

**KATIÚSCIA VIEIRA JARDIM**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA / SULFATO  
DE CONDROITINA PARA NANOENCAPSULAÇÃO DA CURCUMINA  
VISANDO SUA LIBERAÇÃO CONTROLADA E AVALIAÇÃO DE SUA  
ATIVIDADE ANTITUMORAL**

**Brasília – DF  
2013**

Universidade de Brasília  
Faculdade UnB – Planaltina  
Pós-Graduação em Ciências dos Materiais

**KATIÚSCIA VIEIRA JARDIM**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA / SULFATO  
DE CONDROITINA PARA NANOENCAPSULAÇÃO DA CURCUMINA  
VISANDO SUA LIBERAÇÃO CONTROLADA E AVALIAÇÃO DE SUA  
ATIVIDADE ANTITUMORAL**

Dissertação apresentada como requisito para a  
obtenção do Título de Mestre em Ciências de  
Materiais pelo Programa de Pós-Graduação em  
Ciências de Materiais da Universidade de Brasília  
– Faculdade UnB - Planaltina

**Orientador: Prof. Dr. Alexandre Luis Parize**

**Brasília – DF  
2013**

**KATIÚSCIA VIEIRA JARDIM**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA /  
SULFATO DE CONDROITINA PARA NANOENCAPSULAÇÃO DA  
CURCUMINA VISANDO SUA LIBERAÇÃO CONTROLADA E  
AVALIAÇÃO DE SUA ATIVIDADE ANTITUMORAL**

Dissertação apresentada como requisito para a  
obtenção do Título de Mestre em Ciências de  
Materiais pelo Programa de Pós-Graduação em  
Ciências de Materiais da Universidade de Brasília  
– Faculdade UnB - Planaltina

**Aprovada em: 21/05/2013**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Alexandre Luis Parize – Presidente**  
Universidade de Brasília

---

**Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa**  
Universidade de Brasília

---

**Prof. Dr. Alex Fabiano Cortez Campos**  
Universidade de Brasília

*Aos meus pais Maria Mônica e José Alberto, aos meus irmãos, cunhados e amigos, pelo incentivo constante, compreensão e apoio incondicional a mim sempre dedicados.*

## AGRADECIMENTO

A Deus, por me dar as condições físicas, emocionais e espirituais para realização deste trabalho.

Aos meus pais, pela educação, ensinamentos, incentivo e amor que a mim foram dados durante toda a vida.

Aos meus irmãos e cunhados, pela amizade, apoio e cumplicidade que nos une.

Aos meus amigos e familiares, em especial a Mariana Lima, Vera, Izabela, Núbia, Gabriel, Cássia, Katiana e Adriana, pelo incentivo, credibilidade, colaboração, apoio e amizade.

Aos colegas de trabalho, pela compreensão, apoio e estímulo.

Aos colegas de curso, pela agradável convivência e troca de experiências ao longo do curso.

Aos Mestres, pelo aprendizado.

Aos professores da banca, pela participação e colaboração.

A Universidade de Brasília – Campus Planaltina, pela oportunidade.

Ao técnico Marcos Sodré do Laboratório de Alimentos da Universidade Católica de Brasília, pelo apoio, amizade e auxílio na preparação das amostras.

A Universidade de Brasília – Campus Ceilândia, em especial aos técnicos Diego Dias, Hugo e Sr. Teles e aos professores Dr. Marcelo Henrique, Dr. Paulo Barboni, e Dr. Juliano Chaker, pela colaboração e apoio.

Ao técnico Arilson Lehmkuhl da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de Brasília, pelo incentivo, amizade e colaboração com as análises de espectroscopia de infravermelho e ultravioleta-visível.

Ao professor Dr. Joel C. Rubim e ao seu aluno Anderson Medeiros do Laboratório de Materiais e Combustíveis do Instituto de Química da Universidade de Brasília, pela colaboração e apoio com as análises térmicas.

A professora Dra. Sônia Bao e suas alunas Ludmilla, Ingrid, Márcia e Mariana do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, pela colaboração, disponibilidade e auxílio nas análises de microscopia eletrônica de transmissão.

Aos professores Dra. Graziella Anselmo Joanitti e Dr. Ricardo Bentes de Azevedo do Laboratório de Nanociência e Nanotecnologia do Instituto de Biologia da

Universidade de Brasília, pela disponibilidade, colaboração, apoio, dedicação e supervisão durante os testes de viabilidade celular.

A Tatiane Oliveira do Laboratório de Microscopia de Alta Resolução do Instituto de Física da Universidade Federal do Goiás, pela colaboração, paciência e dedicação durante as análises de microscopia.

Agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

E finalmente deixo aqui a minha admiração e imensa gratidão ao meu orientador Dr. Alexandre Luís Parize, pela oportunidade de trabalhar com ele, pelo apoio, compreensão, estímulo e orientação constante, paciência, ensinamentos, amizade, conselhos e pelo excelente convívio. Obrigada Alexandre por acreditar em mim! Sua confiança, incentivo, esforço e dedicação foram fundamentais para conclusão deste trabalho.

## RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar a utilização da técnica de gelatinização iônica no desenvolvimento de nanopartículas poliméricas constituídas dos biopolímeros quitosana e sulfato de condroitina, avaliando este sistema como nanocarreador da curcumina, verificando o comportamento de liberação da curcumina associada às nanopartículas em soluções fisiológicas simuladas com o intuito de melhorar a viabilidade celular no tratamento de câncer. O método de gelatinização iônica consistiu em uma técnica simples, rápida, reprodutível e eficaz, possibilitando a obtenção de nanopartículas com baixo índice de polidispersão ( $0,151 \pm 0,03$  a  $0,563 \pm 0,07$ ), diâmetro na faixa de  $175,7 \pm 2,5$  a  $710,2 \pm 8,9$  nm e com um potencial zeta positivo com valor em módulo relativamente alto, o que favorece a interação com a membrana celular e junções da pele carregadas negativamente. No entanto, observou-se que estas características foram influenciadas diretamente pelo pH, pela concentração da solução de quitosana e pelo volume de sulfato de condroitina adicionado no preparo das nanopartículas. As nanopartículas apresentaram relativa estabilidade físico-química nas diferentes temperaturas de acondicionamento ( $-2^{\circ}\text{C}$  e  $25^{\circ}\text{C}$ ) durante o período de 120 horas e maior estabilidade térmica quando comparada aos seus respectivos constituintes. Observou-se ainda a formação de nanopartículas esféricas, compacta e com morfologia heterogênea, que de forma eficiente conseguem associar a curcumina. A taxa de associação da curcumina às nanopartículas variou de  $62,3 \pm 0,21\%$  a  $68,5 \pm 0,18\%$ , sendo esta dependente do pH da solução da quitosana. A liberação da curcumina por meio das nanopartículas ocorreu de forma lenta e gradual, via mecanismo de difusão, observando-se uma liberação do corante mais acelerada quando a liberação foi conduzida em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 6,8. Embora a curcumina na forma livre tenha demonstrado maior eficiência citotóxica que associada as nanopartículas, pôde-se observar por meio da avaliação citotóxica *in vitro* utilizando a linhagem de célula tumoral humana de pulmão (A549), que as nanopartículas e seus respectivos constituintes não são tóxicos para a célula e que o sistema apresentou boa estabilidade físico-química sob condições fisiológicas, o que indica a possível aplicabilidade deste material nanoestruturado como sistema de liberação controlada de fármacos.

**Palavras chave:** Gelatinização iônica, nanopartículas, quitosana, sulfato de condroitina, curcumina e liberação controlada.

## ABSTRACT

This study had like objective to evaluate the use of ionic gelation technique in the development of polymeric nanoparticles composed of biopolymers chitosan and chondroitin sulfate, evaluating this system as curcumin nanocarrier, checking the behavior associated with the release of curcumin nanoparticles in simulated physiological solutions with In order to improve cell viability in cancer treatment. The ionic gelation method consisted of a simple, fast, reproducible and effective, allowing the obtaining of nanoparticles with low polydispersity index ( $0.151 \pm 0.03$  to  $0.563 \pm 0.07$ ), diameter in the range of  $175.7 \pm 2.5$  to  $710.2 \pm 8.9$  nm and a positive zeta potential in absolute value with relatively high, it favors the interaction with the cell membrane and joins the skin negatively charged. However, it was observed that these characteristics directly influenced by the pH, the concentration of the chitosan solution and the volume of chondroitin sulphate added in the preparation of nanoparticles. The nanoparticles present on physical and chemical stability at different packaging temperatures ( $-2^{\circ}\text{C}$  and  $25^{\circ}\text{C}$ ) during the period of 120 hours and had higher thermal stability compared to their respective constituents. We also observed the formation of spherical nanoparticles, compact and heterogeneous morphology, which can efficiently associate curcumin. The rate of association of curcumin into the nanoparticles ranged from  $62.3 \pm 0.21\%$  a  $68.5 \pm 0.18\%$ , this rate dependent on the pH of the chitosan solution. The release of curcumin through nanoparticles occurred slowly and gradually, via diffusion mechanism, observing a faster release of the colorant when the release was conducted in a solution of  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  at pH 6.8. Although curcumin in its free form has demonstrated a greater efficiency of cytotoxic compared to its form associated nanoparticles, could be observed through cytotoxicity evaluation in vitro using the lineage of human lung tumor cell (A549), that the nanoparticles and their constituents are not toxic to the cell and the system showed good physical and chemical stability at physiological conditions, which indicates the possible applicability of this nanostructured material as a system of controlled drug release.

**Keywords:** Ionic gelation, nanoparticles, chitosan, chondroitin sulfate, curcumin and controlled release.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| ÍNDICE DE FIGURAS .....   | 10 |
| ÍNDICE DE TABELAS .....   | 13 |
| ÍNDICE DE EQUAÇÕES .....  | 15 |
| LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLO E ABREVIATURAS .....   | 16 |
| <br>  |    |
| 1. INTRODUÇÃO.....  | 17 |
| <br>  |    |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....   | 19 |
| 2.1. Materiais nanoestruturados.....  | 19 |
| 2.2. Nanopartículas poliméricas .....   | 19 |
| 2.2.1. Produção de nanopartículas poliméricas .....   | 21 |
| 2.3. Biopolímeros .....   | 23 |
| 2.3.1. Quitosana.....   | 24 |
| 2.3.2. Sulfato de condroitina.....  | 28 |
| 2.4. Curcumina .....  | 29 |
| 2.5. Liberação controlada de fármacos.....  | 34 |
| <br>  |    |
| 3. OBJETIVOS.....   | 39 |
| 3.1. Objetivo Geral .....   | 39 |
| 3.2. Objetivos Específicos .....  | 39 |
| <br>  |    |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS.....   | 41 |
| 4.1. Materiais .....  | 41 |
| 4.2. Método.....  | 41 |
| 4.2.1. Determinação do grau de desacetilação da quitosana (%GD).....                                | 41 |
| 4.2.2. Espectroscopia de absorção molecular UV-Vis para a curcumina.....                            | 42 |
| 4.2.3. Curva padrão de calibração da curcumina.....   | 42 |
| 4.2.4. Delineamento experimental para síntese das nanopartículas .....                              | 42 |
| 4.2.5. Preparação das Nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina.....                     | 44 |
| 4.2.6. Preparação das Nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina contendo curcumina ..... | 45 |
| 4.2.7. Caracterização das nanopartículas.....   | 46 |
| 4.2.7.1. Estabilidade físico-química das nanopartículas em suspensão .....                          | 47 |
| 4.2.7.2. Avaliação morfológica das nanopartículas.....  | 47 |
| 4.2.7.3. Taxa de associação da curcumina às nanopartículas .....                                    | 47 |
| 4.2.7.4. Espectroscopia de infravermelho (FTIR) .....   | 48 |
| 4.2.7.5. Análise Termogravimétrica (TGA) .....  | 48 |
| 4.2.7.6. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) .....  | 49 |
| 4.2.7.7. Perfil de liberação da curcumina .....   | 49 |
| 4.2.8. Avaliação da atividade citotóxica <i>in vitro</i> da curcumina livre e nanoencapsulada.....  | 50 |
| 4.2.8.1. Manutenção das células .....   | 50 |
| 4.2.8.2. Contagem celular.....  | 51 |
| 4.2.8.3. Ensaio de viabilidade celular.....   | 52 |
| <br>  |    |
| 5. RESULTADO E DISCUSSÃO.....   | 54 |
| 5.1. Determinação do grau de desacetilação da quitosana (%GD).....                                  | 54 |
| 5.2. Espectroscopia de absorção molecular UV-Vis para a curcumina.....                              | 55 |

|  |     |
|--|-----|
| 5.3. Curva padrão de calibração da curcumina.....  | 56  |
| 5.4. Diâmetro, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas.....  | 57  |
| 5.4.1. Influência do pH da solução de quitosana nas características das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina.....                    | 58  |
| 5.4.2. Influência da concentração da solução de quitosana nas características das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina.....          | 60  |
| 5.4.3. Influência do volume de sulfato de condroitina nas características das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina.....              | 62  |
| 5.4.4. Influência do pH da solução de quitosana nas características das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina contendo curcumina..... | 63  |
| 5.5. Preparação das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina e quitosana / sulfato de condroitina contendo curcumina.....                | 65  |
| 5.6. Caracterização das nanopartículas.....  | 67  |
| 5.6.1. Estabilidade físico-química das nanopartículas em suspensão.....  | 67  |
| 5.6.2. Avaliação morfológica das nanopartículas.....   | 71  |
| 5.6.3. Taxa de associação da curcumina às nanopartículas.....  | 75  |
| 5.6.4. Espectroscopia de infravermelho (FTIR).....   | 77  |
| 5.6.5. Análise Termogravimétrica (TGA).....  | 79  |
| 5.6.6. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....  | 82  |
| 5.6.7. Perfil de liberação da curcumina.....   | 84  |
| 5.7. Avaliação da atividade citotóxica <i>in vitro</i> da curcumina livre e associada às nanopartículas.....   | 89  |
| <br>   |     |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....  | 97  |
| <br>   |     |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 100 |
| <br>   |     |
| 8. ANEXO.....  | 116 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas. Ativo dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas (a); ativo adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas (b); ativo retido na matriz polimérica das nanoesferas (c); ativo adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas (d) ..... | 20 |
| <b>Figura 2</b> - Esquema representativo da preparação de nanopartículas pelo método de gelatinização iônica .....  | 22 |
| <b>Figura 3</b> - Conversão Quitina em Quitosana via reação de desacetilação.....   | 25 |
| <b>Figura 4</b> - Estrutura da unidade repetitiva do sulfato de condroitina .....   | 28 |
| <b>Figura 5</b> - <i>Curcuma longa L.</i> .....   | 30 |
| <b>Figura 6</b> - Estrutura química de curcuminoides extraídos de <i>Curcuma longa L.</i> Curcumina (a); Demetoxicurmina (b) e; Bisdemetoxicurcumina (c).....   | 31 |
| <b>Figura 7</b> - Perfil de liberação de fármacos convencional e controlada em função do tempo.....   | 35 |
| <b>Figura 8</b> - Métodos de liberação de fármacos a partir de nanopartículas .....   | 38 |
| <b>Figura 9</b> - Preparação de nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina através da técnica de gelatinização iônica .....   | 45 |
| <b>Figura 10</b> - Preparação de nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina contendo curcumina através da técnica de gelatinização iônica.. .....   | 46 |
| <b>Figura 11</b> - Espectro de infravermelho (FTIR) da quitosana.. .....  | 54 |
| <b>Figura 12</b> - Espectro de absorção molecular UV-vis para a curcumina .....   | 55 |
| <b>Figura 13</b> - Curva padrão de calibração da curcumina nas soluções de HCl 0,1 mol.L <sup>-1</sup> em pH 1,2, CH <sub>3</sub> COOH 0,1 mol.L <sup>-1</sup> em pH 4,0 e H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 mol.L <sup>-1</sup> pH 6,8.. .....  | 57 |
| <b>Figura 14</b> - Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina em função da variação do pH da solução de quitosana.. .....   | 59 |
| <b>Figura 15</b> - Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina em função da variação da concentração de quitosana. ....  | 61 |
| <b>Figura 16</b> - Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina em função da variação do volume de sulfato de condroitina.....  | 62 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 17</b> - Características das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina puras e contendo curcumina em função da variação do pH da solução de quitosana: Diâmetro hidrodinâmico (a) e potencial zeta (b)..... | 64 |
| <b>Figura 18</b> - Formação de nanopartículas quitosana / sulfato de condroitina através do método de gelatinização iônica.....  | 65 |
| <b>Figura 19</b> - Formação de nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina contendo curcumina através do método de gelatinização iônica. ....   | 66 |
| <b>Figura 20</b> - Microscopia eletrônica de transmissão da nanopartícula de QTS/SC com solução de quitosana em pH 4,0 (escala = 100 nm).. ....  | 72 |
| <b>Figura 21</b> - Microscopia eletrônica de transmissão da nanopartícula de QTS/SC com solução de quitosana em pH 5,0 (escala = 100 nm)... ..   | 72 |
| <b>Figura 22</b> - Microscopia eletrônica de transmissão da nanopartícula de QTS/SC com solução de quitosana em pH 6,0 (escala = 100 nm).. ....  | 72 |
| <b>Figura 23</b> - Microscopia eletrônica de transmissão da nanopartícula de QTS/SC contendo curcumina com solução de quitosana em pH 4,0 (escala = 100 nm).....   | 73 |
| <b>Figura 24</b> - Microscopia eletrônica de transmissão da nanopartícula de QTS/SC contendo curcumina com solução de quitosana em pH 5,0 (escala = 100 nm).....   | 73 |
| <b>Figura 25</b> - Microscopia eletrônica de transmissão da nanopartícula de QTS/SC contendo curcumina com solução de quitosana em pH 6,0 (escala = 100 nm).....   | 74 |
| <b>Figura 26</b> - Espectro de FTIR da quitosana (a); sulfato de condroitina (b); NPs de QTS/SC (c); NPs de QTS/SC contendo curcumina (d); curcumina (e).....  | 77 |
| <b>Figura 27</b> - Análise termogravimétrica das NPs de QTS/SC, NPs de QTS/SC contendo curcumina e seus respectivos constituintes.....   | 80 |
| <b>Figura 28</b> - Análise de DSC para quitosana (a); sulfato de condroitina (b); NPs de QT/SC pura (c); NPs de QT/SC contendo curcumina (d); curcumina (e).....   | 82 |
| <b>Figura 29</b> - Perfil de liberação para a curcumina em solução de HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> em pH 1,2 associada às NPs de QTS/SC preparadas em solução de QTS em pH 4,0; 5,0 e 6,0. ....                                   | 85 |
| <b>Figura 30</b> - Perfil de liberação para curcumina em solução de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 mol L <sup>-1</sup> em pH 6,8 associada às NPs de QTS/SC preparadas em solução de QTS em pH 4,0; 5,0 e 6,0. ....          | 86 |
| <b>Figura 31</b> - Processo de liberação da curcumina através das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina.. ....  | 87 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 32</b> - Comportamento da rede polimérica formada por QT/SC, quando essa é intumescida em meios com diferentes valores de pH.....   | 88 |
| <b>Figura 33</b> - Formação do Formazan pela quebra do MTT originado pela desidrogenase mitocondrial presente nas células vivas e caracterizado pela absorção em 595 nm.....  | 90 |
| <b>Figura 34</b> - Ensaio de viabilidade celular empregando-se NPs de QTS/SC puras e controles (sulfato de condroitina, solução de ácido acético e etanol) nas diferentes concentrações no período de 24 horas..... | 91 |
| <b>Figura 35</b> - Ensaio de viabilidade celular empregando-se curcumina livre e associada às nanopartículas nas diferentes concentrações no período de 24 horas. ....  | 92 |
| <b>Figura 36</b> - Ensaio de viabilidade celular empregando-se NPs de QTS/SC puras e controles (sulfato de condroitina, solução de ácido acético e etanol) nas diferentes concentrações no período de 72 horas..... | 94 |
| <b>Figura 37</b> - Ensaio de viabilidade celular empregando-se curcumina livre e associada às nanopartículas nas diferentes concentrações no período de 72 horas. ....  | 95 |

## ÍNDICE DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> - Melhoria das propriedades da curcumina proporcionada pelo emprego de sistemas de liberação .....  | 33 |
| <b>Tabela 2</b> - Vantagens do sistema de liberação controlada de fármacos .....  | 36 |
| <b>Tabela 3</b> - Condições para preparo das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina.....  | 43 |
| <b>Tabela 4</b> - Condições para preparo das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina contendo curcumina .....  | 43 |
| <b>Tabela 5</b> - Dados referente as curvas padrões de calibração ( $y = a + bx$ ) para determinação da concentração das soluções de curcumina .....  | 57 |
| <b>Tabela 6</b> - Diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial zeta das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina em função da variação do pH da quitosana.....   | 59 |
| <b>Tabela 7</b> - Diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial zeta das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina em função da variação da concentração de quitosana.....   | 61 |
| <b>Tabela 8</b> - Diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial zeta das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina em função da variação do volume de sulfato de condroitina.....  | 63 |
| <b>Tabela 9</b> - Diâmetro hidrodinâmico e PDI das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina puras e contendo curcumina em função da variação do pH da quitosana.....  | 64 |
| <b>Tabela 10</b> - Potencial zeta das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina puras e contendo curcumina em função da variação do pH da quitosana.....   | 64 |
| <b>Tabela 11</b> - Diâmetro hidrodinâmico e PDI das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina preparadas com solução de quitosana em pH 4,0; 5,0 e 6,0 e acondicionadas a temperatura de -2°C e 25°C por um periodo de 120 horas... ..                   | 68 |
| <b>Tabela 12</b> - Diâmetro hidrodinâmico e PDI das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina contendo curcumina preparadas com solução de quitosana em pH 4,0; 5,0 e 6,0 e acondicionadas a temperatura de -2°C e 25°C por um periodo de 120 horas..... | 69 |
| <b>Tabela 13</b> - Potencial zeta das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina puras e contendo curcumina preparadas com solução de quitosana em pH 4,0; 5,0 e 6,0 e acondicionadas a temperatura de -2°C e 25°C por um periodo de 120 horas.....       | 70 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 14</b> - Taxa de associação da curcumina às nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina.....  | 75 |
| <b>Tabela 15</b> - Dados termogravimétricos obtidos a partir da TGA para as NPs de QTS/SC, NPs de QTS/SC contendo curcumina e seus respectivos constituintes.....  | 79 |
| <b>Tabela 16</b> - Viabilidade celular para a linhagem celular A549 nas diferentes concentrações das NPs QTS/SC puras e dos controles (sulfato de condroitina, solução de ácido acético e etanol) no período de 24 horas.....    | 91 |
| <b>Tabela 17</b> - Viabilidade celular para a linhagem celular A549 nas diferentes concentrações da curcumina livre e associada às nanopartículas no período de 24 horas. ....   | 93 |
| <b>Tabela 18</b> - Viabilidade celular para a linhagem celular A549 nas diferentes concentrações das NPs de QTS/SC puras e dos controles (sulfato de condroitina, solução de ácido acético e etanol) no período de 72 horas..... | 94 |
| <b>Tabela 19</b> - Viabilidade celular para a linhagem celular A549 nas diferentes concentrações da curcumina livre e associada às nanopartículas no período de 72 horas .....   | 96 |

## ÍNDICE DE EQUAÇÕES

|   |    |
|---|----|
| <b>Equação 1</b> - Determinação do grau de desacetilação da quitosana (%GD) ..... | 41 |
| <b>Equação 2</b> - Taxa de Associação da curcumina .....                          | 48 |
| <b>Equação 3</b> - Perfil de liberação da curcumina .....                         | 50 |
| <b>Equação 4</b> - Número de célula / mL.....                                     | 51 |
| <b>Equação 5</b> - Volume de suspensão celular em mL / poço.....                  | 52 |
| <b>Equação 6</b> - Células viáveis (%).....                                       | 53 |

**LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURA**

|                        |   |
|------------------------|---|
| A549                   | Linhagem de célula tumoral humana de pulmão.                      |
| DLS                    | Espalhamento de Luz Dinâmico.                                     |
| DMEM                   | Meio Eagle modificado por Dulbecco.                               |
| DMSO                   | Dimetilsulfóxido  |
| DNA                    | Ácido desoxirribonucleico.  |
| DSC                    | Calorimetria Diferencial de Varredura.                            |
| ETDA                   | Ácido etilenodiaminatetraacético sal disódica 2-hidrato.          |
| FTIR                   | Infravermelho com transformada de Fourier.                        |
| GD                     | Grau de desacetilação.  |
| MET                    | Microscopia Eletrônica de Transmissão.                            |
| MTT                    | Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium. |
| NPs                    | Nanopartículas.   |
| PDI                    | Índice de polidispersão.  |
| PEC                    | Complexo polieletrólítico.  |
| pH                     | Potencial de hidrogênio.  |
| pKa                    | Constante de dissociação ácida.                                   |
| %TA                    | Porcentagem de Taxa de Associação                                 |
| %GD                    | Porcentagem de grau de desacetilação.                             |
| QTS                    | Quitosana.  |
| RNA                    | Ácido ribonucleico.   |
| rpm                    | Rotação por minuto.   |
| SC                     | Sulfato de Condroitina.   |
| SLC                    | Sistema de Liberação Controlada                                   |
| T <sub>g</sub>         | Temperatura de Transição Vítrea.                                  |
| TGA                    | Análise Termogravimétrica.  |
| TPP                    | Tripolifosfato de sódio.  |
| UV-vis                 | Ultravioleta na região do visível                                 |
| $\lambda_{\text{máx}}$ | Comprimento de onda máximo de absorção.                           |

## 1. INTRODUÇÃO

O conceito original de nanotecnologia, sugerido pelo físico Richard Feynman em 1959, envolve a manipulação dos átomos como forma de construir novos materiais, ou seja, a nanotecnologia está ligada a manipulação da matéria em escala nanométrica, já que nesta escala os átomos revelam características peculiares (PINA et al., 2006; HAYASHI et al., 2006; HOLAND e al, 2009; SUNDAR et al., 2010).

Desde o advento da nanotecnologia o desenvolvimento de materiais em escala nanométrica tem se tornado cada vez mais popular em vários campos da ciência, uma vez que, as propriedades físicas e químicas destes materiais são de grande importância para aplicações tecnológicas, como por exemplo, na medicina, energia, eletrônica, meio ambiente, indústria alimentícia e indústria automobilística com a utilização de nanopartículas, nanocristais, nanofios, nanofitas, nanotubos e nanocompósitos (FERREIRA et al., 2009; GOMES et al., 2002; GATTI et al., 2002).

Na medicina, a nanotecnologia possibilita uma série de avanços, como no direcionamento e controle de fármacos, técnicas terapêuticas, técnicas de diagnóstico e imagem, técnicas antibacterianas, reparação celular e biomateriais, permitindo uma melhor qualidade de vida (SCHAFFAZICK et al., 2003; ZANELLA et al., 2009).

Em relação ao direcionamento e controle de liberação de fármacos, as nanopartículas, constituídas por biopolímeros, têm atraído atenção dos pesquisadores, já que estes são facilmente encontrados na natureza, são de baixo custo e são biocompatíveis, podendo assim facilitar os processos regenerativos, aumentar a estabilidade do fármaco em fluidos biológicos, reduzir os efeitos colaterais, distribuir o fármaco de forma controlada, proporcionar rotas versáteis de administração, e aumentar a eficiência terapêutica (SCHAFFAZICK et al., 2003; ARAKI, 2007; PIMENTEL et al., 2007; BASTOS, 2007; ORÉFICE, 2011).

Além disso, para serem utilizadas como sistema de liberação controlada de fármacos, as nanopartículas, devem ser preparadas por métodos que permitem o controle de suas características, como: diâmetro, distribuição granulométrica e potencial zeta. Neste contexto, o método de gelatinização iônica tem sido bastante empregado, atualmente, no desenvolvimento de nanopartículas poliméricas, já que é um método simples, rápido, reprodutível, não necessita de equipamentos sofisticados para o preparo das nanopartículas e possibilita a modificação das características das nanopartículas,

com a finalidade de aumentar a associação da substância ativa com a nanopartícula (SCHAFFAZICK et al., 2003; REIS et al., 2006. TAGLIARI et al., 2012).

Dessa forma, o presente estudo propõe a avaliação da utilização da técnica de gelatinização iônica no desenvolvimento de nanopartículas poliméricas constituídas dos biopolímeros quitosana e sulfato de condroitina, avaliando este sistema como nanocarreador de substâncias hidrofóbicas, como a curcumina, verificando o comportamento de liberação da curcumina, associada às nanopartículas, em soluções fisiológicas simuladas com o intuito de melhorar a viabilidade celular no tratamento de câncer.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Materiais nanoestruturados**

Materiais nanoestruturados são aqueles que apresentam, pelo menos em uma dimensão, o tamanho na ordem de nanômetros, sendo estruturalmente caracterizados por uma grande fração volumétrica de contornos de grãos ou interfaces, as quais podem alterar, de forma significativa, uma variedade de propriedades físicas e químicas quando comparados aos materiais cristalinos convencionais. Essas variações nas propriedades resultam do tamanho reduzido, forma dos cristalitos, baixa densidade ou número de coordenação nas interfaces entre os elementos estruturais (MACIEL et al., 2003).

No entanto, para o entendimento das propriedades apresentadas pelos nanomateriais, em relação aos materiais de origem, técnicas como: espectroscopia Raman, FTIR, UV-vis, microscopias de força atômica, eletrônicas de varredura e de transmissão, medidas de potencial zeta e diâmetro da partícula por meio de do espalhamento de luz dinâmico, têm sido criadas e utilizadas para caracterização das nanoestruturas, cada uma apresentando suas peculiaridades (DLS) (BRUST e KIELY, 2002; PONZIO, 2006; FERREIRA et al., 2009).

Os materiais nanoestruturados vêm sendo amplamente empregados na nanobiotecnologia, nos nanofármacos e na nanoeletrônica, com o uso de nanofilmes, nanopartículas compactas ou dispersas e sistemas de controle da matéria em nível atômico e molecular, já que estes podem potencializar as propriedades físico-químicas dos materiais, apresentando várias possibilidades de aplicações tecnológicas devido ao tamanho reduzido (PONZIO, 2006; FERREIRA et al., 2009).

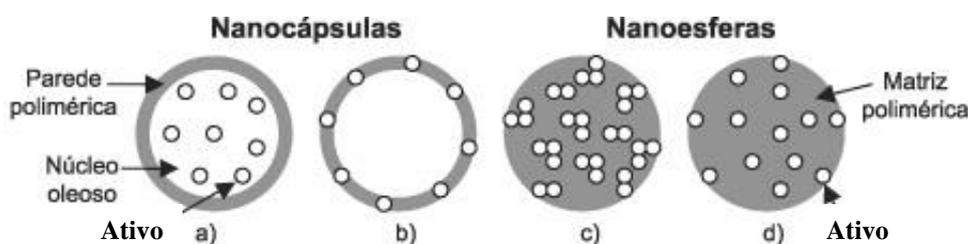
### **2.2. Nanopartículas poliméricas**

As nanopartículas (NPs) são dispersões sólidas ou líquidas, com tamanho inferior a 1µm, e podem consistir de diferentes materiais biodegradáveis, como polímeros naturais ou sintéticos, lipídios ou fosfolipídios e até mesmo metais. O termo nanopartículas é amplo, e utilizado para distinguir as nanoesferas e nanocápsulas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural (KAYSER et al., 2005; SCHAFFAZICK et al., 2003; MOHANRAJ et al., 2006; REIS et al., 2006; GAUDIN et al., 2008; GUTERRES et al., 2007).

Conforme apresentado na Figura 1, as nanocápsulas são definidas como sistemas vesiculares, carreadores de substâncias ativas, formadas por uma membrana polimérica disposta ao redor de um núcleo oleoso, podendo o ativo estar disperso ou dissolvido no núcleo lipofílico, ou adsorvido pela parede polimérica. Já as nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica, onde o ativo pode ficar retido ou adsorvido, não apresentando núcleo oleoso em sua composição (REIS et al., 2006; PIMENTEL et al., 2007; SCHAFFAZICK et al., 2003; RÉUS et al., 2009; DURAN et al., 2012; SANTOS, 2010; GUTERRES et al., 2007).

**Figura 1** - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.

Ativo dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas (a); ativo adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas (b); ativo retido na matriz polimérica das nanoesferas (c); ativo adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas (d).



Fonte: Adaptada de: SCHAFFAZICK et al., 2003.

O potencial uso de nanopartículas poliméricas, como sistema de liberação de fármacos, tem sido extensivamente investigado nos últimos anos, já que, elas podem fornecer um meio de modificar a distribuição de uma substância ativa, aumentando a sua concentração no sítio-alvo, melhorando a eficácia e reduzindo a toxicidade (KAYSER et al., 2005; LEGRAND et al., 2007; SUNDAR et al., 2010).

Além disso, as nanopartículas podem ser utilizadas para veiculação de fármacos hidrofílicos, lipofílicos, proteínas, vacinas e peptídeos, pois aumentam a estabilidade do fármaco, ou substância ativa, em fluidos biológicos, e durante o armazenamento possui baixo custo, diminui os efeitos colaterais e distribui o fármaco de forma mais controlada, aumentando assim o índice terapêutico (LÓPES-LEÓN et al., 2005; HANS et al., 2002). Recentes pesquisas demonstram as vantagens na nanoencapsulação de antígenos em modelos animais, por exemplo, mostrando a capacidade das nanopartículas em desenvolver uma ótima imunização (SAHOO et al., 2007).

No entanto, a liberação dos fármacos, a partir de sistemas nanoparticulados poliméricos, depende de diferentes fatores, tais como: dessorção do fármaco da

superfície das partículas, difusão do fármaco por meio da matriz das nanoesferas, difusão por meio da parede polimérica das nanocápsulas, erosão da matriz polimérica ou da combinação dos processos de difusão e erosão, sendo que o tipo de polímero utilizado determina o mecanismo de liberação do fármaco envolvido (SILVA JÚNIOR, 2008; MOHANRAJ et al., 2006).

Assim, as matérias-primas, utilizadas na produção, podem interferir nas características das nanopartículas, como diâmetro de partícula, morfologia, potencial zeta, eficiência de encapsulação e/ou associação e liberação da substância ativa, que impõe sua resistência físico-química e biológica (SANTOS, 2010; LEGRAND et al., 2007; DASHA et al., 2011; SUNDAR et al., 2010). Logo, a escolha do polímero e do método de preparação das nanopartículas deve ser criteriosa, já que nanopartículas compostas de polímeros biodegradáveis, biocompatíveis e com diâmetro e distribuição granulométrica controlada são mais interessantes para o direcionamento de substâncias ativas.

### **2.2.1. Produção de nanopartículas poliméricas**

Na literatura, há inúmeros relatos de métodos para a preparação de nanopartículas poliméricas, os quais podem ser geralmente classificados em: i) métodos baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos; ii) na precipitação de polímeros pré-formados e; iii) na gelatinização iônica. A incorporação do fármaco pode ser feita durante a produção das nanopartículas ou após a sua formação, pela adição de uma solução concentrada do fármaco (SCHAFFAZICK et al., 2003; MOHANRAJ et al., 2006; REIS et al., 2006; RODRIGUEZ et al., 2004).

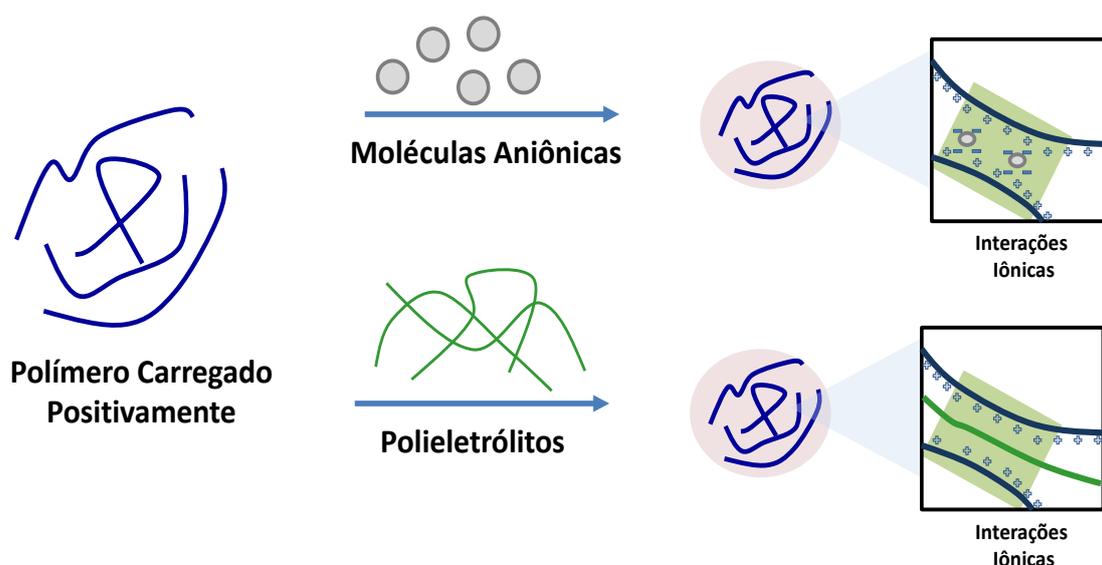
Os métodos de polimerização *in situ* incluem a polimerização em emulsão, polimerização interfacial e a policondensação interfacial. Nesses métodos, a formação do polímero ocorre juntamente com a formação das nanopartículas (GUTERRES et al., 2007; SCHAFFAZICK et al., 2003; REIS et al., 2006; SANTOS, 2010).

O método de precipitação do polímero pré-formado inclui os métodos de nanoprecipitação, deposição interfacial do polímero pré-formado, emulsificação-difusão do solvente, emulsificação-ebulição do solvente e o método de *salting-out*. Estes métodos empregam polímeros previamente formados, ocorrendo dissolução e precipitação do polímero na formulação de preparo de nanopartículas. Uma característica semelhante, entre estes métodos, é a baixa taxa de encapsulação de

substâncias hidrossolúveis, sendo preferencialmente empregados para substâncias lipossolúveis. Além disso, são métodos que necessitam de equipamentos caros e sofisticados, o que dificulta o preparo das nanopartículas (GUTERRES et al., 2007; SCHAFFAZICK et al., 2003; REIS et al., 2006; SANTOS, 2010; SOPPIMATH et al., 2001).

O método de gelatinização iônica, conforme mostrado na Figura 2, é empregado na preparação de nanopartículas poliméricas, e tem despertado grande interesse dos pesquisadores em relação a outros métodos, já que se trata de um processo simples e sem a necessidade da utilização de equipamentos caros e sofisticados. No processo de gelatinização iônica ocorre uma espécie de reticulação física, reversível por meio de interações eletrostáticas entre o polímero e o gelatinizador iônico, ou seja, neste processo não é utilizado reticulante químico, o que diminui os efeitos toxicológicos indesejáveis nas nanopartículas produzidas (DASHA et al., 2011; TAGLIARI et al., 2012). Além disso, o tamanho, a morfologia e o potencial zeta das partículas podem ser modificados variando a proporção do polímero ou do gelatinizador iônico, com a finalidade de aumentar a eficiência de associação da nanopartícula com a substância ativa (TIYABOONCHAI, 2003; PAN et al., 2002).

**Figura 2** - Esquema representativo da preparação de nanopartículas pelo método de gelatinização iônica.



Fonte: Autoria própria.

Na grande maioria dos métodos empregados, no que se refere à preparação de nanopartículas, os produtos são sempre obtidos na forma de suspensões coloidais

aquosas, que dependendo do tempo de armazenamento podem agregar formando coagulados. Além disso, podem ocorrer problemas em relação à estabilidade físico-química do polímero ou das demais matérias-primas, incluindo o fármaco, ocasionando assim um obstáculo para a aplicabilidade industrial das nanopartículas (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Sabendo-se disto, a escolha de qualquer que seja o método devem ser levados em consideração fatores como: tamanho da partícula, estabilidade físico-química, estabilidade do produto final, toxicidade residual associada aos produtos finais, perfis de cinética de liberação, natureza da molécula ativa, bem como o tipo de dispositivo de liberação.

### **2.3. Biopolímeros**

Os biopolímeros vêm sendo amplamente utilizados na preparação de nanopartículas, pois estão presentes em qualquer organismo, e na maioria destes organismos eles contribuem para a maior fração da matéria seca celular. Eles possuem uma gama de funções essenciais ou benéficas para os organismos como: conservação e expressão de informação genética, catálises de reações, armazenamento de carbono, nitrogênio, fósforo e outros nutrientes, armazenamento de energia, defesa e proteção contra ataques de outras células, mediadores de aderência a superfícies de outros organismos, entre outros. Além disso, muitos biopolímeros são componentes estruturais de células, tecidos ou organismos inteiros. No entanto, para cumprir todas essas funções, os biopolímeros precisam apresentar propriedades bastante diversificadas (BASTOS, 2007).

Biopolímeros são polímeros naturais, sintetizados por organismos vivos, sob as mais diversas condições ambientais, com diferentes composições de monômeros, estrutura macromolecular e diferentes propriedades físicas. Constituem exemplos de biopolímeros o amido, as proteínas e os peptídeos, além dos ácidos nucleicos (DNA e RNA), cujos respectivos monômeros são os açúcares e os aminaácidos (BASTOS, 2007; MOREIRA et al., 2003).

Muitos biopolímeros são desenvolvidos para o uso comercial, porém têm sido largamente estudados para outras aplicações, como para substituição de materiais derivados do petróleo, na tecnologia de alimentos e para atuar na obtenção de

biomateriais, fundamentais para o desenvolvimento da biotecnologia (FAJARDO, 2009).

O estudo de biopolímeros apresenta o foco na área de implantes e próteses, inclusive na regeneração de tecidos, com o uso do polietileno, pois interagem melhor com as células e fluidos do organismo, justamente por terem uma origem orgânica, facilitando assim os mecanismos regenerativos (ORÉFICE, 2011).

Na área de tecidos, com destaque para o tratamento de feridas e queimaduras, faz-se o uso de biopolímeros biodegradáveis, como o poli (tereftalato de etila) (Decron), que permanece no organismo apenas por um período de tempo, ou seja, até a regeneração da lesão. Também já se faz o uso dos biopolímeros em diversas outras áreas, como em válvulas, suturas, vasos artificiais e na área de próteses (ORÉFICE, 2011).

Entretanto, uma das importantes e promissoras aplicações dos biopolímeros, como a quitosana e o sulfato de condroitina, está na micro e nanoencapsulação de fármacos, para a liberação controlada de seus princípios ativos, permitindo maior controle na dosagem de drogas.

### **2.3.1. Quitosana**

A quitosana (QTS) é um biopolímero natural, abundante e atóxico, derivado da quitina. É obtida por N-desacetilação, em uma extensão variável, que caracteriza a porcentagem de grupos amina livres. Além disso, a quitosana é geralmente representada como um copolímero de 2-amina-2-desoxi-D-glicose e 2-acetamida-2-desoxi-D-glicose, unidos por ligações  $\beta$  (1,4) (RINAUDO, 2006; GEORGE et al., 2006; KITTUR et al., 2003; SENEL et al., 2004; TAGLIARI et al., 2012).

Este biopolímero pode variar em distribuição de massa molar, conteúdo de impurezas e em grau de desacetilação de 50 a 95%, dependendo da fonte e do método de preparação (WONG, 2009; LARANJEIRA et al., 2009).

O grau de desacetilação (GD) é uma propriedade química muito importante da quitosana, sendo um parâmetro que expressa o conteúdo médio de resíduos acetilados presentes nas cadeias desse biopolímero. Esse parâmetro é capaz de influenciar as características químicas, físicas e biológicas do biopolímero. Do ponto de vista químico, o GD da quitosana exerce influência sobre algumas de suas propriedades, tais como, hidrofobicidade, capacidade de reticulação na presença de determinados agentes

reticulantes, solubilidade e viscosidade de suas soluções (GONSALVES et al., 2011; MAJETI et al., 2000; GEORGE et al., 2006; BARROS et al., 2006).

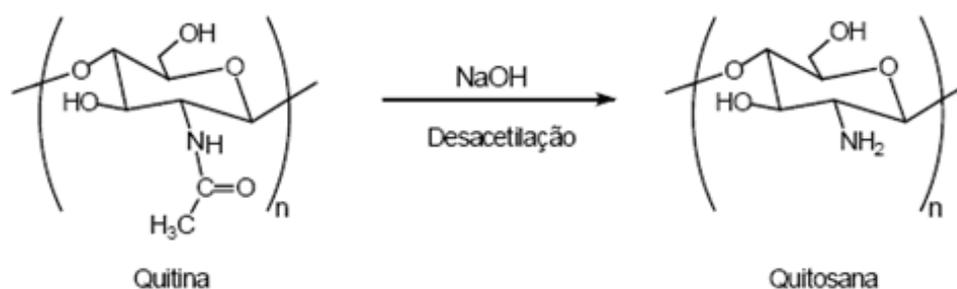
A quitosana atua como uma base fraca, apresentando pKa de grupos amina, variando entre 6,3 e 7,2, o qual é influenciado pelo GD e pela densidade de carga. Assim, o valor do pKa tende a diminuir com o aumento do GD (QIN et al., 2006; GONSALVES et al., 2011).

A quitosana se degrada pela hidrólise enzimática e apresenta cinética de degradação aparentemente relacionada ao grau de cristalinidade que é controlado principalmente pelo GD, entretanto sua resistência mecânica e sua maleabilidade são limitadas, principalmente para aplicação como filmes em bandagens, por exemplo, e por isso a mistura da mesma com outros polímeros é um procedimento utilizado para alterar ou obter as propriedades de interesse (COSTA JÚNIOR et al., 2008).

No estado sólido, a quitosana é um polímero semicristalino, classificada como oligômero quando possui cerca de doze monômeros e como polímero quando possui mais de doze monômeros (WONG, 2009).

A estrutura da quitosana é similar à sua precursora, quitina, conforme representado na Figura 3, exceto pela substituição do grupo acetamida, na posição 2 do anel glicopiranosídeo por grupos amina (CLEASEN et al., 2006).

**Figura 3** - Conversão Quitina em Quitosana via reação de desacetilação.



Fonte: CLEASEN et al., 2006.

A quitosana possui propriedades químicas e biológicas distintas, pois tem grupos amina e hidroxila reativos capazes de serem submetidos a modificações químicas. É solúvel em meios aquosos ácidos, de  $\text{pH} < 6,2$ , sendo os ácidos acético, fórmico e cítricos os mais usados na solubilização do biopolímero. Quando dissolvida possui carga positiva sobre os grupos  $-\text{NH}_3^+$ , o que facilita sua solvatação em água. Além disso, adere a superfícies carregadas negativamente, agregando-se com compostos

polianiónicos e, complexa íons metálicos. Desta forma, tanto a solubilidade em soluções ácidas, quanto à agregação com poliânions atribuem propriedades excelentes à quitosana (CLEASEN et al., 2006; GONSALVES et al., 2011; SUNDAR et al., 2010).

Ao longo das últimas décadas a quitosana tem exibido potencial para diversas aplicações na medicina, cosméticos, agricultura, tratamento de água, engenharia de tecidos e sistema de liberação controlada de drogas, entre outras, sendo utilizada na forma de filmes, géis, esfera, micro/nanopartículas e membranas, pois combina propriedades como a bioatividade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade, hidrofiliçidade, atividade antifúngica, antiúlçera, antiácida, antimicrobiana, antibacteriana e é totalmente absorvível pelo organismo (YANG et al., 2004; RINAUDO, 2006; CASARIEGO et al., 2009; TONHI et al., 2002; KUMAR et al., 2004; DALLAN, 2005; DENG, 2007; ARANAZ et al., 2009).

Na liberação controlada de fármacos, a quitosana tem sido amplamente utilizada na forma de nanopartículas, devido a sua maior estabilidade, baixa toxicidade, método de preparação ser simples e por proporcionar rotas versáteis de administração (DASHA et al., 2011; SCHAFFAZICK et al., 2003; LARANJEIRA et al., 2009; SUNDAR et al., 2010).

Em geral, as nanopartículas formadas à base de quitosana apresentam uma distribuição unimodal, com um baixo índice de polidispersão, bem como um potencial de superfície positivo, o que facilita a interação com as membranas biológicas. No entanto, dependendo do método de preparação empregado pode se observar diferenças no tamanho, morfologia e potencial zeta das nanopartículas formadas (DASHA et al., 2011; SCHAFFAZICK et al., 2003).

Na revisão da literatura realizada por Tiyaboonthai (2003), foi observado que nanopartículas de quitosana podem ser preparadas por diversos métodos e que possuem inúmeras vantagens como sistema de liberação controlada de fármacos, já que oferecem rotas versáteis para a administração de fármacos e facilitam a absorção de drogas por meio da membrana celular, aumentando assim, o efeito do medicamento e melhorando sua biocompatibilidade junto à célula.

No trabalho de Azevedo et al. (2011), foi descrita a utilização de nanopartículas à base de quitosana/TPP (Tripolifosfato de sódio) como uma forma de encapsulação de insulina, de modo a aumentar ou prolongar o efeito hipoglicêmico, e melhorar o tratamento de pacientes com diabetes.

Em outro estudo, desenvolvido por López-León; Lobo e Costa (2005), foi observado que nanopartículas à base de quitosana são muito eficientes quando aplicadas à liberação controlada de fármacos, uma vez que aumentam a eficiência terapêutica e diminuem drasticamente os efeitos colaterais.

Lee et al. (2009), também demonstraram a eficiência terapêutica de nanopartículas de quitosana/glicol por meio de um interessante estudo, utilizando a protoporfirina IX (FpIX) como agente fotossensível. Neste estudo, o agente fotossensível encapsulado as nanopartículas foi conjugado com uma fonte de excitação externa, com o objetivo de produzir dentro do tumor espécies de oxigênio-singlete, altamente reativos, causando a destruição do tecido canceroso.

Grenha et al. (2009) demonstraram, também, que nanopartículas de quitosana são adequadas para aplicação como sistema de liberação controlada de fármacos, pois em um ensaio *in vitro* observaram que a liberação da proteína ovalbumina por meio de nanopartículas à base de quitosana/carragena foi sustentada por um período prolongado de três semanas. Além disso, as nanopartículas apresentaram baixa toxicidade e biocompatibilidade com as células, podendo-se inferir que são eficientes para utilização como sistema de liberação controlada de fármacos e constituem uma ótima estratégia para aplicação na engenharia de tecidos.

O estudo realizado por Tsai et al. (2011a), demonstrou que o desenvolvimento de nanopartículas de quitosana/sulfato de condroitina, por meio da complexação polieletrólítica, é muito eficiente para liberação controlada da dexorubicina, pois são biopolímeros naturais de cargas opostas, biodegradáveis, biocompatíveis e não tóxicos, capazes de incorporar o fármaco com eficiência durante a formação do complexo, além de não apresentar qualquer problema em relação à segurança durante o processo de liberação da dexorubicina.

Do mesmo modo, a quitosana tem se destacado pelo fato de ser bio/mucoadesiva, uma vez que seus grupos podem sofrer protonação em certos pHs fisiológicos, interagindo eletrostaticamente com as cargas negativas na mucosa ou superfícies celulares, o que reforça a sua propriedade de bioadesividade (LARANJEIRA et al., 2009; TAKEUCHI et al., 2003).

Deste modo, pode-se afirmar que a quitosana exibe um comportamento biológico favorável, tais como bioadesão, permeabilidade e características físico-químicas interessantes, que tornam este biopolímero um material único para ser utilizado em sistemas de liberação controlada de fármaco.

### 2.3.2. Sulfato de Condroitina

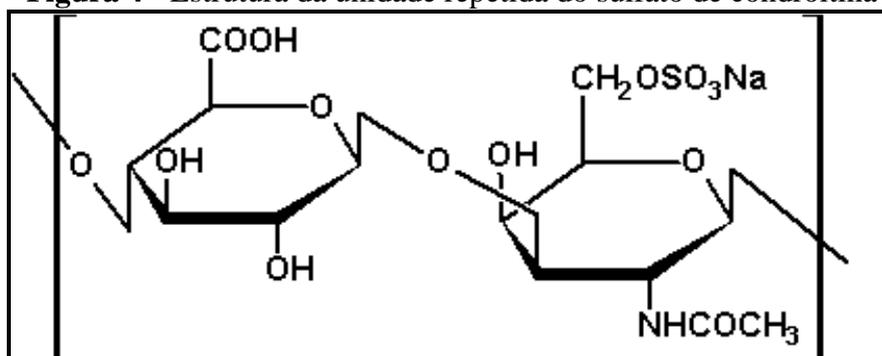
O sulfato de condroitina (SC) é um importante componente estrutural de ligações dos tecidos, bem como um componente da matriz cartilaginosa. Integra a família dos glicosaminoglicanos (GAGs), sendo caracterizado como um copolímero alternado dos monômeros:  $\beta(1,4)$ -*D*-ácido glucurônico e  $\beta(1,3)$ -*N*-acetil-*D*-galactosamina que podem ser sulfatados nos carbonos C<sub>4</sub> ou C<sub>6</sub>, formando a condroitina-4-sulfato e a condroitina-6-sulfato, respectivamente. A condroitina-4-sulfato é chamada de sulfato de condroitina A, e a condroitina-6-sulfato é chamada de sulfato de condroitina C. Esses isômeros têm uma distribuição diferenciada, relacionada com o tecido, com a idade e com o estado de saúde do organismo (SANTOS, 2009; FOOT et al., 2005; CHEN et al., 2006).

O SC foi isolado de tecido cartilaginoso em 1884, porém a natureza dos seus monossacarídeos e a sua estrutura foi descrita pela primeira vez em 1925, por Levene. Desde então, diversos métodos são utilizados para isolar o SC a partir dos tecidos animais, que incluem sempre a digestão proteolítica para extração das proteoglicanas e a purificação do SC (SANTOS 2009; WANG et al., 2007; CHEN et al., 2006).

No início das pesquisas, para a extração do SC, eram usados tratamentos alcalinos, como com o hidróxido de sódio para a degradação da proteína dos tecidos, porém foi observado que tais tratamentos causavam também a degradação do sulfato de condroitina. Outro método pesquisado foi a utilização de cloreto de cálcio, que evitava a degradação alcalina do SC, mas possuía a desvantagem de dissolver o colágeno e ser bastante demorado (SANTOS, 2009).

Na Figura 4 é apresentada a estrutura da unidade repetitiva do sulfato de condroitina.

**Figura 4 - Estrutura da unidade repetitiva do sulfato de condroitina**



Fonte: BUNHAK et al., 2007.

Este biopolímero, extraído principalmente da aorta bovina, é utilizado há bastante tempo no combate de doenças relacionadas à aterosclerose, trombose, hiperlipidemia e osteoartrite (RICHY et al., 2003; JOHNSON et al., 2001). Além disso, estudos clínicos já têm demonstrado efeitos terapêuticos do SC, administrado via oral em pacientes com osteoporose, com a melhoria na função articular e redução de dores, sendo classificado como uma droga que produz alívio sintomático de ação demorada.

Por ser uma molécula abundante na matriz do tecido conjuntivo, e por ser facilmente degradado por bactérias anaeróbicas, *Bacteroides thetaiotaomicron* e *B. ovatus*, que residem no intestino grosso, o SC está envolvido em diversos processos fisiológicos e patológicos, sugerindo assim, que este polímero seja, potencialmente, um bom candidato a carreador de fármacos (RICHY et al., 2003; JOHNSON et al., 2001; PENICHE et al., 2007; FAJARDO, 2009).

Além disso, biopolímeros naturais como o sulfato de condroitina apresentam baixa toxicidade, alta estabilidade, flexibilidade para modificação química, baixo custo e biodegradabilidade específica, o que justifica sua ampla aplicação como carreador de fármaco (SANTOS, 2009; ZOU et al., 2009).

No entanto, o fato de o sulfato de condroitina ser altamente solúvel em água, sob condições fisiológicas, limita sua aplicação como veículo em estado sólido para liberação controlada de fármacos. Porém, esta limitação pode ser minimizada pela formação de complexos polieletrólíticos (PECs) por meio da interação eletrostática com substâncias carregadas opostamente, já que o SC é um polieletrólito de caráter aniônico, tornando assim uma ótima estratégia para manter o sulfato de condroitina no estado sólido para o seu uso como sistema de liberação de fármaco (SANTOS, 2009; ZOU et al., 2009).

Assim, o sulfato de condroitina vem sendo amplamente estudado para associação com outros polímeros, como por exemplo, a quitosana formando nanopartículas poliméricas, com potencial aplicação como sistemas de liberação de fármacos.

#### **2.4. Curcumina**

*Curcuma longa* L. (Figura 5) é uma planta herbácea, perene, com aproximadamente um metro de altura. É cultivada em regiões tropicais e subtropicais da Ásia, Índia, China e América Latina. No Brasil, esta planta é conhecida como açafrão da

terra, e comumente usada na culinária como corante para alimentos. No entanto, o emprego desta planta como remédio caseiro, para uma variedade de doenças, surgiu há séculos, na medicina Indiana (ARAÚJO et al., 2001; RAMSEWAK et al., 2000).

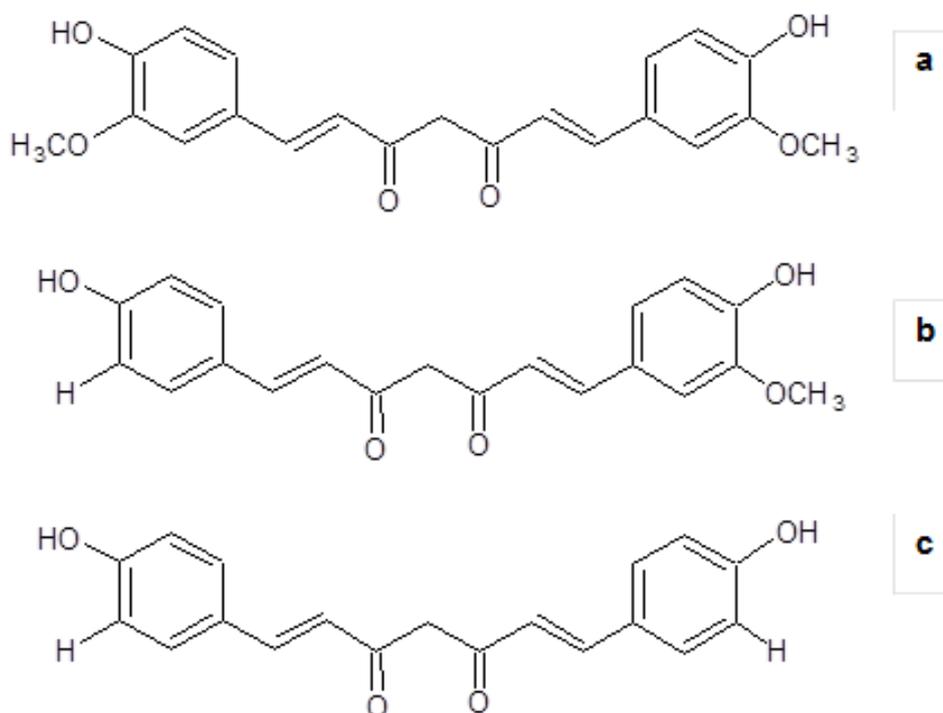
**Figura 5 - *Curcuma longa* L.**



Fonte: <http://www.wepwawet.com.br/plantas.html>

A *Curcuma longa* L. apresenta em sua composição, turmerina, óleos essenciais e curcuminóides (SHARMA, et al., 2005). Porém, suas propriedades medicinais têm sido atribuídas principalmente aos curcuminóides, pigmento amarelo obtido do rizoma da planta. Existem três tipos de curcuminóides: curcumina, demetoxicurcumina e Bisdemetoxicurcumina, conforme mostrado na Figura 6. Estes curcuminóides são compostos fenólicos, insolúveis em água e éter, porém solúveis em etanol, acetona, dimetilsulfóxido e em outros solventes orgânicos (MAHESHWARI et al., 2006; SHISHODIA et al., 2005).

**Figura 6** - Estrutura química de curcuminóides extraídos de *Curcuma longa L.*  
Curcumina (a); Demetoxicurmina (b) e; Bisdemetoxicurcumina (c).



Fonte: MAHESHWARI et al., 2006.

O pó amarelo, obtido do rizoma da planta *Curcuma longa L.*, denominado cúrcuma, é usado como corante para alimentos na culinária e empregado na medicina no tratamento de várias doenças. Um dos princípios ativos da cúrcuma é o composto fenólico curcumina (SRINIVASAN et al., 2006).

A curcumina foi isolada, pela primeira vez, em 1842 (Figura 7), e foi quimicamente caracterizada em 1910. Desde então, diversos estudos vêm sendo realizados com a finalidade de investigar suas atividades biológicas e farmacológicas, tais como, sua ação antimicrobiana, anti-inflamatória, imunomoduladora, hipolipodérmica, antioxidante, antitumoral, anticarcinogênica, dentre outras (ARAÚJO et al., 2001).

Este composto fenólico, de baixo peso molecular (368,38 g/mol), consiste em uma molécula de (1,7bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5diona). Estruturalmente a curcumina exibe um tautomerismo ceto-enólico, como predominância da forma ceto em pH de 3 a 7, possuindo uma estrutura β-dicetona, atuando como potente doador de prótons. Em pH acima de 8 a forma enólica da curcumina predomina,

atuando como doador de elétrons, assim como a maioria dos antioxidantes fenólicos (ANAND et al., 2008; SHARMA et al., 2005).

Apresenta absorção máxima no comprimento de onda de 429 nm e fluorescência amarela sob luz ultravioleta. Possui ponto de fusão entre 170 a 177°C, sendo relativamente estável ao calor e instável quando exposta a luz e a soluções alcalinas. Além disso, a curcumina se degrada facilmente, formando outros compostos (PÉRET-ALMEIDA et al., 2005).

Devido à curcumina ser um composto polifenólico, vários estudos indicam que os fenóis e grupos metoxi, existentes na sua composição química, são responsáveis pelas propriedades biológicas que este fotoquímico exerce em diversas linhagens celulares. Desta forma, a investigação do seu mecanismo de ação, relacionado às diversas atividades farmacológicas da curcumina, tem despertado interesse em muitos pesquisadores (MAHESHWARI et al., 2006; JOE et al., 2004; ODOT et al., 2004; THANGAPAZHAM et al., 2006).

Atualmente, a principal linha de investigação sobre o potencial terapêutico da curcumina tem sido conhecer suas atividades antioxidante, e principalmente sua atividade antitumoral (BACHMEIER et al., 2008; BUSH et al., 2001). Em relação a sua atividade antioxidante, esta encontra-se associada a sua habilidade em reduzir os níveis intracelulares de glutathiona reduzida, que é uma enzima envolvida no sistema de defesa ao *stress* oxidativo nas células (SHISHODIA et al., 2005). Já a atividade antitumoral da curcumina provém da sua capacidade em induzir apoptose em uma variedade de células tumorais, incluindo melanoma, linfoma, câncer de ovário, câncer de pulmão e câncer de mama, demonstrando, desta forma, seu grande potencial como agente quimioterapêutico (MAHESHWARI et al., 2006; JOE et al., 2004; SHI et al., 2006; ODOT et al., 2004).

Apesar de possuir inúmeras propriedades biológicas interessantes, a curcumina é pouco solúvel em soluções aquosas, o que limita sua biodisponibilidade e eficiência clínica (ANITHA et al., 2011b). Assim, várias estratégias têm sido avaliadas para aumentar a atividade biológica da curcumina, bem como oferecer melhor permeabilidade e resistência a processos metabólicos, visando principalmente a maior absorção e disponibilização da curcumina aos tecidos, conforme mostrado na Tabela 1 (MAITI et al., 2007; SHAIK et al., 2009; CHEN et al., 2009; LETCHFORD et al., 2007; MA et al., 2007; ANAND et al., 2008).

**Tabela 1** - Melhoria das propriedades da curcumina proporcionada pelo emprego de sistemas de liberação.

| Sistema de liberação    | Efeito benéfico relatado   |
|-------------------------|--|
| Micelas                 | Aumenta a solubilidade aquosa, mantém a atividade citotóxica e aumenta a possibilidade de administração oral e parenteral com liberação controlada.  |
| Complexos fosfolipídios | Aumenta a atividade hepatoprotetora <i>in vivo</i> , aumenta a concentração plasmática após administração oral e mantém a concentração plasmática efetiva por maior tempo.   |
| Ciclodextrinas          | Aumenta a solubilidade aquosa e aumenta a estabilidade frente à hidrólise alcalina.  |
| Lipossomas              | Obtenção de sistemas dispersos aquosos aplicáveis à administração intravenosa, aumenta ou mantém a atividade antiproliferativa e antiangiogênica sobre células tumorais <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> em relação ao fármaco livre, aumenta a estabilidade em tampão fosfato, reduz a dose, obtém efeito sinérgico inibitório com oxaliplatina e promove o transporte mais efetivo do fármaco para o interior da célula. |
| Nanopartículas          | Facilita a dispersão em meio aquoso, possui atividade citotóxica similar ao fármaco livre, prolonga a liberação de curcuminóides, aumenta a estabilidade, produz efeito sobre a hidratação, possui firmeza e elasticidade da pele e ampla distribuição nos tecidos contendo macrófagos.  |
| Nano e microemulsões    | Aumenta a atividade anti-inflamatória, promove a liberação controlada, aumenta a solubilidade e a absorção oral do fármaco.  |

Fonte: Adaptada de MAZZARINO, 2009.

A utilização de nanopartículas é uma interessante opção para aumento da biodisponibilidade da curcumina, uma vez que podem proporcionar maior penetração em membranas plasmáticas, devido ao seu pequeno tamanho, além de seu potencial de especificidade, tornando-se excelente transportadoras de medicamento (KURRIEN et al., 2007; MAZZARINO, 2009).

O estudo recente de Anitha et al. (2011a), demonstrou que nanopartículas, baseadas em quitosana/carboximetil, preparadas pelos métodos de evaporação de solventes e gelatinização iônica, são adequadas para encapsulação de substâncias hidrofóbicas, como a curcumina, bem como para o fornecimento controlado do flavanóide às células cancerosas.

Outro estudo realizado por Anitha et al. (2011b), mostrou que nanopartículas à base de quitosana e sulfato de dextrano, preparadas pelo método de coacervação

simples, também são apropriadas para o transporte e liberação controlada da curcumina, pois possui morfologia esférica, potencial zeta negativo e boa estabilidade coloidal. Além disso, a nanoformulação de curcumina mostrou-se ser eficiente no tratamento do câncer, já que houve morte de um maior número de células cancerosas quando comparada a células normais.

Feroz et al. (2011) relataram que nanopartículas de quitosana, utilizadas para encapsular a curcumina, são eficientes para garantir a biodisponibilidade e a estabilidade metabólica do flavanóide. Observaram ainda, que tais nanopartículas, acopladas ao plasma de ratos, promoveram a liberação, de forma controlada, da curcumina via oral, impedindo sua degradação, bem como mostrou ser eficaz na cura de ratos infectados por malária.

Existem ainda, relatos na literatura indicando efeitos terapêuticos da curcumina em doenças como diabetes, AIDS, artrite reumatóide, esclerose múltipla, doença de Alzheimer e fibrose cística (SHISHODIA et al., 2005).

Inúmeros estudos realizados com a curcumina indicam que esta constitui um bom exemplo de um fármaco de origem natural, pois é toxicologicamente inerte nas células, não demonstrando ser tóxica em animais ou humanos, mesmo sob administração de até oito gramas por dia. (SHARMA et al., 2005; JOE et al., 2004; AGGARWAL et al., 2002). No entanto, considerando que o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos requer estudos de toxicidade e farmacocinética em conjunto com avaliações da atividade do fármaco, se faz necessária à elucidação dos mecanismos de ação da curcumina, bem como a potencialização de suas propriedades terapêuticas por meio de estratégias farmacotécnicas.

## **2.5. Liberação controlada de fármacos**

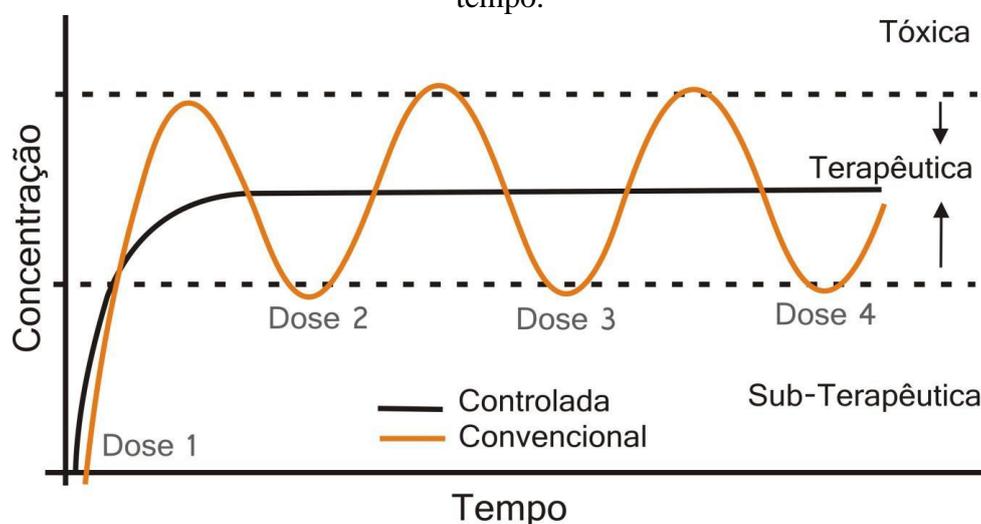
O conceito de um sistema de liberação controlada de fármacos teve início na Inglaterra, na década de 1930. Porém, somente na década de 1970 o desenvolvimento de formulações farmacêuticas, para uso humano, baseado em sistema de liberação de fármacos, com taxas controladas, teve seu início com o uso de minibombas osmóticas (URQHART, 2000; LEE et al., 2004; SHALABY et al., 2005).

Considerando que cada fármaco possui uma faixa de ação terapêutica, acima da qual ela é tóxica e abaixo da qual é ineficaz, as dosagens administradas determinam os níveis plasmáticos, logo o objetivo inicial ideal de um sistema de liberação controlada

(SLC) é manter um nível constante do fármaco no sangue ou tecido-alvo, nos casos terapêuticos em que isto seja necessário ou desejável. Dessa maneira, no sistema de liberação controlada de fármacos ocorre a manutenção da concentração do fármaco em níveis eficazes por um tempo prolongado, utilizando-se de uma única administração (ALLEN et al., 2007; SCHAFFAZICK et al., 2002; YANO et al., 2002).

A Figura 7 estabelece uma comparação entre o sistema convencional e o de liberação controlada.

**Figura 7** - Perfil de liberação de fármacos convencional e controlada em função do tempo.



Fonte: VITALINE, 2011.

Neste contexto, os sistemas de liberação controlada apresentam grandes vantagens sobre os métodos convencionais, com a manutenção da concentração terapêuticamente efetiva de fármacos no sistema circulatório por um extenso período de tempo. Na Tabela 2 estão resumidas algumas das vantagens dos sistemas de liberação controlada de fármacos (DE LYRA et al., 2007; HENRIQUE et al., 2006).

**Tabela 2** - Vantagens do sistema de liberação controlada de fármacos

| Tipo                   | Vantagens   |
|------------------------|---|
| Farmacológica          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Manter nível terapêutico com baixa oscilação;</li> <li>• Impedir níveis tóxicos e efeitos colaterais locais e sistêmicos, evitar subníveis terapêuticos;</li> <li>• Aumentar concentrações plasmáticas de princípios ativos de meia-vida plasmática relativamente curta;</li> <li>• Maior segurança na utilização de alguns fármacos de elevada potência.</li> </ul> |
| Eficácia do tratamento | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Maior comodidade pela diminuição do número de administrações diárias;</li> <li>• Facilita adesão do paciente ao tratamento;</li> <li>• Administração noturna pode ser evitada;</li> <li>• Efeitos indesejados reduzidos.</li> </ul>  |

Fonte: Adaptada de DE LYRA et al., 2007.

O termo fármaco engloba todos compostos bioativos, desde moléculas de baixo peso molecular a proteínas e material genético, administrados com intuito terapêutico. Desta forma, a liberação controlada implica a associação, química ou física, dos fármacos com materiais biocompatíveis em sistemas que tenham a capacidade de controlar, de forma pré-determinada, a taxa de liberação do fármaco, a partir desse mesmo sistema e conduzir o fármaco até ao sítio específico, em que este deve atuar (FREIBERG et al., 2004; KIM et al., 2009).

Neste sentido, os sistemas de liberação controlada são classificados de acordo com os mais variados critérios, incluindo a classe de materiais utilizados, tipo de agente terapêutico incorporado, estado físico, via de administração, forma como o fármaco se encontra encapsulado e/ou associado no sistema e a natureza do mecanismo que controla a liberação deste (FREIBERG et al., 2004; KIM et al., 2009).

Nas últimas décadas, sistemas de liberação controlada de fármacos têm sido alvo de muitos estudos, principalmente porque a utilização da maioria dos compostos terapêuticos é sempre limitada pela impossibilidade de aumento excessivo da dosagem (HENRIQUE et al., 2006).

Suspensões coloidais, lipossomas, micro e nanopartículas vêm sendo amplamente estudados, a fim de melhorar a biodisponibilidade, manter o efeito do

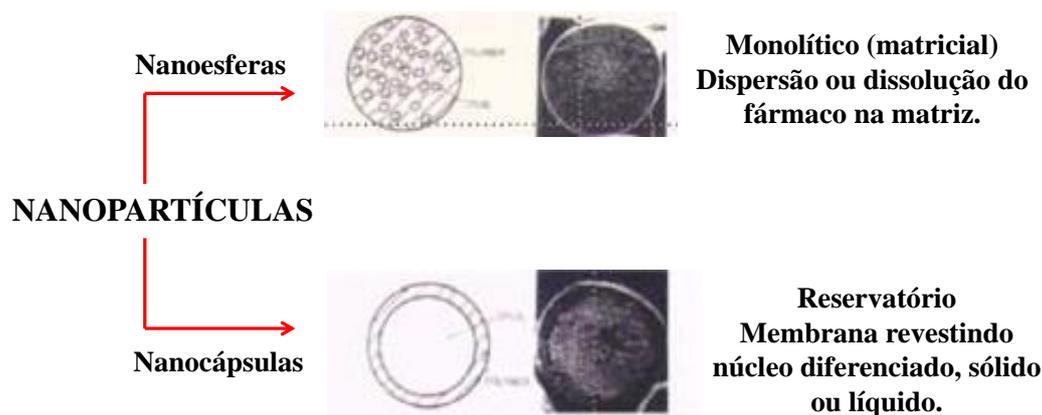
fármaco no tecido alvo, solubilizar fármacos hidrofóbicos, melhorar a estabilidade físico-química de agentes terapêuticos, minimizar efeitos colaterais e reduzir a toxicidade (RAFFIN et al., 2003; SCHAFFAZICK et al., 2003).

O desenvolvimento de nanopartículas poliméricas constitui uma alternativa promissora aos sistemas de liberação de fármacos, já que estas aumentam a sua biodisponibilidade. O aumento da biodisponibilidade se deve a capacidade que estas possuem de proteger, de forma eficaz, o fármaco, e simultaneamente aumentarem a absorção deste (SCHAFFAZICK et al., 2003; ZHANG et al., 2006; DES RIEUX et al., 2006; MOURA, 2012).

Muitos trabalhos reportam que as nanopartículas, em especial as de tamanho compreendido entre 10 e 100 nm, possuem um elevado potencial enquanto veículo de transporte de agentes citotóxicos, pois estas partículas são capazes de circular pela corrente sanguínea sem escapar das paredes dos respectivos vasos. Em tumores sólidos, que possuem vasos sanguíneos permeáveis, com uma distribuição de diâmetro maior e mais heterogênea, as nanopartículas conseguem facilmente penetrar no interior das células tumorais liberando o fármaco e evitando a destruição de tecidos saudáveis (ZHANG et al., 2006; DES RIEUX et al., 2006; MOURA, 2012).

Em geral, a liberação controlada de fármaco utiliza como métodos de liberação a difusão, a dissolução e a osmose, nos quais quase sempre é possível utilizar o sistema de reservatório e o sistema matricial, conforme mostrado na Figura 8. No entanto, em qualquer que seja o método, o fármaco está ligado ao carreador, que é o responsável por mitigar as limitações dos fármacos convencionais e apesar de possuir a natureza e composição variadas têm a capacidade de manter a estrutura original do fármaco, sem que haja degradação do mesmo, tornando sua administração segura e conveniente ao paciente. (SHALABY et al., 2005; HENRIQUE et al., 2006).

**Figura 8** - Métodos de liberação de fármacos a partir de nanopartículas



Fonte: Adaptada de: DURAN et al., 2012.

Neste contexto, um sistema ideal de distribuição de fármacos deve ser biodegradável, biocompatível, facilmente liberado, permitir um controle da taxa de distribuição de fármacos e não deve alterar a atividade do fármaco durante a distribuição (SINKO, 2008).

Deste modo, diversos materiais poliméricos biodegradáveis têm sido utilizados na preparação destes sistemas. A biodegradabilidade é um dos requisitos fundamentais para um sistema de liberação controlada, já que é desejável que o material introduzido no organismo seja reabsorvido depois de cumprida a sua função sem necessidade de recorrer à intervenção cirúrgica para a sua remoção (MOURA, 2012).

Com isto, os polímeros naturais, incluindo biopolímeros como a quitosana e sulfato de condroitina, têm sido largamente estudados e aplicados nos sistemas de liberação de fármacos, apresentando vantagens em relação aos materiais sintéticos, pelo fato de sua degradação ser controlada pelas células de acordo com mecanismos fisiológicos (FAJARDO, 2009). Além disso, o uso de biopolímeros para liberação controlada de fármacos pode minimizar reações teciduais, promover benefícios terapêuticos e, ao mesmo tempo, diminuir efeitos colaterais.

Logo, desenvolver sistemas capazes de transportar o fármaco até um alvo específico, diminuindo os efeitos indesejáveis resultantes de sua ação em outros locais, e aumentando sua permanência em circulação sistêmica, para que alcance maior eficiência terapêutica, vem despertando grande interesse de muitos pesquisadores, já que possibilita a administração de medicamentos por meio de rotas não invasivas, como por exemplo, as vias oral, pulmonar, nasal e ocular.

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1. Objetivo geral**

O objetivo deste estudo consistiu em avaliar a utilização da técnica de gelatinização iônica no desenvolvimento de nanopartículas poliméricas, constituídas dos biopolímeros quitosana e sulfato de condroitina, avaliando este sistema como nanocarreador de substâncias hidrofóbicas, como a curcumina, verificando o comportamento de liberação da curcumina, associada às nanopartículas em soluções fisiológicas simuladas, com o intuito de melhorar a viabilidade celular no tratamento de câncer.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Caracterizar o biopolímero quitosana, via determinação do grau de desacetilação;
- Avaliar as características da curcumina, utilizando-se a técnica de espectroscopia UV-Vis;
- Avaliar a influência do pH da solução de quitosana, da concentração da solução de quitosana e do volume de sulfato de condroitina nas características das nanopartículas formadas;
- Caracterizar o diâmetro, o índice de polidispersão e o potencial zeta das nanopartículas;
- Preparar nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina pelo método de gelatinização iônica;
- Associar a curcumina às nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina;
- Avaliar a estabilidade físico-química das nanopartículas acondicionadas em diferentes temperaturas ( $-2^{\circ}\text{C}$  e  $25^{\circ}\text{C}$ ), por meio do monitoramento do diâmetro, índice de polidispersão e potencial zeta;
- Determinar a taxa de associação da curcumina às nanopartículas;
- Caracterizar a morfologia das nanopartículas desenvolvidas com uso de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET);
- Avaliar as características das nanopartículas desenvolvidas e seus constituintes por meio da Espectroscopia de Infravermelho (FTIR);

- Avaliar a estabilidade térmica das nanopartículas e seu respectivos constituintes através da Análise Termogravimétrica (TGA) e Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC);
- Estudar o perfil de liberação da curcumina por meio das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina em soluções fisiológicas simuladas;
- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* da curcumina livre e associada às nanopartículas, utilizando uma linhagem de célula tumoral humana de pulmão A549.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Materiais

Quitosana (99% de pureza) (massa molecular médio) – Sigma-Aldrich com massa molar de  $190000 \text{ g mol}^{-1}$ , fornecido pelo representante e determinada por meio do método viscosimétrico. O Sulfato de Condroitina Tipo A, sal de sódio (99% de pureza), foi obtido a partir da traqueia bovina – Sigma-Aldrich. A Curcumina (95% de pureza) foi obtida da *Curcuma Longa L.* (cúrcuma), com grau de pureza de 98% – Sigma-Aldrich. Os demais reagentes são de grau analítico e foram usados sem nenhuma purificação prévia.

### 4.2. Método

#### 4.2.1. Determinação do grau de desacetilação da quitosana (%GD)

O grau de desacetilação (GD) expressa o conteúdo médio de grupos amina ( $\text{NH}_2$ ) livres, presentes na quitosana. Neste estudo, o teor destes grupos foi determinado por meio da técnica de espectroscopia de infravermelho (FTIR), aplicando-se o método descrito por Prado et al., 2011. Neste método, aproximadamente 1,5 mg de quitosana foram macerados com uma quantidade suficiente de KBr seco e limpo, e a partir desta mistura obteve-se uma pastilha. O espectro foi registrado em um espectrofotômetro FT-IR Varian 640-IR, representando a média de 32 scans com resolução de  $2 \text{ cm}^{-1}$  na região de  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ .

O grau de desacetilação da quitosana foi obtido pela análise do espectro de FTIR, a partir dos picos entre  $1320$  e  $1420 \text{ cm}^{-1}$  obtidos no espectro de FTIR, que mostram a conversão das unidades N-acetilglicosamina em grupos amina, e utilizando-se a equação 1 (PRADO et al., 2011).

$$\%GD = 100 - \frac{(A_{1320}/A_{1420}) - 0,3822}{0,03133} \quad \text{(Equação 1)}$$

Em que A é a absorbância.

#### **4.2.2. Espectroscopia de absorção molecular UV-Vis para a curcumina**

Os espectros de UV-vis para a curcumina foram realizados em um espectrofotômetro UV-VIS-NIR Cary 5000 da Varian, a partir de uma solução do corante  $0,02 \text{ mmol L}^{-1}$ , preparada em soluções de HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 1,2 e de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 6,8 e etanol na proporção de 80:20, sendo 80 partes de cada solução e 20 partes de etanol. A análise foi conduzida na faixa de 350 a 750 nm.

#### **4.2.3. Curva padrão de calibração da curcumina**

A curva de calibração para a curcumina foi determinada em um espectrofotômetro UV-vis U2M Quimis a partir de uma solução do corante, preparada utilizando-se 10 mg de curcumina e dissolvida em solução composta de solução de HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 1,2, de  $\text{CH}_3\text{COOH}$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 4,0 e de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 6,8 e etanol, na proporção de 80:20, sendo 80 partes de cada solução e 20 partes de etanol. A partir das diluições adequadas da solução estoque, foram realizadas as medidas de absorbância no comprimento de onda de 429 nm para cada solução.

#### **4.2.4. Delineamento experimental para síntese das nanopartículas**

O delineamento experimental consistiu na otimização das condições experimentais adotadas para o preparo das nanopartículas. Os parâmetros avaliados para as nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina foram: pH da solução de quitosana, concentração da solução de quitosana e volume do gelatinizador iônico (SC), conforme mostrado na Tabela 3. Para as nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina, contendo curcumina, foi avaliado apenas o efeito do pH da solução de quitosana, conforme mostrado na Tabela 4. Estes parâmetros foram pré-estabelecidos com o intuito de avaliar a melhor formulação da suspensão coloidal obtida.

**Tabela 3** - Condições para preparo das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina.

| Condições                                     |      | Volume de QTS em mL | Concentração da solução de QTS em mg/mL | Volume de SC em mL |
|---|------|---------------------|---|--------------------|
| pH da solução de quitosana                    | 3,5  | 10,0                | 2,0                                     | 15,0               |
|   | 4,0  | 10,0                | 2,0                                     | 15,0               |
|   | 4,5  | 10,0                | 2,0                                     | 15,0               |
|   | 5,0  | 10,0                | 2,0                                     | 15,0               |
|   | 5,5  | 10,0                | 2,0                                     | 15,0               |
|   | 6,0  | 10,0                | 2,0                                     | 15,0               |
| Concentração da solução de quitosana em mg/mL | 0,5  | 10,0                | 0,5                                     | 15,0               |
|   | 1,0  | 10,0                | 1,0                                     | 15,0               |
|   | 1,5  | 10,0                | 1,5                                     | 15,0               |
|   | 2,0  | 10,0                | 2,0                                     | 15,0               |
|   | 3,0  | 10,0                | 3,0                                     | 15,0               |
| Volume do sulfato de condroitina em mL        | 2,5  | 10,0                | 2,0                                     | 2,5                |
|   | 5,0  | 10,0                | 2,0                                     | 5,0                |
|   | 7,5  | 10,0                | 2,0                                     | 7,5                |
|   | 10,0 | 10,0                | 2,0                                     | 10,0               |
|   | 15,0 | 10,0                | 2,0                                     | 15,0               |

Fonte: Autoria própria.

**Tabela 4** - Condições para preparo das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina contendo curcumina.

| Condições                  |     | Volume de QTS em mL | Concentração da solução de QTS em mg/mL | Volume de SC em mL | Quantidade de curcumina em mg |
|----------------------------|-----|---------------------|---|--------------------|-------------------------------|
| pH da solução de quitosana | 4,0 | 10,0                | 2,0                                     | 15,0               | 3,0                           |
|                            | 5,0 | 10,0                | 2,0                                     | 15,0               | 3,0                           |
|                            | 6,0 | 10,0                | 2,0                                     | 15,0               | 3,0                           |

Fonte: Autoria própria.

Considerando os parâmetros pré-estabelecidos, foi realizada, ainda, a caracterização da suspensão coloidal das nanopartículas por meio do diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta.

A caracterização do diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial zeta das nanopartículas foi realizada utilizando-se o equipamento de espalhamento de luz dinâmico Nano-Zetasizer – ZS, modelo ZEN3600 - Malvern Instruments. O equipamento opera com uma fonte de luz (laser vermelho de 5 mW, He-Ne), comprimento de onda em 633 nm, e detector posicionado em um ângulo fixo de 173°

em relação ao ângulo de incidência, e as medidas foram realizadas à temperatura ambiente (25°C) e utilizando-se água como dispersante.

Para realizar as análises de diâmetro e PDI as amostras foram previamente agitadas por aproximadamente 30 minutos, a fim de que as nanopartículas ficassem em suspensão, em seguida transferiu-se uma alíquota de 25 µL da amostra para uma cubeta de poliestireno com 1 cm de caminho óptico e acrescentou-se cerca de 1 mL de água tipo 1. Cada análise foi realizada em triplicata, sendo que cada uma representa a média de 12 leituras em cada ponto. Os dados foram tratados com o software Zetasizer 6.20<sup>®</sup>.

Para determinar o potencial zeta das NPs, 1 mL da suspensão coloidal preparada para medida de diâmetro e PDI, foi transferida para uma célula eletroforética e as medidas foram realizadas, utilizando-se o mesmo equipamento utilizado para medidas de tamanho (Nano-Zetasizer ZS), alterando apenas a configuração do equipamento do modo size para o modo zeta.

#### **4.2.5. Preparação das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina**

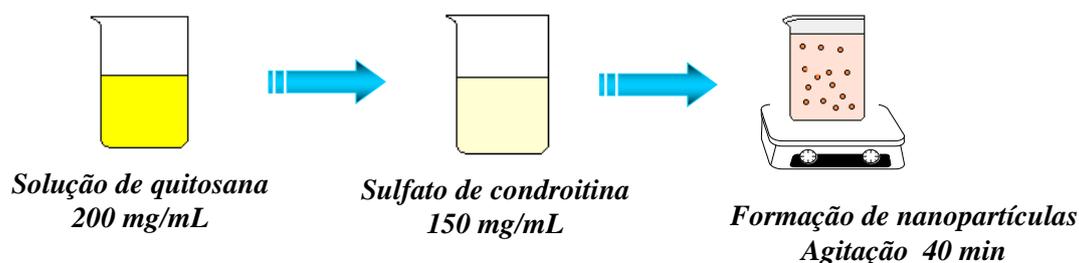
As nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina foram preparadas de acordo com o método de gelatinização iônica descrito por Tsai et al. (2011a); Tiyafoonochal, (2003); Pan et al. (2002); Dasha et al. (2011); Tagliari et al. (2012), utilizando-se as condições pré-estabelecidas, conforme descrito no item 4.2.4. Antes da preparação, foram obtidas soluções homogêneas dos polímeros, em concentrações pré-determinadas dissolvidas separadamente, em solução de ácido acético 0,1 mol L<sup>-1</sup>.

A solução ácida de quitosana foi preparada dissolvendo-se cerca de 200 mg de quitosana em 100 mL de solução de ácido acético, sob agitação magnética constante, por aproximadamente 40 minutos. Já a solução de sulfato de condroitina foi preparada dissolvendo-se cerca de 150 mg de SC em 150 mL de solução de ácido acético. Em seguida o pH da solução de sulfato de condroitina foi ajustado para 5,0 e o da quitosana foi ajustado de acordo com as condições pré-estabelecidas no item 4.2.4, utilizando-se solução de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>.

A formação da nanopartícula de quitosana / sulfato de condroitina foi conduzida a partir da adição lenta da solução de SC à solução de QTS, sob agitação magnética constante por aproximadamente 40 minutos, conforme mostrado na Figura 9, promovendo desta forma a complexação entre espécies de carga oposta. Neste processo

a quitosana sofre geleificação iônica e coagula como nanopartículas esféricas, resultando em uma dispersão coloidal estável.

**Figura 9** - Preparação de nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina através da técnica de gelatinização iônica.



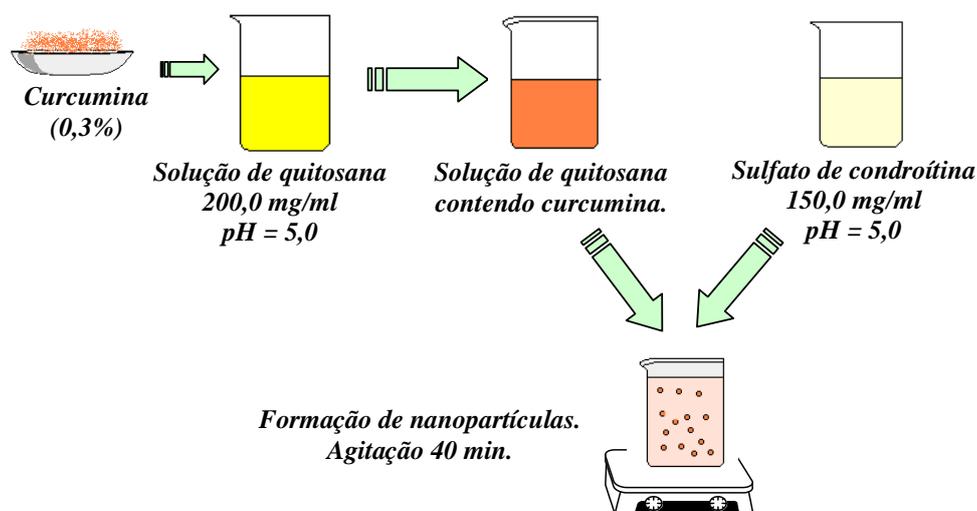
Fonte: Autoria própria.

Após a efetiva obtenção das nanopartículas, estas foram transferidas para tubos falcon, centrifugada por 10 minutos a 3000 rpm em uma centrífuga Hettich Zentrifugen, modelo Rotina 420 gr à 25°C. A amostra foi ressuspensa em água tipo 1, centrifugada novamente e o material resultante foi acondicionado à -18°C para ser liofilizado, utilizando-se um liofilizador Terrone L-300, a uma temperatura de -45°C e pressão de 9,9 bar, obtendo-se nanopartículas na forma de pó, que possibilitou a caracterização físico-química do material obtido.

#### **4.2.6. Preparação das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina contendo curcumina**

A associação da curcumina às nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina foi realizada utilizando-se a mesma metodologia, empregada anteriormente, com pequenas alterações conforme o esquema da Figura 10. Neste observa-se que a curcumina foi adicionada a solução polimérica de quitosana, promovendo sua interação com o polímero. Após a impregnação e estabilização do flavonóide na solução de quitosana, a solução de sulfato de condroitina foi adicionada lentamente à solução contendo QTS/curcumina sob agitação magnética constante por aproximadamente 40 minutos, ocorrendo assim à formação efetiva das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina contendo curcumina.

**Figura 10** - Preparação de nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina contendo curcumina através da técnica de gelatinização iônica.



Fonte: Autoria própria.

A quitosana e o sulfato de condroitina foram dissolvidos separadamente em solução de ácido acético  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , conforme descrito no item 4.2.5, e a curcumina foi incorporada na solução polimérica de quitosana por meio da preparação de uma solução alcoólica, dissolvendo-se cerca de 30 mg de curcumina em aproximadamente 10 mL de etanol.

Após a efetiva obtenção das nanopartículas, estas foram transferida para tubos falcon, centrifugada por 10 minutos a 3000 rpm em uma centrifuga Hettich Zentrifugen, modelo Rotina 420 gr à  $25^{\circ}\text{C}$ . A amostra foi ressuspensa em água tipo 1, centrifugada novamente e o material resultante foi acondicionado à  $-18^{\circ}\text{C}$  para ser liofilizado utilizando um liofilizador Terrone L-300, a uma temperatura de  $-45^{\circ}\text{C}$  e pressão de 9,9 bar, obtendo-se nanopartículas na forma de pó, que possibilitou a caracterização físico-química do material obtido.

#### 4.2.7. Caracterização das nanopartículas

Dentre os procedimentos de caracterização utilizados nesse estudo destacam-se análises espectroscópicas e calorimétricas das nanopartículas, e seus constituintes, avaliação da estabilidade físico-química das nanopartículas em suspensão, avaliação da taxa de associação da substância ativa (curcumina) às NPs de QTS/SC, estudo da

cinética de liberação da curcumina e avaliação morfológica da suspensão coloidal realizada por meio de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

#### **4.2.7.1. Estabilidade físico-química das nanopartículas em suspensão**

A avaliação da estabilidade física das nanopartículas em suspensão foi realizada utilizando o equipamento de espalhamento de luz dinâmico Nano-Zetasizer – ZS, modelo ZEN3600 - Malvern Instruments.

As medidas de diâmetro, PDI e potencial zeta das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina puras e contendo curcumina foram realizadas considerando o efeito do pH da solução polimérica de quitosana, sendo que este variou em 4,0; 5,0 e 6,0. A concentração da solução de quitosana utilizada foi de 2,0 mg/mL, e o volume do gelatinizador iônico (SC) foi de 15 mL

As nanopartículas foram preparadas conforme descrito nos itens 4.2.5 e 4.2.6, sendo mantidas em suspensão e acondicionadas em duas diferentes temperaturas -2°C e 25°C durante 120 horas.

#### **4.2.7.2. Avaliação morfológica das nanopartículas**

A avaliação morfológica das nanopartículas preparadas neste estudo foi realizada utilizando-se um microscópio eletrônico de transmissão, modelo *JOEL JEM-2100*, equipado com EDS, *Thermo scientific*. As suspensões coloidais observadas foram diluídas em água, em uma razão de 50 µL da amostra para 100 µL de água. Após a diluição foi depositado 3 µL da suspensão coloidal sobre uma tela de cobre com 400 mesh, recoberta por um filme de carbono e posteriormente seca à temperatura ambiente (25°C) por aproximadamente 24 horas. No entanto, antes da realização das medidas foi aplicado 20 µL do contraste ósmio para que o vapor de ósmio recobrisse a tela possibilitando assim uma melhor visualização das nanopartículas no microscópio.

#### **4.2.7.3. Taxa de associação da curcumina às nanopartículas**

A taxa de associação da curcumina às NPs de QTS/SC foi determinada por meio do método direto, empregando-se medidas espectroscópicas, no comprimento de onda máximo de absorção da curcumina, e aplicando-se os valores obtidos na equação de

curva padrão de calibração do corante, referente à solução de CH<sub>3</sub>COOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 4,0.

Para cada uma das medidas, aproximadamente 10 mg das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina contendo curcumina, preparadas com o pH da solução de quitosana, variando em 4,0; 5,0 e 6,0, foram dissolvidas em 8 mL de solução de CH<sub>3</sub>COOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 4,0 e posteriormente adicionado 2 mL de etanol. Após a extração da curcumina associada às nanopartículas em solução CH<sub>3</sub>COOH/etanol, com posterior coagulação da QTS/SC, uma alíquota de cada solução foi coletada e analisada, utilizando-se um espectrofotômetro UV-vis U2M Quimis, no comprimento de onda máximo de 429 nm, obtendo-se a concentração de curcumina associada. A quantificação da taxa de associação da curcumina foi determinada utilizando-se a equação 2:

$$\%TA (\%) = \frac{\text{Quantidade de curcumina associada}}{\text{Quantidade inicial de curcumina}} \times 100\% \quad \text{(Equação 2)}$$

#### 4.2.7.4. Espectroscopia de infravermelho (FTIR)

Amostras de todas as matérias-primas e das nanopartículas produzidas neste estudo foram maceradas com KBr seco e limpo, originando pastilhas de KBr. Os espectros de infravermelho, para todas as amostras, foram obtidos na região de 4000 – 400 cm<sup>-1</sup>, utilizando-se um espectrofotômetro FT-IR Varian 640-IR, com resolução de 2 cm<sup>-1</sup>, via análise média de 32 scans.

#### 4.2.7.5. Análise Termogravimétrica (TG)

As análises termogravimétricas das nanopartículas preparadas neste estudo e seus respectivos constituintes foram realizadas utilizando o equipamento Shimadzu TG 60. A temperatura durante a análise variou de 25°C a 600°C, com razão de aquecimento de 10°C/min e fluxo de ar a 50 mL/min, a fim de verificar a degradação dos biopolímeros e das nanopartículas formadas por meio destes, bem como avaliar a estabilidade térmica dos materiais desenvolvidos neste estudo.

#### 4.2.7.6. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As análises de DSC dos biopolímeros, da curcumina e das nanopartículas foram realizadas em um calorímetro Shimadzu DSC 60.

A análise foi realizada em duas corridas: a primeira corrida foi realizada variando a temperatura de 25°C a 150°C, para destruir a história térmica dos materiais preparados. Após esta corrida, a amostra foi resfriada até a temperatura de 30°C e em seguida realizou-se a segunda corrida, variando a temperatura de 30°C a 250°C em atmosfera de N<sub>2</sub> com fluxo de 50 mL/min, com taxa de aquecimento de 5°C/min.

#### 4.2.7.7. Perfil de liberação da curcumina

A cinética de liberação da substância ativa (curcumina), a partir das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina, foi realizada em solução de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 1,2 e em solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 6,8. A análise foi realizada utilizando-se um espectrofotômetro UV-vis U2M Quimis em  $\lambda_{m\acute{a}s}$  429 nm.

As nanopartículas foram previamente preparadas conforme descrito no item 4.2.6, porém variando o pH da solução polimérica de quitosana em 4,0; 5,0 e 6,0. Tanto o pH das nanopartículas quanto o pH das soluções de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> foram ajustados utilizando-se solução de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>.

Para a realização da leitura da absorbância 50 mg das nanopartículas preparadas e posteriormente liofilizadas foram suspensas em 25 mL de soluções de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 1,2 e 6,8, respectivamente.

Após a adição das soluções, em intervalos de tempo pré-determinados, transferiu-se aproximadamente 3 mL do sobrenadante para uma cubeta, sendo a solução analisada por espectroscopia de UV-Vis. A análise foi conduzida por 72 horas, para as amostras colocadas em contato com a solução de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 1,2, e 336 horas para as amostras colocadas em solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 6,8. O estudo do comportamento de liberação da curcumina foi realizado em temperatura ambiente (25°C), e sob agitação magnética constante nas primeiras horas de liberação, com ocasional agitação antes da leitura de absorbância.

Assim, a porcentagem de curcumina liberada foi determinada utilizando-se a equação da curva padrão de calibração que relaciona a absorbância com a concentração conhecida do flavanóide (mg%) na mesma solução em que a cinética de liberação foi

conduzida. Os resultados obtidos foram apresentados na forma de porcentagem de liberação do composto ao longo do tempo, utilizando-se a equação 3:

$$\text{Curcumina liberada (\%)} = \frac{\text{Quantidade de curcumina liberada} \times 100\%}{\text{Quantidade de curcumina encapsulada}} \quad \text{(Equação 3)}$$

#### **4.2.8. Avaliação da atividade citotóxica *in vitro* da curcumina livre e nanoencapsulada**

A avaliação da atividade citotóxica *in vitro* da curcumina livre, e associada às nanopartículas, foi realizada no laboratório de Nanociência e Nanotecnologia do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, sob a supervisão da Professora Dra. Graziella Anselmo Joanitti. A avaliação citotóxica teve como objetivo avaliar se a curcumina e as nanopartículas contendo curcumina interferiam na viabilidade de células tumorais. Os ensaios foram realizados utilizando-se células tumorais humanas de pulmão da linhagem A549, cedidas gentilmente pelo Professor Dr. Ricardo Bentes de Azevedo. Todos os procedimentos foram realizados utilizando-se materiais rigorosamente esterilizados, e executado no interior de uma câmara de fluxo laminar da marca Veco, modelos CFLV 12, cuja luz ultravioleta permaneceu ligada por 25 a 30 minutos antes do início do procedimento.

##### **4.2.8.1. Manutenção das células**

As células de câncer de pulmão (alíquotas de 500 µL) foram removidas de um estoque em nitrogênio líquido e rapidamente descongeladas a 37°C. Em seguida as células foram centrifugadas a 750 g por 2 minutos, ressuspensas em 10 mL de meio de cultura DMEM (meio Eagle modificado por Dulbecco) completo e adicionadas a frascos de cultura com volume de 75 cm<sup>3</sup>. Esses frascos foram então incubados por 48 horas em estufa da marca Thermo Scientific<sup>®</sup>, modelo 8.000 WJ, com 5% de CO<sub>2</sub>, mantida úmida e a uma temperatura de 37°C. O meio de cultura DMEM foi preparado utilizando-se 10% de soro fetal bovino, 1% de antibiótico e tamponado com bicarbonato de sódio de acordo com as instruções do fabricante.

Para garantir a qualidade das células utilizadas nos experimentos, a cada 48 horas o meio de cultura era substituído por um meio de cultura fresco. Periodicamente,

foi realizada a observação da cultura de células por meio de um microscópio óptico invertido da marca Olympus<sup>®</sup>, modelo CK2, com a finalidade de avaliar as condições celulares como: crescimento, aspectos morfológicos e presença de contaminantes.

Depois de atingido o estágio de confluência, elevada densidade de células em uma determinada área, as células foram removidas do frasco de cultura e recultivadas em uma densidade menor. Para isto o meio de cultura contido na garrafa foi descartado e as células removidas do frasco pela adição de 4 mL de solução estoque de tripsina/EDTA. O frasco foi mantido na estufa por aproximadamente 2 minutos, na temperatura de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Ao observar por meio do microscópio que as células estavam suspensas, adicionou-se 1 mL de meio de cultura DMEM, para neutralizar a ação da tripsina, e o conteúdo foi então transferido para um tubo falcon de 15 mL e centrifugado a 750g, por 2 minutos. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e as células precipitadas foram ressuspensas em meio de cultura completo, para então proceder à contagem do número de células.

#### 4.2.8.2. Contagem celular

A fim de determinar o número de células, 10 µL da suspensão de células foram transferidos para um microtubo juntamente com 40 µL de solução estoque de 0,4% de azul de tripan (p/v). Oito microlitros dessa mistura foram depositados em uma câmara de Neubauer, onde apenas as células encontradas nos quatro quadrantes dos extremos maiores laterais foram visualizadas, e contadas com o auxílio do microscópio óptico invertido. Assim, a quantidade de células foi determinada de acordo com a equação 4.

$$\text{Número de células/ mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de Células contadas} \times 5 \times 10^4}{4} \quad \text{(Equação 4)}$$

Após a determinação da quantidade de células, parte delas foi transferida para um frasco de cultura e mantida na estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e, com os outros 875 µL de suspensão celular remanescente realizou-se o ensaio de viabilidade celular.

#### 4.2.8.3. Ensaio de viabilidade celular

Para a realização do ensaio de viabilidade celular, as células contadas foram transferidas para placas de cultura de 96 poços, incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas para a completa adesão das células no fundo da placa. A concentração padrão de células adotada foi de  $5 \times 10^3$  célula/poço, e o volume de suspensão celular transferido para cada poço foi determinado segundo a equação 5:

$$\text{Volume de suspensão celular em mL / poço} = \frac{5 \times 10^3}{N^\circ \text{ de célula / mL}} \quad \text{(Equação 5)}$$

Após 24 horas de incubação, as placas contendo a cultura de células foram observadas em microscópio óptico invertido para a avaliação da morfologia, dispersão das células pela placa e presença de contaminação. Em seguida, iniciou-se a fase de tratamento das células. Para isto, retirou-se o meio de cultura contido nas placas e adicionou-se 200 µL da solução de meio de cultura contendo as amostras em estudo.

As amostras estudadas foram nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina puras e contendo curcumina, curcumina livre, sulfato de condroitina, solução de ácido acético, solução de etanol/água e água. A concentração das amostras variou de 1,25 a 40 µmol L<sup>-1</sup>. Para cada concentração foi realizada uma triplicata, e após o tratamento as células foram mantidas incubadas em estufa pelo período de 24 e 72 horas.

As nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina puras e contendo curcumina foram preparadas conforme descrito nos itens 4.2.5 e 4.2.6, variando-se o pH da solução polimérica de quitosana em 4,0; 5,0 e 6,0. A solução de curcumina livre foi preparada utilizando-se 8 mg de curcumina diluída em solução de etanol/água em uma razão de 80:20, sendo 20 mL de etanol e 80 mL de água.

No entanto, como as células não sobrevivem nos pHs ácidos, as nanopartículas puras e contendo curcumina e seu respectivo controle ácido tiveram seus pHs ajustados para o pH fisiológico (7,4), com solução de NaOH 10 mol L<sup>-1</sup>.

Após o período de incubação, o meio contendo as amostras em estudo, foi removido, e adicionou-se 15 µL de solução estoque de MTT (3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) e 135 µL de meio de cultura fresco. As placas foram novamente mantidas na estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> por aproximadamente duas

horas. Após esse período, removeu-se a solução do meio de cultura e MTT e adicionou-se 200 µL de DMSO, homogeneizando-se o sistema com o auxílio de uma micropipeta para que os cristais de formazan (um produto de cor azulada), formados pelo metabolismo celular na presença do MTT, fossem completamente solubilizados no DMSO. De tal modo, foi possível realizar a leitura da absorbância do formazan por meio de um espectrofotômetro acoplado a um leitor de microplacas da marca SpectraMax<sup>®</sup>, modelo M2, Molecular Devices, em comprimento de onda de 595 nm. A viabilidade das células dos grupos controle foi considerada como máxima (100%) e a porcentagem de células viáveis que haviam sido submetidas a algum dos tratamentos foi determinada a partir dessa consideração. A porcentagem de células viáveis foi calculada de acordo com a equação 6:

$$\text{Células viáveis (\%)} = \frac{\text{Absorbância para grupo tratado} \times 100}{\text{Absorbância para grupo controle}} \quad \text{(Equação 6)}$$

A partir dos dados obtidos foram produzidos gráficos que comparam os resultados obtidos com as células tratadas com a curcumina na forma livre em relação às células tratadas com a curcumina associada às nanopartículas.

Com o término dos experimentos as células a serem desprezadas, bem como todo material que foi utilizado durante o ensaio, receberam adição de hipoclorito de sódio e detergente e foram lavados ou descartados após 24 horas.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

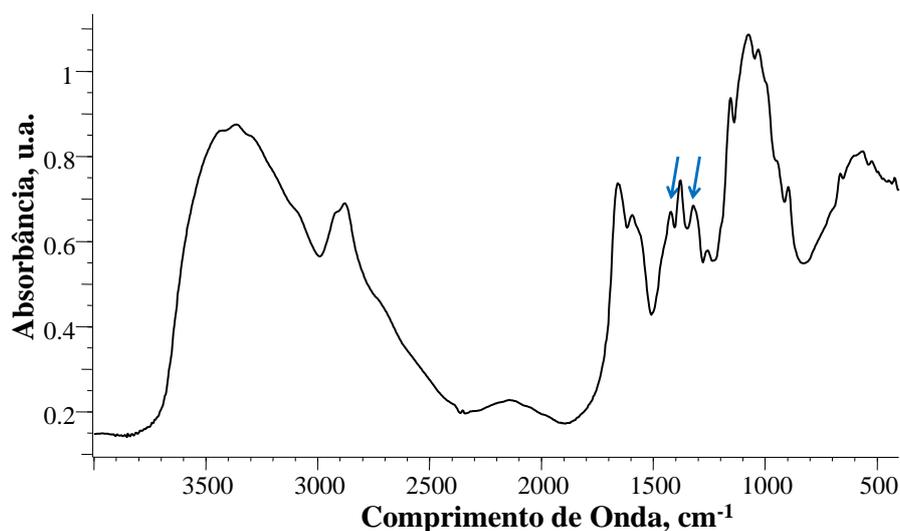
### 5.1. Determinação do grau de desacetilação da quitosana (%GD)

Na obtenção da quitosana via *N*-desacetilação da quitina, os grupos acetamida ( $-NHCOCH_3$ ) das unidades de *N*-acetilglicosamina (*Gl-NAc*), provenientes da quitina, são convertidos em grupos amina ( $-NH_2$ ), em taxas variadas, para originar o heteropolissacarídeo, com diferentes graus médios de desacetilação. No entanto, o produto *N*-desacetilado da quitina só passa a ser considerado quitosana quando o GD se torna igual ou superior a 50 %, percentagem a partir da qual o biopolímero se torna solúvel em soluções ácidas diluídas (GONSALVES et al., 2011).

Há várias técnicas para a determinação do grau de desacetilação da quitosana, baseadas na titulação condutimétrica, espectroscopia de ressonância magnética de hidrogênio (RNM  $^1H$ ), análise elementar (CHNOS), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), termogravimetria (TG/DTG), porém se tratam de técnicas com elevado custo, de difícil preparo das amostras e difícil entendimento dos resultados obtidos (SANTOS et al., 2003). Assim, neste estudo foi utilizada a técnica de espectroscopia de infravermelho (FTIR), já que se trata de uma técnica simples e bastante precisa.

Para obtenção do espectro de infravermelho (FTIR) (Figura 11), utilizou-se aproximadamente 1,5 mg de quitosana misturada a cerca de 100 mg de KBr limpo e seco, formando desta forma uma pastilha.

**Figura 11** - Espectro de infravermelho (FTIR) da quitosana.



Fonte: Autoria própria.

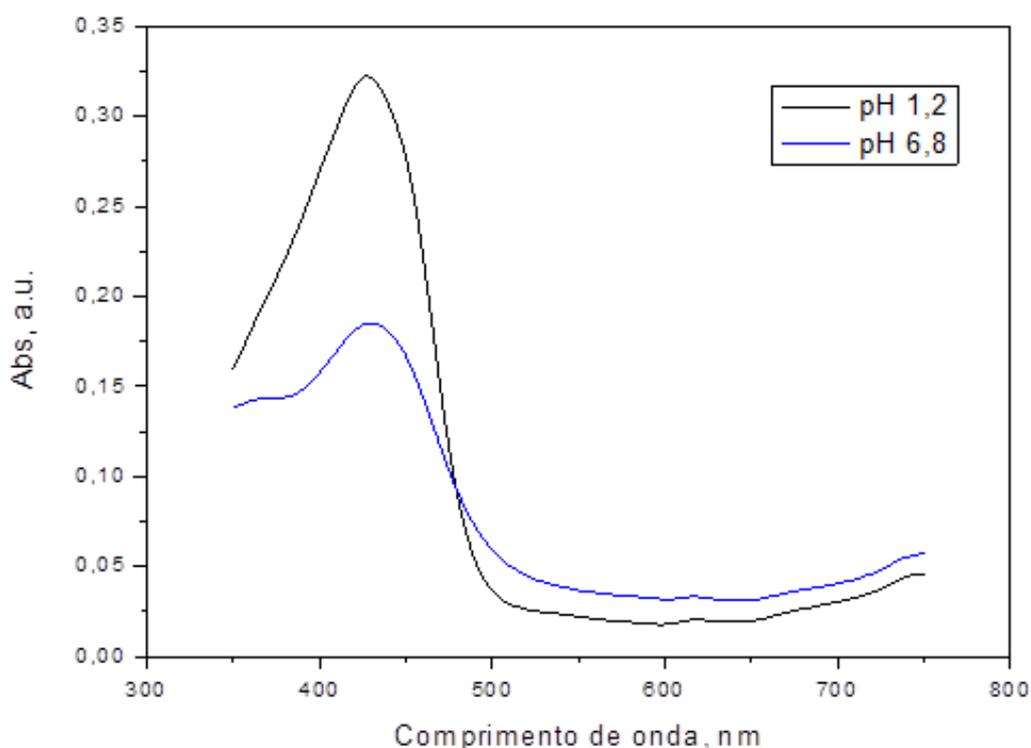
A porcentagem de grupos amina livre (%GD) foi calculada conforme descrito no item 4.2.1, considerando-se os picos em  $1320\text{ cm}^{-1}$ , referente à ligação C-N e em  $1420\text{ cm}^{-1}$ , que representa a ligação  $\text{CH}_2$ , obtidos do espectro de FTIR.

O grau de desacetilação obtido por este método para a quitosana utilizada neste estudo foi de 81,86 %, o que mostra que ocorreu a conversão das unidades *N*-acetilglicosamina em grupos amina.

## 5.2. Espectroscopia de absorção molecular UV-vis para a curcumina

Na Figura 12 é apresentado o espectro de absorção para a curcumina, obtido a partir de uma solução do corante  $0,02\text{ mmol L}^{-1}$ , preparada em solução de HCl/etanol e solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ /etanol em uma razão 80:20, a análise foi conduzida na faixa de 350 a 750 nm.

**Figura 12** - Espectro de absorção molecular UV-vis para a curcumina.



Fonte: Autoria própria.

Embora a curcumina seja mais solúvel em soluções alcalinas e neutras, nesta faixa de pH as velocidades de degradação hidrolítica do corante são relativamente rápidas, tornando-o instável, pois à medida que se aumenta o pH para valores neutro ou alcalino o próton do grupamento fenólico é removido, levando à destruição da estrutura dieno conjugada da molécula de curcumina (PÉRET-ALMEIDA et al., 2005).

Deste modo, neste estudo a análise de espectroscopia de UV-vis foi realizada utilizando-se soluções de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 1,2 e de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 6,8, pHs inferiores aos valores de pKa da curcumina (pKa<sub>1</sub> = 8,3; pKa<sub>2</sub> = 9,8 e pKa<sub>3</sub> = 10,5), onde observou-se maior estabilidade, devido à manutenção da estrutura dieno conjugada da molécula, já que o corante apresentou-se ainda protonado e com valor de  $\lambda_{\text{máx}}$  igual a 429 nm para ambos os valores de pH.

### 5.3. Curva padrão de calibração da curcumina

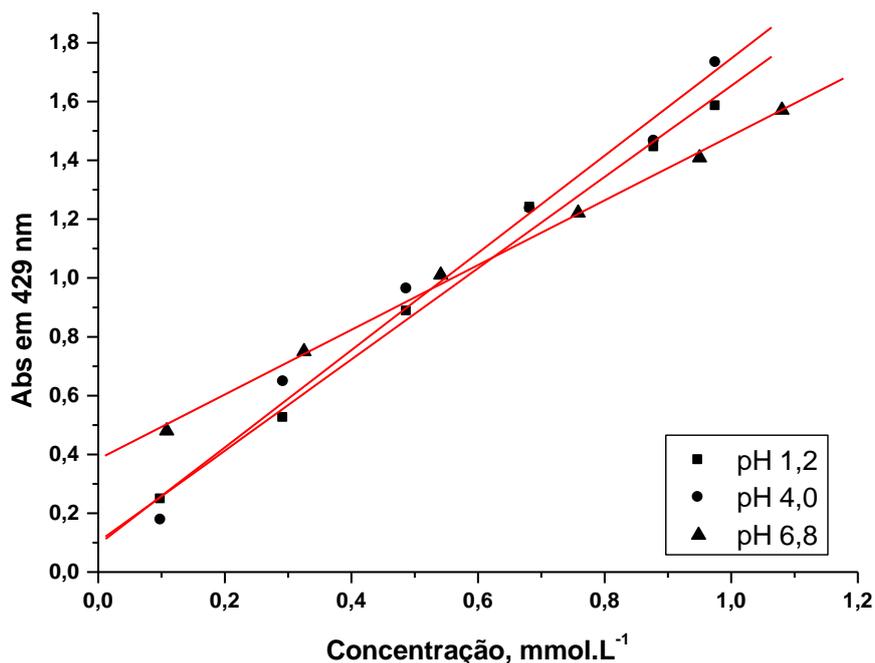
A curva padrão de calibração da curcumina foi determinada utilizando-se a técnica de UV-vis com a finalidade de auxiliar na determinação da taxa de associação da curcumina às nanopartículas, bem como na determinação do estudo de cinética de liberação do corante.

A curva padrão de calibração para a curcumina foi obtida a partir de uma solução do corante, preparada utilizando-se 10 mg de curcumina e dissolvida em solução composta de solução de HCl/etanol, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/etanol e CH<sub>3</sub>COOH/etanol na proporção de 80:20.

A partir das diluições adequadas da solução estoque, foram realizadas as medidas de absorvância no comprimento de onda de 429 nm para cada solução, preparadas nos seguintes pH: HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 1,2, CH<sub>3</sub>COOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 4,0 e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 6,8.

Assim, as curvas padrões de calibração obtidas para a curcumina, em ambas as soluções, estão representadas pela Figura 13. Já na Tabela 5 estão descritos os índices de correlação ( $r^2$ ) obtidos para cada curva padrão de calibração, bem como as equações utilizadas para determinar a concentração das soluções de curcumina.

**Figura 13** - Curva padrão de calibração da curcumina nas soluções de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 1,2, CH<sub>3</sub>COOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 4,0 e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 6,8.



Fonte: Autoria própria.

**Tabela 5** - Dados referente as curvas padrões de calibração ( $y = a + bx$ ) para determinação da concentração das soluções de curcumina.

| pH das soluções | a      | bx      | Índice de correlação ( $r^2$ ) |
|-----------------|--------|---------|--------------------------------|
| 1,2             | 0,1024 | 1551x   | 0,9966                         |
| 4,0             | 0,0932 | 1653,5x | 0,9929                         |
| 6,8             | 0,383  | 1100,2x | 0,9987                         |

Fonte: Autoria própria.

Com base na Tabela 5 e Figura 13, pôde-se observar que ambas as curvas apresentaram um boa correlação entre os pontos, e que possibilitaram a determinação da concentração da curcumina nas soluções de pH 1,2; pH 4,0 e pH 6,8.

#### 5.4. Diâmetro, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas.

Para a análise das características de diâmetro, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas, foram consideradas as condições pré-estabelecidas no item 4.2.4: variação do pH e da concentração da solução de quitosana, bem como a

variação do volume do gelatinizador iônico (SC), e foi utilizada a técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS).

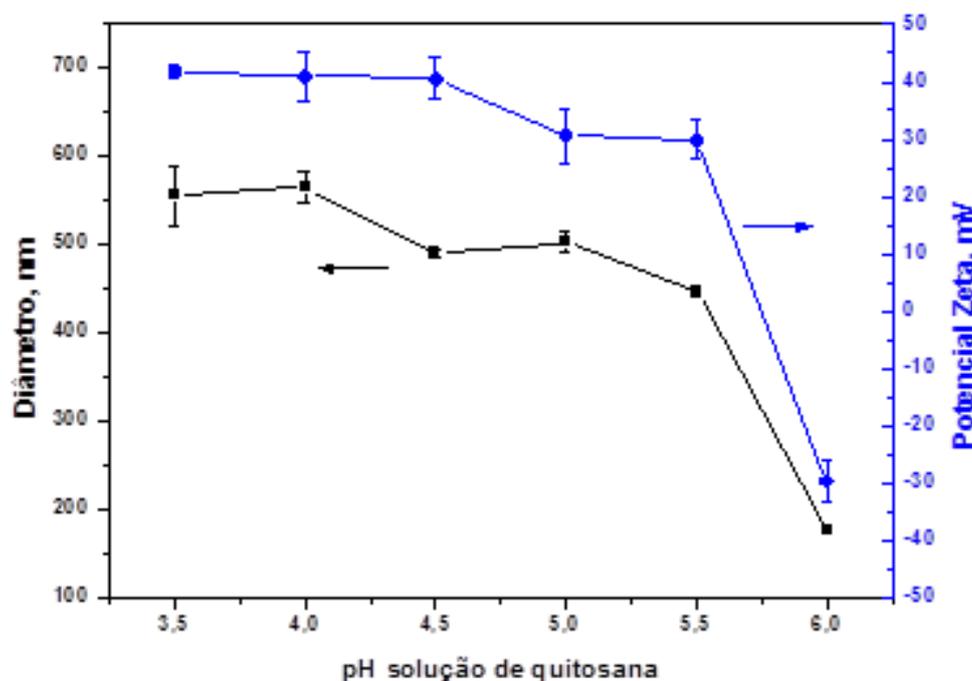
As nanopartículas preparadas pelo método de gelatinização iônica apresentaram baixo índice de polidispersão (PDI), variando de  $0,151 \pm 0,03$  a  $0,563 \pm 0,07$ , indicando homogeneidade na dispersão, já que valores de PDI menores que 0,500 indicam uma dispersão relativamente homogênea, em se tratando de nanopartículas produzidas a partir de polímeros naturais (TAGLIARI, 2012; KULKAMP et al., 2009).

Alguns exemplos de histogramas obtidos do equipamento de espalhamento de luz dinâmico (Nano-Zetasizer – ZS), referente ao diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina puras e contendo curcumina, estão apresentados no anexo, página 116.

#### **5.4.1. Influência do pH da solução de quitosana nas características das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina**

Para a análise do efeito do pH da solução de quitosana nas características das nanopartículas obtidas, este foi variado de 3,5 a 6,0, mantendo-se o volume de quitosana em 10 mL e 15 mL de sulfato de condroitina e a concentração da solução de quitosana em 2,0 mg/mL, o que resultou em nanopartículas com faixa de diâmetro hidrodinâmico entre  $175,7 \pm 2,5$  a  $565,5 \pm 16,5$  nm, uma faixa de polidispersão variando de  $0,153 \pm 0,03$  a  $0,563 \pm 0,07$  e um potencial zeta variando de  $-29,4 \pm 3,5$  a  $+41,8 \pm 1,1$  mV, conforme mostrado na Figura 14 e Tabela 6.

**Figura 14** - Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina em função da variação do pH da solução de quitosana.



Fonte: Autoria própria.

**Tabela 6** - Diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial zeta das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina em função da variação do pH da quitosana.

| pH da solução de QTS | Diâmetro (nm) <sup>a</sup> | PDI <sup>a</sup> | Potencial Zeta (mV) <sup>a</sup> |
|----------------------|----------------------------|------------------|----------------------------------|
| 3,5                  | 555,7 ± 33,7               | 0,495 ± 0,01     | +41,8 ± 1,1                      |
| 4,0                  | 565,5 ± 16,5               | 0,464 ± 0,01     | +40,9 ± 4,1                      |
| 4,5                  | 490,6 ± 3,9                | 0,426 ± 0,02     | +40,6 ± 3,7                      |
| 5,0                  | 502,5 ± 12,1               | 0,339 ± 0,05     | +30,6 ± 4,7                      |
| 5,5                  | 448,5 ± 5,7                | 0,563 ± 0,07     | +29,9 ± 3,4                      |
| 6,0                  | 175,7 ± 2,5                | 0,153 ± 0,03     | -29,4 ± 3,5                      |

<sup>a</sup> análise realizada em triplicata, n=3.

Fonte: Autoria própria.

A partir deste experimento, foi observado que, à medida que se aumentou o pH da solução de quitosana, o diâmetro, o PDI e o potencial zeta das nanopartículas diminuíram significativamente. Isto pode ser justificado porque em meio ácido os grupos amina livres da quitosana ficam protonados, ocorrendo a repulsão mútua entre eles, resultando assim, em uma rede polimérica mais expandida com o sulfato de condroitina, bem como em um aumento no potencial zeta, devido a maior densidade de carga positiva na superfície da quitosana. Com o aumento do pH, a força de repulsão

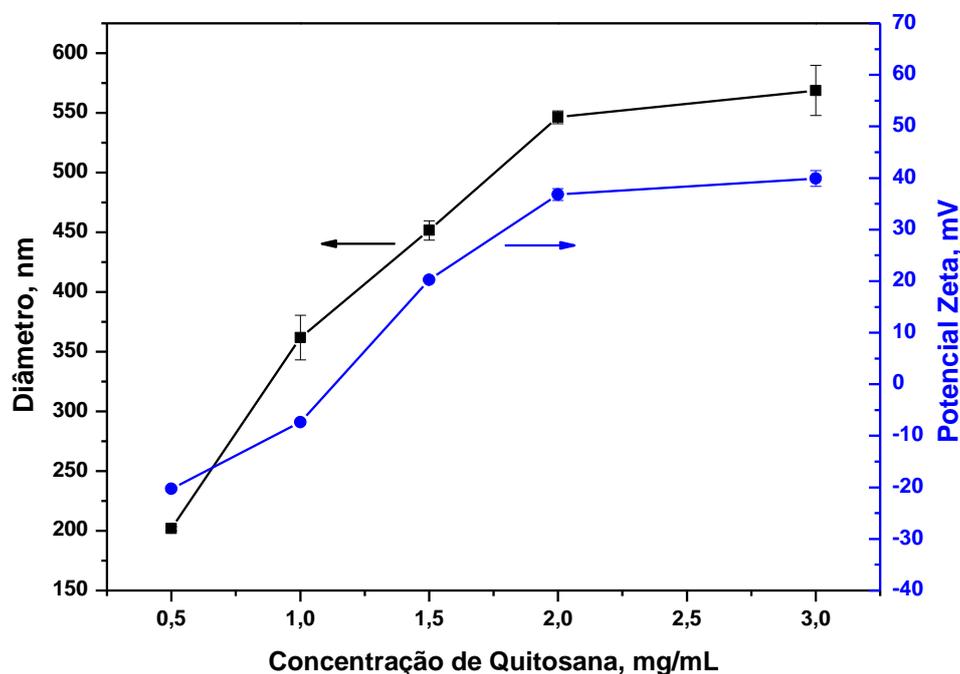
entre os grupos amina livres diminui, favorecendo a formação de nanopartículas menores e provocando uma redução no potencial zeta, já que em valores de pH próximos ao pKa da quitosana (6,3 e 7,2) há uma menor quantidade de grupos amina protonados, disponíveis para interação (TAGLIARI, 2012; TSAI et al., 2011; MARTINS et al., 2010; GONSALVES et al., 2011). Logo, em pH 6,0 as nanopartículas apresentaram um diâmetro e um potencial zeta significativamente menor em comparação com o pH 3,5.

Moura et al. (2008) relataram em seu estudo que o pH do meio influencia no potencial zeta das nanopartículas, pois em pH ácido as nanopartículas adquirem cargas positivas e em pH básico apresentam cargas negativas. Assim, pode-se inferir que, a positividade das nanopartículas está relacionada às características catiônicas da molécula de quitosana, enquanto que a negatividade tem relação com a desprotonação de seus grupos amina em meio mais básico.

#### **5.4.2. Influência da concentração da solução de quitosana nas características das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina**

O segundo parâmetro avaliado na obtenção das NPs, foi a concentração da solução de quitosana, sendo esta variada de 0,5 a 3,0 mg/mL, mantendo-se a solução de QTS em pH 5,0, a concentração de QTS em 2,0 mg/mL e o volume de QTS e de SC em 10 mL e 15 mL, respectivamente. A partir destas condições, observou-se um aumento no diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas formadas, de  $201,8 \pm 1,7$  para  $568,8 \pm 20,9$  nm, uma polidispersidade de  $0,151 \pm 0,03$  a  $0,489 \pm 0,02$  e um potencial zeta variando de  $-20,3 \pm 0,3$  a  $+39,9 \pm 1,5$  mV, conforme apresentado na Figura 15 e Tabela 7.

**Figura 15** - Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina em função da variação da concentração de quitosana.



Fonte: Autoria própria.

**Tabela 7** - Diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial zeta das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina em função da variação da concentração de quitosana.

| Concentração da QTS (mg/mL) | Diâmetro (nm) <sup>a</sup> | PDI <sup>a</sup> | Potencial Zeta (mV) <sup>a</sup> |
|-----------------------------|----------------------------|------------------|----------------------------------|
| 0,5                         | 201,8 ± 1,7                | 0,151 ± 0,03     | -20,3 ± 0,3                      |
| 1,0                         | 361,7 ± 8,8                | 0,207 ± 0,03     | -7,3 ± 0,4                       |
| 1,5                         | 451,5 ± 8,1                | 0,309 ± 0,02     | +20,3 ± 0,4                      |
| 2,0                         | 546,4 ± 5,4                | 0,304 ± 0,01     | +36,8 ± 1,1                      |
| 3,0                         | 568,8 ± 20,9               | 0,489 ± 0,02     | +39,9 ± 1,5                      |

<sup>a</sup> análise realizada em triplicata, n=3.

Fonte: Autoria própria.

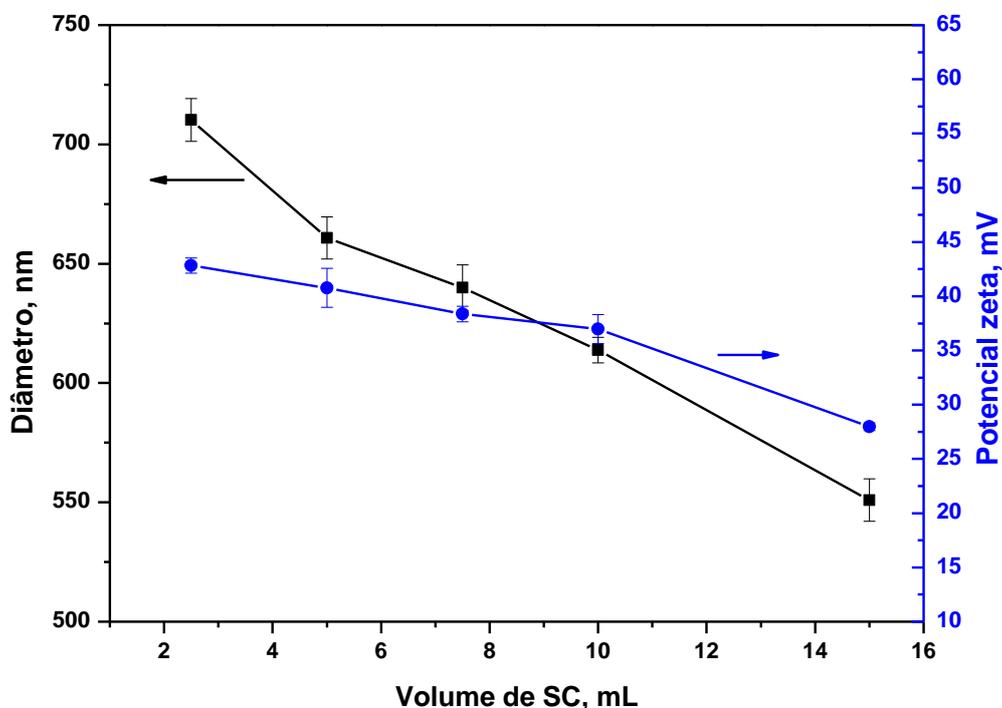
Com base nestes resultados, pôde-se observar que à medida que aumenta a concentração da solução de quitosana, aumenta-se também o tamanho, o PDI e o potencial zeta das nanopartículas formadas, já que uma maior concentração de quitosana em solução implica em uma maior densidade de grupos amina livres, provocando maior repulsão e em consequência um aumento na rede polimérica formada e no potencial zeta das nanopartículas. Já a baixa concentração de quitosana diminui a densidade de carga positivas provenientes dos grupos amina protonados, fazendo com que o potencial zeta

da nanopartícula adquira carga negativa (BAO et al., 2008; CHUAH et al., 2009; TSAI et al., 2011b).

#### 5.4.3. Influência do volume de sulfato de condroitina nas características das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina

Foi avaliada também, a influência do volume do SC na obtenção e característização das nanopartículas. Quando se variou o volume de SC, adicionado no preparo das nanopartículas de 2,5 a 15 mL, mantendo-se a concentração de quitosana em 2,0 mg/mL, o pH da solução de quitosana em 5,0 e o volume de quitosana igual a 10 mL, pôde-se observar uma variação no tamanho das nanopartículas de  $550,9 \pm 8,9$  a  $710,2 \pm 8,9$  nm, um PDI na faixa de  $0,244 \pm 0,04$  a  $0,525 \pm 0,06$  e uma variação no potencial zeta de  $+27,9 \pm 0,3$  a  $+42,8 \pm 0,7$ , conforme apresentado na Figura 16 e Tabala 8.

**Figura 16** - Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina em função da variação do volume de sulfato de condroitina.



Fonte: Autoria própria.

**Tabela 8** - Diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial zeta das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina em função da variação do volume de sulfato de condroitina.

| Volume de SC (mL) | Diâmetro (nm) <sup>a</sup> | PDI <sup>a</sup> | Potencial Zeta (mV) <sup>a</sup> |
|-------------------|----------------------------|------------------|----------------------------------|
| 2,5               | 710,2 ± 8,9                | 0,525 ± 0,06     | +42,8 ± 0,7                      |
| 5,0               | 660,8 ± 8,8                | 0,367 ± 0,04     | +40,7 ± 1,7                      |
| 7,5               | 640,1 ± 9,5                | 0,327 ± 0,04     | +38,4 ± 0,8                      |
| 10,0              | 613,8 ± 5,4                | 0,244 ± 0,04     | +36,9 ± 1,3                      |
| 15,0              | 550,9 ± 8,9                | 0,412 ± 0,06     | +27,9 ± 0,3                      |

<sup>a</sup> análise realizada em triplicata, n=3.

Fonte: A autoria própria.

As variações no tamanho, no PDI e no potencial zeta das nanopartículas observadas nos resultados deste experimento, podem ser justificadas pelo aumento ou diminuição dos grupos na forma de  $\text{NH}_3^+$  presentes na superfície da quitosana e dos grupos na forma de  $\text{SO}_3^-$ , provenientes do sulfato de condroitina, pois à medida que diminui a densidade desses grupos livres na superfície dos polímeros, o tamanho, o PDI e o potencial zeta das nanopartículas também diminuem. Já a presença de maior densidade de grupos na forma de  $\text{NH}_3^+$  ou  $\text{SO}_3^-$  livres, provoca repulsão eletrostática e, conseqüentemente, um aumento no tamanho da rede polimérica formada e no potencial zeta das nanopartículas.

#### 5.4.4. Influência do pH da solução de quitosana nas características das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina contendo curcumina

Para análise do diâmetro, PDI e potencial zeta das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina contendo curcumina manteve-se a concentração de quitosana em 2,0 mg/mL, e o volume do sulfato de condroitina e da quitosana em 15 mL e 10 mL respectivamente, avaliando-se desta forma, apenas o efeito do pH da solução de quitosana, que variou em 4,0; 5,0 e 6,0, conforme mostrado nas Tabelas 9 e 10.

**Tabela 9** - Diâmetro hidrodinâmico e PDI das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina puras e contendo curcumina em função da variação do pH da quitosana.

| Amostra                | pH da Solução Polimérica   |                  |                            |                  |                            |                  |
|------------------------|----------------------------|------------------|----------------------------|------------------|----------------------------|------------------|
|                        | 4,0                        |                  | 5,0                        |                  | 6,0                        |                  |
|                        | Diâmetro (nm) <sup>a</sup> | PDI <sup>a</sup> | Diâmetro (nm) <sup>a</sup> | PDI <sup>a</sup> | Diâmetro (nm) <sup>a</sup> | PDI <sup>a</sup> |
| NPs puras              | 565.5 ± 16.5               | 0.464 ± 0.01     | 502.5 ± 12.1               | 0.339 ± 0.05     | 175.7 ± 2.5                | 0.153 ± 0.03     |
| NPs contendo Curcumina | 599.7 ± 11.5               | 0.544 ± 0.09     | 588,6 ± 16.7               | 0.511 ± 0.07     | 474 ± 16.8                 | 0.401 ± 0.02     |

<sup>a</sup> análise realizada em triplicata, n=3.

Fonte: Autoria própria.

**Tabela 10** - Potencial zeta das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina puras e contendo curcumina em função da variação do pH da quitosana.

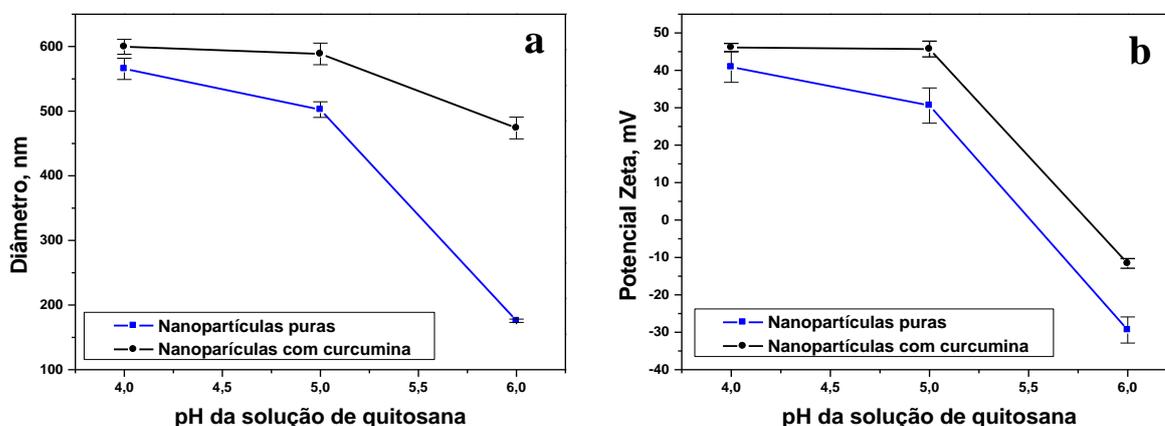
| Amostra                | pH da Solução Polimérica         |                                  |                                  |
|------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
|                        | 4,0                              | 5,0                              | 6,0                              |
|                        | Potencial Zeta (mV) <sup>a</sup> | Potencial Zeta (mV) <sup>a</sup> | Potencial Zeta (mV) <sup>a</sup> |
| NPs puras              | +40.9 ± 4.1                      | +30.6 ± 4.7                      | -29.4 ± 3.5                      |
| NPs contendo Curcumina | +46.1 ± 1.1                      | +45.7 ± 2.1                      | -11.6 ± 1.3                      |

<sup>a</sup> análise realizada em triplicata, n=3.

Fonte: Autoria própria.

A partir dos dados obtidos, observou-se que ao aumentar o pH da solução de quitosana, o diâmetro, o PDI e o potencial zeta das NPs de QTS/SC contendo curcumina diminuí. Além disso, pôde-se observar que ao adicionar o ativo (curcumina) as características das nanopartículas aumentaram, quando comparado as nanopartículas sem o ativo, o que também pode ser confirmado na Figura 17.

**Figura 17** - Características das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina puras e contendo curcumina em função da variação do pH da solução de quitosana: Diâmetro hidrodinâmico (a) e potencial zeta (b).



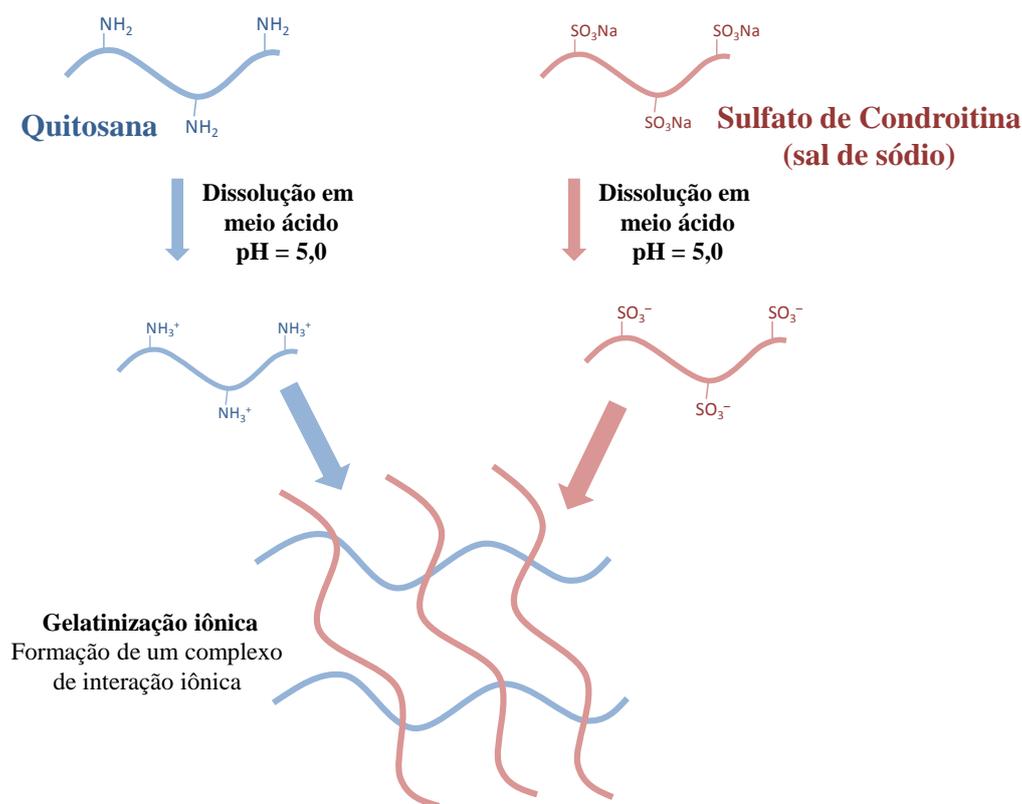
Fonte: Autoria própria.

O aumento nas características das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina contendo curcumina em comparação as nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina puras pode ser justificado devido à interação dos grupos  $\text{NH}_3^+$  da quitosana com os grupos fenólicos do corante.

### 5.5. Preparação das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina e quitosana / sulfato de condroitina contendo curcumina

Neste estudo, a suspensão coloidal de nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina foi obtida pela interação eletrostática entre os grupos amina carregados positivamente da quitosana em meio ácido com os grupos sulfônicos carregados negativamente, advindos do sulfato de condroitina, conforme mostrado na Figura 18.

**Figura 18** - Formação de nanopartículas quitosana / sulfato de condroitina através do método de gelatinização iônica.



Fonte: Autoria própria.

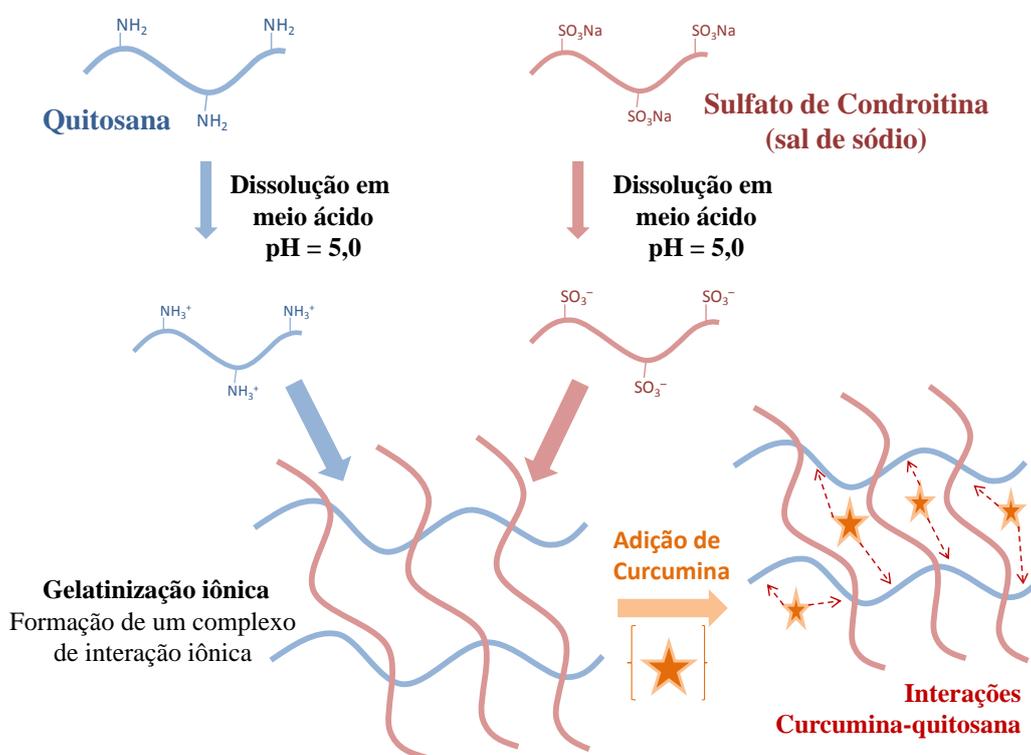
Com a finalidade de promover a interação entre os dois polímeros, bem como de se obter uma distribuição estreita e um menor tamanho das nanopartículas formadas,

foram consideradas as condições pré-estabelecidas no item 4.2.4, observando-se que as NPs de QTS/SC apresentaram maior estabilidade coloidal, quando a solução de quitosana estava no pH 5,0, concentração de quitosana igual a 2,0 mg/mL e quando foi adicionado 15 mL de sulfato de condroitina no preparo das nanopartículas.

Ao serem submetidas a estas condições as nanopartículas apresentaram tamanho similar, uma distribuição estreita aproximada e um potencial zeta médio positivo, com valor em módulo igual a +31,8mV, o que significa que houve maior interação entres os grupos amina livres da quitosana e os grupos sulfônicos do sulfato de condroitina. Além disso, o potencial zeta positivo é considerado uma vantagem do ponto de vista biofarmacêutico, pois favorece a bioadesão das nanopartículas a superfície celular e as junções da pele carregada negativamente, facilitando assim as interações com as membranas biológicas fosfolipídicas (SCHAFFAZICK et al., 2003; YENILMEZ et al., 2011).

Já a obtenção das NPs de QTS/SC/Curcumina (Figura 19), ocorreu pela adição da solução etanólica de curcumina na solução de quitosana, antes da interação com o sulfato de condroitina.

**Figura 19** - Formação de nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina contendo curcumina através do método de gelatinização iônica.



Fonte: Autoria própria.

A formação das nanopartículas foi observada pelo aparecimento da opalescência na solução final. A forma sólida das NPs de QTS/SC, obtidas por meio do processo de liofilização, teve a aparência de pó fino e esbranquiçado, já as NPs de QTS/SC/Curcumina, também tiveram a aparência de pó amarelado, cor característica do flavanóide.

Com isto, verificou-se que o método de gelatinização iônica é um método eficaz, simples, rápido e reprodutível, não necessitando de equipamentos sofisticados para obtenção de nanopartículas poliméricas. Além disso, possibilita o desenvolvimento de nanopartículas de forma controlada, alcançando desta forma a propriedade desejada, como tamanho e potencial zeta da partícula.

## **5.6. Caracterização das nanopartículas**

### **5.6.1. Estabilidade físico-química das nanopartículas em suspensão**

Até alguns meses após a preparação, as suspensões coloidais normalmente não apresentam tendência à separação de fases, pois o processo de sedimentação é lento para partículas submicrométricas e minimizado pelo movimento browniano. No entanto, em períodos de armazenamento prolongados pode ocorrer a aglomeração das partículas e, conseqüentemente, a sedimentação tornando a aplicabilidade das nanopartículas dispersas em meio aquoso limitada, devido aos problemas de baixa estabilidade físico-química (SCHAFFAZICK et al., 2003; KUMARI et al., 2010; KULKAMP et al., 2009).

Sabendo-se disso, este trabalho avaliou a estabilidade físico-química das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina puras e contendo curcumina, por meio do monitoramento do diâmetro hidrodinâmico, do índice de polidispersão e do potencial zeta nos tempos 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas. As nanopartículas foram preparadas variando o pH da solução polimérica de quitosana em 4,0; 5,0 e 6,0 e acondicionadas em duas diferentes temperaturas: -2°C e 25°C.

A distribuição do tamanho das nanopartículas caracteriza a tendência a sedimentação e a agregação destas, permitindo desta forma avaliar a estabilidade do sistema ao longo do tempo (SCHAFFAZICK et al., 2003; PAPINI, 2003; XU, 2007).

Assim sendo, os dados obtidos no estudo de estabilidade coloidal, considerando o parâmetro diâmetro para as NPs de QTS/SC puras e NPs de QTS/SC contendo curcumina, estão apresentados nas Tabelas 11 e 12.

**Tabela 11** - Diâmetro hidrodinâmico e PDI das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina preparadas com solução de quitosana em pH 4,0; 5,0 e 6,0 e acondicionadas a temperatura de -2°C e 25°C por um período de 120 horas.

| Tempo (h) |     | Temperatura -2°C           |                  | Temperatura 25°C           |                  |
|-----------|-----|----------------------------|------------------|----------------------------|------------------|
|           |     | Diâmetro (nm) <sup>a</sup> | PDI <sup>a</sup> | Diâmetro (nm) <sup>a</sup> | PDI <sup>a</sup> |
| pH 4,0    | 0   | 565,5 ± 16,5               | 0,464 ± 0,01     | 565,5 ± 16,5               | 0,464 ± 0,01     |
|           | 24  | 598,5 ± 23,4               | 0,586 ± 0,03     | 546,4 ± 20,5               | 0,559 ± 0,04     |
|           | 48  | 582,6 ± 16,6               | 0,536 ± 0,06     | 595,1 ± 17,4               | 0,428 ± 0,17     |
|           | 72  | 620,6 ± 15,8               | 0,563 ± 0,02     | 635,8 ± 12,9               | 0,538 ± 0,02     |
|           | 96  | 618,2 ± 17,3               | 0,509 ± 0,04     | 605,1 ± 18,2               | 0,468 ± 0,09     |
|           | 120 | 568,6 ± 20,6               | 0,580 ± 0,03     | 492,2 ± 2,1                | 0,550 ± 0,03     |
| pH 5,0    | 0   | 502,5 ± 12,1               | 0,339 ± 0,05     | 502,5 ± 12,1               | 0,339 ± 0,05     |
|           | 24  | 592,3 ± 2,9                | 0,513 ± 0,04     | 477,1 ± 2,3                | 0,379 ± 0,04     |
|           | 48  | 563,4 ± 10,9               | 0,466 ± 0,06     | 580,3 ± 22,8               | 0,545 ± 0,03     |
|           | 72  | 560,3 ± 20,8               | 0,505 ± 0,01     | 572,2 ± 14,8               | 0,526 ± 0,01     |
|           | 96  | 564,0 ± 18,3               | 0,495 ± 0,07     | 518,7 ± 9,1                | 0,326 ± 0,07     |
|           | 120 | 605,9 ± 9,6                | 0,411 ± 0,03     | 480,2 ± 3,4                | 0,334 ± 0,05     |
| pH 6,0    | 0   | 175,7 ± 2,5                | 0,135 ± 0,03     | 175,7 ± 2,5                | 0,135 ± 0,03     |
|           | 24  | 580,3 ± 6,5                | 0,489 ± 0,01     | 446,4 ± 2,6                | 0,307 ± 0,03     |
|           | 48  | 558,5 ± 4,1                | 0,413 ± 0,05     | 435,5 ± 3,6                | 0,289 ± 0,01     |
|           | 72  | 551,4 ± 9,7                | 0,565 ± 0,03     | 467,2 ± 6,9                | 0,321 ± 0,01     |
|           | 96  | 536,9 ± 6,6                | 0,536 ± 0,01     | 430,0 ± 6,5                | 0,300 ± 0,03     |
|           | 120 | 560,7 ± 20,5               | 0,449 ± 0,07     | 399,9 ± 8,3                | 0,311 ± 0,03     |

<sup>a</sup> análise realizada em triplicata, n=3.

Fonte: Autoria própria.

**Tabela 12** - Diâmetro hidrodinâmico e PDI das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina contendo curcumina preparadas com solução de quitosana em pH 4,0; 5,0 e 6,0 e acondicionadas a temperatura de -2°C e 25°C por um período de 120 horas.

| Tempo (h) |     | Temperatura -2°C           |                  | Temperatura 25°C           |                  |
|-----------|-----|----------------------------|------------------|----------------------------|------------------|
|           |     | Diâmetro (nm) <sup>a</sup> | PDI <sup>a</sup> | Diâmetro (nm) <sup>a</sup> | PDI <sup>a</sup> |
| pH 4,0    | 0   | 599,7 ± 11,5               | 0,544 ± 0,09     | 599,7 ± 11,5               | 0,544 ± 0,09     |
|           | 24  | 660,8 ± 0,9                | 0,558 ± 0,02     | 622,4 ± 9,1                | 0,522 ± 0,09     |
|           | 48  | 658,3 ± 6,9                | 0,434 ± 0,01     | 616,1 ± 4,1                | 0,562 ± 0,01     |
|           | 72  | 712,6 ± 7,7                | 0,553 ± 0,01     | 719,9 ± 7,6                | 0,488 ± 0,08     |
|           | 96  | 735,3 ± 28,2               | 0,560 ± 0,01     | 675,1 ± 11,8               | 0,521 ± 0,07     |
|           | 120 | 797,2 ± 12,5               | 0,602 ± 0,02     | 588,9 ± 3,9                | 0,495 ± 0,01     |
| pH 5,0    | 0   | 588,6 ± 16,7               | 0,511 ± 0,07     | 588,6 ± 16,7               | 0,511 ± 0,07     |
|           | 24  | 521,2 ± 6,1                | 0,417 ± 0,04     | 584,1 ± 8,2                | 0,497 ± 0,02     |
|           | 48  | 534,6 ± 31,4               | 0,380 ± 0,09     | 638,1 ± 25,6               | 0,461 ± 0,03     |
|           | 72  | 616,3 ± 8,6                | 0,500 ± 0,01     | 681,7 ± 8,1                | 0,520 ± 0,01     |
|           | 96  | 744,3 ± 18,1               | 0,503 ± 0,03     | 612,9 ± 24,8               | 0,478 ± 0,04     |
|           | 120 | 655,1 ± 8,3                | 0,433 ± 0,01     | 494,3 ± 10,6               | 0,470 ± 0,09     |
| pH 6,0    | 0   | 474,0 ± 16,8               | 0,401 ± 0,02     | 474,0 ± 16,8               | 0,401 ± 0,02     |
|           | 24  | 484,8 ± 29,7               | 0,514 ± 0,05     | 461,6 ± 18,2               | 0,353 ± 0,06     |
|           | 48  | 506,2 ± 9,9                | 0,443 ± 0,02     | 553,3 ± 11,7               | 0,399 ± 0,04     |
|           | 72  | 577,5 ± 14,2               | 0,463 ± 0,02     | 497,1 ± 15,3               | 0,438 ± 0,05     |
|           | 96  | 547,8 ± 16,7               | 0,481 ± 0,08     | 496,6 ± 15,9               | 0,550 ± 0,01     |
|           | 120 | 495,9 ± 7,2                | 0,388 ± 0,03     | 505,2 ± 22,9               | 0,388 ± 0,02     |

<sup>a</sup> análise realizada em triplicata, n=3.

Fonte: Autoria própria.

Ao avaliar os parâmetros diâmetro hidrodinâmico e PDI, pôde-se observar que, todas as nanopartículas analisadas apresentaram variações pouco significativas em relação a estas características, independentemente da temperatura de acondicionamento, indicando a formação de poucos aglomerados. Além disso, observou-se uma redução no diâmetro no último tempo avaliado (120 horas) na maioria das nanopartículas com e sem ativo. Isto se deve ao fato da quitosana ser biodegradável, ou seja, com o passar do tempo ocorreu à degradação do polímero. Observou-se ainda, que as NPs de QTS/SC puras e contendo curcumina, preparadas em solução de quitosana, em pH 6,0, apresentaram menor estabilidade físico-química, quando comparada as NPs com solução de quitosana em pH 4,0 e 5,0 e que a NPs, preparadas com solução de quitosana em pH 5,0, apresentaram-se mais estável nas diferentes temperaturas de acondicionamento, pois houve menor variação nas características observadas durante as 120 horas.

O segundo parâmetro avaliado, cujos dados estão apresentados na Tabela 13, foi o potencial zeta para todas as nanopartículas, que pode ser alterado de acordo com o pH, meio dispersante, composição da partícula e a força iônica presente na solução. Assim, as nanopartículas com valores de potencial zeta relativamente alto, maiores que  $\pm 30$  mV, confere uma boa estabilidade físico-química ao sistema coloidal, fazendo com que este resista mais facilmente à agregação (MELO et al., 2010; SCHAFFAZICK et al., 2003; KULKAMP et al., 2009; KUMARI et al., 2010).

**Tabela 13** - Potencial zeta das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina puras e contendo curcumina preparadas com solução de quitosana em pH 4,0; 5,0 e 6,0 e acondicionadas a temperatura de  $-2^{\circ}\text{C}$  e  $25^{\circ}\text{C}$  por um período de 120 horas.

| Tempo (h) |     | NPs de QTS/SC                    |                                  | NPs de QTS/SC/Curcumina          |                                  |
|-----------|-----|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
|           |     | Temperatura $-2^{\circ}\text{C}$ | Temperatura $25^{\circ}\text{C}$ | Temperatura $-2^{\circ}\text{C}$ | Temperatura $25^{\circ}\text{C}$ |
|           |     | Potencial zeta (mV) <sup>a</sup> |
| pH 4,0    | 0   | $+40,9 \pm 4,1$                  | $+40,9 \pm 4,1$                  | $+46,1 \pm 1,1$                  | $+46,1 \pm 1,1$                  |
|           | 24  | $+42,1 \pm 4,2$                  | $+46,1 \pm 1,1$                  | $+47,3 \pm 1,6$                  | $+51,8 \pm 0,7$                  |
|           | 48  | $+46,5 \pm 1,8$                  | $+45,5 \pm 3,9$                  | $+44,9 \pm 4,1$                  | $+46,5 \pm 0,6$                  |
|           | 72  | $+41,1 \pm 0,9$                  | $+41,4 \pm 2,6$                  | $+42,6 \pm 0,7$                  | $+45,5 \pm 0,5$                  |
|           | 96  | $+47,6 \pm 0,6$                  | $+47,6 \pm 1,2$                  | $+37,1 \pm 0,7$                  | $+46,1 \pm 0,5$                  |
|           | 120 | $+48,7 \pm 0,5$                  | $+46,0 \pm 1,9$                  | $+47,9 \pm 1,6$                  | $+48,4 \pm 0,3$                  |
| pH 5,0    | 0   | $+30,6 \pm 4,7$                  | $+30,6 \pm 4,7$                  | $+45,7 \pm 2,1$                  | $+45,7 \pm 2,1$                  |
|           | 24  | $+42,5 \pm 1,9$                  | $+43,6 \pm 0,9$                  | $+49,5 \pm 0,6$                  | $+45,4 \pm 0,8$                  |
|           | 48  | $+43,5 \pm 2,2$                  | $+41,3 \pm 0,2$                  | $+49,1 \pm 1,7$                  | $+41,9 \pm 0,7$                  |
|           | 72  | $+33,2 \pm 0,1$                  | $+40,6 \pm 0,6$                  | $+40,2 \pm 1,2$                  | $+46,0 \pm 0,8$                  |
|           | 96  | $+39,7 \pm 1,3$                  | $+40,7 \pm 0,6$                  | $+49,2 \pm 1,2$                  | $+44,1 \pm 0,9$                  |
|           | 120 | $+37,1 \pm 0,5$                  | $+38,1 \pm 0,6$                  | $+41,2 \pm 2,7$                  | $+41,4 \pm 0,8$                  |
| pH 6,0    | 0   | $-29,4 \pm 3,5$                  | $-29,4 \pm 3,5$                  | $-11,6 \pm 1,3$                  | $-11,6 \pm 1,3$                  |
|           | 24  | $-41,3 \pm 0,7$                  | $-39,4 \pm 0,1$                  | $-31,9 \pm 0,8$                  | $-27,7 \pm 0,8$                  |
|           | 48  | $-37,5 \pm 2,2$                  | $-38,6 \pm 0,8$                  | $-36,6 \pm 0,7$                  | $-40,7 \pm 0,5$                  |
|           | 72  | $-30,1 \pm 1,4$                  | $-40,4 \pm 0,4$                  | $-33,6 \pm 0,4$                  | $-40,9 \pm 0,3$                  |
|           | 96  | $-37,4 \pm 0,4$                  | $-37,0 \pm 0,6$                  | $-36,9 \pm 1,8$                  | $-36,2 \pm 0,8$                  |
|           | 120 | $-36,2 \pm 0,9$                  | $-33,3 \pm 0,9$                  | $-32,7 \pm 1,2$                  | $-37,9 \pm 0,4$                  |

<sup>a</sup> análise realizada em triplicata, n=3.

Fonte: Autoria própria.

Com base nos dados obtidos, pôde-se observar que as NPs, de maneira geral, apresentaram-se estáveis em relação ao potencial zeta, pois as variações observadas se mostraram pouco significativas ao longo do tempo analisado. Para as NPs de QTS/SC puras e contendo curcumina, preparadas em pH 4,0 e 5,0, da solução de quitosana, foi observado um potencial zeta positivo, já para as NPs de QTS/SC puras e contendo

curcumina, preparadas em pH 6,0, da solução de quitosana foi observado um potencial zeta negativo, devido à menor quantidade de grupos amina da QTS protonados. No entanto, em ambas, foi observado um valor de potencial zeta em módulo relativamente alto, indicando desta forma, boa estabilidade coloidal.

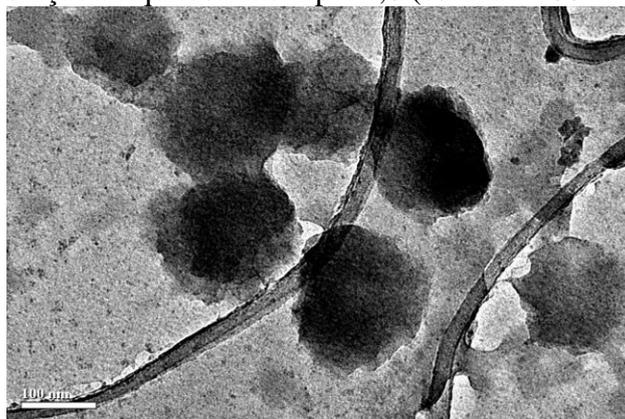
Embora tenha sido observadas variações nas características das nanopartículas ao longo do estudo da estabilidade físico-química, não se pode afirmar que a temperatura teve influência direta nas variações do diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial zeta das nanopartículas, pois as variações sofridas por estas se mostraram pouco significativas nas diferentes temperaturas de acondicionamento. A partir dos parâmetros pré-estabelecidos, verificou-se que as nanopartículas apresentaram-se relativamente estáveis. No entanto, como se trata de uma suspensão coloidal de nanopartículas, que está mais propensa à agregação e sedimentação ao longo do tempo, se faz necessário a realização de um acompanhamento destes, e de outros parâmetros, por um período de tempo superior ao estudado.

### **5.6.2. Avaliação morfológica das nanopartículas**

Neste estudo, empregou-se a técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) com a finalidade de verificar o tamanho e a morfologia das nanopartículas preparadas por meio do método de gelatinização iônica. Não foi possível realizar a contagem das nanopartículas, uma vez que não obtivemos muitos perfis com qualidade que poderiam ser utilizados para tal finalidade.

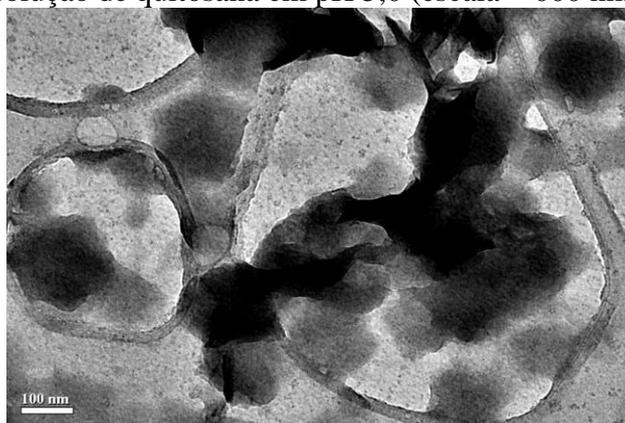
As Figuras 20, 21 e 22 representam as micrografias obtidas para as nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina, preparadas com solução de quitosana em pH 4,0; 5,0 e 6,0.

**Figura 20** - Microscopia eletrônica de transmissão da nanopartícula de QTS/SC com solução de quitosana em pH 4,0 (escala = 100 nm).



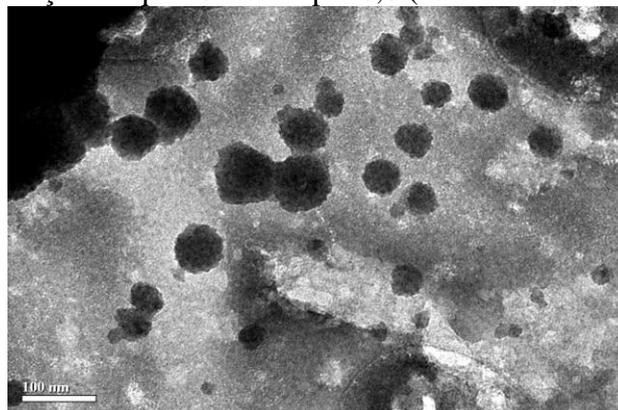
Fonte: Autoria própria.

**Figura 21** - Microscopia eletrônica de transmissão da nanopartícula de QTS/SC com solução de quitosana em pH 5,0 (escala = 100 nm).



Fonte: Autoria própria.

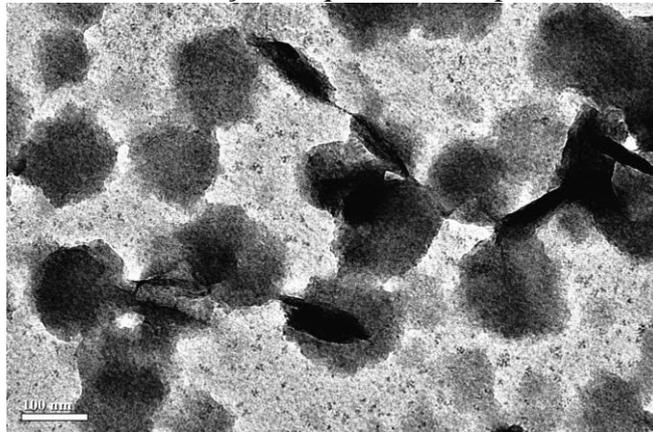
**Figura 22** - Microscopia eletrônica de transmissão da nanopartícula de QTS/SC com solução de quitosana em pH 6,0 (escala = 100 nm).



Fonte: Autoria própria.

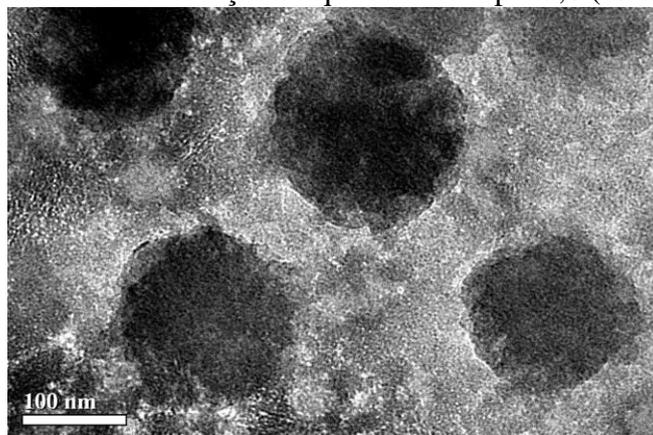
Nas Figuras 23, 24 e 25 estão representadas as micrografias obtidas para as nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina contendo curcumina, preparadas com solução de quitosana em pH 4,0; 5,0 e 6,0.

**Figura 23** - Microscopia eletrônica de transmissão da nanopartícula de QTS/SC contendo curcumina com solução de quitosana em pH 4,0 (escala = 100 nm).



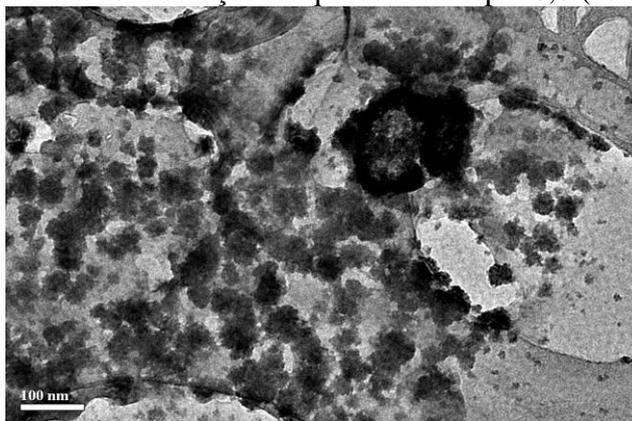
Fonte: Autoria própria.

**Figura 24** - Microscopia eletrônica de transmissão da nanopartícula de QTS/SC contendo curcumina com solução de quitosana em pH 5,0 (escala = 100 nm).



Fonte: Autoria própria.

**Figura 25** - Microscopia eletrônica de transmissão da nanopartícula de QTS/SC contendo curcumina com solução de quitosana em pH 6,0 (escala = 100 nm).



Fonte: Autoria própria.

As micrografias, obtidas por microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina puras e contendo curcumina nos diferentes pHs da solução de quitosana, revelam a formação de nanopartículas esféricas e compactas.

Entretanto, em todas as micrografias, o tamanho das nanopartículas mostrou-se inferior àqueles obtidos nas análises de DLS, o que pode estar relacionado à visualização de apenas uma população de partículas no microscópio ou a formação de aglomerados durante a medida de diâmetro.

Outro fator que justifica a redução no tamanho das nanopartículas na análise de MET é que a suspensão das nanopartículas é gotejada sobre uma tela de cobre e, então desidratada para ser analisada. Com isto, a água presente dentro das nanopartículas é eliminada, causando uma contração e, conseqüentemente uma redução no seu tamanho. Ou seja, a microscopia eletrônica de transmissão fornece uma imagem da partícula isolada do meio, enquanto que a técnica de espalhamento de luz dinâmico possibilita a determinação do diâmetro hidrodinâmico das partículas em suspensão (SCHAFFAZICK et al., 2003; GERELLI et al., 2008; CHUAH et al., 2009).

Em relação à morfologia das nanopartículas, destacou-se certa semelhança entre as nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina puras e contendo curcumina, já que estas apresentaram uma morfologia heterogênea. Este fato pôde ser visualizado pela presença de regiões claras e escuras nas micrografias, o que sugere a falta de homogeneidade (GERELLI et al., 2008; CHUAH et al., 2009).

### 5.6.3. Taxa de Associação da curcumina às nanopartículas (%TA)

A determinação da taxa de associação de fármacos presentes nas nanopartículas é fundamental, porém complexa, devido à dificuldade em separar o fármaco livre do associado, em função da natureza coloidal e do tamanho reduzido dos carreadores (SCHAFFAZICK et al., 2003; BOONSONGRIT et al., 2006; GAN et al., 2007; KUMARI et al., 2010).

Há diversos fatores que influenciam a quantidade de fármacos associado às nanopartículas, dentre os quais se destacam: as características físico-químicas do fármaco, o pH do meio, as características da superfícies das partículas ou a natureza do polímero, a quantidade de fármaco adicionada à formulação, a ordem de adição do fármaco na formulação das nanopartículas, bem como o tipo de surfactante utilizado (SCHAFFAZICK et al., 2003; KUMARI et al., 2010).

Para determinação da taxa de associação da curcumina às nanopartículas produzidas pelo método de gelatinização iônica, variou-se o pH da solução polimérica de quitosana em 4,0; 5,0 e 6,0. Deste modo, a taxa de associação (%TA) do corante foi calculada com base na relação entre a quantidade de curcumina associada e a quantidade total de curcumina adicionada no preparo das nanopartículas, conforme a equação 2, ocorrendo pequena variação entre os valores obtidos para os diferentes pHs, conforme apresentado na Tabela 14.

**Tabela 14** - Taxa de associação da curcumina às nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina.

| pH da solução de QTS | Curcumina adicionada (mg) | Curcumina incorporada (mg) <sup>a</sup> | Taxa de Associação (%TA) <sup>a</sup> |
|----------------------|---------------------------|---|---------------------------------------|
| 4,0                  | 11,0                      | 6,86 ± 0,04                             | 62,3 ± 0,21%                          |
| 5,0                  | 11,0                      | 7,03 ± 0,03                             | 63,9 ± 0,26%                          |
| 6,0                  | 12,0                      | 8,22 ± 0,02                             | 68,5 ± 0,18%                          |

<sup>a</sup> análise realizada em triplicata, n=3.

Fonte: Autoria própria.

A partir dos dados obtidos, pôde-se verificar que, de fato o pH do meio influencia de forma direta na taxa de associação do fármaco, pois houve uma maior associação do corante às nanopartículas quando aumentou-se o pH da solução polimérica de quitosana.

O aumento do pH da solução de quitosana tende a diminuir a quantidade de grupos na forma de  $\text{NH}_3^+$  livres na superfície do polímero, provocando desta forma uma

redução no diâmetro hidrodinâmico e no potencial zeta das nanopartículas e, conseqüentemente, uma maior interação eletrostática entre o polímero e a curcumina. Além disso, em valores de pH, próximos ao neutro, a curcumina apresenta-se mais solúvel e disponível a interação com as NPs de QTS/SC.

Em pH 6,0 da solução de quitosana as nanopartículas apresentaram uma redução no potencial zeta, o que favoreceu o aumento da taxa de associação da curcumina às nanopartículas, já que uma redução no potencial zeta da nanopartícula é concordante com o aumento da taxa de associação do fármaco, sugerindo assim a ocorrência de uma interação eletrostática entre o fármaco e o polímero (SCHAFFAZICK et al., 2003)

Outro fator que influenciou na associação da substância ativa com o polímero, foi à ordem de adição da curcumina. Na preparação das nanopartículas, pelo método de gelatinização iônica, a curcumina é primeiramente adicionada à solução de quitosana e em seguida adiciona-se o sulfato de condroitina. O fato de a curcumina ser adicionada antes da formação das nanopartículas faz com que ela se ligue aos grupos amina da quitosana, e com a posterior adição do SC, este ocupa os sítios restantes, aprisionando a curcumina dentro da partícula, devido à formação de uma rede polimérica. Desta forma, o sulfato de condroitina tem um papel importante na taxa de associação do corante às nanopartículas. Dados semelhantes aos observados neste estudo foram obtidos por Das et al. (2011), em que, nanopartículas de quitosana/alginate foram utilizadas para encapsular curcumina.

Anitha et al. (2011b), determinaram a eficiência de encapsulação da curcumina em nanopartículas de quitosana/sulfato de dextrano, por meio do método de espectrofotometria de UV-vis, em comprimento de onda máximo de 427 nm. As nanopartículas preparadas pelo método de coacervação apresentaram um tamanho médio de 200 a 220 nm, com um valor de potencial zeta igual a -30 mV, e eficácia de encapsulação da curcumina de aproximadamente 74%, indicando que a redução no diâmetro e no potencial zeta das nanopartículas proporcionam uma maior eficiência de encapsulação.

Tsai et al. (2011), estudaram a eficiência de encapsulação da curcumina em nanopartículas de PLGA por meio do método de HPLC, observando que o diâmetro da nanopartícula tem influência direta na eficiência de encapsulação do corante. Neste estudo eles prepararam nanopartículas pelo método de emulsificação e obtiveram os seguintes dados: diâmetro igual a  $163 \pm 8,1$  nm, PDI igual a  $0,053 \pm 0,021$ , potencial zeta de  $-12,5 \pm 2,8$  mV e eficiência de encapsulação de  $46,9 \pm 8,2\%$ .

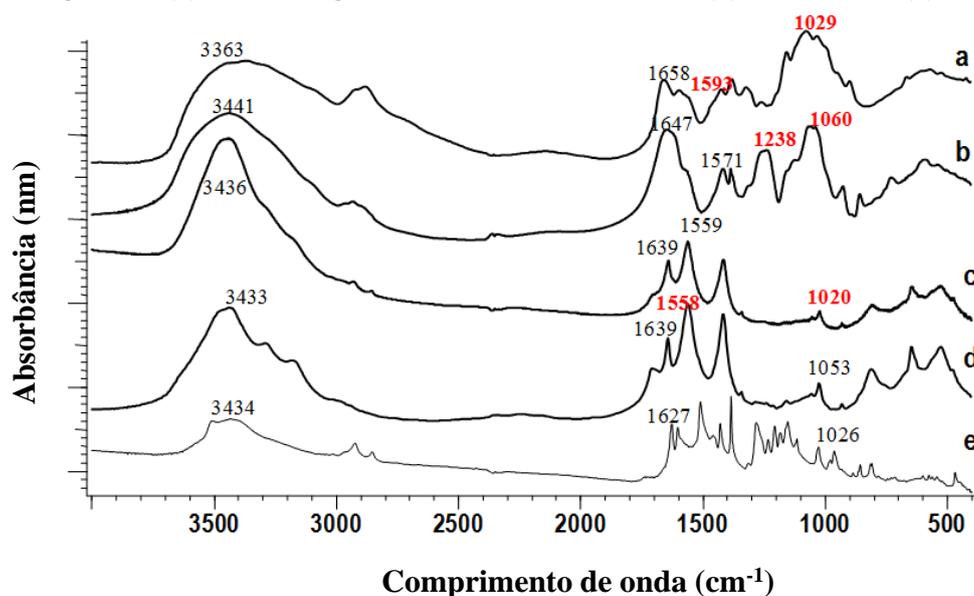
Duan et al. (2010), assim como Tsai et al. (2011b), determinaram a eficiência de encapsulação da curcumina em nanopartículas de quitosana/poli-butil-cianoacrilato (PBCA) pela técnica de HPLC, obtendo nanopartículas com um tamanho médio de 200 nm, potencial zeta de -29,11 mV, e com eficiência de encapsulação de 90,04%. Os autores também observaram que o diâmetro e o potencial zeta reduzido proporcionam uma maior eficiência de encapsulação do corante.

#### 5.6.4. Espectroscopia de infravermelho (FTIR)

Recentemente, alguns artigos têm sido publicados descrevendo a caracterização de polímeros, como a quitosana e o sulfato de condroitina, bem como nanopartículas formadas a partir destes biopolímeros por meio da técnica de espectroscopia de infravermelho (FTIR), já que esta técnica possui algumas vantagens, tais como, ser uma análise não destrutiva, necessitar de pequenas quantidades de amostra e ser um método rápido de análise.

Assim, no espectro de FTIR (Figura 26), pôde-se observar as principais bandas características dos grupamentos químicos presentes nos polímeros quitosana e sulfato de condroitina, na curcumina, bem como as interações ocorridas entre os dois biopolímeros, caracterizando desta forma a formação da nova rede polimérica.

**Figura 26** - Espectro de FTIR da quitosana (a); sulfato de Condroitina (b); NPs de QTS/SC (c); NPs de QTS/SC contendo curcumina (d); curcumina (e).



Fonte: Autoria própria.

No espectro da quitosana (Figura 26a), observa-se a presença dos picos, referentes aos grupos funcionais existentes na cadeia polimérica, tais como: OH, NH<sub>2</sub>, e C=O. As principais banda observadas para a quitosana estão em 3363 cm<sup>-1</sup>, referente ao estiramento da ligação -OH, em 2877 cm<sup>-1</sup>, referente ao estiramento CH, em 1658 cm<sup>-1</sup>, referente à ligação C=O da amida I, em 1593 cm<sup>-1</sup>, referente às vibrações de deformação do N-H de amina primária, em 1419 cm<sup>-1</sup>, referente à ligação CH<sub>2</sub>, em 1377-1257 cm<sup>-1</sup>, referente à ligação C-N, em 1153 cm<sup>-1</sup> aparece o estiramento, referente à ligação C-O-C da glicose β 1-4 e as bandas em 1072 e 1029 cm<sup>-1</sup> correspondendo à vibração de deformação angular do grupo amina (COSTA JÚNIOR et al., 2008; BEPPU et al. 1999; PAULINO et al., 2005).

No espectro do sulfato de condroitina (Figura 26b), observou-se as bandas em 3441 cm<sup>-1</sup>, referente à ligação -OH, em 1647 cm<sup>-1</sup>, referente à amida I, em 1571 cm<sup>-1</sup> observou-se à vibração, referente a deformação da amina, em 1238-1060 cm<sup>-1</sup>, referente ao estiramento da ligação S=O e em 856 cm<sup>-1</sup>, referente à ligação C-O-S (FOOT et al., 2005; YEH et al., 2011).

No espectro das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina (Figura 26c), aparece um estiramento em 1020 cm<sup>-1</sup> atribuído ao estiramento NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, verificando assim a interação entre os dois polímeros (RENA et al., 2007). Além disto, observou-se também neste espectro um deslocamento do pico 1658 cm<sup>-1</sup>, referente à amida I para 1639 cm<sup>-1</sup> e que a deformação da amina que no espectro de QTS aparece em 1593 cm<sup>-1</sup> e no espectro de SC em 1571 cm<sup>-1</sup>, no espectro das NPs de QTS/SC esta deformação é representada pelo estiramento em 1559 cm<sup>-1</sup>, indicando que o grupamento NH<sub>2</sub> nas nanopartículas encontra-se na forma de NH<sub>3</sub><sup>+</sup> (YEH et al., 2011)

No espectro da nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina contendo curcumina (Figura 26d), verificou-se que ocorreu um deslocamento da banda em 1593 cm<sup>-1</sup> para 1558 cm<sup>-1</sup>, referente à NH<sub>2</sub> da quitosana, indicando a interação entre o grupo amina do polímeros e o grupo fenólico da curcumina (PAN et al., 2006).

No espectro da curcumina (Figura 26e), aparece um estiramento em 3434 cm<sup>-1</sup>, referente ao OH fenólico, em 2853 cm<sup>-1</sup>, referente à ligação CH, em 1627 cm<sup>-1</sup>, referente à ligação C=O da cetona conjugada, em 1456 cm<sup>-1</sup>, referente à ligação CH<sub>2</sub>, em 1429 cm<sup>-1</sup> aparece o estiramento da ligação C=C do anel aromático e alifático, em 1384 cm<sup>-1</sup>, referente à ligação CH<sub>3</sub> e em 1026 cm<sup>-1</sup> observou-se o estiramento da ligação C-O-C do éter (PAN et al., 2006).

A partir da análise dos espectros, verificou-se que uma nova rede polimérica foi formada na obtenção das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina, e que de forma eficiente, consegue associar a curcumina.

### 5.6.5. Análise Termogravimétrica (TGA)

A Análise Termogravimétrica (TGA) foi utilizada neste estudo, com a finalidade de verificar a estabilidade térmica e temperatura de decomposição das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina puras e contendo curcumina, bem como de seus respectivos constituintes, já que esta técnica é utilizada quando se deseja avaliar a estabilidade térmica e oxidativa dos materiais, obter informações sobre a sequência de copolímeros e composição de polímeros carregados, e para a análise da cinética dos processos físico-químicos que ocorrem nas amostras (FARJADO, 2009; CARNEIRO, 2004; MOTHÉ et al., 2004).

As curvas termogravimétricas para os polímeros, para as nanopartículas formadas por meio deles, e para a curcumina, foram obtidas na razão de aquecimento 10°C/min, com fluxo de ar a 50 mL/min e estão apresentadas na Tabela 15 e na Figura 27, onde são observados os estágios de perda de massa.

**Tabela 15** - Dados termogravimétricos obtidos a partir da TGA para as NPs de QTS/SC, NPs de QTS/SC contendo curcumina e seus respectivos constituintes.

| Amostra                                   | Estágio 1                   |                             | Estágio 2                   |                             | Estágio 3                   |                             | Massa residual (%) <sup>c</sup> |
|---|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
|   | T <sub>1</sub> <sup>a</sup> | P <sub>1</sub> <sup>b</sup> | T <sub>2</sub> <sup>a</sup> | P <sub>2</sub> <sup>b</sup> | T <sub>3</sub> <sup>a</sup> | P <sub>3</sub> <sup>b</sup> |                                 |
| <b>Quitosana</b>                          | 70,37                       | 4,26                        | 311                         | 63,1                        |                             |                             | 32,64                           |
| <b>Sulfato de condroitina</b>             | 76,25                       | 11,37                       | 248,4                       | 40,87                       | 567,8                       | 27,36                       | 20,2                            |
| <b>Nanopartícula QTS/SC pura</b>          | 125,6                       | 1,94                        | 247,3                       | 14,57                       | 458,6                       | 28,67                       | 54,82                           |
| <b>Nanopartícula QTS/SC com curcumina</b> | 45,96                       | 7,55                        | 254,8                       | 25,23                       | 422,7                       | 21,48                       | 45,74                           |
| <b>Curcumina</b>                          | 67                          | 2                           | 252                         | 28                          | 402                         | 32                          | 38                              |

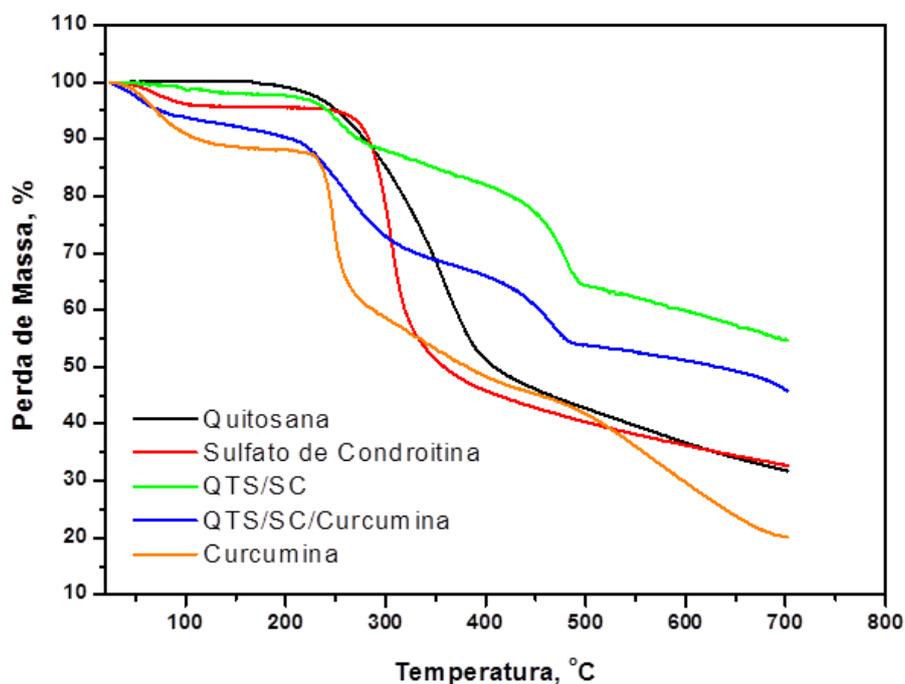
<sup>a</sup> Temperatura de máxima velocidade de degradação, °C.

<sup>b</sup> Porcentagem de perda de massa em cada estágio de degradação.

<sup>c</sup> Massa residual a 600°C.

Fonte: Autoria própria.

**Figura 27** - Análise termogravimétrica das NPs de QTS/SC, NPs de QTS/SC contendo curcumina e seus respectivos constituintes.



Fonte: Autoria própria.

A TGA para a quitosana exibe um comportamento típico para este polissacarídeo, apresentando dois estágios distintos de perda de massa, sendo um em 70,37°C e outro em 311°C. O primeiro estágio corresponde à perda de moléculas de água, que estariam associadas aos grupos amina e hidroxilas deste polímero, por meio de ligações de hidrogênio. A segunda perda de massa, em 311°C, é atribuída à degradação térmica, que tem início por meio da quebra aleatória de ligações glicosídicas, seguida da decomposição das unidades acetiladas e desacetiladas do polímero (NETO et al., 2005).

Na curva de TGA, para o sulfato de condroitina, observam-se três estágios de perda de massa. O primeiro ocorre em 76,25°C, referente à evaporação de água. O segundo e o terceiro estágio de perda de massa ocorrem em 248,4°C com e 567,8°C, respectivamente, atribuídos à degradação do polímero.

Para as nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina puras, foram observados, também, três estágios de perda de massa. O primeiro e o segundo estágio são representados pelos picos 125,6°C e 247,3°C, indicando a perda de moléculas de

água. A terceira perda de massa ocorreu em 458,6°C atribuído à degradação da nanopartícula.

A partir destes dados, foi possível verificar que as nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina apresentaram uma maior estabilidade térmica quando comparado aos polímeros que as constituem, pois necessitaram de uma temperatura mais elevada para se degradar. Isto pode ser justificado devido à forte interação eletrostática entre os dois biopolímeros, provocando uma menor perda de massa no segundo estágio, e o reordenamento dos polímeros. As regiões ordenadas, formadas pelo reordenamento das cadeias de QTS e das cadeias de SC remanescentes, aumentam a estabilidade térmica das nanopartículas. Assim, após a reordenação da rede polimérica, a degradação do material ocorre em temperatura mais elevada (FARJADO, 2009; DU et al., 2006).

As NPs de QTS/SC/Curcumina, apresentaram perfis de degradação com três estágios de perda de massa, sendo que o primeiro e o segundo ocorreram em 45,96°C e 254,8°C, respectivamente, indicando a evaporação da água, o terceiro estágio de perda de massa ocorreu em 422,7°C, referente à decomposição dos polímeros. Além disso, observou-se que há um deslocamento do pico de degradação da NPs de QTS/SC pura em 458,6°C para 422,7°C nas NPs de QTS/SC/Curcumina. O deslocamento deste pico de degradação sugere a presença de outro material nas nanopartículas, provocando uma diminuição na estabilidade térmica dos polímeros (NETO et al., 2005; ZOHURIAN et al., 2004).

Para a curcumina foram observados três estágios de perda de massa. O primeiro ocorreu em 67°C correspondente à perda de moléculas de água e o segundo e terceiro em 252°C e 402°C, respectivamente, referentes à decomposição do corante.

A partir do percentual de massa residual, visualizado na Tabela 16, pode-se inferir que, as nanopartículas possuem maior estabilidade térmica quando comparadas aos seus respectivos constituintes. Isto pode ser explicado devido às interações eletrostáticas que ocorrem entre os dois biopolímeros e entre a quitosana e a curcumina, onde é necessária uma temperatura mais elevada para a quebra destas ligações.

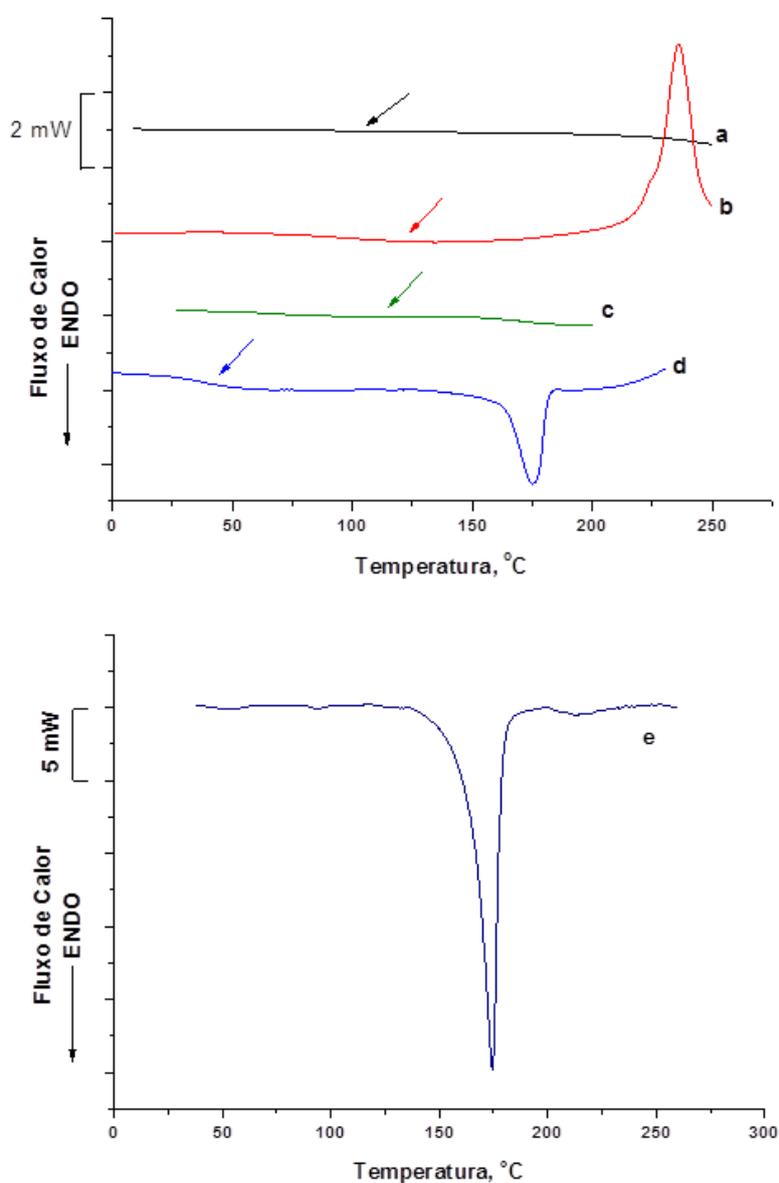
Assim sendo, pode-se observar que a análise termogravimétrica é uma importante ferramenta utilizada para caracterização de polímeros e de nanopartículas formadas a partir deles, já que é possível determinar a máxima temperatura suportada pelo material.

### 5.6.6. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Neste estudo, foi empregada a técnica de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), com o objetivo de caracterizar as mudanças no comportamento térmico das nanopartículas e seus respectivos constituintes, bem como para analisar as possíveis interações entre a quitosana e o sulfato de condroitina e a quitosana e a curcumina.

Na Figura 28 são apresentados os perfis para análise de DSC para as NPs de QTS/SC puras e contendo curcumina e seus respectivos constituintes.

**Figura 28** - Análise de DSC para quitosana (a); sulfato de condroitina (b); NPs de QTS/SC pura (c); NPs de QTS/SC contendo curcumina (d); curcumina (e).



Fonte: Autoria própria.

Inicialmente as amostras foram aquecidas a uma temperatura de 25°C a 150°C, com posterior resfriamento, a fim de destruir suas histórias térmicas. Nesta primeira corrida, foi observada a presença de um pico endotérmico alargado nas amostras, atribuído à evaporação de componentes voláteis, principalmente água.

A fim de se obter mais informações sobre as possíveis interações entre os dois polímeros, bem como entre a quitosana e a curcumina nas nanopartículas preparadas, foi realizada uma segunda corrida por DSC, em uma faixa de temperatura de 30°C a 250°C.

Na segunda corrida, não foram observados eventos correspondentes à perda de água de cristalização contidos nas moléculas, devido à presença de grupos NH<sub>2</sub> e OH livres, podendo assim ser observada apenas a transição vítrea para as amostras estudadas (CERVERA et al., 2004; FAJARDO, 2009).

A partir das curvas de DSC, pôde-se observar que, a transição vítrea para a amostra de quitosana, ocorreu por volta de 101,32°C, para o sulfato de condroitina, em 116,77°C, para as NPs de QTS/SC, em 123,12°C, para as NPs de QTS/SC contendo curcumina, em 42,23°C, e para a curcumina observou-se o surgimento de um pico em 174,1°C, referente à fusão do corante.

A transição vítrea da quitosana tem sido bastante estudada nos últimos anos, sendo observado que a mesma varia com a mudança do grau de desacetilação, massa molar e a fonte de origem do polímero. Assim, são encontrados diversos valores de T<sub>g</sub> para a quitosana (SUYATMA et al., 2005; DONG et al., 2004; CERVERA et al., 2004).

O fato da T<sub>g</sub> das NPs de QTS/SC ocorrer em uma temperatura mais alta quando comparada aos polímeros que a constitui, indica que houve interação eletrostática entre os dois biopolímeros, formando uma rede polimérica mais termicamente estável.

A forte interação eletrostática entre os grupamentos químicos, presentes nos dois polímeros, pode resultar na perda de parte das ligações de hidrogênio entre as cadeias, ocorrendo desta forma, a ruptura das respectivas estruturas cristalinas, presentes nos polímeros (DU et al., 2006). Com base nisso, é possível ressaltar que, a formação de uma rede polimérica por meio da quitosana e do sulfato de condroitina deve apresentar estabilidade térmica diferente daquela apresentada pelos polímeros puros.

Em relação às NPs de QTS/SC contendo curcumina, houve um deslocamento do pico, onde ocorre a interação entre os dois polímeros de 123,12°C para 42,23°C, sugerindo que o corante esteja associado às cadeias poliméricas da quitosana, aumentando, desta forma, a mobilidade do sistema e, conseqüentemente diminuindo a T<sub>g</sub> das nanopartículas. Observou-se ainda um pequeno pico por volta de 174,1°C,

correspondendo a uma pequena percentagem de curcumina livre (ainda cristalina) e não associada às nanopartículas.

### 5.6.7. Perfil de liberação da curcumina

Sistemas poliméricos de liberação de drogas estão sendo amplamente utilizados, atualmente, e não só permitem uma liberação lenta e gradual da substância ativa, como também possibilitam o direcionamento a alvos específicos do organismo (MULLER et al., 2009).

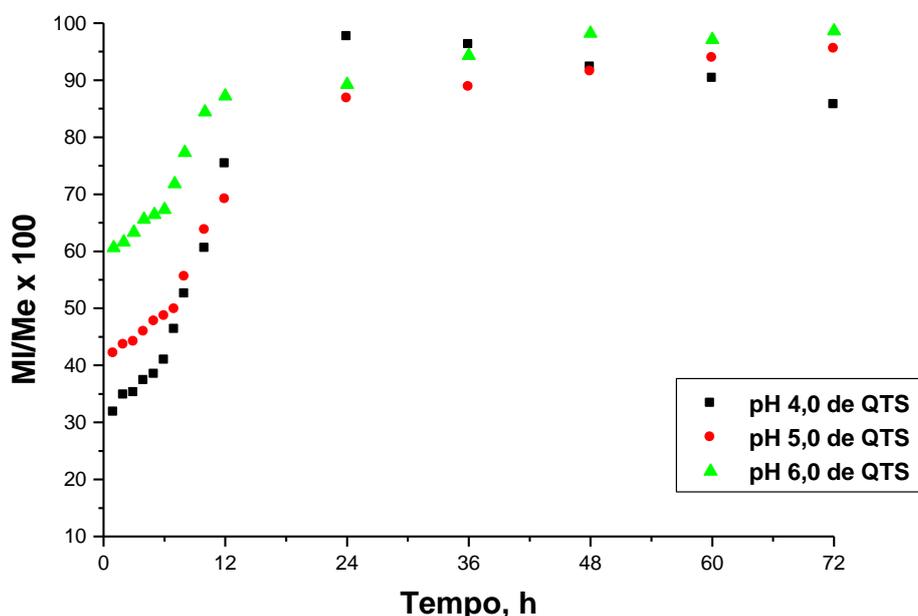
O estudo do perfil de liberação de fármacos é de fundamental importância, pois visa determinar a velocidade e eficiência do processo de interação entre a dissolução, a difusão e os mecanismos de erosão, possibilitando, desta forma, identificar as características de determinada formulação em pHs semelhantes aos fisiológicos (LOPES et al., 2005; SCHAFFAZICK et al., 2003; FREIBERG et al., 2004).

Assim sendo, neste estudo, a determinação do perfil de liberação da curcumina ocorreu em solução de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 1,2 e de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 6,8, a partir de nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina preparadas com solução de quitosana em pH 4,0; 5,0 e 6,0. A análise foi realizada por meio do monitoramento do meio de liberação a 429 nm em um espectrofotômetro UV-vis.

A porcentagem de curcumina liberada foi determinada utilizando-se a equação da curva padrão de calibração que relaciona a absorbância com a concentração conhecida do flavanóide (mg%) na mesma solução em que a cinética de liberação foi conduzida. Os resultados obtidos foram apresentados na forma de porcentagem de liberação do composto ao longo do tempo utilizando-se a equação 3.

Na Figura 29 é apresentado o perfil de liberação da curcumina em solução de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 1,2.

**Figura 29** - Perfil de liberação para a curcumina em solução de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 1,2 associada às NPs de QTS/SC preparadas em solução de QTS em pH 4,0; 5,0 e 6,0.

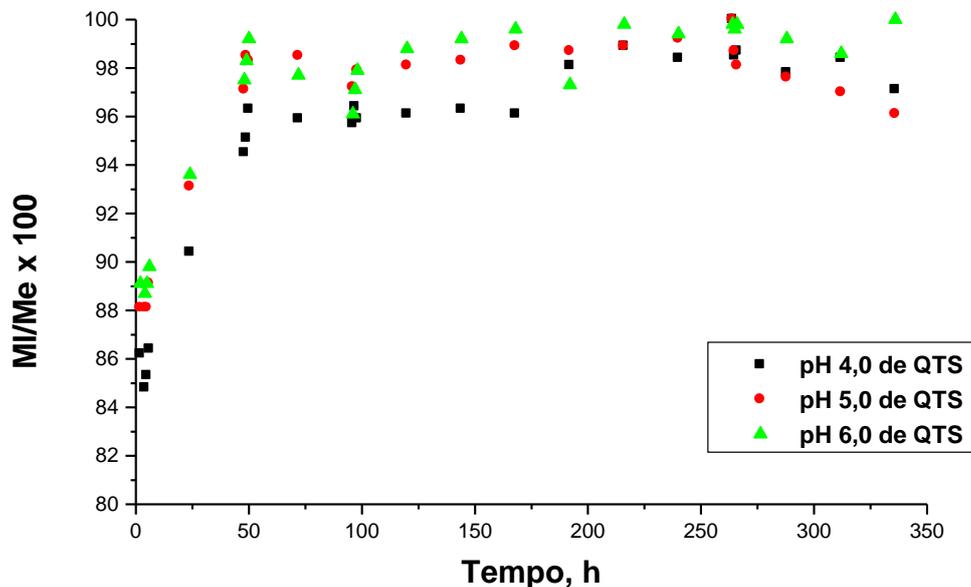


Fonte: Autoria própria.

A partir da curva de liberação da curcumina em solução de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 1,2 foi possível observar que a liberação do corante ocorreu de forma mais lenta quando associado às NPs de QTS/SC preparadas em solução de quitosana em pH 4,0 e 5,0, sendo que o tempo necessário para liberar cerca de 50% do corante foi de 8 horas nestas formulações. Em contrapartida, pôde-se observar uma liberação mais acelerada do corante (80%), nas primeiras 8 horas, por meio das nanopartículas a base de quitosana / sulfato de condroitina, onde o pH da solução polimérica de quitosana estava fixado em 6,0. Após 24 horas observou-se que o corante atinge seu ponto máximo de liberação por meio da NPs de QTS/SC em pH 4,0 da solução de quitosana. No entanto, após 48 horas a liberação do corante continuou de forma gradual até 72 horas. Para a curcumina associada às NPs de QTS/SC em pH 5,0 e 6,0 da solução de quitosana, o ponto de maior liberação foi alcançado em 72 horas.

O aspecto geral da curva de liberação da curcumina em solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 6,8 no período de 336 horas está apresentado na Figura 30, onde se observa um perfil de liberação semelhante ao observado para o corante em solução de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 1,2.

**Figura 30** - Perfil de liberação para curcumina em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 6,8 associada às NPs de QTS/SC preparadas em solução de QTS em pH 4,0; 5,0 e 6,0.



Fonte: Autoria própria.

A partir da curva de liberação observou-se que, por meio das NPs de QTS/SC em pH 4,0 e 5,0 da solução de quitosana a liberação do corante ocorreu de forma mais lenta, quando comparada a liberação da curcumina por meio das NPs de QTS/SC em pH 6,0 da solução de quitosana. Em ambas as formulações foram observadas a liberação de cerca de 80% do corante nas primeiras 2 horas. No entanto, observou-se que o corante atingiu seu ponto máximo de liberação em 192 horas por meio das NPs de QTS/SC em pH 6,0 da solução de quitosana, enquanto que por meio das NPs de QTS/SC com pH 4,0 e 5,0 da solução de quitosana este ponto somente foi alcançado em 264 horas. Após estes tempos, foi observado a continua liberação do corante em velocidades e concentrações menores.

A maior velocidade e taxa de liberação do corante, associado às NPs de QTS/SC em pH 6,0 da solução de quitosana, pode estar associadas ao diâmetro, a biodegradabilidade da quitosana e a maior taxa de associação do fármaco nesta formulação. Em pH 6,0 da solução polimérica de quitosana as nanopartículas apresentaram menor diâmetro hidrodinâmico ( $175,7 \pm 2,5 \text{ nm}$ ), logo é necessário um menor tempo para que ocorra a degradação da quitosana e, conseqüentemente a liberação do fármaco por meio das nanopartículas. Além disso, nesta formulação há maior quantidade de curcumina associada ( $68,5 \pm 0,18\%$ ), e como neste pH as

nanopartículas têm diâmetro menor, grande parte do fármaco pode estar adsorvido na superfície, o que possibilita uma maior taxa de liberação do corante nas primeiras horas.

Observou-se ainda, que em ambas as soluções, o perfil de liberação da curcumina, por meio das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina sugere um processo de dois estágios, conforme mostrado na Figura 31. No primeiro estágio, ocorre o intumescimento das nanopartículas, devido ao contato com as soluções, e no segundo estágio, o corante é liberado por difusão por meio do relaxamento da cadeia polimérica. Ou seja, foi observado que as nanopartículas estudadas se comportam como um hidrogel, que quando em contato com água ou fluidos biológicos, por exemplo, incha e libera o fármaco para o meio via mecanismo de difusão.

**Figura 31** - Processo de liberação da curcumina através das nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina.

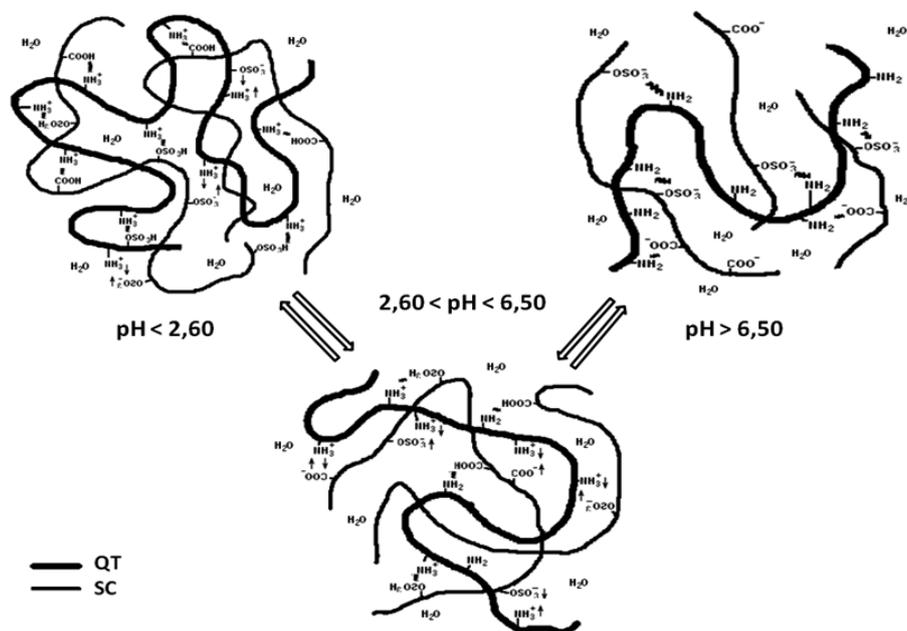


Fonte: Autoria própria.

Segundo George et al. (2008), o grau de intumescimento é uma propriedade muito importante, pois avalia a capacidade do hidrogel de expandir-se em meio ácido e alcalino. Contudo, hidrogéis adequados para liberação de fármacos devem apresentar mínimo grau de intumescimento no meio gástrico (pH 1,2) para que a liberação do fármaco também seja mínima, e ao passar através do meio intestinal (pH 6,8) deve apresentar intumescimento moderado, de forma a permitir a liberação controlada do fármaco.

Assim, neste estudo, o pH foi utilizado como estímulo inicial para a liberação do corante, observando-se que de fato em solução de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 1,2 ocorreu um menor grau de intumescimento e, conseqüentemente, uma menor taxa de liberação da curcumina por meio das nanopartículas quando comparada a solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 6,8, conforme mostrado na Figura 32.

**Figura 32** - Comportamento da rede polimérica formada por QT/SC, quando essa é intumescida em meios com diferentes valores de pH.



Fonte: FAJARDO. 2009.

Isto ocorre, porque em meio ácido, onde o pH é menor que o pKa da quitosana (6,5), ocorre a protonação dos grupos  $\text{NH}_2$  da quitosana. A presença de grupos positivamente carregados provoca a repulsão entre as cadeias da quitosana e solvatação desta, o que deveria permitir uma maior expansão da cadeia polimérica e maior liberação da curcumina. No entanto, isto não ocorre devido ao equilíbrio de ionização dos grupos sulfônicos provenientes do sulfato de condroitina, já que o pKa do SC é 2,6. Assim, em pH 1,2 há presença de fortes interações eletrostáticas entre os grupos  $-\text{SO}_3^-$  do SC e grupos  $\text{NH}_3^+$  da QTS, além de ligações de hidrogênio entre as cadeias poliméricas, fazendo com que a rede polimérica, formada entre as cadeias da QTS e do SC, permaneçam estável, de modo a não ocorrer uma expansão significativa, reduzindo assim sua capacidade de absorção de líquido (FAJARDO, 2009; QIN et al., 2006; GONSALVES et al., 2011).

Em pH 6,8 os grupos amina da quitosana permanecem desprotonados, já que o pH do meio é maior que o pKa do polímero (6,5), diminuindo, desta forma, a força de interação entre as cadeias da quitosana e do sulfato de condroitina. Em contrapartida, os grupos sulfônicos e carboxílicos do sulfato de condroitina, com pKas 2,6 e 4,57, respectivamente, tornam-se desprotonados e negativamente carregados. Com isto, há um aumento na densidade de cargas negativas, promovendo a repulsão eletrostática do

tipo ânion-ânion entre as cadeias do sulfato de condroitina. Esta repulsão, associada à diminuição da força de interação entre as cadeias da quitosana e do sulfato de condroitina, desestabiliza a rede polimérica, provocando a expansão desta, em consequência da expansão da rede polimérica, as moléculas de curcumina associadas às nanopartículas adquirem maior mobilidade, facilitando assim sua difusão por meio das nanopartículas (FAJARDO, 2009; PIAI et al., 2009).

A partir destes resultados pode-se inferir que as nanopartículas estudadas são adequadas para a liberação de fármacos, pois apresentaram maior liberação em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 6,8, meio intestinal simulado. Além disso, a combinação das propriedades da quitosana como: a bioatividade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, não toxicidade, hidrofiliabilidade, formação de nanopartículas com uma distribuição unimodal, com um baixo índice de polidispersão, bem como um potencial zeta positivo, facilita sua interação com as membranas biológicas, favorecendo assim, seu potencial para aplicações como sistema de liberação controlada de fármacos. No entanto, é conveniente que, em estudos futuros seja realizada a funcionalização da superfície das nanopartículas, a fim de que estas se apresentem seletivas quanto ao seu alvo de ação no organismo.

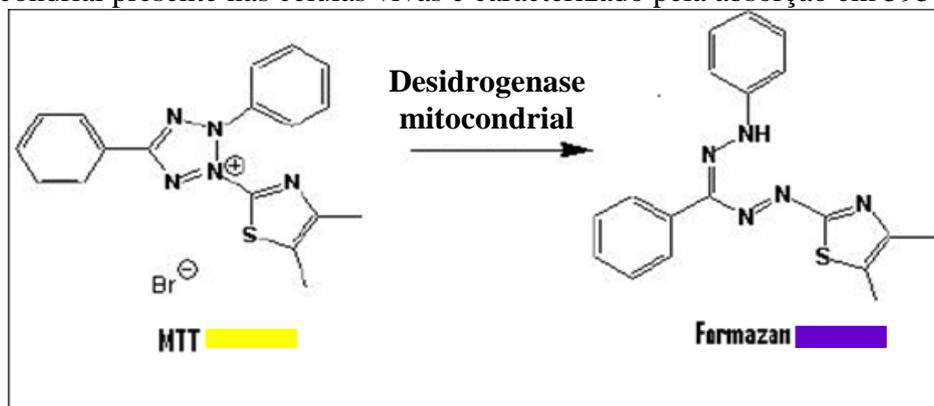
### **5.7. Avaliação da atividade citotóxica *in vitro* da curcumina livre e associada às nanopartículas**

A utilização de testes de citotoxicidade *in vitro*, por meio de ensaios de viabilidade celular, constitui o primeiro passo para a avaliação da compatibilidade biológica de uma determinada substância (ROGERO et al., 2003; EISEMBRAND et al., 2002).

A citotoxicidade é normalmente verificada pelos testes do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium (MTT), um dos mais empregados como indicador colorimétrico da viabilidade celular, que quando dissolvido em meio de cultura ou soluções salinas balanceadas sem vermelho de fenol, apresenta coloração amarelada. A desidrogenase mitocondrial das células viáveis quebra o anel tetrazolium, produzindo cristais de formazan, os quais são insolúveis em solução aquosa. Os cristais são então dissolvidos em DMSO, resultando em uma solução púrpura que é espectrofotometricamente medida, conforme apresentado na Figura 33. Um aumento ou diminuição no número de células resulta em uma mudança na quantidade do formazan formado, indicando assim, o grau de citotoxicidade causado pelo teste do material,

avaliando-se a função mitocondrial da célula (DAGUANO et al., 2007; DE ARAÚJO et al., 2008).

**Figura 33** - Formação do Formazan pela quebra do MTT originado pela desidrogenase mitocondrial presente nas células vivas e caracterizado pela absorção em 595 nm.



Fonte: MONSMANN, 1983.

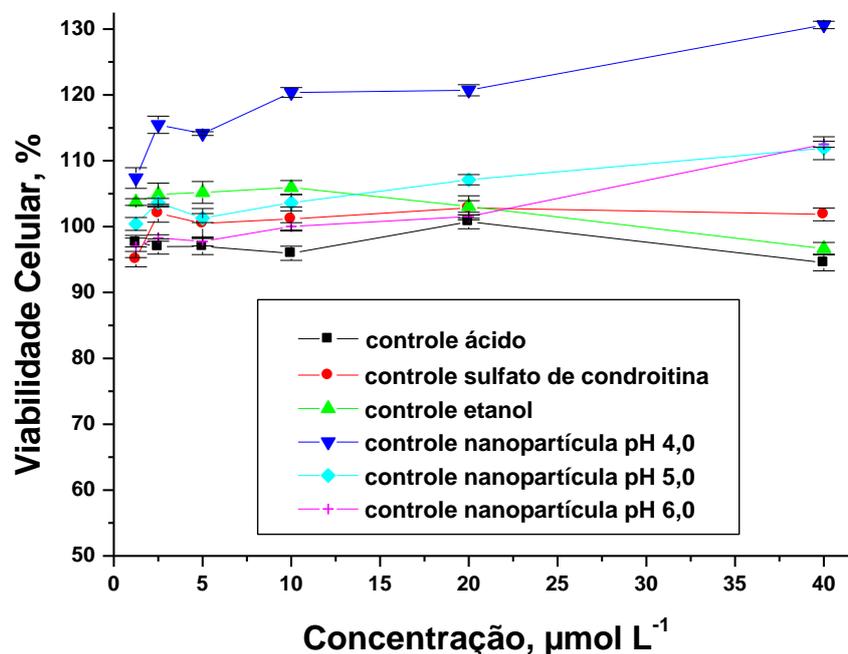
Para ser aprovado no teste de citotoxicidade *in vitro*, um produto não deve ocasionar a morte das células, nem afetar suas funções celulares. Assim, com o uso de técnicas de cultura de células os testes podem detectar a ocorrência de lise das células, de inibição do crescimento celular e de outros efeitos que possam ser desencadeados nas células (DE ARAÚJO et al., 2008).

Com base nisto, este estudo avaliou o efeito citotóxico da curcumina livre e associada às nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina em culturas de células tumorais humanas de pulmão (A549), por meio do teste de viabilidade celular, empregando o método de MTT, uma vez que este é simples, confiável e produz resultados reprodutíveis.

Neste estudo, foram estabelecidos como tempo ideal para tratamento das células com as amostras estudadas os períodos de 24 e 72 horas, sendo que 72h correspondem ao período máximo que as células poderiam ser mantidas com o meio de tratamento.

Nos experimentos controle, realizados para avaliar a toxicidade do sistema de liberação sem a presença de curcumina, no período de 24 horas, observou-se que a adição das NPs puras e dos controles (sulfato de condroitina, solução de ácido acético e etanol), não alterou a viabilidade das células e, principalmente, que estes não apresentaram toxicidade, como pode ser visualizado na Figura 34 e na Tabela 16.

**Figura 34** - Ensaio de viabilidade celular empregando-se NPs de QTS/SC puras e controles (sulfato de condroitina, solução de ácido acético e etanol) nas diferentes concentrações no período de 24 horas.



Fonte: Autoria própria.

**Tabela 16** - Viabilidade celular para a linhagem celular A549 nas diferentes concentrações das NPs de QTS/SC puras e dos controles (sulfato de condroitina, solução de ácido acético e etanol) no período de 24 horas.

| Concentração (µmol L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup> | Viabilidade celular (%) <sup>a</sup> |                      |                      |                        |                |             |
|---|--------------------------------------|----------------------|----------------------|------------------------|----------------|-------------|
|   | NPs de QTS/SC pH 4,0                 | NPs de QTS/SC pH 5,0 | NPs de QTS/SC pH 4,0 | Sulfato de condroitina | Controle ácido | Etanol      |
| 40  | 130,6 ± 0,5                          | 111,9 ± 1,7          | 112,5 ± 0,4          | 106,1 ± 1,3            | 94,5 ± 1,2     | 96,6 ± 0,9  |
| 20  | 120,7 ± 0,8                          | 107,1 ± 0,7          | 101,5 ± 0,2          | 99,2 ± 0,5             | 100,7 ± 1,0    | 103,0 ± 0,8 |
| 10  | 120,3 ± 0,7                          | 103,6 ± 1,2          | 100,0 ± 0,5          | 92,4 ± 2,2             | 95,9 ± 1,0     | 105,9 ± 1,0 |
| 5,0   | 114,1 ± 0,2                          | 101,2 ± 0,6          | 97,7 ± 0,6           | 89,6 ± 0,7             | 97,0 ± 1,2     | 105,1 ± 1,6 |
| 2,5   | 115,4 ± 1,3                          | 103,6 ± 0,6          | 98,2 ± 0,4           | 103,9 ± 0,5            | 96,9 ± 1,1     | 104,9 ± 1,7 |
| 1,25  | 107,3 ± 1,5                          | 100,4 ± 0,9          | 96,9 ± 1,6           | 112,9 ± 2,0            | 97,6 ± 0,6     | 103,7 ± 0,5 |

<sup>a</sup> análise realizada em triplicata, n=3.

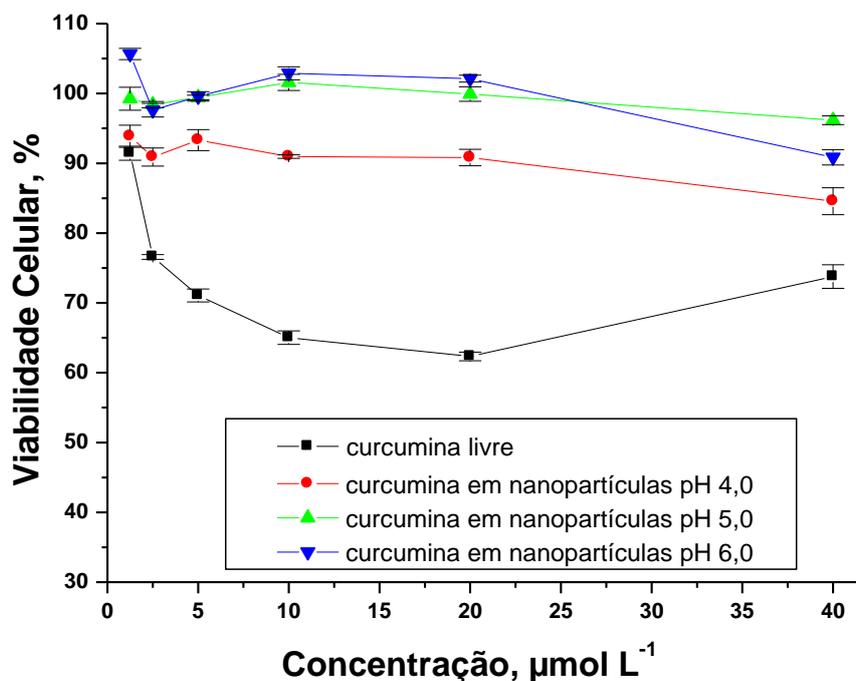
Fonte: Autoria própria.

Ao se analisar a curcumina livre e associada às NPs de QTS/SC, no período de 24 horas, observou-se que a curcumina reduz a viabilidade celular de forma significativa, conforme mostrado na Figura 35 e Tabela 17. Na maior concentração (40 µmol L<sup>-1</sup>) verificou-se que a curcumina livre reduz aproximadamente 73,7 ± 1,6 %, a viabilidade celular e que na menor concentração (1,25 µmol L<sup>-1</sup>) houve redução de 91,4

$\pm 1,0$  %, da viabilidade celular, entretanto, a maior redução na viabilidade  $62,3 \pm 0,6$  % foi observada na concentração de  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Observou-se ainda, que na maior concentração ocorreu a formação de cristais de curcumina, que ficaram impregnados na placa, o que pode ter afetado sua habilidade de inibir o crescimento das células. A formação destes cristais pode ser justificada pela baixa solubilidade do corante em água, já que a solução de curcumina livre foi preparada utilizando-se 8 mg de curcumina, diluída em solução de etanol/água, em uma razão de 80:20, sendo 20 mL de etanol e 80 mL de água.

Para a curcumina associada às nanopartículas a maior redução da viabilidade celular ( $84,5 \pm 1,9$  %) foi observada nas NPs de QTS/SC com solução de quitosana em pH 4,0 na maior concentração ( $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). As NPs de QTS/SC contendo curcumina preparadas com solução de quitosana, em pH 5,0 e 6,0, não apresentaram redução significativa na viabilidade das células. Isto pode ser justificado pela influência de condições físico-químicas das NPs como: tamanho, morfologia, superfície e principalmente pelo tempo de incubação para que a maioria delas sejam completamente internalizadas pelas células.

**Figura 35** - Ensaio de viabilidade celular empregando-se curcumina livre e associada às nanopartículas nas diferentes concentrações no período de 24 horas.



Fonte: Autoria própria.

**Tabela 17** - Viabilidade celular para a linhagem celular A549 nas diferentes concentrações da curcumina livre e associada às nanopartículas no período de 24 horas.

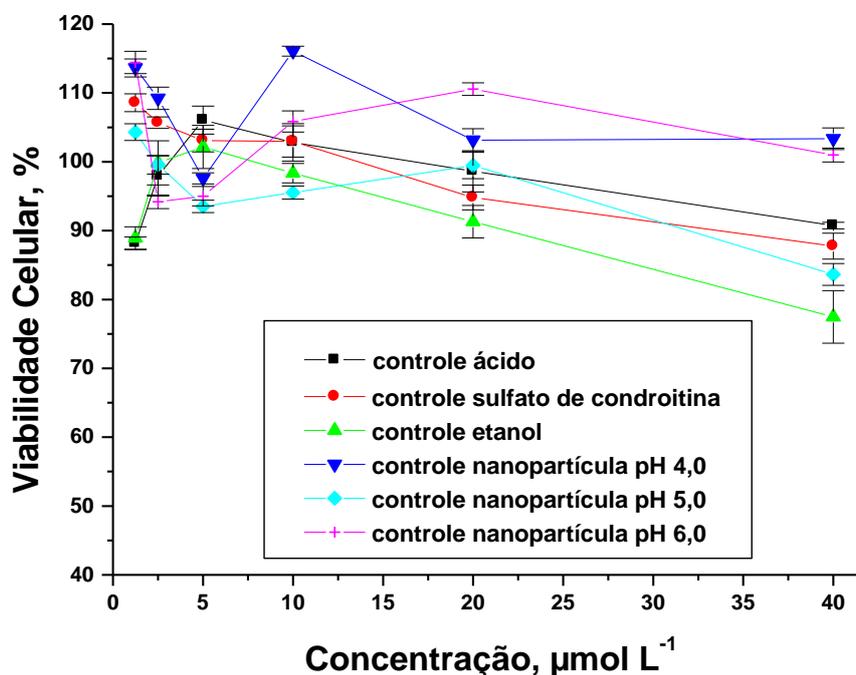
| Concentração<br>( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) <sup>a</sup> | Viabilidade celular (%) <sup>a</sup> |                                      |                                      |                    |
|---|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------|
|   | NPs de<br>QTS/S/Curcumina<br>pH 4,0  | NPs de<br>QTS/SC/Curcumina<br>pH 5,0 | NPs de<br>QTS/SC/Curcumina<br>pH 4,0 | Curcumina<br>livre |
| <b>40</b>   | 84,5 ± 1,9                           | 96,1 ± 0,6                           | 90,8 ± 1,0                           | 73,7 ± 1,6         |
| <b>20</b>   | 90,8 ± 1,1                           | 99,9 ± 1,4                           | 102,1 ± 0,4                          | 62,3 ± 0,6         |
| <b>10</b>   | 90,9 ± 0,2                           | 101,5 ± 1,1                          | 102,8 ± 0,9                          | 65,0 ± 0,9         |
| <b>5,0</b>  | 93,3 ± 1,5                           | 99,4 ± 0,3                           | 99,5 ± 0,6                           | 71,0 ± 0,9         |
| <b>2,5</b>  | 90,8 ± 1,2                           | 96,3 ± 0,4                           | 97,5 ± 0,9                           | 76,5 ± 0,3         |
| <b>1,25</b>   | 93,8 ± 1,5                           | 99,2 ± 1,6                           | 105,6 ± 0,8                          | 91,4 ± 1,0         |

<sup>a</sup> análise realizada em triplicata, n=3.

Fonte: Autoria própria.

Na avaliação da viabilidade celular, no período de 72 horas, também foi observado que as nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina puras, e os controles (sulfato de condroitina, solução de ácido acético e etanol), nas variadas concentrações, não apresentaram toxicidade para as células. Observou-se ainda, que a adição de pequenas quantidades das amostras mantinha-se a viabilidade celular próxima a 100 %, e que a adição de uma maior quantidade das NPs de QTS/SC puras, com solução de quitosana em pH 5,0 na concentração de 40  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ocasionou a redução da viabilidade celular para 83,6 ± 1,5 %, conforme apresentado na Figura 36 e Tabela 18. Contudo, este resultado não é atribuído à toxicidade dos polímeros (quitosana e sulfato de condroitina), já que estes são considerados atóxicos e biocompatíveis, mas sim à grande quantidade de partículas de quitosana coaguladas devido ao pH do meio (7,4), que impediram a troca de nutrientes entre as células e o meio de tratamento (RINAUDO, 2006; CASARIEGO et al., 2009; KUMAR et al., 2004; DALLAN, 2005; DENG, 2007; ARANAZ et al., 2009; SANTOS, 2009; ZOU et al., 2009).

**Figura 36** - Ensaio de viabilidade celular empregando-se NPs de QTS/SC puras e controles (sulfato de condroitina, solução de ácido acético e etanol) nas diferentes concentrações no período de 72 horas.



Fonte: Autoria própria.

**Tabela 18** - Viabilidade celular para a linhagem celular A549 nas diferentes concentrações das NPs de QTS/SC puras e dos controles (sulfato de condroitina, solução de ácido acético e etanol) no período de 72 horas.

| Concentração (µmol L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup> | Viabilidade celular (%) <sup>a</sup> |                      |                      |                        |                |             |
|---|--------------------------------------|----------------------|----------------------|------------------------|----------------|-------------|
|   | NPs de QTS/SC pH 4,0                 | NPs de QTS/SC pH 5,0 | NPs de QTS/SC pH 4,0 | Sulfato de condroitina | Controle ácido | Etanol      |
| 40  | 103,3 ± 1,5                          | 83,6 ± 1,5           | 100,9 ± 1,0          | 95,5 ± 0,7             | 90,7 ± 0,4     | 77,4 ± 3,8  |
| 20  | 103,1 ± 1,6                          | 99,4 ± 1,9           | 110,5 ± 0,9          | 93,1 ± 2,1             | 98,6 ± 2,9     | 91,3 ± 2,3  |
| 10  | 116,0 ± 0,7                          | 95,5 ± 0,9           | 105,8 ± 1,5          | 97,9 ± 1,7             | 102,8 ± 2,7    | 98,3 ± 1,4  |
| 5,0   | 97,5 ± 0,8                           | 93,5 ± 0,9           | 94,9 ± 1,4           | 106,2 ± 2,0            | 106,0 ± 2,0    | 102,1 ± 3,1 |
| 2,5   | 109,2 ± 1,6                          | 99,5 ± 1,3           | 94,1 ± 0,9           | 100,3 ± 1,5            | 97,9 ± 2,9     | 99,8 ± 3,2  |
| 1,25  | 113,6 ± 1,3                          | 104,3 ± 1,2          | 114,4 ± 1,6          | 93,3 ± 1,4             | 88,1 ± 0,9     | 88,9 ± 1,6  |

<sup>a</sup> análise realizada em triplicata, n=3.

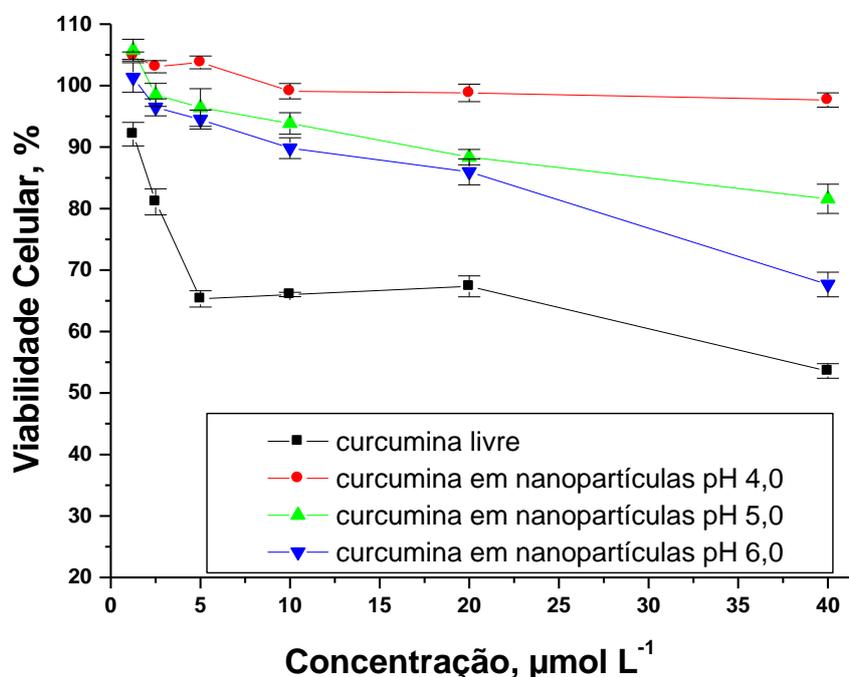
Fonte: Autoria própria.

Para a curcumina livre e associada às NPs de QTS/SC, foi observado uma redução mais significativa e linear da viabilidade celular, no período de 72 horas, conforme visualizado na Figura 37 e Tabela 19. Na maior concentração (40 µmol L<sup>-1</sup>) foi observado que a curcumina livre reduziu em 53,5 ± 1,1 %, enquanto que na menor concentração (1,25 µmol L<sup>-1</sup>) a redução foi de 92,1 ± 1,9 % na viabilidade celular.

Entretanto, esta redução na viabilidade celular visualizado na maior concentração foi alcançada fazendo-se o controle da curcumina livre sem a presença de células para eliminar os cristais observados durante o tratamento no período de 24 horas.

Para a linhagem de célula A549, tratada com as NPs de QTS/SC contendo curcumina com solução de quitosana em pH 6,0, observou-se uma maior redução da viabilidade celular  $67,6 \pm 2,0$  % na maior concentração ( $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Observou-se ainda que as NPs de QTS/SC/Curcumina, com solução de quitosana em pH 5,0 reduziram para  $81,5 \pm 2,3$  % a viabilidade das células. Para as NPs de QTS/SC/Curcumina preparadas com solução de quitosana em pH 4,0 não foi observado redução significativa na viabilidade das células, sendo esta mantida próxima a  $97,6 \pm 1,1$  % na maior concentração ( $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Estes resultados podem estar relacionados ao maior tempo de incubação e com o perfil de liberação da curcumina por meio das NPs de QTS/SC, onde se observou uma liberação mais rápida do corante quando associado às NPs de QTS/SC preparadas com solução de quitosana em pH 6,0.

**Figura 37** - Ensaio de viabilidade celular empregando-se curcumina livre e associada às nanopartículas nas diferentes concentrações no período de 72 horas.



Fonte: Autoria própria.

**Tabela 19** - Viabilidade celular para a linhagem celular A549 nas diferentes concentrações da curcumina livre e associada às nanopartículas no período de 72 horas.

| Concentração<br>( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) <sup>a</sup> | Viabilidade celular (%) <sup>a</sup> |                                      |                                      |                    |
|---|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------|
|   | NPs de<br>QTS/S/Curcumina<br>pH 4,0  | NPs de<br>QTS/SC/Curcumina<br>pH 5,0 | NPs de<br>QTS/SC/Curcumina<br>pH 4,0 | Curcumina<br>livre |
| <b>40</b>   | 97,6 ± 1,1                           | 81,5 ± 2,3                           | 67,6 ± 2,0                           | 53,5 ± 1,1         |
| <b>20</b>   | 98,8 ± 1,4                           | 88,3 ± 1,2                           | 85,9 ± 2,1                           | 67,3 ± 1,7         |
| <b>10</b>   | 99,0 ± 1,2                           | 93,8 ± 1,7                           | 89,8 ± 1,6                           | 66,0 ± 0,3         |
| <b>5,0</b>  | 103,7 ± 1,0                          | 96,4 ± 3,0                           | 94,4 ± 1,5                           | 65,3 ± 1,3         |
| <b>2,5</b>  | 103,0 ± 0,9                          | 98,4 ± 1,8                           | 96,4 ± 1,3                           | 81,0 ± 2,1         |
| <b>1,25</b>   | 104,8 ± 0,5                          | 105,7 ± 1,7                          | 101,3 ± 2,4                          | 92,1 ± 1,9         |

<sup>a</sup> análise realizada em triplicata, n=3.

Fonte: Autoria própria.

Esta habilidade da curcumina, na sua forma livre, também foi observada nos estudos de Pillai et al. (2004) e Chen et al. (2010), que mostraram que a curcumina livre inibe a proliferação de células tumorais humanas de pulmão. Em ambos os estudos foi utilizado o teste de MTT e a linhagem de célula tumoral humana de pulmão A549, observando-se uma redução de aproximadamente 50% da viabilidade das células, com a adição de curcumina livre.

Das et al. (2011) também demonstraram por meio do teste de MTT a avaliação da citotoxicidade da curcumina na forma livre, e encapsuladas a nanopartículas de quitosana/alginato em três diferentes linhagens de células tumorais humanas. Os autores observaram uma redução da viabilidade celular de aproximadamente 50%, quando utilizado a curcumina na forma livre, e cerca de 60% quando o corante foi encapsulado as nanopartículas.

Contudo, o comportamento geral observado nos ensaios de viabilidade celular, realizados neste estudo consiste na maior eficiência citotóxica da curcumina na sua forma livre que na associada às nanopartículas. Apesar disso, observou-se que as nanopartículas e seus respectivos constituintes não são tóxicos para a célula, e que o sistema apresentou boa estabilidade físico-química sob condições fisiológicas.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir dos resultados obtidos neste estudo, observou-se que o método de gelatinização iônica, utilizado para preparar as nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina, é eficaz, simples, rápido e reprodutível, não necessitando de equipamentos sofisticados para preparação das nanopartículas.

Embora existam inúmeras técnicas utilizadas, atualmente para determinação do grau de desacetilação da quitosana, neste estudo, esta medida foi realizada por meio da técnica de espectroscopia de infravermelho (FTIR), já que se trata de uma técnica bastante simples e precisa. A porcentagem dos grupos amina livre obtida foi de 81,86%, o que demonstra que o polímero estudado é de fato a quitosana.

A fim de caracterizar a substância ativa, curcumina, utilizou-se da técnica de espectroscopia UV-vis. A análise foi conduzida em solução de HCl  $0,1\text{mol L}^{-1}$  em pH 1,2 e solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1\text{mol L}^{-1}$  em pH 6,8, pHs inferiores aos valores de pKa da curcumina. Nestes valores de pH o corante apresentou-se ainda protonada e com  $\lambda_{\text{máx}}$  igual a 429 nm.

A avaliação do efeito do pH da solução de quitosana, da concentração da solução de quitosana e do volume do gelatinizador iônico (SC) na obtenção das nanopartículas foi realizada utilizando-se a técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS), em que observou-se que estes parâmetros teve influência direta sobre as características das nanopartículas formadas.

As nanopartículas, formadas por meio da interação entre os dois biopolímeros, apresentaram diâmetro em escala manométrica, na faixa de  $175,7 \pm 2,5$  a  $710,2 \pm 8,9$  nm, baixo índice de polidispersão, variando de  $0,151 \pm 0,03$  a  $0,563 \pm 0,07$ , indicando homogeneidade na dispersão e potencial zeta positivo com um valor em módulo relativamente alto, o que indica boa estabilidade coloidal.

Ao se adicionar o ativo (curcumina) no preparo das nanopartículas, o diâmetro hidrodinâmico, o PDI e o potencial zeta das NPs diminuíram à medida que se aumentou o pH da solução de quitosana. Foi observado ainda, que as características das NPs de QTS/SC contendo curcumina, aumentaram significativamente quando comparado as nanopartículas sem o ativo, o que pode estar associado à interação dos grupos  $\text{NH}_2$  da quitosana com os grupos fenólicos do corante.

A partir dos parâmetros pré-estabelecidos (diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial zeta) pode-se inferir que as nanopartículas estudadas apresentaram-se

relativamente estáveis sob as diferentes temperaturas de acondicionamento ( $-2^{\circ}\text{C}$  e  $25^{\circ}\text{C}$ ), já que não se observou variações significativas nestas características, durante o período de 120 horas em que foram avaliadas.

Com o uso da técnica de microscopia eletrônica de transmissão pôde-se observar a formação de nanopartículas esféricas, compactas e com morfologia heterogênea. Foi observado ainda, com o uso desta técnica, que as nanopartículas apresentaram diâmetro inferior ao observado na análise de DLS, o que pode estar relacionado à evaporação da água presente na nanopartículas, ou a visualização de apenas uma população de partículas no microscópio, ou ainda a formação de aglomerados durante a medida do diâmetro.

A associação da curcumina às NPs de QTS/SC ocorreu de forma eficiente. A taxa de associação obtida variou de  $62,3 \pm 0,21\%$  a  $68,5 \pm 0,18\%$ , sendo esta dependente do pH da solução da quitosana e da ordem de adição do corante durante a preparação das nanopartículas

A caracterização das nanopartículas, por meio da técnica de FITR, foi fundamental para determinar os diferentes grupos funcionais presentes nos materiais estudados, bem como as interações ocorridas entre os dois biopolímeros e a quitosana e a curcumina.

As análises térmicas demonstraram que as nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina apresentaram maior estabilidade térmica quando comparada aos seus respectivos constituintes, pois foi necessária uma temperatura mais elevada para ocorrer à degradação das nanopartículas. Além disso, o fato da transição vítrea das NPs de QTS/SC ter sido observado em uma temperatura mais elevada na análise de DSC, indica que houve interação eletrostática entre os polímeros, formando uma rede polimérica mais rígida e estável.

A liberação da curcumina foi conduzida em solução de HCl  $0,1\text{mol L}^{-1}$  em pH 1,2 e solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1\text{mol L}^{-1}$  em pH 6,8, sendo observado uma liberação mais rápida do corante em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1\text{mol L}^{-1}$  em pH 6,8. As nanopartículas utilizadas para liberação da curcumina permitiram uma liberação lenta e gradual da substância ativa, observando-se que a liberação ocorreu de forma mais acelerada por meio das NPs de QTS/SC, com solução de quitosana em pH 6,0. Observou-se ainda, que em ambas as soluções, as nanopartículas se comportaram semelhante a um hidrogel, liberando o fármaco para o meio via mecanismo de difusão.

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* utilizando a linhagem de célula tumoral humana de pulmão (A549), mostrou uma maior eficiência citotóxica da curcumina na sua forma livre que associada às nanopartículas, pois em 72 horas houve redução de  $53,5 \pm 1,1\%$  da viabilidade celular, quando se utilizou curcumina livre na concentração de  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Por meio do ensaio biológico foi possível observar, também, que as NPs de QTS/SC e seus respectivos constituintes não são tóxicos para a célula, e que apresentaram boa estabilidade sob condições fisiológicas.

Assim sendo, pode-se considerar que os resultados obtidos neste estudo foram importantes no sentido de mostrar que é possível obter nanopartículas de quitosana / sulfato de condroitina por meio de um método simples e rápido, adequadas para associação e liberação controlada de substâncias hidrofóbicas, como a curcumina. No entanto, se faz necessário um melhor entendimento do comportamento destas, bem como o aperfeiçoamento de suas características. Com isso sugere-se:

- Aperfeiçoar a síntese das nanopartículas poliméricas, visando uma maior padronização do processo de produção;
- Reduzir o tamanho das nanopartículas com o uso de surfactantes;
- Otimizar a estabilidade físico-química e de armazenamento das nanopartículas;
- Monitorar a estabilidade das suspensões coloidais poliméricas por meio da análise da alteração do seu potencial zeta, diâmetro, PDI e pH do meio em que são mantidas suspensas por um período de tempo superior ao estudado;
- Com a melhoria do método de preparação das nanopartículas, aumentar a quantidade de fármaco associado à amostra final;
- Realizar a funcionalização da superfície das nanopartículas, a fim de torná-las mais seletivas;
- Realizar novos ensaios biológicos com as nanopartículas contendo curcumina, visando avaliar o mecanismo de ação da atividade antitumoral da curcumina.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, S. et al. Curcumin (Diferuloylmethane) down-regulates expression of cell proliferation and antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of I $\kappa$ B $\alpha$  kinase and Akt activation. **Cellular Signalling**, v.14, p. 649- 654, 2002.

ALLEN JÚNIOR, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. Porto Alegre: Artmed, 2007.

ANAND, P. et al. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and mother nature. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, p. 1590-1611, 2008.

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

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

ARAKI, K. Estratégia supramolecular para a nanotecnologia. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1484-1490, 2007.

ARANAZ, I. et al. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. **Current Chemical Biology**, v. 3, p. 203-230, 2009.

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

AZEVEDO, J. R et al. Physical and chemical characterization insulin-loaded chitosan-TPP nanoparticles. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 106, p. 685–689, 2011.

BACHMEIER, B. E. et al. Curcumin downregulates the inflammatory cytokines CXCL1 and -2 in breast cancer cells via NF $\kappa$ B, **Carcinogenesis**, v. 29, n. 4, p. 779-789, 2008.

BAO, H. et al. Influence of cetyltrimethylammonium bromide on physicochemical properties and microstructures of chitosan-TPP nanoparticles in aqueous solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 328, p. 270-277, 2008.

BARROS, F. C. F et al. Produção e caracterização de esferas de quitosana modificada quimicamente. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 7, p. 232-246, 2006.

BASTOS, V. D. Biopolímeros e polímeros de matérias-primas renováveis alternativa aos petroquímicos. **Revista do BNDES**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 28, p. 201-234, 2007.

BEPPU, M. M.; ARRUDA, E. J.; SANTANA, C. C. Síntese e caracterização de estruturas densas e porosas de quitosana. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, p. 163-169, 1999.

BOONSONGRIT, Y.; MITREVEJ, A.; MUELLER, B. Chitosan drug binding by ionic interaction. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 62, p. 267-274, 2006.

BRUST, M.; KIELY, C. J. Some recent advances in nanostructure preparation from gold and silver particles: a short topical review. **Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 202, p. 175-186, 2002.

BUNHAK, E. J. et al. Influência do sulfato de condroitina na formação de filmes isolados de polimetacrilato: avaliação do índice de intumescimento e permeabilidade ao vapor d'água. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 12-317, 2007.

BUSH, J. A., CHEUNG, K-J. J, LI, G. Curcumin induces apoptosis in human melanoma cells through a Fas receptor/caspase-8 pathway independent of p53. **Experimental Cell Research**, v. 271, p. 305-314, 2001.

CARNEIRO JÚNIOR, S. V. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. UFSCar/DEMa. São Carlos, SP: ArtLider, 2004.

CASARIEGO, A. et al. Chitosan/Clay films' properties as affected by biopolymer and Clay micro/nanoparticles' concentrations. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1895–1902, 2009.

CERVERA, M. F et al. Effects of Spray Drying on Physicochemical Properties of Chitosan Acid Salts. **AAPS Pharmaceutical Sciences Technology**, p. 1-13, 2004.

CHEN, Y. L.; CHEN, H. C.; LEE H, P. Rational development of GAG-augmented chitosan membranes by fractional fractional design methodology. **Biomaterials**, v. 27, p. 2222-2232, 2007.

CHEN. C. et al. An *in vitro* study of liposomal curcumin: Stability, toxicity and biological activity in human lymphocytes and Epstein-Barr virus-transformed human B-cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366, p. 133-139, 2006.

CHEN, Q et al. Curcumin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells through a reactive oxygen species-dependent mitochondrial signaling pathway. **Onconology Reports**, v. 23, p. 397-403, 2010.

CHUAH, A. M. et al. Formation of Biocompatible Nanoparticles via the Self-Assembly of Chitosan and Modified Lecithin. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 1, p. 1-8, 2009.

CLEASEN, C.; WHILHELMS, T.; KULICKE, W. M. Formation and characterization of chitosan membranes. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 3210-3222, 2006.

COSTA JÚNIOR, E. S.; MANSUR, H. S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1460-1466, 2008.

DAGUANO, J. K. M. F.; SANTOS, C.; ROGERO, S. O. Avaliação da Citotoxicidade de Biocerâmicas desenvolvidas para uso em Sistemas de Implantes. **Matéria**, v. 12, n. 1, p. 134-139, 2007.

DALLAN, P. R. M. **Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele**, 2005, 211 f. Tese (Doutorado) – Curso de

Engenharia Química, Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos. Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

DAS, R. K.; KASOJU, N.; BORA, U. Encapsulation of curcumin in alginate-chitosan-pluronic composite. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, p. 153-160, 2011.

DASHA, M. et al. Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 981–1014, 2011.

ARAÚJO, S. A. C. et al. Avaliação *in vitro* da atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos caprinos. **Ciência Animal**, v. 18, n. 1, p. 5-31, 2008.

LYRA, M. A. M. et al. Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 784-93, 2007.

DENG, C. M. et al. Biological properties of the chitosan-gelatin sponge wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 583-58, 2007.

DES RIEUX, A. et al. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. **Journal of Controlled Release**, v. 116, p. 1-27, 2006.

DONG, Y. M. et al. Studies on glass transition temperature of chitosan with four techniques. **Journal Applied Polymer Science**, v. 93, n. 4, p. 1553-1558, 2004.

DU, J.; DAI, J.; LIU, J.; DANKOVICH, T. Novel pH-sensitive polyelectrolyte Carboximethyl Konjac Glucomannan-Chitosan beads as drug carriers. **Reactive & Functional Polymers**, v. 66, n. 1055-1061, 2006.

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

DURÁN, N.; DE AZEVEDO, M. M. M. **Rede de pesquisa em nanobiotecnologia**. Disponível em: <<http://www.comciencia.br/reportagens/nanotecnologia/nano20.htm>>. Acesso em: 12 ago. 2012.

EISENBRAND, G. et al. Methods of in vitro toxicology. **Food Chemical Toxicological**, v. 40, n. 2-3, p. 193-236, 2002.

FAJARDO, A. R. **Caracterização de complexos polieletrólitos de quitosana/sulfato de condroitina em diferentes condições de pH e tempos de imersão**. 2009, 97 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009.

FERREIRA, H. S.; RANGEL, M. C. Nanotecnologia: Aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1860-1870, 2009.

FEROZ, A. M.; MOSHAHID, A. R.; SANTOSH, K. K. Oral delivery of curcumin bound to chitosan nanoparticles cured Plasmodium yoelii infected mice. **Biotechnology Advances**, 2011.

FOOT, M.; MULHOLLAND, M. Classification of chondroitin sulfate A, chondroitin sulfate C, glucosamine hydrochloride and glucosamine 6 sulfate using chemometric techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, p. 397-407, 2005.

FREIBERG, S.; ZHU, X., Polymer microspheres for controlled drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 282, n. 1-2, p. 1-18, 2004.

GAN, Q.; WANG, T. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier—Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 59, p. 24–34, 2007.

GATTI, A. M.; RIVASI, F. Nanotecnology and control delivery systems of drugs. **Biomaterials**, v. 23, p. 23-81, 2002.

GAUDIN, F.; ZYDOWICZ, N. S. Core-shell biocompatible polyurethane nanocápsulas obtained by interfacial step polymerization in miniemulsion. **Colloids and surfaces A: Physicochem, Eng. Aspects**, v. 331, p. 133-142, 2008.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. Polyionic hydrocolloids for intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan – a review. **Journal Controlled Release**, v. 114, p. 1-14, 2008.

GERELLI, Y. et al. Structure of Self-Organized Multilayer Nanoparticles for Drug Delivery. **Langmuir**, v. 24, p. 11378-11384, 2008.

GOMES, A. S.; MELO, C. P. First Brazilian Winter School on Nanobiotechnology - **Rede Nanobiotec**, Campinas; São Carlos; Ribeirão Preto, v. 1, p. 146, 2002.

GONSALVES, A. A. et al. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215-1223, 2011.

GRENHA, A. et al. Development of new chitosan/carrageenan nanoparticles for drug delivery applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, 2009.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.

HANS, M. L.; LOWMAN, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Opinion in Solid State & Material Science**, v. 6, n. 4, p. 319-327, 2002.

HARUYAMA, T. Micro and nanobiotechnology for biosensing cellular responses. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 393-401, 2003.

HAYASHI, M. C. P. I. et al. Em direção à construção de indicadores regionais de nanociência e nanotecnologia. **Revista Brasileira de Gestão e Desenvolvimento Regional**, v. 2, n. 3, p. 85-127, 2006.

HENRIQUE, J. S.; FALCARE, R. S.; LOPES, P. S. Sistemas de Liberação Controlada. **Pharmacia Brasileira**, v. 56, p. 22, 2006.

HOLAND, W. et al. Future perspectives of biomaterials for dental restoration. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 29, p. 1291-1297, 2009.

JOE, B., VIJAYKUMAR., LOKESH, R. B. Biological properties of curcumin cellular and molecular mechanisms of action. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, p. 97-111, 2004.

JOHNSON, D. W.; MOKLER, D. J. Chondroitin sulfate. Continuing Education Module. **New Hope Institute of Retailing**, 2001

KAYSER, O.; LEMKE, A.; TREJO, N. The impact of nanobiotechnology on the development of new drug delivery systems. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 6, p. 3-5, 2005.

KIM, S. et al. Engineered polymers for advanced drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 3, p. 420-430, 2009.

KITTUR, F. S.; THARANATHAN, R. N. Chitin – The Undisputed Biomolecule of Great Potential. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 43, p. 61-87, 2003.

KULKAMP, I. C. et al. Estabilização do ácido lipoico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2078-2084, 2009.

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

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 75, p. 1-18, 2010.

KURRIEN, B. T. et al. Improving the solubility and pharmacological efficacy of curcumin by heat treatment. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 5, p. 567-576, 2007.

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

LEE, T. W. Y; ROBINSON, J. R. Sistema de Liberação Controlada de Drogas. In: GENNARO, A. R. (Ed.) **Remington: A Ciência e a Prática da Farmácia**, 20. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

LEE, S. J. et al. Tumor specificity and therapeutic efficacy of photosensitizer-encapsulated glycol chitosan-based nanoparticles in tumor-bearing mice. **Biomaterials**, v. 30, p. 2929-2939, 2009.

LEGRAND, P. et al. Influence of polymer behavior in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 344, p. 33-43, 2007.

LETCHFORD, K. et al. Solubilization of hydrophobic drugs by methoxy poly(ethylene glycol)-block-polycaprolactone diblock copolymer micelles: Theoretical and experimental data and correlations. **Journal Pharmaceutical Science**, 2007.

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

LÓPEZ-LEÓN, T. et al. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 283, p. 344-351, 2005.

MA, Z. et al. High-performance liquid chromatography analysis of curcumin in rat plasma: application to pharmacokinetics of polymeric micellar formulation of curcumin. **Biomedical Chromatography**, v. 21, p. 5, p. 546-52, 2007.

MACIEL, A. P. M.; LONGO, E.; LEITE, E. R. Dióxido de estanho nanoestruturado: Síntese e crescimento de nanocristais e nanofitas. **Química Nova**, v. 26, p. 6, p. 855-862, 2003.

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

MAITI, K. et al. Curcumin–phospholipid complex: Preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 330, n. 1, p. 155-163, 2007.

MAJETI, N. V.; KUMAR, R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, p. 1-27, 2000.

MARTINS, G. V.; MANO, J. F.; ALVES, N. M. Nanostructured self-assembled films containing chitosan fabricated at neutral pH. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 570–573, 2010.

MAZZARINO, L. **Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados contendo curcumina e avaliação in vitro e in vivo em modelo de melanoma murinho B16-F10**. 2009, 157 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Centro de Ciência da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

MELO, N. F. S. et al. Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de poli (l-lactídeo) contendo benzocaína. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 65-69, 2010.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research, Stuttgart**, v. 5, n. 1, p. 561-573, 2006.

MONSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: applications to proliferation and cytotoxicity assay's. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOREIRA, A. N.; DEL PINO, F. A. B.; VENDRUSCULO, C. T. Estudo da produção de biopolímeros via enzimática por meio de da inativação e lise celular e com células

viáveis de *Beijerinckia* sp. 7070. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 300-305, 2003.

MOTHÉ, C. G.; ARAUJO, C. R. Caracterização térmica e mecânica de compósitos de poliuretano com fibras de curauá. **Polímeros: Ciência e tecnologia**, v. 14, n. 4, p. 274-278, 2004.

MOURA, M.R.; AOUADA, F. A.; MATTOSO, L. H. C. Preparation of chitosan nanoparticles using methacrylic acid. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 312, p. 477-483, 2008.

MOURA, M. J. Aplicações do quitosano em liberação controlada de fármacos: Algumas considerações. In: **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia: Centro Científico Conhecer, v. 8, n. 14, p. 1489, 2012.

MULLER, V. et al. Preparação e caracterização de microesferas constituídas de quitosana e zeína, como matrizes poliméricas para posterior liberação controlada de fármacos. **Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros**. Foz do Iguaçu, PR, out. 2009.

NETO, C. G. T. et al. Thermal analysis of chitosan based networks. **Carbohydrates Polymers**, v. 62, p. 97-103, 2005.

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

ORÉFICE. R. **Alguns biopolímeros e aplicações**. Disponível em: <<http://www.biomaterial.com.br/biopol/sld002.htm>>. Acesso em: 2 nov. 2011.

PAN, Y. et al. Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 249, p. 139-147, 2002.

PAN, C. H. J. et al. Preparation, characterization and anticoagulation of curcumin-eluting controlled biodegradable coating stents. **Journal of Controlled Release**, v. 116, p. 42-49, 2006.

PAPINI, C. J. **Estudo comparativo de métodos de determinação do tamanho de partícula**. 2003. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais) – Instituto de pesquisas energéticas e nucleares, Autarquia Associada à universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

PAULINO, A. T. et al. Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, p. 98–103, 2006.

PENICHE, C.; FERNÁNDEZ, M.; RODRIGUEZ, G. Cell supports of chitosan/hyaluronic acid and chondroitin sulphate system morphology and biological behaviour. **Journal of Materials Science. Materials in Medicine**, v. 18, p. 1719-1726, 2007.

PÉRET-ALMEIDA, L. et al. Atividade antimicrobiana de diferentes extratos de *Curcuma longa* L. 2º Simpósio em Ciência de Alimentos. **SIMPOCAL/SBCTA**. Florianópolis, SC, 28-30 maio de 2003.

PIAI, J. F.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. Self-assembly of a swollen chitosan/chondroitin sulfate hydrogel by outward diffusion of the chondroitin sulfate chains. **Acta Biomaterialia**, v. 5, p. 2601-2609, 2009.

PILLAI, G. R. et al. Induction of apoptosis in human lung cancer cells by curcumin. **Cancer Letters**, v. 208, p. 163–170, 2004.

PIMENTEL, L. F. et al. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 4, 2007.

PINA, K. V. et al. Nanotecnologia e Nanobiotecnologia? Estado da arte, perspectivas de inovação e investimentos. **Revista Gestão Industrial**, v. 02, n. 02, p. 115-125, 2006.

PONZIO, E. A. **Nanocompósitos de blendas poliméricas condutoras e óxidos de metais de transição**. 2006. 199 f. Tese (Doutorado) – Química. Instituto de química da Universidade de São Paulo, 2006.

PRADO, A. G. S. et al. Adsorption and preconcentration of divalent metal ions in fossil fuels and biofuels: Gasoline, diesel, biodiesel, diesel-like and ethanol by using chitosan microspheres and thermodynamic approach. **Talanta**, v. 84, p. 759–765, 2011.

QIN, C. et al. Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, p. 367–374, 2006.

RAFFIN, R. P. et al. Nanocápsulas poliméricas secas contendo indometacina: Estudo de formulação e de tolerância gastrointestinal em ratos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, p. 163-72, 2003.

RAMSEWAK, R. S. et al. Cytotoxicity, antioxidant and antiinflammatory activities of Curcumins I-III from *Curcuma longa*. **Phytomedicine**, v. 7, p. 4, p. 303-308, 2000.

REIS, P. C. et al. Nanoencapsulation I: Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine Journal**, v. 2, p. 8-21, 2006.

REÚS, Márcia et al. Nanopartículas poliméricas na administração tópica ocular defármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 28, n. 1, p. 125-32, 2009.

RICHY, F. et al. Structuraland symptomatic efficacy of glucosamine and chondroitin in knee osteoarthritis: A comprehensive meta-analysis. **Archives of Internal Medicine**, v. 163, p. 1514-1522, 2003.

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

RODRIGUEZ, G. S. et al. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsificationdiffusion, and nanoprecipitation methods. **Pharmaceutical Research**, v. 21, p. 1428-1439, 2004.

ROGERO, S. O. et al. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Material Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future nanotechnology in human health care. **Clinical Nanomedicine**, p. 20-31, 2007.

SANTOS, J. E. et al. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

SANTOS, C. V. **Sulfato de Condroitina: da matéria-prima à terapêutica**. 2009. 79 f. Monografia (Graduação) - Medicina Veterinária. Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

SANTOS, J. S. Nanopartículas: Aplicações cosméticas e farmacêuticas. São Paulo: **Pharmabooks**, 2010.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e Estudo de Estabilidade de Suspensões de Nanocápsulas e de Nanoesferas Poliméricas Contendo Diclofenaco. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 21, n. 2, p. 99-106, 2002.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERES, S. S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

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

SHALABY ,M.; SHALABY W. S. Implantable Insulin Controlled Release System for Treating Diabetes Mellitus. In: SHALABY W. S.; BURG K **Absorbable biodegradable polymers**. CRC PRESS: Boca Raton London, 2005.

SHARMA, R. A.; GESCHER, A. J.; STEWARD, G. W. P. Curcumin: the story so far. **European Journal of Cancer**, v. 41, p. 1955-1968, 2005.

SHI, M. et al. Antiproliferation and apoptosis induced by curcumin in human ovarian cancer cells. **Cell Biology International**, n. 30, p. 221-226, 2006.

SHISHODIA, S.; SETHI, G.; AGGARWAL, B. B. Curcumin: Getting Back to the Roots. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1056, p. 206-217, 2005.

SILVA JÚNIOR, A. A. **Micropartículas de ácido poli lático-co-glicólico obtidas por “spray drying” para liberação prolongada intra-ocular de fármacos**. 2008. 177 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – UNESP, Araraquara, 2008.

SINKO, P. J. **Físico-farmácia e Ciências Farmacêuticas**. 5. ed. Artmed: São Paulo, 2008.

SOPPIMATH, K. S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, USA, v. 70, p. 1-20, 2001.

SRINIVASAN, M.; RAINENDRA, P. N.; MENON, V. P. Protective effect of curcumin on radiation induced DNA damage and lipid peroxidation in cultured human lymphocytes. **Mutation Research**, v. 611, p. 96-103, 2006.

SUNDAR, S.; KUNDU, J.; KUNDU, S. C. Biopolymeric nanoparticles. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 11, p. 014104-13, 2010.

SUYATMA, N. E.; TIGHZERT, L.; COPINET, A. Effects of hydrophilic plasticizers on mechanical, thermal and surface properties of chitosan films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 10, p. 3950-3957, 2005.

TAGLIARI, M. P. **Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana e alginato de sódio para incorporação de ácido glicirrízico, ácido salicílico ou cafeína visando a liberação tópica**. 2012. 229 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – UFSC, Santa Catarina, 2012.

TAGLIARI, M. P. et al. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação de ácido glicirrízico, ácido salicílico e cafeína em nanopartículas de quitosana e alginato. **Química Nova**, v. 35, p. 6, 2012.

TAKEUCHI, H. et al. Mucoadhesive properties of carbopol or chitosan-coated liposomes and their effectiveness in the oral administration of calcitonin to rats. **Journal of Controlled Release**, v. 6, p. 42–235, 2003.

THANGAPAZHAM, R. L., SHARMA, A., MAHESWARI, R. K. Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin. **The AAPS Journal**, v. 8, p. 3, p. 443-449, 2006.

TIYABOONCHAI, W. Chitosan Nanoparticles: A Promising System for Drug Delivery. **Naresuan University Journal**, v. 11, n. 3, p. 51-66, 2003.

TONHI, E.; PLEPIS, A M. G. Obtenção e caracterização de blendas de colágeno-chitosana. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 943-948, 2002.

TSAI, H-Y. et al. Antitumor Efficacy of Doxorubicin Released from Crosslinked Nanoparticulate Chondroitin Sulfate/Chitosan Polyelectrolyte Complexes. **Macromolecular Bioscience**, v. 11, p. 680–688, 2011a.

TSAI, Y-M. et al. Curcumin and its nano-formulation: The kinetics of tissue distribution and blood–brain barrier penetration. **International Journal of Pharmaceutics**, 2011b.

URGHART, J. Controlled Drug Delivery: therapeutic and pharmacological aspects. **Journal of Internal Medicine**, v. 248, p. 357-376, 2000.

VITALINE C. GERBRAS. **Química Farmacêutica**. Disponível em: <[http://www.gerbras.com.br/produtos/vitaline\\_c.asp](http://www.gerbras.com.br/produtos/vitaline_c.asp)>. Acesso em: 2 nov.2011.

XU, R., Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. **Particuology**, v. 6, p. 112–115, 2007.

WANG, D. A.; VARGHESE, S.; SHARMA, B. Multifunctional chondroitin sulphate for cartilage tissue-biomaterial integration. **Nature Materials**, v. 6, p. 385-392, 2007.

WONG, T. W. Chitosan and Its Uses in Design of Insulin Delivery System. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 3, p. 8-25, 2009.

YANG, J. M. et al. Evaluation of chitosan/PVA blended hydrogel membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 236, p. 39-51, 2004.

YANO, H. et al. Control delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 79, p. 103, 2002.

YEH, M-K. et al. Novel protein loaded chondroitin sulfate-chitosan nanoparticles: Preparation and characterization. **Acta Biomaterialia**, v. 7, p. 3804-3812, 2011.

YENILMEZ, E.; BASARAN, B.; YAZAN, Y. Release characteristics of vitamin E incorporated chitosan microspheres and in vitro–in vivo evaluation for topical application. **Carbohydrate Polymers**, v. 7, p. 800-811, 2011.

ZANELLA, I. et al. Abordagens em nanociência e nanotecnologia para o ensino médio. **XVIII Simpósio Nacional de Ensino de Física – SNEF – Vitória**, 26 a 30 de Janeiro, 2009.

ZHANG, J. et al. Design of nanoparticles as drug carriers for cancer therapy. **Cancer Genomics & Proteomics**, v. 3, p. 147-158, 2006.

ZOHURIAAN, M. J.; SHOKROLARI, F. Thermal studies on natural and modified gums. **Polymer Testing**, v. 23, p. 575-579, 2004.

ZOU, X. H.; JIANG, Y. Z.; ZANG, G. R. Specific interactions between human fibroblast and particular chondroitin sulphate molecules for wound healing. **Acta Biomaterialia**, p. 1472-7061, 2009.

## 8. ANEXO

Neste tópico estão apresentados exemplos de histogramas obtidos a partir do equipamento de espalhamento de luz dinâmico Nano-Zetasizer – ZS, modelo ZEN3600 - Malvern Instruments, para as nanopartículas de quitosana / sulfato de Condroitina puras em função da variação do pH da solução de quitosana, da variação da concentração da solução de quitosana e da variação do volume do gelatinizador iônico (SC) e para nanopartículas de quitosana / sulfato de Condroitina contendo curcumina em função da variação do pH da solução de quitosana.