1999).

Em 1926, foi observada a semelhança entre os padrões de difração de raios-X dos nanocristais inorgânicos do osso e de um composto de fosfato de cálcio. Apesar, do componente mineral do tecido ósseo não apresentar composição definida e mostrar variações entre os estágios de maturação e envelhecimento, sua estrutura cristalina e razão Ca/P assemelhavam-se às da hidroxiapatita, apresentando ainda a presença de íons Na^+ , Mg^{2+} e CO_3^{2-} e em menor quantidade K^+ , F^- e Cl^- , podendo ser caracterizada como uma hidroxiapatita carbonatada de



composição representada por:

onde \square representa as possíveis substituições catiônicas.

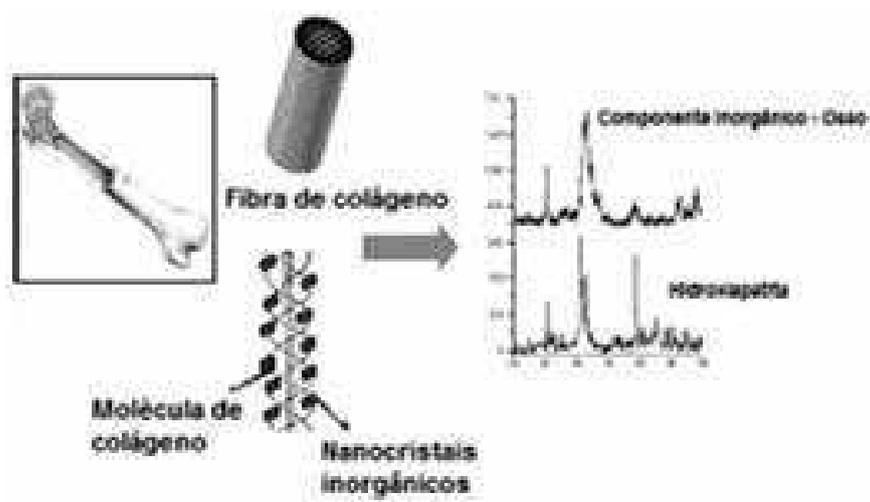


Figura 3- Arranjo de Hidroxiapatita e do colágeno no tecido ósseo e semelhança dos padrões de difração de raios X do componente inorgânico do tecido ósseo e da HA.(Guastaldi & Aparecida, 2010).

A hidroxiapatita é similar ao osso natural em relação à porosidade, cristalinidade e a razão molar cálcio-fósforo. A fórmula química $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, pode escrita também como $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, mostrando que há 2 unidades de fórmula na célula unitária. Cristaliza-se no sistema hexagonal com grupo espacial $\text{P6}_3/\text{m}$, onde P indica que é um sistema hexagonal primitivo. Onde, $a = b = 9,43 \text{ \AA}$, $c = 6,88 \text{ \AA}$, $a = b = 90^\circ$ e $\gamma = 120^\circ$. Os átomos de cálcio estão localizados em sítios não equivalentes, sendo 4 no sítio I (Ca1) e 6 no sítio II (Ca2), e os íons OH^- ocupam os denominados sítios canais, Figura 4 (Dalapícula et al., 2006).

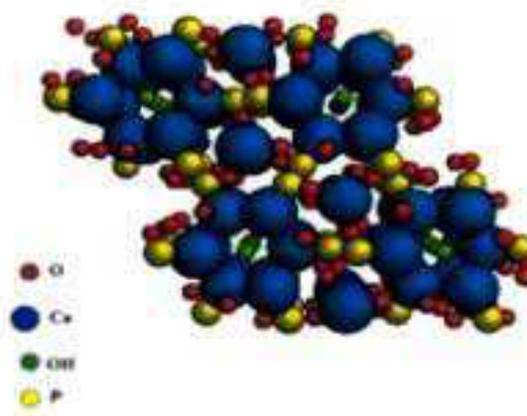


Figura 4- Representação esquemática da estrutura cristalina da hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Fontes, 2010).

A estrutura cristalina da HA lhe confere uma de suas mais importantes propriedades, a facilidade de substituições catiônicas e aniônicas, sendo referida como capaz de incorporar metade dos elementos da tabela periódica em sua estrutura. Íons Ca^{2+} podem ser substituídos por um grande número de cátions metálicos mono e divalentes, tais como o K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} , e íons trivalentes de elementos terras raras. A diferença de valência causada por qualquer substituição requer uma redução na carga aniônica para manter o balanço de carga. Íons PO_4^{3-} podem ser substituídos por íons AsO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} , SiO_4^{4-} , VO_4^{3-} e os íons OH^- por íons CO_3^{2-} , F^- , Cl^- . Todas as substituições podem alterar a cristalinidade, os parâmetros de rede, as dimensões dos cristais, a textura superficial, a estabilidade e a solubilidade da HA que, por sua vez, alteram a degradação e o comportamento *in vivo*. O íon CO_3^{2-} pode fazer tanto substituições no sítio do OH^- , originando a denominada HA carbonatada do tipo A, quanto no sítio do PO_4^{3-} , originando HA carbonatada do tipo B. Para estas substituições ocorrem efeitos opostos nos parâmetros de rede: substituição do tipo A causa expansão no eixo a e contração no eixo c, enquanto que a substituição do tipo B causa contração no eixo a e expansão no eixo c. Além disso, a substituição do tipo B acarreta também a diminuição do tamanho dos cristais e da cristalinidade. As substituições catiônicas por Sr^{2+} e Mg^{2+} causam aumento da solubilidade. Nos organismos vivos, sua facilidade de substituições catiônicas e aniônicas faz com que a HA atue como reserva de cálcio e fósforo e um sistema regulador de diferentes íons nos líquidos corporais por meio de sua liberação ou armazenamento (Guastaldi & Aparecida, 2010; Dantas et al. 2011).

Nas últimas décadas a hidroxiapatita tem sido extensamente estudada como alternativa para aplicações de implantes biomédicos e regeneração do osso, devido à sua bioatividade, biocompatibilidade, porosidade e osteocondutividade. Alguns autores afirmam que a característica mais importante da HA é a osteocondutividade, por permitir a reposição do novo tecido ósseo, a partir do osso pré-existente, funcionando como arcabouço para as células osteoprogenitoras se fixarem e permitirem que os vasos sanguíneos proliferem e levem os componentes necessários à formação óssea, induzindo, assim, o crescimento ósseo no interior do enxerto, promovendo estabilidade e manutenção do volume (Fontes, 2010; Landi et al, 2008; Chen et. al., 2002; Dantas et al. 2011).

A hidroxiapatita em superfície porosa pode fornecer um substrato adicional à proliferação do tecido ósseo, permitindo a junção, proliferação, migração e expressão fenotípica de células ósseas, o que resultará em formação de novo osso, em aposição direta ao biomaterial. Estas propriedades somadas à sua alta capacidade de adsorver e/ou absorver moléculas fazem da hidroxiapatita um excelente suporte para ação prolongada de drogas anticancerígenas no tratamento de tumores ósseos (Horta, 2012; Mavropoulos, 1999; Jones et al. 2009).

Apesar de todas as vantagens exibidas pela HA seu uso clínico é limitado devido a fatores como limitações mecânicas e sua lenta biodegradação, mesmo que alguns autores considerem como positivo os padrões de reabsorção e degradação lentos, em que se observam a neoformação óssea ao redor das partículas de HA (Chen et. al., 2002; Fontes, 2010).

A reabsorção e biodegradação das cerâmicas de fosfato pode ser causada por 3 mecanismos: dissolução físico-química; desintegração física em pequenas partículas, devido a ataque químico preferencial dos limites de grão; e fatores biológicos, tais como os fagócitos, o que diminui o pH locais. Estudos efetuados por longos períodos de tempo têm mostrado que a HA começa a ser reabsorvida gradualmente após 4 a 5 anos de implantação, e a reabsorção é uma característica desejada para biomateriais nos quais o processo de degradação é concomitante com a reposição do osso em formação, como no caso de arcabouços (Finisic et al., 2001; Dalapícula et al., 2006).

A aplicação da HA pura é limitada devido à propriedade mecânica, e sua fratura frágil e muitos estudos tem tentado melhorar as propriedades mecânicas da HA, e uma das alternativas é modifica-la por meio de combinação com polímeros, tais como o ácido polilático, o colágeno, quitosana, polietileno. Entre estes polímeros, os biopolímeros têm recebido muita atenção no campo de aplicações médicas, devido à sua excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade (Dalapícula et al., 2006; Chen et. al., 2002; Fontes, 2010).

2.4 Quitosana

A quitosana é um tipo de polissacarídeo e polímero natural, geralmente obtido pelo processo de desacetilação da quitina. A quitina foi isolada pela primeira

vez em 1811 por Braconnot, trinta anos antes do isolamento da celulose, a partir de fungos. O nome quitina vem do grego “*chiton*”, que significa cobertura ou envoltura. Amplamente encontrada na natureza, a quitina encontra-se na matriz da estrutura esquelética de invertebrados, como artrópodes, anelídeos, moluscos e celenterados, em algas diatomáceas, e também está presente na parede celular de alguns fungos, como ascomicetos, zigomicetes, basidiomicetes e deuteromicetos. É provável que as futuras fontes de quitina e quitosana sejam originadas de inovações na biotecnologia, especialmente quando o foco são as aplicações médicas (Chen et al., 2002; Rangel, 2012; Campana et al., 2007; Covas, 2006; Khor & Lim, 2003).

A quitina é um copolímero, poli-2-acetamida-2-desoxi-β-(1,4)-D-glucopiranosose, formado por unidades aleatórias ou de blocos de N-acetilglucosamina e N-glucosamina distribuídos ao longo da cadeia. Quando o número de N-acetil-unidades de glucosamina é menor que 50%, o biopolímero é denominado quitina, por outro lado, quando este número é mais elevado, o termo quitosana é utilizado, gerando um polissacarídeo catiônico natural; ou seja, quando o grau de desacetilação de quitina atinge cerca de 50% (dependendo da origem do polímero), torna-se solúvel em meio ácido aquoso e é chamado de quitosana. A molécula de quitosana é um copolímero composto por N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosose e 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosose, Figura 5, onde os dois tipos de unidades de repetição estão ligadas por (1→4)-β-glicosídica, estas unidades estão distribuídas em diferentes graus de acordo com o grau das porções acetiladas, dependendo da fonte e procedimento de preparação, o grau de desacetilação pode variar de 50% a 95% e o peso molecular pode variar de 300 a cerca de 1000 kDa. (Finisic et al., 2001; Khor & Lim, 2003; Jiang et al., 2008; Rinaudo, 2006).

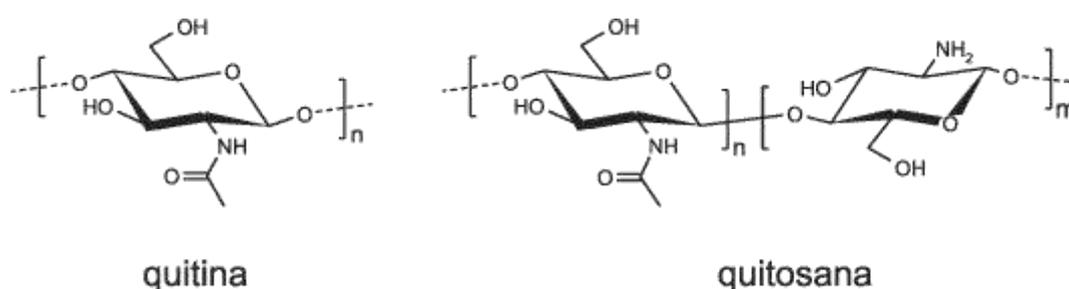


Figura 5- Estrutura da quitina e quitosana. (Silva et. al, 2006).

A quitosana tem sido pesquisada em várias aplicações, por ser encontrada em várias formas no que se refere ao peso molecular médio e grau de desacetilação, devido à ampla gama de compostos abrangidos por este termo. Esta diversidade é aumentada exponencialmente pela fácil modificação química da quitosana, uma vez que, este biopolímero catiônico possui solubilidade em ácidos diluídos, tornando-se solúvel em soluções aquosas, tendo capacidade de ser moldada em várias geometrias e formas, tais como: géis, membranas, nanofibras, micropartículas, e arcabouços com estruturas porosas, adequadas para manipular e reconstituir a estrutura e função do tecido. (Piai, 2008; Baldino et. al. 2014; Khor & Lim, 2003; Rinaudo, 2006; Chen et. al., 2002; Martino et al.,2005; Laus et al., 2006).

Diferentes métodos têm sido utilizados para preparar partículas de quitosana dentre elas tem-se: a separação de fase (coacervação), técnica de evaporação/extração de solventes, a técnica emulsão cross-linking, secagem por pulverização e gelificação ionotrópica. Na técnica de gelificação iónotrópica a quitosana é dissolvida numa solução ácida, esta solução é então desprendida da agulha, gota a gota, e ficam dispersas numa solução coagulante, sob agitação constante. A reação entre as espécies de carga oposta, faz com que o quitosana se submeta a gelificação iónotrópica e precipitando na forma de partículas esféricas. (Kean e Thanou, 2010; Dash et al., 2011; Baldino et al., 2014).

A quitosana oferece grandes possibilidades ser empregada em aplicações biomédicas, uma vez que possui características interessantes tais como: biocompatibilidade, biodegradabilidade, natureza antibacteriana intrínseca. De modo que, a quitosana vem sendo estudada em aplicações na engenharia de tecidos, em especial no campo da engenharia de tecidos ósseos. Características interessantes que tornam a quitosana apropriada para esta finalidade é seu baixo custo, disponibilidade em larga escala, biocompatibilidade, mínima reação como corpo estranho, natureza antibacteriana intrínseca, e a capacidade de ser moldada em estruturas porosas, adequadas para o crescimento para dentro de células e permitir osteocondução (Chen et. al., 2002; HUANG et. al, 2005; Li & Jiang, 2004; JIANG et al., 2008; Baldino et. al. 2014).

Na área farmacêutica, a quitosana pode proporcionar fatores morfogênicos e liberação de agentes farmacêuticos, de forma controlada, devido à sua favorável propriedade gelificante, não-toxicidade, mucoadesividade, tendo capacidade de manipular e reconstituir a estrutura e função do tecido, apresentando consideráveis

implicações clínicas. E, tem sido utilizada como um transportador potencial para administração prolongada de fármacos específicos e macromoléculas, e em formulações de administração oral, nasal, transdérmica e tópica, e na obtenção de nanopartículas para veiculação de proteínas, vacinas e DNA. A quitosana em formato de esferas permite que o fármaco seja encapsulado e a liberação ocorra em lugar específico do tratamento, através de fatores que podem ser manipulados para atingir o perfil de liberação desejado, tais como: escolha da formulação de várias combinações do fármaco/polímero, a quantidade do fármaco, a cinética de liberação, o método de microencapsulação, o peso molecular do polímero, a morfologia da partícula (tamanho e forma) e etc (Martino et. al., 2005; Kean e Thanou, 2010; Sinha et al., 2004; Jayakumar et al., 2011; Maheshwari, et al., 2006).

Para melhorar as propriedades mecânicas e/ou biológicas da quitosana, tem sido sendo amplamente estudada a mistura com outros polímeros. Um polímero que merece destaque neste aspecto é a gelatina, uma vez que, quando misturada com a quitosana pode melhorar a atividade biológica, permitindo a adesão celular e migração, além de formar um complexo polielectrolítico. Arcabouços de gelatina-quitosano tem sido formado e testado em vários tecidos, incluindo regeneração de pele, cartilagem, e osso (Huang et. al, 2005).

2.5 Biocompósitos de Quitosana e Hidroxiapatita

Os compósitos são materiais cuja composição contém dois ou mais tipos de materiais diferentes, provenientes das classes convencionais (metais, cerâmicos e polímeros). Normalmente são utilizados quando a aplicação exige uma combinação de propriedades que não podem ser obtidas se os materiais forem usados isoladamente. Portanto, devido às limitações próprias de cada um dos biomateriais, tem sido investigada a combinação de materiais de diferentes características para construção de biocompósitos arcabouços, para aplicações específicas, como em aplicações de engenharia de tecido ósseo. O desenvolvimento de biomateriais compósitos tem como objetivo combinar as propriedades individuais de cada material, e otimizá-las podendo proporcionar adequadas propriedades mecânicas, químicas, morfológicas, e biológicas, como taxas de degradação e absorção,

bioatividade e biodegradabilidade (Ratner et al., 2004; LI et al., 2007; Matos et. al., 2013).

Do ponto de vista biológico, a formação de um biocompósito a partir da combinação entre fração de polímeros e cerâmicas, para fabricação de um arcabouço na perspectiva de regeneração óssea, é uma estratégia natural e biomimética, já que o osso consiste da combinação de um polímero natural juntamente com uma apatita natural. E, do ponto de vista de ciências dos materiais, a combinação de materiais como polímeros e cerâmicas pode gerar um material compósito que possibilite a otimização de propriedades destes materiais, tornando-se mais adequado a aplicação desejada (Chen et. al., 2002; Chen et al., 2008; Sampaio, 2014).

Atualmente, existem vários biomateriais utilizados no desenvolvimento de arcabouços, cada um deles com as suas vantagens e desvantagens. A presente pesquisa focou seu estudo na utilização de um biocompósito formado por hidroxiapatita combinada com quitosana. Compósitos formados por fases inorgânica/orgânica, como compostos a base de cálcio e polímeros, para uso potencial como materiais substitutos do tecido ósseo, geram vantagens, tais como: otimização de propriedades mecânicas e biológicas, melhoramento do potencial osteogênico, e inibição da migração dos compostos de cálcio, além de obter elevada bioatividade e propriedades de ligação. Os estudos a partir de materiais compósitos à base de polímero para obter biomateriais inteligentes, têm mostrado resultados consideráveis em muitas aplicações de engenharia de tecidos, tais como, substituição óssea e aplicações periodontais (Chen et. al., 2002; Khor & Lim, 2003, Rusu et. al., 2005).

As pesquisas desenvolvendo biocompositos formados por hidroxiapatita (HA) e quitosana, tem mostrado resultados significativos em relação á formação de arcabouços para regeneração óssea. No entanto, ainda se faz necessário o desenvolvimento adequado em relação a propriedades como porosidade e propriedade mecânicas. Além disso, a morfologia final dos compósitos é uma outra propriedade importante que influencia a funcionalidade destes materiais; ela é afetada por condições de reação, tais como: concentração, temperatura, pH, conformação 3D, tempo e interação. Geralmente, a morfologia do compósito pode variar amplamente dependendo da versatilidade geométrica fornecida pela matriz

polimérica (filmes, micro e nanopartículas, membranas, cimentos, etc.) e a aplicação pretendida (Chen et. al., 2002; Peniche et. al, 2010; Huang et. al, 2005).

2.6 Arcabouços

A engenharia de tecidos tem atraído muitos cientistas com o intuito de tratar doentes de uma maneira minimamente invasiva e menos dolorosa, aplicando métodos derivados da engenharia e da biomedicina, para a produção e construções artificiais direcionadas a regeneração de tecidos. Além disso, o objetivo geral da engenharia de tecidos é isolar as células específicas de um paciente, e cultivá-las em uma estrutura tridimensional biodegradável, em condições controladas, podendo ser transplantado para o local desejado no corpo do paciente, promovendo, assim, a formação de um novo tecido (Baldino et. al. 2014; Fontes, 2010; Barbanti et. al, 2005), como mostra a Figura 6, abaixo.

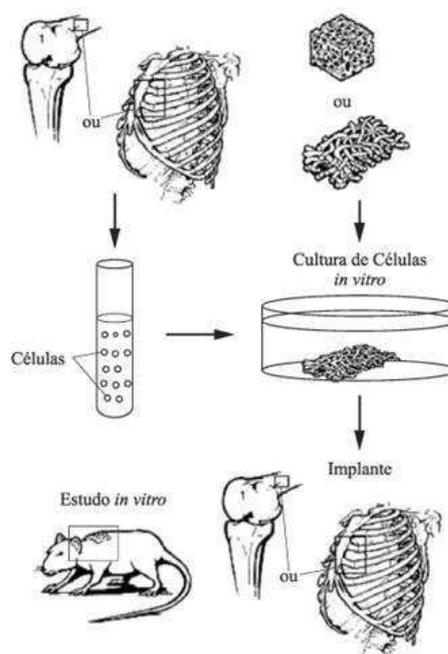


Figura 6- Representação esquemática da engenharia de tecidos, onde populações de células específicas são isoladas e cultivadas em um arcabouço biodegradável (Barbanti et. al, 2005).

A estrutura tridimensional biodegradável é denominada de arcabouços, que são estruturas artificiais porosas com composição e morfologia pré-determinadas, em que células são implantadas e capazes de suportar a formação de tecido em três

dimensões, podendo ser substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar as funções de tecidos. Desse modo, estes suportes devem ser biocompatíveis, biodegradáveis, porosos, além de possuírem taxa de degradação correspondente a taxa de regeneração do tecido novo. De modo que, os arcabouços devem proporcionar suporte mecânico e vascular temporário para a regeneração do tecido, enquanto o tecido em crescimento está sendo formado. (Almeida & Bártolo, 2014; Fontes, 2010).

O maior desafio na construção de um arcabouço é estabelecer um equilíbrio adequado entre a porosidade e o desempenho mecânico dos arcabouços. Uma vez que, na engenharia de tecidos, a formação de tecido com propriedades desejáveis depende fortemente das propriedades mecânicas dos arcabouços, a nível macroscópico e microscópico. Macroscopicamente, o arcabouço deve suportar cargas para fornecer estabilidade para os tecidos ao mesmo tempo em que eles estão sendo formados, cumprindo sua função de manutenção de volume. Em nível microscópico, o crescimento e diferenciação celular e a formação de tecido final é dependente da carga mecânica de entrada das células. Assim, o arcabouço tem que ser capaz de resistir a cargas específicas e transmiti-las de forma adequada para as células e os tecidos em crescimento e circundantes (Almeida & Bártolo, 2014; Fook, 2012).

As tentativas de produção de diferentes materiais biológicos (ossos, cartilagens, nervos, tendões, vasos, válvulas cardíacas, da pele, etc) mostram que cada tipo de tecido exige diferentes características morfológicas e requisitos que dependem principalmente do tecido a ser restaurado, da localização e do tamanho do defeito a ser tratado. Os requisitos para o material ser utilizado em aplicações em engenharia de tecidos são complexos e em muitos casos, não há consenso entre a comunidade científica sobre as características específicas que estes devem possuir para uma aplicação particular. No entanto, existem algumas características gerais que são comuns a todos os tecidos, e que o material do arcabouço deve possuir, sendo:

- Ser biocompatível, ou seja, o material do arcabouço e os seus produtos de degradação, não podem provocar uma resposta do sistema imunitário do corpo ou possuir qualquer substância tóxica;

- Ter propriedades mecânicas adequadas, i.e. o arcabouço deve possuir uma resistência mecânica suficiente para suportar tensões existentes no ambiente onde é implantado;
- Ter uma degradação controlada, porque os tecidos têm diferentes taxas de regeneração, a taxa de degradação do arcabouço tem que ser ajustada ao tecido a ser reparado, levando-se em conta que as propriedades mecânicas deste também diminuem com a degradação;
- Ter tamanho e morfologia dos poros apropriada, uma vez que, a porosidade, o tamanho e a estrutura dos poros são fatores com grande importância no transporte de nutrientes (Fontes, 2010; Baldino et. al. 2014; Horta, 2012).

A fabricação dos arcabouços tem um papel crítico na criação de um novo tecido quer seja *in vivo* ou *in vitro*, e tem como funções principais promover a migração e adesão celular e fornecer fatores bioquímicos, para permitir a difusão de nutrientes vitais às células e exercer influências mecânicas e biológicas para modificar o comportamento da fase celular, tendo a função de tentar replicar as funções das matrizes extracelulares compreendendo a sua estrutura, interação com as células e principais suas funções (Fook, 2012; Bohner, 2000).

Existem vários biomateriais utilizados no desenvolvimento de arcabouços, cada um deles com as suas vantagens e desvantagens. E, os três principais tipos de materiais investigados para o uso em arcabouços são: os polímeros naturais, tais como quitina, quitosana, amido, colágeno; os polímeros sintéticos, a base de Poliacido láctico (PLA), Poliacido glicólico (PGA) e seus copolímeros (PLGA); e cerâmicas, tais como hidroxiapatita (HA) e β -fosfato tricálcio (β -TCP). Os polímeros naturais oferecem grande potencial em termos de biocompatibilidade, porém podem existir grandes variações em seus grupos como também inadequado desempenho mecânico. As cerâmicas também são muito utilizadas em função da alta biocompatibilidade e semelhança com o componente inorgânico natural dos ossos, entretanto, são inerentemente frágeis o que limita sua aplicabilidade. Em função das limitações próprias de cada um dos biomateriais, têm sido investigada a combinação de materiais de diferentes características na construção de arcabouços. E, para arcabouços empregados em regeneração de tecidos ósseos, destacam-se os compósitos de PCL – HA, PGA – HA e colágeno – quitosana, e compósitos

formados por HA/quitosana. Estas combinações tem como objetivo melhorar as propriedades mecânicas, taxas de degradação e absorção, os índices de biocompatibilidade e biodegradabilidade dos arcabouços (Fontes, 2010; Buckley e O'Kelly, 2004; Chen et. al., 2002; Chen et. al., 2013).

2.7 Métodos de fabricação de arcabouços e agregação de partículas

O desenvolvimento dos arcabouços envolve um grande número de tecnologias para produção de estruturas adequadas fisicamente e em relação à biocompatibilidade e biodegradabilidade. As técnicas de fabricação de arcabouços dependem das propriedades dos materiais envolvidos e da função final desejada, e diversas técnicas têm sido estudadas e desenvolvidas para atender as propriedades necessárias para uma aplicação ser efetiva. (Fontes, 2010; Murphy e Mikos, 2009; Martino et. al., 2005; Duarte, 2009).

A técnica selecionada para o processamento do arcabouço, deve garantir que todas as características do arcabouço sejam cumpridas, portanto, deverá atender aos seguintes critérios: o processamento não pode afetar as propriedades dos materiais, mais precisamente a biocompatibilidade; a técnica deve ser o mais precisa possível, para que permita uma boa obtenção de propriedades, sobretudo a porosidade e o tamanho, a distribuição e a interconectividade dos poros; a reprodutibilidade do processamento e das propriedades deve ser garantida. (Salgado et al., 2004; Tavares, 2014)

Foram desenvolvidas várias técnicas de processamento com o objetivo de produzir arcabouços com propriedades adequadas para a engenharia de tecido ósseo, entre as mais utilizadas podem referir-se: a técnica baseada na evaporação do solvente, a eletrofiliação ou eletrospinning, a prototipagem rápida, e a técnica de separação de fases termicamente induzida (TIPS) combinada com a liofilização. Cada método apresenta distintas vantagens e desvantagens, e não existe uma técnica que seja universal para todas as aplicações, então, as propriedades do arcabouço devem ser priorizadas, de modo a selecionar o método de fabricação mais apropriado, bem como se deve considerar o tempo e o custo de produção. (Salgado et al., 2004; Tavares, 2014; Fontes, 2010; Murphy e Mikos, 2009).

O método utilizado para desenvolver os arcabouços desta pesquisa, foi o método de gelificação ionotrópica combinado com o de agregação de partículas. A técnica de geleificação ionotrópica consiste na reticulação iônica de grupos do polímero com contra-íons multivalentes, formando partículas esféricas. As partículas são formadas após a solução polimérica ser lançada através do orifício de um tubo fino ou seringa em uma solução reticulante para formar as microgotas, cujo tamanho será dependente do diâmetro do orifício e da velocidade de saída do material (Queiroz, 2011; Donbrow, 1992; Silva et. al, 2003).

Partículas de quitosana têm sido preparadas por geleificação ionotrópica, de modo que, a quitosana é dissolvida numa solução ácida aquosa tornando a quitosana solúvel, e esta solução é então desprendida de uma agulha, gota a gota, em que, ficam dispersas numa solução coagulante, sob agitação constante. A reação entre as espécies de carga oposta, faz com que a quitosana se precipite na forma de partículas esféricas. Ko et al. (2002) prepararam microesferas de quitosana pela técnica de gelificação ionotrópica utilizando o tripolifosfato como agente físico de reticulação, encapsulando a felodipina. A liberação do fármaco a partir das microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato (TPP) diminuiu quando o tempo de reticulação foi aumentado. Esta técnica é interessante para obtenção de partículas esféricas com diâmetros controlados. E promover estudos de como combiná-la com outras técnicas, como a agregação de partículas, pode ser uma alternativa importante para obtenção de estruturas tridimensionais com composições pré-definidas (Queiroz, 2011; Sinha et al., 2004; Jayakumar et al., 2011; Lourenço, 2006; Balan e Verestiuc, 2014; Lacerda et al., 2014).

Uma abordagem inovadora para desenvolver arcabouços está baseada no método de agregação de partículas esféricas por meios físicos ou químicos. Esta técnica mostra-se interessante por permitir um controle da porosidade através do diâmetro das partículas, devido aos interstícios quando as partículas são aglomeradas. Outra vantagem é a possibilidade de incorporar grandes quantidade de moléculas no interior das partículas, de modo que, além de, fornecer um suporte físico para adesão celular, poderiam servir como carreadores para liberação de agentes bioativos, tais como fármacos. (Malafaya et. al., 2005; Gomes et al., 2005; Fidèles, 2014). Sinha et al., 2004 e Malafaya et. al., 2005 produziram arcabouços de quitosana pelo método de agregação de partículas para avaliar o potencial de

aplicação como biomaterial em engenharia de tecidos, e observou adequada morfologia, estabilidade mecânica e biocompatibilidade *in vivo*.

2.8 Dexametasona

A Dexametasona (DEX) é 9- α -flúor-11 β -, 17 α , 21-triidroxi-16 α -metilpregna-1,4-dieno-3, 20-diona, cuja fórmula estrutural está apresentada na figura 7, tem fórmula molecular $C_{22}H_{29}FO_5$, e massa molar de 392,47 g/mol. (Bergamin, 2008; Ferrony, 2009).

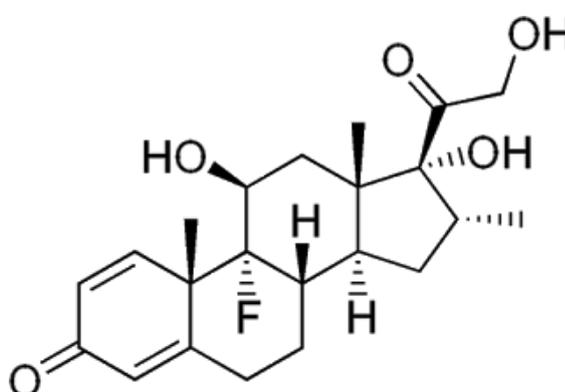


Figura 7- Estrutura química da dexametasona. (Ferrony, 2009).

A dexametasona é um potente corticosteróide sintético, derivado do núcleo ciclopentanoidrofenantreno que apresenta atividade glicorticóide e anti-inflamatória. É um derivado fluorado da prednisolona e isômero da betametasona podendo ser caracterizada como um pó cristalino branco ou quase branco e inodoro, praticamente insolúvel em água (solubilidade em água é de 1 mg/ml); facilmente solúvel em etanol, acetona, dioxano e metanol; levemente solúvel em clorofórmio e em éter. Apresenta ponto de fusão entre 268^o e 271^o C com decomposição. Seu coeficiente de partição é de 1,33, determinado em sistema octanol/ tampão fosfato pH 7,4 a 37^oC. A potência anti-inflamatória de dexametasona foi estimada como 25 vezes maior do que a hidrocortisona. A dose de DEX varia de 4 mg a 20 mg / dia. (Mosna et al., 2010; Ferrony, 2009; Farmacaopéia Brasileira; Bergamin, 2008).

A dexametasona apresenta-se em 4 formas diferentes, sendo elas: na forma de acetato de dexametasona, isocotinato de dexametasona, fosfato sódico e tebutato. No Brasil, segundo o DEF 2006/7, é comercializada na forma de

comprimidos, elixir, solução e suspensão injetável, solução nasal ou creme; e, encontra-se nestas formulações na sua forma livre, de acetato ou fosfato de sódio, de acordo com as suas características de solubilidade. (Ferrony, 2009; Bergamin, 2008).

Dentre os glicocorticóides de ação sistêmica, a dexametasona é o glicocorticóide sintético, e agente anti-inflamatório, que apresenta a maior potência, com ação prolongada, sua atividade biológica tem duração maior que 48 horas e atividade glicocorticoide 30 vezes superior à hidrocortisona. É utilizada sistematicamente no tratamento de doenças agudas ou crônicas inflamatórias, imunológicas e alérgicas. Para além do uso clínico comum, como agente anti-inflamatório para doenças inflamatórias ou após cirurgias, a dexametasona é rotineiramente utilizada em meios osteogênicos para estimular a diferenciação de células estaminais mesenquimais no sentido da linhagem osteógena. Uma concentração típica de Dex utilizada para indução da diferenciação osteogênica é de 10 a 100 nmol / L. Na concentração de 10 nmol/ L tem mostrado regular compromisso em formar progenitores derivados de células pulpares para dar origem a células de odontoblastos. Diversos grupos de pesquisa têm utilizado este fármaco para induzir a mineralização das células estaminais dentárias, incluindo células estaminais da polpa dentária *in vitro* (Silva, 2006; Bergamin, 2008; Sun et al, 2007; Ferrony, 2009; Silva et al., 2008; Ho et. al., 2014; Mosna et al., 2010; Shertha et. al. 2015).

O uso contínuo deste glicocorticóide, na forma sistêmica e/ou tópica apresenta algumas desvantagens como o surgimento de efeitos indesejáveis, e em longo prazo, o surgimento até mesmo de doenças crônicas degenerativas como, por exemplo, diabetes melittus tipo 2 e obesidade visceral. Levando-se em consideração os efeitos adversos apresentados por este fármaco, alguns estudos estão sendo desenvolvidos com o objetivo de aumentar a eficácia da dexametasona, diminuindo seus efeitos adversos. A literatura tem indicado o desenvolvimento de alguns sistemas de liberação modificada contendo dexametasona, com o objetivo de otimizar a ação terapêutica e reduzir os efeitos colaterais. Devido a dexametasona apresentar estabilidade *in vitro*, sendo apropriada para utilização em sistemas de liberação controlada de fármacos de ação prolongada (Silva, 2006; Bergamin, 2008; Sun et al, 2007; Ferrony, 2009).

Kumar et al. (2008) realizaram a avaliação de comprimidos matriciais contendo dexametasona, com liberação controlada pela presença de goma guar. A liberação controlada desse fármaco também foi descrita por Galeska et al. (2005), em um estudo baseado no desenvolvimento de microesferas de poli(ácido lático-co-glicólico) contendo dexametasona, na presença de poli(álcool vinílico). Outros tipos de sistema de liberação modificada são descritos por Bossa et al. (2008), no qual a liberação de dexametasona é mediada por eritrócitos e por Kim et al. (2003), com o desenvolvimento de membranas de policarbonato-poliuretano que retardam a liberação do fármaco.

Segundo Duarte et. al., (2009b), estudos foram propostos utilizando a dexametasona impregnada em arcabouços de quitosana em diferentes condições de operação, a fim de otimizar o processo de impregnação, foi visto que a pressão e a temperatura afetam a densidade do polímero e a solubilidade do fármaco na fase fluida, por conseguinte, estes são dois parâmetros importantes para serem estudados. Duarte et. al., (2009b) estudou esponjas de quitosana preparadas por liofilização e impregnados com composto ativo, sob pressões de 8,0 até 14,0 MPa e temperaturas de 35 até 55 ° C.

Turkoglu, et al. (2005) desenvolveu microesferas de quitosana carregada com dexametasona, usando o método de evaporação de solvente. E, observou que as microesferas resultantes proporcionaram uma libertação por um período dependente de suas próprias propriedades físico-químicas e da substância ativa; como também, não houve nenhum efeito de degradação do ingrediente ativo; e, os efeitos secundários do material ativo foram minimizados por causa de encapsulação para as formulações das microesferas.

2.9 Curcumina

A Curcumina é um fármaco composto, 1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) -1,6-heptadien-3,5-diona, de origem natural obtido a partir da *Curcuma longa* Linn, vulgarmente conhecida como cúrcuma, e do açafrão, sendo o componente principal, cerca de 80%, destes rizomas. Esta substância de fórmula química $C_{12}H_{20}O_6$ (Figura 1), é um polifenol hidrofóbico que apresenta baixo peso molecular (368,37 g/mol) e

ponto de fusão variando entre 170-183°C (Rodríguez et al., 2014; Parize et al., 2012; Priyadarsini, 2009).

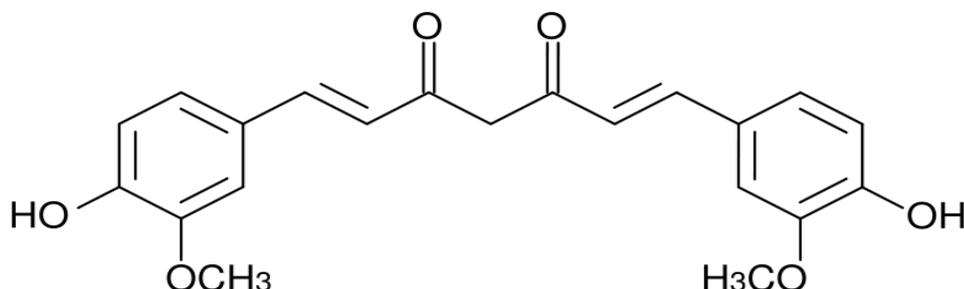


Figura 8- Estrutura química da curcumina. (Rodríguez et al., 2014).

Os dois anéis benzeno com grupos orto-metoxi e OH fenólicos estão ligados simetricamente em conjugação com a porção de β-Dicetona, que confere propriedades interessantes para a molécula curcumina, tanto no estado sólido quanto em solução. A funcionalidade β-Dicetona também é responsável pela transferência de átomo de hidrogénio intramolecular, e conduz à conformações tautomicas ceto e enol, e estes podem também existir em formas tautoméricas diferentes, formas cis e trans (Priyadarsini, 2009).

A *Curcuma longa* L., que dá origem a curcumina, apresenta coloração com pigmento alaranjado, é amplamente utilizado no sudeste da Ásia, e útil para fins culinários e medicinais. Além da curcumina, outros componentes podem ser extraídos do rizoma da *Curcuma Longa* L., Figura 9, e também apresentam atividade biológica, são eles a demetoxicurcumina (10 a 15%) e o cloreto de bis-desmetoxicurcumina (5%). A curcumina comercial é uma mistura de curcuminóides, contendo aproximadamente 77% de curcumina, 18% de demetoxicurcumina e 5% de cloreto de bis-desmetoxicurcumina (Rodríguez et al., 2014; Anand et al., 2008).

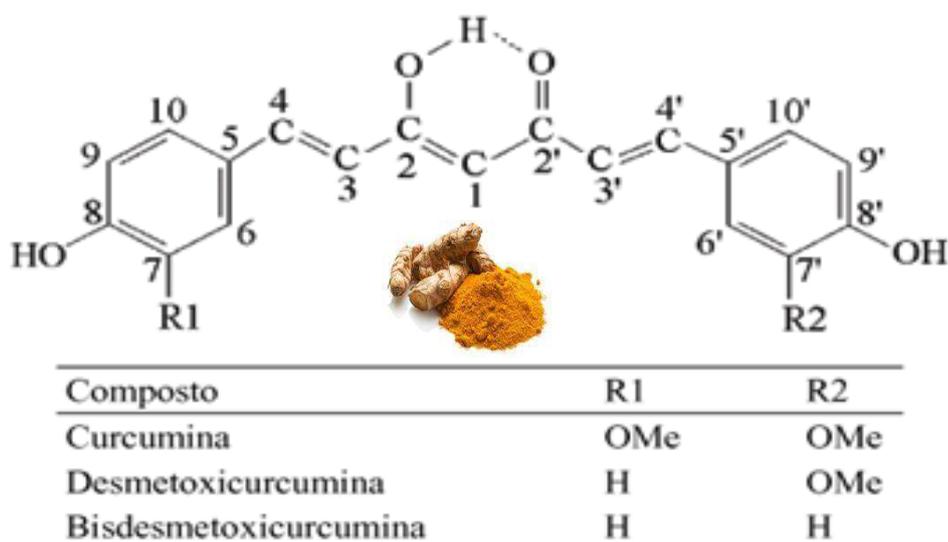


Figura 9- Estrutura química dos pigmentos curcuminóides da *Cúrcuma longa* L. (Almeida et al, 2008).

A curcumina provoca grande interesse farmacológico por apresentar importantes propriedades, sendo: antioxidante; anti-inflamatório; antibacteriana; antisséptico; antiparasitários; antimalárica; além de possuir atividades anticancerígenas, como quimiopreventivo e quimioterápico no tratamento de diversos tipos de câncer. Além disso, a curcumina apresenta segurança farmacológica, ou seja é extremamente segura, mesmo em doses muito elevadas. Combinando essa característica com o custo relativamente baixo, torna a curcumina um agente extremamente atraente para pesquisas (Parize et al., 2012; Priyadarsini, 2009; Anand et al., 2008; Aggarwal & Harikumar, 2009).

Desde 1974, que se conhece a atividade antibacteriana *in vitro* do extrato alcoólico de cúrcuma, da curcumina e de seus óleos essenciais contra as bactérias gram-positivas. E, hoje a curcumina apresenta grande potencial terapêutico e se mostra promissora no tratamento de doenças crônicas onde a inflamação desempenha um papel importante. Estas doenças incluem a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose múltipla, HIV, inflamações crônicas, psoríase, estresse oxidativo, fibrose cística, diabetes, obesidade, depressão, além do seu grande potencial no tratamento de diversos tipos de câncer (Parize et al., 2012; Li et al., 2013, Rodríguez et al., 2014; Anand et al., 2008; Aggarwal & Harikumar, 2009).

A atividade anticancerígena da curcumina tem sido sugerida como um agente terapêutico para a prevenção e tratamento de uma grande variedade de

diferentes tipos de câncer incluindo câncer de mama, câncer oral, câncer de esôfago, linfoma, câncer gástrico, câncer de colo uterino, câncer intestinal, câncer hepático, câncer de pâncreas, leucemia, câncer colo retal , câncer de bexiga, melanoma, câncer de rim, câncer de ovário, câncer de próstata, sarcoma, câncer uterino, câncer de pele, câncer neurológico, câncer no cérebro e cabeça, e até mesmo o câncer ósseo (Li e Zhang, 2014; Chuah et al., 2014, Yadav et al., 2012; Naksuriya et al., 2014).

Um fator que limita a utilidade terapêutica da curcumina é a sua solubilidade, uma vez que é praticamente insolúvel em água, apresenta baixa solubilidade em soluções aquosas de ácido, mas tem boa solubilidade em soluções de pH básico e em solventes tais como etanol, acetona, clorofórmio e dimetilsulfoxido. Sendo assim, a aplicação da Curcumina é limitada em água e em solução aquosa à pH básico, por sofrer hidrólise e degradação química; já em pH ácido e em soluções aquosas de álcool a curcumina é estável. Quantificando, temos que, a solubilidade máxima da curcumina em solução tampão aquoso é supostamente apenas 11 ng / mL; em pH neutro é demasiadamente baixo para quantificar; e também degrada rapidamente em solução tampão neutro ou alcalino. A solubilidade da curcumina pode ser aumentada pela modificação química ou derivatização, tais como complexação ou interação com macromoléculas, tensoativos e copolímeros. Estudos indicam que a estabilidade da curcumina aumentou após a adição de surfactantes e ciclodextrinas (Parize et al., 2012; Li et al., 2013; Priyadarsini, 2009; Aggarwal & Harikumar, 2009).

A curcumina também apresenta baixa biodisponibilidade que ocorre tanto em animais quanto em seres humanos. E, as principais razões atribuídas à baixa biodisponibilidade são a má absorção, o metabolismo e a eliminação sistêmica rápida, a instabilidade química, e a susceptibilidade metabólica. Portanto, é extremamente importante o estudo e desenvolvimento de sistemas de drogas que aumentem a biodisponibilidade, a solubilidade e a estabilidade química da curcumina. Para aumentar a biodisponibilidade da curcumina, têm-se estudado alternativas utilizando substâncias terapêuticas tais como a piperina; ou protegendo a curcumina da degradação e do metabolismo antes de atingir o alvo, por meio do uso de nanopartículas, tais como: polímeros, nanogéis, lipossomas/fosfolipídio, entre outros (Aggarwal & Harikumar, 2009; Parize et al., 2012; Li et al., 2013; Priyadarsini, 2009).

Estudos realizados associando a curcumina a um polímero, como a quitosana, demonstram resultados animadores em relação a biodisponibilidade e estabilidade do fármaco. E, a interação entre a curcumina e a quitosana se dá por meio de forças eletrostáticas, podendo haver também formação de ligações intermolecular, do tipo pontes de hidrogênio. A quitosana, além de melhorar a biodisponibilidade e estabilidade do fármaco curcumina, pode ser utilizada para desenvolver sistemas de liberação controlada para tratamento de câncer, como estudado por Rejinolde, et al.(2011), que observou que a curcumina modificada quimicamente com tripolifosfato de sódio pode ser benéfica para o tratamento de câncer (Boruah et al.,2012; Akhta et al., 2012).

2.10 Liberação controlada de fármacos

O principal objetivo de um fármaco, quando administrado, é atingir concentrações plasmáticas ou níveis de concentrações adequadas nos tecidos, devendo ser terapeuticamente efetivo e não tóxico, por um longo tempo. Porém, quando um fármaco é administrado, em um ser humano ou animal, apenas uma pequena fração da dose atinge o tecido alvo, e a maior parte é desperdiçada, devido à sua distribuição por outros tecidos e à sua metabolização ou excreção antes de atingir o local de ação. Neste contexto, o termo “fármaco” engloba todos compostos bioativos administrados com intuito terapêutico, desde moléculas de baixo peso molecular a proteínas e a material genético (Silva, 2012; Coimbra, 2010; Henrique et. al., 2007; Coimbra, 2010).

Devido às limitações em relação à administração de fármacos, nas últimas décadas, atenção considerável esteve voltada para o desenvolvimento de novos sistemas de transporte de drogas, principalmente, porque a utilização da maioria dos compostos terapêuticos é sempre limitada pela impossibilidade de aumento de dosagem (Henrique et. al., 2007; Coimbra, 2010).

A liberação controlada implica na associação, química ou física, dos fármacos com materiais biocompatíveis em sistemas que, quando administrados *in vivo*, tenham a capacidade de controlar, de forma pré-determinada, a taxa de liberação/entrega do fármaco a partir desse mesmo sistema, e/ou conduzir o fármaco até ao sítio específico em que este deve atuar. A liberação controlada de

fármacos tem como objetivo principal o controle temporal e espacial, *in vivo*, da concentração de fármacos para que o benefício clínico da administração destes seja maximizado e os efeitos adversos minimizados (Henrique et. al., 2007; Coimbra, 2010).

Os sistemas de liberação controlada (SLC) são sistemas promissores em relação ao aumento da eficácia terapêutica de um fármaco através da manutenção de níveis dos fármacos dentro da faixa terapêutica, diminuindo significativamente a toxicidade e reduzindo a necessidade de várias doses, em relação ao sistema convencional; isso leva conseqüentemente à melhor adesão do paciente ao tratamento, Figura 10, (Silva, 2012).

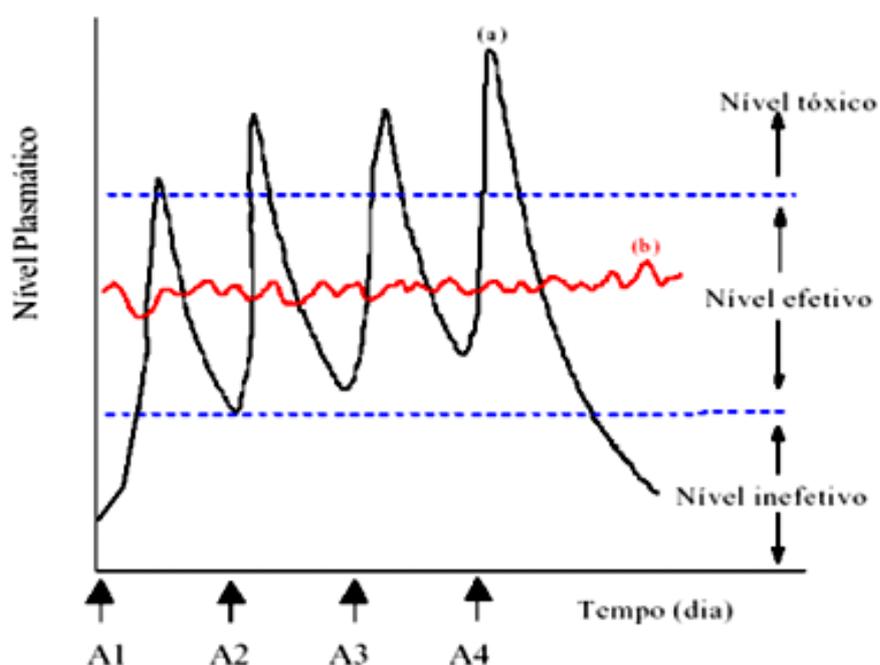


Figura 10- Comparação entre as variações de concentração de fármacos administrados por: (a) métodos convencionais de multidose e, (b) sistemas de liberação controlada. (A: administração do fármaco). (Berwig, 2006).

A utilização de um sistema de liberação controlada representa uma das fronteiras da ciência, a qual envolve diferentes aspectos multidisciplinares e pode contribuir para o desenvolvimento da saúde humana. A liberação controlada de fármacos apresenta diversas vantagens em relação aos sistemas convencionais, de forma que, além de promover a redução do número de aplicações e conseqüentemente diminuição de reações adversas, aumentando a segurança de

sua ação, esses sistemas oferecem: maior eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco; diminuição da toxicidade e maior tempo de permanência do fármaco na circulação; administração segura e conveniente (menor número de dose); direcionamento a alvos específicos, sem imobilização significativa das espécies bioativas, e possível incorporação tanto de substâncias hidrofílicas como lipofílicas (Ferrony et. al., 2012; Azevedo, 2002).

O desenvolvimento de um SLC eficaz é um empreendimento complexo, pois envolve o conhecimento e integração de uma série de aspectos de natureza diversa, tais como: propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas do fármaco; via de administração e as conseqüentes barreiras fisiológicas e bioquímicas impostas à absorção do fármaco; e as propriedades do material/materials base do SLC. Os métodos e tecnologias envolvidos na produção do SLC exigem o domínio de conhecimentos associados a áreas científicas como a medicina, farmácia, bioquímica, química, engenharia e outras. Por esta razão, a área da liberação controlada de fármacos é considerada uma área inerentemente interdisciplinar (Coimbra, 2010).

No que diz respeito aos materiais que têm sido utilizados como suportes de SLC, eles devem apresentar adequadas propriedades físico-químicas, biocompatibilidade, comportamento *in vivo*, interações com o fármaco, etc; e destacam-se os de natureza lipídica, inorgânica e polimérica. Destes, os materiais poliméricos são, sem dúvida, os mais investigados. Grande variedade de polímeros, sintéticos, naturais ou semissintéticos podem ser aplicados no desenvolvimento de um sistema de liberação controlada. Um requisito para escolher o material a ser utilizado nesta finalidade é que este polímero e os seus produtos não sejam tóxicos e apresentem uma boa biodisponibilidade, pelo menos nos tecidos que vão entrar em contato direto (Silva, 2012; Coimbra, 2010).

Espécies coloidais, como lipossomas micro e nanopartículas, vêm sendo extensamente estudadas para esse sistema que, em geral, pode ser utilizado para melhorar a biodisponibilidade, manter o efeito do fármaco no tecido alvo, solubilizar fármacos, melhorar a estabilidade física e química de agentes terapêuticos, minimizar efeitos colaterais e reduzir a toxicidade. Entre esses sistemas, têm-se as nanoesferas, que apresentam cinéticas de adsorção rápidas e maior facilidade de manuseio e operação (Silva, 2012).

2.11 Sistemas de Liberação Controlada de fármacos

A classificação mais fundamental relacionada ao funcionamento dos sistemas de liberação controlada de fármacos baseia-se na estrutura destes sistemas. Assim, eles podem ser classificados como sistemas reservatórios, sistemas matriciais ou monolíticos, há também o tipo osmótico. Independente do sistema e do tipo de forma farmacêutica, se faz necessário o uso de excipientes específicos. Esses materiais geralmente são polímeros com características e propriedades especiais, tais como: capacidade de formação de estruturas (matrizes ou membranas) microporosas/semipermeáveis, capacidade de intumescimento (expansão) em contato com a água e capacidade de complexação com fármacos (Carbinatto, 2010; Pezzini et al., 2007).

Bombas osmóticas são sistemas que utilizam pressão osmótica para modular a liberação do fármaco. A forma farmacêutica é constituída por um núcleo (comprimido, cápsula gelatinosa dura ou mole) revestido com uma membrana semipermeável, que possui um orifício feito a laser. O núcleo contém um agente osmótico, que pode ser a substância ativa ou outro material. Após a administração, o solvente penetra no núcleo (atraído pelo agente osmótico), aumentando a pressão interna, o que resulta na liberação do fármaco dissolvido ou disperso, através do orifício na membrana (Pezzini et al., 2007).

Sistemas reservatório são constituídos por um reservatório (núcleo) de fármaco envolvido por uma matriz polimérica, que pode ser microporosa ou não apresentar poros, que regula o processo de difusão. O núcleo pode ser um comprimido, como representado na figura 11, um grânulo, um pellet ou um minicomprimido. O modelo apresenta a existência de duas camadas de difusão, uma no interior do reservatório e outra no exterior. O processo de transferência de massa de um lado do sistema para outro é dependente do gradiente, tamanho molecular, afinidade do solvente em que o fármaco está dissolvido com a matriz polimérica e a espessura da matriz (Carbinatto, 2010; Pezzini et al., 2007; Berwig, 2006).

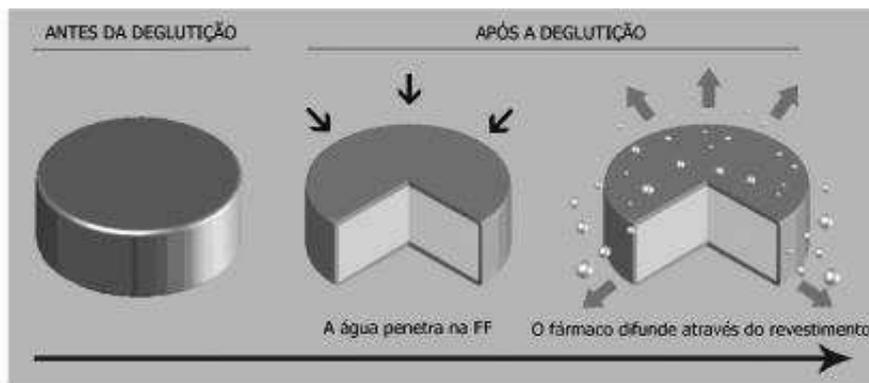


Figura 11- Mecanismo de liberação de um fármaco a partir de um sistema reservatório: a água penetra na forma farmacêutica e dissolve o fármaco, e ocorre a difusão através do filme, seguindo para partição e eluição para o meio receptor. (Adaptado de Berwig, 2006 e Pzzini et al., 2007).

Em relação ao filme polimérico, a porosidade, a cristalinidade do polímero, a afinidade entre o polímero e o fármaco podem influenciar sensivelmente o perfil de permeação. Entre os polímeros mais utilizados em sistemas reservatórios estão os copolímeros de polietileno-co-vinil acetato que são aplicados em sistemas transdérmicos de liberação controlada de fármacos, os derivados da celulose e os siloxanos (Berwig, 2006).

Sistemas monolíticos ou matriciais são aqueles em que o fármaco está uniformemente distribuído em uma matriz polimérica, em forma de uma solução, suspensão ou sólido disperso; e a liberação do fármaco pode envolver processos de intumescimento do polímero, difusão do fármaco e erosão da matriz. Essas matrizes podem ser elaboradas sob as formas de comprimidos, cápsulas gelatinosas, grânulos, péletes ou minicomprimidos. Considerando a estrutura da matriz polimérica, estes sistemas podem ser classificados como de natureza hidrofílica ou inerte, como ilustrado na Figura 12. (Berwig, 2006; Carbinatto, 2010; Lyra et al., 2007; Pzzini et al., 2007).

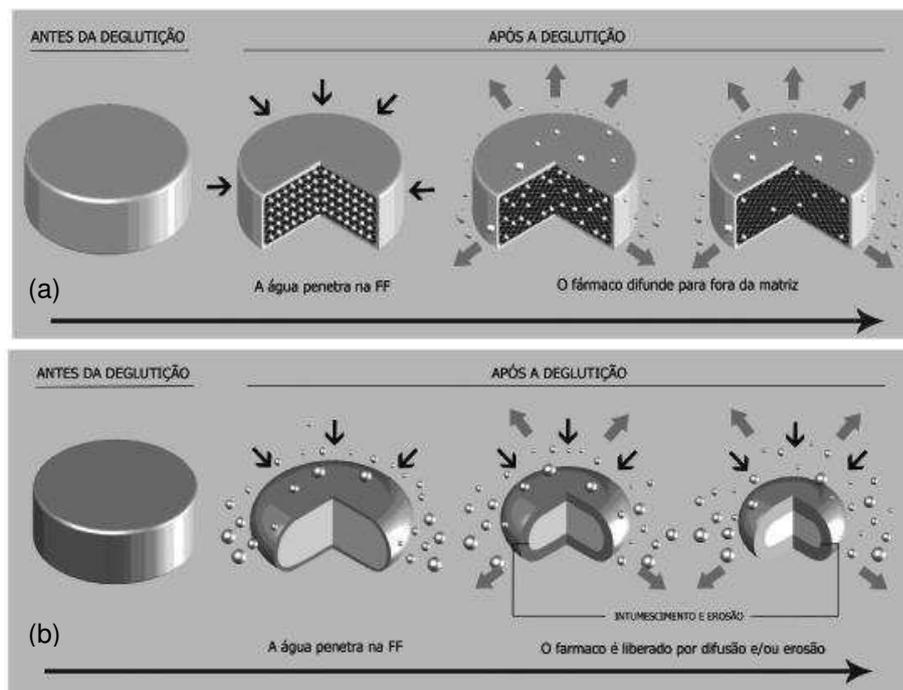


Figura 12- Mecanismos de liberação de um fármaco a partir de um sistema monolítico: (a) Matriz insolúvel: dissolução na matriz, difusão, transporte a partir da superfície; (b) Matriz hidrofílica: difusão através da matriz, transporte a partir da superfície. (Adaptado de Berwig, 2006 e Pzzini et al., 2007).

Nos sistemas de matrizes insolúveis, constituídas por ceras (nesse caso, também denominadas matrizes hidrofóbicas) ou polímeros insolúveis em água (nesse caso, também denominadas matrizes inertes), o fármaco é liberado essencialmente por difusão, como ilustrado na figura 12a (para matrizes hidrofóbicas, pode haver um mecanismo de erosão associado). Para sistemas de matrizes hidrofílicas, a liberação é regulada pelos processos de intumescimento, difusão e erosão, quando o fármaco está homogeneamente disperso na matriz polimérica estão envolvidos processos físicos e químicos na sua liberação, incluindo penetração de líquido na matriz, difusão do fármaco pelos poros da matriz, erosão do polímero ou uma combinação dos mecanismos. Neste sistema monolítico o polímero na sua superfície é hidratado e intumescer, formando uma camada gelificada, que é posteriormente dissolvida, promovendo a erosão do comprimido. Outras camadas de gel são formadas e dissolvidas sucessivamente na superfície da forma farmacêutica. O fármaco é liberado por difusão através dessas camadas gelificadas e/ou erosão da matriz, como representado na figura 12 b (Berwig, 2006; Carbinatto, 2010; Pzzini et al., 2007). A Tabela 2 apresenta formas farmacêuticas de liberação controlada.

Tabela 2- Classificação dos sistemas matriciais.

Tipo	Tipo	Modo de ação
Matrizes Minerais	Reservatório	<ul style="list-style-type: none"> • Fármaco retido no reservatório • Fármaco adsorvido ao suporte
Matrizes hidrofílicas	Monolítico	<ul style="list-style-type: none"> • Intumescimento ilimitado, liberação por difusão • Intumescimento ilimitado, liberação controlada pelo intumescimento
Matrizes inertes	Monolítico	<ul style="list-style-type: none"> • Liberação controlada por difusão
Matrizes lipídicas	Monolítico	<ul style="list-style-type: none"> • Liberação por difusão
Matrizes biodegradáveis não lipídicas	Monolítico	<ul style="list-style-type: none"> • Bio- erosão

Fonte:(Lyra et al., 2007).

Dentre as formas farmacêuticas de liberação controlada, (Tabela 2), a utilização de sistemas matriciais, constituídos por diversos tipos de polímeros é uma das opções mais interessante, sendo uma das estratégias mais empregadas no desenvolvimento deste tipo de liberação controlada, devido às vantagens inerentes a estes sistemas: versatilidade, eficácia, baixo custo e produção que recorre a equipamentos e técnicas convencionais (Lyra et al., 2007).

Mais recentemente os estudos destes sistemas foram direcionados ao desenvolvimento de matrizes implantáveis biodegradáveis, contendo fármacos anti-neoplásicos, anti-inflamatórios não-esteroidais, neurolépticos, contraceptivos, entre outros. Entre os polímeros mais estudados como matrizes para sistemas monolíticos ou matriciais estão os poli(hidroxialquil metacrilato, poli(óxido de etileno), ácidos poli(acrílicos), poli vinilpirrolidona , derivados de celulose, poli(caprolactonas) e copolímeros de ácido poli láctico com ácido glicólico (Berwig, 2006; Carbinatto, 2010; Evangelista, 1998).

Numerosos polímeros biodegradáveis estão disponíveis e têm sido estudados para aplicações na liberação controlada de fármacos. Estes polímeros são sistemas aptos para controlar a taxa de liberação do fármaco, evitando a necessidade da retirada da matriz após a exaustão do fármaco e possuem

solubilidade limitada em pH ácido, sendo, portanto solúvel em pH neutro. Os sistemas matriciais hidrofílicos também são chamados de matrizes solúveis e intumescíveis, sofrem intumescimento, seguido da erosão do gel formado e dissolução em meio aquoso, os adjuvantes hidrofílicos comumente usados são os derivados celulósicos e os polissacarídeos. As matrizes lipídicas constituem sistemas de liberação simples feitos de cera e com controle relativamente grosseiro da velocidade e da extensão da liberação do fármaco, os principais adjuvantes lipídicos são: cera de carnaúba, álcool cetílico, óleos vegetais hidrogenados, ceras microcristalinas, mono e triglicerídeos, polietilenoglicol (PEG) e monoestearato de PEG. Um sistema matricial inerte é aquele no qual o fármaco é incorporado em um polímero inerte que não é solúvel nos fluídos gastrintestinais, os adjuvantes mais usados na preparação dessas matrizes são: fosfatos de cálcio, etilcelulose, copolímeros de metacrilato, poliamida, polietileno e acetato de polivinila (Lyra et al., 2007; Carbinatto, 2010; Manju & Sreenivasan, 2011; Naficy et al., 2009).

2.12 Cinética de Liberação

Os sistemas de liberação controlada de fármacos podem ser delineados para ter uma liberação constante e decrescente o que, necessariamente, não garante uma concentração plasmática constante, mas conseguem fornecer uma liberação sustentada, ou bimodal. E em função do desenvolvimento de inúmeras formas farmacêuticas de liberação controlada a partir de polímeros, foram desenvolvidas expressões matemáticas para descrever o perfil de liberação de um fármaco (mecanismo de liberação) em função da forma física (cilindro, esferas, filmes, gel, etc.) do sistema de liberação, o modo de difusão do fármaco (estático ou dinâmico) e as características da matriz polimérica (porosa ou densa). De modo que, os modelos matemáticos são um fator bastante importante no desenvolvimento de dispositivos farmacêuticos de liberação controlada (Lyra et al., 2007; Berwig, 2006).

Os modelos matemáticos trazem inúmeros benefícios práticos, como a possibilidade de simular o efeito dos parâmetros delineados, a redução do número de experimentos necessários, além de facilitarem o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos. 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. (Berwig, 2006; Carbinatto, 2010).

Existem atualmente diversos modelos matemáticos aplicados ao controle dos sistemas matriciais de liberação controlada de fármacos, alguns destes estão demonstrados na Tabela 3. As equações levam em consideração que a difusão do solvente é influenciada pelas propriedades físicas da rede polimérica e pela própria interação solvente-polímero, com isso, diversos comportamentos podem ser observados e, correlacionando o coeficiente difusional, e classificados em difusão Fickiana (Caso-I) e difusão não-Fickiana (Caso-II e Transporte Anômalo) (Lyra et al., 2007; Carbinatto, 2010).

Tabela 3- Modelos matemáticos.

Equação	Descrição do Modelo
<p>Cinética de ordem zero:</p> $\frac{M_t}{M_\infty} = k_0 t + b$	<p>O modelo cinética de ordem zero baseia-se na liberação lenta da substância ativa a partir de formas farmacêuticas que não se desagregam. M_t representa a quantidade absoluta de fármaco liberada no tempo t e M_∞ a quantidade total de fármaco liberado num tempo infinito, a qual deverá corresponder à quantidade total de fármaco incorporado ao sistema polimérico no $t = 0$; K_0 é uma constante cinética e b é a quantidade inicial de fármaco na solução.</p>
<p>Modelo de Higuchi:</p> $\frac{M_t}{M_\infty} = k_H \sqrt{t} + b$	<p>Higuchi descreve o mecanismo de liberação dos fármacos como um processo de difusão baseado na lei de Fick, estando dependente da raiz quadrada do tempo. Porém, o uso desta relação em sistemas que intumescem pode tornar-se insuficiente, pois sistemas deste tipo podem sofrer erosão, devendo-se atender ao atributo do relaxamento das cadeias poliméricas para o transporte do fármaco. Assim, a equação de Higuchi apresenta limitações na interpretação dos mecanismos de liberação controlada, mas, é mais realista que o modelo de ordem zero.</p>
<p>Modelo de Korsmeyer Peppas:</p> $\frac{M_t}{M_\infty} = k t^n$	<p>Esta equação é utilizada para descrever a liberação do soluto quando o mecanismo que prevalece é uma combinação da difusão do fármaco (transporte Fickiano) e do transporte Caso II (não-Fickiano, controlado pelo relaxamento das cadeias poliméricas) K é uma constante cinética, que incorpora características estruturais e geométricas do mecanismo e n é o expoente de liberação que, de acordo com o valor numérico que assume, caracteriza o mecanismo de liberação do fármaco.</p>

Fonte:(Lopes et al., 2005).

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 mecanismo de liberação (Valgas, 2005; Parize, 2009; Berwig, 2006). A Tabela 4 apresenta a correlação entre o expoente difusional (n) e o mecanismo de liberação.

Tabela 4- Correlação entre o expoente difusional (n) e o mecanismo de liberação.

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 ou não Fickiano
1,0	0,89	0,85	Transporte do caso II
> 1,0	> 0,89	> 0,85	Super caso II

Fonte:(Parize, 2009).

Para a cinética de liberação de solutos a partir de sistemas intumescíveis com geometria esférica, um valor do expoente de liberação de $n \leq 0,43$, indica que o mecanismo de liberação observado é 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 $n > 0,85$ tem-se um super caso II de transporte, e ocorre contribuição simultânea de processos como difusão, intumescimento, relaxação e erosão da matriz polimérica (Parize, 2009; Valgas, 2005).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa e sua parte experimental, desde obtenção até as caracterizações dos arcabouços, foram desenvolvidas no Laboratório de avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO), que pertencente à Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais, e está localizado na Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), na cidade de Campina Grande - PB, Brasil.

3.1 Materiais

Para o desenvolvimento e produção dos arcabouços deste projeto foram utilizados:

- Hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) pó, fornecido pela Sigma Aldrich;
- Quitosana de médio peso molecular com grau de desacetilação entre 75- 85% , fornecida na forma de pó pela Sigma Aldrich;
- Gelatina em pó, adquirida em Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO);
- Dexametasona, fornecido pela Sigma Aldrich;
- Curcumina Longa, adquirido pela Sigma Aldrich;
- Ácido acético glacial P.A. fornecido pela Vetec;
- Tripolifosfato de Sódio P.A. adquirido pela Sigma Aldrich;
- Álcool Etílico 99,5º GL Glacial;
- Tampão de Fosfato Salino (PBS), adquiridos pela Sigma-Aldrich.

3.2 Procedimento Experimental

O trabalho experimental foi desenvolvido em três etapas:

Etapa I: etapa exploratória do método de fabricação, e escolha dos arcabouços de quitosana/hidroxiapatita mais adequado para dar continuidade as Etapas II e III.

Etapa II: etapa de inserção do fármaco, curcumina, na composição dos arcabouços desenvolvidos na Etapa 1, e investigação do comportamento do fármaco e perfil de liberação.

Etapa III: etapa de inserção do fármaco, dexametasona, na composição dos arcabouços desenvolvidos na Etapa 1, e investigação do comportamento do fármaco e perfil de liberação.

3.2.1 Etapa I

Etapa exploratória do método de fabricação dos arcabouços de quitosana/hidroxiapatita, bem como definição dos parâmetros experimentais para o método de gelificação ionotrópica combinado com o método de agregação de partículas, além de, testar diferentes proporções de hidroxiapatita e escolher a mais adequada para dar continuidade à pesquisa, em suas Etapas II e III.

3.2.1.1 Preparação da Quitosana

A quitosana de médio peso molecular com grau de desacetilação entre 75-85%, fornecida na forma de pó pela Sigma Aldrich, foi transformada em solução polimérica de 0,02g/mL, a partir da dissolução deste polímero em ácido acético (1%v/v), mantida sob agitação mecânica por 24 horas, para garantir a total dissolução da quitosana. Após esse período, a solução foi filtrada a vácuo para possível eliminação de impurezas e resíduos.

3.2.1.2 Preparação das esferas quitosana/hidroxiapatita

Para obtenção das esferas desta pesquisa seguiu-se o método de gelificação ionotrópica baseada e adaptada das pesquisas de Fidèles (2014) e Baptista (2008). Para a preparação das esferas de quitosana/hidroxiapatita, inicialmente, foi preparada uma mistura combinando a solução de quitosana, preparada anteriormente, com quantidades variadas de hidroxiapatita, resultando nas seguintes concentrações 1%, 3% e 5% de hidroxiapatita em relação ao peso de quitosana. A solução de quitosana foi misturada com diferentes concentrações de hidroxiapatita por meio de agitador mecânico e mantida sob agitação constante até

tornar-se uma solução homogênea, para então seguir para aplicação do método da gelificação ionotrópica, adaptada de Fidèles, (2014) para obterem-se as esferas.

Para aplicação do método de geleificação ionotrópica foi utilizado um sistema composto por uma bomba infusora, de marca Vernon Hills, modelo Illinois 60061, com uma seringa de 20 mL acoplada a uma agulha de dimensões 0,7mm x 25mm (22G x 1/2”), além de um agitador mecânico de marca IKA RW 20 digital, como mostra na Figura 13. A seringa (20mL) é preenchida com a solução de Quitosana/Hidroxiapatita preparada nas diferentes concentrações de HA, que com o auxílio da bomba infusora que exerce pressão na seringa, ocorre o gotejamento dessa solução, com razão de 25 mL/h formando as esferas em um banho contendo 200ml de solução coagulante de tripolifosfato de sódio-TPP (5%*m/v*), que age como agente reticulante. Após o término do processo de formação das esferas, elas irão permanecer imersas na solução de TPP por cerca de 1 hora em temperatura ambiente. E, em seguida serão submetidas a lavagens em solução de PBS, para que os resíduos de ácido acético e TPP sejam eliminados.



Figura 13- Sistema para formação das esferas de quitosana/hidroxiapatita.

Inicialmente, foi testada como metodologia para a preparação das esferas, a reticulação da solução de quitosana em uma mistura da solução de TPP com hidroxiapatita, mas percebeu-se que não há uma agregação adequada e formação de esferas uniformes, de modo que com o passar do tempo o pó de hidroxiapatita desagrega das esferas, não fornecendo confiança para manter esta metodologia.

De maneira inicial além das concentrações de 1%, 3% e 5% de hidroxiapatita em massa de quitosana, foram testadas concentrações 0,5% e 10%, entretanto, com o desenvolver dos procedimentos experimentais, foi observado que as amostras geradas não eram viáveis para dar continuidade a pesquisa. Já que, com 0,5% era observada pouca influência em relação à presença da hidroxiapatita, apresentando-se quase que como um arcabouço constituído apenas por quitosana. E, para concentração de 10% foi possível observar uma esfera mais densa, ausente de poros, e por vezes, de comportamento frágil, o que a torna inviável para a construção de arcabouços, em especial para aplicações ósseas. Diante disso, para efeito de apresentação e discussão dos resultados, foram consideradas apenas as misturas concentrações de 1%, 3% e 5% de HA.

3.2.1.3 Agregação de partículas e obtenção dos arcabouços

Após a formação das esferas de quitosana/hidroxiapatita partiu-se para a etapa de agregação das partículas, para tanto, é necessário à preparação da solução de gelatina (5%*m/v*), de modo que, inicialmente, diluiu-se 5g de gelatina em pó em 100 mL de água destilada em um misturador magnético por cerca de 30 minutos a 60 °C. Com a solução de gelatina pronta, acondicionaram-se as esferas em tubos falcons (50 mL) e adicionou-se 2mL de gelatina. A introdução de gelatina teve o intuito de promover maior adesão entre as partículas, e assim, formar os arcabouços. Por fim, os tubos foram colocados no congelador a uma temperatura de aproximadamente -20°C durante 24 horas, e em seguidas liofilizadas por um período de 48 horas, este procedimento experimental foi adaptado de FIDÉLES, (2014). Com isso, obteve-se os arcabouços de quitosana/hidroxiapatita com diferentes concentrações de hidroxiapatita, codificados como: QH1, QH3, QH5; como apresentado na Tabela 5. E, para dar continuidade a pesquisa foi escolhido manter o arcabouço compósito de QH3, para inserir o fármaco curcumina na Etapa II e o fármaco dexametasona na Etapa III.

Tabela 5- Composição dos arcabouços de quitosana/hidroxiapatita/ gelatina.

Arcabouço	QH1	QH3	QH5
Hidroxiapatita	32%	58,5%	70%
Quitosana	64%	39%	28%
Gelatina	4%	2,5%	2%

3.2.2 Etapa II

Etapa exploratória do método de inserção do fármaco, curcumina, nas esferas de concentração pré-definida QH3 (Etapa 1), formando os arcabouços QHC1, QHC5, QHC10, além de promover a investigação do comportamento do fármaco nos arcabouços e o perfil de liberação por meio das caracterizações.

3.2.2.1 Obtenção dos arcabouços de quitosana/hidroxiapatita/curcumina

Para obtenção dos arcabouços de quitosana/hidroxiapatita/curcumina, inicialmente foram preparadas as esferas de quitosana/hidroxiapatita/curcumina seguindo o método de gelificação ionotrópica, e em seguida, com o auxílio da gelatina aplicou-se o método de agregação de partículas.

A solução de quitosana (2%) foi preparada por meio da dissolução do polímero na forma de pó em solução de ácido acético (1%) e mantida em agitação mecânica constante por 24 horas. Em seguida, pesou-se a hidroxiapatita em pó, em concentração de 3% em relação ao peso do polímero, e adicionou a solução de quitosana onde se manteve em agitação mecânica. Enquanto isso, o pó de curcumina, foi pesado em três concentrações, sendo estas: 1%, 5% e 10% em relação ao peso do polímero, e foi dissolvido em etanol (10mg/mL), por meio de agitação mecânica. Isso feito, a solução de curcumina foi incorporada à solução de quitosana/hidroxiapatita e manteve-se sob agitação até se obter a homogeneidade do sistema. Com a solução homogênea, partiu-se para formação das esferas por meio do método de gelificação ionotrópica, a partir de uma seringa de 20 mL acoplada com uma agulha de dimensões 0,7mm x 25mm (22G x 1/2"). O gotejamento ocorreu em uma solução coagulante de tripolifosfato de sódio (5%*m/v*). Em seguida, as esferas foram lavadas e neutralizadas com uma solução de PBS. Por fim, aplicou-

se o método de agregação de partículas, as esferas formadas foram acondicionadas em tubos falcons (50 mL) e adicionou-se 2mL de solução de gelatina (5%*m/v*), onde seguiu para o congelamento, em aproximadamente -20°C , e posteriormente para liofilização por 48 horas. Formando os arcabouços de quitosana/hidroxiapatita/curcumina com diferentes concentrações de curcumina (1%, 5% e 12%), codificados como QHC1, QHC5, QHC10 respectivamente. A Figura 14 apresenta a representação esquemática desta metodologia para obtenção dos arcabouços QHC1, QHC5, QHC10.

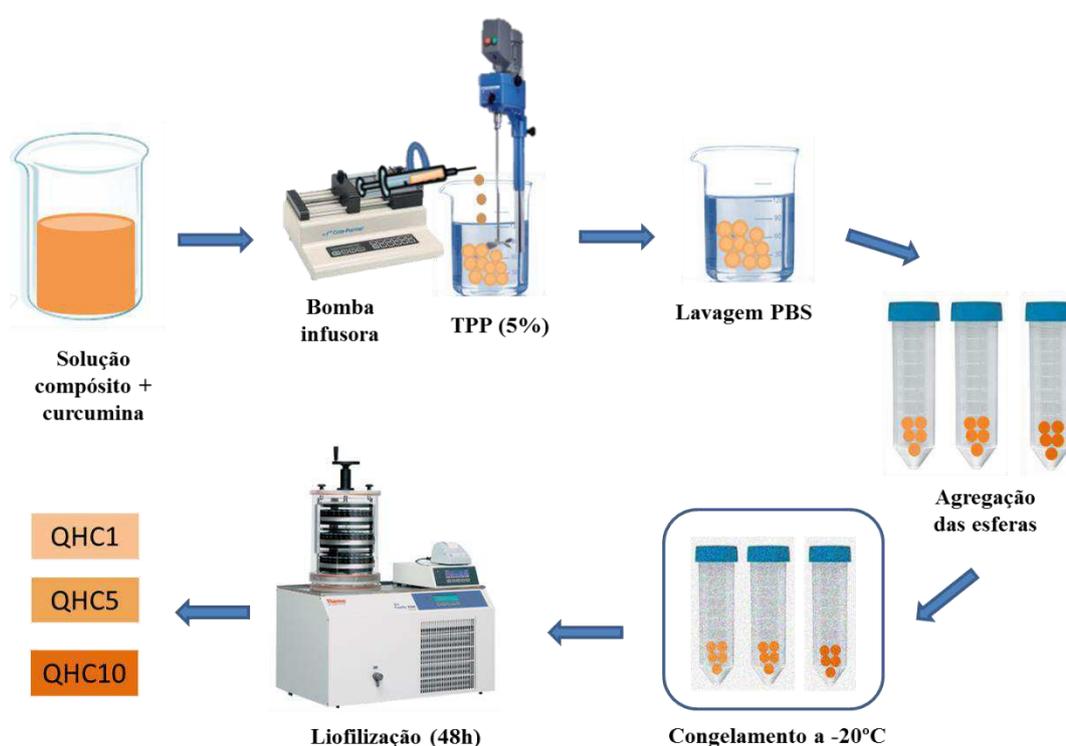


Figura 14- Representação esquemática da metodologia para obtenção das esferas por gelificação iônica e formação dos arcabouços de QHC1, QHC5 e QHC10, por meio de agregação das partículas. (Fonte própria).

3.2.3 Etapa III

Etapa exploratória do método de inserção do fármaco, dexametasona, nas esferas de concentração pré-definida QH3 (Etapa 1), formando os arcabouços QHD1, QHD5, além de promover a investigação do comportamento do fármaco nos arcabouços e o perfil de liberação por meio das caracterizações.

3.2.3.1 Obtenção dos arcabouços de quitosana/hidroxiapatita/ dexametasona

Para obtenção dos arcabouços de quitosana/hidroxiapatita/dexametasona, inicialmente foram preparadas as esferas de quitosana/hidroxiapatita/dexametasona seguindo o método de gelificação ionotrópica, e em seguida, com o auxílio da gelatina aplicou-se o método de agregação de partículas.

A solução de quitosana (2%) foi preparada por meio da dissolução do polímero na forma de pó em solução de ácido acético (1%) e mantida em agitação mecânica constante por 24 horas. Em seguida, pesou-se a hidroxiapatita em pó, em concentração de 3% em relação ao peso do polímero, e adicionou a solução de quitosana onde se manteve em agitação mecânica. Enquanto isso, o pó de curcumina, foi pesado em três concentrações, sendo estas: 1% e 5% em relação ao peso do polímero, e foi dissolvido em etanol (10mg/mL), por meio de agitação mecânica. Isso feito, a solução de dexametasona foi incorporada à solução de quitosana/hidroxiapatita e manteve-se sob agitação até se obter a homogeneidade do sistema. Com a solução homogênea, partiu-se para formação das esferas por meio do método de gelificação ionotrópica, a partir de uma seringa de 20 mL acoplada com uma agulha de dimensões 0,7mm x 25mm (22G x 1/2"). O gotejamento ocorreu em uma solução coagulante de tripolifosfato de sódio (5%*m/v*). Em seguida, as esferas foram lavadas e neutralizadas com uma solução de PBS. Por fim, aplicou-se o método de agregação de partículas, como descrito em 5.2.1.3, as esferas formadas foram acondicionadas em tubos falcons (50 mL) e adicionou-se 2mL de solução de gelatina (5%*m/v*), onde seguiu para o congelamento, em aproximadamente -20°C, e posteriormente para liofilização por 48 horas. Formando os arcabouços de quitosana/hidroxiapatita/dexametasona com diferentes concentrações de dexametasona (1% e 5%), codificados como QHD1, QHD5, respectivamente. A Figura 15 apresenta a representação esquemática desta metodologia para obtenção dos arcabouços QHD1e QHD5.

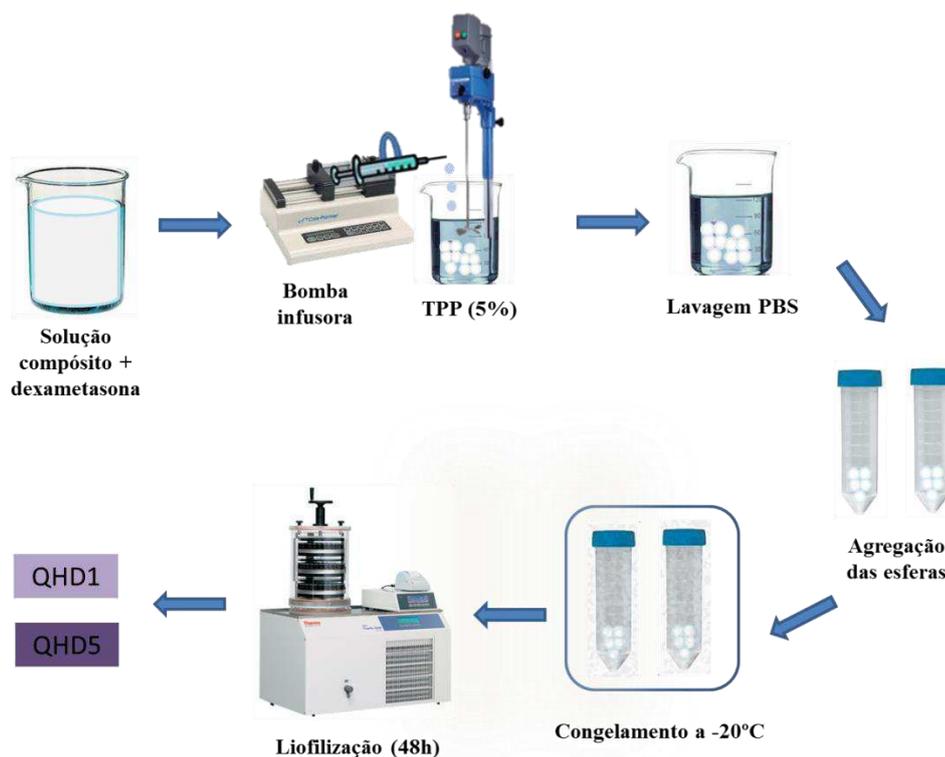


Figura 15- Representação esquemática da metodologia para obtenção das esferas por gelificação iônica e formação dos arcabouços de QHD1 e QHD5 por meio de agregação das partículas. (Fonte própria).

3.3 Caracterizações

Os arcabouços desenvolvidos nesta pesquisa, Etapas I, II e III, foram caracterizados em aspecto físico-químico e microestrutural por meio de análises realizadas através de Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Difração de raio X (DRX), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Microscopia Ótica (MO), Porosidade (%), e Ensaio de Grau de Intumescimento (%GI). Como também, foi analisado o comportamento mecânico dos arcabouços obtidos na Etapa I, por meio da realização do Ensaio de compressão.

A caracterização biológica realizada nos arcabouços, obtidos em todas as Etapas da pesquisa, foi efetuada por meio do Ensaio de Citotoxicidade que permitiu avaliar a viabilidade celular dos arcabouços.

Em função da presença de fármaco nos arcabouços obtidos nas Etapas II e III, foram realizadas ensaios por meio de Espectrofotômetro (UV- VIS) para fornecer a investigação da Liberação dos fármacos, bem como permitir realização da validação do método analítico para quantificação dos fármacos conforme a

Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que determina o "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". Além disso, foi possível estabelecer modelos de liberação controlada do fármaco.

3.3.1 Espectroscopia da Região de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização por espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foi realizada em um espectrômetro de marca Perkin Elmer e modelo Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR Spectrometer, para as amostras foi feita varredura de 4000 a 650 cm^{-1} , sem a necessidade de preparar pastilhas de KBr, tendo-se utilizado o dispositivo ATR (attenuated total reflectance).

Esta técnica tem grande valor para a análise orgânica qualitativa, sendo utilizada para identificar as bandas características dos grupos funcionais presentes nos materiais, e compreende a faixa do espectro eletromagnético que vai do limite superior da faixa de microondas até o começo da região visível, com comprimento de onda entre 14000 cm^{-1} e 20 cm^{-1} , porém considera que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibrações específicas, as quais correspondem a níveis vibracionais da molécula. A finalidade do uso da espectroscopia de infravermelho nesse trabalho foi identificar os principais grupos funcionais pertencentes na quitosana, na hidroxiapatita e nos fármacos, dexametasona e curcumina, observando se houve alguma interação entre eles quando misturados para formar os arcabouços.

3.3.2 Difração de raios X (DRX)

O uso da técnica de difração de raios X tem a finalidade de comparar as possíveis variações da cristalinidade. E, a difratometria de raios X é uma das principais técnicas de caracterização microestrutural de materiais cristalinos, de grande importância na engenharia e ciências de materiais. Neste trabalho, utilizou-se o difratômetro SHIMADZU (modelo XRD 7000), com varredura angular entre 5° e 80° com passo de 2°/min na montagem de Bragg-Brentano, sistema θ -2 θ , utilizando-se radiação $K\alpha$ do cobre (1,5418 Å), tensão de 40 kV e corrente 30 mA. O uso desta

técnica teve o objetivo de visualizar as fases presentes nos arcabouços desenvolvidos.

3.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDS)

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um equipamento capaz de produzir imagens de alta resolução e ampliação. Sendo capaz de fornecer informações morfológicas e topográficas da superfície das amostras. Para realização das análises foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura de bancada, modelo TM-1000, marca Hitachi, com capacidade de aumento de até 45000X, sendo que os aumentos utilizados nesta pesquisa foram: 100x, 200x, 500x e 10000x; profundidade de foco de 1 mm, resolução de 30 nm, 15 KV, baixo vácuo e pressão variada (1 a 270 Pa), sem recobrimento metálico. O MEV foi utilizado para identificar a morfologia da superfície das esferas e dos arcabouços formados, além do tamanho, a forma e a distribuição dos poros.

A porosidade dos arcabouços é importante para avaliar suas propriedades, e vários autores vem ressaltando essa importância bem como propondo diferentes métodos de avaliar a porosidade. Tomamos por base o método utilizado por HANA et al.(2010), que segue o princípio de Arquimedes, em que a porosidade dos arcabouços é medida pelo deslocamento de líquido. O procedimento realizado para obtenção da porosidade, partiu do cálculo do volume (V_0) e pesagem (W_0) da amostra seca. Em seguida, a amostra foi imersa em etanol, por 5 minutos, até ser saturado através da absorção do etanol. Com isso, a amostra foi retirada e pesada novamente (W_1). Com estes dados foi possível calcular a porosidade do arcabouço, de acordo com a Equação 1.

Equação 1- Porosidade (%)

$$\text{Porosidade (\%)} = \frac{W_1 - W_0}{(\rho V_0)} \times 100$$

Onde:

W_0 = Peso dos arcabouços secos

V_0 = Volume dos arcabouços secos

W_1 = Peso do arcabouço depois de 5 minutos imersos no etanol.

ρ = representa a densidade do etanol

Uma análise complementar ao MEV é a Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDS), na qual os elementos químicos presentes na amostra podem ser identificados através do espectro de raios X emitidos pela amostra. Para esta análise foi utilizado o EDS acoplado ao MEV Hitachi, que permitiu a identificação dos elementos com maior confiabilidade aos resultados.

3.3.4 Microscopia ótica (MO)

Os arcabouços desenvolvidos foram caracterizados por meio de Microscopia ótica, com o auxílio do Microscópio Advanced 3D Digital, Hirox- KH 7700, que permite reflexão e transmissão, possui profundidade de campo estendida, com medições 2D e 3D, este tipo de microscópio, além de ampliar as estruturas, pode fazê-lo capturando imagens tridimensionais de estrutura interna do material, estando acoplado a uma estação de Análise de Imagens. Para aplicação da técnica de MO, foram utilizados aumentos que variaram de 40X até 150X. O Microscópio ótico foi utilizado para ampliar as imagens e permitir a diferenciação dos arcabouços produzidos, por meio das diferentes colorações apresentadas pelas amostras.

3.3.5 Ensaio Mecânico de Compressão

A caracterização mecânica está entre os mais importantes testes físicos a serem realizados em materiais que desejam ser implantados e deverão suportar esforços mecânicos quando em uso, para aplicações ortopédicas, como regeneração óssea.

As propriedades mecânicas dos arcabouços foram caracterizadas por ensaio de compressão. A propriedade mecânica de compressão será avaliada com a finalidade de determinar como os arcabouços de quitosana/hidroxiapatita reagem quando comprimidos, e observar a carga máxima suportada por estes, para assim, determinar a capacidade de aplicação. Em decorrência da ausência de uma norma específica para o ensaio de compressão em arcabouços como os desenvolvidos na pesquisa, optou-se por adaptar o ensaio de compressão realizado por Fontes (2010) e atribuindo valores específicos para diâmetro dos corpos de prova e condições do ensaio. Assim, para realização do ensaio foram confeccionados arcabouços, para

cada concentração estudada, com diâmetro igual 20 mm e altura igual a 10 mm. Antes do ensaio foi realizada uma análise visual direta dos arcabouços, com o intuito de verificar a sua integridade e acabamento. Os testes de compressão pela ação de uma carga axial compressiva foi realizado em uma máquina Universal de ensaios eletrodinâmicos da marca Instron, modelo 3366, com uma célula de carga de 500N e taxa de deformação constante de 1,3 mm/min. A resistência a compressão foi calculada a partir da divisão entre a tensão máxima e a área original. Três amostras foram testadas e o valor médio de Módulo de Young com o seu respectivo desvio foi calculado para 10% de deformação.

3.3.6 Grau de Intumescimento

O ensaio de avaliação do Grau de Intumescimento (%GI), também conhecido como Ensaio de absorção, é aplicado com o intuito de investigar o comportamento do material durante a imersão e permanência em soluções aquosas de concentração iônica similar ao plasma sanguíneo.

O do Grau de Intumescimento foi obtido por meio da imersão dos arcabouços em solução tampão de PBS com pH 7,4 a uma temperatura de 37 °C durante 24 horas, conforme metodologia descrita por Wattanutchariya & Changkowchai, 2014. Inicialmente, os arcabouços secos foram pesados e em seguida imersos na solução de PBS, após o período de 24 horas, as amostras foram retiradas da solução e pesadas novamente, de modo que o %GI foi determinado seguindo a equação 2, descrita abaixo:

Equação 2- Grau de Intumescimento

$$GI(\%) = \frac{W_w \cdot W_o}{W_o} \times 100$$

Onde:

W_o = Peso dos arcabouços secos

W_w = Peso úmido dos arcabouços retirados da solução de PBS

3.3.7 Citotoxicidade

A citotoxicidade dos arcabouços será avaliada seguindo a norma ISO 10993-5: "Biological evaluation of medical devices- Part5: tests for cytotoxicity: in vitro methods", 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]. 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 de MTT tem sido utilizado como ensaio de viabilidade celular. As células utilizadas foram do tipo L929.

Para avaliação da citotoxicidade dos arcabouços, foi utilizado o método direto de contato entre o substrato do material e as células. As células L929 foram obtidas através da injeção intraperitoneal de Tioglicolato de Sódio (3,0%) em camungongos Swiss Mus Musculus, três dias antes dos experimentos. Após este período, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ (5,0%) para a retirada das células. A remoção foi realizada através da exposição da cavidade peritoneal, seguido de injeção intraperitoneal de 5 mL de PBS (pH 7,4) refrigerado e estéril, e de massagem vigorosa na cavidade e suspensão das células. As células foram transferidas para um tubo estéril e centrifugadas a 3500 RPM por 15 minutos, em três ciclos. O sobrenadante foi retirado e as células suspendidas em 1 mL de RPMI 1640-C.

Foi utilizada uma concentração de 5×10^5 células/mL RPMI e adicionadas 100 µL em uma placa de 96 poços. A placa foi transferida para a estufa de CO₂ (5,0%) a 37°C por 1 hora. Após este período, foram adicionadas as amostras e mais 200 µL de RPMI 1640-C. RPMI 1640-C foi utilizado como controle negativo. A placa foi incubada novamente em estufa de CO₂ a 37°C por 24 horas.

Após as 24 horas, foram adicionados 100 µL de solução de MMT (0,5 mg/mL) em RPMI 1640-C. Novamente, as placas foram incubadas em estufa de CO₂ (5,0%) a 37°C por 3 horas. Depois disso, o sobrenadante foi descartado e adicionado 100 µL de álcool isopropílico. A leitura da densidade ótica foi determinada em um leitor de microplacas (Victor3 – Perkin Elmer), 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.

De acordo com a classificação de citotoxicidade de materiais do documento ISO 10993-5: 1999, a viabilidade celular (%) determina a citotoxicidade do material de modo que, os resultados mais consideráveis são acima de 70%, além disso, pode-se classificar: > 90 o material é considerado como não-citotóxico; na faixa de 80 a 89 é levemente citotóxico; de 50 a 79 é moderadamente citotóxico; e em valores < 50 é severamente citotóxico.

3.3.8 Espectrofotômetro (UV- VIS)

O equipamento Espectrofotômetro, Perkin Elmer, detector com comprimento de onda variável UV/Vis modelo Lambda 35, com cubeta de quartzode caminho ótico de 1cm, foi utilizado para a realização do método analítico para determinação e quantificação dos fármacos, curcumina e dexametasona, no ensaio de liberação controlada das drogas nos arcabouços desenvolvidos. Além de, permitir realização de validação do método analítico conforme a Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, da Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA), que determina o "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos".

Para definir as condições ideais para análise inicialmente definiu-se o comprimento de onda de detecção dos fármacos isoladamente, para então seguir para elaboração da curva de calibração e depois para a validação do método. Para determinação do comprimento de onda de detecção foram utilizados a curcumina (Sigma Aldrich) e a dexametasona (Sigma Aldrich) como padrão do trabalho. Como solvente foi empregado o etanol P.A. (Neon, lote: 15079) e PBS. Foram empregadas soluções padrão de etanol e curcumina, e de etanol e dexametasona, em uma concentração de 1mg/mL dos fármacos em metanol. Para a elaboração da curva de calibração do método, partiu-se da diluição da solução estoque ou solução padrão preparadas com etanol, para obtenção de concentração entre 0,5 e 15 ug/mL para curva de calibração da curcumina; e entre 5 e 50 ug/mL para curva de calibração da dexametasona. A curva de calibração foi obtida por análise de regressão linear interpolando a concentração nominal do padrão com a área do pico cromatográfico detectado no UV-VIS. As curvas foram obtidas em triplicata (n=3). Os dados obtidos

foram tratados estatisticamente para a determinação da equação da reta (método dos mínimos quadrados) e dos coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2).

O estudo de liberação do fármaco juntamente com a Validação do método analítico, foram estudadas de acordo com a ANVISA e conforme pesquisas de Pedroso, (2009); Silva et al., (2007); Duarte et al, (2007); Valgas(2005); Carbinatto, (2010). E a determinação de fármaco liberado foi estudada conforme Manju & Sreenivasan, (2011), e Naficy et al., (2009).

3.3.8.1 Validação do método analítico

A validação do método foi realizada conforme a Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que determina o "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". A validação deve garantir que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Portanto, devem ser realizados os seguintes experimentos: seletividade, linearidade, exatidão, precisão, 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 dos arcabouços sem fármaco, comparadas com as bandas do sistema contendo fármaco.

Linearidade

A linearidade foi determinada por meio de medidas de absorbância (Abs) feitas em triplicata para as concentrações de soluções utilizadas para obtenção da curva de calibração. A linearidade entre as concentrações e as medidas de Abs foi avaliada pelo coeficiente de correlação (R), e pode ser considerada satisfatória se $R \geq 0,99$ (ANVISA, 2003).

Exatidão

A exatidão do método foi avaliada pela análise de soluções de curcumina e dexametasona em concentrações baixa, média e alta, (1, 6, 12 µg/ml para curcumina). Expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a teórica correspondente. Sendo representada na equação 3.

Equação 3- Exatidão

$$R\% = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

A ANVISA estabelece como aceitáveis valores de exatidão com coeficiente de variação (CV%) máxima de 5%, portanto uma recuperação entre 95% a 105% é considerada satisfatória.

Precisão

A precisão foi determinada pela repetitividade do procedimento analítico e foi determinada por meio da análise de cinco soluções de mesma concentração (6 µg/mL para curcumina; e 30 µg/mL para dexametasona) pelo mesmo método, sob as mesmas condições de medição, mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento e mesmo dia, definindo a repetibilidade. Já a precisão intermediária foi avaliada no mesmo laboratório, utilizando o mesmo equipamento, porém em dias diferentes e com analistas diferentes. O coeficiente de variação (CV%) máximo permitido é de 5% (ANVISA, 2003).

Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados a partir do estudo de linearidade, baseando-se no desvio padrão e na inclinação da curva analítica. E, são expressos como: $LQ=3(\sigma/S)$, e $LD=10(\sigma/S)$, onde σ é o desvio padrão dos coeficientes lineares das curvas de calibração do ensaio de linearidade, e S é a inclinação da curva padrão ou média dos coeficientes angulares.

3.3.8.2 Quantificação dos fármacos

A quantidade de fármaco libertado foi determinada por meio de espectroscopia de UV-visível (Lambda 35) por monitorização da absorvência máxima a 422nm para curcumina e 236nm para dexametasona. Uma solução de PBS (pH 7,4 a 25 ° C) foi usado como o meio de libertação. Para quantificação do teor de fármaco no arcabouços desenvolvidos nas Etapas II e III os arcabouços foram pesados e medidos com diâmetro igual 20 mm e altura igual a 10 mm, e imersos em volumes de 60 ml de PBS em um sistema sob agitação magnética a 250 RPM a temperatura ambiente. A cada intervalo de tempo de 1 hora foram retiradas alíquotas de 3 mL do sistema e quantificado pelo UV-VIS, os tempos para determinação foram 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 24 horas. Após, cada extração das alíquotas foi realizada a reposição de 3 mL de PBS. A quantidade cumulativa de fármaco libertado foi obtida a partir da quantidade de fármaco no meio de libertação antes e depois de um dado intervalo de tempo. A quantificação foi determinada avaliando-se a quantidade de curcumina ou dexametasona, associada aos arcabouços, de modo que para os arcabouços de QHC1 (4,5g de curcumina), QHC5 (22,5g de curcumina) QHC10 (45,0g de curcumina); e QHD1 (4,5g de dexametasona), QHD1 (22,5g de dexametasona). A concentração de fármaco para cada alíquota foi comparado contra a curva de calibração de cada fármaco. O teor de fármaco liberado foi calculado de acordo com a equação 4.

Equação 4- Determinação do teor de fármaco liberado.

$$\text{Teor de fármaco liberado \%} = \frac{\text{Valor}_{\text{quantificado}}}{\text{Valor}_{\text{total}}} \times 100$$

Onde:

Valor_{total} representa a massa de fármaco adicionada inicialmente nos arcabouços;

Valor_{quantificado} representa o valor analisado através do UV-VIS.

3.4 Fluxograma

Fluxograma experimental, Figura 16, etapas e desenvolvimento da pesquisa.

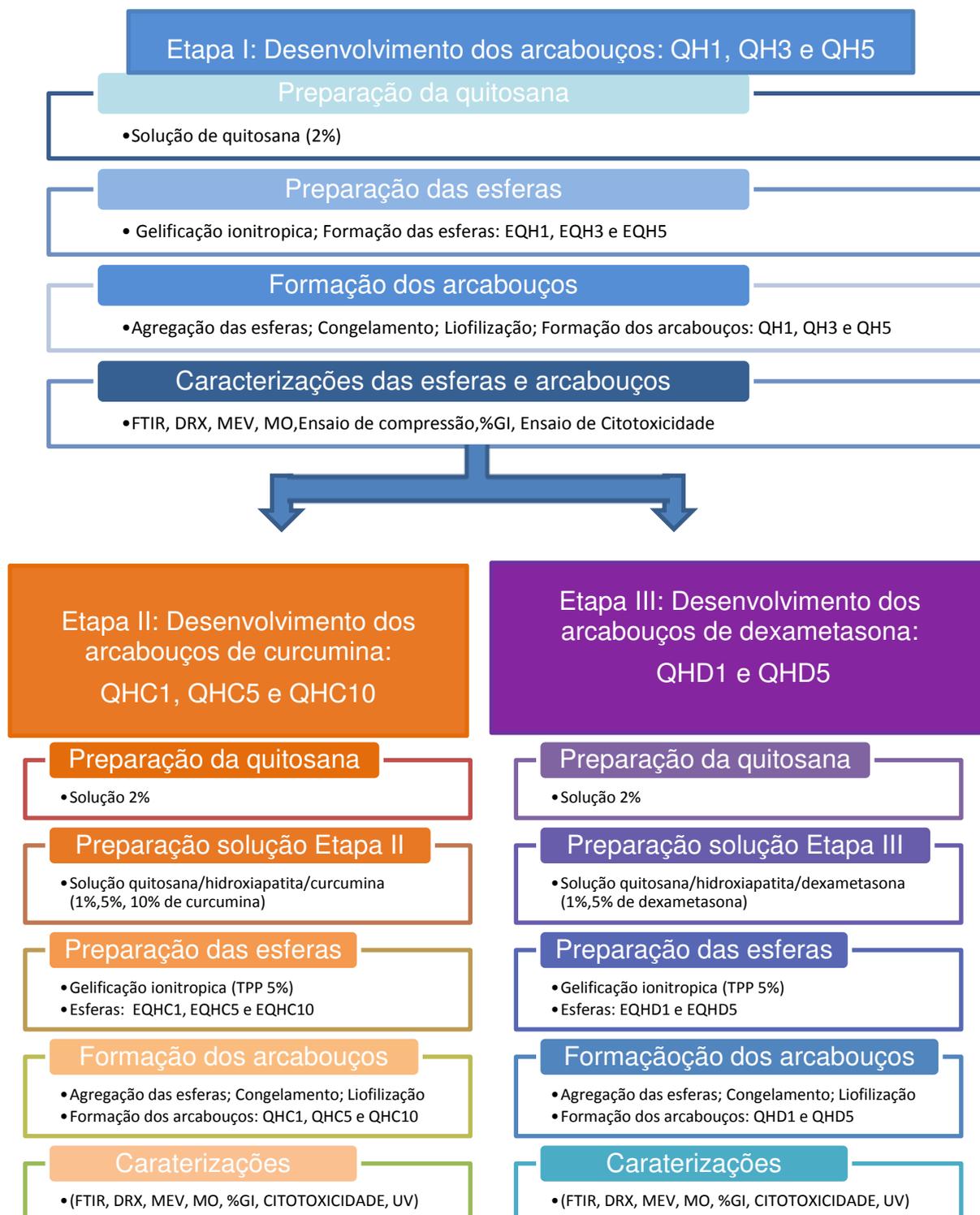


Figura 16- Fluxograma experimental da pesquisa.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para promover o melhor entendimento da pesquisa, os resultados foram divididos em três partes, de acordo com as Etapas descritas na metodologia (seção 3.2).

4.1 Etapa I

Os resultados expostos a seguir referem-se à Etapa I, etapa exploratória do método de fabricação dos arcabouços de quitosana/hidroxiapatita, com concentrações de 1%, 3% e 5% de HA, codificados como: QH1, QH3, QH5, respectivamente, e escolha do arcabouço mais adequado para dar continuidade as Etapas II e III.

4.1.1 Espectroscopia na Região de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Para essa etapa, foram obtidos os espectros na região do infravermelho para os materiais utilizados, a quitosana e a hidroxiapatita, e os arcabouços QH1, QH3, QH5, e estão apresentados na Figura 17.

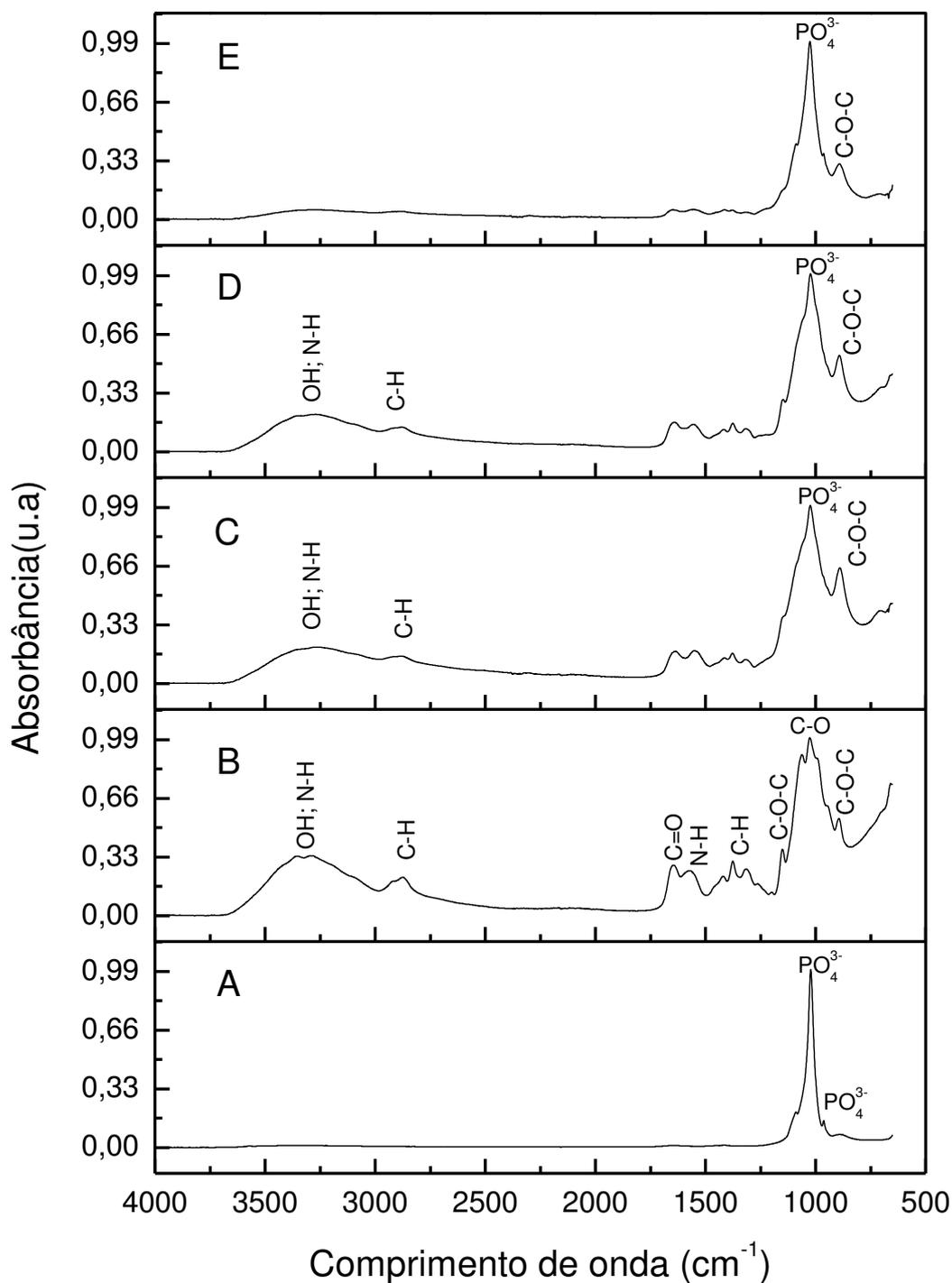


Figura 17- Espectros de FTIR: (a) Hidroxiapatita, (b) Quitosana, (c) Arcabouço QH1 (d) Arcabouço QH3, (e) Arcabouço QH5.

Através da análise por Espectroscopia do Infravermelho foram observadas as bandas de absorção presentes no material utilizado e dos arcabouços fabricados.

A partir do espectro de FTIR da Hidroxiapatita, Figura 17(a), pode-se observar que as principais bandas características como sendo: o pico bem definido em torno de 1047cm^{-1} e em 1090cm^{-1} correspondente à deformação do grupo PO_4^{3-} , e outro em 962cm^{-1} corresponde as vibrações de alongamento do grupo PO_4^{3-} , esses resultados apresentam-se em acordo com os espectros de HA observados por Chen et al., (2002) e por Han et. al., (2010). Além disso, podemos associar aos resultados de Volkmer & Santos, (2007) que em sua pesquisa relatam as bandas características da hidroxiapatita como sendo, além dos picos citados que se relacionam com as ligações PO_4^{3-} , a presença de outro pico em torno de 3570cm^{-1} que é correspondente ao grupo -OH estrutural, e de outro pico que se estende de aproximadamente 3700 a 3000cm^{-1} e o pico em 1627cm^{-1} correspondem à água absorvida, que podem ser observados na Figura 11(a) com menos intensidade.

A partir do espectro de FTIR da quitosana, Figura 17(b), pode-se observar as principais bandas características, sendo: banda de estiramento axial de OH entre 3180 e 3600cm^{-1} , sobreposta à banda de estiramento de N-H; grupo C-H em 2820cm^{-1} ; deformação axial de C=O de amida I em 1656cm^{-1} ; deformação angular de N-H de amina primária em 1560cm^{-1} ; estiramento vibracional de C-O do álcool primário em 1000cm^{-1} ; e presença de pico em 1120cm^{-1} e em 890cm^{-1} relacionados a estruturas polissacarídicas, ligação C-O-C (éter). O espectro de quitosana obtido está de acordo com os espectros característicos descritos nas pesquisas de Souza et al., (2010); Torres et al., (2005); Han et. al., (2010); Chen et al., (2002), e Sampaio (2012).

Embora os espectros na região do infravermelho da quitosana e dos arcabouços QH1, QH3, QH5, respectivamente, (Figura 17(c, d, e)), apresentem certas semelhanças, é possível observar algumas diferenças, que são atribuídas as diferentes concentrações de hidroxiapatita presentes nas esferas, as diferenças são evidentes principalmente nas regiões correspondentes aos seguintes intervalos de comprimento de onda: 3550 a 3250cm^{-1} e 1800 a 1500cm^{-1} . Comparando-se os espectros de quitosana com os dos arcabouços, verifica-se que houve significativas modificações na região entre 1700 a 1300cm^{-1} . No caso das amostras de arcabouços, é visível a diminuição da banda de estiramento axial de OH em torno de 3460cm^{-1} presente no espectro da quitosana, isso em virtude da presença da hidroxiapatita. Como também vai se evidenciando o pico em torno de 1000cm^{-1} característico do estiramento vibracional de C-O da quitosana (Souza et al, 2010), e

ocorre o aumento do pico em torno de 800cm^{-1} , que provavelmente pode ser atribuído a hidroxiapatita, sendo esse pico é um triplete que se relaciona com as ligações PO_4^{3-} em 601 e 570cm^{-1} com contribuição da ligação $-\text{OH}$ do grupo apatita em 630cm^{-1} (Volkmer & Santos, 2007). Diante disso, a partir das curvas obtidas na Figura 17 (c), (d), (e), podemos observar que de forma geral, as absorções mais características são as de quitosana. Além disso, pode-se perceber que com o aumento da concentração de hidroxiapatita ocorrem alterações como a diminuição das bandas mais características da quitosana fazendo com que haja um comportamento mais próximo ao da hidroxiapatita, em especial no arcabouço, QH5, corroborando com os resultados refletidos em DRX, a seguir.

4.1.2 Difração de raios X (DRX)

Para essa etapa, foram obtidos os difratogramas para os materiais utilizados, a quitosana e a hidroxiapatita, e os arcabouços de QH1, QH3 e QH5 estão apresentados na Figura 18.

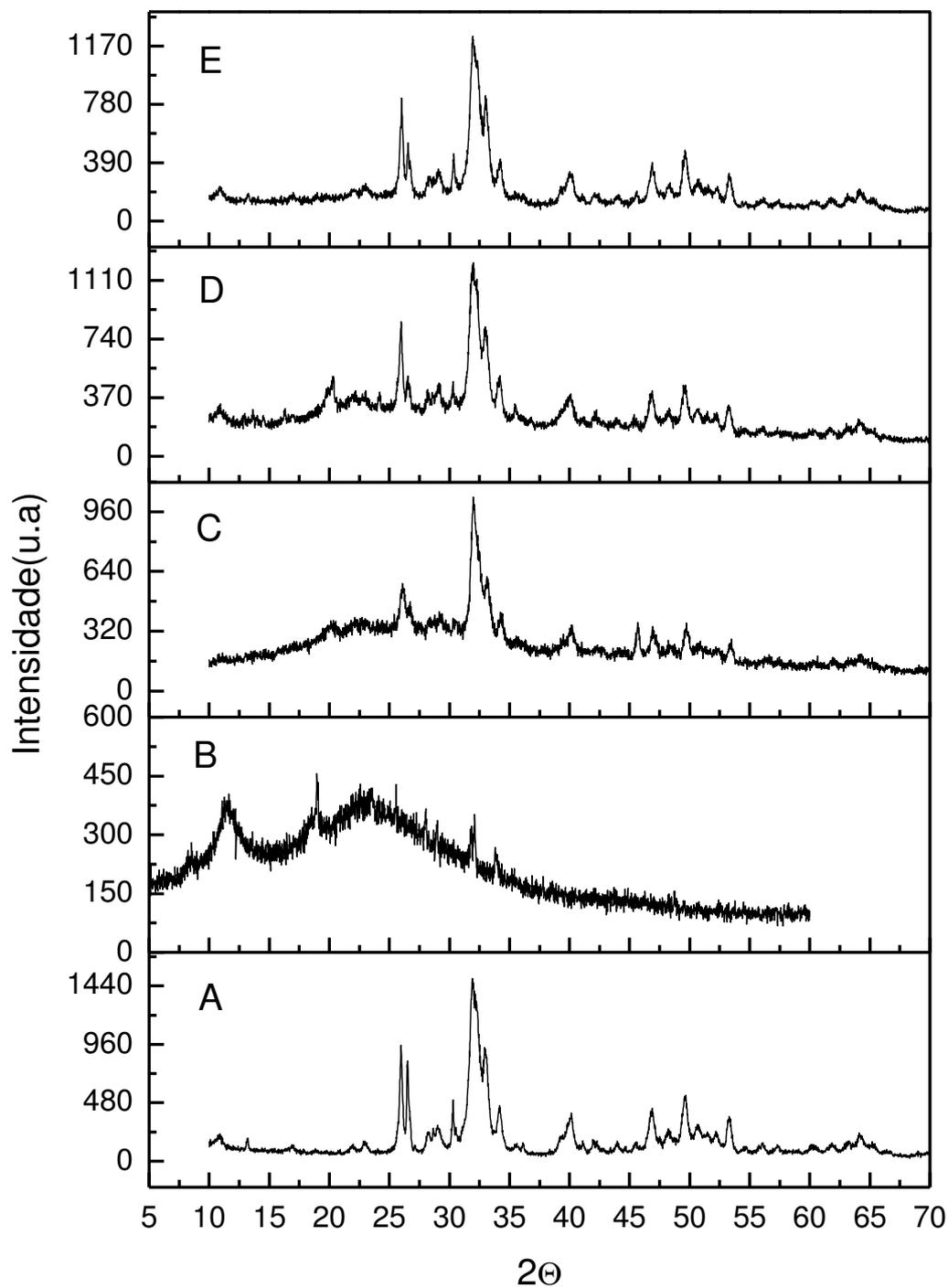


Figura 18- Difratoograma para: (a) Hidroxiapatita, (b) Quitosana, (c) Arcabouço QH1, (d) Arcabouço QH3, (e) Arcabouço QH5.

O difratograma da Hidroxiapatita, Figura 18(a), apresenta picos de difração característicos com o padrão JCPDS 9-432 e JCPDS 72-1243, e foi essencial para

comparação com os difratogramas dos arcabouços QH1, QH3, QH5, respectivamente. Uma vez que permitiu identificar, os dois grupos de picos de reflexão que podem ser utilizados para avaliar a formação de hidroxiapatita: um pico a $2\theta = 26^\circ$ (002), $2\theta = 31,8^\circ$ (211), $2\theta = 33^\circ$ (112), $2\theta = 40^\circ$ (310), $2\theta = 46^\circ$ (222), $2\theta = 50^\circ$ (213) (FOOK, 2012; MOREIRA et. al, 2007; CHEN et al., 2002).

O difratograma da Quitosana (Figura 18(b)) apresenta picos de difração em $2\theta = 25^\circ$ e observou-se um halo de difração em $2\theta = 10^\circ$. Segundo Uragami (2006), as fortes interações intra e intermoleculares devido às pontes de hidrogênio entre os grupos amina e álcool presentes na molécula de quitosana, faz com que esse material se apresente como semi-cristalino daí a ausência de picos bem definidos.

A análise de DRX para os arcabouços QH1, QH3, QH5, respectivamente, apresenta um aumento na cristalinidade, atribuído à cristalinidade do hidroxiapatita, quando comparada com a quitosana, e apresentam os picos que correspondem a fase JCPDS 9-432, apresentando em todos os difratogramas para os arcabouços os picos: $2\theta = 26^\circ$ (002), $2\theta = 31,8^\circ$ (211), $2\theta = 33^\circ$ (112), $2\theta = 40^\circ$ (310), $2\theta = 46^\circ$ (222), $2\theta = 50^\circ$ (213). Além disso, podemos observar que conforme vai aumentando a concentração de hidroxiapatita o difratograma apresenta os picos identificados no difratograma da HA mais definidos. Além disso, observa-se no padrão de DRX dos arcabouços QH1, QH3, QH5, que a região de em torno de $2\theta = 10^\circ$ e 20° apresenta um alargamento típico de fase amorfa, indicada pela quitosana, esta região expressa a falta de periodicidade a longo alcance, em decorrência das deformações; como também, podemos observar ainda nesta região que para os arcabouços na concentração de QH5 observa-se maior cristalinidade, pela presença de picos bem definidos, em função da maior quantidade de HA.

4.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDS)

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para avaliar a morfologia e a superfície das esferas constituintes dos arcabouços EQH1, EQH3 e EQH5, tanto em aspecto externo como em aspecto interno, por meio de corte realizado na secção transversal das esferas EQH1, EQH3 e EQH5. As micrografias e as análises por EDS estão apresentadas nas Figuras 19, 20 e 21.

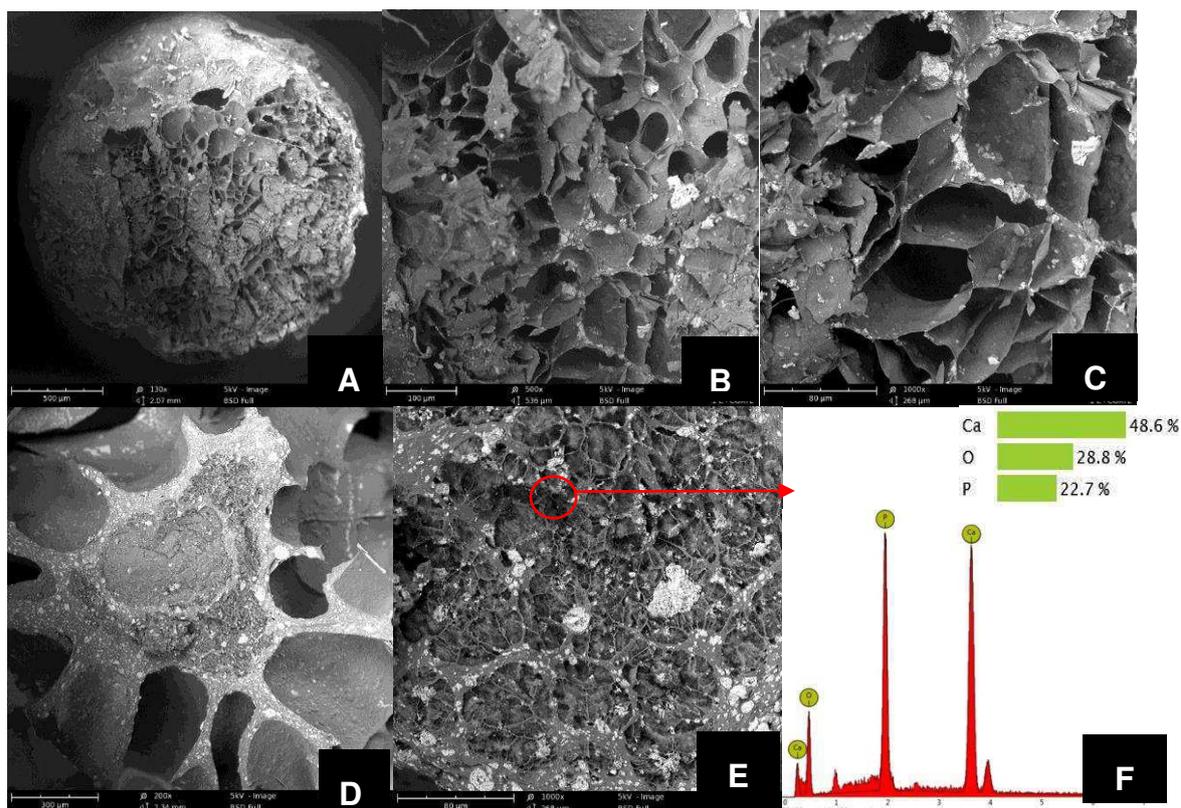


Figura 19- Micrografias das esferas EQH1: superfície externa em aumento de (a)100x, (b)500x, (c)1000x; superfície interna em aumento de (d)100x, (e)1000x e (f)EDS da superfície indicada.

A partir das micrografias apresentadas na Figura 19 podemos afirmar que as estruturas formadas têm de fato uma geometria esférica, com presença de poros com diâmetros variados, como evidenciado pela Figura 19a, b e c. Além disso, a partir da micrografias da Figura 19b verifica-se que as esferas compósitas não apresentam sua superfície totalmente homogêneas devido à presença de hidroxiapatita, que é observada como partículas dispersas no seio da fase polimérica, de forma que, a análise de EDS, apresentada na Figura 19f, permitiu confirmar que os pontos brancos observados se tratam de fosfato de cálcio, pela presença dos elementos cálcio e fósforo, confirmando assim a presença da hidroxiapatita dispersa na matriz de quitosana.

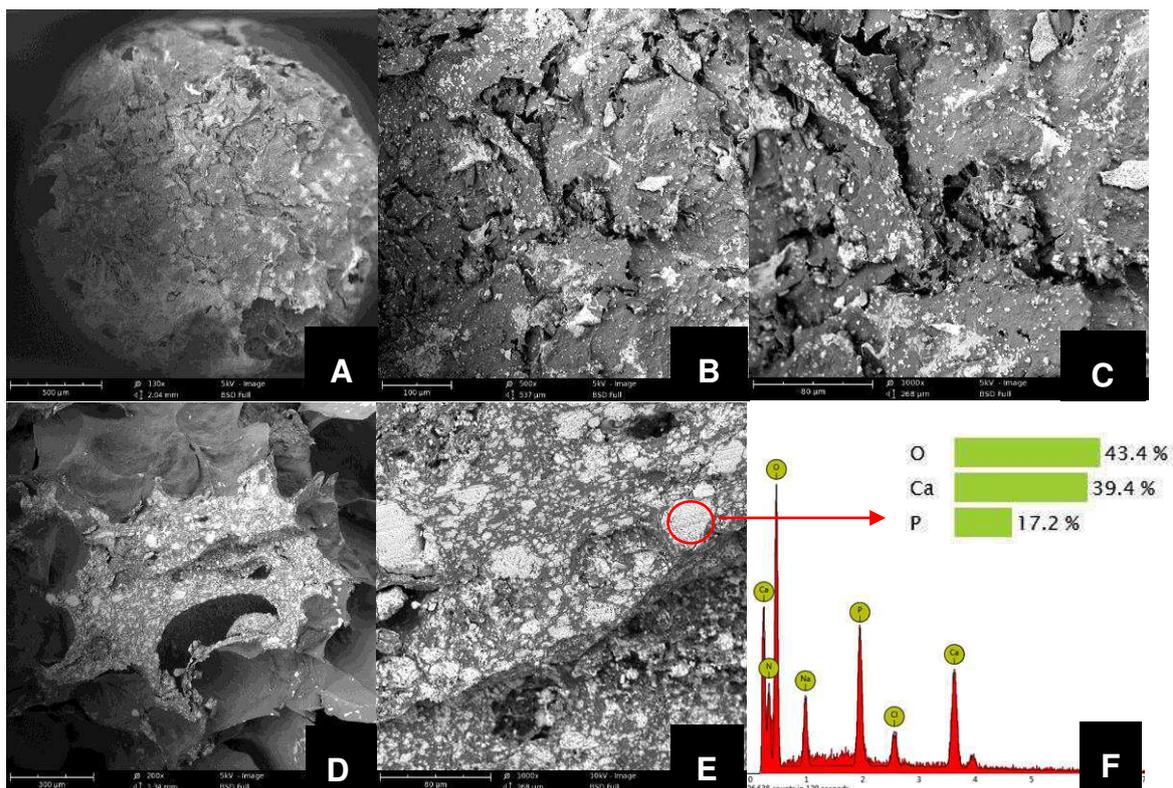


Figura 20- Micrografias das esferas EQH3: superfície externa em aumento de (a)100x, (b)500x, (c)1000x; superfície interna em aumento de (d)100x, (e)1000x e (f)EDS da superfície indicada.

Analisando as micrografias das esferas EQH3 apresentadas na Figura 20, verifica-se que com a composição usada foi possível obter uma geometria esférica, com menor número de poros superficiais, sendo estes também de menor dimensão. Indicativo de que com a introdução de uma maior quantidade de fosfato de cálcio, verifica-se que a superfície da esfera se torna mais densa, com menos espaços vazios, e que os pontos brancos, identificados como sendo o cerâmico, passam a ser mais frequentes, sendo ainda possível identificar duas fases distintas, a polimérica e a cerâmica.

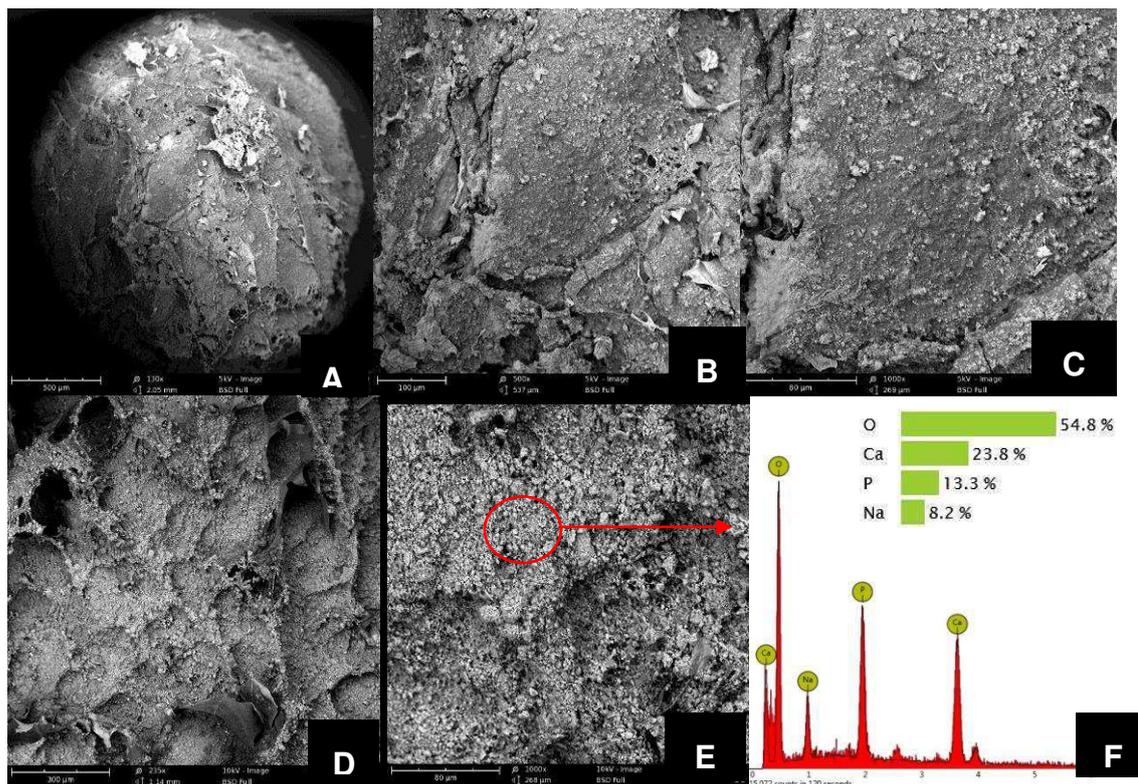


Figura 21- Micrografias das esferas EQH5: superfície externa em aumento de (a)100x, (b)500x, (c)1000x; superfície interna em aumento de (d)100x, (e)1000x e (f)EDS da superfície indicada.

Nas micrografias apresentadas na Figura 21 podemos afirmar que mesmo observando-se uma geometria esférica, com o aumento do percentual de cerâmico, a tendência verificada foi a de maior densidade da superfície e consequente diminuição do número de poros ou espaços vazios. Dos poros observados verifica-se ainda que estes têm menor dimensão. Verifica-se também que a superfície se tornou mais rugosa e que nesta última composição já não é possível distinguir a diferença entre a fase polimérica e a cerâmica, e que em uma região aleatória como mostrado nas micrografias da Figura 21, por EDS, Figura 21e, podemos identificar as fases cerâmicas pela presença de cálcio e fósforo, indicando que a hidroxiapatita está de fato bem distribuída de forma a não possibilitar sua diferenciação entre a quitosana, como era permitido fazer nas concentrações anteriores.

Com o auxílio de um software denominado IMAGEJ, foi possível fazer um estudo do tamanho dos poros observados para as micrografias anteriores. Na Figura 22 apresentam-se o tamanho e a distribuição dos poros para os compósitos formados:

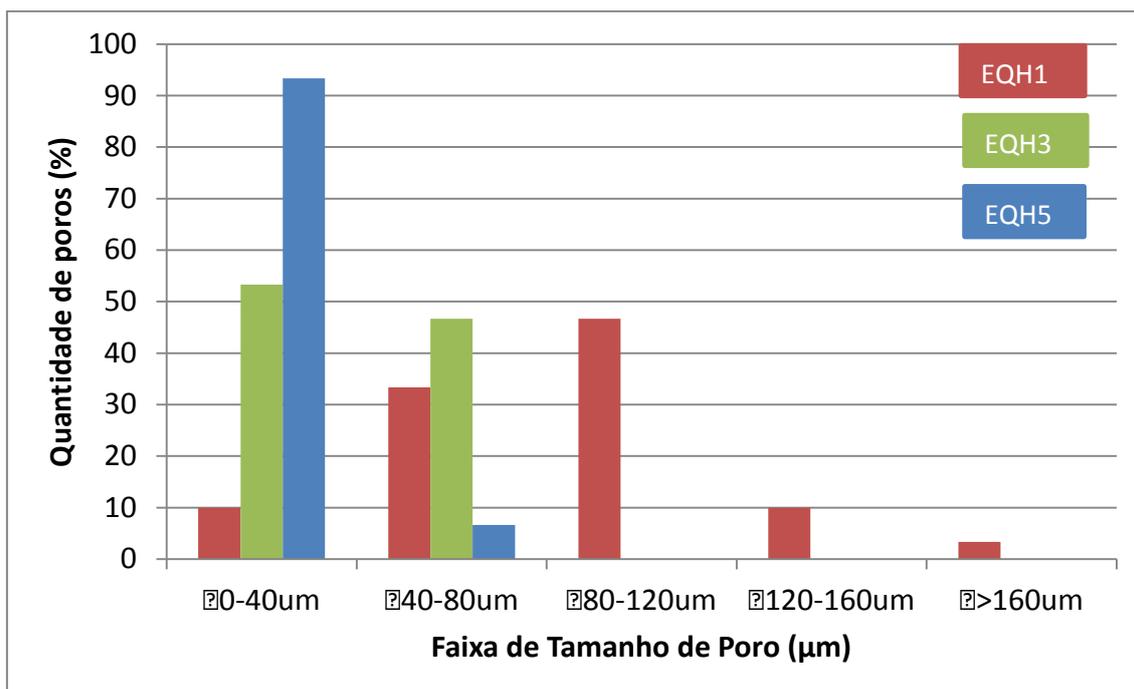


Figura 22- Histograma de Distribuição de poros. Vermelho EQH1, Verde EQH3, Azul EQH5.

Analisando o histograma apresentado na figura 22, verifica-se que a composição de EQH1 apresenta uma maior quantidade de poros entre 80- 120 μm , enquanto que as composições de EQH3 e EQH5 apresentam maior quantidade de poros até 80 μm . Diante disso, observa-se que com o aumento da quantidade de cerâmico nas esferas a quantidade de poros superficiais diminuiu, tendo a homogeneidade e a rugosidade aumentando consideravelmente. O tamanho e a forma do poro afetam a capacidade de fixação e de crescimento das células e, portanto, influencia a eficácia da regeneração de tecidos. Segundo Cheung et al. (2007), o tamanho e geometria ideal dos poros são dependentes de tipos específicos de células. Por exemplo, o tamanho ótimo para o crescimento celular em osso poroso varia de 75-250 μm , enquanto que para tecido fibro-cartilaginoso, o tamanho deve ser maior, estando em torno de 200-300 μm . A explicação para a diminuição da porosidade poderá estar associada a fatores que dizem respeito ao congelamento e liofilização, uma vez que os poros são criados pelo congelamento da água presente em cada esfera, ocorrendo difusão de moléculas de água e agregação em cristais que depois de sublimados na liofilização deixam o espaço vazio observado como poro. Com a inclusão de maior quantidade de cerâmico e com a possível interação deste com o polímero é possível que a água tenha menor mobilidade para formar cristais maiores e assim ocorra a formação de poros

menores. Por outro lado devido à menor fração polimérica menos água é adsorvida pelas macromoléculas poliméricas e, assim, menor quantidade de poros é formada.

No âmbito da engenharia de tecidos, os suportes tridimensionais devem ter alta porosidade e estrutura de poros interligados para melhorar a condição biológica, permitindo a proliferação e diferenciação de células. A porosidade dos arcabouços foi avaliada por base no método utilizado por HANA et al.(2010), e está representada em valores percentuais no Gráfico da Figura 23.

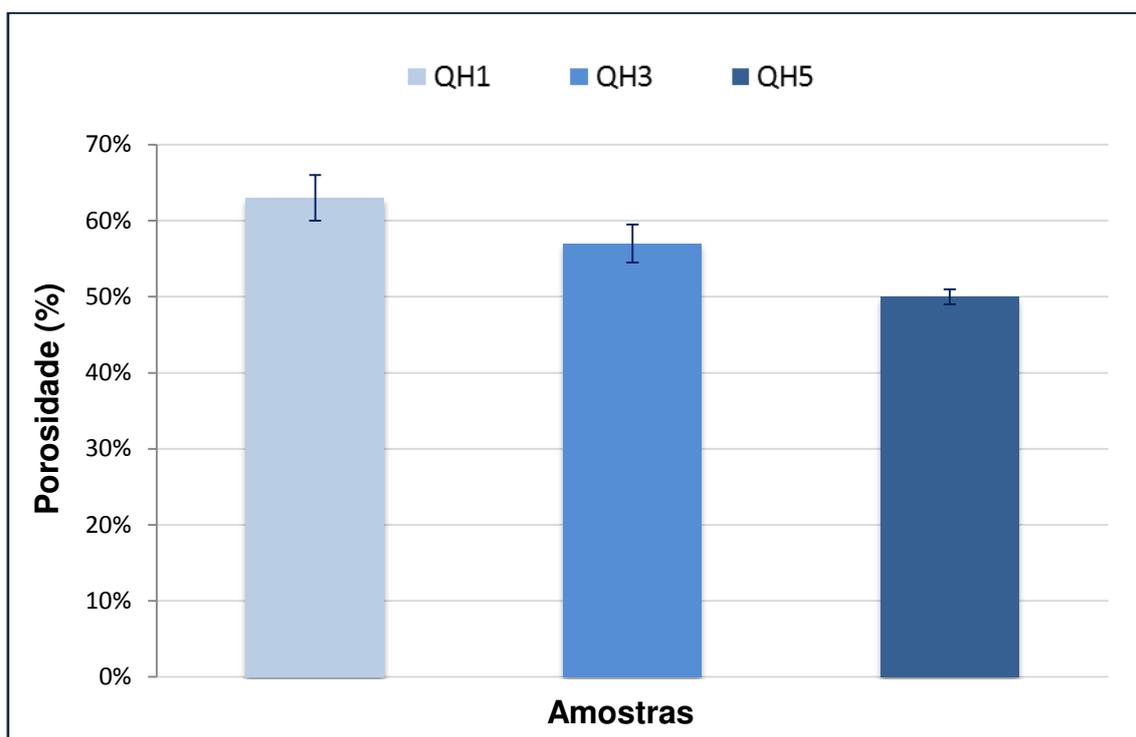


Figura 23- Gráfico da Porosidade (%) dos arcabouços: QH1 (HA1%); QH3 (HA3%); QH5 (HA5%).

Os resultados do ensaio de Porosidade (Fig. 23) mostraram que quanto maior a concentração de hidroxiapatita nos arcabouços formados há uma tendência à diminuição da porosidade nos arcabouços, de modo que, em QH1 pode-se obter maior porosidade (63 ± 3), e em arcabouços QH5 observa-se menos porosidade (50 ± 1). Corroborando com os resultados observados nas micrografias e discutidos anteriormente, em que se pode observar que quanto maior a concentração de hidroxiapatita havia uma diminuição na presença e no tamanho de poros na estrutura. Zhang & Zhang, (2001), consideram que a porosidade mais adequada para os arcabouços deve estar em valores em acima de 70%, considerando esta

porcentagem ideal para promover diferenciação celular e permitir proliferação das células, e osteocondutividade. Cai et al. (2011), em sua pesquisa desenvolveu arcabouços compostos por quitosana/hidroxiapatita, e obteve resultados de porosidade em torno de 80%, sendo bem maiores que os obtidos nesta pesquisa. Bem como, Wattanutchariya & Changkowchai, 2014 também em sua pesquisa com arcabouços compostos por quitosana-alginato/hidroxiapatita, obteve resultados de porosidade em torno de 70%. A diferença de porosidade encontrada nas literaturas reportadas em relação a esta pesquisa pode ser atribuída à metodologia de obtenção dos arcabouços, de modo que, pode ser interessante ajustar a metodologia para obtenção de arcabouços com porosidade maior que 70%.

4.1.4 Microscopia Ótica (MO)

A técnica de Microscopia Ótica foi utilizada para auxiliar nas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), na investigação dos arcabouços QH1, QH3, QH5 (Figura 24).

As Figuras 24(a), (c) e (e) mostram as análises das esferas de EQH1, EQH3 e EQH5, respectivamente, que foram obtidas a partir do método de gelificação ionotrópica, e as Figuras 24(b), (d) e (f) apresentam imagens da seção transversal dos arcabouços QH1, QH3, QH5, respectivamente, obtidos por agregação de partículas.

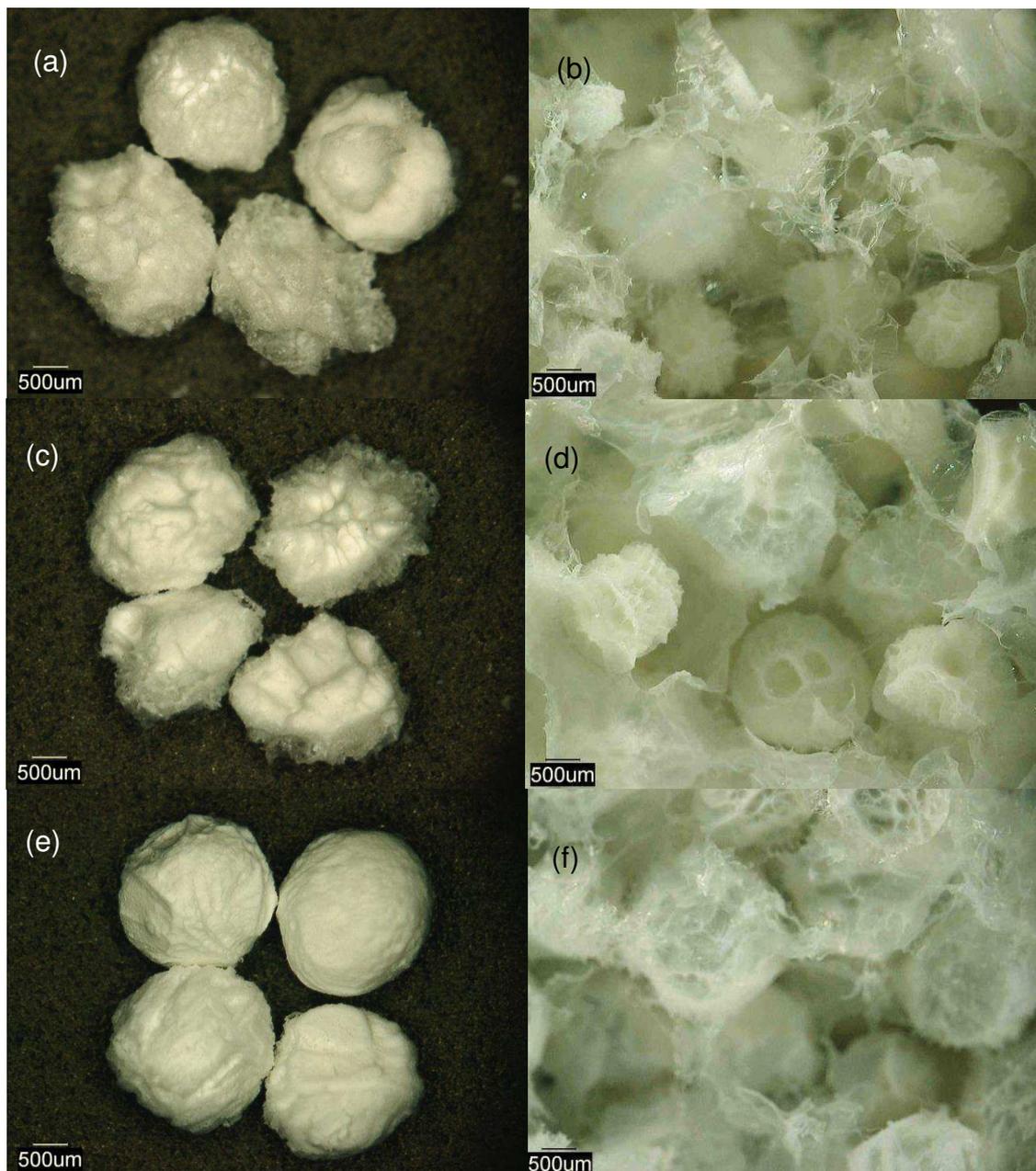


Figura 24- Imagens obtidas por microscopia óptica, em aumento de 50x, para: (a) EQH1; (b) QH1; (c) EQH3; (d) QH3; (e) EQH5; (f) QH5.

A partir das imagens obtidas para as esferas e os arcabouços formados por quitosana/hidroxiapatita com diferentes concentrações de HA, podemos afirmar que à medida que se aumenta a concentração de HA nas esferas apresentadas nas Figuras 24(a), (c) e (e), verifica-se a formação de estruturas mais densas e com formato esférico mais definido, como representado na figura 24 (e), que apresenta a esfera com maior concentração de HA. Como também, verifica-se que de modo geral a inclusão de hidroxiapatita ocasionou um leve aumento no diâmetro das

partículas, que estão em torno de $1820 \pm 210 \mu\text{m}$ para as esferas EQH1, de $1920 \pm 170\mu\text{m}$ para as esferas EQH3, e de $2166 \pm 230\mu\text{m}$ para as esferas EQH5. Resultados semelhantes em relação ao tamanho de esferas foi observado por Morais et al.(2008), que obteve esferas de quitosana produzidas pelo método de gelificação ionotrópica com diâmetro médio de 2000-3000 μm , utilizando uma agulha hipodérmica ($0,7 \times 25 \text{ mm}^2$), onde as gotículas formadas foram coletadas em uma solução de NaOH (10%) e sem seguidas reticuladas com glutaraldeído. As diferenças, ou diminuição do tamanho médio das esferas podem ser atribuídas ao tipo de reticulante utilizado nesta pesquisa, que no caso foi o tripolifostado de sódio.

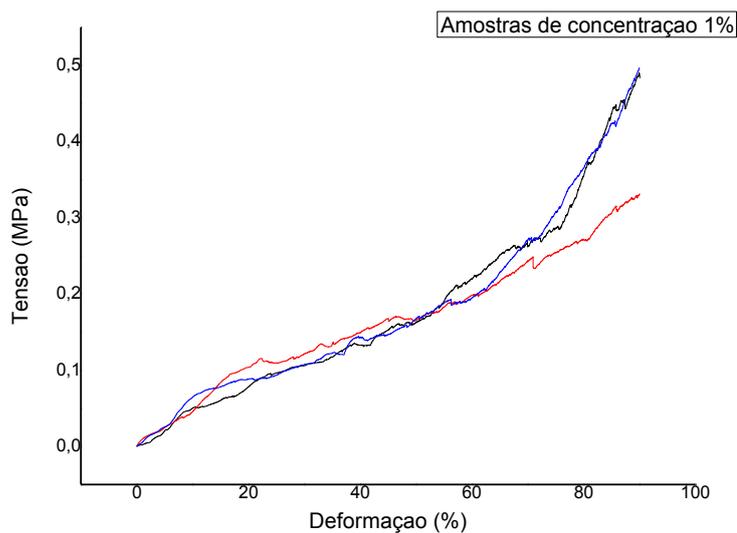
A técnica de Microscopia Ótica (Figuras 24) permitiu a identificação do formato dos arcabouços, formados depois do processo de agregação de partículas, por meio do uso de gelatina, e a visualização da estrutura porosa como apresentado nas Figuras 24(b), (d) e (f). De forma geral, todos os arcabouços exibiram estrutura porosa com uma boa interligação e tamanho de poro, estando em torno de 80 a 300 μm . O tamanho e a forma do poro afetam a capacidade de fixação e de crescimento das células e, portanto, influencia a eficácia da regeneração de tecidos. Segundo CHEUNG et al. (2007), o tamanho e geometria ideal dos poros são dependentes de tipos específicos de células. Por exemplo, o tamanho ótimo para o crescimento celular em osso poroso varia de 75-250 μm , enquanto que para tecido fibrocartilaginoso, o tamanho deve ser maior, estando em torno de 200-300 μm . Além disso, a interligação dos poros no arcabouço também afeta a migração e proliferação celular.

4.1.5 Ensaio de Compressão

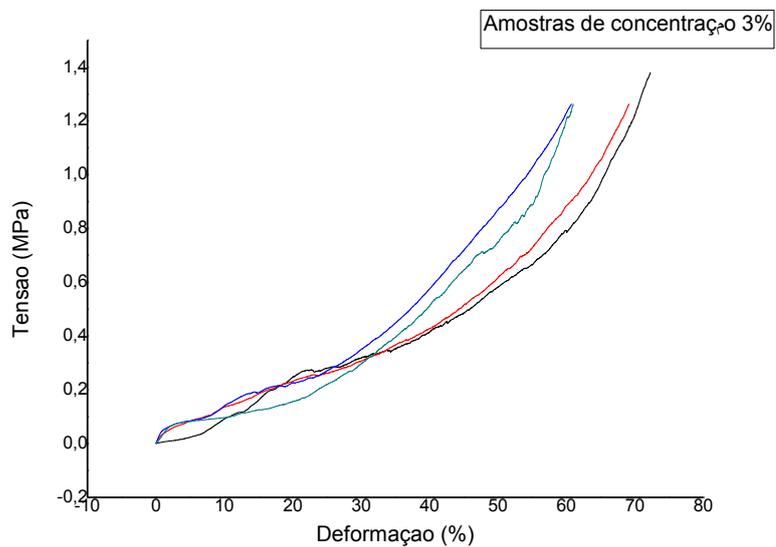
A caracterização mecânica está entre os mais importantes testes físicos a serem realizados em materiais que desejam ser implantados e deverão suportar esforços mecânicos quando em uso, para aplicações ortopédicas, como regeneração óssea.

As propriedades do tecido ósseo dependem da sua composição (colágeno e hidroxiapatite) e da sua estrutura (trabécular ou cortical) (Fook et al., 2012). Os arcabouços utilizados em engenharia de tecidos ósseos devem possuir uma compatibilidade estrutural mais aproximada possível, i.e. devem ter um comportamento mecânico semelhante ao tipo de tecido que se pretende reconstruir.

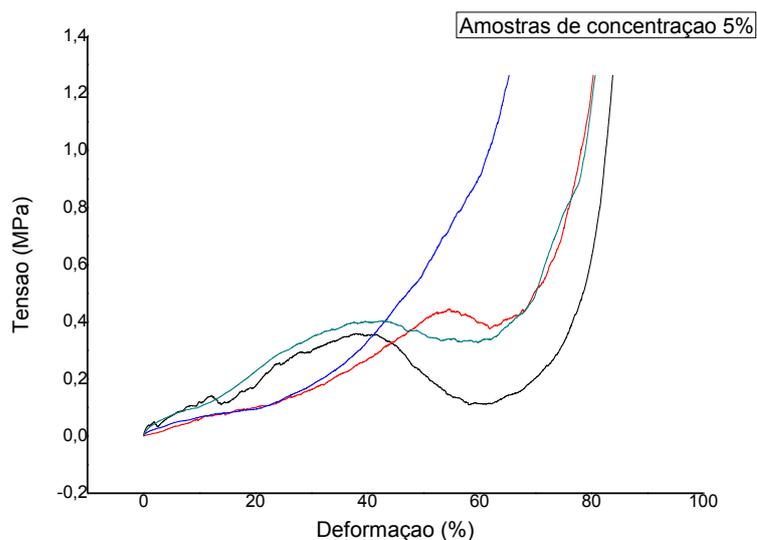
As propriedades mecânicas dos arcabouços foram caracterizadas por ensaio de compressão, em quatro amostras de cada composição escolhidas aleatoriamente, e as curvas tensão-deformação obtidas para os arcabouços QH1, QH3 e QH5, estão apresentadas na Figura 25.



(a) Curvas dos arcabouços QH1.



(b) Curvas dos arcabouços QH3.



(c) Curvas dos arcabouços QH5.

Figura 25- Curvas tensão-deformação dos arcabouços: (a) QH1 (b) QH3 (c) QH5.

A partir das curvas tensão-deformação, Figura 25, podemos observar que independente da concentração de hidroxiapatita presente, as análises por compressão geraram curvas tensão-deformação típicas de um sólido elastomérico celular, tais como, o comportamento de um polímero elastômero e, a nível biológico, comportamento de espumas de célula aberta de baixa densidade, Figura 26.

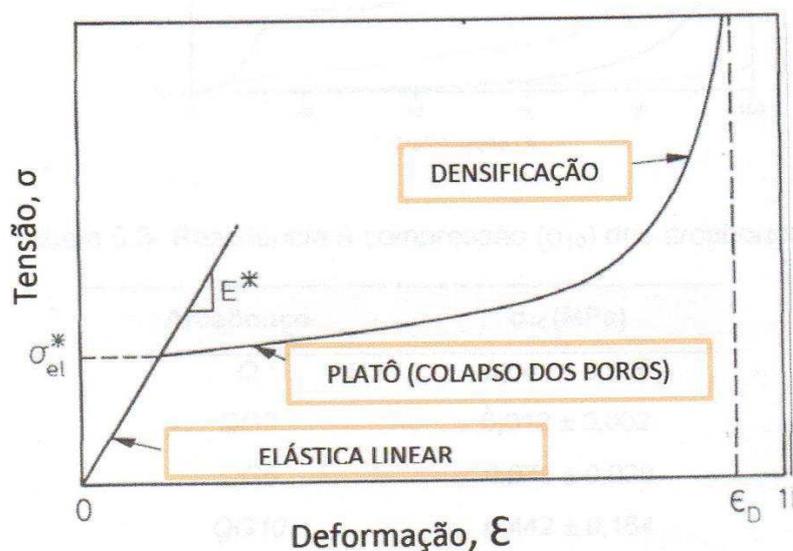


Figura 26- Curva típica de tensão-deformação uniaxial de um sólido elastomérico celular em compressão apresentando as regiões elástica linear, platô (colapso) e densificação, assim como o módulo elástico linear (E^*) e tensão elástica na região de colapso. (Adaptado de Fook, 2012).

Essas curvas são caracterizadas por três regiões distintas: (1) uma região elástica linear controlada pela flexão das paredes dos poros, (2) um longo platô na curva devido ao colapso dos poros, mostrado a seguir na Figura 19 (3) uma região caracterizada pelo aumento da tensão sem grande incremento de deformação, conhecida como região de densificação, onde os poros são completamente colapsados, o que provoca um aumento rápido da resistência do material (OLIVEIRA et. al, 2007), conforme a Figura 27.

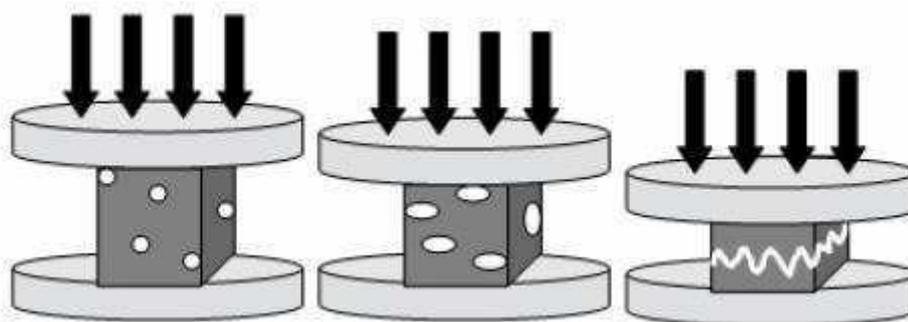


Figura 27- Esquema do comportamento dos poros durante o ensaio de compressão (OLIVEIRA et. al, 2007).

E, além disso, a nível comparativo podemos afirmar que as pequenas diferenças observadas entre as curvas anteriores são provenientes das diferentes concentrações de hidroxiapatita. Que resultaram em diferentes tensões como podemos observar na tabela 6 a seguir:

Tabela 6- Propriedades mecânicas de compressão.

Composição	QH1	QH3	QH5
Tensão máxima (MPa)	0,44 ± 0,09	1,29 ± 0,06	1,26 ± 0,00
Módulo de Elasticidade(MPa)	0,73± 0,29	3,39 ± 0,47	2,32 ± 0,82

Do ensaio de MEV verificou-se que com o aumento da composição de cerâmico, ocorreu menor ocorrência de poros, e presença de poros com menores tamanhos. A presença de espaços vazios no interior de um dispositivo determina de forma significativa as suas propriedades mecânicas uma vez que são zonas onde não existem ligações moleculares. Adicionalmente, é de esperar que o cerâmico devido ao fato de ter um maior módulo de elasticidade se comporte como um reforço

da estrutura. Assim, teoricamente é de esperar que quanto maior a composição de hidroxiapatita maior tensão deverá suportar o compósito formado.

Nas curvas tensão x deformação apresentado na Figura 25, o comportamento da curva mostrou que o caráter elastomérico é mais evidente quando se tem um teor polimérico mais elevado, tornando-se menos evidente com o aumento da composição em hidroxiapatita.

Já no que toca à tensão máxima, na tabela 6, verifica-se tal como esperado que a tensão aumente da composição de QH1 para QH3 e se mantém praticamente idêntica de QH3 para QH5. A primeira variação poderá estar relacionada com o número de poros e o tamanho dos poros, uma vez que a composição QH1, como já visto, possui uma estrutura mais porosa. Mas, também poderá estar relacionado com o maior reforço oferecido pela hidroxiapatite na composição de QH3.

Em relação ao módulo de elasticidade, verifica-se que a composição de QH1 é mais elástica que as demais por conta da presença de menos fosfato de cálcio. Para as composições de QH3 e QH5 nota-se que esta relação (quanto maior fosfato de cálcio menor elasticidade) não se verifica, sendo a composição de QH3 menos elástica uma vez que na zona de deformação elástica é necessário mais tensão para provocar o mesmo deslocamento compressivo. Atendendo a metodologia empregue, a suspeita do reforço da estrutura recai sobre possíveis interações entre polímero-cerâmico, obtendo-se um máximo destas interações na composição de QH3 ficando a composição de QH5 com maior número de interações cerâmico-cerâmico que acabam por não contribuir para o aumento da rigidez do polímero.

Observações realizadas ao arcabouço de QH5 confirmam que este ser torna mais frágil que o arcabouço de QH3, como pode ser confirmado na Figura 28, que apresenta os corpos de prova após o ensaio de compressão. A possível justificativa para tal poderá ser que ocorram mais ou o mesmo número de ligações entre a quitosana e a hidroxiapatite na concentração de QH3 do que quando se usa QH5, uma vez que a fração de quitosana é menor. Para que se observasse um valor maior de tensão e módulo de elasticidade devido à presença de cerâmico, seria necessário proceder à sinterização do mesmo, para que se estabelecessem ligações entre as moléculas cerâmicas.



Figura 28- Corpos de prova após ensaio de compressão: (a) QH1 (b) QH3 (c) QH5.

A literatura para arcabouços empregados em regeneração óssea indica que o comportamento mecânico deve se assemelhar ao osso, seja ele trabecular ou cortical. Sendo assim, esperava-se que os resultados obtidos se assemelhassem aos do osso trabecular, com sua tensão de compressão variando entre 4 a 12 MPa e o seu módulo de rigidez podendo estar entre 0,02 a 0,5 GPa (Fontes, 2010; Guastaldi & Aparecida, 2010). Desse modo, os arcabouços desenvolvidos não apresentam comportamento mecânico adequado com o esperado na literatura.

4.1.6 Grau de Intumescimento

A figura 29 apresenta os resultados do Grau de Intumescimento para os arcabouços QH1; QH3 e QH5.

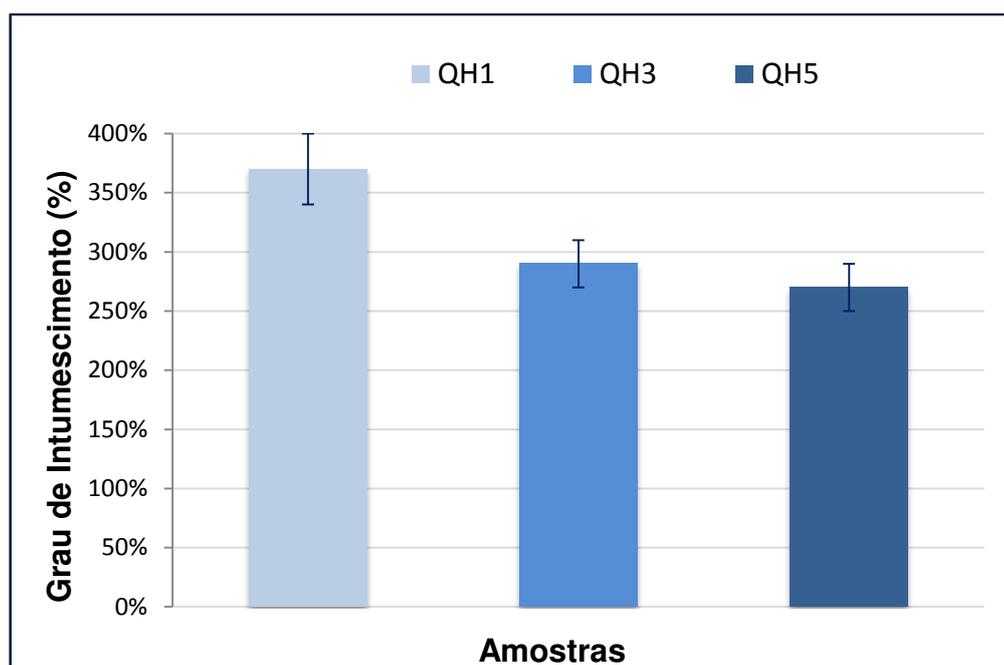


Figura 29- Gráfico do Grau de Intumescimento(%) dos arcabouços: QH1; QH3; QH5.

A partir do gráfico nota-se que todas as composições apresentam alta capacidade de absorção e habilidade de retenção da solução de PBS, uma vez que, absorvem mais do que seu próprio peso apresentando valores de grau de intumescimento maiores que 100%. Essa capacidade pode ser atribuída tanto a hidrofiliabilidade dos materiais quanto a manutenção das estruturas 3D. Em relação a hidrofiliabilidade dos materiais, podemos afirmar que este comportamento pode ser atribuído a quitosana, devido a presença dos grupos desacetilados que naturalmente associados aos grupos hidroxilas e amino caracterizam essa forte afinidade por moléculas polares.

A partir dos valores de grau de intumescimento obtidos para os arcabouço QH1, QH3 e QH5, é possível observar que há uma diminuição dos valores à medida que se aumenta a concentração de HA, de modo que para os arcabouço QH5 são observados os menores valores e para os arcabouço QH1 são observados os maiores valores, isso pode ser atribuído a morfologia e porosidade dos arcabouços, uma vez que que quanto maior a concentração de HA menor é a presença e o tamanho dos poros, fazendo com que, possivelmente, haja uma menor capacidade de absorção de PBS.

4.1.7 Citotoxicidade

A Figura 30 mostra os resultados de viabilidade celular para os arcabouços QH1; QH3 e QH5.

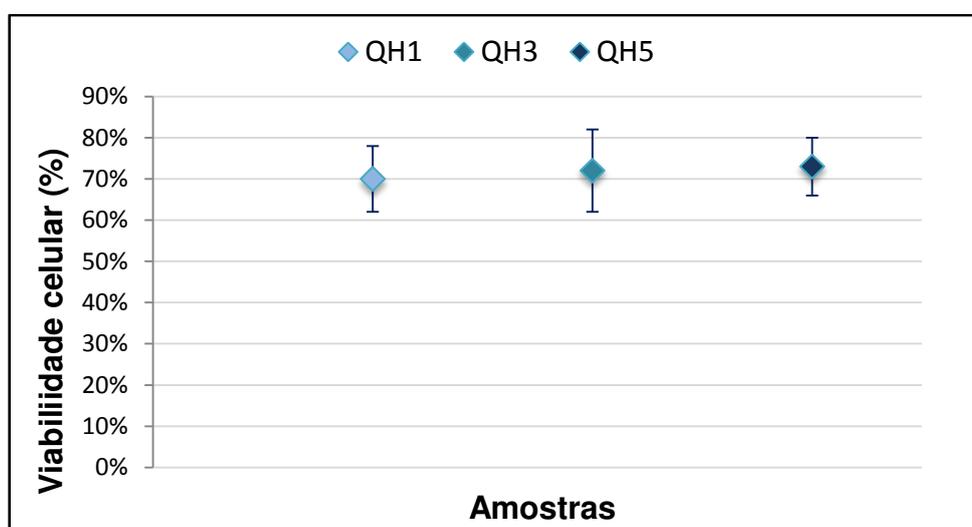


Figura 30- Gráfico do Ensaio de Citotoxicidade (%) dos arcabouços: QH1; QH3; QH5.

A partir dos resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade e apresentados na Figura 30, podemos afirmar que os arcabouços produzidos apresentam resultados satisfatórios em relação à viabilidade celular, uma vez que, os valores estão em torno de 70% para todos os arcabouços QH1, QH3 e QH5 mostrando assim, que não apresentam citotoxicidade que afeta a possibilidade de serem aplicados. Além disso, podemos afirmar que as diferentes concentrações de HA não afetaram a viabilidade celular de forma a gerar grandes diferenças nos resultados. A qualidade dos resultados deve-se ao caráter não-citotóxico da quitosana e da hidroxiapatita. Análogo a esta pesquisa, Leal et al., (2012), desenvolveu biocompósitos de quitosana e hidroxiapatita, que quando testados apresentaram viabilidade celular acima de 70 % . Zhao et al., (2006), em sua pesquisa desenvolveu arcabouços compostos por quitosana-gelatina e hidroxiapatita e obteve resultados de viabilidade celular em torno de 90%, sendo até maiores que os obtidos nesta pesquisa, isso pode ser atribuído à metodologia de obtenção dos arcabouços, indicando que o uso de alguns reagentes desta pesquisa, como o caso de etanol, pode ter afetado a viabilidade celular, mas ainda assim os resultados observados nesta pesquisa são consideráveis.

Levando em consideração todos os resultados obtidos e discutidos nesta seção optou-se escolher o arcabouço QH3 para dar continuidade à pesquisa, em suas Etapas II e III. Uma vez que, este arcabouço foi o que apresentou resultados consideráveis em relação às propriedades mecânicas, citotoxicidade, e até mesmo em relação à porosidade, de maneira a apresentar melhores características para o estudo em liberação controlada de fármacos.

4.2 Etapa II

Os resultados expostos a seguir referem-se à Etapa II, etapa de inserção do fármaco, curcumina, formando os arcabouços QHC1, QHC5, QHC10, e investigação do comportamento do fármaco e perfil de liberação.

4.2.1 Espectroscopia na Região de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Para essa etapa, foram obtidos os espectros na região do infravermelho para os materiais utilizados, quitosana e hidroxiapatita, para os arcabouços QH3 e para os arcabouços com curcumina, sendo eles QHC1, QHC5 e QHC10, que estão apresentados na Figura 31.

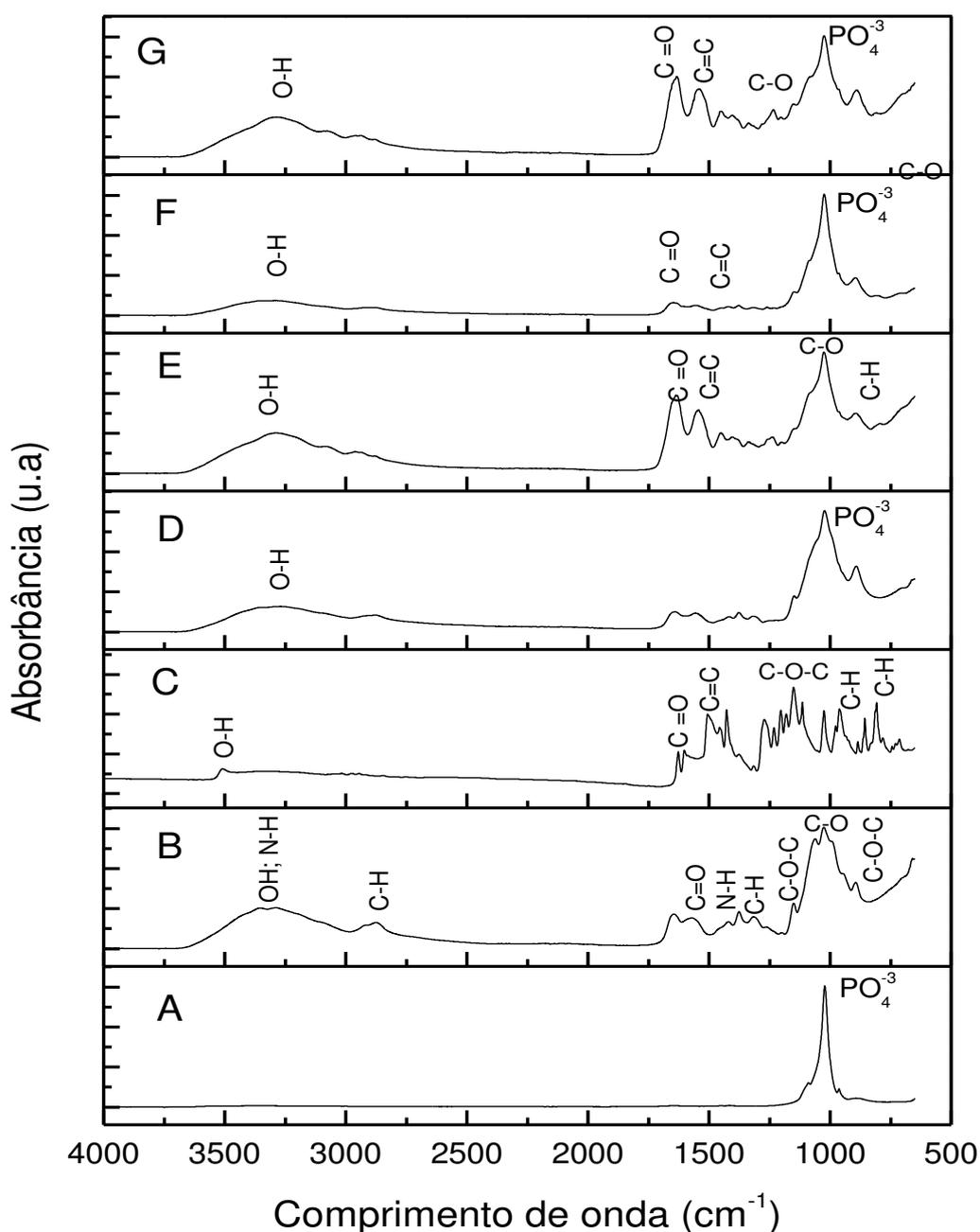


Figura 31- Espectros de FTIR: (a) Hidroxiapatita, (b) Quitosana, (c) curcumina (d) Arcabouço QH3, (e) Arcabouço QHC1 (f) arcabouço QHC5 (g) arcabouço QHC10.

Através da análise por Espectroscopia do Infravermelho foram observadas as bandas de absorção presentes no material utilizado e dos arcabouços fabricados. A partir do espectro de FTIR da Hidroxiapatita, Figura 31(a), podemos observar que as principais bandas características como sendo: o pico bem definido em torno de 1047 cm^{-1} e em 1090 cm^{-1} correspondente à deformação do grupo PO_4^{3-} , e outro em 962 cm^{-1} corresponde as vibrações de alongamento do grupo PO_4^{3-} , esses resultados apresentam-se em acordo com os espectros de HA observados por Chen et al., (2002) e por Han et. al., (2010).

A partir do espectro de FTIR da quitosana, Figura 31(b), podemos observar as principais bandas características, sendo: banda de estiramento axial de OH entre 3180 e 3600 cm^{-1} , sobreposta à banda de estiramento de N-H; grupo C-H em 2820 cm^{-1} ; deformação axial de C=O de amida I em 1656 cm^{-1} ; deformação angular de N-H de amina primária em 1560 cm^{-1} ; estiramento vibracional de C-O do álcool primário em 1000 cm^{-1} ; e presença de pico em 1120 cm^{-1} e em 890 cm^{-1} relacionados a estruturas polissacarídicas, ligação C-O-C (éter). O espectro de quitosana obtido está de acordo com os espectros característicos descritos nas pesquisas de Souza et al., (2010); Torres et al., (2005); Han et. al., (2010); Chen et al., (2002), e Sampaio (2012).

A partir do espectro de FTIR para curcumina (Figura 31c) pode-se observar as bandas de absorção características identificadas por: presença de vibrações em 3504 cm^{-1} devido ao alongamento O-H de grupo fenólico; pico a 1627 cm^{-1} devido ao alongamento de vibrações de ligação C = O; pico a 1602 cm^{-1} devido a alongamento de C = C de grupos aromáticos e alifáticos; pico em 1230 cm^{-1} devido a alongamento de C-O-C de éter; pico em 960 cm^{-1} devido a vibração trans-CH do benzoato; e pico em 713 cm^{-1} devido a vibração cis-CH do anel aromático. Esses resultados apresentam-se em acordo com os espectros de curcumina observados por Khan et al. (2015), Parize et al. (2012) e Ali et al. (2014).

A partir do espectro de FTIR para os arcabouços contendo curcumina, Figura 31(e), (f) e (g), podemos afirmar que há regiões no espectro com sobreposição em alguns picos característicos de quitosana e do fármaco curcumina, e que estão mais evidentes para os arcabouços QHC1 e QHC10, Figura 31(e) e (g). As absorções características de curcumina, mais destacadas como sobreposição são: pico a 1602 cm^{-1} devido alongamento de vibrações de ligação C = O; e pico a 1602 cm^{-1} devido a alongamento de C = C de grupos aromáticos e alifáticos. Khan

et al.(2015), em sua pesquisa com curcumina e quitosana, também obteve espectros de FTIR sobrepostos, indicando que nenhuma transformação na estrutura química do fármaco ocorreu devido aos passos de processamento. Resultados semelhantes para de análise FTIR também foram encontrados por Ali et al. (2014) em sua pesquisa com curcumina e polímeros , que revelou que não havia nenhuma interação entre o fármaco e os polímeros, de modo que estes polímeros podem ser utilizados convenientemente no maior desenvolvimento das microesferas curcumina. Além disso, a análise de FTIR dos arcabouços de QHC5 revelou que as absorções sobrepostas dos picos de curcumina e quitosana, apresentam-se com menor intensidade de absorção, indicando uma possível interação entre o compósito e o fármaco, de modo que, a interação mais provável refere-se a possíveis interações entre a quitosana e a curcumina. Alguns autores como Boruah et al. (2012), afirma que as reduções podem ser atribuídas a uma possível interação entre os grupos amina da quitosana e os grupos cetona da curcumina.

4.2.2 Difração de raios X (DRX)

Para essa etapa, foram obtidos os difratogramas para os materiais utilizados, a quitosana e a hidroxiapatita, os arcabouços QH3, e os arcabouços de QHC1, QHC5 e QHC10, e estão apresentados na Figura 32.

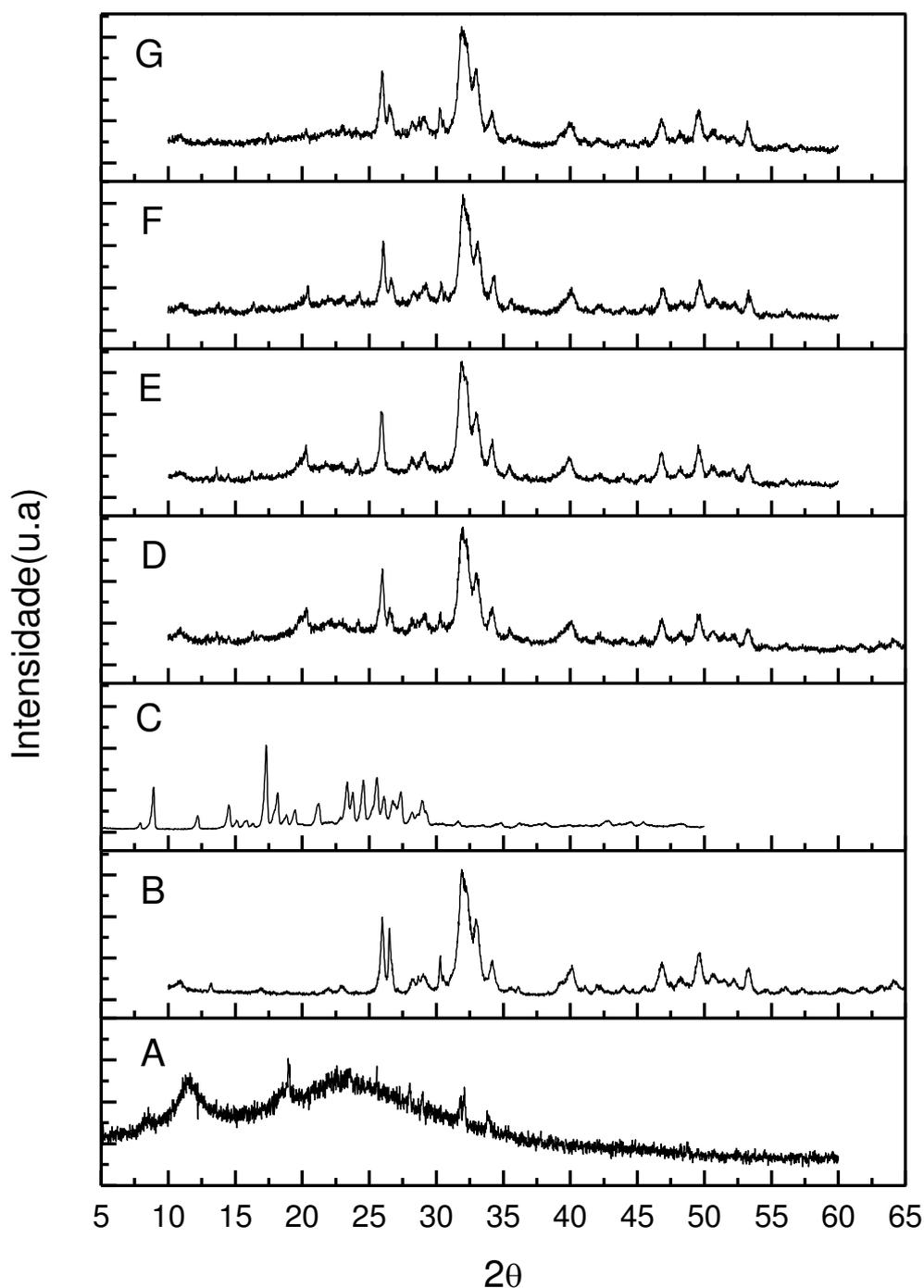


Figura 32- Difratomogramas: (a) Quitosana, (b) Hidroxiapatita, (c) curcumina, (d) Arcabouço QH3, (e) Arcabouço QHC1 (f) arcabouço QHC5 (g) arcabouço QHC10.

Como discutido anteriormente, o difratograma da Quitosana, Figura 32(a), apresenta picos de difração em $2\theta = 25^\circ$ e observou-se um halo de difração em $2\theta = 10^\circ$, devido a quitosana ser um polímero semi-cristalino e assim, apresentar ausência de picos bem definidos. No difratograma da Hidroxiapatita, Figura 32(b), observa-se picos de difração característicos com o padrão JCPDS 9-432 e JCPDS

72-1243, sendo estes: um pico a $2\theta = 26^\circ$ (002), $2\theta = 31,8^\circ$ (211), $2\theta = 33^\circ$ (112), $2\theta = 40^\circ$ (310), $2\theta = 46^\circ$ (222), $2\theta = 50^\circ$ (213) (FOOK, 2012; MOREIRA et. al, 2007; CHEN et al., 2002; GAO et al., 2013).

É possível observar pelo difratograma da curcumina, Figura (c), dois picos estreitos de maior intensidade e bem definidos em $2\theta = 8,95^\circ$ e $17,26^\circ$, indicando que a curcumina em pó encontra-se numa forma semicristalina. De acordo com Kumar et al. 2014, os picos característicos da curcumina são observados no intervalo de $10-30^\circ$, onde verifica-se uma série de picos nos ângulos $7,84^\circ$, $12,12^\circ$, $14,45^\circ$, $18,12^\circ$, $21,27^\circ$, $23,36^\circ$, $24,51^\circ$, $25,65^\circ$, $26,73^\circ$, $28,23^\circ$, $28,9^\circ$. Conforme também observado por Chen et al.,2013; Yallapu et al., 2012; Anitha et al., 2011; Donsl et al., 2010.

A análise de DRX para os arcabouços QH3 apresenta um aumento na cristalinidade, atribuído à cristalinidade do hidroxiapatita, quando comparada com a quitosana, e apresentam os picos que correspondem à fase JCPDS 9-432, apresentando em todos os difratogramas para os arcabouços os picos: $2\theta = 26^\circ$ (002), $2\theta = 31,8^\circ$ (211), $2\theta = 33^\circ$ (112), $2\theta = 40^\circ$ (310), $2\theta = 46^\circ$ (222), $2\theta = 50^\circ$ (213).

Ao observamos os difratogramas para os arcabouços contendo curcumina, Figura 32(e), (f) e (g), podemos afirmar que a presença do fármaco, não ocasionou de forma significativa o aumento da cristalinidade do material, pois no difratograma das amostras QHC1 QHC5 e QHC10 observa-se que os picos característicos da curcumina estão presentes em menor intensidade, de acordo com Khan et al.(2015) isto pode ser devido a diferenças no tamanho da partícula ou na cristalinidade das amostras, logo indica-se uma provável obtenção de uma estrutura amorfa. Segundo Song et al. (2011), a obtenção de uma estrutura amorfa sugere que a curcumina foi dispersa molecularmente na quitosana. De acordo com Song et al. (2014), isto é benéfico para a difusão de moléculas do fármaco através da matriz polimérica, o que pode levar a uma liberação controlada do fármaco encapsulado. Com isso, de acordo com Vasconcellos et al., (2011),espera-se que o fármaco se difunda a uma taxa mais rápida, pois a estrutura com aspecto amorfo apresenta poros com uma área de superfície maior de troca, em comparação com materiais cristalinos.

4.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDS)

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para avaliar a morfologia e a superfície das esferas constituintes dos arcabouços, tanto em aspecto externo quanto em aspecto interno, por meio de corte realizado na secção transversal das esferas EQHC1, EQHC5 e EQHC10. As micrografias e as análises por EDS estão apresentadas nas Figuras 33, 34, 35.

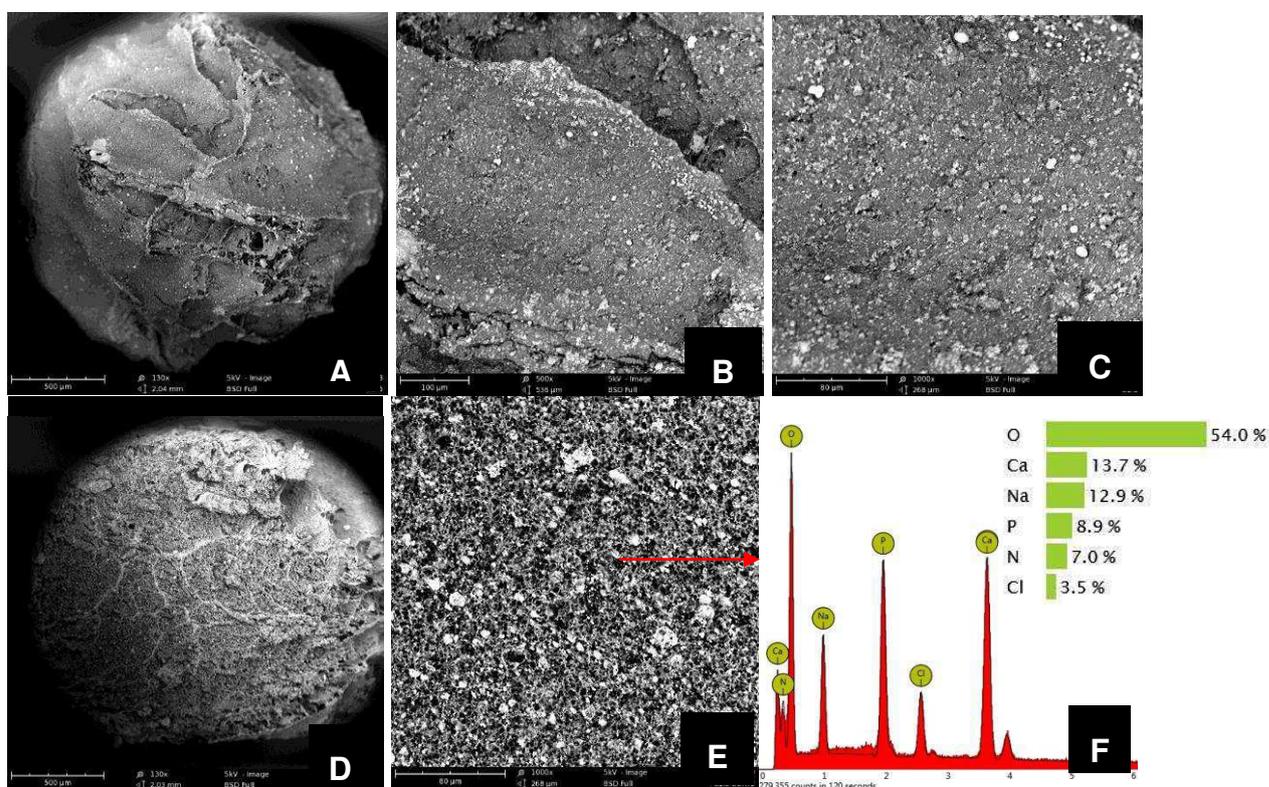


Figura 33- Micrografias das esferas EQHC1: superfície externa em aumento de (a)100x, (b)500x, (c)1000x; superfície interna em aumento de (d)100x, (e)1000x e (f) EDS da superfície indicada.

A partir das micrografias apresentada para esferas EQHC1, Figura 33, podemos observar a formação de partículas esféricas, rugosas e com poros, o que pode influenciar a liberação do fármaco. Além disso, ao compararmos essas esferas com as esferas que não continham o fármaco, esferas EQH3, Figura 20, pode-se afirmar que com a introdução do fármaco levou a uma tendência de maior densidade da superfície e conseqüente diminuição do número de poros ou espaços vazios. Verifica-se também que a superfície se tornou rugosa e que é possível perceber

pontos dispersos e às vezes aglomerados distribuídos em meio a matriz polimérica como mostrado na Figura 33(e), e por EDS, Figura 33(f), podemos identificar as fases cerâmicas pela presença de cálcio e fósforo, indicando da presença da hidroxiapatita, bem como em maior quantidade o elemento oxigênio (O), que está presente tanto na cadeia da quitosana quanto na cadeia de curcumina. Além disso, é possível observar a presença de sódio (Na) e cloro (Cl), que podem ser relacionados a resíduos da solução de PBS que ficaram impregnados nas esferas.

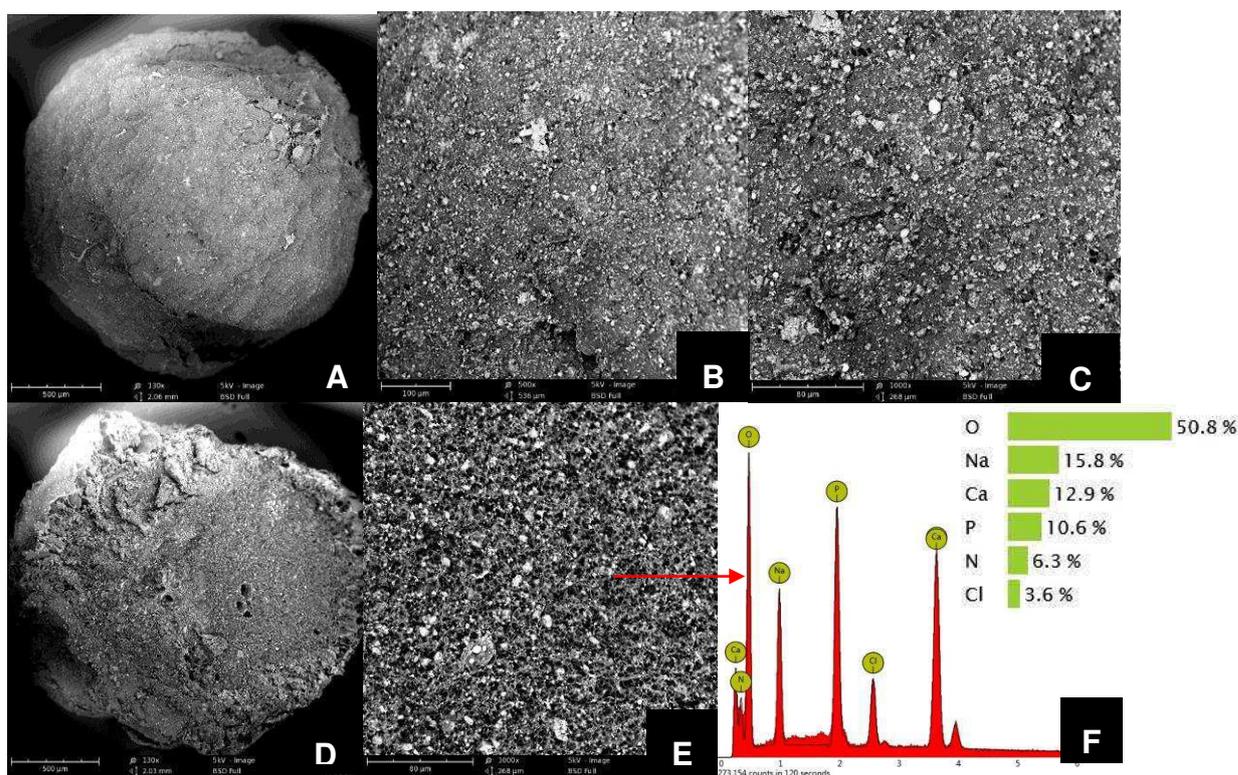


Figura 34- Micrografias das esferas EQHC5: superfície externa em aumento de (a)100x, (b)500x, (c)1000x; superfície interna em aumento de (d)100x, (e)1000x e (f) EDS da superfície indicada.

A partir das micrografias das esferas EQHC5, apresentadas na Figura 34, podemos observar a formação de partículas esféricas, rugosas e com poros, o que pode influenciar a liberação do fármaco. Além disso, podemos afirmar que essas esferas não apresentam diferenças significativas quando comparadas com as esferas EQHC1, Figura 33. De forma que, verifica-se também que a superfície se tornou rugosa e que é possível perceber pontos dispersos e às vezes aglomerados distribuídos em meio a matriz polimérica; e por EDS, Figura 34(f) podemos identificar as fases cerâmicas pela presença de cálcio e fósforo, indicando da presença da

hidroxiapatita, bem como em maior quantidade o elemento oxigênio (O), que está presente tanto na cadeia da polimérica da quitosana quanto na cadeia de curcumina. Além disso, é possível observar a presença de sódio (Na) e cloro (Cl), que podem ser relacionados a resíduos da solução de PBS que ficaram impregnados nas esferas.

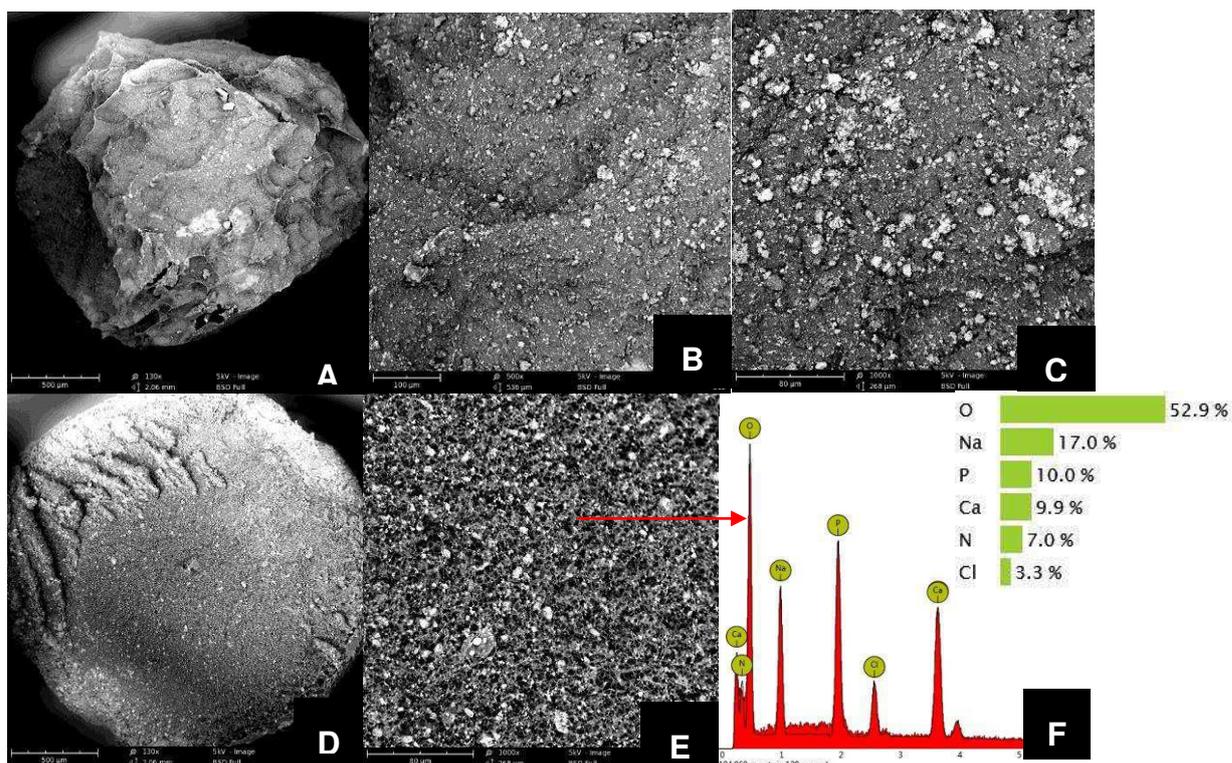


Figura 35- Micrografias das esferas EQHC10: superfície externa em aumento de (a)100x, (b)500x, (c)1000x; superfície interna em aumento de (d)100x, (e)1000x e (f) EDS da superfície indicada.

A partir das micrografias apresentadas para as esferas EQHC10, Figura 35, podemos observar, assim como nas figuras 33 e 34, a formação de partículas esféricas, rugosas e com poros, o que pode influenciar a liberação do fármaco. Além disso, podemos afirmar que essas esferas não apresentam diferenças significativas quando comparadas com as esferas de EQHC1 e EQHC5, apresentadas nas micrografias das Figuras 33 e 34, ainda que, possamos afirmar o aumento de fármaco pode ter levado a uma tendência de maior densidade da superfície e conseqüente diminuição do número de poros ou espaços vazios, verificados nas esferas com menores concentrações de curcumina. Da mesma forma que, nas esferas anteriores Figuras 33 e 34, verifica-se que a superfície apresenta-se rugosa

e que é possível perceber pontos dispersos e às vezes aglomerados distribuídos em meio a matriz polimérica; e por EDS, podemos identificar as fases cerâmicas pela presença de cálcio e fósforo, indicando da presença da hidroxiapatita, bem como em maior quantidade o elemento oxigênio (O), que está presente tanto na cadeia da polimérica da quitosana quanto na cadeia de curcumina. Além disso, é possível observar a presença de sódio (Na) e cloro (Cl), que podem ser relacionados aos resíduos da solução de PBS que ficaram impregnados nas esferas.

Os suportes tridimensionais devem ter alta porosidade e estrutura de poros interligados para melhorar a condição biológica, permitindo a proliferação e diferenciação de células. A porosidade dos arcabouços foi avaliada por base no método utilizado por Hana et al.(2010), e está representada em valores percentuais no Gráfico da Figura 36.

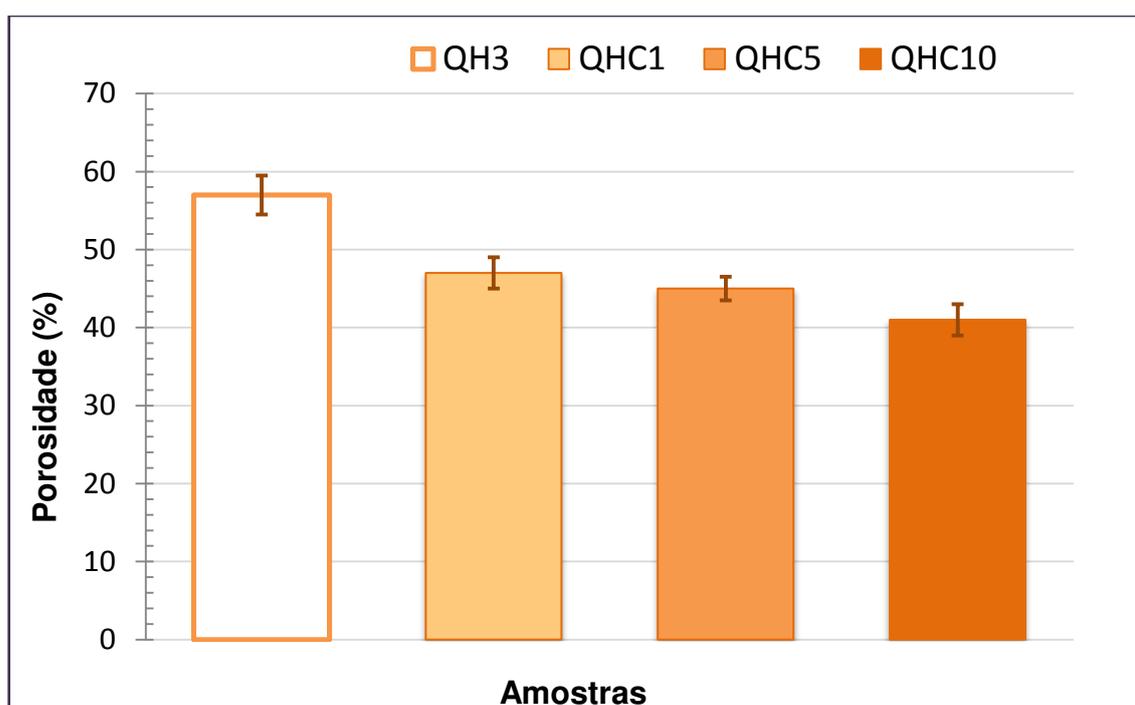


Figura 36- Gráfico da Porosidade (%) para arcabouços: QH3; QHC1; QHC5; QHC10.

Os resultados do ensaio de Porosidade, Figura 36, apresentam dados para os arcabouços com e sem o fármaco, curcumina. Diante disso, podemos observar que a introdução do fármaco implicou na diminuição da porosidade dos arcabouços, como previsto nas micrografias, Figuras 33,34 e 35. E, além disso, apesar dos arcabouços com diferentes concentrações de curcumina apresentarem valores de porosidade em torno de 45%, ainda é possível afirmar que quando se aumenta a

concentração de curcumina nos arcabouços há uma tendência à maior densidade de superfície e possível aumento no diâmetro das esferas. Resultados parecidos em relação à porosidade, foram encontrados por Kucharska et al., (2010) em que foram produzidos arcabouços de quitosana por agregação de partículas e obtiveram-se valores em torno de 40% de porosidade.

4.2.4 Microscopia Ótica (MO)

A técnica de Microscopia Ótica foi utilizada para auxiliar nas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), na investigação dos arcabouços com diferentes concentrações de curcumina, QHC1, QHC5 e QHC10, que estão apresentadas nas Figuras 37, 38 e 39.

As Figuras 37 (a) e (b) mostram as imagens das esferas de EQHC1, que foram obtidas a partir do método de gelificação ionotrópica, em aumentos de 50x e 100x respectivamente, e as Figuras 37(c) e (d) apresentam imagens da estrutura externa do arcabouços de QHC1, obtidos por agregação de partículas, em aumentos de 50x e 100x respectivamente.

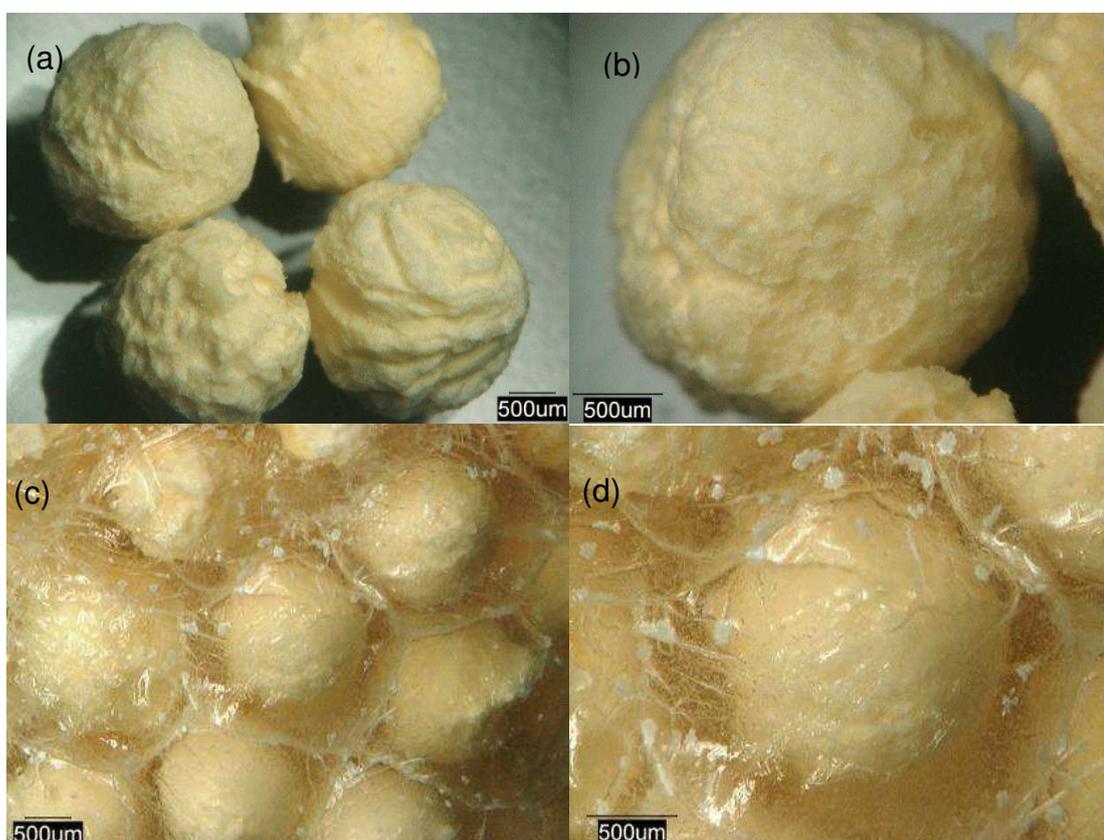


Figura 37- Imagens obtidas por microscopia óptica, para: (a) esferas EQHC1; aumento de 50x, (b) esferas EQHC1, aumento de 100x (c) arcabouços QHC1, aumento de 50x (d) arcabouços QHC1, aumento de 100x.

As Figuras 37(a) e (b) mostram as imagens das esferas EQHC5, que foram obtidas a partir do método de gelificação ionotrópica, em aumentos de 50x e 100x respectivamente, e as Figuras 37(c) e (d) apresentam imagens da estrutura externa dos arcabouços QHC5, obtidos por agregação de partículas, em aumentos de 50x e 100x respectivamente.

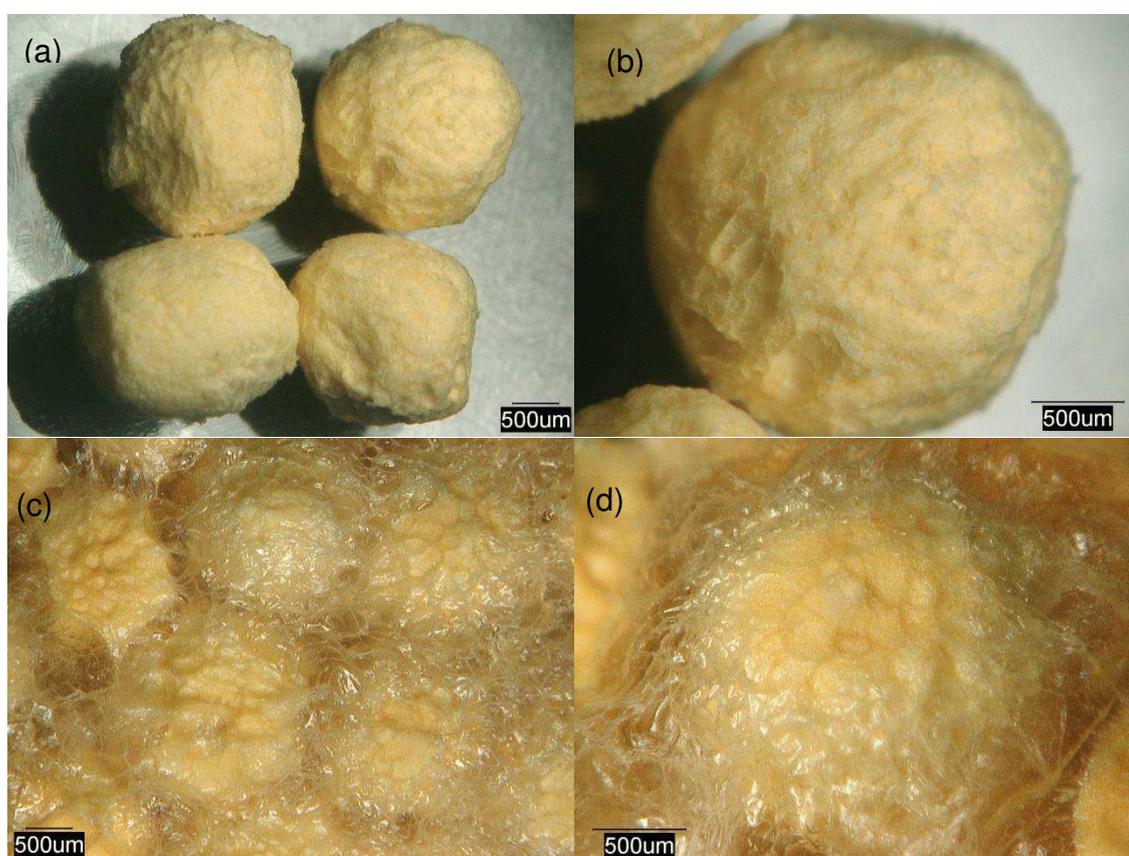


Figura 38- Imagens obtidas por microscopia óptica, para: (a) esferas EQHC5; aumento de 50x, (b) esferas EQHC5, aumento de 100x (c) arcabouços QHC5, aumento de 50x (d) arcabouços QHC5, aumento de 100x.

As Figuras 38(a) e (b) mostram as imagens das esferas EQHC5, que foram obtidas a partir do método de gelificação ionotrópica, em aumentos de 50x e 100x respectivamente, e as Figuras 38(c) e (d) apresentam imagens da estrutura externa do arcabouços QHC5, obtidos por agregação de partículas, em aumentos de 50x e 100x respectivamente.



Figura 39- Imagens obtidas por microscopia óptica, para: (a) esferas EQHC10; aumento de 50x, (b) esferas EQHC10, aumento de 100x (c) arcabouços QHC10, aumento de 50x (d) arcabouços QHC10, aumento de 100x.

A técnica de Microscopia Ótica foi utilizada para auxiliar nas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Figuras 33, 34, 35), por permitir a identificação de coloração que é um fator importante na diferenciação destes arcabouços, em especial, porque a curcumina é um fármaco de coloração laranja, permitindo afirmar que a droga foi inserida nas esferas em diferentes concentrações. A partir das imagens obtidas para as esferas e os arcabouços com diferentes concentrações de curcumina, podemos afirmar que a coloração laranja se torna mais intensa à medida que se aumenta a concentração e curcumina, de modo que em QHC10 Figura 39, observa-se a coloração laranja mais intensa em comparação com as demais, bem como nas esferas e arcabouços EQHC1 e QHC1, Figura 37, observa-se esta coloração menos intensa. De maneira geral, ao compararmos os aspectos superficiais das esferas e dos arcabouços podemos afirmar que não são

evidenciadas diferenças significativas além da coloração, de forma que, é percebida em todas as esferas uma rugosidade superficial semelhante.

De forma geral, todos os arcabouços exibiram estrutura porosa com uma boa interligação e tamanho de poro, estando em torno de 80 a 300 μm . Verifica-se também que a inclusão do fármaco (curcumina) não ocasionou grandes diferenças no diâmetro médio das partículas, permanecendo na faixa de 1800 - 2400 μm . Mas possibilitou um pequeno aumento, quando comparado com as esferas de QH3 como visto em 3.1.4, que estão em torno de $1920 \pm 170\mu\text{m}$, e para as esferas com fármaco, há um pequeno aumento em torno de 100 μm a mais a cada vez que se aumenta o percentual de curcumina nas esferas. Santos et al. 2003, em seu trabalho incorporou o fármaco (insulina) em esferas de quitosana, e observou um aumento no diâmetro das esferas com a insulina. De acordo com Bitencourt 2013, a incorporação de substâncias ativas pode influenciar na estrutura superficial e interna dos materiais devido a diversos fatores como, tamanho, peso molecular, as interações com a matriz polimérica, dentre outros.

4.2.5 Grau de Intumescimento

A Figura 40 apresenta os resultados do Grau de Intumescimento para os arcabouços QH3, e os arcabouços contendo curcumina QHC1 QHC5 e QHC10.

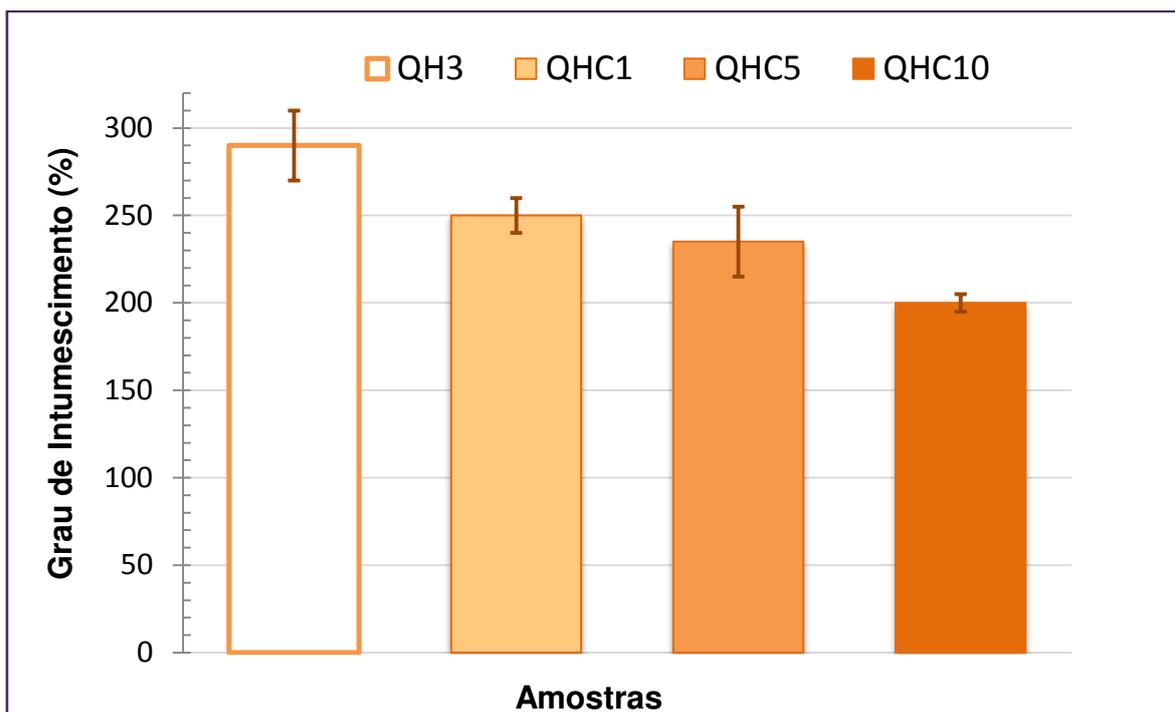


Figura 40- Gráfico do Grau de Intumescimento (%) dos arcabouços: QH3; QHC1; QHC5; QHC10.

A partir do gráfico, Figura 40, nota-se que todas assim como na secção 4.1.5, os arcabouços formados apresentam alta capacidade de absorção e habilidade de retenção da solução de PBS, uma vez que, absorvem mais do que seu próprio peso apresentando valores de grau de intumescimento maiores que 100%. Essa capacidade pode ser atribuída tanto a hidrofiliabilidade dos materiais quanto a manutenção das estruturas 3D. Em relação à hidrofiliabilidade dos materiais, podemos afirmar que este comportamento pode ser atribuído a quitosana, devido à presença dos grupos desacetilados que naturalmente associados aos grupos hidroxilas e amino caracterizam essa forte afinidade por moléculas polares.

A partir dos valores de grau de intumescimento obtidos para os arcabouços com diferentes concentrações de curcumina, é possível observar que há uma diminuição dos valores à medida que se aumenta a concentração do fármaco, de modo que para os arcabouços QHC10 são observados os menores valores e para os arcabouços de QH3 são observados os maiores valores, isso pode ser atribuído a morfologia e porosidade dos arcabouços, uma vez que a introdução do fármaco possivelmente influenciou na porosidade de modo que, quanto maior a concentração de curcumina menor é a presença e o tamanho dos poros, fazendo com que, possivelmente, haja uma menor capacidade de absorção de PBS; além disso

podemos atribuir a queda dos valores de %GI as possíveis interações que ocorreram entre o fármaco e a quitosana, fazendo com que os grupos polares da quitosana fiquem reduzidos quando em comparação com os arcabouços sem curcumina.

4.2.6 Citotoxicidade

A Figura 41 mostra os resultados de viabilidade celular para os arcabouços constituídos QH3, e os arcabouços contendo curcumina QHC1, QHC5, QHC10.

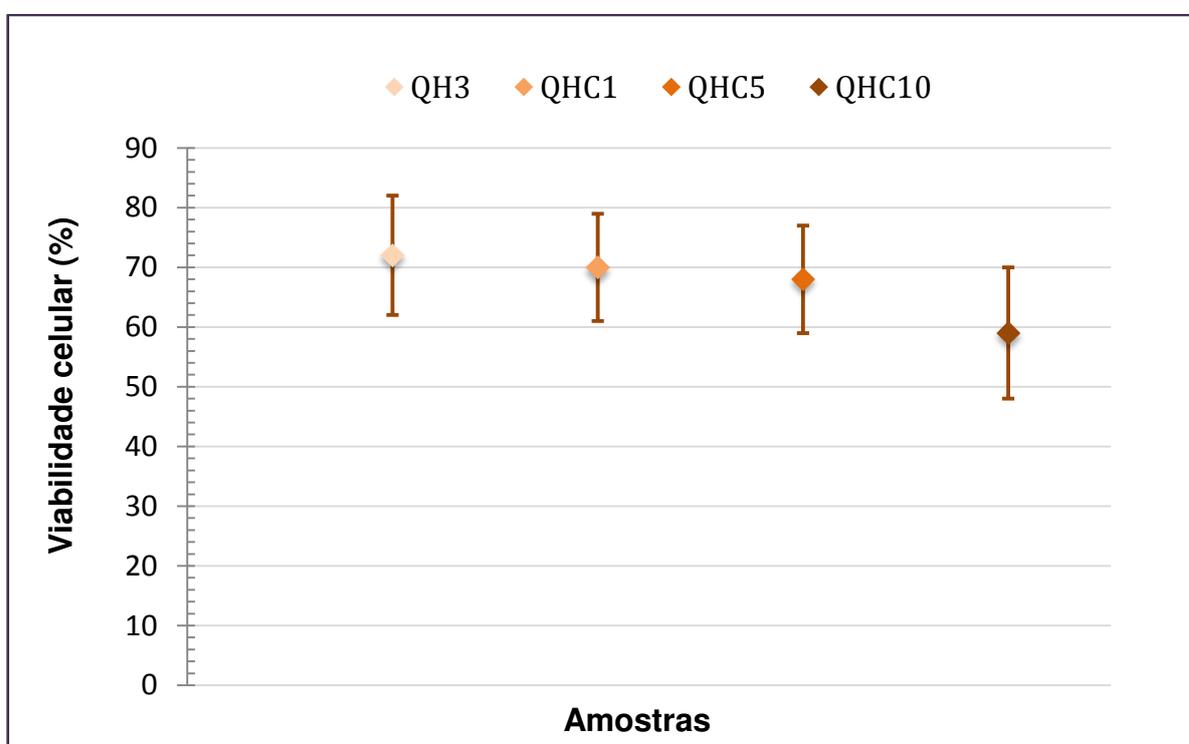


Figura 41- Gráfico do Ensaio de Citotoxicidade (%) dos arcabouços de QH3; QHC1; QHC5; QHC10.

A partir dos resultados apresentados no Gráfico de Ensaio de Citotoxicidade, Figura 41, podemos afirmar que adição do fármaco, curcumina, afetou a viabilidade celular dos arcabouços de modo que, houve uma diminuição da viabilidade celular à medida que se aumentou a concentração de curcumina, assim, podemos notar que para os arcabouços QH3 observa-se valores em torno de $72 \pm 10\%$, e com adição do fármaco, para os arcabouços QHC1 apresentaram valores em torno de 70 ± 9 , nos arcabouços de QHC5 passou para valores em torno de 68 ± 9 , e na maior concentração de curcumina, representada pelos arcabouços de QHC10,

observa-se os menores valores, sendo estes em torno de 59 ± 11 . Diante disso, podemos afirmar que ao acrescentar a concentração de 10% de curcumina os arcabouços apresentam baixa viabilidade celular, podendo apresentar-se citotóxico, e possivelmente estes valores são esperados, tendo em vista que o fármaco utilizado tem ação anti-inflamatória.

4.2.7 Desenvolvimento e Validação do método analítico para o fármaco curcumina por Espectrofotômetro (UV- VIS)

4.2.7.1 Determinação do comprimento de onda de detecção

A Figura 42 apresenta o espectro de absorção da curcumina (1 mg/mL), obtido através do método analítico utilizado nesta pesquisa.

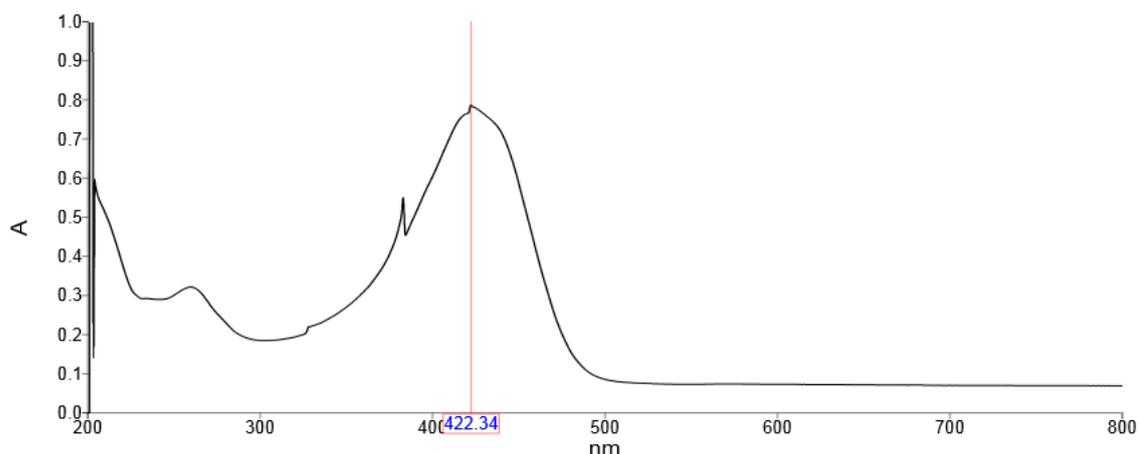


Figura 42- Espectro de absorção da curcumina (1 mg/mL), e detecção do comprimento de onda em 422,34 nm.

Conforme apresenta o espectro de absorção da curcumina (1 mg/mL) dissolvida em etanol conforme método analítico utilizado nesta pesquisa, identificou-se o comprimento de onda da curcumina em $\lambda = 422,34$ nm, onde o fármaco apresentou pico de absorção máxima.

4.2.7.2 Validação do método analítico por Espectrofotômetro (UV- VIS) para o fármaco curcumina

A validação deve garantir que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Portanto, conforme descrito na secção 3.3.8.1, o método desenvolvido neste trabalho foi validado seguindo os parâmetros: seletividade, linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção e limite de quantificação.

Seletividade

Seletividade refere-se à capacidade que o método possui de medir exatamente um composto na presença de outros componentes, a seletividade do método foi avaliada pela comparação das bandas máximas de absorção obtidas da análise de uma amostra dos arcabouços sem fármaco, comparadas com as bandas do sistema contendo curcumina. O método empregado utilizou o comprimento de onda de 422,34 nm, pois representa o comprimento de máxima absorção da curcumina. Os resultados demonstraram que o método proposto é seletivo e específico, para todos os meios analisados, uma vez que não se observou interferência dos polímeros e da hidroxiapatita no comprimento de onda de máxima absorção do fármaco.

Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ANVISA, 2003). A linearidade do método foi avaliada a partir da curva de calibração, conforme Figura 43.

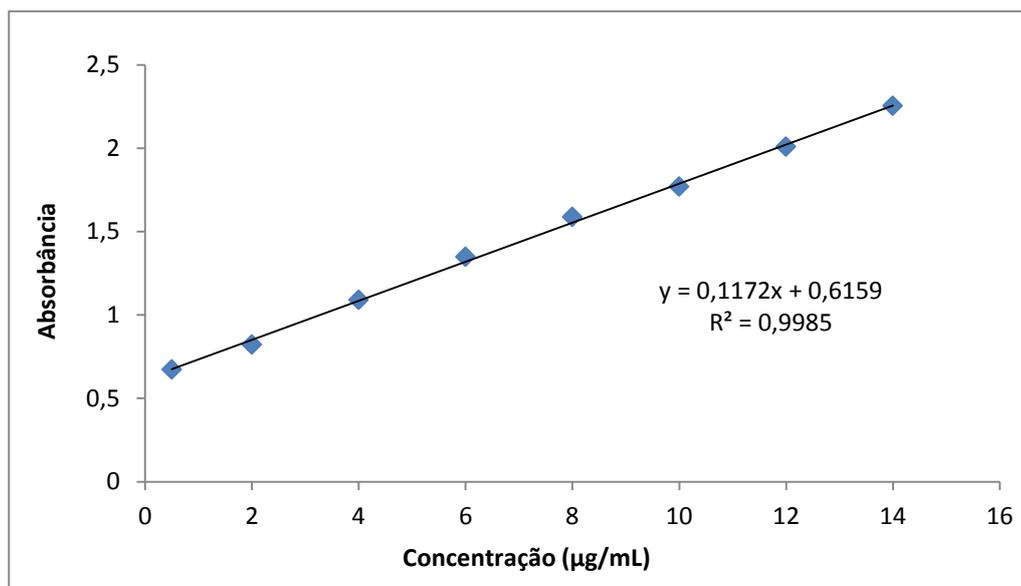


Figura 43- Representação gráfica da curva de calibração da curcumina obtida por espectrofotometria UV ($\lambda=422,34$ nm).

No presente caso, o método mostrou-se linear no intervalo entre 0,5 a 14 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 43). A equação da reta encontrada, $\text{ABS} = 0,1172C + 0,6159$, obtida pelo método dos mínimos quadrados apresentou o coeficiente de correlação (R) igual a 0,9992, estando em concordância com os critérios estabelecidos pela RE N° 899/2003 da ANVISA, que preconiza valor mínimo de $r = 0,99$ (BRASIL, 2003). A equação da reta encontrada foi aplicada aos outros testes para obtenção das concentrações do padrão e amostras.

Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor teórico. Para determinar a exatidão foram determinadas concentrações baixas (1,0 $\mu\text{g/mL}$), média (6,0 $\mu\text{g/mL}$) e alta (12,0 $\mu\text{g/mL}$), conforme a Tabela 7.

Tabela 7- Determinação da exatidão do método.

Concentração teórica de curcumina ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração calculada de curcumina ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão (CV%)	Exatidão (CV%)
1,0	0,98	0,12	0,68
6,0	6,27	0,23	1,17
12,0	11,85	0,29	0,58

A ANVISA estabelece como aceitáveis valores de exatidão com coeficiente de variação (CV%) máxima de 5%, portanto como visto na tabela 7, podemos afirmar que o método proposto mostrou-se exato conforme RE899/03.

Precisão

A precisão foi determinada pela repetitividade do procedimento analítico e foi determinada por meio da análise de cinco soluções de mesma concentração (6 $\mu\text{g/mL}$) para curcumina, pelo mesmo método, sob as mesmas condições de medição, mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento e mesmo dia, definindo a repetibilidade. E, já a precisão intermediária foi avaliada no mesmo laboratório, utilizando o mesmo equipamento, porém em dias diferentes e com analista diferente. O coeficiente de variação (CV%) máximo permitido é de 5% (ANVISA, 2003).

Tabela 8- Coeficiente de variação das amostras empregadas no teste de precisão por repetibilidade e de precisão intermediária.

1- Precisão por Repetibilidade			
Precisão por Repetibilidade	Concentração teórica de curcumina ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração calculada de curcumina ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão (CV%)
5 Repetições	6,0	6,2143 \pm 0,06	0,36
2- Precisão Intermediária (analista diferente)			
Dia	Concentração teórica de curcumina ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração calculada de curcumina ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão (CV%)
Dia 1	6,0	6,2232 \pm 0,08	0,18
Dia 2	6,0	6,3454 \pm 0,12	0,34

Os resultados apresentados na Tabela 8 indicam que o método proposto mostrou-se preciso para a quantificação de curcumina, obtendo-se um coeficiente de variação menor que 5% (BRASIL, 2003).

Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados a partir do estudo de linearidade, sendo que $LQ=3(\sigma/S)$, e $LD=10(\sigma/S)$, onde σ é o desvio padrão dos coeficientes lineares das curvas da calibração do ensaio de linearidade, e S é a inclinação da curva padrão ou média dos coeficientes angulares. Desse modo, foram obtidos os limites: $LD= 0,125 \mu\text{g/mL}$ e $LQ= 0,158 \mu\text{g/mL}$.

4.2.7.3 Quantificação do teor de curcumina liberado dos arcabouços

A quantidade de fármaco libertado, Figura 44, foi determinada por meio de espectroscopia de UV-visível (Lambda 35) por monitorização da absorvência máxima a 422,34 nm, das alíquotas obtidas no ensaio de liberação para os arcabouços QHC1, QHC5, QHC10.

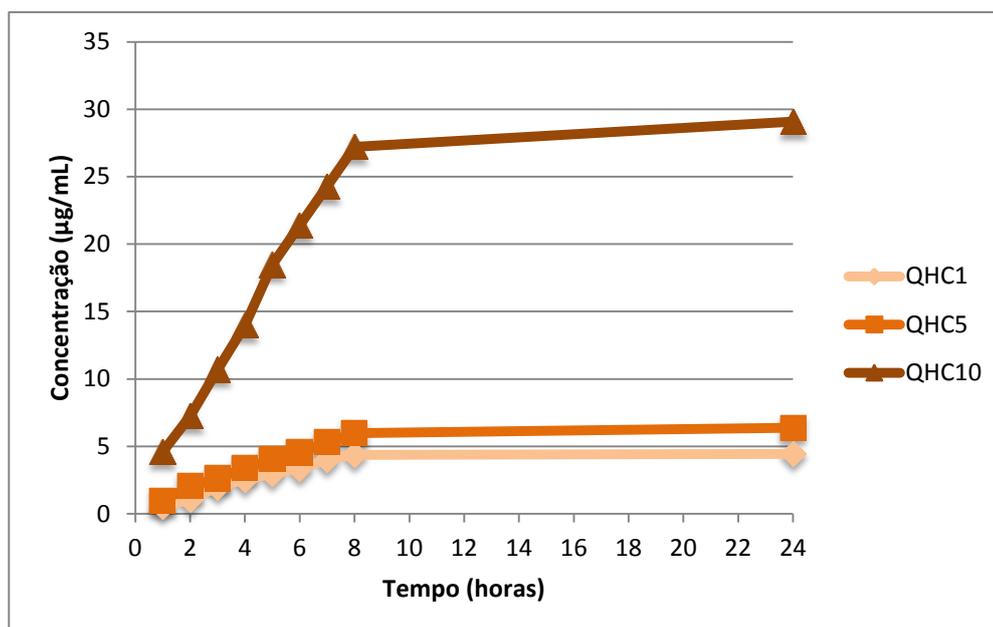


Figura 44- Representação gráfica da curva de liberação da curcumina nos arcabouços QHC1, QHC5, QHC10, obtida por espectrofotometria UV ($\lambda=422,34$ nm).

Diante da curva de Liberação da curcumina nos arcabouços QHC1, QHC5, QHC10, podemos observar que as curvas apresentam semelhante comportamento de liberação, de modo que nas primeiras oito horas se tem a maior quantificação de fármaco liberado para todos os arcabouços.

Associando a concentração de fármaco liberada pelos arcabouços com a quantidade de curcumina depositada nos arcabouços submetidos ao ensaio de liberação, temos que, a concentração inicial de fármaco no sistema de liberação seria: em QHC1 de 75µg/mL; em QHC5 de 375µg/mL de curcumina; e em QHC10 teríamos 750µg/mL; ficando claro que para QHC1 ocorreu 5,93% de liberação, para QHC5 ocorreu 1,6% de liberação, e QHC10 liberação de 3,86%. Desse modo, podemos afirmar que a liberação ocorre de forma lenta. Vários fatores podem

influenciar a cinética de liberação, entre eles o tipo de fármaco, sua forma polimórfica, grau de cristalinidade, tamanho de partícula, solubilidade e quantidade incorporada na forma farmacêutica (Carbinatto, 2010). Com isso, podemos fazer algumas observações a cerca dos demais resultados, assim, como indicado pelo DRX e FTIR o fármaco interagiu com o sistema compósito, e as interações mais prováveis se podem ser atribuídas ao grupo amina da quitosana com o grupo cetona da curcumina; bem como, a fração cerâmica pode ter atuado como barreira a passagem do fármaco; ou ainda, o perfil hidrofóbico do fármaco pode ter contribuído para a lenta liberação.

Corroborando com os resultados da nossa pesquisa, Manju & Sreenivasan, (2011) avaliaram o perfil de liberação do fármaco curcumina em micro cápsulas imersas em PBS, e perceberam uma liberação inicial, observada em 24 horas, de 1,11% (0,26 ug /mL) de fármaco total encapsulado, seguida por uma liberação prolongada durante o período de uma semana, com liberação total de 2,77%, indicando o potencial de micro cápsulas carregado com curcumina como sendo um veículo de entrega sustentada de drogas.

4.2.7.4 Análise dos modelos matemáticos para os mecanismos de liberação da curcumina nos arcabouços

A interpretação quantitativa dos valores obtidos em um ensaio de dissolução é facilitada pelo uso das equações que traduzem matematicamente a curva de dissolução em função de alguns parâmetros relacionados à forma farmacêutica e devem, assim, contribuir para o esclarecimento do mecanismo de liberação do fármaco. Dessa forma, utilizamos três modelos cinéticos: Cinética de ordem zero, Higuchi e Korsmeyer-Peppas, aplicados aos dados de liberação apresentado na seção anterior.

A escolha do melhor modelo matemático de liberação pode ser baseada no valor do coeficiente de correlação (R^2). No entanto, este valor tende a tornar-se maior com a adição de mais parâmetros. Por isso, quando se compara modelos com vários parâmetros, é mais correto utilizar o coeficiente de correlação ajustado, os gráficos efetuados para os três modelos aplicados às amostras QHC1, QHC5 e QHC10 estão expostos no Apêndice A. E, a tabela 9 apresenta os valores do

coeficiente de correlação (R^2) para os diferentes modelos matemáticos (Cinética de Ordem zero, Higuchi e Korsmeyer-Peppas) aplicados às amostras.

Tabela 9- Coeficiente de correlação (R^2) para os modelos matemáticos Cinética de Ordem zero, Higuchi e Korsmeyer-Peppas aplicados a QHC1, QHC5 e QHC10.

Modelos	Coeficiente de correlação (R^2)		
	QHC1	QHC5	QHC10
Cinética de Ordem zero	0,9783	0,9855	0,9877
Higuchi	0,9856	0,9939	0,9968
Korsmeyer-Peppas (n=0,43)	0,9751	0,9926	0,9920
Korsmeyer-Peppas (n=0,6)	0,9881	0,9921	0,9969
Korsmeyer-Peppas (n=0,85)	0,9984	0,9939	0,9971

Baseado no valor de R^2 ajustado, conforme apresentado na Tabela 9, podemos afirmar que os modelos que mais se enquadram ao perfil de liberação demonstrado nos arcabouços QHC1, QHC5 e QHC10 foram os modelos de Higuchi e de Korsmeyer-Peppas. Ainda assim, é possível afirmar que o modelo que retratou mais adequadamente a liberação da curcumina foi o de Korsmeyer-Peppas, o qual se baseia na Lei das Potências, que relaciona exponencialmente a liberação do fármaco com o tempo e deve ser aplicado para os primeiros 60% de fármaco liberado. Assim, analisando os valores de n, podemos afirmar que o n mais adequado à liberação dos arcabouços nas diferentes concentrações de curcumina, foi o n=0,85. Isto indica que, a liberação do soluto é controlada e ocorre contribuição simultânea de processos como difusão, intumescimento, relaxação e erosão da

matriz polimérica, e ocorre independente do tempo, também conhecido como “Caso II” ou “super caso II” de transporte. Corroborando com os altos resultados de %GI, observados para os arcabouços QHC1, QHC5 e QHC10.

O modelo de Higuchi que também se adequa ao perfil de liberação indica que a liberação ocorre por meio do processo de difusão. Corroborando o que indica Manju & Sreenivasan, (2011), em sua pesquisa de liberação controlada, em que afirmam que o perfil de liberação de curcumina carregado em micro cápsulas é controlada pelo mecanismo de difusão, como resultado da partição entre as microcápsulas poliméricas e fase aquosa rodeada. E, a maior parte da droga ainda permanece dentro das microcápsulas devido a adsorção de drogas e estabilização na camada interna através de interações não covalentes. Podemos fazer esta analogia as possíveis interações entre a curcumina e a quitosana, bem como ao papel da hidroxiapatita de barreira.

4.3 Etapa III

Os resultados expostos a seguir referem-se à Etapa III, etapa de inserção do fármaco, dexametasona, nos arcabouços QH3, formando os arcabouços QHD1 e QHD5, e investigação do comportamento do fármaco e perfil de liberação.

4.3.1 Espectroscopia na Região de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Para essa etapa, foram obtidos os espectros na região do infravermelho para os materiais utilizados, hidroxiapatita e quitosana, para os arcabouços QH3, e os arcabouços contendo fármaco, QHD1 e QHD5, que estão apresentados na Figura 45.

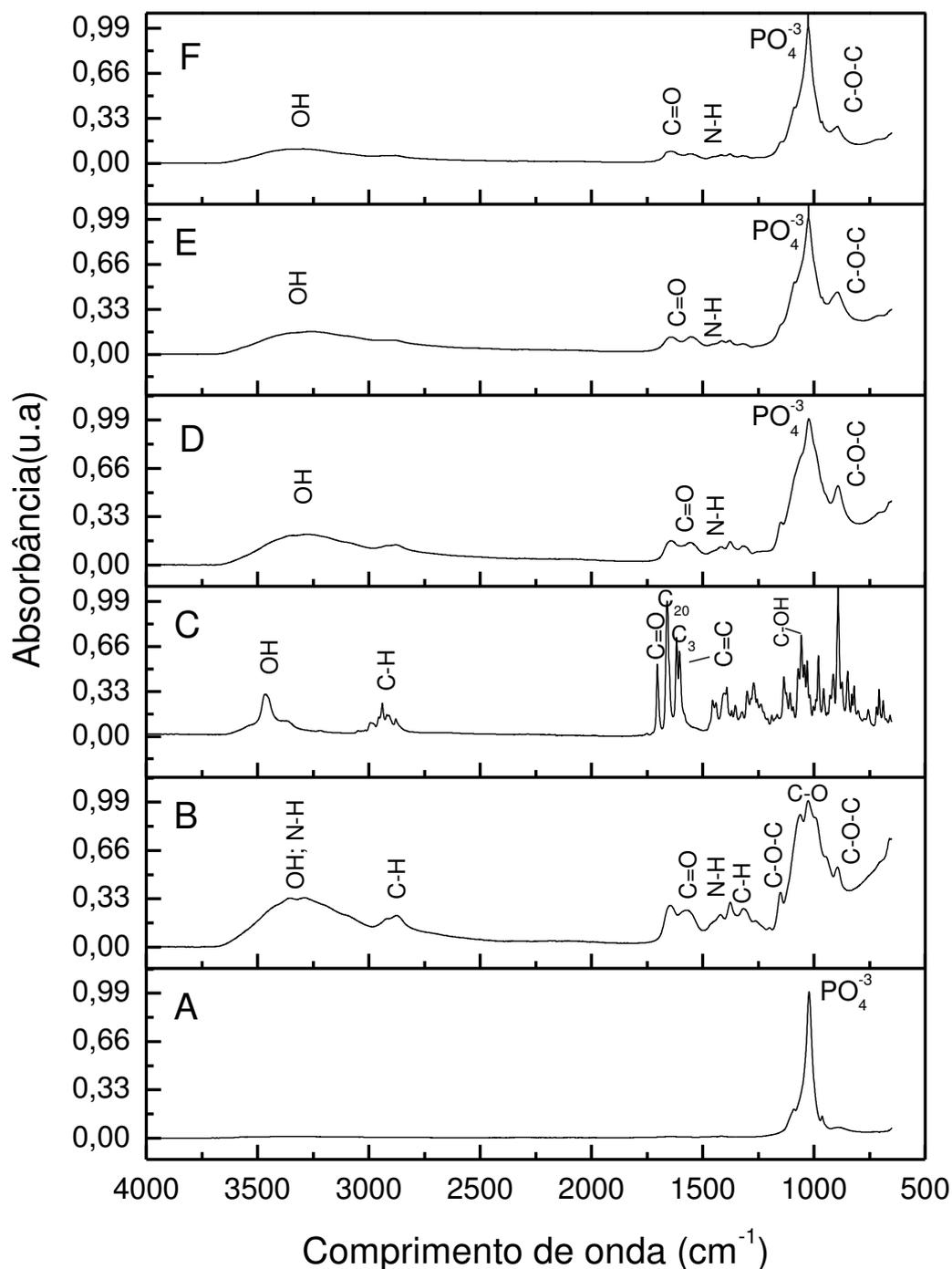


Figura 45- Espectros de FTIR: (a) Hidroxiapatita, (b) Quitosana, (c) dexametasona (d) Arcabouço QH3; (e) QHD1; (f) QHD5.

Através da análise por Espectroscopia do Infravermelho foram observadas as bandas de absorção presentes no material utilizado e dos arcabouços fabricados. A partir do espectro de FTIR da Hidroxiapatita, Figura 45(a), podemos observar que as principais bandas características como sendo: o pico bem definido em torno de 1047 cm^{-1} e em 1090 cm^{-1} correspondente à deformação do grupo PO_4^{3-} , e outro em 962

cm^{-1} corresponde as vibrações de alongamento do grupo PO_4^{3-} , esses resultados apresentam-se em acordo com os espectros de HA observados por Chen et al., (2002) e por Han et. al., (2010). A partir do espectro de FTIR da quitosana, Figura 45(b), podemos observar as principais bandas características, sendo: banda de estiramento axial de OH entre 3180 e 3600 cm^{-1} , sobreposta à banda de estiramento de N-H; grupo C-H em 2820 cm^{-1} ; deformação axial de C=O de amida I em 1656 cm^{-1} ; deformação angular de N-H de amina primária em 1560 cm^{-1} ; estiramento vibracional de C-O do álcool primário em 1000 cm^{-1} ; e presença de pico em 1120 cm^{-1} e em 890 cm^{-1} relacionados a estruturas polissacarídicas, ligação C-O-C (éter). O espectro de quitosana obtido está de acordo com os espectros característicos descritos nas pesquisas de Souza et al., (2010); Torres et al., (2005); Han et. al., (2010); Chen et al., (2002), e Sampaio (2012).

A partir do espectro de FTIR para dexametasona (Figura 45c) pode-se observar as bandas de absorção características identificadas por: presença de vibrações em 3400 - 3675 cm^{-1} devido deformação axial da ligação O-H, ligações de hidrogênio intramolecular; vibrações em 3020 - 3050 cm^{-1} devido a deformação axial da ligação C-H de grupos aromáticos; vibrações em 2850 - 3000 cm^{-1} devido a deformação axial da ligação C-H de grupos alifáticos; vibrações em 1745 - 1723 cm^{-1} devido a deformação axial de C = O de acetato; pico a 1.700 cm^{-1} devido a Carbonila C_{20} ; pico a 1.660 cm^{-1} devido a deformação axial da Carbonila C_3 ; pico em 1620 cm^{-1} devido ao Anel A e deformação C=C; pico em 1.130 cm^{-1} devido a deformação angular C-OH; e pico em 890 cm^{-1} devido a -dieno-3-cetona. O espectro de dexametasona obtido apresenta-se em acordo com o espectro relatado por Bergamini, (2008), Chiang, et al.(2012) e Shrestha et al.(2015).

A partir do espectro de FTIR para os arcabouços contendo dexametasona, Figura 45(e) e (f), podemos afirmar que há regiões no espectro com sobreposição em alguns picos característicos de quitosana e do fármaco dexametasona. Além disso, revelou-se que as absorções sobrepostas dos picos de dexametasona e quitosana, apresentam-se com menor intensidade de absorção, indicando uma possível interação entre o composto e o fármaco. De modo que, fazendo uma analogia aos resultados de FTIR obtidos para os arcabouços contendo curcumina, Figura 31, podemos afirmar que a interação mais provável refere-se a possíveis interações entre a quitosana e a dexametasona.

4.3.2 Difração de raios X (DRX)

Para essa etapa, foram obtidos os difratogramas para os materiais utilizados, a quitosana e a hidroxiapatita, os arcabouços QH3, e os arcabouços contendo dexametasona QHD1 e QHD5, que estão apresentados na Figura 46.

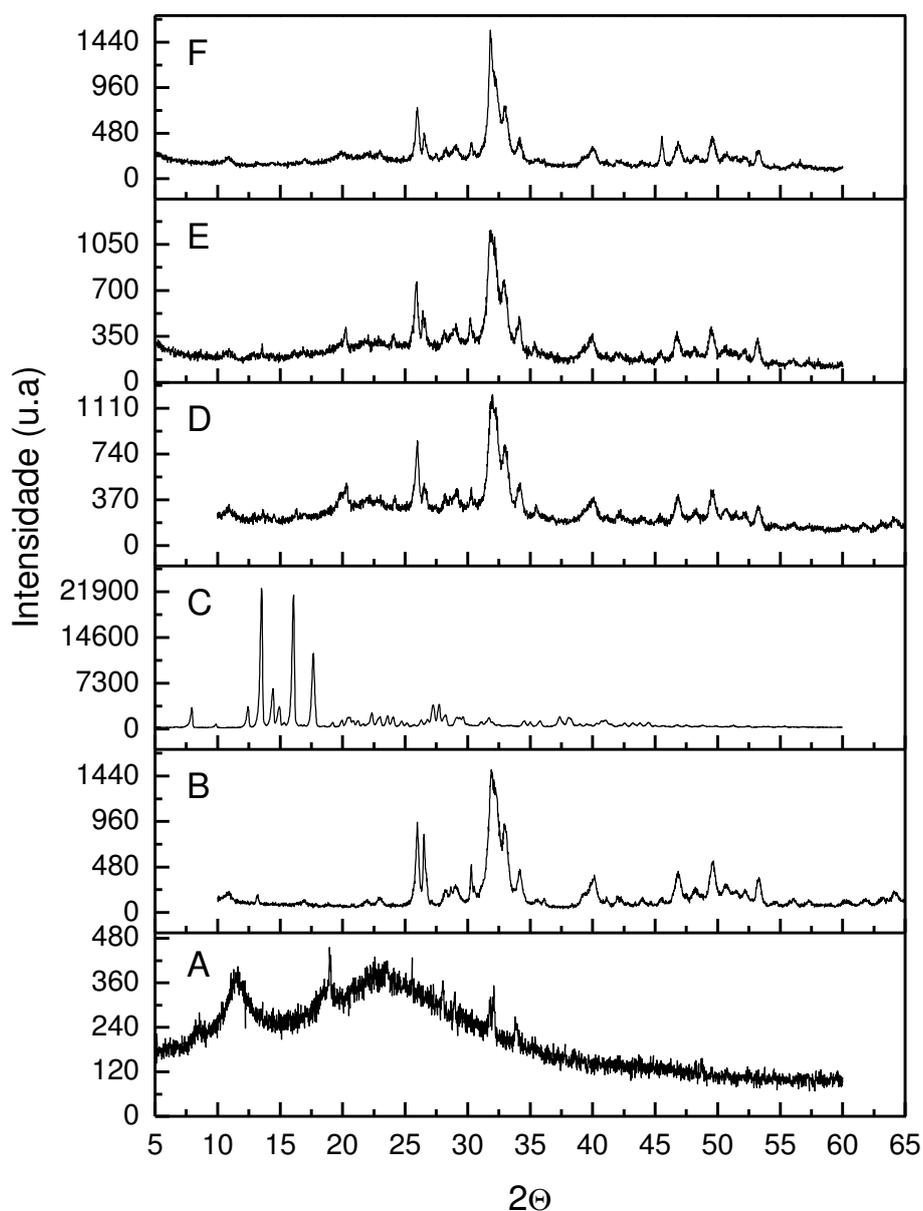


Figura 46- Difratogramas: (a) Quitosana, (b) Hidroxiapatita, (c) dexametasona (d)Arcabouço QH3; (e) Arcabouço QHD1; (f) Arcabouço QHD5.

Como discutido na seção 6.1.2, o difratograma da Quitosana, Figura 46(a), apresenta picos de difração em $2\theta = 25^\circ$ e observou-se um halo de difração em $2\theta = 10^\circ$, devido a quitosana ser um polímero semi-cristalino e assim, apresentar ausência de picos bem definidos. No difratograma da Hidroxiapatita, Figura 46(b), observa-se picos de difração característicos com o padrão JCPDS 9-432 e JCPDS 72-1243, sendo estes: um pico a $2\theta = 26^\circ$ (002), $2\theta = 31,8^\circ$ (211), $2\theta = 33^\circ$ (112), $2\theta = 40^\circ$ (310), $2\theta = 46^\circ$ (222), $2\theta = 50^\circ$ (213) (FOOK, 2012; MOREIRA et. al, 2007; CHEN et al., 2002).

É possível observar pelo difratograma da dexametasona, Figura 46(c), os picos de difração característicos como sendo: $2\theta = 6,19^\circ$, $2\theta = 8,34^\circ$, $2\theta = 10,3^\circ$, $2\theta = 12,4^\circ$, $2\theta = 13,6^\circ$, $2\theta = 14,39^\circ$, $2\theta = 15,1^\circ$, $2\theta = 15,6^\circ$, $2\theta = 16,2^\circ$, $2\theta = 17,8^\circ$, $2\theta = 18,4^\circ$, $2\theta = 22,6^\circ$, $2\theta = 23,8^\circ$, $2\theta = 26,3^\circ$, $2\theta = 27,0^\circ$, $2\theta = 29,6^\circ$, $2\theta = 31,4^\circ$, $2\theta = 33,8^\circ$, $2\theta = 37,2^\circ$, $2\theta = 41,2^\circ$. Verifica-se que os picos de difração das fases cristalinas são similares ao do padrão, obtido na biblioteca de dados do difratômetro, e apresentam-se próximos aos relatados por Bergamini, (2008).

A análise de DRX para os arcabouços de quitosana/hidroxiapatita, apresenta um aumento na cristalinidade, atribuído à cristalinidade do hidroxiapatita, quando comparada com a quitosana, e apresentam os picos que correspondem a fase JCPDS 9-432, apresentando em todos os difratogramas para os arcabouços os picos: $2\theta = 26^\circ$ (002), $2\theta = 31,8^\circ$ (211), $2\theta = 33^\circ$ (112), $2\theta = 40^\circ$ (310), $2\theta = 46^\circ$ (222), $2\theta = 50^\circ$ (213).

Ao observamos os difratogramas para os arcabouços contendo dexametasona, podemos afirmar que a presença do fármaco, não ocasionou de forma significativa o aumento da cristalinidade do material, pois no difratograma das amostras QHD1 e QHD5, observa-se que os picos característicos da dexametasona não estão presentes em intensidade considerável, logo indica-se uma provável obtenção de uma estrutura amorfa. Fazendo analogia com os resultados obtidos para os arcabouços de contendo curcumina, Figura 32, sugerindo que o fármaco foi disperso molecularmente na quitosana, o que pode levar a uma liberação controlada do fármaco encapsulado.

4.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDS)

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi utilizada para avaliar a morfologia e a superfície das esferas EQD1 e EQD5 constituintes dos arcabouços de dexametasona, tanto em aspecto externo quanto em aspecto interno, por meio de corte realizado na secção transversal das esferas. As micrografias e as análises por EDS estão apresentadas nas Figuras 47 e 48.

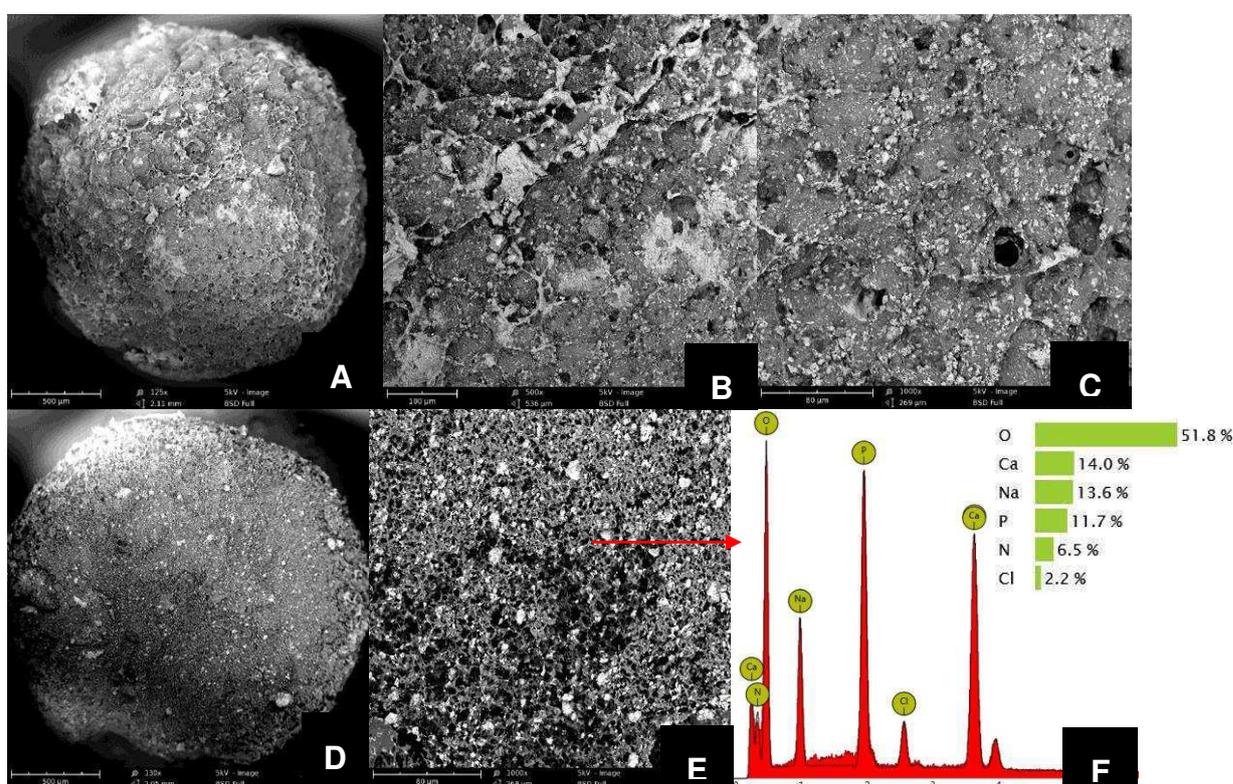


Figura 47- Micrografias das esferas EQD1: superfície externa em aumento de (a)100x, (b)500x, (c)1000x; superfície interna em aumento de (d)100x, (e)1000x e (f) EDS da superfície indicada.

A partir das micrografias apresentadas na Figura 47 podemos observar a formação de partículas esféricas, rugosas e com poros, o que pode influenciar a liberação do fármaco. Além disso, ao compararmos essas esferas com as esferas que não continham o fármaco, esferas EQH3, Figura 22, podemos afirmar que a introdução do fármaco levou a uma tendência de maior densidade da superfície e conseqüente diminuição do número de poros ou espaços vazios. Verifica-se também que a superfície se tornou rugosa e que é possível perceber pontos dispersos e às vezes aglomerados distribuídos em meio a matriz polimérica como mostrado na

Figura 47(e), e por EDS, Figura 47(f) podemos identificar as fases cerâmicas pela presença de cálcio e fósforo, indicando a presença da hidroxiapatita, bem como em maior quantidade o elemento oxigênio (O), que está presente tanto na cadeia da quitosana quanto na cadeia do fármaco dexametasona. Além disso, é possível observar a presença de sódio (Na) e cloro (Cl), que podem ser relacionados a resíduos da solução de PBS que ficaram impregnados nas esferas.

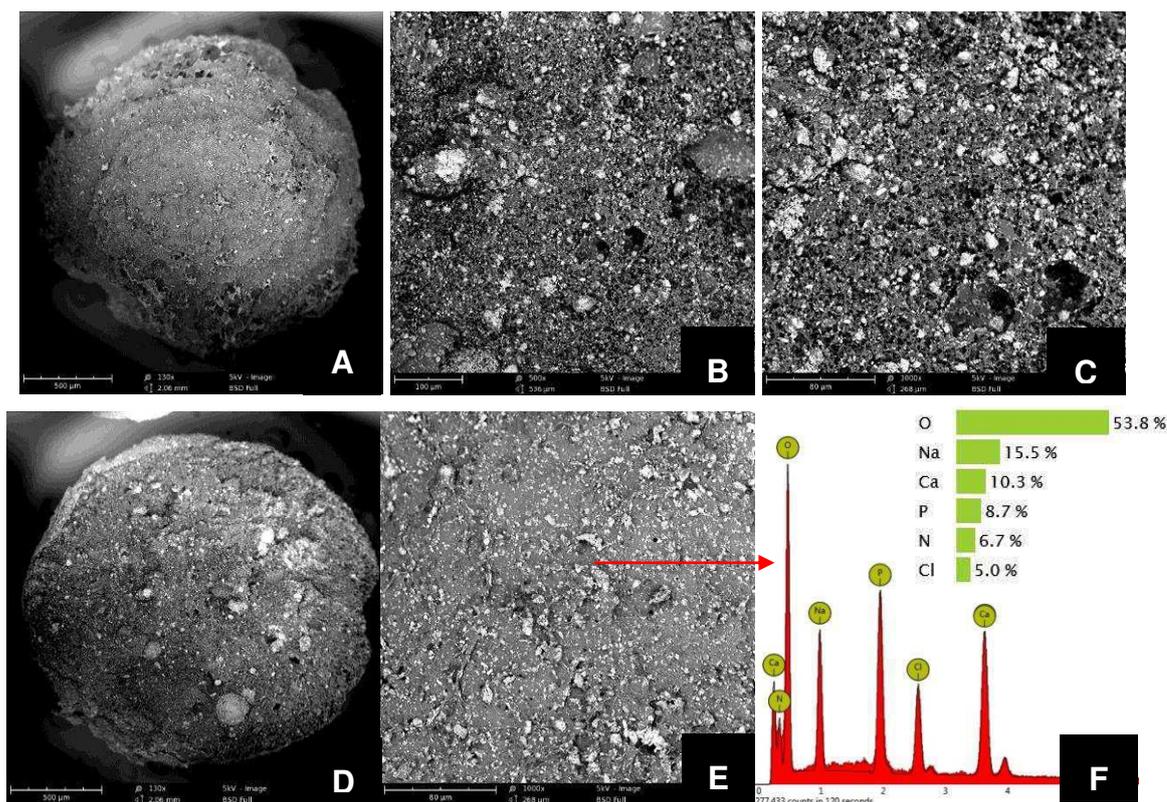


Figura 48- Micrografias das esferas EQD5: superfície externa em aumento de (a)100x, (b)500x, (c)1000x; superfície interna em aumento de (d)100x, (e)1000x e (f) EDS da superfície indicada.

A partir das micrografias apresentadas na Figura 48 podemos afirmar que essas esferas não apresentam diferenças significativas quando comparadas com as esferas apresentadas na Figura 47, compostas por QHD1, ainda que, possamos afirmar que em QHD5, introdução de mais fármaco pode ter levado a uma tendência de maior densidade da superfície e conseqüente diminuição do número de poros ou espaços vazios. E, por EDS, Figura 48(f) podemos identificar as fases cerâmicas pela presença de cálcio e fósforo, indicando a presença da hidroxiapatita, bem como em maior quantidade o elemento oxigênio (O), que está presente tanto na cadeia da polimérica da quitosana quanto na cadeia de curcumina. Além disso, é possível

observar a presença de sódio (Na) e cloro (Cl), que podem ser relacionados aos resíduos da solução de PBS que ficaram impregnados nas esferas. Em acordo com nossa pesquisa, RIEKES et al., (2009), também produziu esferas contendo o fármaco dexametasona e obteve uma morfologia semelhante, de partículas esféricas, rugosas e com poros, o que pode influenciar a liberação do fármaco, além disso, ele também diferença de granulometria entre as micropartículas com diferentes formulações, de modo que com maior quantidade de dexametasona a esfera apresentou o maior diâmetro médio.

Os suportes tridimensionais devem ter alta porosidade e estrutura de poros interligados para melhorar a condição biológica, permitindo a proliferação e diferenciação de células. A porosidade dos arcabouços foi avaliada por base no método utilizado por HANA et al.(2010), e está representada em valores percentuais no Gráfico da Figura 49.

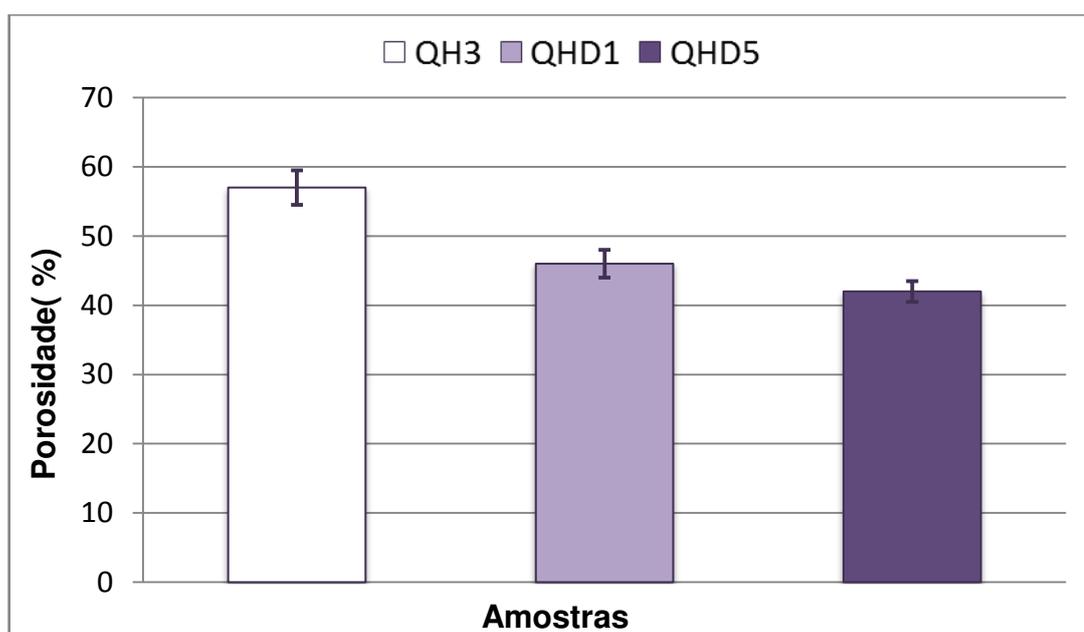


Figura 49- Gráfico da Porosidade (%) dos arcabouços: QH3; QHD1; e QHD5.

Os resultados do ensaio de Porosidade, Figura 49, apresentam dados para os arcabouços com e sem o fármaco, dexametasona. Diante disso, podemos observar que a introdução deste fármaco implicou na diminuição da porosidade dos arcabouços. E, além disso, apesar dos arcabouços com diferentes concentrações de dexametasona apresentarem valores de porosidade em torno de 45%, ainda é possível afirmar que quando se aumenta a concentração de curcumina nos

arcabouços há uma tendência à diminuição da porosidade. Esses resultados corroboram com os resultados de porosidade observados nos arcabouços contendo o fármaco curcumina como descrito na seção 6.2.3, Figura 36.

4.3.4 Microscopia Ótica (MO)

A técnica de Microscopia Ótica foi utilizada para auxiliar nas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), na investigação dos arcabouços com diferentes concentrações de dexametasona, QHD1 e QHD5, que serão apresentados nas Figuras 50 e 51.

As Figuras 50 (a) e (b) mostram as imagens das esferas de EQHD1 que foram obtidas a partir do método de gelificação ionotrópica, em aumentos de 50x e 100x respectivamente, e as Figuras 50 (c) e (d) apresentam imagens da estrutura externa dos arcabouços QHD1, obtidos por agregação de partículas, em aumentos de 50x e 100x respectivamente.

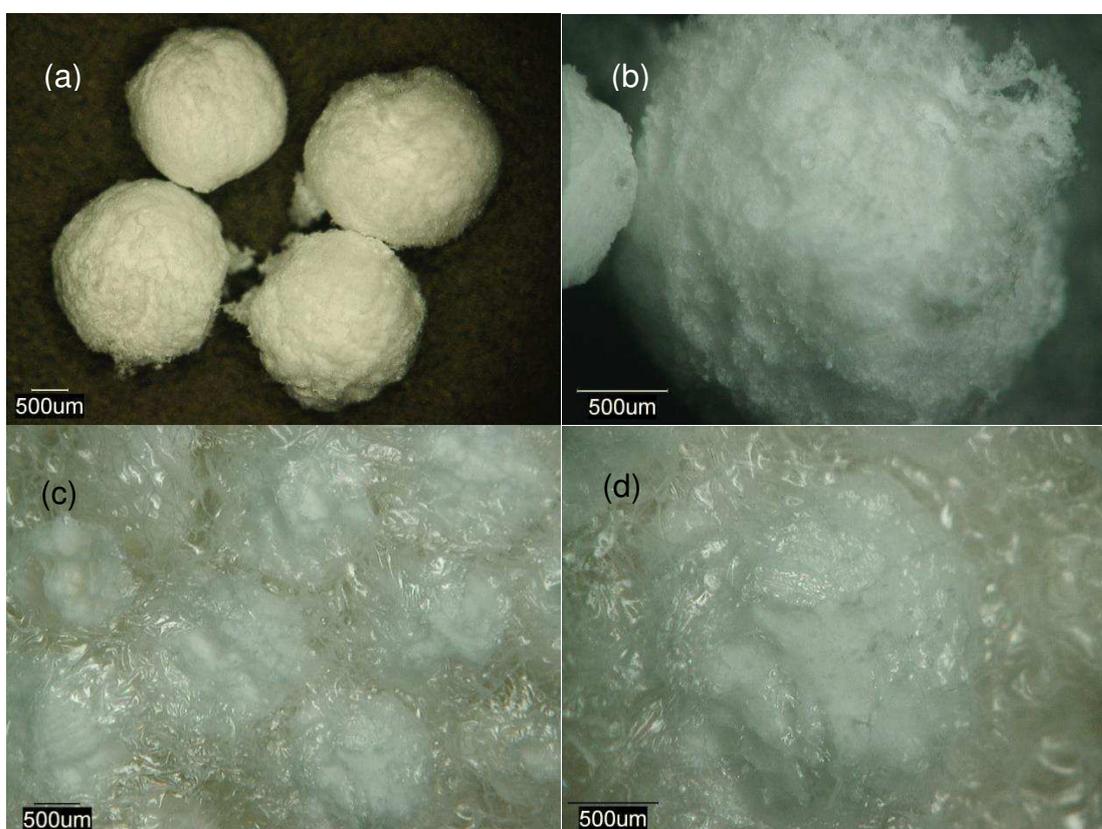


Figura 50- Imagens obtidas por microscopia ótica, para: (a) EQHD1; aumento de 50x, (b) EQHD1 aumento de 100x (c) QHD1, aumento de 50x (d) arcabouços QHD1, aumento de 100x.

As Figuras 51(a) e (b) mostram as imagens das esferas EQHD5, que foram obtidas a partir do método de gelificação ionotrópica, em aumentos de 50x e 100x respectivamente, e as Figuras 51(c) e (d) apresentam imagens da estrutura externa do arcabouços QHD5, obtidos por agregação de partículas, em aumentos de 50x e 100x respectivamente.

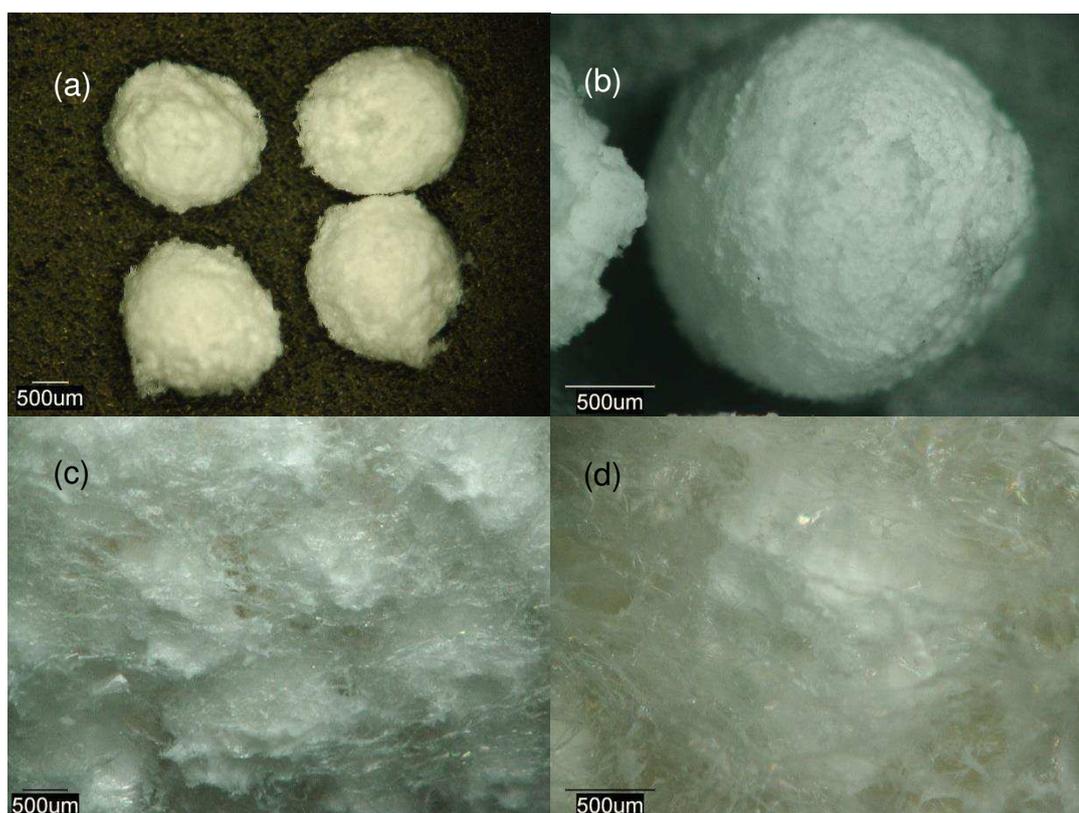


Figura 51- Imagens obtidas por microscopia óptica, para: (a) EQHD5; aumento de 50x, (b) EQHD5 aumento de 100x (c) QHD5, aumento de 50x (d) arcabouços QHD5, aumento de 100x.

A técnica de Microscopia Ótica foi utilizada para auxiliar nas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), por permitir a visualização de aumentos menores, tornando possível a vista da seção transversal dos arcabouços, além disso, por permitir a identificação de coloração, entretanto o fármaco dexametasona apresenta coloração branca o que impossibilita fazer diferenciações em relação a coloração, tanto em comparação entre os arcabouços de QH3, quanto entre os arcabouços com dexametasona, QHD1 e QHD5. De modo que, a partir das imagens apresentadas nas Figuras 50 e 51, obtidas para as esferas e os arcabouços com diferentes concentrações de dexametasona, podemos afirmar que ao compararmos

aspectos superficiais das esferas e dos arcabouços não é percebido diferenças significativas.

De forma geral, todos os arcabouços exibiram estrutura porosa com uma boa interligação e tamanho de poro, estando em torno de 80 a 300 μm . Verifica-se também que a inclusão do fármaco (dexametasona) não ocasionou grandes diferenças no diâmetro médio das partículas, mas possibilitou um pequeno aumento, de modo que, como visto em 3.1.4, estão em torno de $1920 \pm 170\mu\text{m}$ para as esferas de QH3 e permanecem na faixa de 1800 - 2300 μm para as esferas com fármaco, QHD1 e QHD5.

4.3.5 Grau de Intumescimento

A Figura 52 mostra os resultados do Grau de Intumescimento para os arcabouços QH3, e os arcabouços constituídos por dexamtasona QHD1 e QHD5.

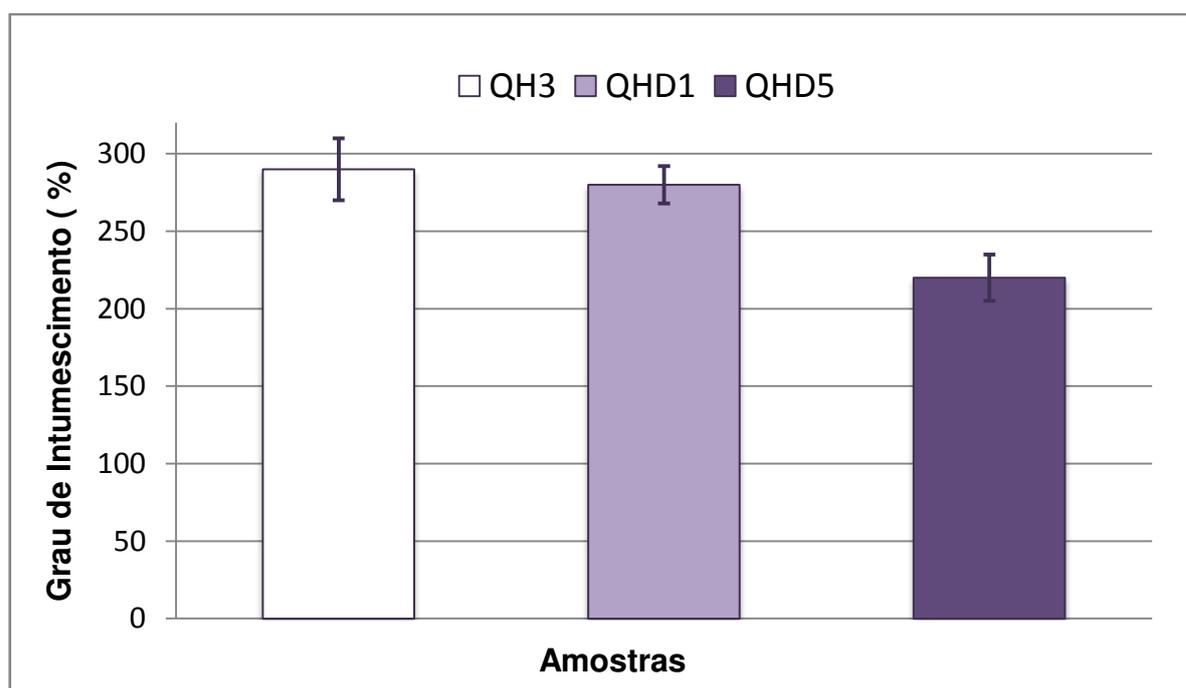


Figura 52- Gráfico do Grau de Intumescimento (%) dos arcabouços de: QH3; QHD1; e QHD5.

A partir do gráfico, Figura 52, nota-se que todas assim como na secção 4.1.5, os arcabouços formados apresentam alta capacidade de absorção e habilidade de retenção da solução de PBS, uma vez que, absorvem mais do que seu

próprio peso apresentando valores de grau de intumescimento maiores que 100%. Essa capacidade pode ser atribuída tanto a hidrofiliidade dos materiais quanto a manutenção das estruturas 3D. Em relação a hidrofiliidade dos materiais, podemos afirmar que este comportamento pode ser atribuído a quitosana, devido a presença dos grupos desacetilados que naturalmente associados aos grupos hidroxilas e amino caracterizam essa forte afinidade por moléculas polares.

A partir dos valores de grau de intumescimento obtidos para os arcabouços com diferentes concentrações de dexametasona, QHD1 e QHD5, é possível observar que há uma diminuição dos valores à medida que se aumenta a concentração do fármaco, de modo que para os arcabouço QHD5, são observados os menores valores e para os arcabouço de QH3 são observados os maiores valores, isso pode ser atribuído as possíveis ligações entre os grupos ativos de quitosana e dexametasona; como também a morfologia e porosidade dos arcabouços, uma vez que a introdução do fármaco possivelmente influenciou na porosidade de modo que, quanto maior a concentração de dexametasona menor é a presença e o tamanho dos poros, fazendo com que, possivelmente, haja uma menor capacidade de absorção de PBS.

4.3.6 Citotoxicidade

A Figura 53 mostra os resultados de viabilidade celular para os arcabouços para os arcabouços QH3, e os arcabouços constituídos por dexametasona QHD1 e QHD5.

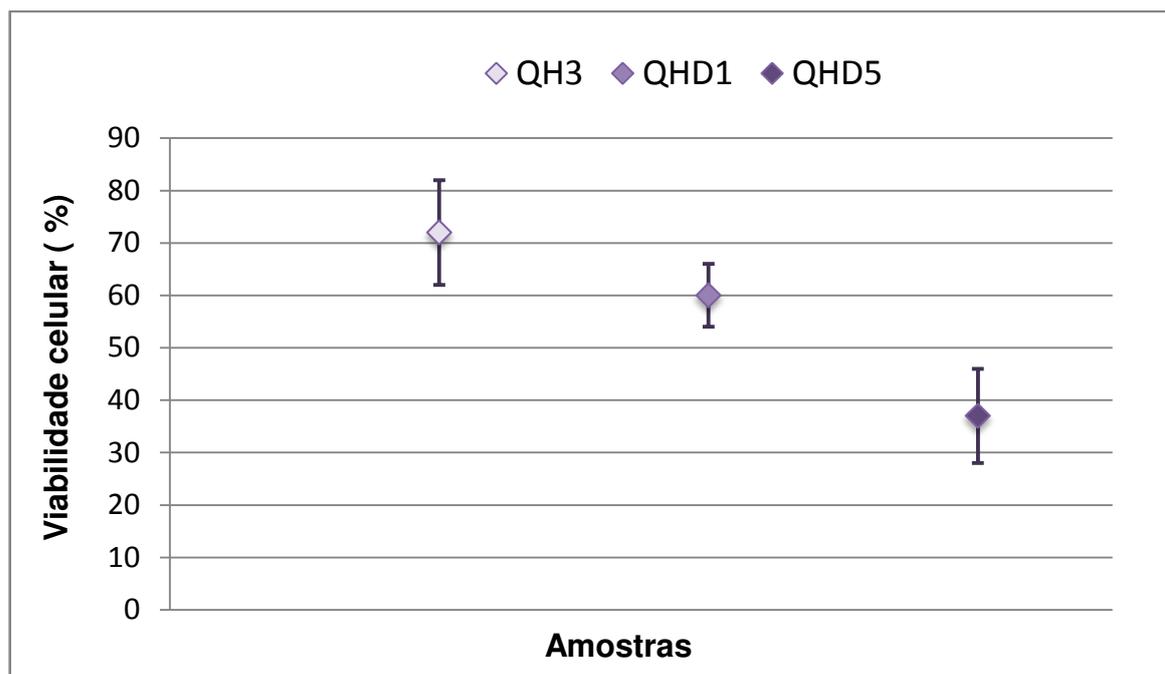


Figura 53- Gráfico do Ensaio de Citotoxicidade (%) para os arcabouços: QH3; QHD1; e QHD5.

A partir dos resultados apresentados no Gráfico de Ensaio de Citotoxicidade, Figura 53, podemos afirmar que a adição do fármaco afetou a viabilidade celular dos arcabouços, uma vez que houve uma queda nesses valores à medida que se aumentou a concentração de dexametasona. Desse modo, observa-se que para os QH3 obtém-se valores em torno de $72 \pm 10\%$, e com a adição do fármaco há uma diminuição deste valor, onde para os arcabouços de QHD1 obtém-se valores em torno de $60 \pm 6\%$, e nos arcabouços de QHD5 passou para valores em torno de $37 \pm 9\%$. Diante disso, podemos afirmar que a adição de dexametasona nos arcabouços diminuiu a viabilidade celular, apresentando-se perfil citotóxico na concentração de 5% de dexametasona, uma vez que a viabilidade é menor que 50%. Estes valores são esperados, tendo em vista que o fármaco utilizado tem ação anti-inflamatória. Além disso, ao compararmos os valores de viabilidade celular da Figura 53 com os valores obtidos para os arcabouços contendo curcumina, Figura 30, pode-se observar que a dexametasona apresentou-se mais citotóxica do que a curcumina, isso pode ser atribuído ao seu perfil de liberação.

4.3.7 Desenvolvimento e Validação do método analítico para o fármaco dexametasona por Espectrofotômetro (UV- VIS)

4.3.7.1 Determinação do comprimento de onda de detecção

A Figura 54 apresenta o espectro de absorção da dexametasona (1 mg/mL), obtido através do método analítico utilizado nesta pesquisa.

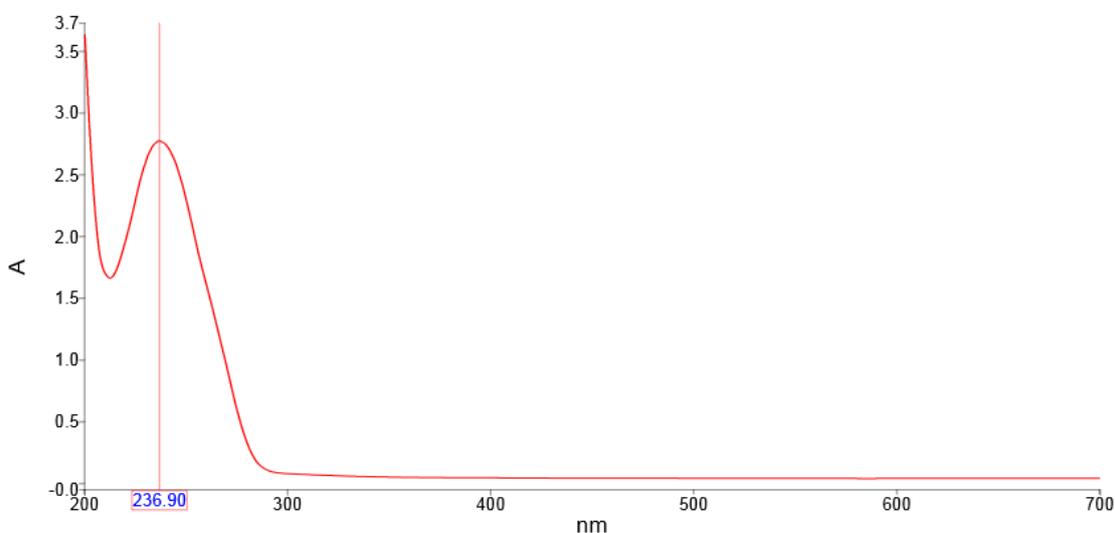


Figura 54- Espectro de absorção da dexametasona (1 mg/mL), e detecção do comprimento de onda em 236,9 nm.

Conforme apresenta o espectro de absorção da dexametasona (1 mg/mL) dissolvida em etanol, identificou-se o comprimento de onda da dexametasona em $\lambda=236,9$ nm, onde o fármaco apresentou pico de absorção máxima.

4.3.7.2 Validação do método analítico por Espectrofotômetro (UV- VIS) para o fármaco dexametasona

A validação deve garantir que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Portanto, conforme descrito na seção 3.3.8.1, o método desenvolvido neste trabalho foi validado seguindo os parâmetros: seletividade, linearidade, exatidão, precisão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação.

Seletividade

Seletividade refere-se à capacidade que o método possui de medir exatamente um composto na presença de outros componentes. A seletividade do método foi avaliada pela comparação das bandas máximas de absorção obtidas da análise de uma amostra dos arcabouços sem dexametasona, comparadas com as bandas do sistema contendo fármaco. O método empregado utilizou o comprimento de onda de 236,9 nm, pois representa o comprimento de máxima absorção da dexametasona. Os resultados demonstraram que o método proposto é seletivo e específico, para todos os meios analisados, uma vez que não se observou interferência dos polímeros e da hidroxiapatita no comprimento de onda de máxima absorção do fármaco.

Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ANVISA, 2003). A linearidade do método foi avaliada a partir da curva de calibração, conforme Figura 55.

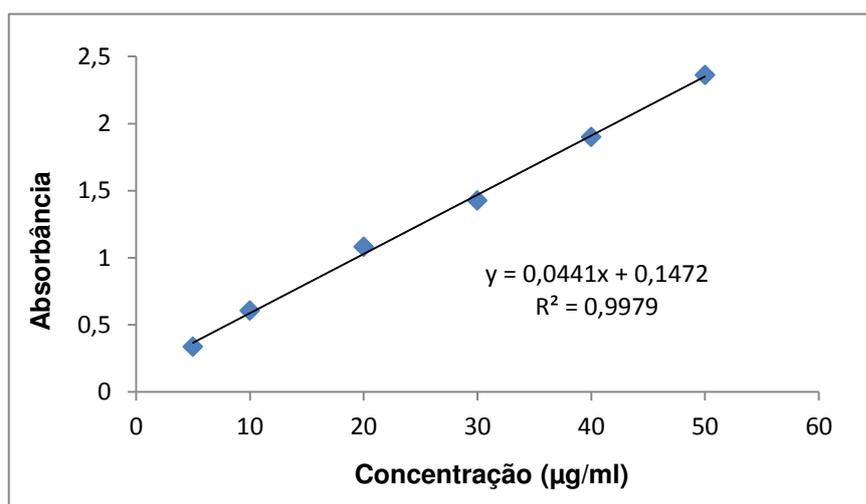


Figura 55- Representação gráfica da curva de calibração da dexametasona obtida por espectrofotometria UV ($\lambda=236,9$ nm).

No presente caso, o método mostrou-se linear no intervalo entre 5 a 50 µg/mL (Figura 55). A equação da reta encontrada, $ABS = 0,0441C + 0,1472$, obtida pelo método dos mínimos quadrados apresentou o coeficiente de correlação (R)

igual a 0,9993, estando em concordância com os critérios estabelecidos pela RE N^o 899/2003 da ANVISA, que preconiza valor mínimo de $r = 0,99$ (BRASIL, 2003). A equação da reta encontrada foi aplicada aos outros testes para obtenção das concentrações do padrão e amostras.

Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor teórico. Para determinar a exatidão foram escolhidas concentrações baixas (10,0 µg/mL), média (30,0 µg/mL) e alta (50,0 µg/mL), conforme a Tabela 10.

Tabela 10- Determinação da exatidão do método.

Concentração teórica de dexametasona (µg/mL)	Concentração calculada de dexametasona (µg/mL)	Precisão (CV%)	Exatidão (CV%)
10,0	9,87	0,19	1,38
30,0	29,82	0,38	0,96
50,0	51,35	0,61	2,07

A ANVISA estabelece como aceitáveis valores de exatidão com coeficiente de variação (CV%) máxima de 5%, portanto como visto na tabela 10, podemos afirmar que o método proposto mostrou-se exato conforme RE899/03.

Precisão

A precisão (Tabela 11) foi determinada pela repetitividade do procedimento analítico e foi determinada por meio da análise de cinco soluções de mesma concentração (30 µg/mL) para dexametasona, pelo mesmo método, sob as mesmas condições de medição, mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento e mesmo dia, definindo a repetibilidade. E, já a precisão intermediária foi avaliada no mesmo laboratório, utilizando o mesmo equipamento, porém em dias diferentes e

com analista diferente. O coeficiente de variação (CV%) máximo permitido é de 5% (ANVISA, 2003).

Tabela 11- Coeficiente de variação das amostras empregadas no teste de precisão por repetibilidade e de precisão intermediária.

1- Precisão por Repetibilidade			
Precisão por Repetibilidade	Concentração teórica de dexametasona ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração calculada de dexametasona ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão (CV%)
5 Repetições	30,0	30,4673 \pm 0,21	0,78
2- Precisão Intermediária (analista diferente)			
Dia	Concentração teórica de dexametasona ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração calculada de dexametasona ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão (CV%)
Dia 1	30,0	30,132 \pm 0,11	0,45
Dia 2	30,0	30,367 \pm 0,17	0,23

Os resultados apresentados na Tabela 11 indicam que o método proposto mostrou-se preciso para a quantificação de dexametasona, obtendo-se um coeficiente de variação menor que 5% (BRASIL, 2003).

Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados a partir do estudo de linearidade das curvas da calibração do ensaio de linearidade, e foram obtidos os limites: LD= 2,25 $\mu\text{g/mL}$ e LQ= 3,58 $\mu\text{g/mL}$.

4.3.7.3 Quantificação do teor de dexametasona liberado dos arcabouços

A quantidade de fármaco libertado, Figura 56, foi determinada por meio de espectroscopia de UV-visível (λ 35) por monitorização da absorvência

máxima a 236,9 nm, das alíquotas obtidas no ensaio de liberação para os arcabouços QHD1, QHD5.

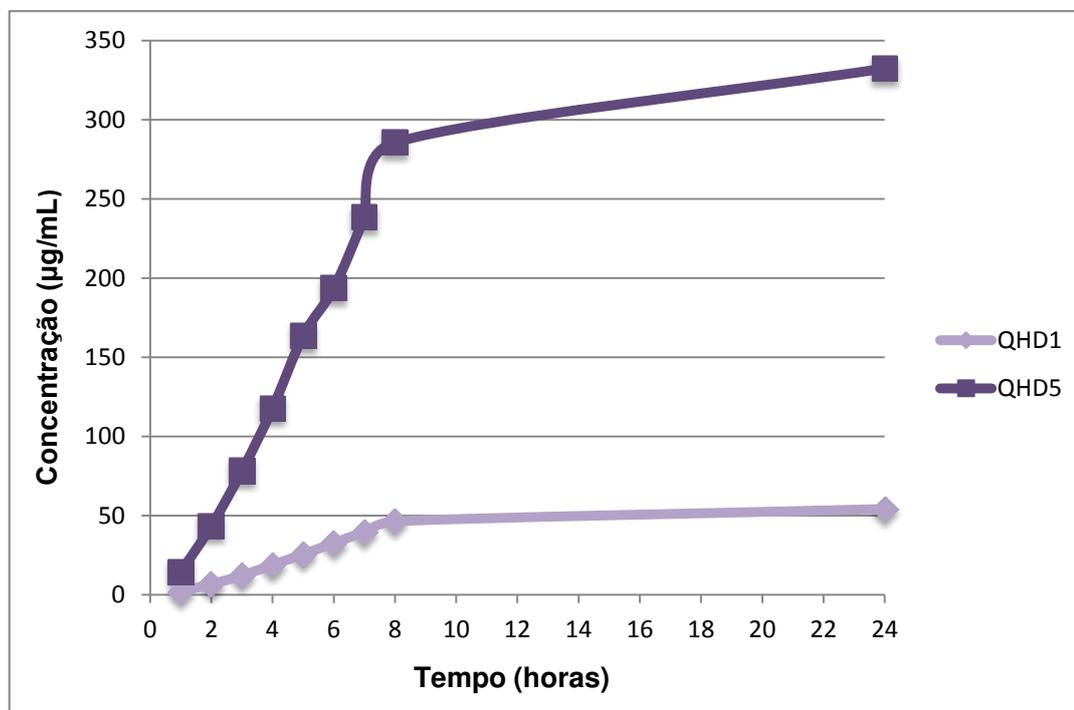


Figura 56- Representação gráfica da curva de liberação da dexametasona nos arcabouços QHC1, QHC5, QHC10, obtida por espectrofotometria UV ($\lambda=422,34$ nm).

A liberação da dexametasona foi monitorizada ao longo de um período de 24 horas, e diante da curva de liberação para os arcabouços QHD1, QHD5, Figura 56, podemos observar que as curvas apresentam semelhante comportamento de liberação, de modo que o perfil de liberação dos arcabouços mostrou uma rápida liberação do fármaco durante as primeiras horas, e diminuição com o tempo, de modo que começou a estabilizar após oito horas, altura em que aproximadamente 60% do fármaco tinham sido libertados tanto nos arcabouços QHD1, quanto nos QHD5.

Associando a concentração de fármaco liberada pelos arcabouços (Figura 56), com a quantidade de dexametasona depositada nos arcabouços submetidos ao ensaio de liberação, temos que, a concentração inicial de fármaco no sistema de liberação seria: em QHD1 de $75\mu\text{g/mL}$; em QHD5 de $375\mu\text{g/mL}$ de dexametasona; podemos assim afirmar que para QHD1 ocorreu 72% de liberação e para QHD5 ocorreu 91,4% de liberação. Com isso, podemos afirmar, que as possíveis

interações que possam ter ocorrido entre o fármaco e o biocompósito, podem ser do tipo física, de modo que permite a liberação mais rápida deste fármaco. Podemos associar este resultado aos altos níveis de citotoxicidade observada nos arcabouços com este fármaco, já que se observou rápida liberação de fármaco.

Os estudos de Nacify et al., (2009), sobre a liberação modulada de dexametasona a partir de filmes de nanotubos de carbono de quitosana, reportam que em um intervalo de tempo de 15 horas se tem mais de 50% da liberação do fármaco e com estimulação elétrica esse tempo é reduzido para 2h, baseado nisso podemos afirmar que os resultados obtidos nesta pesquisa estão dentro de um intervalo de liberação esperado para este tipo de fármaco.

4.3.7.4 Análise dos modelos matemáticos para os mecanismos de liberação da dexametasona nos arcabouços

Da mesma forma que na seção 4.2.7.4, a interpretação quantitativa dos valores obtidos no ensaio de liberação foi feito pelo uso das equações que se referem aos três modelos cinéticos: Cinética de ordem zero, Higuchi e Korsmeyer-Peppas, aplicados aos dados de liberação (Figura 56).

A escolha do melhor modelo matemático de liberação pode ser baseada no valor do coeficiente de correlação (R^2), os gráficos efetuados para os três modelos aplicados às amostras QHD1 e QHD5 estão expostos no Apêndice B. E, a tabela 12 apresenta os valores do coeficiente de correlação (R^2) para os diferentes modelos matemáticos (Cinética de Ordem zero, Higuchi e Korsmeyer-Peppas) aplicados às amostras.

Tabela 12- Coeficiente de correlação (R²) para os modelos matemáticos Cinética de Ordem zero, Higuchi e Korsmeyer-Peppas, aplicados a QHD1, e QHD5.

Modelos	Coeficiente de correlação (R ²)	
	QHD1	QHD5
Cinética de Ordem zero	0,9915	0,9939
Higuchi	0,9966	0,9963
Korsmeyer-Peppas (n=0,43)	0,9965	0,9947
Korsmeyer-Peppas (n=0,6)	0,9950	0,9915
Korsmeyer-Peppas (n=0,85)	0,9977	0,9973

Baseado no valor de R² ajustado, conforme apresentado na Tabela 12, podemos afirmar que os modelos que mais se enquadram ao perfil de liberação demonstrado nos arcabouços QHD1, QHD5 foram os modelos de Higuchi e de Korsmeyer-Peppas, assim como observado para os arcabouços com curcumina. O modelo de Higuchi indica que o perfil de liberação ocorre por meio do processo de difusão. Mas, é possível afirmar que o modelo que retratou mais adequadamente a liberação da dexametasona foi o de Korsmeyer-Peppas, o qual se baseia na Lei das Potências e, analisando os valores de n, podemos afirmar que o n mais adequado à liberação dos arcabouços nas diferentes concentrações de dexametasona, foi o n=0,85. Isto indica que, a liberação do soluto é controlada e ocorre contribuição simultânea de processos como difusão, intumescimento, relaxação e erosão da matriz polimérica. Os estudos de Nacify et al., (2009), sobre a liberação modulada de dexametasona a partir de filmes contendo quitosana, indicam que a liberação é atribuída à difusão passiva de dexametasona do filme quitosana para o meio de liberação.

5 CONCLUSÕES

Conclui-se que a partir desta pesquisa foi possível o desenvolvimento de arcabouços constituídos por quitosana/hidroxiapatita/gelatina carregado com curcumina ou dexametasona, para estudo em liberação controlada de fármacos. E, considerando os resultados obtidos a partir das caracterizações propostas podemos chegar as seguintes conclusões:

- A metodologia permitiu o desenvolvimento de arcabouços constituídos por quitosana/hidroxiapatita/gelatina carregado com curcumina e dexametasona, com perfil para sistemas de liberação controlada para os dois tipos de fármaco estudados.
- Na Etapa I, de maneira geral, ocorreu formação de esferas compósitas, com estrutura definida e porosa; e arcabouços com estruturas tridimensionais porosas, com poros interconectados;
- Os arcabouços formados na Etapa I, têm seus resultados influenciados pelas diferentes concentrações de hidroxiapatita. Interferindo na: porosidade, grau de intumescimento, e propriedade mecânica.
- Os arcabouços formados na Etapa I, têm seus resultados influenciados pelas diferentes concentrações de hidroxiapatita. Interferindo na: porosidade, grau de intumescimento, e propriedade mecânica.
- A viabilidade celular dos arcabouços com fármacos diminuiu proporcionalmente ao aumento da concentração de fármacos. A dexametasona apresentou-se mais citotóxica que a curcumina, isso pode ser associado as taxas de liberação que para a dexametasona apresentou-se maior que para a curcumina.
- Por meio da Validação conforme a Resolução RE nº 899 (ANVISA) e de estudos por modelos matemáticos, conclui-se que os arcabouços com dexametasona e curcumina permitem a liberação controlada.
- A liberação é controlada pelo processo de difusão e pelo intumescimento/relaxação da cadeia polimérica para os dois fármacos mesmo que em taxas diferentes.

Os resultados do presente estudo sugerem que os arcabouços constituídos por quitosana/hidroxiapatita/gelatina carregado com curcumina e dexametasona, possuem perfil para sistemas de liberação controlada para os dois tipos de fármaco estudados.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Este trabalho teve como principal objetivo o desenvolvimento de arcabouços constituídos por quitosana/hidroxiapatita/gelatina carregado com curcumina e dexametasona, para estudo em liberação controlada de fármacos. Utilizando estes componentes, buscou-se mimetizar, em termos de composição, o tecido ósseo e promover a liberação de fármacos, com o intuito de aplicação em regeneração óssea.

Com os resultados encontrados, foram levantadas novas questões, que geram a necessidade de continuação da pesquisa, pensando em melhorias futuras para os arcabouços desenvolvidos nesta tese. Desse modo, em termos de estrutura tridimensional, podemos focar no aperfeiçoamento da metodologia para adequar a propriedades desejadas, tais como, maiores porosidade e módulo de elasticidade; e em termos de liberação controlada de fármacos, podemos focar em promover uma maior avaliação do comportamento biológico destes tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Diante disso, podemos citar as seguintes sugestões:

- Variar o tamanho das esferas por meio do uso de agulhas com outras dimensões, e avaliar sua influência na porosidade e módulo de elasticidade dos arcabouços;
- Testar outros materiais para empregar como agente agregador de esferas, ou ainda, reticular a gelatina utilizando algum agente não tóxico, como, por exemplo, a genipina;
- Promover estudos de citotoxicidade com células mais específicas para aplicação em regeneração óssea;
- Promover estudos *in vivo*, para avaliar a capacidade de aplicação e a resposta aos fármacos, curcumina e dexametasona.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, B.B.; HARIKUMAR, K. B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.41, p 40–59, 2009.

ALI, M. S.; PANDIT, V.; JAIN, M.; DHAR, K. L. Mucoadhesive microparticulate drug delivery system of curcumin against *Helicobacter pylori* infection: design, development and optimization. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 5, p. 48-56, 2014.

ALMEIDA, H. R.; BARTOLO, P. J. Design of tissue engineering scaffolds based on hyperbolic surfaces: Structural numerical evaluation. **Medical Engineering & Physics**, v. 36, n. 8, p. 1033-1040, 2014.

ALMEIDA, L. P.; NAGHETINI, C. DA C.; NUNAN, E. DE A.; JUNQUEIRA, R. G.; GLÓRIA, M. B. A. Atividade antimicrobiana in vitro do rizoma em pó, dos pigmentos curcuminóides e dos óleos e dos essenciais da *Curcuma longa* L. **Ciênc. agrotec.**, vol.32, n.3, p. 875-881, 2008.

ALVES, L. B. **Enxerto osteocondral alógeno, associado à inoculação de células mononucleares da medula óssea e dexametasona no reparo da tróclea de coelhos**. 2008. 53f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – Minas Gerais.

AMARAL, I. F.; BARBOSA, M. A.; BARRIAS, C. C.; CAVALHEIRO, J.; FERRAZ, M. P.; GRANJA, P. L.; LOPES, M. A.; MARTINS, C. L.; MONTEIRO, F. J.; RIBEIRO, C. C.; SANTOS, J. D.; SOUSA, S. R.; QUEIROZ, A.C. Biomateriais. In: LIMA, N.; MOTA, M. (Eds.). **Biotecnologia: Fundamentos e Aplicações**. Lisboa, Portugal: Lidel, 2003. p. 377-397.

ANAND, P.; THOMAS, S. G.; KUNNUMAKKARA, A. B.; SUNDARAM, C.; HARIKUMAR, K. B.; SUNG, B.; THARAKAN, S. T.; MISRA, K.; PRIYADARSINI, I. K.; RAJASEKHARAN, K. N.; AGGARWAL, B. B. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. **Biochemical Pharmacology**, v. 6, p. 1590 – 1611, 2008.

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

ANTONINO, N. DE A. **Otimização do Processo de Obtenção de Quitina e Quitosana de Exoesqueletos de Camarões Oriundos da Indústria Pesqueira Paraibana**. 2007. 88f. Dissertação (Mestrado em Química). Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa - Paraíba.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2003. Resolução nº 899, de 29/05/2003: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Ministério da Saúde. Brasil, 2003.

AZEVEDO, M. M. M. **Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos**. 2012. 20f. Monografia (Avaliação do curso Tópicos Especiais em Química Inorgânica). Instituto de Química, Universidade de Campinas, São Paulo – São Paulo.

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

BALDINO, L.; CARDEA, S.; DE MARCO, I.; REVERCHON, E. Chitosan scaffolds formation by a supercritical freeze extraction process. **The Journal of Fluids supercritics**, v. 90, p. 27-34, 2014.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros**, v. 15, n. 1, p. 0104-1428. 2005.

BERGANIMI, G. **Dexametasona: interação com ácidos carboxílicos aromáticos no estado sólido**. 2008. 133f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - Rio Grande do Sul.

BERWIG, E. **Preparação e caracterização de filmes de poliuretano com potencial aplicação na liberação controlada de fármacos**. 2006. 69f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química). Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – Santa Catarina.

BITENCOURT, C.M. **Desenvolvimento e aplicação de filmes á base de gelatina aditivados com extrato etanólico de cúrcuma (*Curcuma longa L.*)**. 2013. 107f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Engenharia de Alimentos). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga – São Paulo.

BOHNER, M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements, **Injury**, v. 31, p. 37-47, 2000.

BUCKLEY C. T.; O'KELLY, K. U. Regular scaffold fabrication techniques for investigations in tissue engineering. **Bio-Mechanical Engineering**, p. 147-166, 2004.

CAI, X.; CHEN, L.; JIANG, T.; SHEN, X.; HU, J.; TONG, H. Facile synthesis of anisotropic porous chitosan/hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, p. 12015–12025, 2011.

CAMARGO, N. H. A.; DELIMA, S. A.; AGUIAR, J. F.; GEMELLI, E.; TOMIYAMA, M. Synthesis and Characterization of Nanostructures Calcium Phosphates Powders and Calcium Phosphates/-Al₂O₃ Nanocomposites. **Journal of Advanced Materials**, v. 41, p. 33-43, 2009.

CARBINATTO, F. M. **Matrizes poliméricas reticuladas de alta amilose e pectina para liberação controlada de fármacos**. 2010. 109f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara – São Paulo.

Central da Fisioterapia. Assessment 2014. <Disponível em <http://www.centraldafisioterapia.com.br/dicas-de-saude/do-que-os-ossos-sao-feitos>>.

CHEN, F.; WANG, ZC; LIN, CJ. Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite particles and hydroxyapatite/chitosan nano-composite for use in biomedical materials. **Materials Letters**, v. 57, pp. 858-861, 2002.

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

CHEN, Q., ROETHER, J. A., BOCCACCINI, A. R. Tissue Engineering Scaffolds from Bioactive Glass and Composite Materials. **Tissue Engineering**, v. 4, p. 1-27, 2008.

CHEUNG, H.-Y.; LAU, K.-T.; LU, T.-P.; HUI D. A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. **Composites Part B: Engineering**, v. 38, p. 291–300, 2007.

CHIANG, Z.-C.; YU, S.-H.; CHAO, A.-C.; DONG, G.-C. Preparation and characterization of dexamethasone-immobilized chitosan scaffold. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, p. 654–660, 2012.

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

COIMBRA, P. M. A. **Preparação e Caracterização de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos com base em Polímeros de Origem Natural**. 2010. 241f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra – Portugal.

COLTRO, M. C. R. C. **Síntese e Caracterização De Polímeros Biodegradáveis Para Liberação Controlada De Dexametasona**. 2014. 114f. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia - Goiás.

COSTA, A. C. F. M.; LIMA, M. G.; LIMA, L. H. M. A.; CORDEIRO, V. V.; VIANA, K. M. S.; SOUZA C. V.; LIRA H. L. Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 4, p. 29-38, ISSN 1809-87971, 2009.

DALAPÍCULA, S.; VIDIGAL Jr, G.M.; CONZ, M.B.; CARDOSO, E.S.. Características físico-químicas dos biomateriais utilizados em enxertias ósseas: uma revisão crítica. **Implant News**, v. 3, n. 5, p. 487-491, 2006.

DANG, T. T.; THAI, A. V.; COHEN, J.; SLOSBERG, J. E.; SINIAKOWICZ, K.; DOLOFF, J. C.; MA, M.; HOLLISTER-LOCKE, J.; TANG, K. M.; GU, Z.; CHENG, H.; WEIR, G. C.; LANGER, R.; ANDERSON, D. G. Enhanced function of immun-isolated islets in diabetes therapy by co-encapsulation with an anti-inflammatory drug. **Biomaterials**, v. 34, p. 5792–5801, 2013.

DANTAS, T. S.; LELIS, E. R.; NAVES, L. Z.; FERNANDES-NETO, A. J.; MAGALHÃES, D. Materiais de enxerto ósseo e suas aplicações na Odontologia. UNOPAR. **Cient Cienc Biol Saude**, v. 13, n. 2, p.131-135, 2011.

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

DONSI, F.; WANG, Y.,; LI, J.; HUANG, Q. Preparation of Curcumin Sub-micrometer Dispersions by High-Pressure Homogenization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.5 8, p. 2848–2853, 2010.

DOROZHUKIN, S. Calcium orthophosphates. **Journal of Materials Science**, v. 42, p. 1061-1095, 2007.

DRAENERT, M.E.; DRAENERT, Y.; DRAENERT, K.; POHLEMANN, T.; ERLER, M. Primary cancellous bone formation around micro-chambered beads. **Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología (English Edition)**, v. 58, p. 131-137, 2014.

DUARTE, A. R. C.; MANO, J. F.; REIS, R. L. Dexamethasone-loaded scaffolds prepared by supercritical-assisted phase inversion. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 6, p. 2054–2062, 2009a.

DUARTE, A. R. C.; MANO, J. F.; REIS, R. L. Preparation of chitosan scaffolds loaded with dexamethasone for tissue engineering applications using supercritical fluid technology. **European Polymer Journal**, v. 45, n. 1, p. 141-148, 2009b.

FERRONY, D. de A. **Desenvolvimento de uma formulação semi-sólida contendo nanocápsulas de dexametasona: estudo da estabilidade e avaliação da liberação “in vitro”**. 2009. 102f. Dissertação (Mestrado em Nanociências). Centro Universitário Franciscano – UNIFRA, Santa Maria – Rio Grande do Sul.

FERRONY, D.; ROGGIA, ISABEL; ALVES, M. P. Avaliação da liberação “in vitro” da dexametasona nanoestruturada e incorporada em um creme gel. **Disc. Scientia**. Série: Ciências da Saúde, v. 13, n. 1, p. 51-62, 2012.

FIDÉLES, T.B. **Desenvolvimento de scaffolds de quitosana para aplicação na engenharia de tecidos**. 2014. 121f. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais). Programa de Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Campina Grande – Paraíba.

FINISIE, M. R.; JOSUE, A.; FAVERE, V. T.; LARANJEIRA, M. C. M.. Synthesis of calcium-phosphate and chitosan bioceramics for bone regeneration. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 73, n.4, pp. 525-532, 2001.

FONTES, R. A. M. **Desenvolvimento e Caracterização de Arcabouços à Base de Fosfatos de Cálcio**. 2010. 126f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica). Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa – Portugal.

FOOK, A. C. B. M. **Produção e caracterização de arcabouços compósitos HA/biopolímeros para engenharia de tecidos**. 2012. 121f. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais), Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Campina Grande – Paraíba.

FUCHS, J. R.; BORIS, M. D.; NASSERI, A.; VACANTI, J. P. **Tissue Engineering: A 21st Century Solution to surgical Reconstruction**. 2001. Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston – Estados Unidos.

GAO, C.; CAI, Y.; KONG, X.; HAN, G.; YAO, J. Development and characterization of injectable chitosan-based hydrogels containing dexamethasone/rhBMP-2 loaded hydroxyapatite nanoparticles. **Materials Letters**, v.93, p. 312–315, 2013.

GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1352-1358, 2010.

HAN, J.; ZHOU, Z.; YIN, R.; YANG, D.; NIE, J. Alginate–chitosan/hydroxyapatite polyelectrolyte complex porous scaffolds: Preparation and characterization. **Journal International of macromoléculas biológicas**, v. 46, p. 199-205, 2010.

HANA, J.; ZHOUA, Z.; YINA, R.; YANGA, D.; NIE, J. Alginate–chitosan/hydroxyapatite polyelectrolyte complex porous scaffolds: Preparation and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, p. 199–205, 2010.

HENRIQUE, J. S.; FALCARE, R. S.; LOPES, P. S. Sistemas de liberação controlada. **Pharmacia Brasileira**, p. 22, 2007.

HO, W.-T.; CHEN, T.-C.; CHOU, S.-F.; CHANG, S.-W. Dexametasona modifica mitomicina-C desencadeada interleucina-8 secreção em isolados humanos fibroblastos da cápsula de Tenon. **Experimental Eye Research**, v. 124, p. 86-92, 2014.

HORTA, C. H. V. **Hidroxiapatita: Substituto Ósseo Nas Reconstruções Alveolares**. 2012. 32f. Monografia (Especialização em Implantodontia). Instituto de Ciências da Saúde FUNORTE/SOEBRAS, Três Corações – Minas Gerais.

HUANG, Y.; ONYERI, S.; SIEWE, M.; MOSHFEGHIAN, A.; SUNDARARAJAN MADIHALLY, V. In vitro characterization of chitosan–gelatin arcabouços for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 26, n. 36, p. 7616-7627, 2005.

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

JIANG, L.; LI, Y.; WANG, X.; ZHANG, L.; WEN, J.; GONG, M.. Preparation and properties of nano hydroxyapatite/ chitosan/carboxymethyl cellulose composite scaffold. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 3, p. 680-684, 2008.

JONES, A. C.; ARNS, C. H.; HUTMACHER, D. W.; MILTHORPE, B. K.; SHEPPARD, A. P. The correlation of pore morphology, interconnectivity and physical properties of 3D ceramic arcabouços with bone ingrowth. **Biomaterials**, v. 30, p. 1440-1451, 2009.

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

KHAN, M. A.; AKHTAR, N.; SHARMA V.; PATHAK, K. Product Development Studies on Sonocrystallized Curcumin for the Treatment of Gastric Cancer. **Pharmaceutics**, v. 7, p. 43-63, 2015.

KHOR, E. ; LIM, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2339-2349, 2003.

KO, J. A.; PARK, H. J.; HWANG, S. J.; PARK, J. B.; LEE, J. S.; Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 249, p. 165-174, 2002.

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

LANDI, E.; VALENTINI, F.; TAMPIERI, A. Porous hydroxyapatite/gelatine arcabouços with ice-designed channel-like porosity for biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, v. 4, n. 6, p. 1620–1626, 2008.

LI, J.; CHEN, Y. P.; YIN, Y.; YAO, F.; YAO, K.. Modulation of nano-hydroxyapatite size via formation on chitosan–gelatin network film in situ. **Biomaterials**, v. 28, n. 5, p. 781-790, 2007.

LIBONATI, F.; NAIR, A. K.; VERGANI, L.; BUEHLER, M. J. Mechanics of collagen–hydroxyapatite model nanocomposites. MULTI-SCALE MODELING AND CHARACTERIZATION OF INNOVATIVE MATERIALS AND STRUCTURES. **Mechanics Research Communications**, v. 58, p. 17–23, 2014.

LOURENÇO, V. A. **Desenvolvimento e avaliação de micropartículas de quitosana para a veiculação de dimetilaminoetanol (DMAE) na pele**. 2006. 117f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – São Paulo.

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

LEAL, R. DE C. A. ; NASCIMENTO, I. V. S. R. ; FOOK, M. V. L.; MEIRA, R. C. Avaliação do potencial citotóxico de biocompositos Hidroxiapatita/Quitosana. In: 7º Congresso Latinoamericano de Órgãos Artificiais e Biomateriais (7º COLAOB). Natal, 2012.

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

LOPES, C.M.; LOBO, J. M.S. and COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** vol.41, n.2, pp. 143-154, 2005.

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

MANJU, S. & SREENIVASAN, K. Hollow microcapsules built by layer by layer assembly for the encapsulation and sustained release of curcumin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, p. 588–593, 2011.

MARTINO, A. DI; SITTINGER, M.; RISBUD, M. V. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. **Biomaterials**, v. 26, n. 30, p. 5983-5990, 2005.

MATOS, M. B. C. DE; PIEDADE, A. P.; ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCHEIRO, A.; BRAGA, M. E. M.; SOUSA, H. C. DE. Dexamethasone-loaded poly(ϵ -caprolactone)/silica nanoparticles composites prepared by supercritical CO₂ foaming/mixing and deposition. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 456, n. 2, p. 269–281, 2013.

MAVROPOULOS, E. **A hidroxiapatita como absorvedor de metais**. 1999. 105f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro – Rio de Janeiro.

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

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

MOREIRA, E. L.; ARAÚJO, J. C. DE; MORAES, V. C. A.; MOREIRA, A. P. D. Análise estrutural de uma hidroxiapatita carbonatada por difração de raios-X. **Matéria**, v. 12, n.3, 2007.

MOSNA, F.; SENSEBÉ, L.; KRAMPERA, M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide. **Stem Cells Dev**, v. 19, pp. 1449–1470, 2010.

MOTA, N. L.; CASTRO JÚNIOR, A. F.; CASTRO B. K.; SILVEIRA NETO, L. L. Embriologia e histofisiologia do tecido ósseo: revisão de literatura e bases histofisiológicas das principais doenças osseas metabólicas. **Boletim do Centro de Biologia da reprodução**, v. 27, p. 27-32, 2008.

MURPHY, M. B.; MIKOS, A.G. Polymer Scaffold Fabrication. In: LANZA, R. N.; LANGER, R.; VACANTI, J. **Principles of tissur Engineering**. San Diego: Elsever Academic Press, 2009.

NAFICY, S.; RAZAL, J. M. G.; SPINKS, M.; WALLACE, GORDON G. Modulated release of dexamethasone from chitosan–carbon nanotube films. **Sensors and Actuators A: Physical**, v. 155, p. 120–124, 2009.

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

OLIVEIRA, A. A. R. DE; OLIVEIRA, J. E. DE; ORÉFICE, R. L.; MANSUR, H. S.; PEREIRA, M. DE M. Avaliação das propriedades mecânicas de espumas híbridas de vidro bioativo/álcool polivinílico para aplicação em engenharia de tecidos. **Matéria**, v.12, n. 1, ISSN 1517-7076, 2007.

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

PENICHE, C.; SOLÍS, Y.; DAVIDENKO, N.; GARCÍA, R. Chitosan/ hydroxyapatite-based composites. *Materiales compuestos de quitosana e hidroxiapatita*. **Bioteconología Aplicada**, v. 27, n.3, 2010.

PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, vol. 43, n. 4, p. 491-502, 2007.

PRIYADARSINI, K. I. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 10, p. 81–95, 2009.

QUEIROZ, L. R. T. **Avaliação de Sistemas Sólidos Particulados, Gastroretensivos Flutuantes, Obtidos Por Geleificação Ionotrópica**. 2011. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Sorocaba, Sorocaba – São Paulo.

RANGEL, M. L. da S. S. **Nanomagnetitas revestidas com biopolímero quitosana para aplicação na remediação ambiental**. 2012. 47f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas), Centro Universitário Estadual da Zona Oeste – UEZO, Rio de Janeiro – Rio de Janeiro.

RATNER, Buddy D [et. al]. **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. 2 ed. San Diego: Elsevier; Academic Press, 2004. 851 p.

RIEKES, M. K.; PAULA, J. P. DE; ZAWADZKI, S. F.; FARAGO, P. V. Micropartículas De Poli(3-Hidroxiubutirato-Co-3- Hidroxivalerato) para a liberação modificada da Dexametasona. In: 10^o Congresso Brasileiro de Polímeros (10^oCBPol). Foz do Iguaçu (Brasil), 2009.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.

RODRÍGUEZ, E T.; GONZÁLEZ, Z. G.; ESPINOSA, R. H.; CEDEÑO, Q. A.; VOGEL, C; SAAVEDRA, M. A. Empleo de ultrasonido en la extracción de curcumina a partir de su fuente natural. **Revista Cubana de Plantas Medicinales** (revista online), v. 19, 2014.

RUSU, V. M.; NG, C.-H.; WILKE, M.; TIERSCH, B.; FRATZL, P.; PETER, M. G. Size-controlled hydroxyapatite nanoparticles as self-organized organic–inorganic composite materials. **Biomaterials**, v. 26, n. 26, p. 5414-5426, 2005.

SAMPAIO, G. Y. H. **Produção de scaffolds de policaprolactona-nanohidroxiapatita**. 2014. Seminário de tese. Programa de Pós-graduação em Ciência e Engenharia de materiais, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande – Paraíba.

SANTOS, J. V.; MOURA, T. F. A.; RAFFIN, F. N. Otimização dos Parâmetros de Secagem por Aspersão de Micropartículas de Quitosana como Carreadores de Insulina. **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 22, n.4, p. 327-333, 2003.

SHRESTHA, S.; DIOGENES, A.; KISHEN, A. Temporal-controlled Dexamethasone Releasing Chitosan Nanoparticle System Enhances Odontogenic Differentiation of Stem Cells from Apical Papilla. **Journal of Endodontics**, v. 41, p. 1253–1258, 2015.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 1, São Paulo, 2003.

SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R. DOS; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, 2006.

SILVA, P. **Farmacologia**, 7. Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. ISBN 85-277-1124-9.

SILVA, R. A.; FAGUNDES, D. J.; SILVA, A. C. M. B. A.; SISTI, K. E.; CARVALHO, T. M. M. B.; SILVA, D. N. Efeito de anti-inflamatórios na integração de enxerto ósseo autógeno e de matriz óssea bovina desvitalizada em retos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 23, n. 2, 2008.

SILVA, R. L. Da. **Sistema de Liberação Controlada de Quitosana Contendo Antígeno Capsular Vi de Salmonella Typhi**. 2012. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém – Pará.

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

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

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

SOUZA, K. V. DE; ZAMORA, P. G. P; ZAWADZKI, S. F. Esferas de quitosana/fe na degradação do corante azul qr-19 por processos foto-fenton utilizando luz artificial ou solar. **Polímeros**, v. 20, n. 3, p. 0104-1428, 2010.

SUN, J.; LIU, Y.; KONG, W.; JIANG, W. In vitro permeability of round window membrane to transforming dexamethasone with delivery vehicles - a dosage estimation. **Chinese Medical Journal**, v. 120, n. 24, p. 2284-2289, 2007.

TAVARES, D. S. C. **Fabricação e caracterização de scaffolds compósitos de polímero-hidroxiapatite e polímero-vidro para engenharia de tecidos**. 2014. 50f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica). Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa. Porto – Portugal.

TORRES, M. A.; VIEIRA, R. S.; BEPPU, M. M.; SANTANA, C. C. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. **Polímeros**, v. 15, n. 4, p. 0104-1428, 2005.

TURKOGLU, O. F.; EROGLU, H.; OKUTAN, O.; BURUL, E.; SARGON, M. F.; ÖZER, N.; ÖNER, L.; BESKONAKLI, E. The efficiency of dexamethasone sodium phosphate–encapsulated chitosan microspheres after cold injury. **Surgical Neurology**, v. 64, p. S11–S16, 2005.

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

VALGAS, S. **Desenvolvimento De Um Novo Sistema De Liberação Controlada Do Fármaco Enrofloxacin A Partir De Microesferas De Malonilquitosana A Ser Aplicado Em Medicina Veterinária**. 2005. 125f. Tese (Doutorado em Química) Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – Santa Catarina.

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

VOLKMER, T. M.; dos SANTOS L. A. Influência do tempo de indução nas propriedades de hidroxiapatita porosa obtida por gelcasting de espumas. **Cerâmica**, v. 53, n. 328, p. 0366-6913, 2007.

WATTANUTCHARIYA, W. E CHANGKOWCHAI, W. Characterization of Porous Scaffold from Chitosan-Gelatin/Hydroxyapatite for Bone Grafting. Proceedings of the International MultiConference of Engineers and Computer Scientists, v. 2, p. 12-14, 2014.

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

YALLAPU. M. M. ; JAGGI M.; CHAUHAN S. C. Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 2, 2012.

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

ZHANG, Y. & ZHANG, M. Synthesis and characterization of macroporous chitosan/calcium phosphate composite scaffolds for tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 55, p. 304–312, 2001.

ZHAO, F.; GRAYSON, W. L.; MA T.; BUNNELL, B.; LU, W. W. Effects of hydroxyapatite in 3-D chitosan–gelatin polymer network on human mesenchymal stem cell construct development. **Biomaterials**, v. 27, p. 1859–1867, 2006.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Modelos de liberação controlada de fármacos conforme discutido na seção 6.2.7.4. que reporta a análise dos modelos matemáticos para os mecanismos de liberação da curcumina nos arcabouços.

Modelo cinética de Ordem Zero

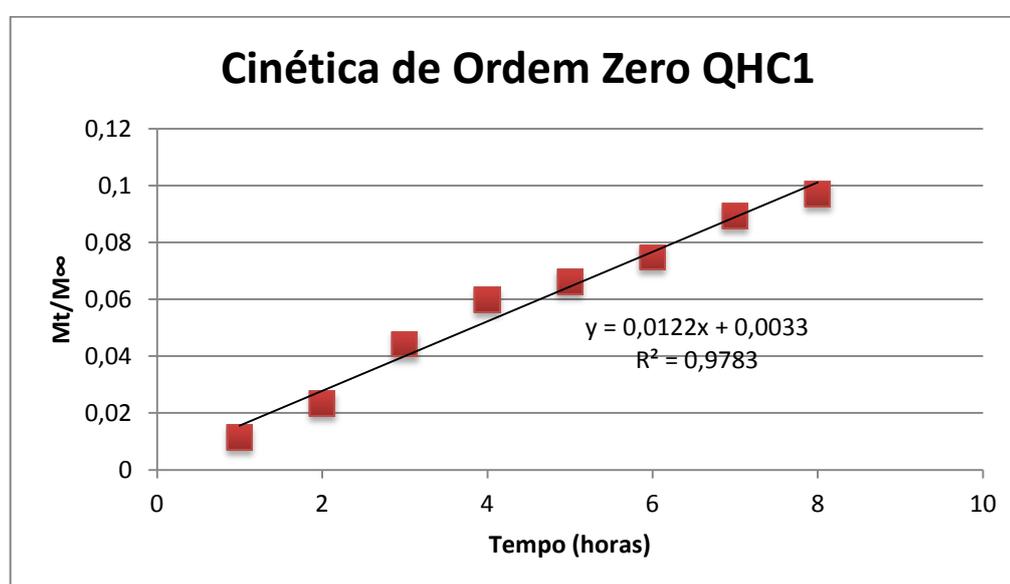


Figura A1- Cinética de Ordem Zero QHC1

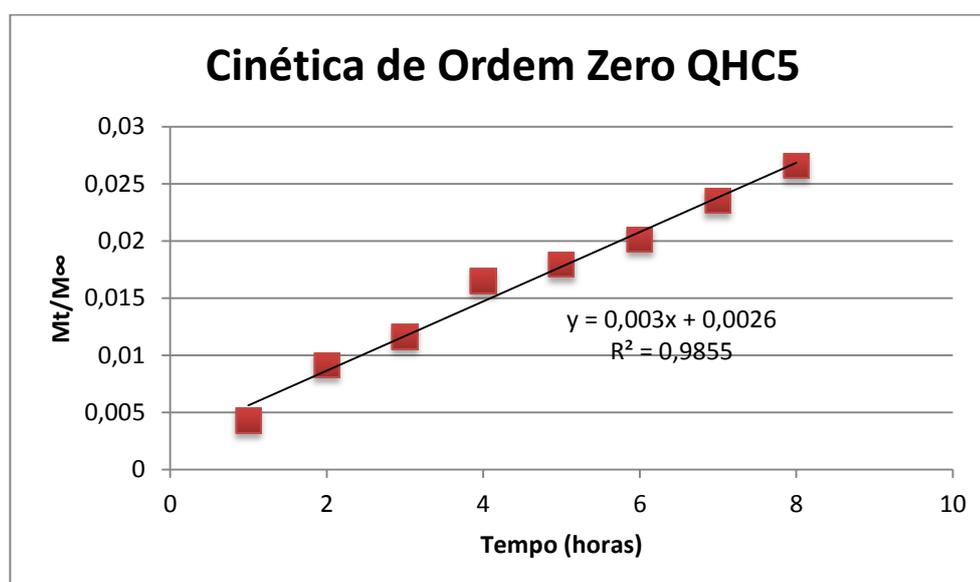


Figura A2- Cinética de Ordem Zero QHC5

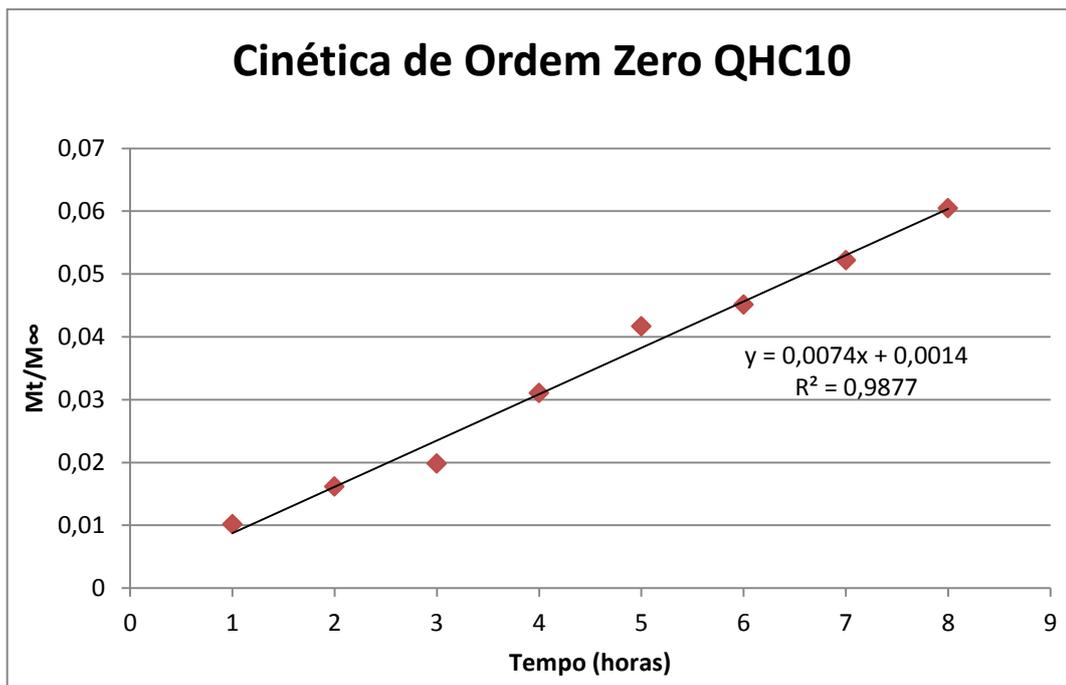


Figura A3- Cinética de Ordem Zero QHC10

Modelo de Higuchi

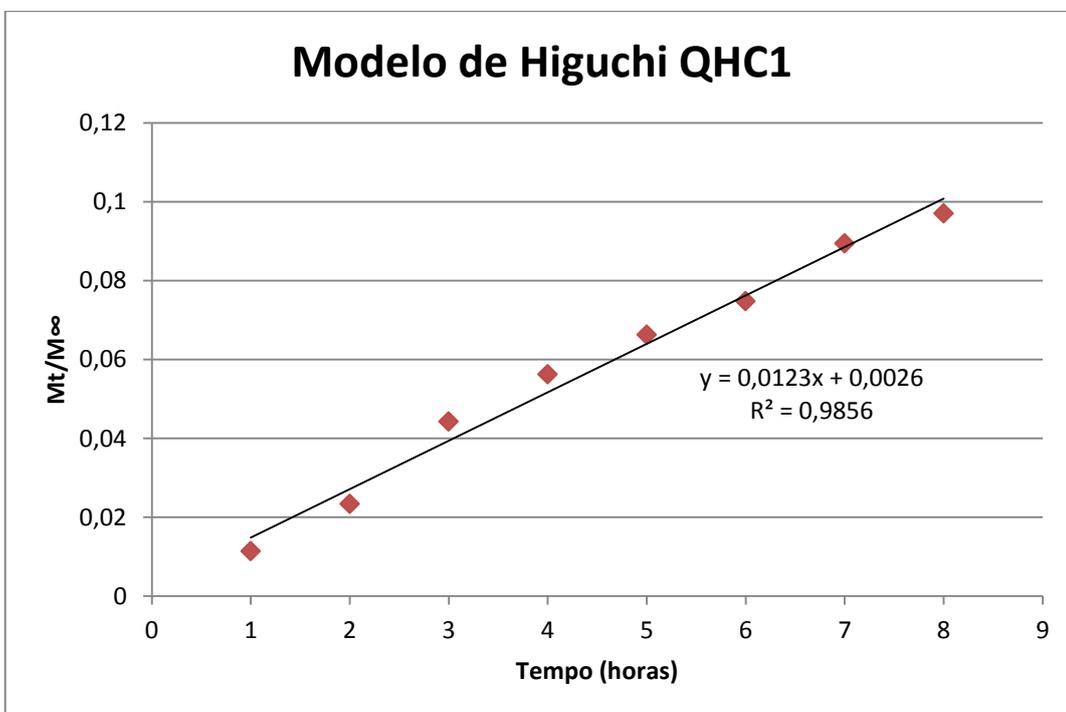


Figura A4- Modelo de Higuchi QHC1.

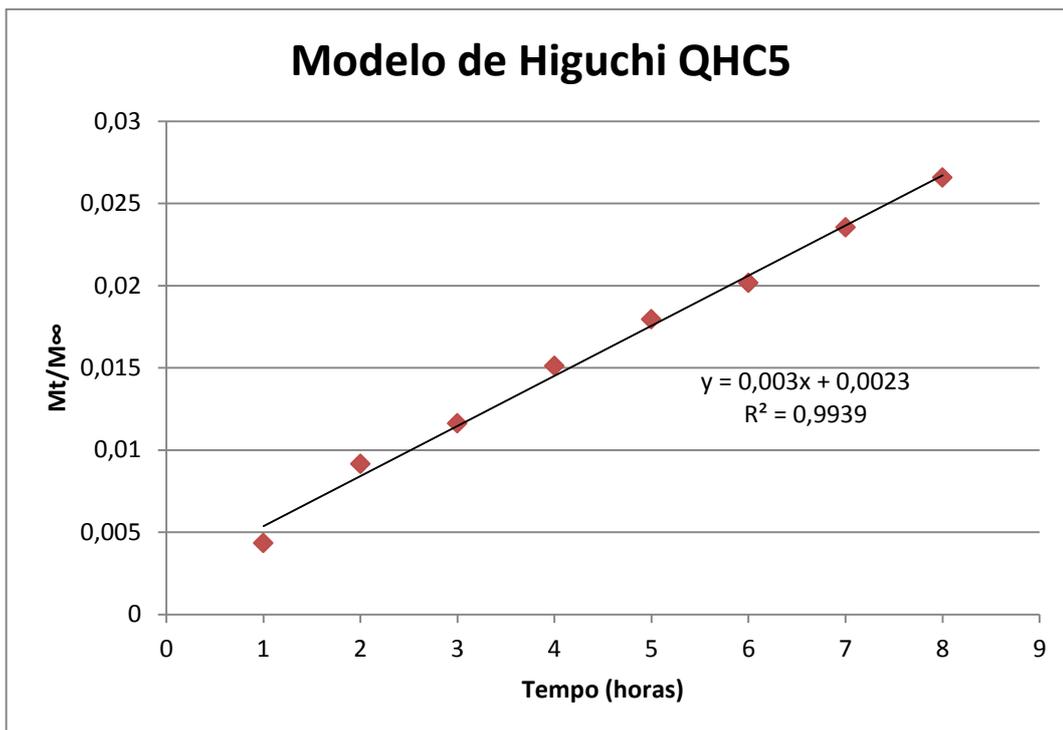


Figura A5- Modelo de Higuchi QHC5.

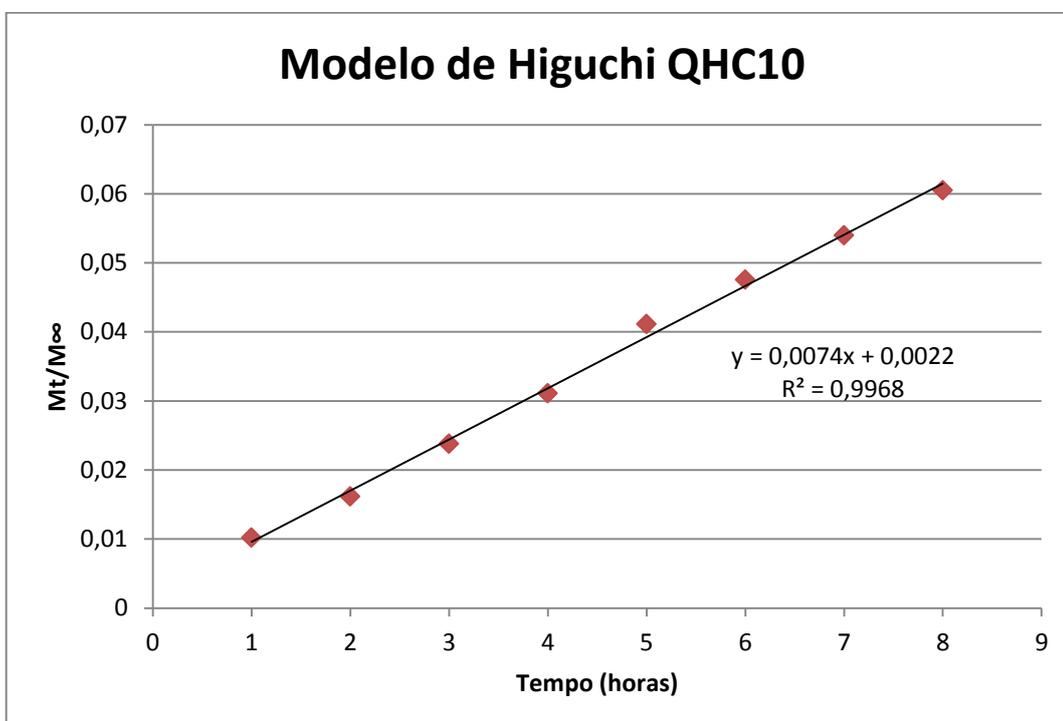


Figura A6- Modelo de Higuchi QHC10.

Modelo de Peppas

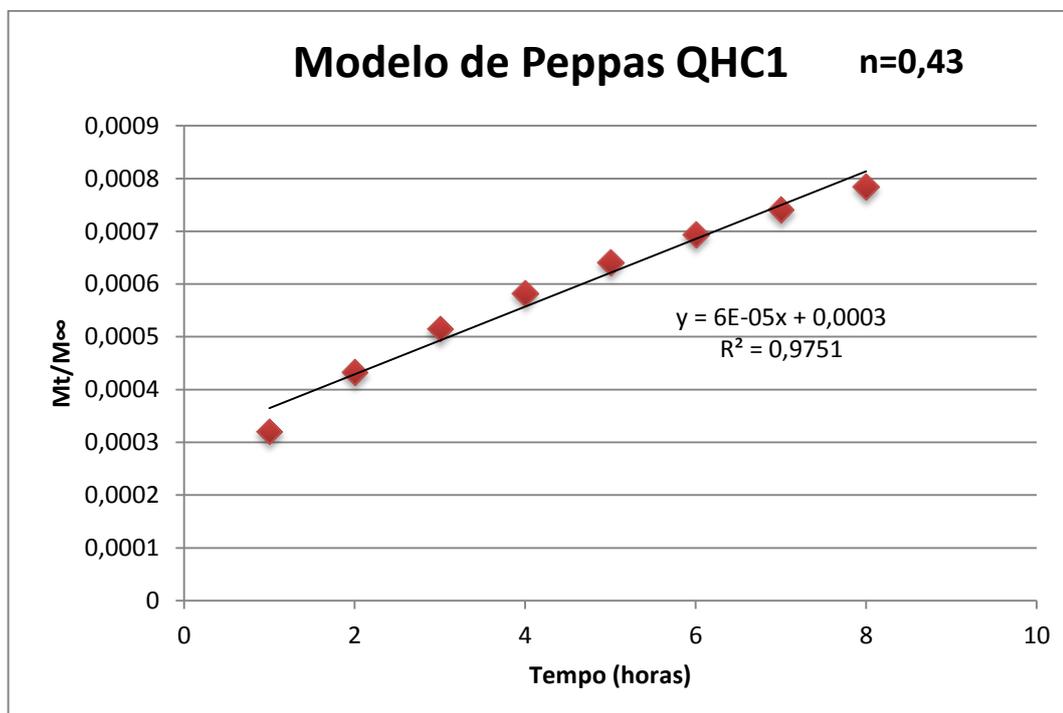


Figura A7- Modelo de Peppas ($n=0,43$) QHC1.

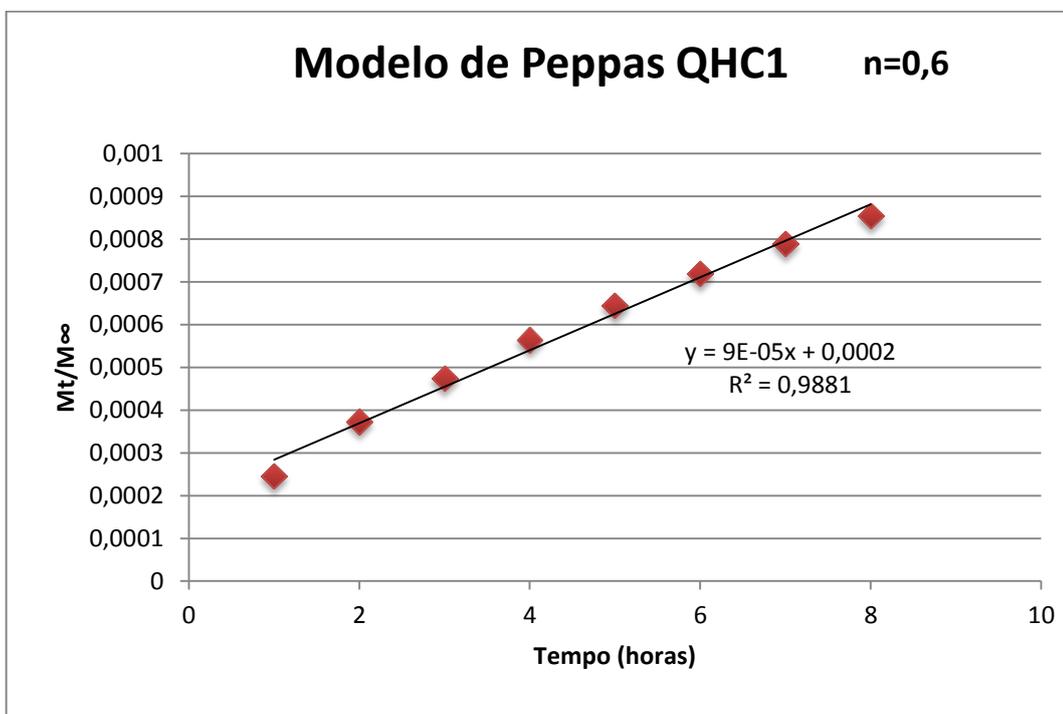


Figura A8- Modelo de Peppas ($n=0,6$) QHC1.

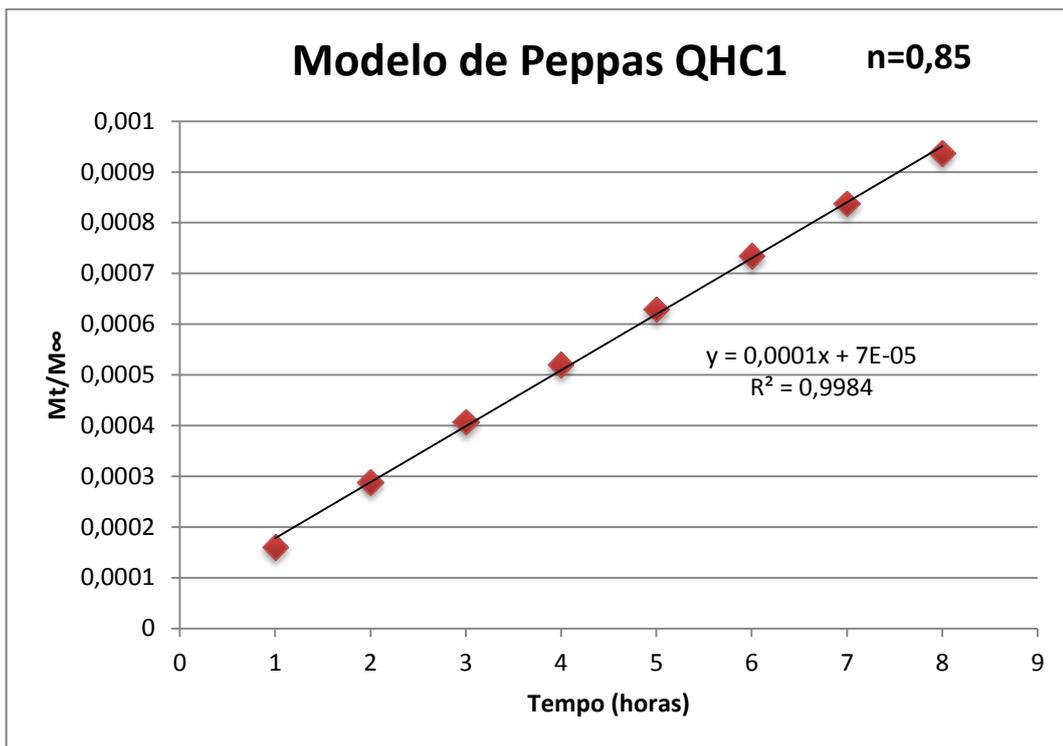


Figura A9- Modelo de Peppas (n=0,85) QHC1.

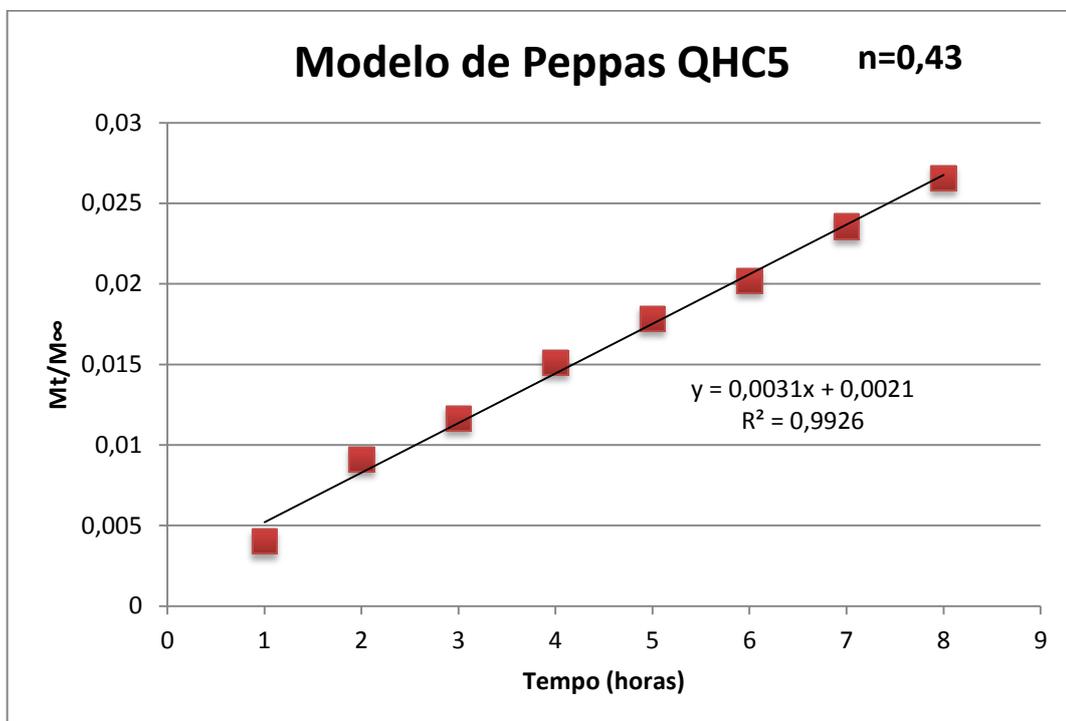
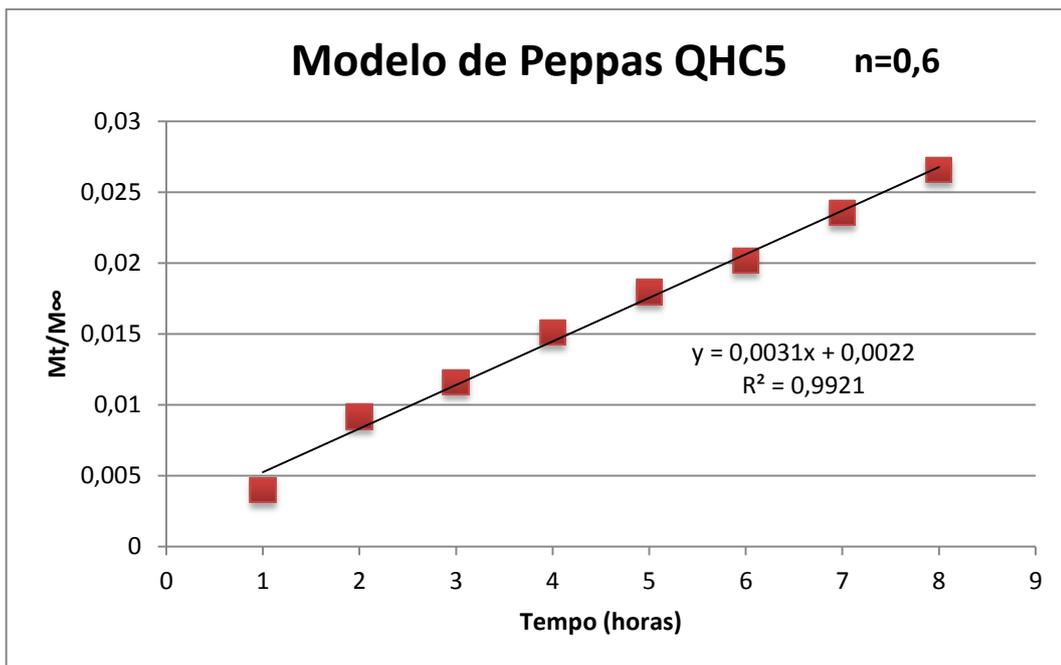
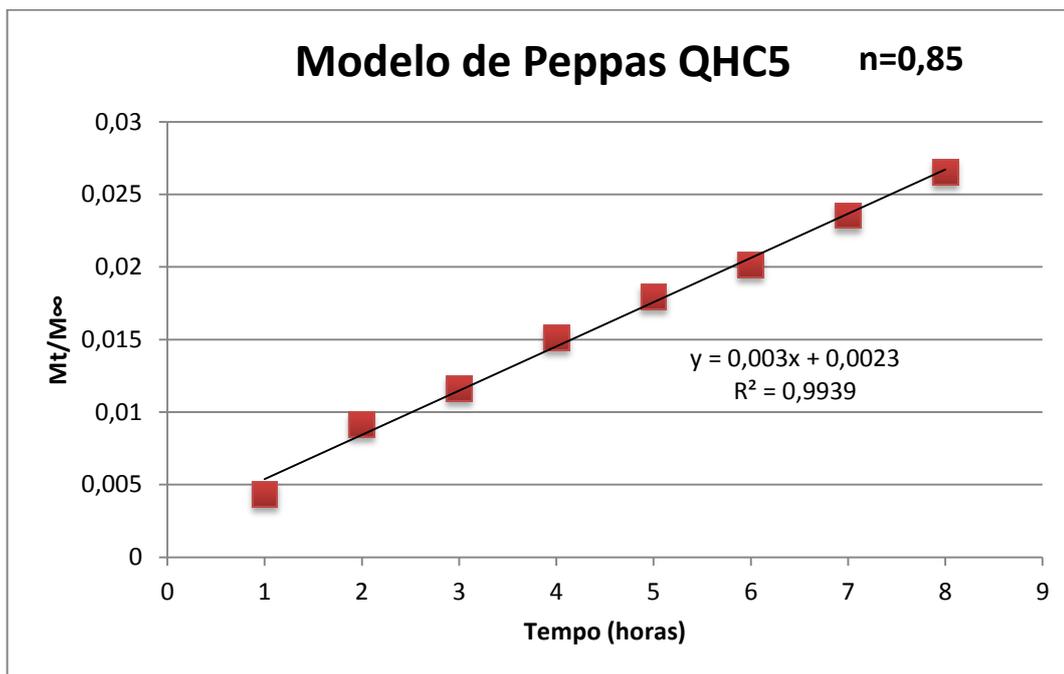


Figura A10- Modelo de Peppas (n=0,43) QHC5.

Figura A11- Modelo de Peppas ($n=0,6$) QHC5.Figura A12- Modelo de Peppas ($n=0,85$) QHC5.

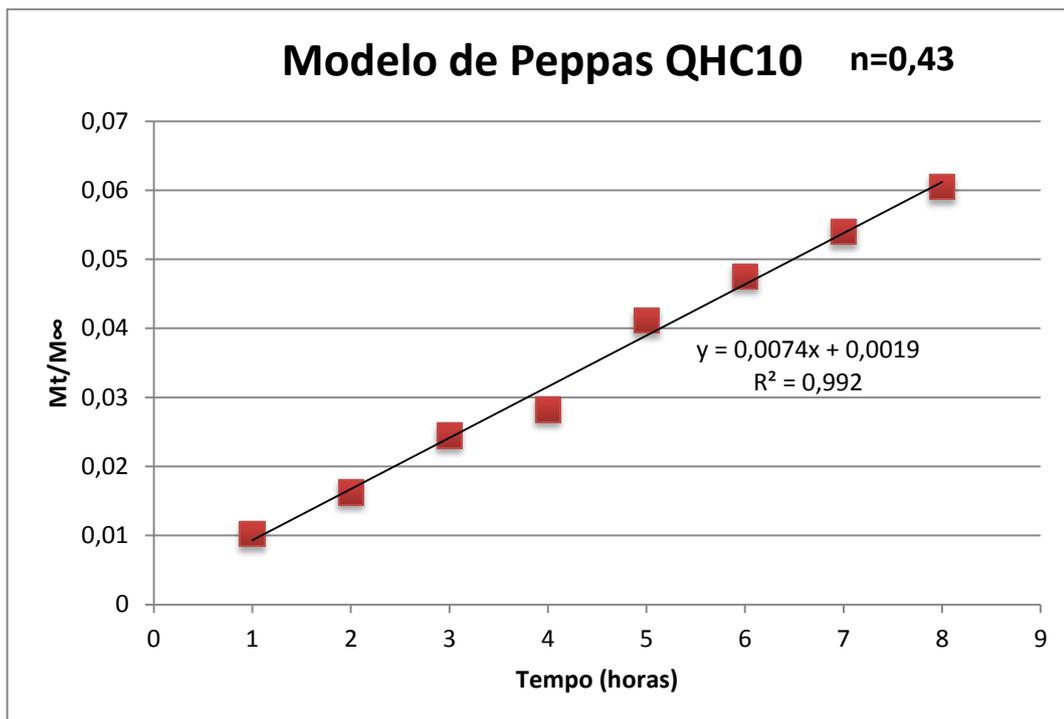


Figura A13- Modelo de Peppas (n=0,43) QHC10.

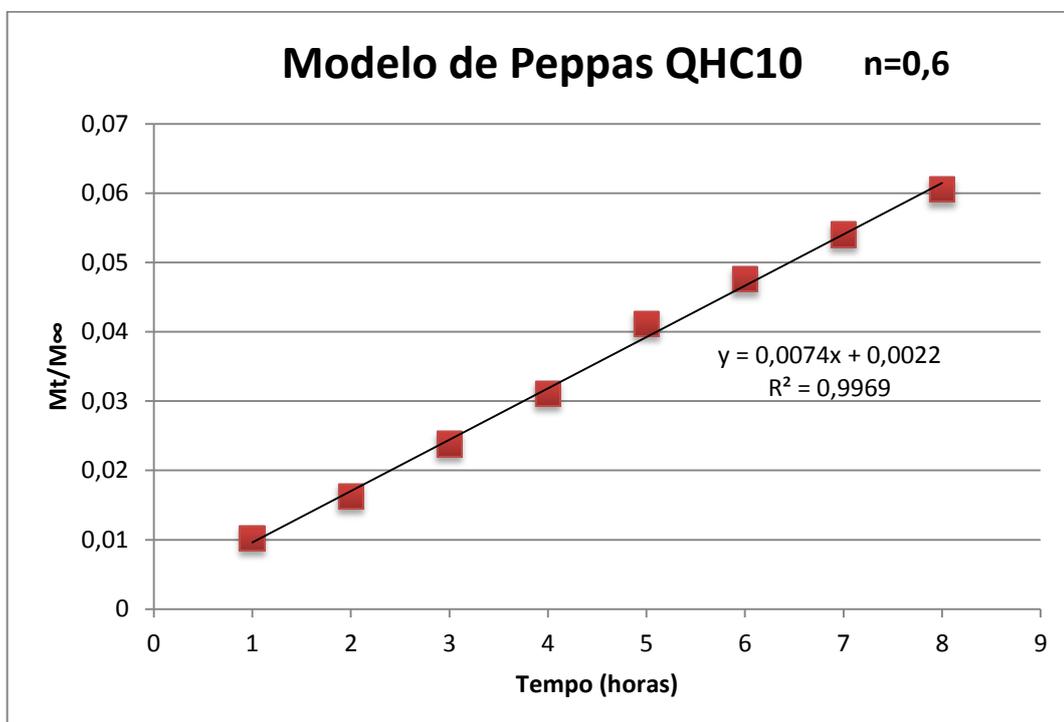


Figura A13- Modelo de Peppas (n=0,6) QHC10.

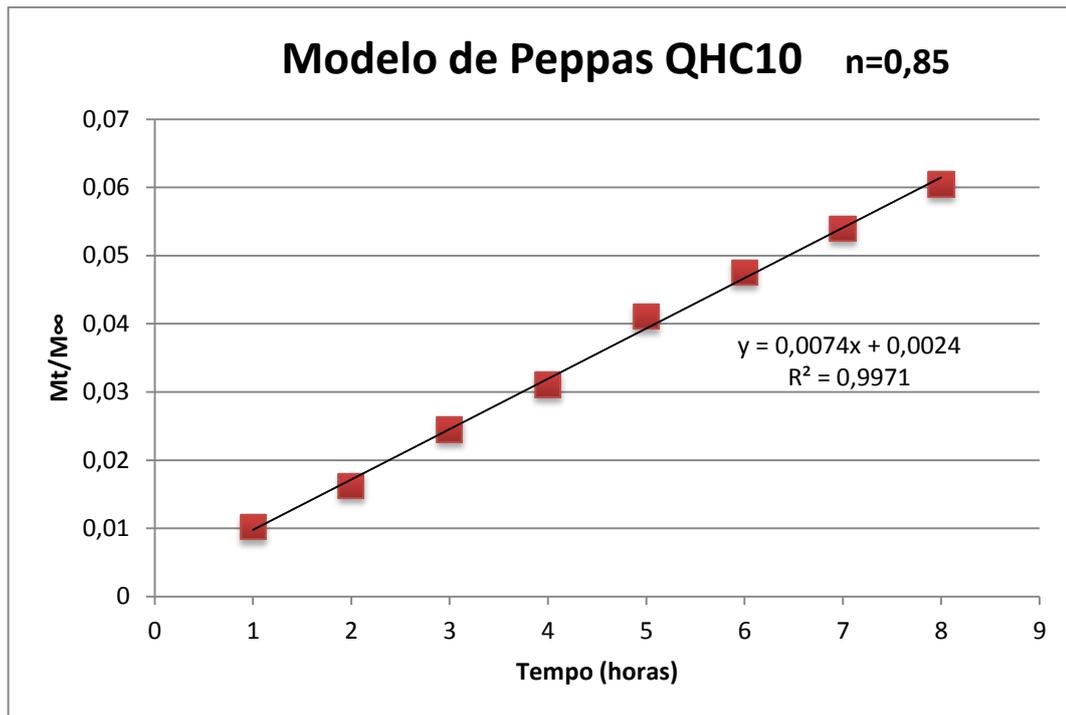


Figura A13- Modelo de Peppas (n=0,85) QHC10.

APÊNDICE B

Modelos de liberação controlada de fármacos conforme discutido na seção 6.3.7.4. que reporta a análise dos modelos matemáticos para os mecanismos de liberação da dexametasona nos arcabouços.

Modelo cinética de Ordem Zero

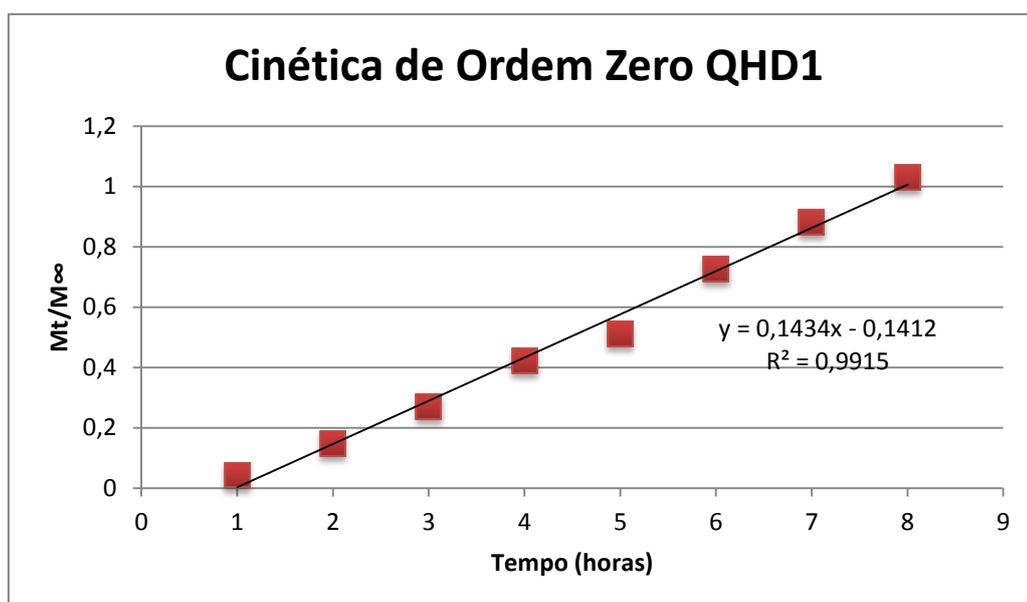


Figura B1- Cinética de Ordem Zero QHD1

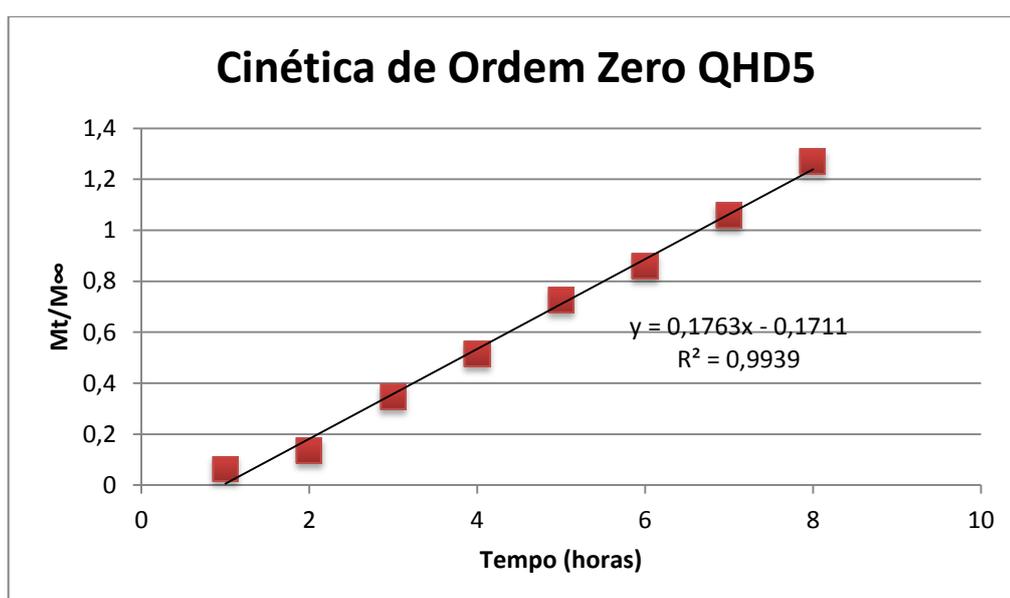


Figura B2- Cinética de Ordem Zero QHD5.

Modelo de Higuchi

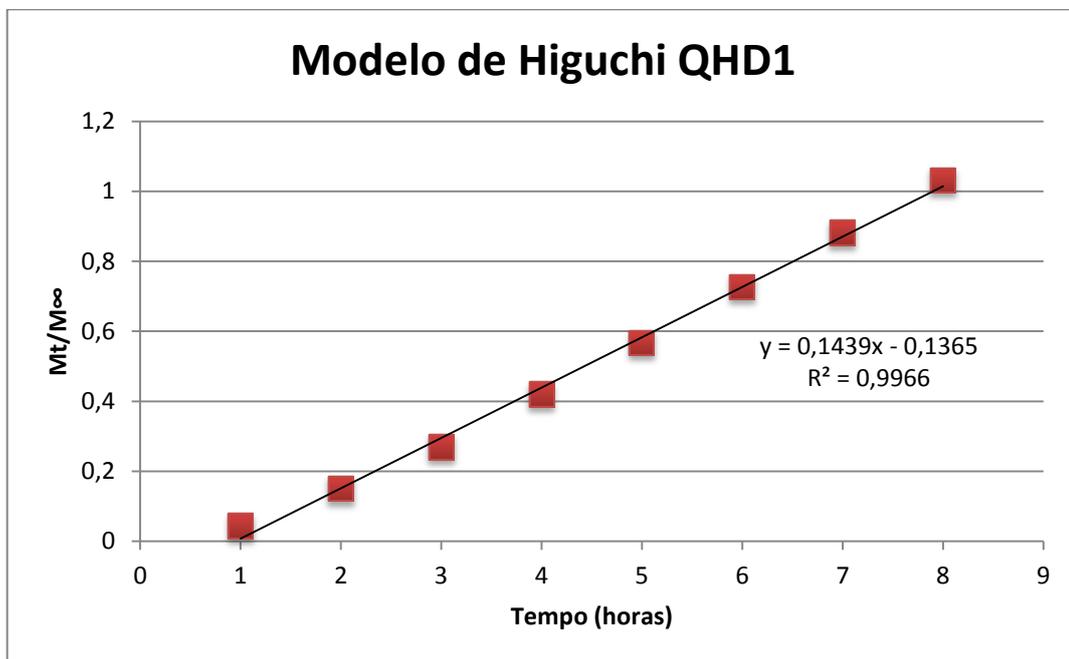


Figura B3- Modelo de Higuchi QHD1

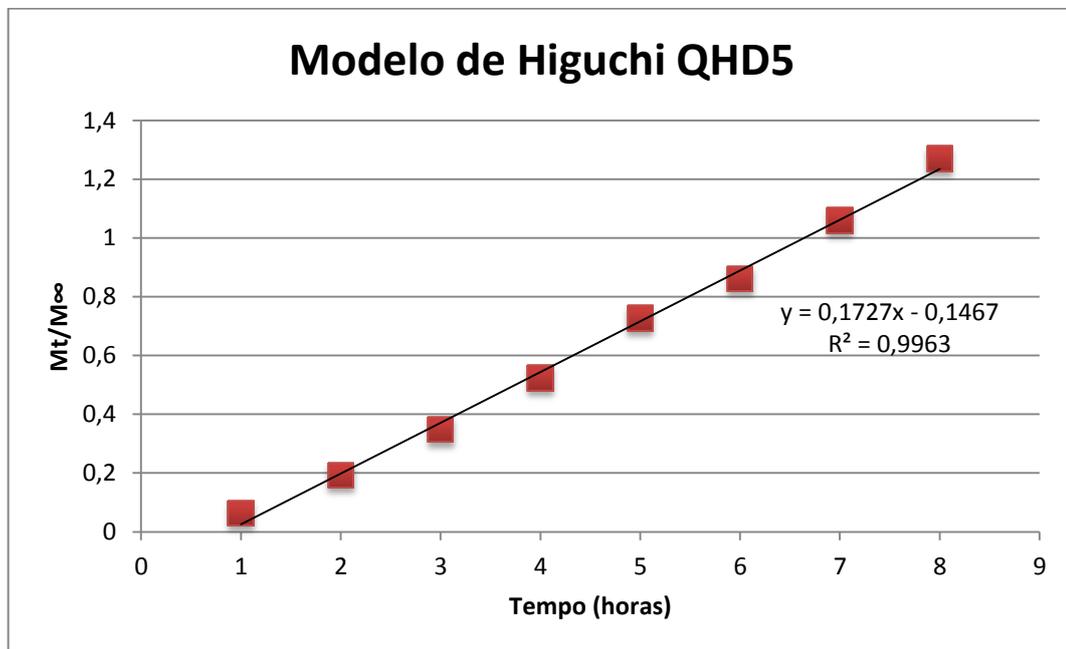
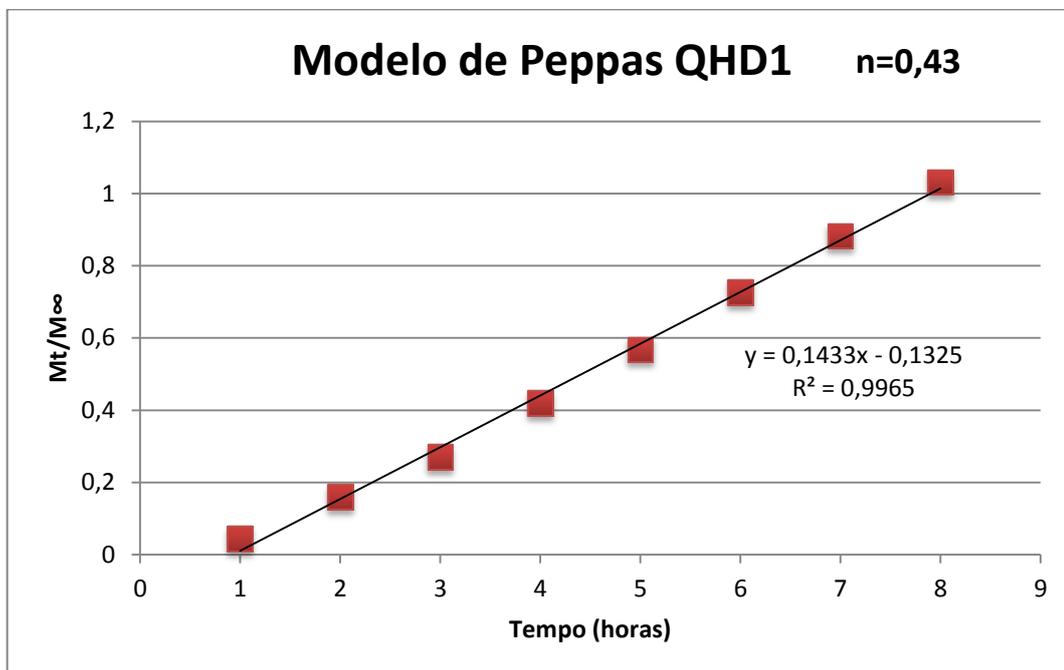
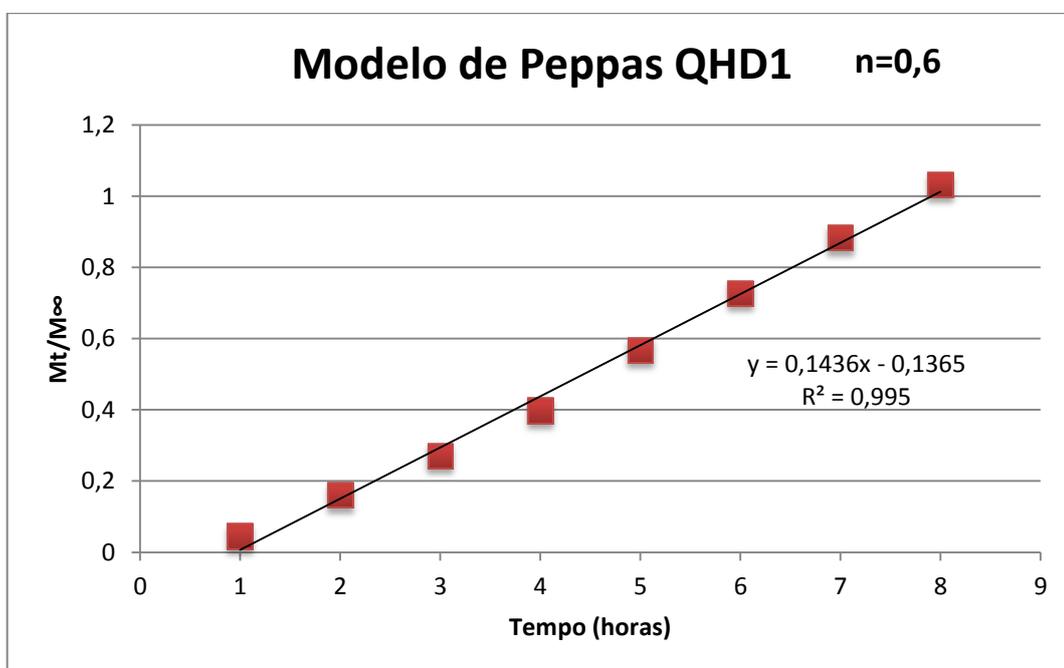
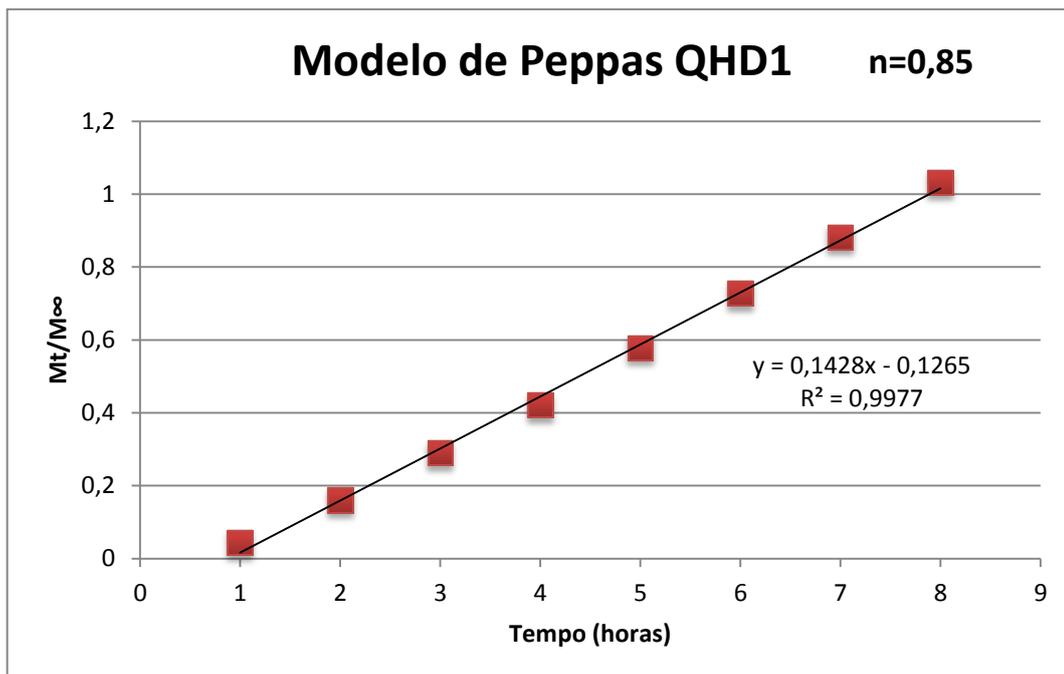
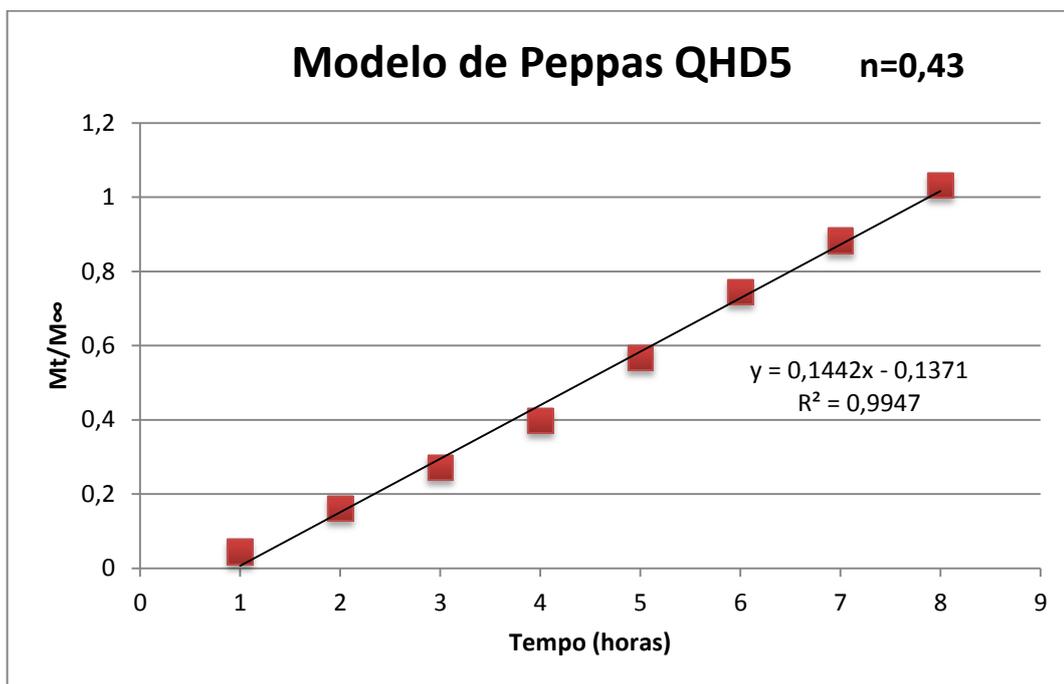
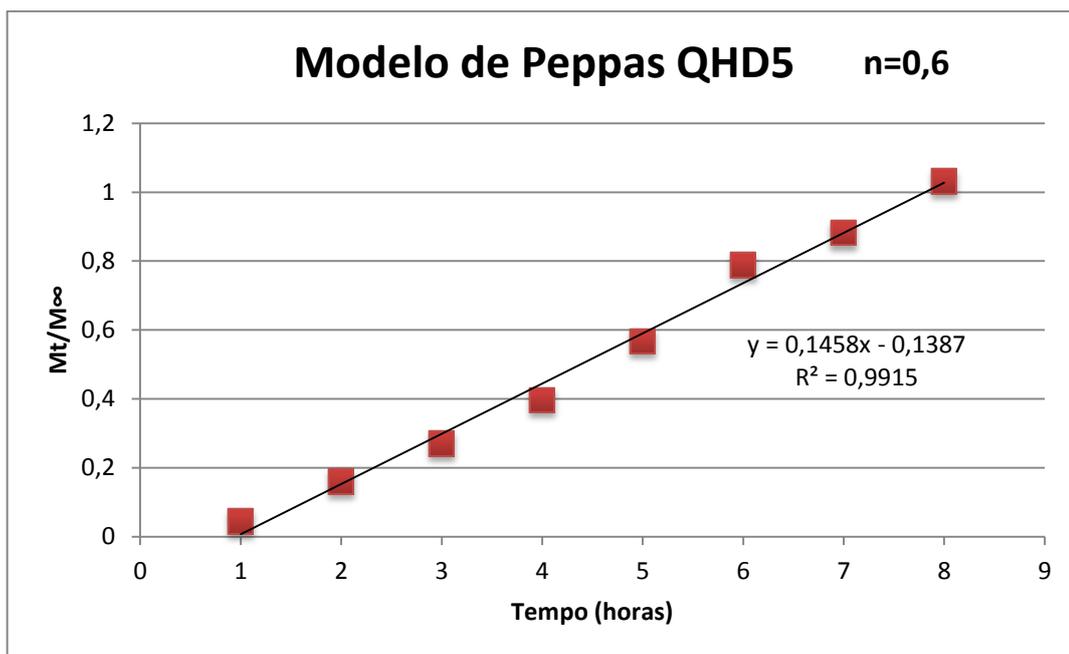
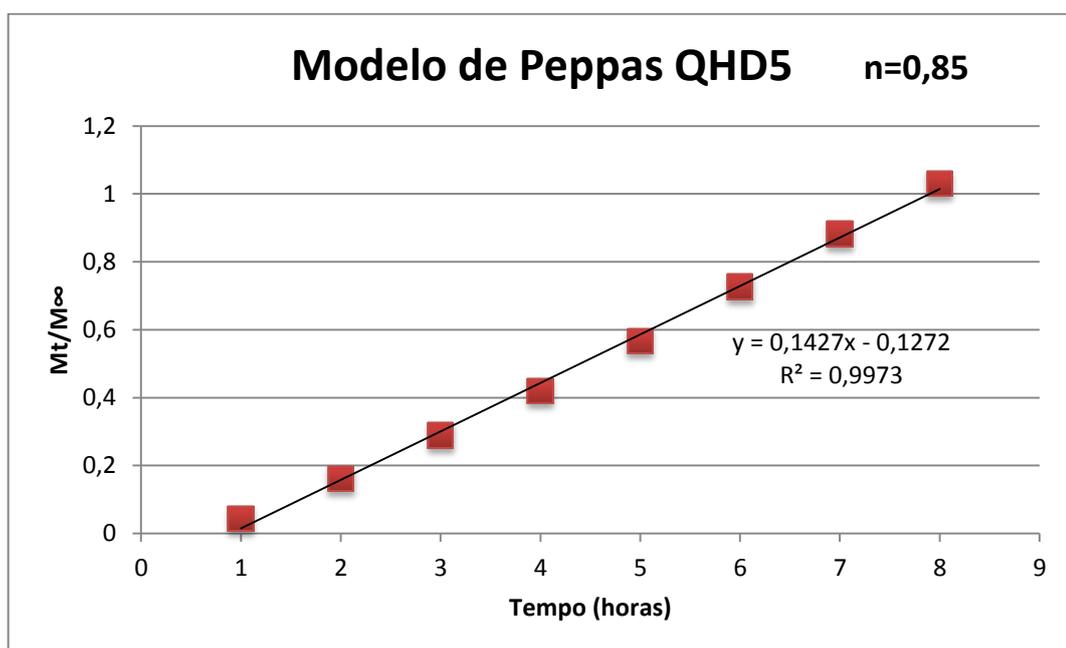


Figura B4- Modelo de Higuchi QHD5

Modelo de PeppasFigura B5- Modelo de Peppas ($n=0,43$) QHD1.Figura B6- Modelo de Peppas ($n=0,6$) QHD1.

Figura B7- Modelo de Peppas ($n=0,85$) QHD1.Figura B8- Modelo de Peppas ($n=0,43$) QHD5.

Figura B9- Modelo de Peppas ($n=0,6$) QHD5.Figura B10- Modelo de Peppas ($n=0,85$) QHD5.