



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
E ENGENHARIA DE MATERIAIS**



DISSERTAÇÃO

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS QUITOSANA/PIPERINA PARA
LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS**

IMARALLY VITOR DE SOUZA RIBEIRO NASCIMENTO

CAMPINA GRANDE
Agosto/2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA
GRANDE**



**CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
E ENGENHARIA DE MATERIAIS**

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS QUITOSANA/PIPERINA PARA
LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS**

IMARALLY VITOR DE SOUZA RIBEIRO NASCIMENTO

*Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciência e
Engenharia de Materiais como requisito
parcial à obtenção do título de MESTRE
EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE
MATERIAIS.*

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook
Agência Financiadora: CAPES

CAMPINA GRANDE
Agosto/2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

- N244d Nascimento, Imarally Vitor de Souza Ribeiro.
Desenvolvimento de sistemas quitosona/piperina para liberação controlada de fármacos / Imarally Vitor de Souza Ribeiro Nascimento. – Campina Grande, 2014.
80 f. : il. color.
- Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2014.
- "Orientação: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook".
Referências.
1. Biomateriais. 2. Quitosana. 3. Piperina. 4. Membranas. 5. Sistemas Matriciais. I. Fook, Marcus Vinícius Lia. II. Título.

CDU 620.1 (043)

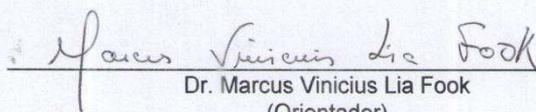
Imarally Vitor de Souza Ribeiro Nascimento

Nascimento	05 de Fevereiro de 1990.
Naturalidade	Campina Grande, PB.
Filiação	Josemar Ribeiro Nascimento Iracema Vitor de Souza Ribeiro Nascimento
2007 – 2012	Graduação em Engenharia de Materiais pela Universidade Federal de Campina Grande – UFCG.
2012- 2014	Curso de pós-graduação, nível de Especialização, em Engenharia e Segurança do Trabalho, pela Faculdade Integrada de Patos- FIP.
2012- 2014	Curso de pós-graduação, nível de Mestrado, em Ciência e Engenharia de Materiais pela Universidade Federal de Campina Grande –UFCG.

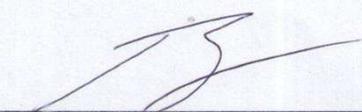
**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS QUITOSANA/PIPERINA
PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS.**

IMARALLY VITOR DE SOUZA RIBEIRO NASCIMENTO

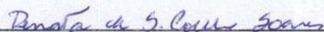
Dissertação Aprovada em 29/08/2014 pela banca examinadora constituída dos seguintes membros:



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



Dr. Raúl Garcia Carrodeguas
(Examinador Externo)
CERTBIO/UFCG



Dr.ª Renata de Souza Coelho Soares
(Examinadora Externa)
CCBS/UEPB

“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo propósito debaixo do céu: há tempo de nascer e tempo de morrer; tempo de plantar e tempo de arrancar o que se plantou; tempo de matar e tempo de curar; tempo de derribar e tempo de edificar; tempo de chorar e tempo de rir; tempo de prantear e tempo de saltar de alegria; tempo de espalhar pedras e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar e tempo de afastar-se de abraçar; tempo de buscar e tempo de perder; tempo de guardar e tempo de deitar fora; tempo de rasgar e tempo de coser; tempo de estar calado e tempo de falar; tempo de amar e tempo de aborrecer; tempo de guerra e tempo de paz. Que proveito tem o trabalhador naquilo com que se afadiga? Vi o trabalho que Deus impôs aos filhos dos homens, para com ele os afligir. Tudo fez Deus formoso no seu devido tempo; também pôs a eternidade no coração do homem, sem que este possa descobrir as obras que Deus fez desde o princípio até ao fim. Sei que nada há melhor para o homem do que regozijar-se e levar vida regalada; e também que é dom de Deus que possa o homem comer, beber e desfrutar o bem de todo o seu trabalho. Sei que tudo quanto Deus faz durará eternamente; nada se lhe pode acrescentar e nada lhe tirar; e isto faz Deus para que os homens temam diante dele.” **Eclesiastes 3: 1-14.**

AGRADECIMENTOS

A **Deus** primeiramente, que me deu o dom da sabedoria, a força e a coragem para que eu não desistisse nessa caminhada tão difícil.

Aos **meus pais, Iracema e Josemar**, primeiros incentivadores da minha educação e que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões.

As minhas queridas **amigas-irmãs, Karol, Flávia, Tamy e Bianca**, que estão comigo desde sempre e para sempre, vocês fazem parte da minha vida.

As minhas **amigas da faculdade, Caline, Raquel**, que fizeram e fazem parte dessa dura caminhada.

Ao meu **noivo, Willams**, que com sua paciência ímpar sempre me disse: “Calma, vai dar tudo certo”.

Ao **Prof. Dr. Marcus Vinicus Lia Fook** pela orientação, pelas oportunidades e pelo jeito de pai, dando carinho e puxões de orelha, quando necessário.

A todos que fazem parte do **Laboratório CERTBIO**, que contribuíram com meu caminhar acadêmico em especial pela participação efetiva no trabalho. Em especial a **Rodrigo**, pela ajuda nas análises de DRX, a **Cássia e Thiago**, pelas considerações para tornar esse trabalho cada vez melhor, a **Rayane**, pela ajuda com os ensaios e considerações sobre o CLUE.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais.

Ao **PROADI/SUS** e **Hospital Samaritano** pelo suporte financeiro na realização deste trabalho.

A CAPES pela bolsa concedida.

RESUMO

Os sistemas de liberação controlada de fármacos oferecem inúmeras vantagens quando comparados a outros de dosagem convencional tendo os polissacarídeos biodegradáveis ganhando bastante aceitação no desenvolvimento desses sistemas. A quitosana é um exemplo de polissacarídeo biodegradáveis, cuja taxa de liberação pode ser modulada a partir da reticulação iônica com o Tripolifosfato de sódio (TPP). A piperina é um dos principais constituintes da pimenta negra, possuindo diversas ações farmacológicas que podem causar a morte de células cancerígenas e quando conjugada com a quitosana apresenta melhor biodisponibilidade e ação mais rápida. Sendo assim, esse trabalho objetivou desenvolver e avaliar comparativamente membranas poliméricas de quitosana e quitosana reticulada pelo TPP para uso em sistema de liberação controlada de piperina, com a finalidade de obter uma via alternativa para a administração desse fármaco. A piperina foi adicionada sob agitação constante à solução de quitosana e as membranas foram obtidas pelo método de evaporação do solvente. As membranas desenvolvidas foram caracterizadas pelas técnicas de Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Difração de Raios X (DRX), Microscopia Ótica (MO), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS), Análise Termogravimétrica (TG), Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Eficiência de Carregamento (EC) através da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE), Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos (MTT). Observou-se na análise por FTIR bandas características da quitosana, do agente reticulante e da piperina, como também bandas que caracterizam uma interação entre a quitosana e a piperina. A técnica de DRX demonstrou alteração no caráter semicristalino da quitosana com a presença da piperina e do tripolifosfato. Foi possível perceber, através das técnicas de MO e MEV, alteração na morfologia da membrana contendo piperina quando comparada a de quitosana pura, com a presença de partículas fibrilares. As análises de TG e DSC evidenciaram que quando a piperina foi adicionada à quitosana esta proporcionou uma maior estabilidade térmica ao sistema. O ensaio eficiência de carregamento evidenciou que a extração do fármaco foi eficaz e que a reticulação influenciou na extração deste. As membranas desenvolvidas apresentaram potencial citotóxico para as células de câncer mamário humano MCF 7. Nas condições desenvolvidas nesta pesquisa o sistema indicado como referência para ensaios de liberação e novos ensaios biológicos é o sistema MQPR. Diante do exposto o sistema desenvolvido apresenta-se como promissor para a obtenção de um sistema para liberação controlada de fármacos.

Palavras chaves: Biomateriais, Quitosana, Piperina, Membranas, Sistemas matriciais.

ABSTRACT

Controlled drug delivery systems offer many advantages when compared to other conventional dosage methods with biodegradable polysaccharides gaining enough acceptance in the development of these systems. Chitosan is an example of a biodegradable polysaccharide, whose rate of release can be modulated from the ionic crosslinking with sodium tripolyphosphate (TPP). Piperine is one of the major constituent of black pepper, having many pharmacological actions that can cause the death of cancer cells and when combined with chitosan has better bioavailability and faster action. Therefore, this study aimed to develop and comparatively evaluate polymer membranes of chitosan and crosslinked chitosan by TPP to be used in a controlled release system of piperine, in order to obtain an alternative route for the administration of this drug system. Piperine was added under constant stirring to the solution of chitosan and membranes were obtained by the solvent evaporation method. The developed membranes were characterized by the techniques of Infrared Spectroscopy in the Region Fourier Transform (FTIR), X-ray Diffraction (XRD), Optical Microscopy (OM), scanning electron microscopy (SEM), Energy Dispersive Spectroscopy X-Ray (EDS), Thermogravimetric Analysis (TGA), Scanning Calorimetry Analysis of Difference (DSC), Efficiency Charge (EC) by liquid Chromatography Ultra Efficiency (HPLC), Assessment of Cell Viability of Macrophages (MTT). It was observed by FTIR analysis, bands characteristic of chitosan, the crosslinking agent and piperine, as well as bands characterizing an interaction between chitosan and piperine. The XRD technique showed change in semi-crystalline nature of chitosan in the presence of piperine and tripolyphosphate. It was possible to see, through the techniques of OM and SEM, changes in the morphology of the membrane containing piperine compared to pure chitosan, with the presence of fibrillar particles. TG analysis showed that, when piperine was added to the chitosan it provided a smaller weight loss of the system, showing the interaction between chitosan and piperine. DSC analysis showed that addition of piperine into chitosan provided greater stability to the system. The charging efficiency test showed that the drug can be entrapped by 57% in the uncrosslinked membranes and crosslinking influenced the extraction of drug. The developed membranes showed cytotoxic potential for human breast cancer cells MCF 7. Under the developed conditions in this research, MQPR system was shown as a reference for drug delivery testing and new biological tests. Given the above, the developed system is presented as promising for obtaining a system for controlled release of drugs.

Keywords: Biomaterials, Chitosan, Piperine, Membranes, Matrix Systems.

PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

1. NASCIMENTO, I.V.S.R.; LEAL, R.C.A.; FOOK, M.V.L.; MEIRA, R.C. Sterilization Of Chitosan Membranes For Use As Biomaterial. *Materials Science Forum*. v. 805, p. 35-40, 2015.
2. LEAL, R.C.A.; NASCIMENTO, I.V.S.R.; FOOK, M.V.L.; MEIRA, R.C. Evaluation Of The Cytotoxic Potential Chitosan/Hydroxyapatite Biocomposites. *Materials Science Forum*. v. 805, p. 30-34, 2015.
3. MEIRA, R.C; LEAL, R.C.A.; FOOK, M.V.L.; NASCIMENTO, I.V.S.R. Evaluation Of The Terms Of Use Of Recycled Polymer Packaging Co-Extruded, v. 805, p. 41-46, 2015.

TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSO (COMPLETO)

1. FURTADO, G.T.F.S.; **NASCIMENTO, I.V.S.R.**, MENESES, R. L., GUEDES, N. C., FOOK, M. V. L. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SCAFFOLDS QUITOSANA/CURCUMINA In: 3er Taller de Órganos Artificiales, Biomateriales e Ingeniería de Tejidos, 2013, Vinã del Mar. **PROGRAMA DE LIBROS TRABAJOS COMPLETOS.** , 2013. p.138 – 143.
2. GOMES, Y. V. R., LEAL, R. C. A., **NASCIMENTO, I.V.S.R.**, FURTADO, G.T.F.S., FOOK, M. V. L. Arcabouços de Quitosana: Avaliação Morfológica. In: I Encontro Nacional de Educação, 2012, Campina Grande - PB. **Anais do Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia UEPB(2012)**. Editora Realize, 2012. v.1.
3. SODRE, M. A., LEAL, R. C. A., **NASCIMENTO, I.V.S.R.**, FOOK, M. V. L. CARACTERIZAÇÃO DE CELULOSE MICROCRISTALINA DE USO INTRANASAL In: I Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia, 2012, Campina Grade. **Anais do Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia UEPB(2012)**. , 2012. v.1. p.1 - 9

TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSO (RESUMO)

1. BARBOSA, W.T., **NASCIMENTO, I.V.S.R.**, LISBOA, H.M., FOOK, M.V.L. Caracterização de Scaffolds de Hidroxiapatita Obtida A Partir Do Método Sol-Gl Utilizando a Técnica de Réplica Da Esponja Polimérica. In: 8th Latin American Congress of Artificial Organs, Biomaterials and tissue Engineering (8th COLAOB), Rosário, Argentina, 2014.
2. **NASCIMENTO, I.V.S.R.**, SOUZA, M.K.S., BARBOSA, W.T., FIDELES, T.B., FOOK, M.V.L., Thermoanalytical Evaluation of Chitosan/Piperine Membranes, In: 8th Latin American Congress of Artificial Organs, Biomaterials and tissue Engineering (8th COLAOB), Rosário, Argentina, 2014.

3. NASCIMENTO, I.V.S.R., OLIVEIRA, H. M. L., FOOK, M. V. L. Effect Of Sterilization in Chitosan Fibers. In: 3er Taller de Organos Artificiales, Biomateriales e Ingeniería de Tejidos, 2013, Vinã del Mar. **Anais do 3er Taller de Organos Artificiales.** , 2013.
4. FURTADO, G.T.F.S., NASCIMENTO, I.V.S.R., MENESES, R. L., GUEDES, N. C., FOOK, M. V. L. PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF CHITOSAN/CURCUMIN SCAFFOLDS In: 3er Taller de Organos Artificiales, Biomateriales e Ingeniería de Tejidos, 2012, Vinã del Mar. **Anais do 3er Taller de Organos Artificiales.** , 2013.
5. FURTADO, G.T.F.S, Rafaella Meneses, **NASCIMENTO, I. V. S. R.**, Natália de Carvalhos Guedes, FOOK, M. V. L. Evaluation of the chitosan's concentration and their effects in three dimensional structures In: 11th International Congress of the Europeans Chitin Society - EUCHIS 2013 **11th International Congress of the Europeans Chitin Society - EUCHIS 2013 Conference Book.** , 2013.
6. LEAL, R. C. A, **NASCIMENTO, I. V. S. R.**, RABELO, I, FERREIRA, V, FOOK, M.V.L. EVALUATION OF CYTOTOXICITY OF SCAFFOLDS CHITOSAN / CALCIUM PHOSPHATE FOR APPLICATION AS A BONE GRAFT In: 6th Chitin Iberoamerican Symposium / 12th International Conference on Chitin and Chitosan, 2012, FORTALEZA. **6th Chitin Iberoamerican Symposium / 12th International Conference on Chitin and Chitosan.** , 2012.
7. LEAL, R. C. A, **NASCIMENTO, I. V. S. R.**, RABELO, I, FERREIRA, V, FOOK, M.V.L. PERFORMANCE EVALUATION OF MECHANICAL CHITOSAN/HYDROXYAPATITE BIOCOMPOSITES In: 6th Chitin Iberoamerican Symposium / 12th International Conference on Chitin and Chitosan, 2012, FORTALEZA. **6th Chitin Iberoamerican Symposium / 12th International Conference on Chitin and Chitosan.** , 2012.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Perfis de concentração de droga no plasma para comprimidos convencionais ou cápsula (---) e uma formulação de libertação controlada de ordem zero (___). MEC = concentração mínima eficaz; MSC = Concentração máxima segura.	22
Figura 2: Representação esquemática do sistema reservatório (A) e matricial (B).	24
Figura 3: Estrutura da quitosana.	30
Figura 4: Representação esquemática da reticulação da quitosana com o Tripolifosfato de sódio.	33
Figura 5: Estrutura molecular da piperina.	37
Figura 6: Etapas de preparação da solução de quitosana.	41
Figura 7: Etapas de preparação da solução alcoólica de piperina.	41
Figura 8: Etapas de preparação das membranas de quitosana.	42
Figura 9: Etapas de preparação das membranas de quitosana/piperina.	43
Figura 10: Etapas da reticulação: (a) membranas de quitosana e (b) membranas de quitosana/piperina.	44
Figura 11: Espectroscopia por FTIR das membranas de quitosana (MQ) e membranas de quitosana reticuladas (MQR).	50
Figura 12: Espectroscopia por FTIR do fármaco piperina (PIP).	51
Figura 13: Espectroscopia por FTIR das membranas de quitosana/piperina (MQP) e quitosana/piperina reticulada (MQPR).	52
Figura 14: Difratoograma das membranas de quitosana (MQ) e membranas de quitosana reticuladas (MQR).	53
Figura 15: Difratoograma do fármaco Piperina.	54
Figura 16: Projeção do fármaco piperina.	54
Figura 17: Difratoogramas das membranas de quitosana/piperina (MQP) e membranas de quitosana/piperina reticuladas (MQPR).	55
Figura 18: Microscopia ótica da membranas de quitosana não reticuladas (MQ): (a) 350x e (b) 1050x.	56
Figura 19: Microscopia ótica das membranas de quitosana reticuladas (MQR): (a) 350x e (b) 1050x.	57
Figura 20: Microscopia ótica das membranas de quitosana/piperina não reticuladas (MQP): (a) 350x e (b) 1050x.	57
Figura 21: Microscopia ótica das membranas de quitosana/piperina reticuladas (MQPR): (a) 350x e (b) 1050x.	58
Figura 22: MEV das membranas de quitosana não reticuladas (MQ) (a)500x, (b) 2000x e membranas de quitosana reticuladas (MQR) (c) 500x, (b) 2000x.	59
Figura 23: Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS) das membranas de quitosana não reticuladas (MQ) (a) e membranas de quitosana reticuladas (MQR) (b). Aumento de 2000x.	60

Figura 24: MEV do fármaco Piperina: (a) 500x, e EDS: (b) 2000x.	60
Figura 25: MEV das membranas de quitosana não reticuladas (a)500x, (b) 2000x e reticuladas (c) 500x, (b) 2000x.	62
Figura 26: Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS) das membranas de quitosana/piperina (MQP) (a) e membranas de quitosana/piperina reticuladas (MQPR) (b). Aumento de 2000x.	63
Figura 27: Análise termogravimétrica (a) TG das membranas MQ, MQR, MQP, MQPR e do fármaco PIP e (b) DTG das membranas MQ, MQR, MQP, MQPR e do fármaco PIP.....	63
Figura 28: Análise calorimétrica exploratória diferencial membranas de quitosana não reticuladas (MQ) e reticuladas (MQR), das membranas quitosana/piperina não reticuladas (MQP) e reticuladas (MQPR) e do fármaco piperina (PIP).	66
Figura 29: Cromatograma das soluções-padrão da piperina obtido por CLUE-UV a 330nm.	68
Figura 30: Curva de calibração da piperina.....	69
Figura 31: Viabilidade celular das células MCF 7 na presença das membranas de quitosana (MQ), membranas de quitosana/piperina (MQP) e membranas de quitosana/piperina reticuladas (MQPR).....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados termogravimétricos dinâmicos das membranas de quitosana (MQ), membranas de quitosana reticuladas (MQR), membranas de quitosana/piperina (MQP), membranas quitosana/piperina reticuladas (MQPR); e fármaco piperina (PIP).	64
Tabela 2: Dados dos eventos calorimétricos das amostras estudadas.	66
Tabela 3: Determinação da eficiência de carregamento da piperina nas membranas MQP.	70
Tabela 4: Determinação da eficiência de carregamento da piperina nas membranas MQPR.	70

LISTA DE SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
TTS – Sistemas Terapêuticos Transdérmico
CLUE – Cromatografia Líquida de Ultra eficiência
MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
GD – Grau de Desacetilação
TPP – Tripolifosfato de Sódio
pH - Potencial de Hidrogênio Iônico
Mw – Peso Molecular
MQ – Membrana de quitosana
MQR – Membrana de quitosana reticulada
MQP – Membrana de quitosana/piperina
MQPR – Membrana de quitosana/piperina reticulada
EC – Eficiência de carregamento
r – Coeficiente de correlação
r² – Coeficiente de determinação
UFCG Universidade Federal de Campina Grande
FTIR - Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier
EDS - Espectroscopia Dispersiva de Raios X
DRX - Difração de Raios X
TG – Termogravimetria
DTG – Análise Térmica Diferencial
DSC – Análise calorimétrica diferencial
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
MO – Microscopia Ótica

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE SIGLAS	xiv
1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 Biomateriais	20
3.2 Sistemas de Liberação Controlada	21
3.3 Sistemas transdérmico de liberação controlada	24
3.4 Modelos matemáticos empregados no mecanismo de liberação	25
3.4.1 Sistemas reservatório com fonte de atividade não-constante	26
3.4.2 Sistemas reservatório com fonte de atividade constante	27
3.4.3 Sistema monolítico	28
3.5 Polímeros na obtenção de sistemas de liberação controlada	29
3.6 Quitosana	30
3.6.1 Reticulação iônica da quitosana em aplicações biomédicas	32
3.6.2 Propriedades físico-químicas da quitosana	34
3.6.3 Propriedades biológicas da quitosana	34
3.7 Piperina	37
4 METODOLOGIA	40
4.1 Local da Pesquisa	40
4.2 Materiais	40
4.2.1 Biopolímero	40
4.2.2 Fármaco	40
4.2.3 Reagentes	40
4.3 Métodos	40
4.3.1 Preparação das soluções de quitosana	40
4.3.2 Preparação das soluções de piperina	41
4.3.3 Preparação das membranas de quitosana	41
4.3.4 Preparação das membranas de quitosana/piperina	42

4.3.5 Reticulação das membranas com Tripolifosfato de Sódio	44
4.4 Caracterização das membranas	44
4.4.1 Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	44
4.4.2 Difração de Raios X (DRX)	45
4.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	45
4.4.4 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	45
4.4.5 Microscopia Ótica	45
4.4.6 Análise termogravimétrica (TG)	46
4.4.7 Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	46
4.4.8 Teor de Piperina na Membrana de Quitosana	46
4.4.9 Ensaio de Citotoxicidade <i>in vitro</i>	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	49
5.2 Difração de Raios X	52
5.3 Microscopia Ótica	55
5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS)	58
5.5 Análise termogravimétrica	63
5.6 Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	66
5.7 Teor de Piperina na Membrana de Quitosana	68
5.7.1 Cromatograma da Piperina	68
5.7.2 Curva de calibração	68
5.7.3 Eficiência de carregamento das membranas contendo a piperina	69
5.8 Avaliação da viabilidade celular das células MCF-7	71
6 CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1 INTRODUÇÃO

A tecnologia de liberação controlada de fármacos representa uma das fronteiras da ciência, envolvendo campos multidisciplinares e contribuindo, portanto, de maneira significativa para o avanço da saúde humana. Os sistemas de liberação, geralmente descritos como “*drug delivery systems*”, oferecem inúmeras vantagens quando comparados a outros *de* dosagem convencional. Frequentemente, estas novas estratégias para a veiculação de fármacos permitem aplicações de materiais nas suas mais variadas formas, como emulsões múltiplas e inversas, micro e nanogéis, lipossomas, micro e nanopartículas biodegradáveis, micro e nanocápsulas (DE AZEVEDO, 2002).

Devido as suas diversas aplicações e funcionalidades, especialmente em terapias de liberação controlada do fármaco, os polímeros estão dentre os excipientes mais utilizados para a obtenção de formas de dosagens farmacêuticas (RIOS, 2005).

A utilização de polímeros naturais como biomateriais se dá, em sua maioria, porque estes apresentam estruturas com semelhanças químicas e biológicas com o tecido humano, atendendo aos requisitos de biodegradabilidade e biocompatibilidade exigidos para tais aplicações. Além disso, esses materiais estão disponíveis na natureza em grandes quantidades e com custos cada vez mais competitivos (SHI, 2006).

A quitosana, um polímero natural, vem sendo utilizado para aplicação em uma variedade de formas, tais como hidrogéis, fibras, membranas, microesferas e arcabouços porosos. Tem sido estudada também como uma possível matriz para o desenvolvimento dos métodos de liberação controlada de vários agentes terapêuticos, incluindo os de origem natural. (BODMEIER, OH, PRAMAR, 1989).

A utilização de plantas com fins medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (AKERELE, 1993). A literatura indica que muitos produtos naturais estão disponíveis como agentes quimioterápicos contra câncer de ocorrência frequente (REDDY *et al.*, 2003).

A piperina, um composto de origem natural, é o principal componente da pimenta negra. Possui vários benefícios farmacológicos e terapêuticos. Apresenta atividade hepatoprotetora, anti-inflamatória, antibacteriana e anti-tumorais (BONEPALLY et al., 2008).

Neste contexto, a quitosana foi utilizada como matriz polimérica e a piperina foi dispersa, formando um sistema no qual esta deverá ser liberada de forma controlada.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e avaliar comparativamente membranas de quitosana/piperina não reticuladas e reticuladas para aplicação como sistema transdérmico para liberação controlada de fármacos.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Avaliar a interação entre fármaco e matriz polimérica;
- Analisar as propriedades físico-química e estrutural das membranas de quitosana/piperina;
- Avaliar eficiência de carregamento das membranas;
- Estudar a biocompatibilidade *in vitro* dos filmes de quitosana/piperina;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biomateriais

Um biomaterial é uma substância que foi desenvolvida para ter uma forma que, sozinho ou como parte de um sistema complexo, é usado para direcionar, pelo controle de interações com os componentes de sistemas vivos, o curso de qualquer processo de diagnóstico ou terapêutico, em medicina humana ou veterinária (WILLIAMS, 2009).

Os biomateriais são dispositivos que, de modo contínuo ou intermitente entram em contato com fluidos corpóreos, mesmo quando localizados fora do corpo. Estes materiais devem possuir características imprescindíveis como: biocompatibilidade, estabilidade química, estabilidade mecânica adequada, peso, densidade e forma adequadas, ser relativamente barato, reprodutível e de fácil fabricação e ser biofuncional, ou seja, desempenhar a função para a qual foi projetado com o máximo de eficiência (PEREIRA, 1999; SILVER; DOILLON, 1989).

Entende-se por biocompatibilidade a capacidade de um biomaterial de desempenhar a função desejada sem provocar efeitos indesejáveis ao organismo, mas gerar uma resposta adequada e otimizar o seu desempenho (WILLIAMS, 2008).

Biodegradável é um termo utilizado para polímeros e dispositivos sólidos que devido à degradação macromolecular sofrem dispersão *in vivo*, sem a eliminação dos produtos e subprodutos tóxicos (VERT et al., 1992).

Estas definições destacam a importância de que um biomaterial não deverá produzir quaisquer efeitos adversos clinicamente significativos no hospedeiro. Como reflexo mais concreto, as diretrizes ISO 10993 representam uma série de normas para avaliar a biocompatibilidade de um dispositivo médico antes de um estudo clínico (JIANG et al., 2014).

Essas características são desafiadoras e fundamentais para o desenvolvimento e para a escolha de um biomaterial. Dentre esses aspectos, a interação dos tecidos vivos com o biomaterial, associada com o tipo de resposta do organismo à presença deste material, é o ponto mais desafiador no

desenvolvimento de biomateriais, pois se faz necessário entender os aspectos morfológicos e funcionais do organismo humano, incluindo a sua resposta imunológica (PEREIRA, 1999).

São diversas as classes existentes no campo dos biomateriais. Uma delas é a dos materiais poliméricos, cujas aplicações nas áreas médicas e biotecnológicas têm apresentado crescimento significativo. Os materiais poliméricos possuem um campo vasto de aplicações, como implantes, devido a sua facilidade de serem moldados nas mais variadas formas, a exemplo de fibras, filmes, tecidos e líquidos viscosos. Além disso, os polímeros possuem uma semelhança com os componentes teciduais formados por polímeros naturais, como o colágeno (PARK; LAKES, 2007). Inserido na vasta área dos materiais poliméricos, estão os biopolímeros, que podem ser de origem natural ou sintética, biodegradável ou não (GRIGOLON, 2001; KHOR; LIM, 2003).

O diferencial dos biomateriais poliméricos em relação aos metálicos ou cerâmicos é a facilidade de fabricação e produção de formas variadas, facilidade de processamento e custo razoável. A característica principal requerida para ser um biomaterial polimérico é semelhante a outros biomateriais, isto é, a biocompatibilidade, estabilidade, propriedades mecânicas e físicas adequadas (WONG; BRONZINO, 2007).

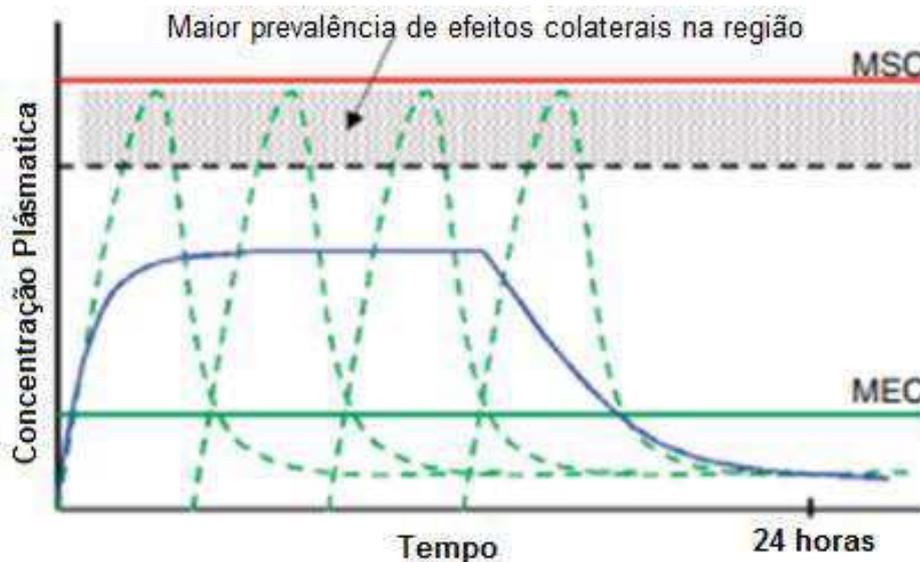
3.2 Sistemas de Liberação Controlada

O desenvolvimento de sistemas de transporte adequados para produtos farmacêuticos continua sendo um grande desafio, sendo a liberação controlada de drogas um tema importante neste campo (RAVIVARAPU, et al., 2006).

Sistemas de entrega de droga convencionais como *spray*, injeção e pílulas, apresentam um aumento na concentração sanguínea do fármaco logo após a administração do mesmo, apresentando posterior decréscimo, conforme o tempo de ação do medicamento. A liberação controlada apresenta uma constância na liberação durante quase todo o tempo de ação do fármaco, o qual é administrado em dose terapêutica durante a maior faixa de tempo. Na Figura 1 é possível observar o perfil de concentração plasmática para os dois tipos de liberação, evidenciando que a liberação controlada mantém a

concentração do fármaco no sangue na faixa segura, tornando-se menos agressivo que o tratamento convencional (LYRA et al., 2007).

Figura 1: Perfis de concentração de droga no plasma para comprimidos convencionais ou cápsula (---) e uma formulação de liberação controlada de ordem zero (—). MEC = concentração mínima eficaz; MSC = Concentração máxima segura.



Fonte: Das; Das, 2003.

Segundo De Azevedo (2002) quando os sistemas de liberação controlada são comparados com os sistemas convencionais de entrega de droga algumas vantagens são encontradas, como a diminuição da toxicidade e maior tempo de permanência da droga na circulação sanguínea; diminuição dos efeitos colaterais devido ao maior nível de precisão e localização do fármaco no organismo; liberação progressiva e controlada do fármaco a partir da degradação da matriz, aumentando assim a eficácia terapêutica; administração segura com ausência de reações inflamatórias locais e um menor número de doses; substâncias hidrofílicas e lipofílicas podem ser incorporadas; sistema econômico: embora o custo inicial de produtos de liberação prolongada seja e maior do que a da forma de dosagem convencional, devido à natureza especial destes produtos, o custo médio de tratamento ao longo de um período de tempo prolongado pode ser menor.

De acordo com Gudsoorkar e Rambhau (1993) e Lyra et al. (2007) esses sistemas também apresentam desvantagens, tais como: dose *dumping*, ou

seja, a probabilidade de ocorrência de liberação rápida do fármaco, a partir de um sistema de liberação prolongada, em função de um defeito no produto; utilização de fármacos que possuem baixo tempo de meia-vida com dificuldade de absorção no trato gastrointestinal; impossibilidade de interromper de imediato o efeito terapêutico em caso de intolerância ou intoxicação do paciente; risco de acumulação do fármaco no organismo com baixa velocidade de eliminação.

Polímeros naturais e sintéticos são amplamente utilizados na liberação controlada de drogas para maximizar a bioeficácia, facilitar a aplicação clínica e melhorar a qualidade de vida. Esta refere-se ao processo no qual a droga migra da sua posição inicial para a superfície exterior do polímero e, em seguida, para o meio de liberação. Este processo aparentemente simples é afetado por fatores complexos, como as propriedades físico-químicas dos solutos, as características estruturais do sistema, o meio de liberação e as possíveis interações entre esses fatores (FU; KAO, 2010).

Os sistemas de liberação controlada possuem dois objetivos principais: manter constante a concentração sanguínea de uma determinada droga, assegurando uma maior biodisponibilidade, e reduzir os efeitos colaterais, realçando a adesão do paciente ao tratamento com um menor número de dosagens requeridas (HENRIQUE; FALCARE; LOPES, 2006).

Esse sistema necessita de uma barreira química ou física para que a liberação do fármaco seja proporcionada de forma lenta. Diversas técnicas têm sido estudadas de forma a obter uma barreira eficaz para a liberação controlada do fármaco, tais como: utilização de revestimento; manter o fármaco retido numa matriz polimérica ou compósita e microencapsulação (LYRA, 2007).

Na última década, a administração transdérmica tem sido estudada por proporcionar uma via alternativa para a administração de vários agentes terapêuticos. Neste contexto muitos dos novos sistemas terapêuticos transdérmicos (TTS's) já foram desenvolvidos para entrega local ou sistêmica da droga. Estas novas formulações são destinadas à obtenção de uma liberação prolongada e constante da droga, permitindo a segmentação de drogas, a redução da dose e efeitos colaterais, melhorando a adesão do paciente ao

tratamento e aumentando o desempenho terapêutico (VERONESE; CALICETI, 2002).

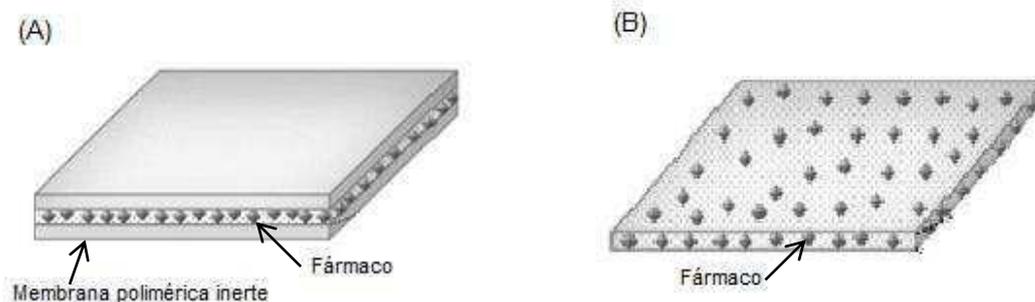
3.3 Sistemas transdérmico de liberação controlada

Os TTS's são desenvolvidos para induzir a passagem de substâncias ativas através da superfície da pele e suas diversas camadas até atingir a circulação sistêmica (ALLEN, POPOVICH, ANSEL, 2007)

De um ponto de vista tecnológico, os TTS's de maiores desempenho, são fabricados por uma combinação de diferentes matrizes poliméricas que representam os elementos estruturais e funcionais do dispositivo. Um bom conhecimento das propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas dos polímeros usados para preparar estes dispositivos é, por conseguinte, um passo fundamental para a obtenção de um sistema adequado. Requisitos gerais de polímeros utilizados para a realização de TTS's são: a estabilidade física e química, a compatibilidade física e química com a droga ou os outros aditivos e a ausência de toxicidade (VERONESE; CALICETI, 2002).

Os sistemas de entrega transdérmica poliméricas podem ser classificados em duas categorias principais com base na sua arquitetura: dispositivos monolítico ou matricial e reservatórios (Figura 2).

Figura 2: Representação esquemática do sistema reservatório (A) e matricial (B).



Fonte: (SIEPMANN; SIEPMANN, 2012).

Dispositivos do tipo reservatórios são sistemas complexos obtidos pela combinação de duas ou mais camadas poliméricas, uma camada é o revestimento e a outra contém o fármaco disperso. As camadas devem

apresentar diferentes funções e deve ser preparada com polímeros que possuam diferentes propriedades físico-químicas, mecânica e biológicas. Este sistema é construído de modo que as propriedades do polímero ou a estrutura física da rede polimérica são física e quimicamente compatíveis com a droga e não afetam a sua liberação. A taxa de liberação é modulada pelas propriedades físico-químicas dos polímeros ou usando membranas com microestrutura diferente (VERONESE; CALICETI, 2002).

Num sistema matricial o fármaco encontra-se uniformemente disperso ou dissolvido numa matriz polimérica, sendo a taxa de liberação controlada pela taxa de difusão do fármaco através dessa mesma matriz (COIMBRA, 2010).

Uma questão relevante para a eficácia adequada de um TTS's é o fato de que o dispositivo deve ser facilmente aplicado por pressão suave, aderir uniformemente sobre a pele, permanecer no local de aplicação durante o tratamento e ser facilmente removido sem qualquer lesão na pele (VERONESE; CALICETI, 2002).

3.4 Modelos matemáticos empregados no mecanismo de liberação

Para quantificar o transporte de massa por difusão, a lei de difusão de Fick pode ser usada (SIEPMANN; SIEPMANN, 2012).

A primeira lei de Fick de difusão:

$$F = -D \frac{\partial c}{\partial x} \quad \text{Equação 1}$$

Na qual F é a taxa de transferência por unidade de área de secção (fluxo); c é a concentração das espécies de difusão e D indica o coeficiente de difusão (também chamado difusividade) (SIEPMANN; SIEPMANN, 2012).

A segunda lei de difusão de Fick (que pode ser derivada da primeira lei de Fick e considerações de equilíbrio de massa):

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right) \quad \text{Equação 2}$$

Na qual c é a concentração das espécies de difusão; t indica o tempo, D é o coeficiente de difusão e x , y e z são as três coordenadas espacial do plano cartesiano (SIEPMANN; SIEPMANN, 2012).

Para cada tipo de sistema de liberação e tipo de condições de liberação dada, as condições iniciais e de contorno do sistema devem ser considerados. As condições iniciais afetam distribuição inicial das espécies de difusão no sistema. O tratamento matemático é muito mais simples se essa distribuição é homogênea. As condições de contorno afetam as condições de difusão no limite da superfície do sistema de liberação. Se as dimensões do dispositivo são constantes ao longo do tempo, as condições de contorno são ditas estacionárias (SIEPMANN; SIEPMANN, 2012).

Um aspecto muito importante quando se vai resolver a segunda lei de Fick é o fato de o coeficiente de difusão ser ou não constante. O tratamento matemático é muito mais simples quando D é constante (GÖPFERICH; LANGER, 1995; LAAKSONEN et al., 2009).

De acordo com Siepmann e Siepmann (2012), para a seleção adequada da equação matemática, é importante considerar se o sistema é do tipo reservatório, neste caso, a droga está localizada no centro do sistema, ao passo que o polímero forma uma membrana que envolve este depósito de droga. Ou se é um sistema do tipo matricial, também denominado sistema monolítico, na qual a droga e a membrana que controla a taxa de liberação (em geral polímeros ou lipídeos) estão mais ou menos distribuídas de forma homogênea ao longo do dispositivo. Deve-se considerar também se a concentração inicial da droga está abaixo ou acima da sua solubilidade e qual a geometria do sistema, podendo-se considerar filmes finos, cilindros ou esferas.

3.4.1 Sistemas reservatório com fonte de atividade não-constante

Nesse caso, a droga é separada da membrana que controla a velocidade de liberação, mas a concentração inicial da droga é inferior à solubilidade desta. Isto significa que o fármaco está molecularmente disperso no núcleo da formulação, que as moléculas da droga liberadas não são substituídas e que a concentração de fármaco na superfície da membrana interna diminui com o tempo. Este abrange dois casos: (i) o fármaco é disperso molecularmente em

excipientes que formam o núcleo da formulação, ou (ii) após a penetração de água no sistema, as partículas da droga dissolvem-se rapidamente. Uma vez que a dissolução da droga é mais rápida quando comparada com a sua difusão, este passo pode ser negligenciado para a análise matemática (SIEPMANN; SIEPMANN, 2012).

Sob estas condições, a seguinte Equação 3, para o caso de sistema reservatório na forma de filmes finos, pode ser obtida:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \exp\left(-\frac{ADKt}{VL}\right) \quad \text{Equação 3}$$

Na qual M_t e M_∞ denotam os valores acumulados de drogas liberada no tempo t e no infinito, respectivamente; A é a área total da superfície do dispositivo; D é o coeficiente de difusão da droga dentro da membrana; V é o volume do reservatório; K é o coeficiente de partição do fármaco entre a membrana e o reservatório, e L é a espessura da membrana.

3.4.2 Sistemas reservatório com fonte de atividade constante

Nesses casos, o fármaco também é separado da membrana que controla a velocidade de liberação, mas a concentração inicial deste é maior que a sua solubilidade. Isto significa que, após a penetração de água para dentro do dispositivo, nem todo o fármaco se dissolve. Assim, uma solução saturada do fármaco é rapidamente criada no núcleo e as moléculas liberadas são rapidamente substituídas pela dissolução (parcial) do excesso de fármaco restante. Consequentemente, a concentração do fármaco na superfície da membrana interna permanece constante (enquanto o excesso de fármaco está presente). É por isso que este tipo de dispositivos é chamado de "sistemas de reservatórios com fonte de atividade constante" (SIEPMANN; SIEPMANN, 2012).

Uma vez que estes sistemas entram em contato com os fluidos orgânicos aquosos, a água penetra nos dispositivos e rapidamente dissolve partes do fármaco. Este é, então, dissolvido, se difundindo para fora do sistema através da membrana. Neste caso, a Equação 4 pode ser utilizada para descrever o mecanismo de liberação para o modelo de filmes finos:

$$M_t = \frac{ADKc_s}{L} \cdot t \quad \text{Equação 4}$$

Na qual M_t denota a quantidade de droga liberada no tempo t ; A é a área total da superfície do dispositivo (ambas as superfícies da película, se ambos são expostos ao meio de libertação); D é o coeficiente de difusão da droga dentro da membrana; K é o coeficiente de partição da droga entre a membrana e o reservatório; C_s é a solubilidade do fármaco no núcleo, e L é a espessura da membrana.

3.4.3 Sistema monolítico

O sistema monolítico é aquele no qual o fármaco não é separado da membrana que controla a velocidade de libertação, mas, mais ou menos homogeneamente distribuído no interior desta. Se o fármaco é molecularmente disperso na matriz, ou se é completamente dissolvido após a penetração da água no sistema, o dispositivo é chamado de "solução monolítica". Já, se a água penetra no sistema e dissolve apenas parcialmente o fármaco, o dispositivo é chamado de "dispersão monolítica" (SIEPMANN; SIEPMANN, 2012).

Para o sistema de solução monolítica, a Equação 5 e pode ser utilizada para calcular a quantidade de fármaco liberada no tempo t :

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{\exp\left[-D(2n+1)^2 \pi^2 t / L^2\right]}{(2n+1)^2} \quad \text{Equação 5}$$

Na qual M_t e M_∞ denotam a quantidade de fármaco liberado no tempo t e no infinito, respectivamente; D é o coeficiente de difusão do fármaco no sistema, e L representa a espessura total do filme.

Há muitos anos atrás uma equação simples foi proposta para quantificar a libertação do fármaco, a partir de dispersões monolítica com geometria de filmes: a equação de Higuchi (Equação 2).

$$M_t = A \sqrt{Dc_s(2c_{mi} - c_s)} \cdot t \quad \text{Equação 2}$$

Na qual M_t indica a quantidade absoluta cumulativa de fármaco libertado ao tempo t ; A é a área da superfície total da película exposta ao meio de

liberação; D é o coeficiente de difusão da droga dentro do sistema; c_s indica a solubilidade do fármaco na matriz (não no meio de liberação), e c_{ini} representa a concentração inicial da droga do sistema.

3.5 Polímeros na obtenção de sistemas de liberação controlada

A matriz ideal para liberação de drogas deve ser biocompatível, mecanicamente resistente, confortável para o paciente, capaz de carregar altas cargas de fármacos, simples para administração e remoção, fácil de fabricar e esterilizar e de baixo custo. O modelo e material adequado para a seleção da matriz em cada aplicação específica dependem de diversas variáveis, incluindo propriedades físicas (mecânica, degradação, formação do gel), propriedades do transporte (difusão), e biológicas (adesão celular e sinalização) (SANTOS, 2011).

As matrizes poliméricas biorreabsorvíveis, naturais ou sintéticas, devem ser biocompatíveis e degradáveis. A degradação deve ocorrer em um razoável período de tempo, requerido pela aplicação (FUKUSHIMA et al., 2000).

Vários produtos farmacêuticos com base em sistemas de liberação biodegradáveis de hormônios, drogas antitumorais e antibióticos, têm sido aprovados pela FDA. Em geral, os polímeros biodegradáveis contêm ligações lábeis tais como éster, amida e anidrido, ligações que são propensas à hidrólise ou degradação enzimática (DORATI et al., 2007; FU; KAO, 2010).

As matrizes poliméricas utilizadas na liberação local e controladas podem ser apresentadas como hidrogéis, membranas, nanopartículas e microesferas.

Os hidrogéis são materiais que possuem alta afinidade por água, estruturas similares à matriz extracelular da maioria dos tecidos, podendo ser processados em condições relativamente brandas e aplicados de uma maneira minimamente invasiva, servindo como matriz extracelular sintética (DRURY; MOONEY, 2003).

As nanopartículas são morfologicamente semelhantes às microesferas, mas os tamanhos das partículas estão na faixa submicrônica. Estas partículas podem ser preparadas por diferentes métodos e usando uma variedade de materiais de partida, que incluem biopolímero e polímeros sintéticos. A escolha

do polímero depende da aplicação terapêutica do sistema, da biocompatibilidade e do perfil de liberação da droga (RAVIVARAPU, et al., 2006).

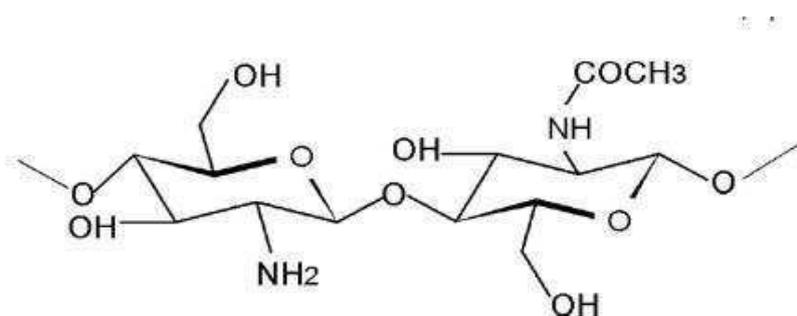
As micropartículas ou microcápsulas são sistemas onde a droga pode ser distribuída de forma homogênea por toda a matriz de polímero (micropartículas), ou pode ser encapsulado num polímero circundante, para formar um reservatório de fármaco (microcápsulas). É também possível adsorver droga para a superfície da partícula através de interações iônicas ou químicas, dependendo da aplicação. Facilitam a administração de novas drogas de estrutura complexa, como peptídeos, que são frequentemente difíceis de serem administradas de maneira conveniente por outros meios (LABHASETWAR; SONG; LEVY, 1997).

3.6 Quitosana

A quitosana (Figura 3) pertence à família dos polissacarídeos e é comumente encontrada no exoesqueleto de crustáceos. Esta se apresenta como um copolímero com unidades aleatórias ou blocos distribuídos ao longo da cadeia de biopolímero de N-acetilglucosamina e N-glucosamina. A porcentagem das unidades N – glucosamina é definida como grau de desacetilação (GD) da quitosana (JIANG et al., 2014).

Sua obtenção ocorre a partir da desacetilação da quitina, que é formada por unidades de repetição de β -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosose, em que os resíduos N-acetilglucosamina, presentes na cadeia macromolecular da quitina, são totalmente desacetilados e transformam em N-glucosamina (JIANG et al., 2014).

Figura 3: Estrutura da quitosana.



Fonte: PENGPONG et al. 2014.

O processo de desacetilação é relativamente severo e envolve a remoção de grupos acetila a partir da cadeia molecular da quitina através do tratamento com hidróxido de sódio (NaOH) concentrado em um período prolongado de tempo, deixando para trás os grupos amina (-NH₂). A versatilidade da quitosana depende do elevado nível de grupos amina reativos (ALSARRA et al., 2002).

Como biopolímero natural, a quitosana tem atraído interesse de pesquisa em aplicações de engenharia de tecidos devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades antimicrobianas. Além disso, devido à natureza catiônica das moléculas de quitosana e às grandes quantidades de grupos funcionais amina e hidroxila na cadeia molecular, o polímero quitosana tem sido utilizado como um biomaterial para o transporte de proteínas e outras moléculas (KHOR; LIM, 2003; AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004).

A quitosana tem sido efetivamente utilizada na liberação de drogas como sistemas do tipo hidrogel, reservatório, matriz biodegradável, dentre outros. Sistemas à base de quitosana são utilizados na liberação de proteínas/peptídeos, substâncias anti-inflamatórias, antibióticas, hepatoprotetora, substâncias utilizadas no tratamento de câncer e etc (DASH et al., 2011).

Dallan (2005), Osório (2007) e Hermans (2014) obtiveram membranas de quitosana pela técnica de evaporação de solvente. A quitosana (pó) foi dissolvida em ácido acético aquoso, sob agitação magnética até completa solubilização, em seguida, a solução de quitosana foi colocada em placa de Petri e seca à temperatura ambiente.

Akabuga e Bergisadi (1999) incorporaram cis-platina em microesferas de quitosana usando um sistema de emulsão (w/o) e observaram que a eficiência de encapsulação foi elevada e variou 28-99%. O tipo e a concentração de quitosana afetaram a liberação da cis-platina e o perfil de liberação deste fármaco a partir das microesferas caracteriza-se por um efeito de explosão inicial.

Outra característica importante da quitosana é a possibilidade de modificações estruturais, de modo a obter diversas formas de interações químicas e resistência mecânica. Essas interações químicas podem ser obtidas através de diferentes rotas, entre elas o uso de agentes reticulantes. A reticulação é uma modificação química que pode ser feita pela reação do polímero com diferentes substâncias (TORRES et al., 2005; GEORGE; ABRAHAM, 2006).

3.6.1 Reticulação iônica da quitosana em aplicações biomédicas

A maioria dos agentes de reticulação utilizados para realizar a reticulação covalente pode causar toxicidade ao organismo. Um método alternativo para este problema é preparar hidrogéis por reticulação iônica reversível. A quitosana é um polímero policatiônico, bem conhecido por suas propriedades quelantes (GUIBAL et al., 2001). A reticulação covalente requer moléculas multifuncionais como agentes de reticulação, já a reticulação iônica requer contra-íons polivalentes como agentes, para formar pontes entre as cadeias poliméricas. Portanto, reações com componentes carregados negativamente, sejam íons ou moléculas, podem conduzir à formação de uma rede através de pontes iônicas entre as cadeias poliméricas (BERGER, et al., 2004).

As cadeias de quitosana reticulada ionicamente podem ser divididas em dois grupos, dependendo do tipo de agente de reticulação utilizado: as reticuladas por ânions e as reticuladas por moléculas aniônicas. Nestes casos, a maior parte de suas características e propriedades são idênticas e as suas estruturas são muito semelhantes. A rede é formada na presença de grupos carregados negativamente, que formam pontes entre as cadeias poliméricas de quitosana carregados positivamente (BERGER et al., 2004).

Além dos grupos amino protonados (NH_3^+) da quitosana, outros grupos ao longo da sua cadeia, como grupos hidroxila, também podem reagir com o agente de reticulação iônica (MI et al., 1997; BERGER, et al., 2004).

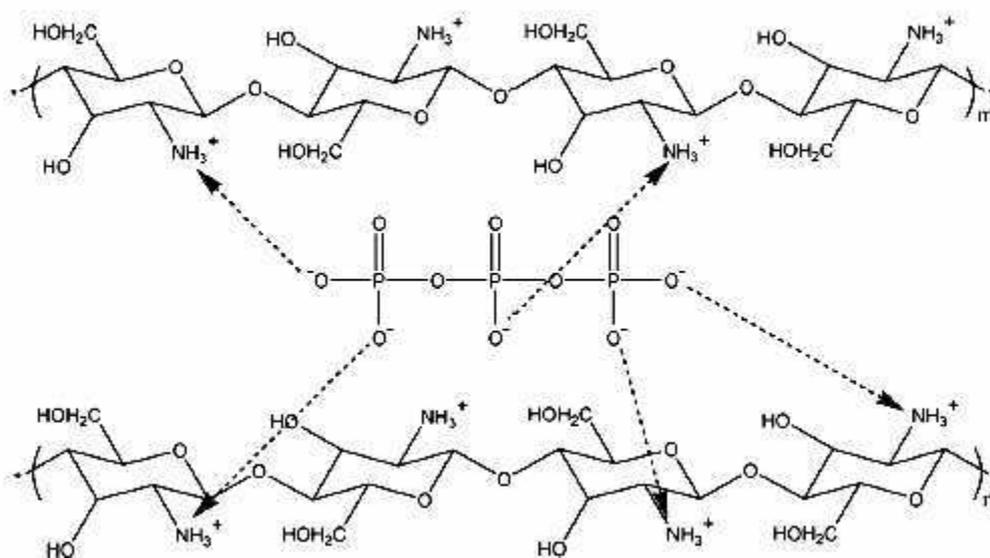
Aniões metálicos, como Mo (VI) (Draget, et al., 1992), ou Pd (II) (Brack et al., 1997), são geralmente utilizados como agentes de reticulação iônica. Entre as moléculas aniônicas aquelas contendo grupos fosfato, como b-glicerofosfato

e particularmente tripolifosfato (SEZER; AKBUĞA, 1995; MI, et al., 1999) são normalmente utilizados.

O tripolifosfato de sódio (TPP) é usado como agente reticulante na preparação de membranas de quitosana. Este apresenta grupos O⁻ que são reativos, sendo atraídas pelos grupamentos NH₃⁺ da molécula de quitosana, ocorrendo assim, um entrelaçamento cruzado e aproximação entre essas duas substâncias através de uma reticulação iônica, conforme representado na Figura 4 (YANG et al., 2007).

O aumento do grau de reticulação leva a um aumento de obstáculos à difusão do fármaco, ou seja, as pontes de reticulação aproximam as cadeias macromoleculares e diminuem a sua mobilidade, provocando assim uma redução da área efetiva de difusão (GUPTA; JABRAIL, 2006).

Figura 4: Representação esquemática da reticulação da quitosana com o Tripolifosfato de sódio.



Fonte: STULZER, 2008.

Na fabricação de hidrogéis, a reticulação iônica é um método simples e rápido. Estes são geralmente pensados para serem biocompatíveis. Os hidrogéis de quitosana reticulados ionicamente oferecem mais possibilidades como sistemas de entrega de drogas em comparação com os hidrogéis reticulados covalentemente (BERGER, et al., 2004).

3.6.2 Propriedades físico-químicas da quitosana

A quitosana é um biopolímero semicristalino resultante de fortes ligações de hidrogênio (inter e intramoleculares). A quitosana é facilmente solúvel em soluções diluídas de ácidos com $\text{pH} < 6$, mas insolúvel em solventes orgânicos. Ácidos orgânicos tais como ácido acético, ácido fórmico, ácido lático e ácido inorgânico, tal como ácido clorídrico, podem dissolver a quitosana. O valor de pK_a dos grupos amino primários da quitosana é de cerca de 6,3; por conseguinte, em condições ácidas de $\text{pH} < 6$, os grupos amina são protonados, levando à repulsão entre as cadeias macromoleculares carregadas positivamente, que permite as moléculas de água se difundirem no polímero (JIANG et al., 2014).

A estrutura D-glicosamina do polissacarídeo quitosana, que é rígida e hidrofílica, apresenta muitos grupos reativos para ativação química e reticulação e é capaz de formar sais com ácidos orgânicos e inorgânicos. Apresenta ainda propriedades quelantes e condutividade iônica. Agentes reticulantes, tais como glutaraldeído, etilenoglicol diglicidil éter, tripolifosfato, ácido sulfúrico e epícloridrina, são usados para aumentar a estabilidade química e a resistência mecânica da quitosana (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

As propriedades físico-químicas e biológicas da quitosana são em grande parte dependente de dois parâmetros estruturais principais: o peso molecular (M_w) e o grau de desacetilação (GD).

3.6.3 Propriedades biológicas da quitosana

3.6.3.1 Biodegradabilidade

A biodegradabilidade, normalmente refere-se à capacidade de um biomaterial ser degradado por enzimas e outras reações de caráter biológico, quando colocado no sistema biológico. Na natureza, a quitina e a quitosana são decompostos por quitinases e quitosanase, respectivamente, primeiramente em oligossacarídeo e, eventualmente, em N-acetil-glucosamina

e N-glucosamina. No corpo humano, a quitosana pode ser biodegradada por lisozima e pela enzima bacteriana do cólon. Além disso, vários quitinases humanos, glicosidase e proteases foram identificados por terem atividades enzimáticas e de ser capaz de degradar a quitosana em graus variados (FUNKHOUSER; ARONSON, 2007; ZHANG; NEAU, 2001).

Vários estudos têm demonstrado que a taxa de degradação *in vitro* é máxima quando o GD é cerca de 50%, devido à maior hidrofiliidade. Aumentando o GD (> 50%), a taxa de degradação é reduzida por causa do aumento de cristalinidade e de redução no número de grupos de N-acetilglucosamina. Quitosanas altamente desacetilada exibem mínima degradação. O peso molecular da quitosana desempenha um papel importante na taxa de degradação. Mantendo inalterado o GD, quitosana de peso molecular mais elevado, degradam-se mais lentamente do que os que têm pesos moleculares mais baixos (ZHANG; NEAU, 2001).

Estudos revelam que a quitosana com GD de 92,3% foram resistentes a biodegradação; no entanto, a quitina e a quitosana com menor GD foram facilmente biodegradável. Estes resultados sugerem que a biodegradação da quitosana é altamente controlável. Parâmetros estruturais, tais como o peso molecular, o GD e a cristalinidade pode ser usado sozinho ou em combinação para o ajuste da velocidade de degradação para aplicações específicas (YANG et al., 2007).

3.6.3.2 Biocompatibilidade

A biocompatibilidade da quitosana tem sido investigada e relatada ao longo das últimas décadas. Muitos estudos foram realizados para avaliar a biocompatibilidade *in vitro* da quitosana e de sistemas à base de quitosana usando vários tipos de células, tais como fibroblastos, osteoblastos, condrócitos, células endoteliais, células neurais e hepatócitos. Os resultados mostraram que a quitosana não é tóxica e pode servir de apoio para estes tipos de células se aderirem e proliferarem (JIANG et al., 2014).

O desempenho *in vivo* de matrizes à base de quitosana, também foi avaliado utilizando uma variedade de modelos animais, em particular em modelos subcutâneos utilizando camundongos ou ratos. Vande Vord et al.

(2002) implantaram um *scaffold* de quitosana em ratos por via subcutânea e verificou que a quitosana não apresentou respostas inflamatórias. Além disso, não houve evidência de infecção ou endotoxina. Já Wang et al. (2007) testaram a biocompatibilidade de um dispositivo reforçado com fibras à base de quitosana, tendo demonstrado ser compatível com o tecido adjacente.

O GD da quitosana demonstrou influência sobre o desempenho biológico do material, tanto *in vitro* como *in vivo*. A evidência sugere que a quitosana com maior GD suporta melhor o crescimento celular e produz reação inflamatória em menor escala (JIANG et al., 2014).

3.6.3.3 Atividade antimicrobiana

Uma das razões para o caráter antimicrobiano da quitosana é a carga positiva no grupamento amino, que interage eletrostaticamente com a superfície celular do micro-organismo, alterando a permeabilidade da célula, provocando a liberação de componentes intracelulares, levando a morte celular (SEO; MITSUHASHI; TANIBE, 1992; JUNG et al., 1999).

Quanto mais baixa a massa molar e menor o grau de acetilação mais eficiente será essa atividade na redução do crescimento e multiplicação do microorganismo (DAMIAN et al., 2005).

A eficácia antimicrobiana *in vitro* da quitosana em soluções aquosas e lipídicas foi testada com o intuito de produzir formulações com ações mais efetivas na redução do número de microrganismos. Um estudo observou que a quitosana com peso molecular de $8,7 \times 10^4$ g/mol, alto grau de desacetilação e baixa viscosidade apresentou melhor atividade antimicrobiana (JUMAA, et al., 2002).

Em outro estudo foi verificado que, quanto maior a concentração da quitosana, maior a ação antimicrobiana da mesma. Diante disso, demonstrou-se o mecanismo de ação da quitosana em diferentes concentrações em solução. Em baixa concentração, a quitosana se liga à carga negativa da superfície bacteriana, perturbando a atividade de membrana celular e propiciando a saída dos componentes intracelulares. Em alta concentração, a quitosana se adiciona à membrana da superfície bacteriana, impedindo a

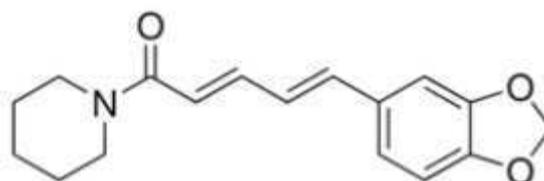
transferência dos íons através da membrana celular, tendo como consequência a morte bacteriana (FEI LIU, et al., 2001).

Portanto, a atividade antimicrobiana da quitosana e seus derivados dependem de vários fatores intrínsecos, tais como a estrutura molecular, o peso molecular, e o GD, o qual está relacionado, por sua vez, ao número de grupamentos amino protonados (KONG et al. 2010).

3.7 Piperina

O composto 1-Piperoyl-piperidin (Piperina) (Figura 5) foi a primeira amida isolada do gênero *Piper*, sendo o principal metabólito secundário da *P. nigrum* encontrado principalmente em seus frutos *Pippali piper nigrum* e *Pippali Piper longum*. Seus cristais tem a forma de prismas brancos, que fundem entre 128°C - 219°C, sendo quase insolúvel em água, mas solúvel em álcool e éter. (SAHU; CHOURASIYA; GAJBHIYE, 2012).

Figura 5: Estrutura molecular da piperina.



Fonte: THIEL, et al., 2014

A piperina apresenta diversas atividades farmacológicas e efeitos bioquímicos como, por exemplo, antimicrobiano, antifúngico e hepatoprotetor. Também apresenta atividade antioxidante, tanto em condições *in vivo* quanto *in vitro*. É conhecida pela proteção a danos oxidativos causados por radicais livres e espécies reativas de oxigênio (SELVENDIRAN; BANU; SAKTHISEKARAN, 2004). Este alcalóide tem potencial depressor no sistema nervoso central, apresentando também atividades analgésica, antipirética, antiinflamatória e antioxidante (PARMAR et al.,1997; KHAJURIA et al., 1998).

Além disso, ela pode aumentar a biodisponibilidade de drogas e inibir as enzimas responsáveis pelo metabolismo de xenobióticos e outras drogas, e

também melhorar o poder antioxidante das células (SELVENDIRAN; SINGH; SAKTHISEKARAN, 2006).

Estudos revelam que a presença de benzo- α -pireno em alimentos, poluentes ambientais, cigarro e gases provenientes de queima incompleta está ligada ao desenvolvimento de câncer. Mais tarde, foi demonstrado que a piperina previne significativamente o desenvolvimento de câncer de pulmão por eliminar os radicais livres ou reagir com os metabólitos tóxicos do benzo- α -pireno, inibindo a mutagênese destes compostos genotóxicos (SELVENDIRAN et al., 2005).

Estudos recentes mostram que a piperina é capaz de impedir o crescimento *in vivo* de células cancerígenas, incluindo células de melanoma B16-F10 (PRADEEP; KUTTAN, 2002), linfoma de ascíte de Danlton e células do carcinoma ascítico de Ehrlich (SUNILA; KUTTAN, 2004). A piperina, também inibe a expressão de células de fibrossarcoma HT-1080 de metaloproteinases da matriz (MMP), interferindo, assim, com a migração de células tumorais (HWANG, et al., 2011).

Além disso, alguns estudos revelam que a piperina mostra uma atividade de proteção hepática significativa quando administrada em animais (ratos Wistar albino) através de microesferas de quitosana. Nos estudos de libertação *in vitro* das microesferas carregadas com piperina foi observado que cerca de 80% da droga foi liberada após 48 horas. Estudos *in vivo* revelam que quando a piperina foi dado aos animais, e eles apresentam propriedades protetoras no fígado em relação ao grupo tóxico. Assim, a piperina aumenta a atividade hepatoprotetora e reduz a toxicidade para o fígado (SAHU; CHOURASIYA; GAJBHIYE, 2012).

Pengpong et al. (2014) estudou a piperina como um fármaco hidrofóbico encapsulado em micropartículas de PCA-HT-quitosana através de ionização por eletrospray, e apresentou eficiência de encapsulação de mais de 80% . Os estudos *in vitro* de liberação mostraram uma liberação prolongada da piperina com taxa >75% ao longo de 12 horas entre pH 1,2 e 6,4 .

Em pesquisa realizada por Bezerra (2005), sobre o potencial anticâncer da pipartina e da piperina, amidas isoladas de plantas do gênero *piper*, a atividade antitumoral *in vivo* da piperina foi determinada utilizando o modelo

experimental do Sarcoma 180. Foi que esta amida inibiu de forma significativa o crescimento tumoral. Os percentuais para inibição do crescimento tumoral demonstram que a piperina inibiu em 55,01 % e 56,79% nas doses de 50 e 100 mg/Kg/dia.

A piperina mostrou ser citotóxica para as células de linfoma de Dalton e para as células do tumor sólido e ascítico de Ehrlich 250 µg/ml. A administração da piperina (1,14 mg / dose / animal) inibiu o desenvolvimento de tumores sólidos em ratos induzidos com as células do linfoma de Dalton e aumentou o tempo de vida de camundongos portadores do tumor sólido e ascítico de Ehrlich (SUNILA; KUTTAN, 2004).

4 METODOLOGIA

4.1 Local da Pesquisa

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste – CERTBIO, localizado na Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais, na Universidade Federal de Campina Grande/ UFCG.

4.2 Materiais

4.2.1 Biopolímero

- Quitosana de Médio Peso Molecular ($C_{12}H_{24}N_2O_9$) - Sigma Aldrich®.

4.2.2 Fármaco

- Piperina ($C_{17}H_{19}NO_3$) - Sigma Aldrich®, massa molar = 285 g/mol.

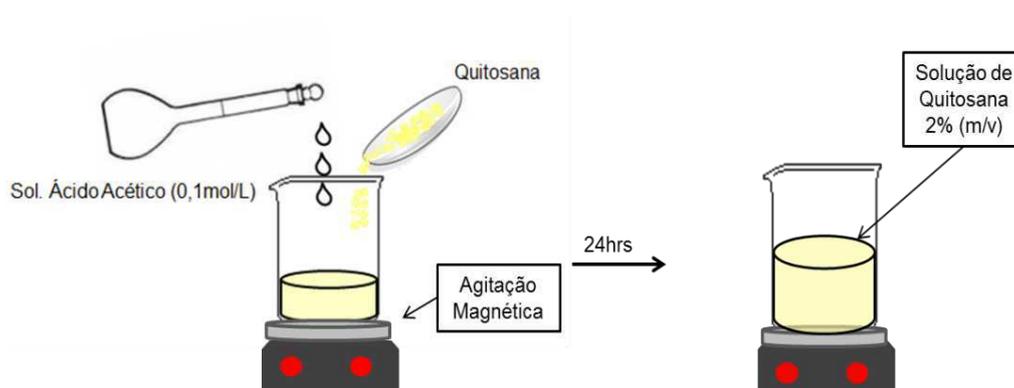
4.2.3 Reagentes

- Ácido Acético Glacial P.A. ($C_2H_4O_2$) - Vetec® Química Fina Ltda. com grau analítico.
- Álcool Metílico P.A. (CH_3CH_2OH) - Vetec® Química Fina Ltda. com grau analítico.
- Tripolifosfato de Sódio ($Na_5O_{10}P_3$) (TPP) - Sigma Aldrich®, massa molar = 367,86 g/mol.

4.3 Métodos

4.3.1 Preparação das soluções de quitosana

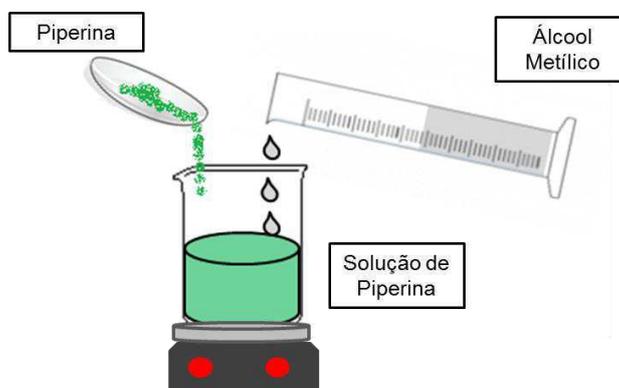
As soluções de quitosana (2% m/v) de médio peso molecular foram preparadas pela dissolução de quitosana em uma solução aquosa de ácido acético (0,1 mol/L) em temperatura ambiente sob agitação mecânica a 620 rpm, até total solubilização da quitosana. Na Figura 6 é possível observar as etapas de preparação da solução de quitosana.

Figura 6: Etapas de preparação da solução de quitosana.

Fonte: Própria

4.3.2 Preparação das soluções de piperina

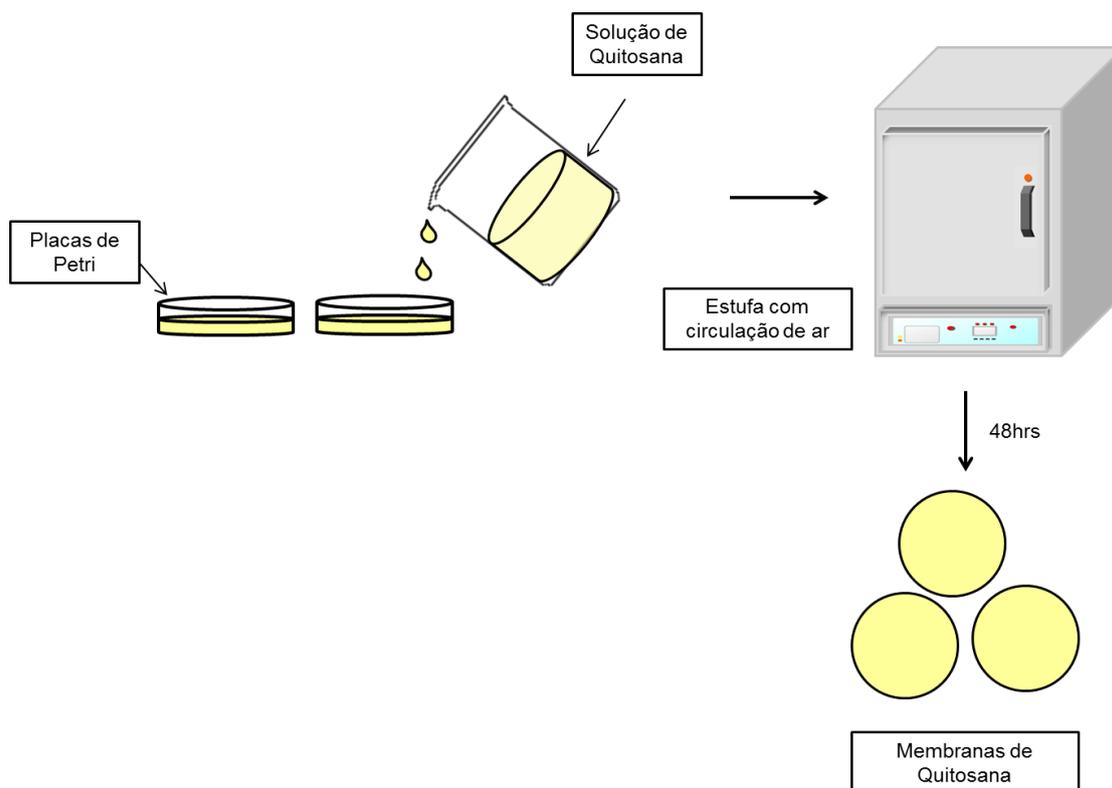
A solução de piperina foi preparada pela dissolução do fármaco em álcool metílico (1mg/mL) e depois adicionada à solução de quitosana, esta permaneceu sob agitação magnética por 30min, conforme pode ser observado na Figura 7.

Figura 7: Etapas de preparação da solução alcoólica de piperina.

Fonte: Própria

4.3.3 Preparação das membranas de quitosana

As membranas de quitosana (MQ) foram preparadas pelo método de evaporação de solvente, 20mL de solução foi distribuída em placas de Petri ($\varnothing=5,5$ cm) e submetida à secagem em estufa com circulação de ar por um período de 48 horas para evaporação completa do solvente.

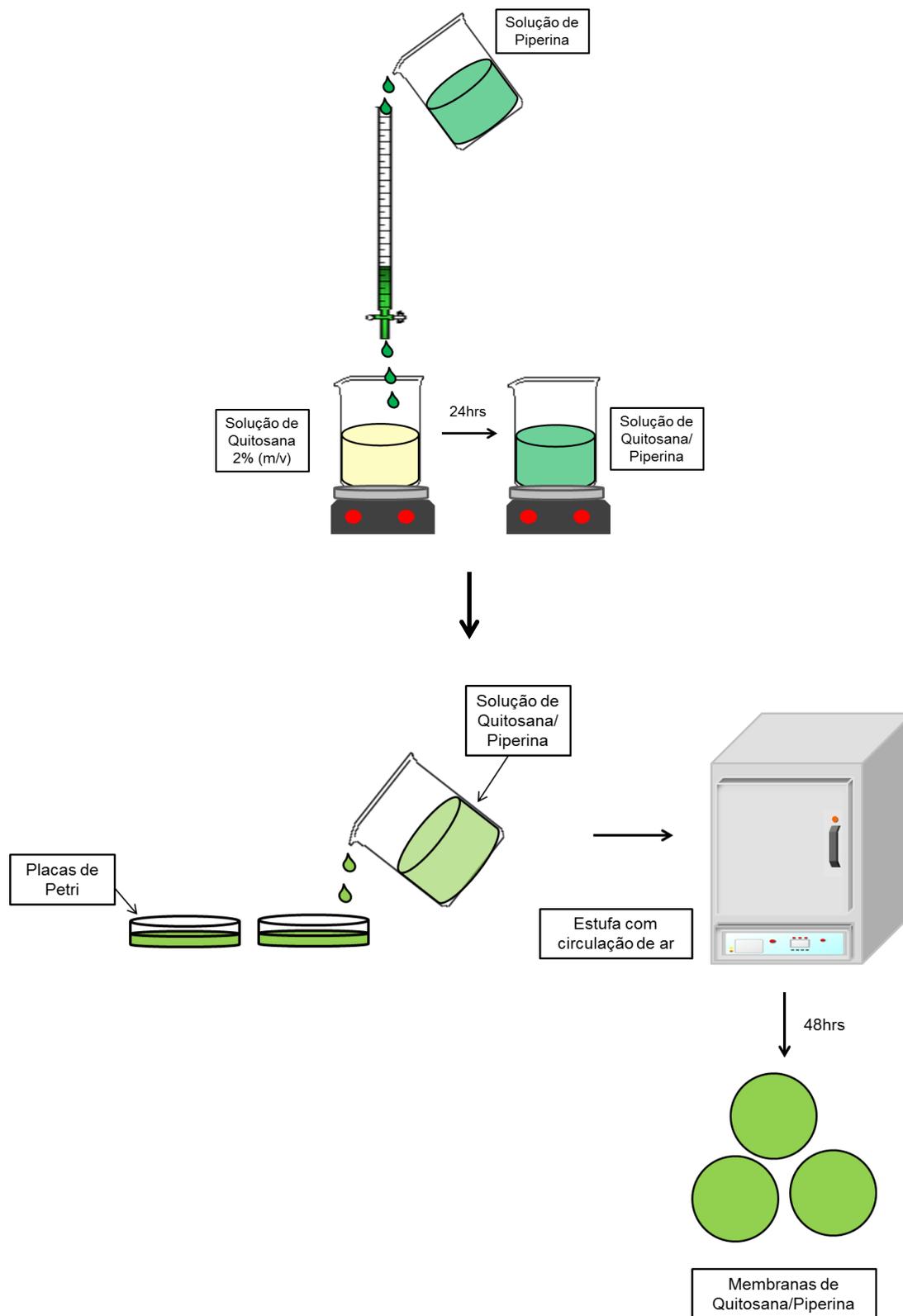
Figura 8: Etapas de preparação das membranas de quitosana.

Fonte: Própria

4.3.4 Preparação das membranas de quitosana/piperina

As membranas de quitosana/piperina (MQP) foram produzidas seguindo uma adaptação da metodologia utilizada por Sahu, Chourasiya e Gajbhiye (2012). A quantidade de piperina utilizada foi de 5% em peso da quantidade de polímero utilizado. Para o preparo da solução final, primeiramente a quitosana foi dissolvida em uma solução aquosa de ácido acético (0,1mo/L), mantida sob agitação magnética. Em seguida, a solução de piperina foi gotejada lentamente na solução de quitosana. Para a obtenção de uma solução homogênea, a solução foi mantida sob agitação magnética por um período de 24h. As membranas foram produzidas, a partir da solução final, seguindo o mesmo procedimento para a obtenção daquelas de quitosana pura.

Figura 9: Etapas de preparação das membranas de quitosana/piperina.

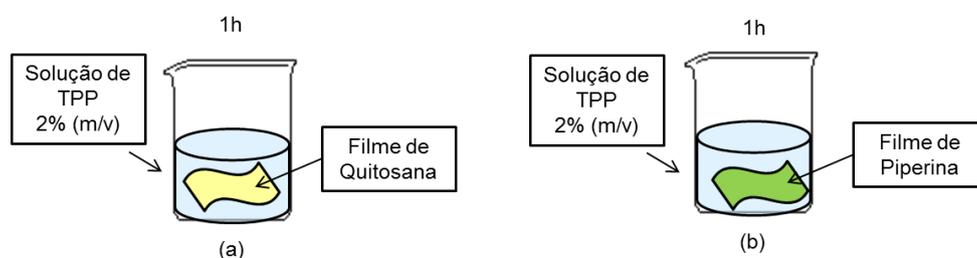


Fonte: Própria

4.3.5 Reticulação das membranas com Tripolifosfato de Sódio

Com o intuito de aumentar a resistência das membranas MQ e MQP à degradação em condições fisiológicas, foi promovida a sua reticulação pelo agente Tripolifosfato de Sódio. O procedimento adotado foi à imersão completa das membranas em uma solução de Tripolifosfato de sódio 2% (m/v) por 1h a temperatura ambiente. Cada membrana foi imersa em 100mL de solução do TPP. A razão área/volume determinada por este ensaio foi 0,275 cm² de área da membrana por mL de solução reticulante.

Figura 10: Etapas da reticulação: (a) membranas de quitosana e (b) membranas de quitosana/piperina.



Fonte: Própria

4.4 Caracterização das membranas

As membranas obtidas foram caracterizadas pelas técnicas de Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Difração de Raios X (DRX), Microscopia Ótica (MO), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS), Termogravimetria (TG), Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Eficiência de Carregamento (EC) e Ensaio de Citotoxicidade. As análises foram realizadas na Universidade Federal de Campina Grande/UFCG e na Universidade Estadual da Paraíba, no Laboratório CERTBIO.

4.4.1 Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A análise por FTIR das amostras foi feita com o equipamento Spectrum 400 Perkin Elmer FTIR/FTNIR *Spectrometer*.

As membranas foram colocadas diretamente sobre o cristal e pressionadas uniformemente, de modo que todas recebessem a mesma pressão. Os espectros foram obtidos no modo absorvância na faixa de 4000 a 600 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} .

4.4.2 Difração de Raios X (DRX)

A caracterização por DRX foi realizada no equipamento XRD-7000 Shimadzu, utilizando radiação $K\alpha$ do cobre (1,5418 Å), com varredura angular de $2^\circ < 2\theta < 60^\circ$, tensão de 40kV e corrente 30mA.

As análises de difração de raios X foram realizadas a temperatura ambiente em aparelho XRD-7000 Shimadzu, utilizando radiação $K\alpha$ do cobre (1,5418 Å), com varredura angular de $5^\circ < 2\theta < 35^\circ$, tensão de 40kV e corrente 30mA, instalado na Universidade Federal de Campina Grande/UFCG, no Laboratório CERTBIO.

4.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As microestruturas dos arcabouços foram visualizadas a partir do equipamento MEV, PRO X Phenon, com aumento de até 40000 X, profundidade de foco de 1 mm, resolução de 30 nm, e tensão de 15 KV, baixo vácuo e pressão variada (1 à 270Pa).

Foram feitas imagens usando aumentos de 250x, 500x e 1000x.

4.4.4 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

A análise qualitativa da composição química da amostra. Os elementos químicos das amostras de quitosana foram obtidos a partir do dispositivo de energia dispersiva acoplado ao equipamento MEV, PRO X, Phenon.

4.4.5 Microscopia Ótica

Neste trabalho, a caracterização por MO, para avaliação da morfologia das membranas, foi realizada em um Microscópio Óptico Hirox de reflexão e transmissão com acessórios 2D e variação de 50X-400X, acoplado a uma estação de Análise de Imagens.

4.4.6 Análise termogravimétrica (TG)

A análise termogravimétrica (TG) foi utilizada para monitorar características químicas e mudanças físicas nas membranas durante o aquecimento. As curvas de TG do fármaco e das membranas foram obtidas por meio de termobalança Shimadzu®, modelo TGA 50H, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 50 mL.min⁻¹, sendo a massa das amostras em torno de 5,0 mg (±0,5), acondicionadas em cadinho de alumina, na razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹ até 900°C.

4.4.7 Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A técnica de DSC foi realizada no equipamento DSC 8000/8500 Perkin Elmer, empregada para observar o comportamento e a estabilidade térmica do material obtido quando submetido ao aquecimento. As curvas foram analisadas em atmosfera de dinâmica de nitrogênio (50mL min⁻¹) usando amostras de 2mg a 3mg e razão de aquecimento de 5°C min⁻¹. As amostras foram pesadas com precisão (±0,1mg) e prensadas em painéis de alumínio. A calibração do equipamento foi realizada com metal índio (99,9%) em relação à temperatura e entalpia.

4.4.8 Teor de Piperina na Membrana de Quitosana

Para quantificação do teor de piperina nas membranas, uma membrana com massa de aproximadamente 0,54 g foi imersa em álcool metílico e mantida em sistema fechado sob agitação magnética a 250 RPM. Após esse período uma alíquota de 2mL (133µg/mL) foi coletada e quantificado por CLUE. Os tempos para determinação foram 1h, 3h, 6h, 24h, 48h, 72h e 96h.

A EC foi calculada de acordo com a equação abaixo:

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

Na qual: R% representa a porcentagem de piperina retida às membranas de quitosana, $Valor_{total}$ representa a massa de piperina adicionada inicialmente para se obter as membranas e $Valor_{quantificado}$ representa o valor analisado através do CLUE.

Para a determinação da EC fez-se necessário identificar a piperina na metodologia analítica escolhida bem como a elaboração da curva de calibração para determinar quantitativamente o teor de piperina nas membranas.

4.4.8.1 Cromatograma da Piperina

Com o intuito de se obter o melhor comprimento de onda de detecção para análise foi utilizado um Sistema Ultra-Fast LC, da Shimadzu munido de duas bombas (LC 20AD), com DGU 20A3, que oferece opções de reboque para desgaseificar. Além disso, o equipamento apresenta: Forno de coluna (CTO 20A), detector de UV visível com lâmpada de Deutério (SPD 20A), um controlador de sistema (Interface CBM 20A), e monitoração pelo Software LC-Solution. A fase estacionária foi composta por uma coluna C18 SHIM-PACK XR-ODS (*d.i.* 3,0mm X 50mm, 2,2 μ m). A fase móvel que forneceu melhor seletividade ao método foi constituída de uma mistura isocrática de acetonitrila: água (80:20, v/v). As análises foram realizadas em temperatura controlada (30°C), utilizando um fluxo de 0,2mL/min e volume de injeção de 10 μ L. Todas as amostras foram filtradas com filtros de seringa 0,45 μ m de diâmetro.

4.4.8.2 Elaboração da curva de calibração

Partindo da solução estoque de piperina em metanol (1mg/mL), foram realizadas diluições em fase móvel (acetonitrila:água (80:20, v/v) para obtenção das seguintes concentrações: 5, 10, 20, 30, 40 e 50 μ g/mL. A curva de calibração foi obtida por análise de regressão linear interpolando a concentração nominal do padrão com a área do pico cromatográfico obtida utilizando o software LC Solution[®]. As curvas foram obtidas em triplicata (n=3).

4.4.9 Ensaio de Citotoxicidade *in vitro*

O teste de citotoxicidade tem como objetivo detectar o potencial de um material ou dispositivo, em produzir efeitos letais ou subletais nos sistemas biológicos em nível celular. Esse teste deve ser aplicado a todas as categorias de biomateriais (DEE; PULEO; BIZIOS, 2002).

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* das membranas foi realizada pelo teste de avaliação da viabilidade celular dos macrófagos por MTT [brometo de 3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio] de acordo com a ISO 10993-5:2009. Para a concretização desta etapa, foi utilizado o método de contato direto entre as membranas e as células de câncer de mama humano MCF 7.

Após tripsinização das células em cultura e do ajuste da concentração da suspensão celular para 1×10^5 células/mL, procedeu-se à distribuição desta suspensão celular numa microplaca de 96 poços, preenchendo-se 12 poços para cada uma das amostras e 12 poços para o controle negativo (100 μ L de suspensão celular por poço). Esta placa foi então incubada durante 24h (5% CO₂, 37°C) para se formar uma monocamada celular aderente e semi-confluyente. Após este período, o meio de cultura foi aspirado, e 200 μ L de RPMI 1640-C foram adicionados a cada poço. As amostras foram então colocadas nos respetivos poços e a microplaca foi incubada por 24h adicionais (5% CO₂, 37°C). Após 24h, o meio de cultura foi aspirado e foi adicionado 100 μ L de uma solução de MTT a cada um dos poços, posteriormente incubou-se a microplaca durante um período de 3h. Depois desse período, a solução de MTT foi descartada, e foi adicionado 100 μ L de Isopropanol a cada poço, medindo-se de imediato a densidade ótica num espectrofotômetro a 540 nm com filtro de referência de 620 nm.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

Neste estudo membranas de quitosana (MQ), membranas de quitosana reticuladas (MQR), o fármaco piperina (PIP), membranas de quitosana/piperina (MPQ) e as membranas de quitosana/piperina reticuladas (MQPR), foram analisadas por FTIR para observar a possível interação entre os grupos funcionais das moléculas que compõem essas substâncias.

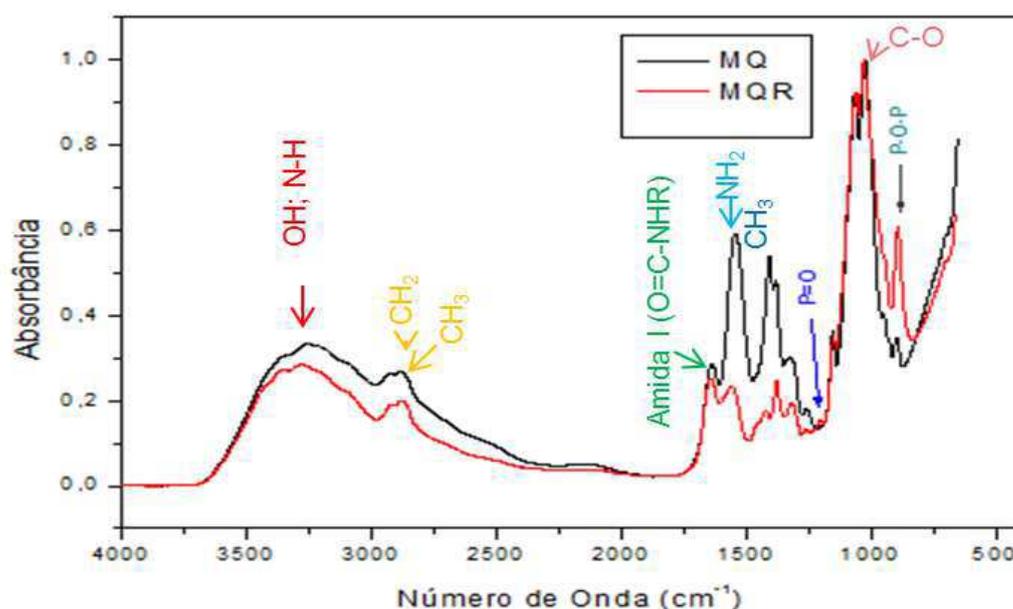
No espectro de infravermelho obtido das membranas de quitosana (MQ), apresentado na Figura 11, observam-se absorções típicas da quitosana. A banda de absorção em 3350 cm^{-1} corresponde ao alongamento vibracional da ligação -NH e a banda em 3260 cm^{-1} corresponde ao estiramento do grupo -OH . As bandas em 2922 cm^{-1} e 2880 cm^{-1} são atribuídas às vibrações de estiramentos dos grupos C-H assimétrico (CH_2) e simétrico (CH_3), respectivamente. A banda a 1634 cm^{-1} corresponde a vibração de estiramento do grupo da amida I (O=C-NHR) e a banda em 1542 cm^{-1} corresponde a vibração de estiramento da ligação -NH da amina protonada (NH_3^+). As bandas em 1406 cm^{-1} e 1379 cm^{-1} são característica da vibração de deformação angular simétrica do grupo -CH_3 pertencente ao grupo acetamido. A banda em 1323 cm^{-1} corresponde à vibração de estiramento do grupo -CH_3 da amida III. A banda em 1258 cm^{-1} corresponde a vibração de estiramento do grupo -C-O-H . Bandas de absorção na região de 1152 e 1064 cm^{-1} correspondem a vibração de estiramento dos grupos -C-O-C assimétrico e -C-O-C simétrico. A pequena banda em 897 cm^{-1} corresponde ao movimento de rotação da estrutura sacarídica da quitosana (MINCHEVA et. al, 2004; YUAN et al., 2010; PALUSZKIEWICZ, et al., 2011).

Nos espectros das membranas de quitosana reticuladas com TPP (MQR) apresentados na Figura 11 possível observar atenuações significativas nas bandas características da quitosana. Além disso, algumas alterações adicionais podem ser observadas. A presença de uma banda fraca em 1250 cm^{-1} que é atribuída a vibração de estiramento da ligação P=O e uma banda em 891 cm^{-1} atribuído ao alongamento assimétrico da ligação P-O-P (MARTINS

et al., 2012; LAWRIE et al., 2007; MINCHEVA et. al, 2004; GIERSZEWSKA-DRUŻYŃSKA e OSTROWSKA-CZUBENKO, 2010). Pode-se identificar também uma banda em 1556 cm^{-1} correspondente ao grupo amino protonado, indicando a presença de interações iônicas entre o grupo amino da quitosana e o grupo fosfato do TPP (LAUS et al., 2006).

Pode-se afirmar, a partir desses resultados, que a reticulação foi eficaz através da interação iônica entre os grupos fosfatos do TPP e o grupo amino protonados da quitosana.

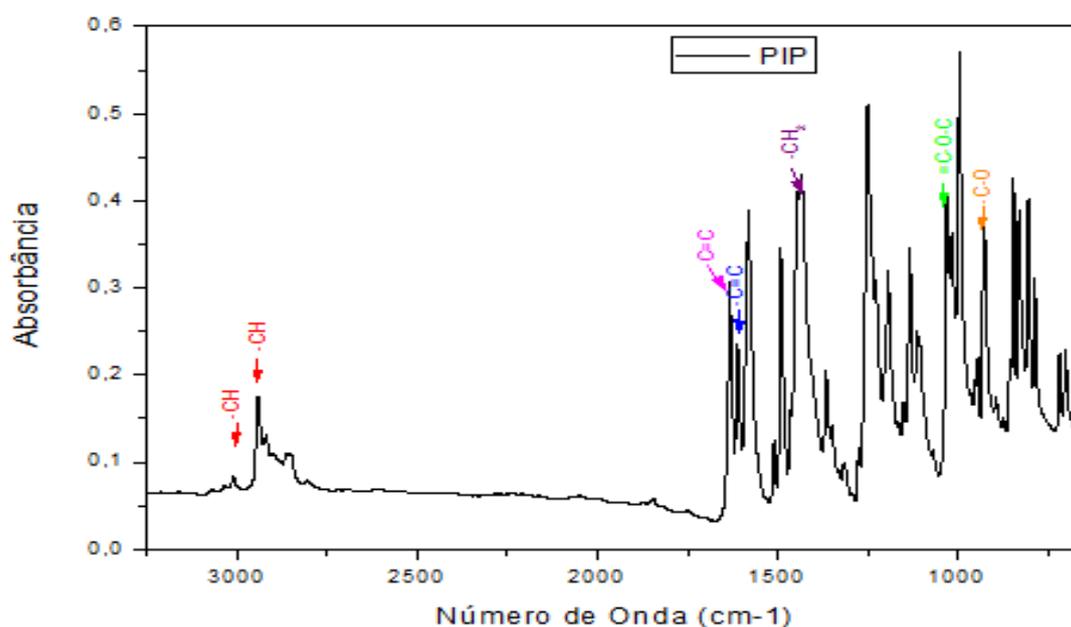
Figura 11: Espectroscopia por FTIR das membranas de quitosana (MQ) e membranas de quitosana reticuladas (MQR).



No espectro do fármaco piperina (PIP) (Figura 12), é possível observar bandas de absorção na região de 3011 cm^{-1} , que correspondem ao alongamento vibracional do grupo -C-H aromático. As bandas em 2940 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} correspondem ao alongamento simétrico e assimétrico do grupo -CH_2 . As bandas em 1633 e 1611 cm^{-1} correspondem ao alongamento vibracional do grupo -C=C (dieno) simétrico e assimétrico, respectivamente. As bandas em 1581 e 1491 cm^{-1} correspondem ao alongamento do grupo -C=C do anel benzeno. A banda em 1446 cm^{-1} corresponde a flexão do grupo -CH_2 . A banda em 1251 e 1193 cm^{-1} correspondem ao alongamento vibracional da ligação assimétrica =C-O-C e a banda em 1030 cm^{-1} corresponde ao

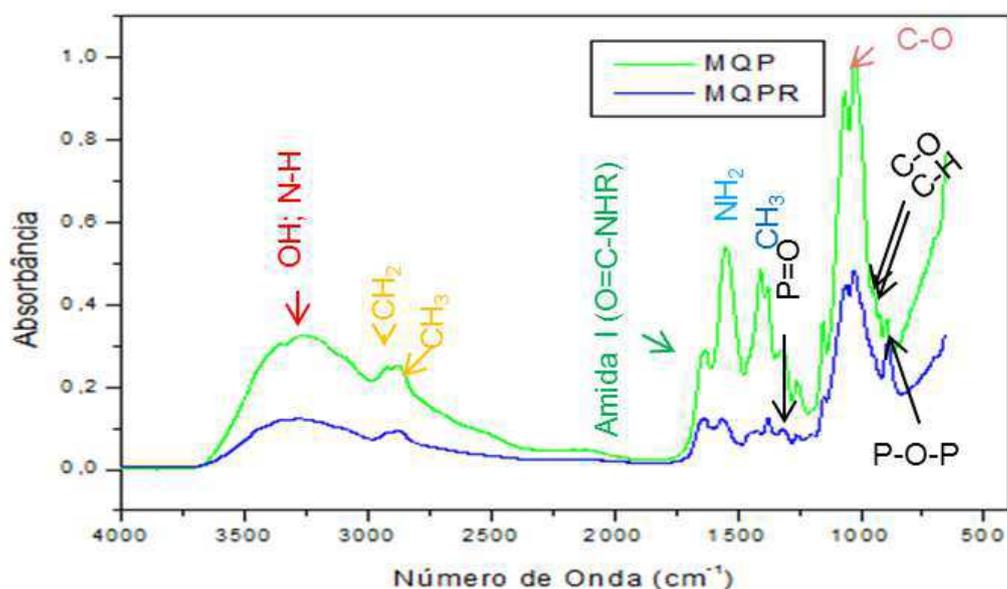
alongamento da ligação simétrica deste grupo. A banda em 928 cm^{-1} corresponde ao alongamento vibracional da ligação C-O (mais característica). A banda em 995 cm^{-1} corresponde a flexão do grupo C-H do *trans*-CH=CH-. E as bandas em 846 , 828 e 804 cm^{-1} corresponde a flexão das ligações -CH nas posições 1,2,4 do grupo fenil. (WHITE, 2001; SAHU, CHOURASIYA, GAJBHIYE, 2012; PENG PONG et al. 2014).

Figura 12: Espectroscopia por FTIR do fármaco piperina (PIP).



O espectro por FTIR das membranas de quitosana/piperina não reticulada (MQP) e reticuladas (MQPR) observado na Figura 13 apresentam bandas características da quitosana e também da piperina que se encontram em 924 cm^{-1} e em 850 cm^{-1} corresponde ao alongamento vibracional da ligação C-O e a flexão das ligações -CH nas posições 1,2,4 do grupo fenil, respectivamente. Para o sistema MQPR é possível observar as bandas características do agente reticulante em 889 cm^{-1} correspondente ao alongamento assimétrico da ligação P-O-P e em 1254 cm^{-1} que é atribuída a vibração de estiramento da ligação P=O. As bandas características da piperina não ficaram evidenciadas, provavelmente, devido a uma inibição desta pelo agente reticulante.

Figura 13: Espectroscopia por FTIR das membranas de quitosana/piperina (MQP) e quitosana/piperina reticulada (MQPR).



5.2 Difração de Raios X

As Figuras 14, 15 e 17 apresentam os difratogramas das membranas de quitosana não reticuladas (MQ), membranas de quitosana reticulada (MQR), do fármaco piperina (PIP), das membranas quitosana/piperina não reticulada (MQP) e das membranas de quitosana/piperina reticuladas (MQPR).

De acordo com Luyen e Huong (1996) a quitosana pode apresentar três morfologias diferentes: não-cristalinas, cristalinas hidratados e cristalinas anidro, que pode ser identificado por difração de raios-X.

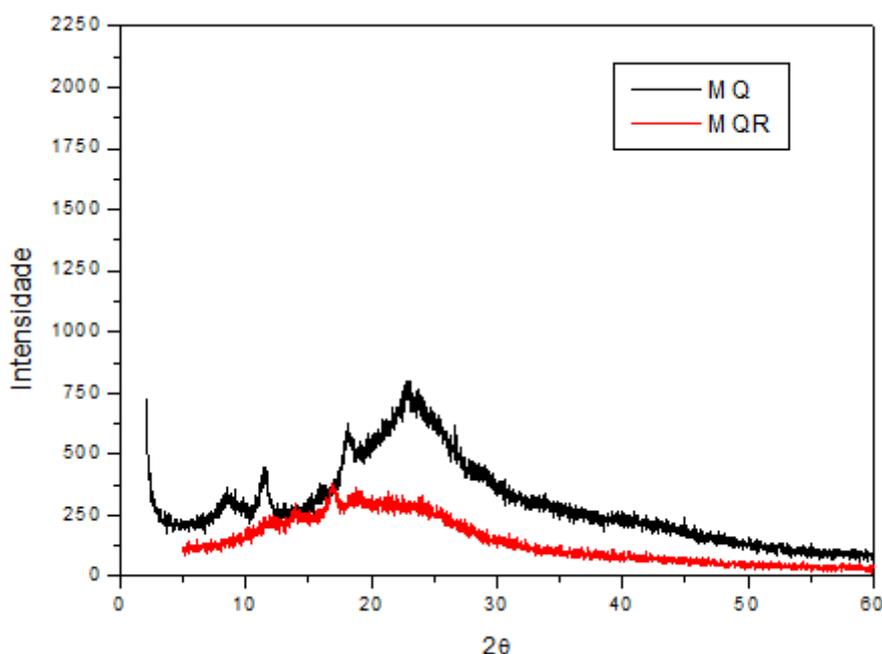
Os difratogramas de DRX das membranas de quitosana não reticulada (MQ) (Figura 14) mostrou dois picos um em $2\theta=11^\circ$ e o outro em $2\theta=22^\circ$. Esses picos são uma característica da estrutura da quitosana hidratada, atribuídos às regiões cristalinas do polímero, corroborando com os resultados apresentados por Luyen e Huong (1996), Martins et al. (2011) e Piai et al. (2009).

Nos difratogramas das membranas de quitosana reticulada (MQR) (Figura 14), é possível observar que estas membranas apresentaram um perfil amorfo, pois apresentou apenas um pico com máximo em $2\theta = 20^\circ$ com

intensidade reduzida e, também, a ausência do pico $2\theta = 10^\circ$ quando comparado com o difratograma da membrana não reticulada (MQ). Estes resultados corroboram com os apresentados por Martins et al. (2012), em seus estudos sobre a produção de micropartículas de quitosana reticuladas com TPP.

Essas diferenças podem ser atribuídas à modificação no arranjo da molécula na rede cristalina. As alterações na estrutura molecular das membranas de quitosana resultam tanto da formação de ligações iônicas cruzadas, como também na quebra de ligações de hidrogênio intermolecular da quitosana (GIERSZEWSKA-DRUŻYŃSKA; OSTROWSKA-CZUBENKO, 2010).

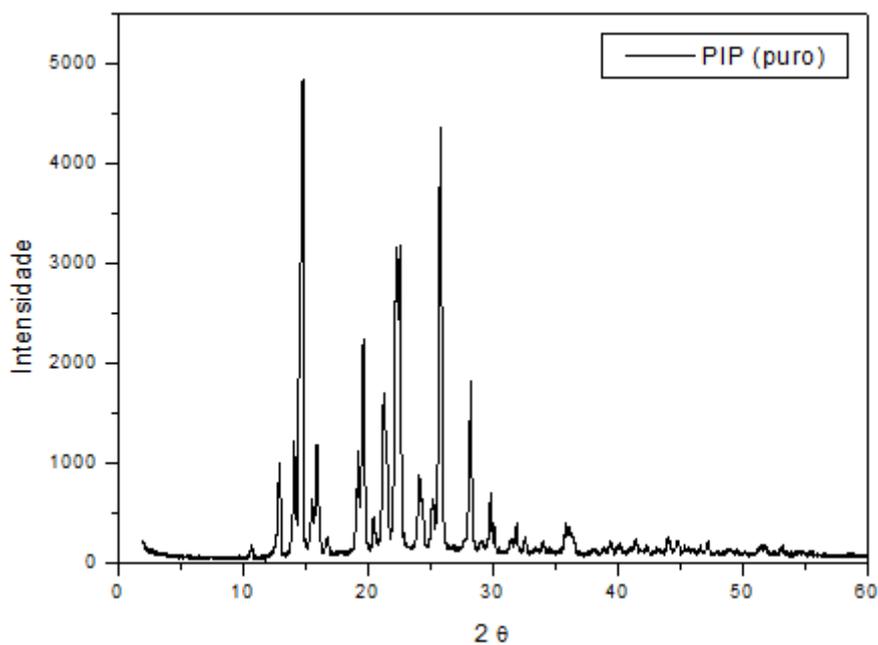
Figura 14: Difratograma das membranas de quitosana (MQ) e membranas de quitosana reticuladas (MQR).



O difratograma do fármaco piperina (Figura 15) apresentou uma série de picos bem definidos na região de $2\theta = 10$ a 30° e picos com pequena intensidade na região de $2\theta = 30$ a 60° , implicando a sua natureza cristalina (VINOD, SANTHOSHA, ANBAZHAGAN; 2011). Foi realizado o refinamento pelo método de Rietveld do fármaco piperina, e foi verificado que este cristaliza

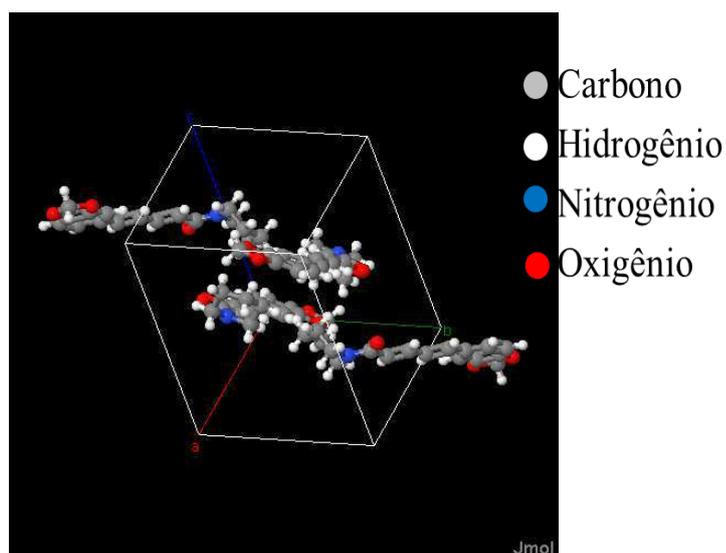
no sistema monoclinico, grupo espacial P21/n, com parâmetros de cela $a = 8.74319$, $b = 13.63668$, $c = 13.16426$, $\alpha = \gamma = 90.000$ e $\beta = 108.670$.

Figura 15: Difratoograma do fármaco Piperina.



Na Figura 16 é possível observar a projeção na célula unitária do fármaco Piperina.

Figura 16: Projeção do fármaco piperina.

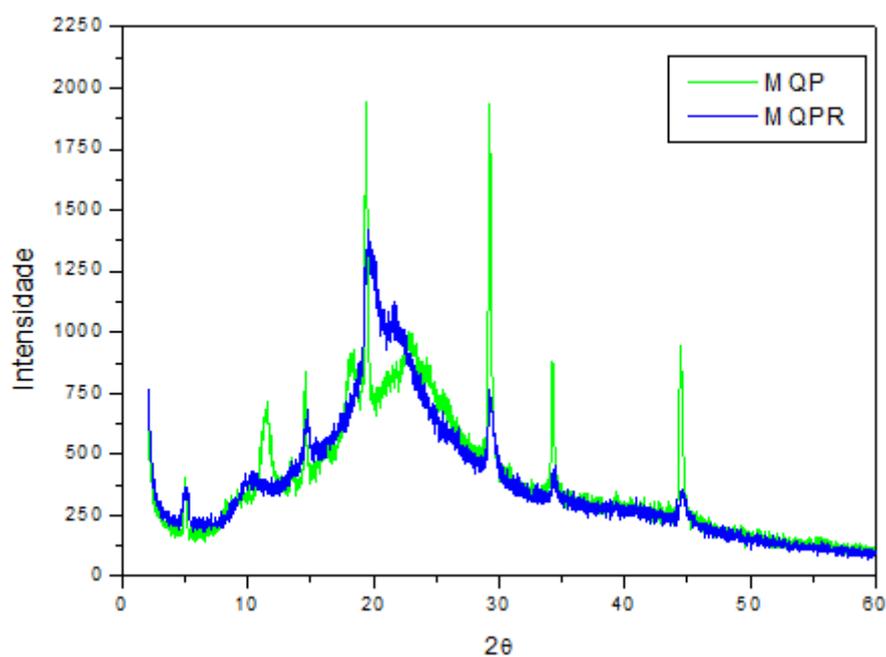


No difratograma da membrana de quitosana/piperina (MQP) apresentado na Figura 17 observa-se que a incorporação da piperina aumentou a cristalinidade do sistema devido ao aumento da intensidade dos picos característicos da quitosana em $2\theta=10^\circ$ e $2\theta=20^\circ$ e também pela presença de picos em $2\theta=29^\circ$, $2\theta=34^\circ$ e $2\theta=45^\circ$, revelando a presença do fármaco piperina.

O difratograma das membranas de quitosana/piperina reticuladas (MQPR) está apresentado também na Figura 17 foi observado que a reticulação das membranas de quitosana/piperina (MQPR) proporcionou a redução da intensidade dos picos em $2\theta=29^\circ$, $2\theta=34^\circ$ e $2\theta=45^\circ$.

Este resultado confirma a interação entre a quitosana, a piperina e o agente reticulante (TPP), observada na análise por FTIR.

Figura 17: Difratogramas das membranas de quitosana/piperina (MQP) e membranas de quitosana/piperina reticuladas (MQPR).



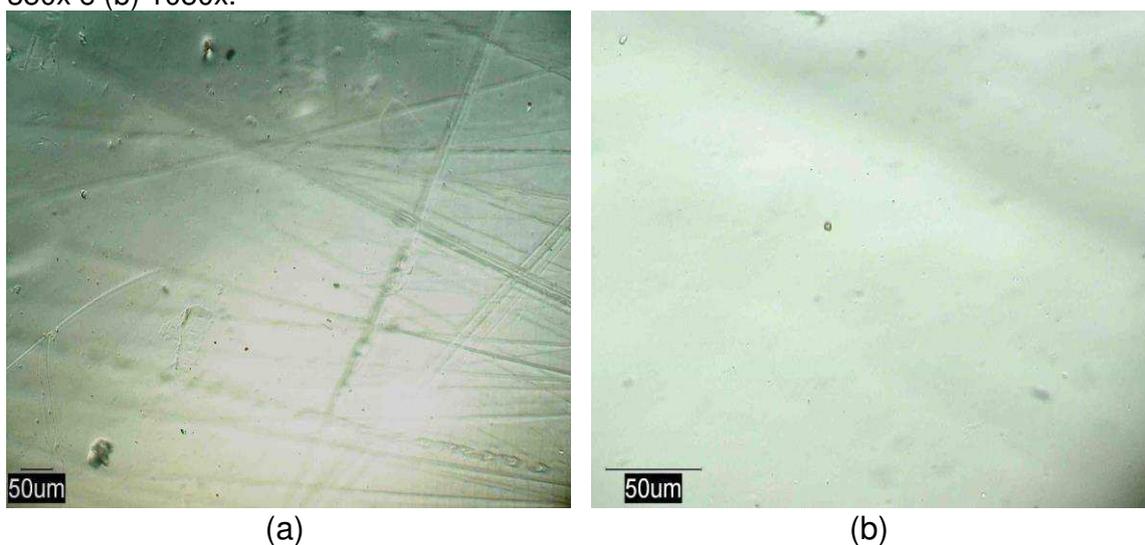
5.3 Microscopia Ótica

As figuras 18, 19, 20 e 21 apresentam as imagens de microscopia ótica das membranas de quitosana (MQ), membranas de quitosana reticulada

(MQR), membranas de quitosana/piperina (MQP) e membranas de quitosana/piperina reticuladas (MQPR).

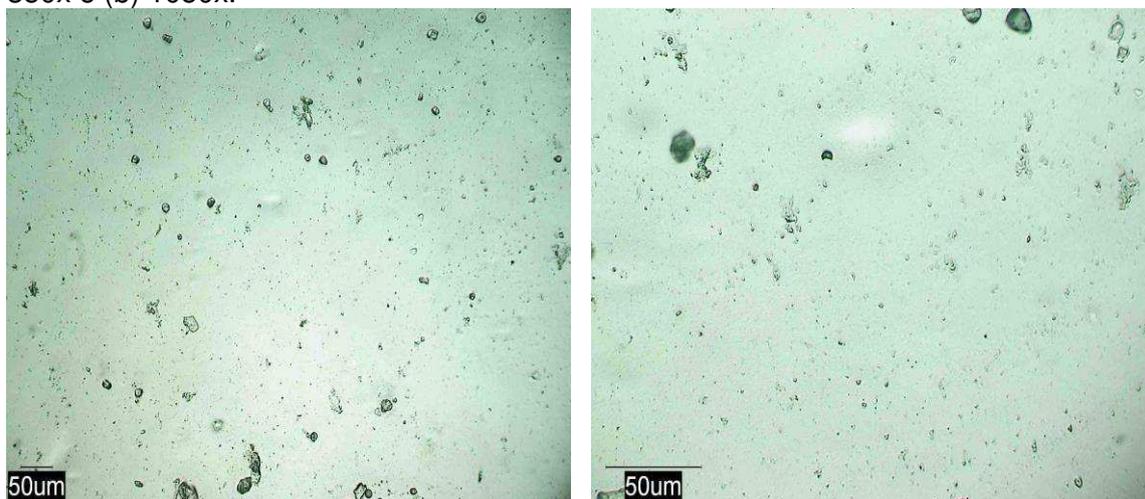
A morfologia da superfície das membranas de quitosana não reticuladas (MQ) apresentada na Figura 18 foi observada no microscópio ótico. Todas as membranas não reticuladas apresentaram superfície lisa, com a presença eventual de bolhas, como pode ser observado nas micrografias das Figuras 18 (a) e (b). Além disso, riscos, proveniente das ranhuras da placa de poliestireno, durante o processo de formação da membrana, foram observados. Tais problemas foram corrigidos, pela utilização de placas novas, também de poliestireno, as quais não apresentavam riscos na superfície, mesmo quando observadas ao microscópio ótico.

Figura 18: Microscopia ótica da membranas de quitosana não reticuladas (MQ): (a) 350x e (b) 1050x.



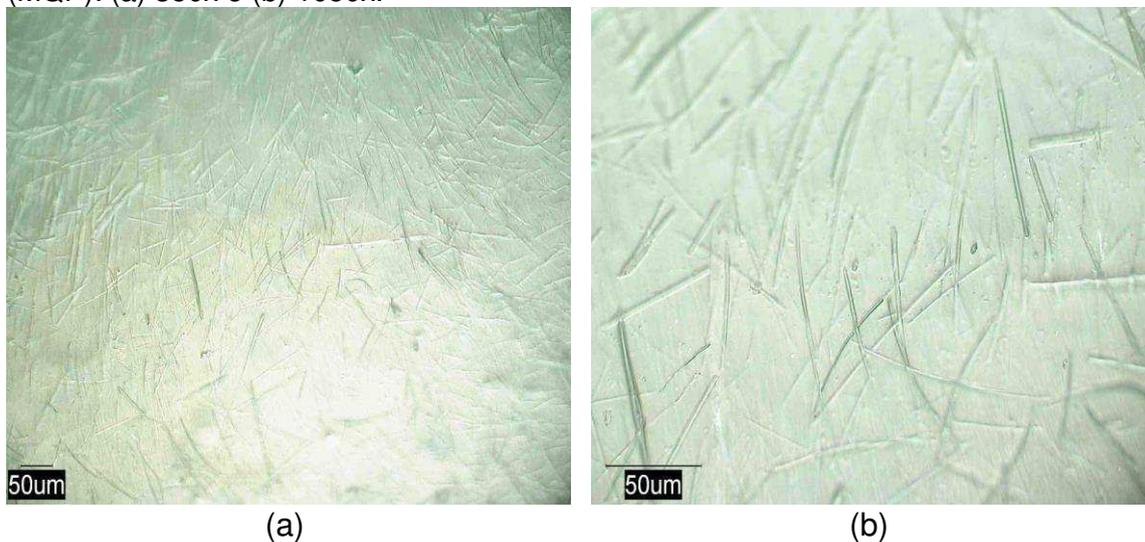
Observando-se as micrografias das membranas de quitosana reticuladas (MQR) (Figura 19) é possível constatar pequenas alterações na morfologia.

Figura 19: Microscopia ótica das membranas de quitosana reticuladas (MQR): (a) 350x e (b) 1050x.



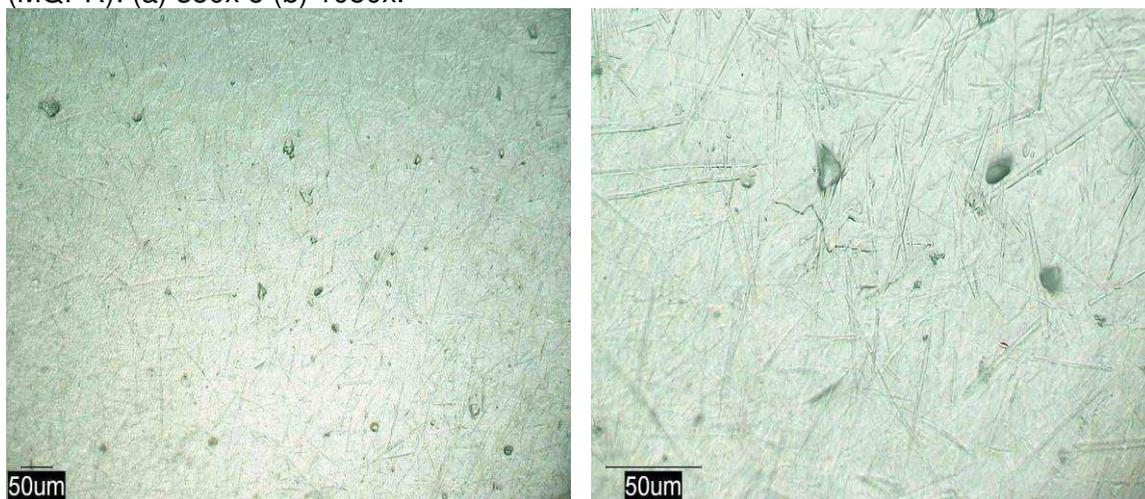
Na Figura 20, as membranas de quitosana/piperina (MQP) observa-se que a incorporação da piperina sugere a formação de uma nova fase, na matriz polimérica, com forma fibrilar que pode ser atribuída à presença da piperina.

Figura 20: Microscopia ótica das membranas de quitosana/piperina não reticuladas (MQP): (a) 350x e (b) 1050x.



Observando-se a micrografia da membrana de quitosana/piperina reticulada (MQPR), apresentada na Figura 21, constata-se a mesma morfologia das membranas de quitosana/piperina não reticuladas (MQP). Mas, é possível observar uma maior densidade volumétrica do sistema, tendo em vista que as partículas estão mais aglomeradas.

Figura 21: Microscopia ótica das membranas de quitosana/piperina reticuladas (MQPR): (a) 350x e (b) 1050x.

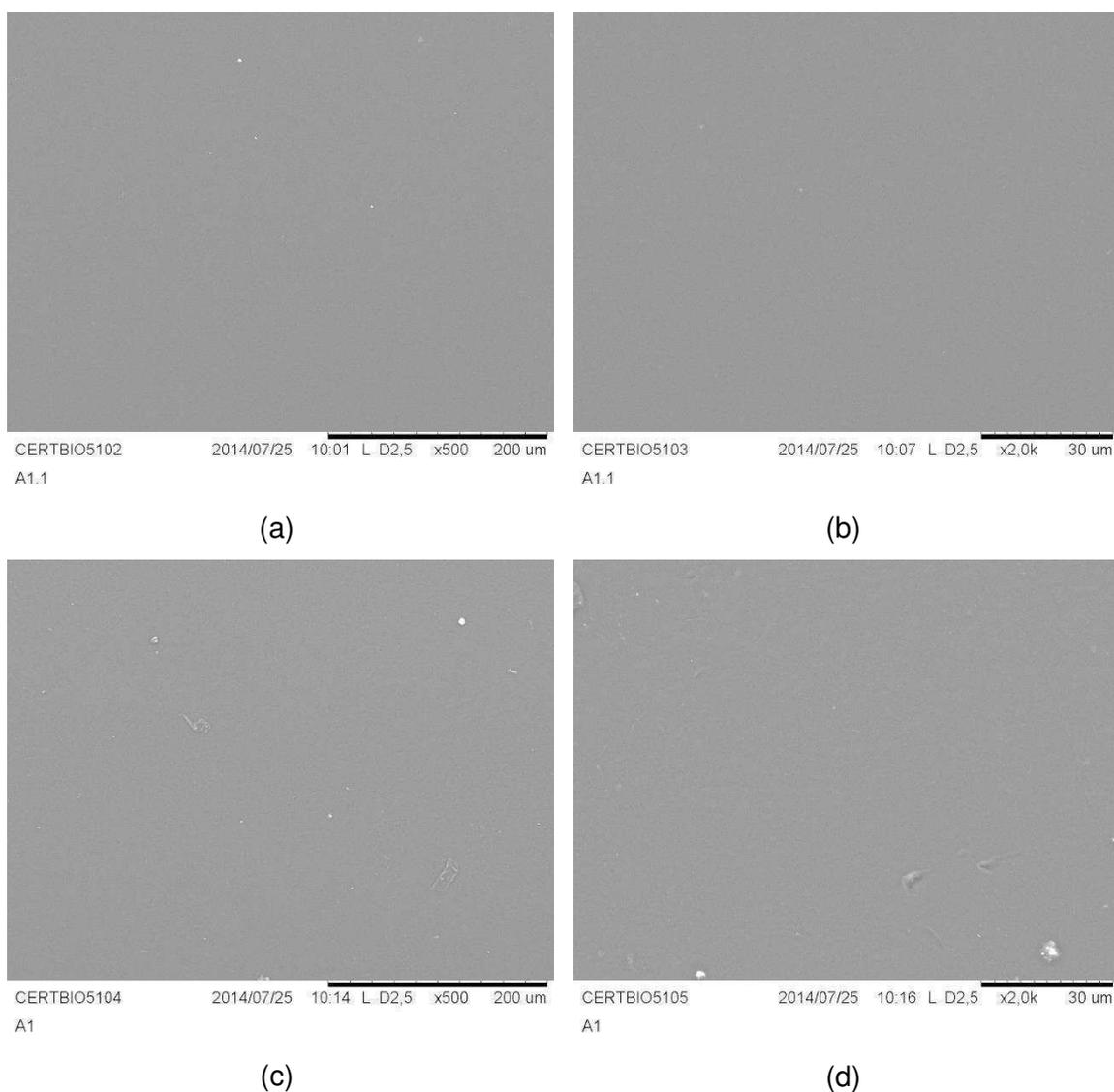


5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS)

As micrografias das membranas de quitosana não reticulada (MQ), reticulada (MQR), do fármaco piperina (PIP), membranas de quitosana/piperina (MQP) e das membranas de quitosana/piperina reticulada (MQPR) estão apresentadas nas Figuras 22, 24 e 25.

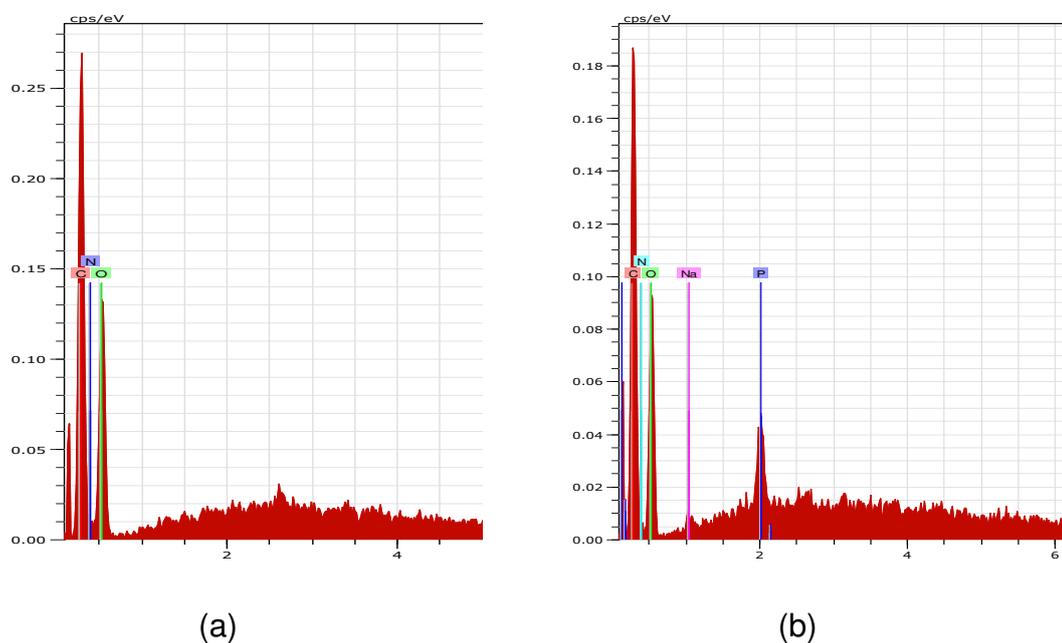
Na Figura 22 (a) e (b) tem-se as micrografias da membrana de quitosana (MQ), com magnitude de 500x e 2000x respectivamente, sem o fármaco. Observa-se uma superfície uniforme, lisa e plana, sem a presença de poros visíveis, caracterizando as membranas como densas. Corroborando com os estudos de Dallan (2005) e Lima (2010). É possível observar que a reticulação não causou nenhuma alteração significativa na microestrutura das membranas. Essas mesmas características foram observadas na análise por MO.

Figura 22: MEV das membranas de quitosana não reticuladas (MQ) (a)500x, (b) 2000x e membranas de quitosana reticuladas (MQR) (c) 500x, (b) 2000x.



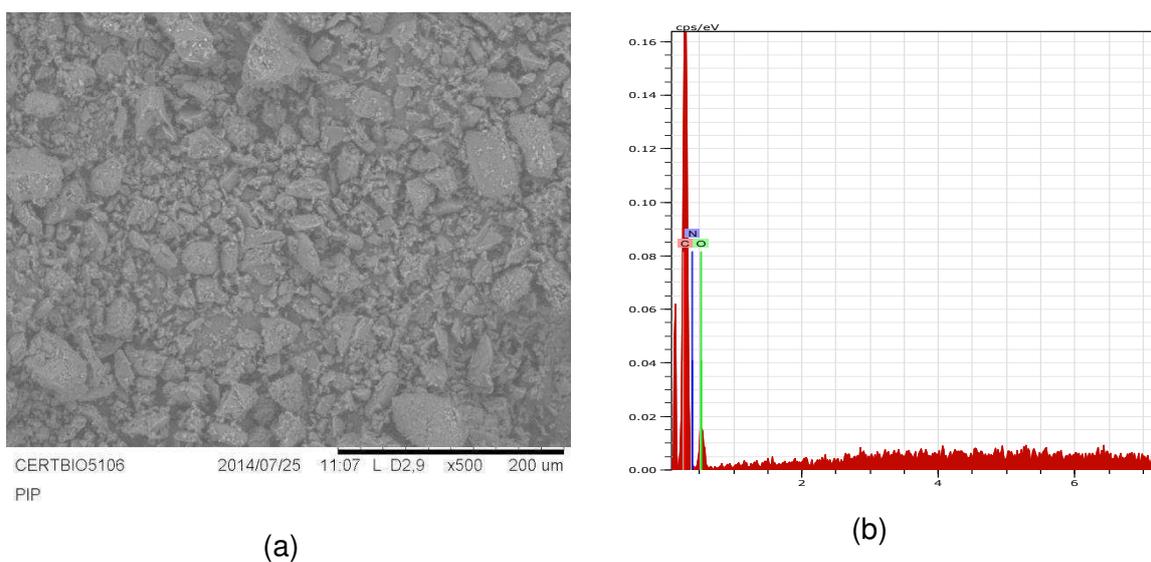
A partir dos resultados de espectroscopia dispersiva de raios X apresentados na Figura 23 (a) para as membranas de quitosana não reticuladas (MQ) foi observada a presença dos elementos O, C, N, próprios da membrana de quitosana. Os espectros das membranas de quitosana reticuladas (Figura 14 (b)) apresentaram além dos elementos próprios da quitosana a presença dos elementos Na e P que são característicos da reticulação com o TPP.

Figura 23: Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS) das membranas de quitosana não reticuladas (MQ) (a) e membranas de quitosana reticuladas (MQR) (b). Aumento de 2000x.



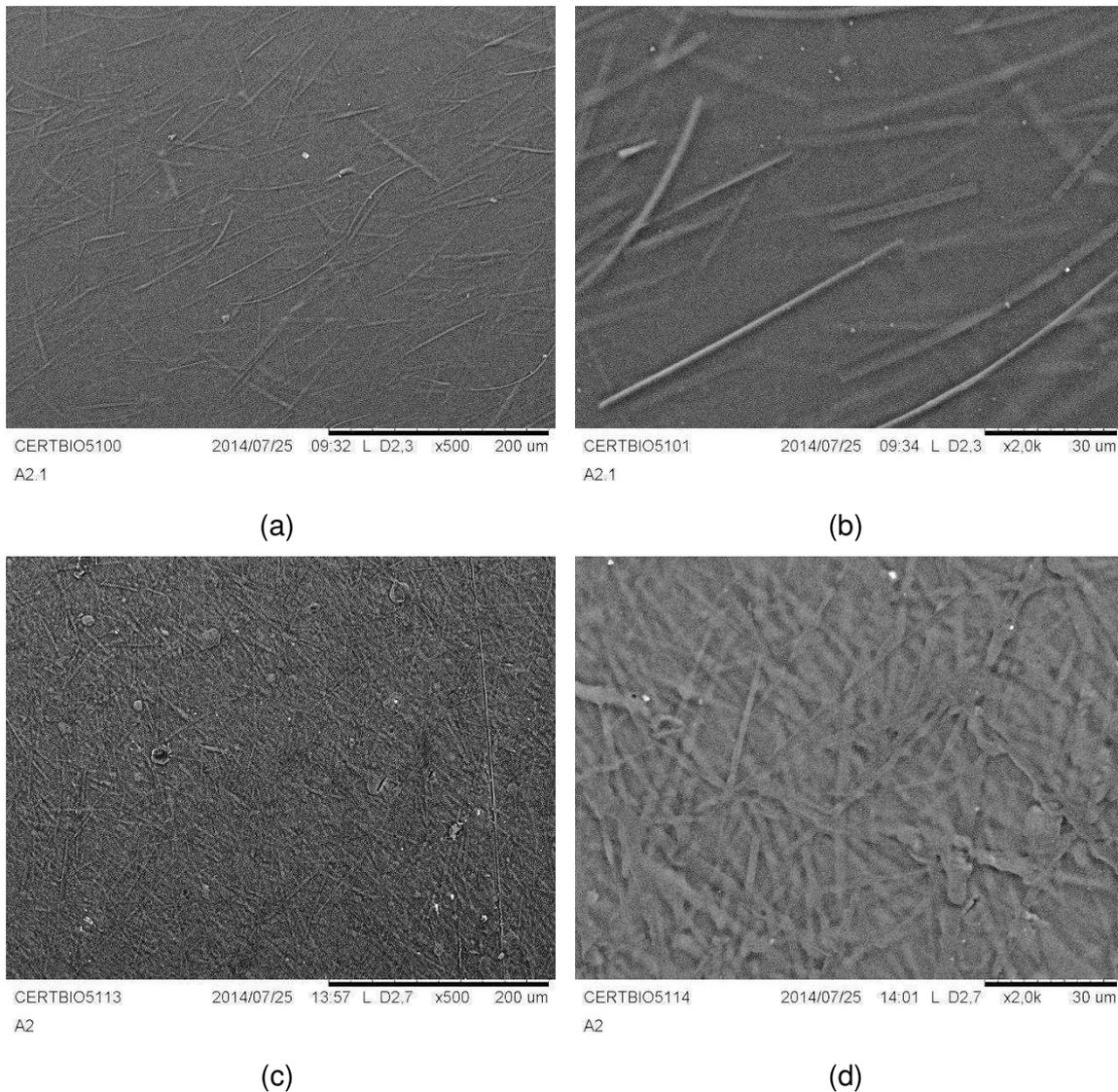
Na Figura 24 (a) observa-se a micrografia do fármaco piperina, as partículas apresentam-se na forma granular com tamanho variado e geometria irregular. A análise por EDS do fármaco (Figura 24 (b)) evidenciou a presença dos elementos O,N e C, típicos da piperina.

Figura 24: MEV do fármaco Piperina: (a) 500x, e EDS: (b) 2000x.



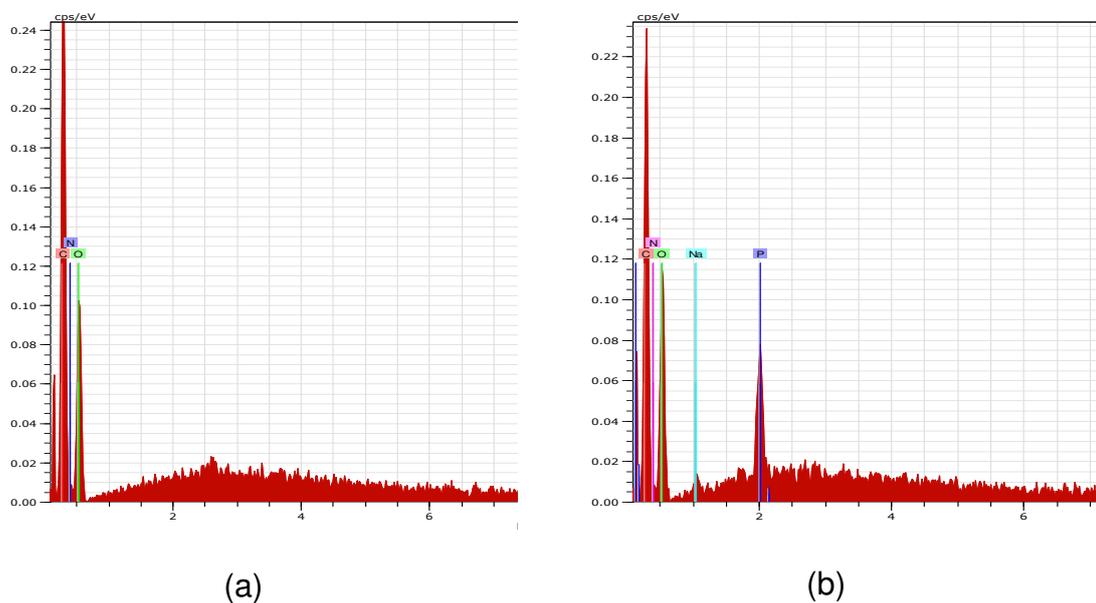
As micrografias referentes à membrana de quitosana/piperina não reticuladas (MQP) são mostradas nas Figuras 25 (a) e (b) com magnitude de 500x e 2000x, respectivamente. Ao introduzir a piperina à membrana de quitosana observa-se uma morfologia fibrilar. A presença dessas fibras pode ser atribuída a uma interação entre a piperina e a matriz polimérica, visto que a micrografia do fármaco, já mostrada anteriormente, apresenta uma morfologia granular. É possível observar também que a incorporação da piperina foi adequada uma vez que a micrografia demonstra uma boa dispersão das partículas do fármaco. As micrografias das membranas de quitosana/piperina reticuladas (MQPR) são apresentadas nas Figuras 25 (c) e (d). Após a reticulação podemos observar o mesmo fenômeno apresentado nas micrografias obtidas no microscópio ótico, uma maior densidade volumétrica.

Figura 25: MEV das membranas de quitosana não reticuladas (a)500x, (b) 2000x e reticuladas (c) 500x, (b) 2000x.



As análises de espectroscopia dispersiva de raios X para as membranas de quitosana/piperina (MQP) e membranas de quitosana/piperina reticuladas (MQPR) são mostradas na Figura 26 (a) e (b). Na Figura 26 (a) foi observada a presença dos elementos C, O e N, típicos da quitosana e da piperina. Já para as membranas de quitosana/piperina reticuladas (Figura 26 (b)) além dos elementos típicos da quitosana e da piperina foram encontrados também os elementos Na e P, que são característicos da reticulação com o TPP.

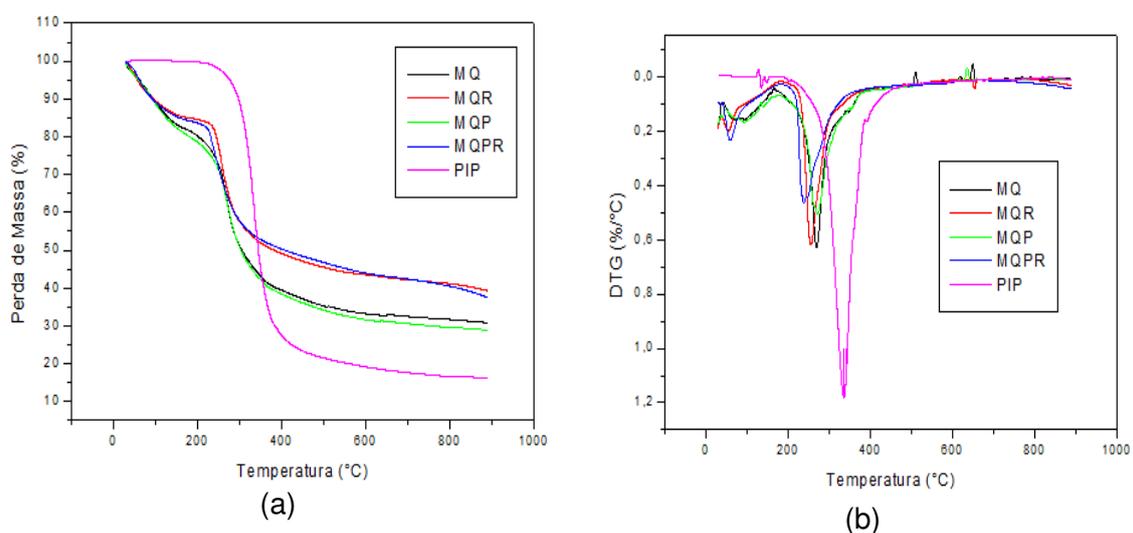
Figura 26: Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS) das membranas de quitosana/piperina (MQP) (a) e membranas de quitosana/piperina reticuladas (MQPR) (b). Aumento de 2000x.



5.5 Análise termogravimétrica

As Figuras 27(a), (b), ilustram os resultados de TG/DTG para as membranas de quitosana não reticuladas (MQ) e reticuladas (MQR), das membranas quitosana/piperina não reticuladas (MQP), reticuladas (MQPR) e o fármaco piperina (PIP).

Figura 27: Análise termogravimétrica (a) TG das membranas MQ, MQR, MQP, MQPR e do fármaco PIP e (b) DTG das membranas MQ, MQR, MQP, MQPR e do fármaco PIP.



As decomposições térmicas das membranas e do fármaco estão evidenciadas na Tabela 1.

Tabela 1: Dados termogravimétricos dinâmicos das membranas de quitosana (MQ), membranas de quitosana reticuladas (MQR), membranas de quitosana/piperina (MQP), membranas quitosana/piperina reticuladas (MQPR); e fármaco piperina (PIP).

Amostras	Etapas de Decomposição			
	1ª Etapa		2ª Etapa	
	Tp (°C)	Perda de Massa (%)	Tp (°C)	Perda de Massa (%)
MQ	68	16	268	43
MQR	53	6	255	35
MQP	92	12	272	43
MQPR	58	9	238	33
PIP	335	76	-	-

*Tp: Temperatura máxima de decomposição

A decomposição térmica das membranas de quitosana não reticuladas (MQ) ocorreu em duas etapas de perda de massa. A primeira etapa apresentou uma perda de massa em torno de 16% com temperatura de decomposição máxima em 68°C. A segunda etapa apresentou uma perda de massa de cerca de 43% e temperatura máxima de decomposição em 268°C (FERNANDES, 2009).

Para as membranas de quitosana reticuladas (MQR), também foi identificada uma perda de massa em duas etapas. A primeira etapa apresentou uma perda de massa em torno de 6% com temperatura de decomposição máxima em 53°C. A segunda etapa apresentou uma perda de massa de cerca de 35% e temperatura máxima de decomposição em 255°C.

As membranas de quitosana/piperina não reticuladas (MQP) e reticuladas (MQPR) também apresentaram perda de massa em duas etapas de decomposição. As membranas MQP apresentaram a primeira perda de massa de 12% e temperatura máxima de decomposição de 92°C. A segunda etapa exibiu perda de massa de 43% e temperatura máxima de decomposição de 272°C. A primeira perda de massa das amostras MQPR foi de aproximadamente 9% e temperatura máxima de decomposição de 58°C. Já a

segunda etapa de decomposição foi cerca de 47% e temperatura máxima de decomposição de 238°C.

O fármaco piperina apresentou perda de massa em apenas uma etapa, com perda de massa de aproximadamente 76% e temperatura máxima de decomposição de 335°C.

Analisando os termogramas de todas as amostras pode-se afirmar que a primeira etapa é atribuída à perda de água que estaria ligada aos grupos aminos e hidroxilas deste polímero, através de pontes de hidrogênio e também de materiais voláteis. O segundo evento é atribuído a um complexo processo de decomposição que tem início através da quebra aleatória das ligações glicosídicas seguidas de decomposição das unidades acetiladas e desacetiladas do polímero (PENICHE, et al. 1999; MUKOMA, JOOSTE, VOSLOO, 2004). Pode-se observar que a reticulação proporcionou diferenças na temperatura de pico das membranas MQ e MQR. Estas diferenças podem ser atribuídas à forte afinidade dos polissacarídeos com a água e, portanto, pode ser facilmente hidratado. Partindo do pressuposto de que a ligação –OH é mais polar que a ligação –NH₃⁺, a interação da água com os grupos hidroxilas é mais forte do que com os grupos amina. As reticulações com o TPP ocorrem entre o grupo reativo O⁻ e o grupo amina protonado (NH₃⁺) da quitosana. As membranas de quitosana reticulada apresentaram uma menor perda de massa na primeira etapa de decomposição, portanto, pode-se considerar que estas apresentaram um menor número de grupos amina livres para interagir com as moléculas de água, fazendo com que esses se ligassem ao grupo hidroxila.

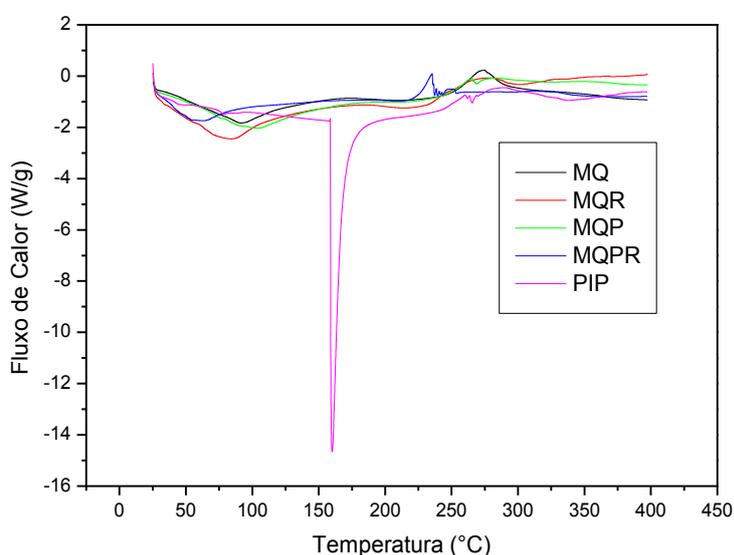
Quando a piperina foi adicionada ao sistema a temperatura de pico da primeira etapa de decomposição das membranas (MQP) foi deslocada para valores mais elevados. Este resultado é uma forte indicação de que o fármaco está ligado a quitosana, pois com o aumento da temperatura, menor a interação polímero-água, provavelmente devido ao perfil hidrofóbico do fármaco ligado a quitosana.

Quando esse sistema foi reticulado as membranas MQPR apresentaram redução tanto na temperatura como na porcentagem de perda de massa, mesmo perfil apresentado pela MQR. Ou seja, as membranas MQPR apresentaram maior estabilidade térmica.

5.6 Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As Figuras 28 (a) e (b) ilustram os resultados de DSC para as membranas de quitosana não reticuladas (MQ) e reticuladas (MQR), das membranas quitosana/piperina não reticuladas (MQP) e reticuladas (MQPR) e do fármaco piperina (PIP).

Figura 28: Análise calorimétrica exploratória diferencial membranas de quitosana não reticuladas (MQ) e reticuladas (MQR), das membranas quitosana/piperina não reticuladas (MQP) e reticuladas (MQPR) e do fármaco piperina (PIP).



A Tabela 2 resume os principais dados relacionados aos eventos calorimétricos para as amostras estudadas.

Tabela 2: Dados dos eventos calorimétricos das amostras estudadas.

Amostras	Eventos Calorimétricos			
	1ª Evento		2ª Evento	
	Tp (°C)	ΔH (J/g)	Tp (°C)	ΔH (J/g)
MQ	90	415	274	124
MQR	86	479	267	44
MQP	104	526	265	7
MQPR	62	204	234	30
PIP	159	145	-	-

Nos resultados de DSC para as membranas de quitosana reticuladas e não reticuladas foi observada a presença de dois eventos principais um pico endotérmico e um exotérmico. Para as membranas não reticuladas o evento endotérmico foi encontrado em 90°C e o evento exotérmico foi encontrado em 274°C. Para as membranas de quitosana reticuladas o evento endotérmico foi encontrado em 86°C e o exotérmico foi encontrado em 267°C. O evento endotérmico pode ser atribuído à perda de água e solventes voláteis e o evento exotérmico à decomposição das unidades monoméricas do polímero (AZEVEDO et al., 2010; ZAWADZKI; KACZMAREK, 2010; GUINESI; CARVALHEIRO, 2006; SARMENTO et al. 2006).

Os resultados apresentados na Tabela 2 revelaram diferenças nas áreas e na posição dos picos endo e exotérmicos. É possível observar que a reticulação proporcionou uma redução na temperatura de decomposição, mas proporcionou um aumento na entalpia de fusão. Esses resultados confirmam os resultados obtidos pela análise de TG, ou seja, o sistema ficou mais estável termicamente. Podemos observar que a redução da cristalinidade, comprovada pelas análises de DRX, proporcionou um aumento na capacidade de retenção de água da quitosana reticulada. Devido às diferenças nas características químicas, também foram observadas alterações no pico exotérmico das membranas de quitosana não reticuladas (MQ) e reticuladas (MQR). Valores mais elevados de ΔH indicam a presença de grupos aminos que não foram substituídos. À medida que os grupos amina foram substituídos foram encontrados menores valores de ΔH (KITTUR et al. 2002).

O resultado de DSC para as membranas de quitosana/piperina não reticuladas e reticuladas também apresentam dois eventos principais, sendo um pico endotérmico e outro exotérmico. Para as membranas quitosana/piperina não reticuladas (MQP) o evento endotérmico foi encontrado em 104°C e o evento exotérmico foi encontrado em 265°C. Para as membranas de quitosana/piperina reticuladas (MQPR) o evento endotérmico foi encontrado em 62°C e o exotérmico foi encontrado em 234°C. Quando a piperina foi adicionada ao sistema (MQP) observou-se, a partir da técnica de

DRX, um aumento do arranjo cristalino e, portanto, ocorreu o aumento da entalpia para este sistema.

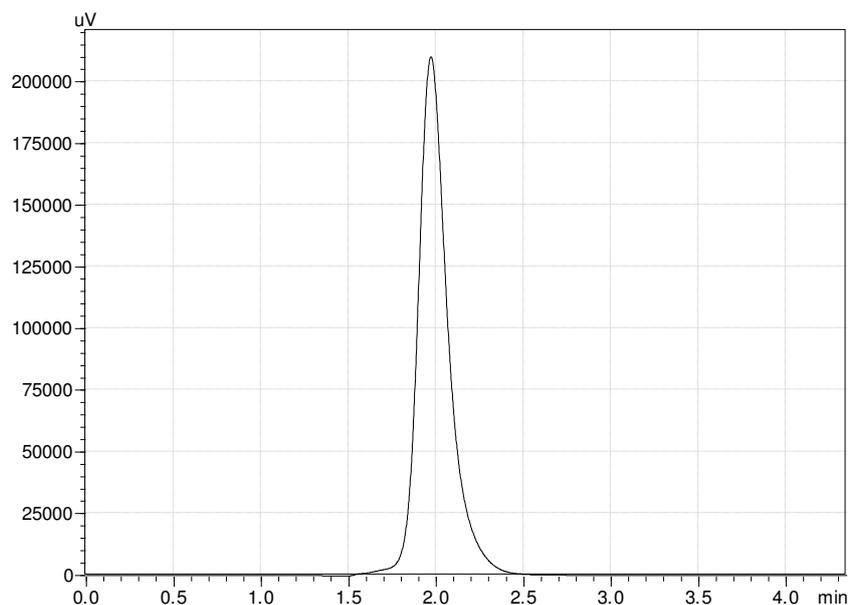
Em ambos os sistemas, o pico característico da fusão da piperina a 159°C, desapareceu completamente permanecendo apenas o pico da decomposição da quitosana, isso pode ser atribuído à formação de um complexo, indicando uma interação efetiva entre a quitosana e a piperina.

5.7 Teor de Piperina na Membrana de Quitosana

5.7.1 Cromatograma da Piperina

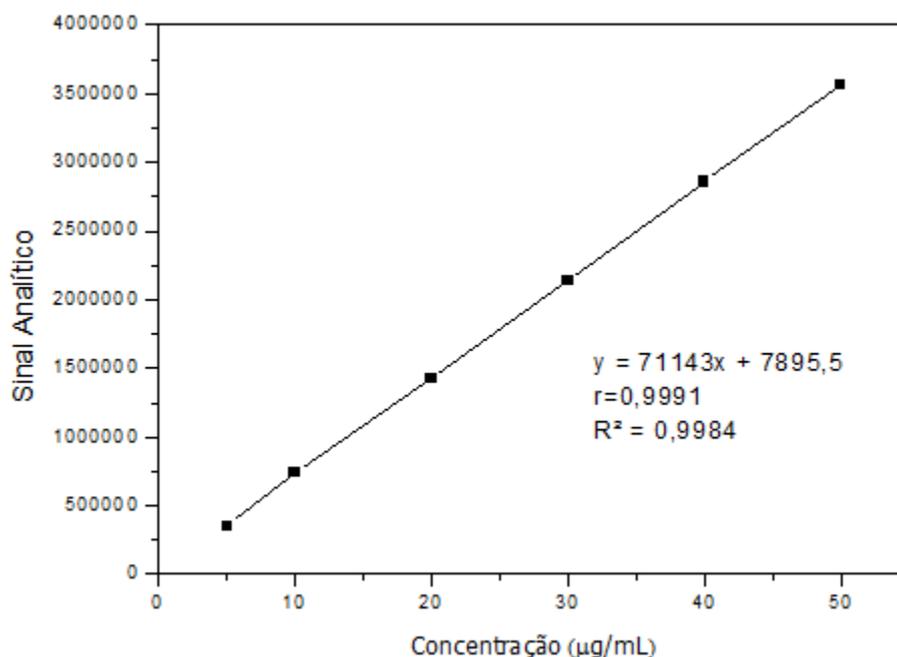
Através do método analítico já citado identificou-se o comprimento de onda da piperina em $\lambda=330\text{nm}$, onde o fármaco apresentou pico de absorção máxima, e, apresentou um tempo de retenção de 2,00 minutos conforme Figura 29.

Figura 29: Cromatograma das soluções-padrão da piperina obtido por CLUE-UV a 330nm.



5.7.2 Curva de calibração

Na Figura 30 é possível observar a curva de calibração da piperina que será utilizada para a quantificação deste nas membranas no ensaio de eficiência de carregamento.

Figura 30: Curva de calibração da piperina.

O método apresentou-se linear em uma faixa de 5 a 50 µg/mL. A curva analítica ($y = 71143x + 7895,5$) obtida pelo método dos mínimos quadrados apresentou um coeficiente de correlação (r) igual a 0,9991, estando em concordância com os critérios estabelecidos pela RE Nº 899/2003 da ANVISA, que preconiza valor mínimo de $r = 0,99$ (BRASIL, 2003). Os coeficientes de determinação (r^2) e o coeficiente de correlação (r) demonstram que nos intervalos de concentração estudados os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração dos fármacos na amostra e com uma excelente correlação devido ao r ser maior que 0,99.

5.7.3 Eficiência de carregamento das membranas contendo a piperina

A quantificação do teor de piperina nas membranas foi realizada empregando-se o método analítico para quantificação do fármaco por CLUE, descrito anteriormente.

A porcentagem de fármaco presente nas membranas de quitosana/piperina (MQP) analisadas é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3: Determinação da eficiência de carregamento da piperina nas membranas MQP.

Tempo (h)	Concentração Experimental (µg/mL)	Concentração Teórica (µg/mL)	Eficiência de carregamento para MQP (%)
1	20,05	133	15,08
3	33,35	133	25,08
6	50,83	133	38,22
24	101,31	133	76,17
48	112,50	133	84,58
72	113,55	133	85,37
96	115,40	133	86,76

A porcentagem de fármaco presente nas membranas de quitosana/piperina reticuladas (MQPR) analisadas é apresentada na Tabela 4.

Tabela 4: Determinação da eficiência de carregamento da piperina nas membranas MQPR.

Tempo (h)	Concentração Experimental (µg/mL)	Concentração Teórica (µg/mL)	Eficiência de carregamento para MQPR (%)
1	8,35	133	6,28
3	9,70	133	7,29
6	10,60	133	7,97
24	14,82	133	11,14
48	17,84	133	13,41
72	20,54	133	15,45
96	22,85	133	17,18

A quantidade de fármaco, que se conseguiu dosear nas membranas de quitosana/piperina se manteve acima de 86%, valor este considerado satisfatório, tendo em vista que a RE N° 899/2003 estabelece para este ensaio para o doseamento de medicamentos e de fármacos o limite é entre 80 a 120% (BRASIL, 2003)

Já a quantidade de fármaco, que se conseguiu dosear nas membranas de quitosana/piperina reticuladas foi de aproximadamente 17%. Evidenciando que a reticulação dificultou a extração da piperina das membranas. Este resultado comprova que o efeito da reticulação tarda a extração da piperina das membranas e, conseqüentemente, esta irá influenciar no perfil de liberação.

Pengpong et al. (2014) estudaram a eficiência de encapsulação da piperina em micropartículas de quitosana e obtiveram uma taxa de encapsulação de 54,84% para a concentração de piperina de 1% (m/m). Já Sahu, Chourasiya, Gajbhiye (2012) em seus estudos obtiveram micropartículas de quitosana contendo piperina e obtiveram taxa de encapsulação 80%, para a concentração de piperina de 5% (m/m).

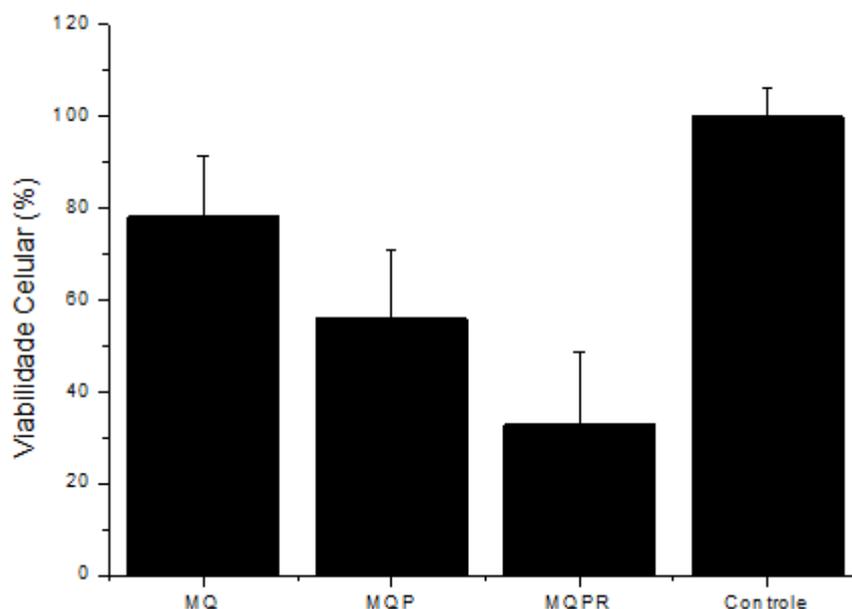
5.8 Avaliação da viabilidade celular das células MCF-7

A avaliação da atividade citotóxica das membranas de quitosana/piperina reticuladas e não reticuladas sob a célula MCF-7 foi realizada pelo método do MTT. A Figura 31 ilustra os resultados deste teste.

De acordo com Bispo (2009) o valor mínimo requerido para o teste de citotoxicidade de membranas de quitosana é de 50%. Os resultado mostrados na Figura 31 demonstram que as membrana de quitosana (MQ) submetidas à análise neste ensaio, apresentaram viabilidade celular de 78%, portanto, estas podem ser utilizadas como biomaterial.

Ainda analisando a Figura 31 é possível observar que as membranas de quitosana/piperina (MQP) apresentaram potencial citotóxico para as células cancerígenas, pois apresentou viabilidade celular de 55%. Já as membranas MQPR apresentaram um potencial citotóxico de 32%.

Figura 31: Viabilidade celular das células MCF 7 na presença das membranas de quitosana (MQ), membranas de quitosana/piperina (MQP) e membranas de quitosana/piperina reticuladas (MQPR).



Diante do exposto, pode ser inferido que o sistema MQPR proporcionou uma redução no número de células viáveis, portanto esse sistema é citotóxico para as células de câncer de mama MCF 7. As membranas de quitosana/piperina reticuladas (MQPR) apresentaram potencial tóxico maior que aquele apresentado para a membrana quitosana/piperina não reticulada (MQP), indicando que a presença do agente reticulante potencializa a ação citotóxica da piperina.

6 CONCLUSÃO

A partir dos estudos realizados pode-se concluir que o processo descrito para a obtenção das membranas MQ, MQR, MQP e MQPR mostrou-se eficaz. Os resultados indicaram alterações que sugerem a presença da piperina incorporada na membrana de quitosana com e sem a presença do TPP.

As membranas MQP e MQPR apresentam potencial citotóxico para as células de câncer mamário humano (MCF 7) e apresentaram um efetivo coeficiente de carregamento do fármaco, podendo então serem utilizadas como um sistema de liberação controlada.

Nas condições desenvolvidas nesta pesquisa o sistema indicado como referência para ensaios de liberação e novos ensaios biológicos é o sistema MQPR. Diante do exposto o sistema desenvolvido apresenta-se como promissor para a obtenção de um sistema para liberação controlada de fármacos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 100, n. 1, p. 5-28, 2004.
- AKABUGA, J.; BERGISADI, N. Effect of formulation variables on cis-platin loaded chitosan microsphere properties. **Journal of Microencapsulation**, v. 16, n. 6, p. 697-703, 1999.
- ALLEN JR, L. V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos - 8. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2007, 776p.
- ALSARRA, I. A. et al. Molecular weight and degree of deacetylation effects on lipase-loaded chitosan bead characteristics. **Biomaterials**, v. 23, n. 17, p. 3637-3644, 2002.
- AKERELE, O. WHO Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines. **HerbalGram**, 28, 13-20, 1993.
- AZEVEDO, J. R. et al. Caracterização Físico-química de nanopartículas de quitosana-TPP contendo insulina. In: VII Congresso Brasileiro de análise Térmica e Calorimetria. São Pedro, 2010. **Anais...**, São Pedro, SP, 2010.
- BERGER, J., M. REIST, J. M. MAYER, O. FELT, N. A. PEPPAS, R. GURNY. 'Structure and Interactions in Covalently and Ionically Crosslinked Chitosan Hydrogels for Biomedical Applications', **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** Vol. 57, No. 1, 19-34, 2004.
- BEZERRA, D.P. Potencial anticâncer da pilartina e da piperina, amidas isoladas de plantas do gênero piper. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia (Dissertação). Universidade Federal do Ceará. 142p. 2005.
- BISPO, V. M. Estudo do Efeito da Reticulação por Genipin em suportes biocompatíveis de Quitosana-PVA. Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas (Tese), Universidade Federal de Minas Gerais, 206p. 2009.
- BODMEIER, R.; OH, K.-H.; PRAMAR, Y. Preparation and Evaluation Of Drug-Containing Chitosan Beads. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 15, n. 9, p. 1475-1494, 1989.
- BONEPALLY, C. R. et al. Fabrication and Investigations on Hepatoprotective Activity of Sustained release Biodegradable Piperine Microspheres. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology**. v. 1, p. 87-96. 2008.
- BRACK, H. P.; TIRMIZI, S. A.; RISEN JR., W. M. 'A Spectroscopic and Viscometric Study of the Metal Ion-Induced Gelation of the Biopolymer Chitosan', **Polymer**, Vol. 38, No. 10, 2351-2362, 1997.
- BRASIL. Resolução N° 899, de 29 de maio de 2003. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, 2003.

BRUGNEROTTO, J, et al. An infrared investigation and solid state structures of acylated chitosan characterization. **Polymer**, vol. 42, p. 3569-3580, 2001.

CASARANO, R. Copolímeros biodegradáveis com potencial uso como biomateriais. Programa de pós-graduação em Química. Universidade de São Paulo (Tese), 281p, 2009.

COIMBRA, P.M.A. Preparação e Caracterização de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos com Base em Polímeros de Origem Natural. Programa de pós-graduação em Engenharia Química. Universidade de Coimbra (Dissertação), 268p, 2010.

DALLAN, P. R. M. Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração da pele. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. (Tese). 194f, 2005.

DAMIAN, C.; BEIRÃO, L.H.; FRANCISCO, A.; ESPÍRITO SANTO, M.L.P.; TEIXEIRA, E. Quitosana: Um Amino Polissacarídeo com Características Funcionais. Alim. Nutri, Araraquara, v.16, n. 2, p.195-205, 2005.

DAS, N.G.; DAS, S.K. Controlled-Release of Oral Dosage Forms. Formulation, Fill & Finish. 2003. Disponível em: <www.pharmtech.com>. Acesso em: 12 de março de 2013.

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

DEE, K.C.; PULEO, D.A.; BIZIOS, R. **An introduction to tissue-biomaterial interactions**. New Yor: Wiley, 2002.

DE AZEVEDO, M. M. M. NANOESFERAS E A LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS <http://lges.igq.unicamp.br>, p. 20, 2002. ISSN 1677-5058. Disponível em: < <http://lges.igq.unicamp.br> >. Acesso em: 20/06/2013.

DORATI, R. et al. Investigation of the degradation behaviour of poly(ethylene glycol-co-d,l-lactide) copolymer. **Polymer Degradation and Stability**, v. 92, n. 9, p. 1660-1668, 2007.

DRAGET, K. I.; VÅRUM, K. M.; MOEN, E.; GYNNILD, H.; SMIDSRØD, O. 'Chitosan Cross-Linked with Mo(Vi) Polyoxyanions: A New Gelling System', **Biomaterials**, vol. 13, No. 9, 635-638, 1992.

DRURY, J. L.; MOONEY, D. J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. **Biomaterials**, v. 24, n. 24, p. 4337-4351, 2003.

FEI LIU, X.; GUAN, Y.L.; YANG, D.Z.; LI, Z.; YAO, K. 'Antibacterial Action of Chitosan and Carboxymethylated Chitosan', **Journal of Applied Polymer Science**, Vol. 79, No. 7, 1324-1335, 2001.

FU, Y.; KAO, W. J. Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 7, n. 4, p. 429-444, 2010.

FUKUSHIMA, S. et al. Preparation and evaluation of o/w type emulsions containing antitumor prostaglandin. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 45, n. 1, p. 65-75, 2000.

FUNKHOUSER, J.; ARONSON, N. Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, n. 1, p. 96, 2007.

GEORGE, M; ABRAHAM, E. T. Polyonic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and Chitosan- a review. **Journal of Controlled Release**. v.114, p.1-14, 2006.

GIERSZEWSKA-DRUŻYŃSKA M, OSTROWSKA-CZUBENKO J; The effect of ionic crosslinking on thermal properties of hydrogel chitosan membranes. Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives, Polish Chitin Society, Łódź, v. 15,p. 25-32, 2010.

GO"PFERICH, A.; LANGER, R. Modeling monomer release from bioerodible polymers. **Journal of Controlled Release**, v. 33, n. 1, p. 55-69, 1995.

GRIGOLON, L.B. Modificação de quitina e quitosana por via enzimática. Programa de pós graduação em Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas (Dissertação), 86p, 2001.

GUDSOORKAR VR, RAMBHAU D. Sustained release of drugs. **Eastern Pharmacist**. 1993; 9: 17-19 HENRIQUE, J. S.; FALCARE, R. S.; LOPES, P. S. **Sistemas de Liberação Controlada**. Pharmacia Brasileira: 1 p. 2006.

GUIBAL, E.; VON OFFENBERG SWEENEY, N.; ZIKAN, M. C.; VINCENT, T.; TOBIN, J. M. Competitive Sorption of Platinum and Palladium on Chitosan Derivatives, **Int J Biol Macromol**, Vol. 28, No. 5, 401-8, 2001.

GUINESI, L.S.; CAVALHEIRO, E.T.G. The use of DSC curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples. **Thermochímica Acta**, v. 444, 2006, p. 128-133.

GUPTA, K.C; JABRAIL, F.H. Effects of degree of deacetylation and cross-linked on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. **Carbohydrate Polymers**. v.66, p.43-54, 2006.

HWANG, Y. P.; YUN, H.J.; KIM, H.G.; HAM, E.H.; CHOI, J.H.; CHUNG, Y.C.; JEONG, H.G. Suppression of Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Tumor Cell Invasion by Piperine Via the Inhibition of Pkca/Erk1/2-Dependent Matrix Metalloproteinase-9 Expression, **Toxicology Letters**, Vol. 203, No. 1, 9-19, 2011.

HENRIQUE, J. S.; FALCARE, R. S.; LOPES, P. S. Sistemas de Liberação Controlada. **Pharmacia Brasileira**. 1 p. 2006.

HERMANS, K.; VAN DEN PLAS; D., KERIMOVA, S.; CARLEER, R.; ADRIAENSENS, P.; WEYENBERG, W.; LUDWIG, A. 'Development and Characterization of Mucoadhesive Chitosan Films for Ophthalmic Delivery of Cyclosporine A', **International Journal of Pharmaceutics** Vol. 472, No. 1–2, 10-19, 2014.

JIANG, T.; JAMES, R.; KUMBAR, S.G.; LAURENCIN, C.T. Chapter 5 - Chitosan as a Biomaterial: Structure, Properties, and Applications in Tissue Engineering and Drug Delivery. In: KUMBAR, S. G.;LAURENCIN, C. T., *et al* (Ed.). **Natural and Synthetic Biomedical Polymers**. Oxford: Elsevier, p.91-113, 2014.

JUMAA, M.; FURKERT, F.H.; MULLER, B.W. A New Lipid Emulsion Formulation with High Antimicrobial Efficacy Using Chitosan, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Vol. 53, No. 1, 115-123, 2002.

JUNG, BYUNG-OK; KIM, CHUN-HO; CHOI, KYU-SUK; LEE, Y.M.; Jae-Jin Kim. 'Preparation of Amphiphilic Chitosan and Their Antimicrobial Activities', *Journal of Applied Polymer Science* **Vol. 72, No. 13**, 1713-1719, 1999.

KHAJURIA, A. *et al*. Piperine modulation of carcinogen induced oxidative stress in intestinal mucosa. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 189, n. 1-2, p. 113-118, 1998.

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

KITTUR, F. S., HARISH PRASHANTH, K. V.; UDAYA SANKAR, K.; THARANATHAN, R. N. Characterization of Chitin, Chitosan and Their Carboxymethyl Derivatives by Differential Scanning Calorimetry, **Carbohydrate Polymers**, Vol. 49, No. 2, 185-193, 2002.

KONG, M. *et al*. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 51-63, 2010.

LAAKSONEN, H.; HIRVONEN, J.; LAAKSONEN, T. Cellular automata model for swelling-controlled drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 380, n. 1–2, p. 25-32, 2009.

LABHASETWAR, V.; SONG, C.; LEVY, R. J. Nanoparticle drug delivery system for restenosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 24, n. 1, p. 63-85, 1997.

LARANJEIRA, M.C.M; FÁVERE, V.T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**. v.32 n. 3. São Paulo, 2009.

LAUS, R.; LARANJEIRA, M. C. M., MARTINS, A. O.; FÁVERE, V. T.; PEDROSA, R. C.; BENASSI, J. C.; GEREMIAS; R. Microesferas De Quitosana Reticuladas Com Tripolifosfato Utilizadas Para Remoção Da Acidez, Ferro(III) E Manganês(II) De Águas Contaminadas Pela Mineração De Carvão, **Química Nova**, Vol. 29, 34-39, 2006.

LAWRIE, G. *et al*. Interactions between Alginate and Chitosan Biopolymers Characterized Using FTIR and XPS. **Biomacromolecules**, v.8, p. 2433-2541, 2007.

LI, X. **Design of Controlled Release Drug Delivery Systems**. McGraw-Hill Education, 2005.

LIECHTY, W. B. et al. Polymers for Drug Delivery Systems. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 1, n. 1, p. 149-173, 2010.

LIMA, R.S.C. Desenvolvimento de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos: Quitosana/Insulina. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos). Universidade Federal de Campina Grande, 112 f, 2010.

LUYEN, D.V., HUONG, D.M., 1996. Chitin and derivatives. In: Salomone, J.C. (Ed.), **Polymeric Materials Encyclopedia**, vol. 2. CRC Press, Boca Raton, pp. 1208–1217.

LYRA, et al. Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**. v.26, n.5, p. 784-793, 2007.

MARTINS, A. F., PEREIRA, A.G.B.; FAJARDO, A.R.; RUBIRA, A.F.; MUNIZ, E.C. Characterization of Polyelectrolytes Complexes Based on N,N,N-Trimethyl Chitosan/Heparin Prepared at Different Ph Conditions, **Carbohydrate Polymers**, Vol. 86, No. 3, 1266-1272, 2011.

MARTINS, A. F.; OLIVEIRA, D. M.; PEREIRA, A.G.B.; RUBIRA, A.F.; MUNIZ, E.C. Chitosan/Tpp Microparticles Obtained by Microemulsion Method Applied in Controlled Release of Heparin, **International Journal of Biological Macromolecules**, Vol. 51, No. 5, 1127-1133, 2012.

MI, FWU-LONG, CHIN-TA CHEN, YUAN-CHENG TSENG, CHIH-YANG KUAN, AND SHIN-SHING SHYU. 'Iron(III)-Carboxymethylchitin Microsphere for the Ph-Sensitive Release of 6-Mercaptopurine', **Journal of Controlled Release** Vol. 44, No. 1, 19-32, 1997.

MI, FWU-LONG, SHIN-SHING SHYU, TSUNG-BI WONG, SHIANG-FANG JANG, SUNG-TAO LEE, AND KAI-TAI LU. 'Chitosan–Polyelectrolyte Complexation for the Preparation of Gel Beads and Controlled Release of Anticancer Drug. Ii. Effect of Ph-Dependent Ionic Crosslinking or Interpolymer Complex Using Tripolyphosphate or Polyphosphate as Reagent', **Journal of Applied Polymer Science**, Vol. 74, No. 5, 1093-1107, 1999.

MINCHEVA, R. et. al. Hydrogels from chitosan crosslinked with poly(ethyleneglycol) diacid as bone regeneration materials, *e-Polymers*, v.58, p.1-11, 2004.

MUKOMA, P.; JOOSTE, B.R.; VOSLOO, H.C.M. Synthesis and characterization of cross-linked chitosan membranes for application as alternative proton exchange membrane materials in fuel cells. **Journal of Power Sources**, v.136, p.16-23, 2004.

OSÓRIO, S.M.L.; Novel polymeric systems based on natural materials: development and biological performance. Programa de pós graduação em Processamento e Caracterização de Materiais. Universidade do Minho (Dissertação), 161p, 2007.

PALUSZKIEWICZ, C., STODOLAK, E.; HASIK, M.; BLAZEWICZ, M. Ft-Ir Study of Montmorillonite-Chitosan Nanocomposite Materials, **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**, Vol. 79, No. 4, 784-8, 2011.

PARK, J.; LAKES, R. S. **Biomaterials: An Introduction**. Springer, 2007.

PARMAR, V. S. et al. Phytochemistry of the genus Piper. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 597-673, 1997.

PENGPONG, T. et al. Design, synthesis and in vitro evaluation of mucoadhesive p-coumarate-thiolated-chitosan as a hydrophobic drug carriers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 3, p. 487-497, 2014.

PENICHE, C. et al. Self-curing membranes of chitosan/PAA IPNs obtained by radical polymerization: preparation, characterization and interpolymer complexation. **Biomaterials**, v.20, p. 1869-1878, 1999.

PEREIRA, A. P. V.; VASCONCELOS, W. L.; ORÉFICE, R. L. Novos biomateriais: híbridos orgânico-inorgânicos bioativos. **Polímeros**, v. 9, p. 104-109, 1999.

PIAI, J. F.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. D. Self-Assembly of a Swollen Chitosan/Chondroitin Sulfate Hydrogel by Outward Diffusion of the Chondroitin Sulfate Chains', **Acta Biomaterialia**, Vol. 5, No. 7, 2601-2609, 2009.

PRADEEP, C. R., KUTTAN, G. Effect of Piperine on the Inhibition of Lung Metastasis Induced B16f-10 Melanoma Cells in Mice, **Clin Exp Metastasis**, Vol. 19, No. 8, 703-8, 2002.

RATNER, B. D. **Biomaterials science : an introduction to materials in medicine**. Amsterdam; Boston: Elsevier Academic Press, 2004. ISBN 0125824637 9780125824637.

RAVIVARAPU, H., MAHALINGAM, R., JASTO, B.R. Biodegradable Polymeric Delivery Systems. In: LI, X., JASTI, B.R. **Design of Controlled Release Drug Delivery Systems**, Ed. MsGraw-Hill, p. 271-303, 2006.

REDDY, L., ODHAV, B. & BHOOLA, K.D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmac. Therap.**, 99, 1 . 13, 2003.

REIS, A.C.B.P. Encapsulação de fármacos peptídicos pelo método de emulsificação/gelificação interna. Tese de Doutorado. Universidade de Coimbra, Coimbra, 2007.

RIBEIRO, G. B. M. Obtenção de biomateriais porosos utilizando sílica coloidal como Aglutinante. 51p. Trabalho de Diplomação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul.2009.

RIOS, M. Polymers for controlled release: Formulation Follows Function. **Pharmaceutical Thchnology**, New York, v.29, n.6, p. 42-50, 2005

SAHU, P.; CHOURASIYA, A.; GAJBHIYE, V. Higher Therapeutic Benefits of piperine Loaded Optimized Chitosan Microspheres for Improved Hepatoprotective Potentials. **Reserch Gate: Pharmaceutical Sciences**, v.1, p. 39-44, 2012.

SANTOS, C.C. Obtenção e Caracterização de Moicroesferas de PLDLA carregadas com Sinvastatina. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Engenharia Mecânica). Universidade Estadual de Campinas. Caompinas, 100f, 2011.

SARMENTO, B. et al., Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, p.1-7, 2006.

SELVENDIRAN, K.; BANU, S. M.; SAKTHISEKARAN, D. Protective effect of piperine on benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. **Clinica Chimica Acta**, v. 350, n. 1–2, p. 73-78, 2004.

SELVENDIRAN, K. et al. Preliminary study on inhibition of genotoxicity by piperine in mice. **Fitoterapia**, v. 76, n. 3–4, p. 296-300, 2005.

SELVENDIRAN, K.; PRINCE VIJEYA SINGH, J.; SAKTHISEKARAN, D. In vivo effect of piperine on serum and tissue glycoprotein levels in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 19, n. 2, p. 107-111, 2006.

SEO, H.J.; MITSUHASHI, K.; TANIBE, H. Antibacterial and antifungal fiber blended by chitosan in *Advances in Chitin and Chitosan*, C. J. Brine, P. A. Sandford, and J. P. Zikakis, Eds., **Elsevier Applied Science**, v. 45, p. 34-40, 1992.

SEZER, A. D.; AKBUĞA, J. 'Controlled Release of Piroxicam from Chitosan Beads', **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 121, no. 1, 113-116, 1995.

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

SILVER, F; DOILLON, C. *Biocompatibility, interactions and implantable materials*, New York, VCH. v. 1. p. 1-76, 1989.

SHI, D. Naturally Occuring Polymer Biomaterials. In: SCIENTIFIC, W. (Ed.). **Introduction to Biomaterials**, 2006. cap. 10, p.143 - 210.

STULZER, H.K. Desenvolvimento e avaliação de sistemas microparticulados de liberação modificada a base de quitosana contendo o antiviral aciclovir. Tese (Programa de Pós Graduação em Química). Universidade Federal de Santa Catarina, 268f, 2008.

SUNILA, E. S., KUTTAN, G. Immunomodulatory and Antitumor Activity of Piper Longum Linn. And Piperine, **Journal of Ethnopharmacology**, Vol. 90, No. 2–3, 339-346, 2004.

THIEL, A.; BUSKENS, C.; WOEHRLE, T.; ETHEVE, S.; SCHOENMAKERS, A.; FEHR, M.; BEILSTEIN, P. Black Pepper Constituent Piperine: Genotoxicity Studies in Vitro and in Vivo, **Food and Chemical Toxicology Vol. 66, No. 0**, 350-357, 2014.

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

VANDEVORD, P. J. et al. Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 59, n. 3, p. 585-590, 2002.

VERONESE, F. M.; CALICETI, P. Drug Delivery Systems. In: **BARBUCCI, R.** (Ed.). **Integrated Biomaterials Science**. NEW YORK: Kluwer Academic Publishers, 2002. cap. 29, p.833-873.

VERT, M. et al. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 3, n. 6, p. 432-446, 1992.

VINOD, K.R., SANTHOSHA, D., ANBAZHAGAN, S. Formulation and evaluation of piperine cream-a new herbal dimensional approach for vitiligo patients. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n.2, p. 29-33, 2011.

WANG, A. et al. Physical properties and biocompatibility of a porous chitosan-based fiber-reinforced conduit for nerve regeneration. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 11, p. 1697-1702, 2007.

WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, v. 29, n. 20, p. 2941-2953, 2008.

WILLIAMS, D. F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 5897-5909. 2009.

WONG, J. Y.; BRONZINO, J. D. **Biomaterials**. Taylor & Francis, 2007.

YANG, Y. M. et al. The controlling biodegradation of chitosan fibers by N-acetylation in vitro and in vivo. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, n. 11, p. 2117-2121, 2007.

YIE, W. C.; SENSANG, L. Drug Delivery: Controlled Release. In: (Ed.). **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Third Edition**: Informa Healthcare, 2006. cap. 73, p.1082-1103. ISBN 0-8493-9399-x.

YUAN, Q.; SHAH, J.; HEIN, S.; MISRA, R. D. K. Controlled and Extended Drug Release Behavior of Chitosan-Based Nanoparticle Carrier, **Acta Biomaterialia**, Vol. 6, No. 3, 1140-1148, 2010.

ZAWADZKI, J.; KACZMAREK; H. Thermal Treatment of Chitosan in Various Conditions, **Carbohydrate Polymers**, Vol. 80, No. 2, 394-400, 2010.

ZHANG, H.; NEAU, S. H. In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation. **Biomaterials**, v. 22, n. 12, p. 1653-1658, 2001.

WHITE, C. Infrared Analysis of Piperine in Black Pepper. Developed through the National Science Foundation-funded. 2001. Disponível em: <http://www.terrificscience.org/lessonpdfs/PiperineAnalysis.pdf>. Acessado em: 24/07/2013.