

PUCRS

ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS
MESTRADO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

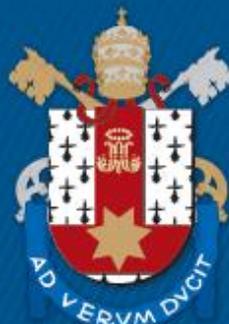
PEDRO HENRIQUE FERREIRA TONDO

**IMPREGNAÇÃO ASSISTIDA POR FLUIDO SUPERCRÍTICO DE CURCUMINA EM
MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA**

Porto Alegre

2023

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul



IMPREGNAÇÃO ASSISTIDA POR FLUIDO SUPERCRÍTICO DE CURCUMINA EM MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA

PEDRO HENRIQUE FERREIRA TONDO
ENGENHEIRO QUIÍMICO

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Porto Alegre

2023

Ficha Catalográfica

F383i Ferreira Tondo, Pedro Henrique

Impregnação assistida por fluido supercrítico de curcumina em micropartículas de quitosana / Pedro Henrique Ferreira Tondo. – 2023.

56 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Cassel.

1. câncer de cólon. 2. liberação de drogas. 3. CO₂. 4. modelagem matemática. I. Cassel, Eduardo. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051



Impregnação Assistida Por Fluido Supercrítico De Curcumina Em Micropartículas De Quitosana

CANDIDATO: PEDRO HENRIQUE FERREIRA TONDO

Esta Dissertação de Mestrado foi julgada para obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

DR. EDUARDO CASSEL - ORIENTADOR

BANCA EXAMINADORA

DR. RAFAEL NOLIBOS ALMEIDA - PUCRS

DRA. ROSANE ANGÉLICA LIGABUE - DO PGETEMA - PUCRS



IMPREGNAÇÃO ASSISTIDA POR FLUIDO SUPERCRÍTICO DE CURCUMINA EM MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA

PEDRO HENRIQUE FERREIRA TONDO
ENGENHEIRO QUÍMICO

ORIENTADOR: PROF. DR. EDUARDO CASSEL

Dissertação realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

Porto Alegre
2023

O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas”.

(Claude Lévi-Strauss)

AGRADESCIMENTOS

Agradeço ao Professor Eduardo Cassel, meu orientador, por tudo o suporte, paciência e pela oportunidade em participar do grupo de pesquisa do Laboratório de Operações Unitárias. Sempre conduziu o trabalho com alegria e incentivando a todos a buscar cada vez mais.

Meus pais, Luis Artur e Jaqueline, por todo o apoio dado durante essa caminhada. A companhia deles foi muito importante para minha evolução durante esse processo.

Aos meus colegas do LOPE, especialmente Rafael e Bruna, não só pelo suporte técnico, mas também pela companhia.

Aos profissionais do LabCEMM e PUCRS que auxiliaram no desenvolvimento da dissertação.

À CAPES pela bolsa pesquisa.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	3
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE QUADROS	11
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE SÍMBOLOS.....	13
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivos Específicos	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1. CÂNCER DE CÓLON	21
3.1.1. Curcumina.....	22
3.1.2. Quitosana.....	25
3.2. IMREGNAÇÃO SUPERCRÍTICA.....	27
3.2.1. Equilíbrio Termodinâmico	29
3.2.2. Influência das Variáveis do Processo	31
3.2.3. Métodos Analíticos para a Quantificação da Curcumina Impregnada em Polímeros	32
3.3. MODELOS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1. Materiais.....	35
4.2. Metodologia da Impregnação e Fluxograma.....	36
4.2.1. Planejamento experimental.....	37
4.2.2. Análise Estatística.....	38
4.3. Quantificação da Impregnação	38
4.4. Microscopia Eletrônica de Varredura das Partículas de Quitosana	39
4.5. FTIR	39
4.6. Ensaio de Liberação da CUR.....	39
4.6.1. Modelagem Matemática da Liberação	39

5. RESULTADOS	41
5.1. Impregnação Supercrítica	41
5.2. Microscopia das micropartículas.....	42
5.3. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier.....	44
5.4. Curva de Liberação de Curcumina	46
6. CONCLUSÃO.....	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
ANEXOS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
APÊNDICES	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Estrutura química da CUR.	23
Figura 3.2 – Estrutura química da QUIT.....	25
Figura 4.1 – Fluxograma de blocos das etapas constituintes da metodologia.	35
Figura 4.2 – Fluxograma do equipamento da célula de impregnação supercrítica. Legenda: 1 – cilindro de CO ₂ ; 2 – válvula de bloqueio; 3 – bomba seringa; 4 – célula de impregnação com sistema de aquecimento; 5 – válvula micrométrica com sistema de aquecimento.	36
Figura 5.1 – MEV da QUIT antes da impregnação.....	43
Figura 5.2 – Imagens comparativas entre QUIT impregnada usando 200 bar de pressão e 70% de etanol como cossolvente e QUIT não impregnada...	44
Figura 5.3 – Espectro de transmitância do infravermelho de amostras de QUIT, CUR e de QUIT impregnada com CUR na condição de 200 bar de pressão e 70% de cossolvente.	45
Figura 5.4 – Curvas de liberação de CUR <i>in vitro</i> : dados experimentais e teóricos..	48

LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1 - Modelos de liberação de fármacos para MPQUIT (equação e descrição).	33
Quadro 5.1 - Parâmetros e R^2 obtidos a partir dos experimentos de liberação da CUR para os modelos Ordem Zero, Primeira Ordem, Higuchi e Korsmeyer- Peppas.	47

LISTA DE TABELAS

- Tabela 4.1 – Condições investigadas no planejamento experimental da impregnação de CUR em QUIT, indicando a faixa de pressão em bar e o percentual molar de etanol em relação ao CO₂. 37
- Tabela 5.1 – Eficiência de impregnação de curcumina em quitosana em diferentes pressões (100 - 200 bar) e percentuais de etanol (50% - 70%) à 55 °C com taxa de despressurização de 10 bar/min. Letras iguais (a e b) indicam que não há diferença significativa considerando um intervalo de confiança de 95%. 41
- Tabela 5.2 – Dados experimentais da liberação de CUR *in vitro* a partir de amostras MPQUIT impregnadas com CUR a 200 bar, usando 70% de ET como cossolvente, numa solução de PBS (pH 7,4) à 37 °C e agitação constante. 46

LISTA DE SÍMBOLOS

CC	Câncer de cólon	-
CUR	Curcumina	-
CO ₂	Dióxido de carbono	-
ET	Etanol	-
FSC	Fluido supercrítico	-
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier	-
IAFSC	Impregnação assistida por fluido supercrítico	-
MET	metanol	-
MEV	Microscopia eletrônica de varredura	-
MP	Micropartículas	-
MPQUIT	Micropartículas de quitosana	-
QUIT	quitosana	-

RESUMO

A curcumina, um polifenol extraído da cúrcuma, é promissora no ramo da medicina por apresentar diversas propriedades terapêuticas. Essas características fazem com que ela seja usada no tratamento de diversas enfermidades como artrite, síndrome metabólica, doença do fígado, obesidade, doenças neurodegenerativas e, acima de tudo, vários tipos de câncer. O câncer de cólon é uma doença com ocorrência relativamente alta, sendo o segundo tipo mais letal. Devido às complicações geradas pela quimioterapia, que é o tratamento mais convencional, novos produtos naturais são estudados como drogas alternativas por apresentarem menos efeitos colaterais. A curcumina se mostra uma alternativa interessante nesse caso, no entanto, ela tem como desvantagem a baixa estabilidade quando ingerida, não conseguindo chegar até o cólon sem ser degradada. Incorporá-la em polímeros biodegradáveis e biocompatíveis é uma estratégia frequentemente usada para contornar esse problema e fazer com que ela chegue até o local desejado preservada. A quitosana é um exemplo de polímero que atende essas características e pode ser usada como matriz para suportar a curcumina e transportá-la pelo trato digestivo. A maneira escolhida para incorporar a curcumina na quitosana foi a impregnação supercrítica, que é um método derivado das tecnologias que utilizam fluido supercrítico. O objetivo do trabalho foi impregnar as partículas de quitosana com curcumina através do uso de dióxido de carbono expandido em etanol e avaliar a liberação dessa substância, fazendo a modelagem matemática desse fenômeno. A caracterização das partículas antes e após a impregnação foi realizada usando as análises de microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier. Na pressão de 200 bar se obteve o maior percentual e quantidade de curcumina impregnada (15,8% e 3,16 mg) nas partículas e não houve diferença significativa entre os diferentes percentuais de etanol utilizados. O modelo de Primeira Ordem foi o que melhor descreveu a liberação de curcumina em meio fisiológico simulado de PBS (pH 7,4).

Palavras-chave: câncer de cólon; liberação de drogas; CO₂; modelagem matemática

ABSTRACT

Curcumin, a polyphenol extracted from turmeric, has many therapeutic properties. Those benefits make this compound a promising alternative in medicine that can be used in the treatment of diseases such as arthritis, metabolic syndrome, liver disease, obesity, neurodegenerative illness and multiple types of cancer. Colon cancer is high occurrence disease and it's the second most lethal type of cancer. As chemotherapy has too many side effects, new natural products are widely researched as alternative drugs to treat all kinds of cancer. Curcumin is being researched as a replacement for the traditional chemotherapy drugs, however, it's instability when ingested makes it unable to reach the colon with treatment potential. Incorporating the compound in a biopolymer is a common strategy to by-pass this problem and allow the drug to reach the desired location. Chitosan is an example of biopolymer which suits this characteristics and can be used to transport the curcumin through the digestive tract. Supercritical impregnation was the technique chosen to incorporate the curcumin into the chitosan, which is a method that utilizes a supercritical fluid technology to achieve this objective. The goal of this work was to impregnate the chitosan particles with curcumin using carbon dioxide expanded in ethanol and evaluate its delivery capacity as well as making the mathematical modeling of the process. SEM and FTIR were used to characterize the particles before and after the impregnation. The pressure of 200 bar resulted in highest percent and amount of curcumin impregnated (15,8% and 3,16 mg) in the particles and there was no significant difference between the quantities of ethanol evaluated. The first order model was the one that best described the curcumin liberation in PBS (pH 7,4).

Keywords: colon cancer; drug delivery; CO₂; mathematical modeling

1. INTRODUÇÃO

A curcumina (CUR) é um composto que possui diversas aplicações, podendo ser usada no tratamento de diabetes, doença inflamatória de Bowel, pancreatite, artrite, doença metabólica e vários tipos de câncer (BHARAT *et al.*, 2007). Apesar de ser um fármaco com aplicações promissoras, ela apresenta uma desvantagem: baixa estabilidade. Essa substância degrada rapidamente quando é metabolizada pelo corpo e, no caso de uma terapia que entrega a CUR por via oral, ainda enfrenta o meio do trato gástrico superior, que oxida facilmente polifenóis (TANG; FANG; NG, 2020).

Um dos tipos de câncer com mais ocorrência é o de cólon, sendo o quarto em incidência global (6,1%) e o segundo em mortalidade (5,8%) (JIA *et al.*, 2021). A quimioterapia é o principal tratamento usado contra essa doença, mas, apesar da sua eficácia e os avanços que teve ao longo dos anos, ainda apresenta efeitos colaterais que impactam negativamente na qualidade de vida do paciente. Por essa razão, a busca por novos tratamentos que não apresentam esses efeitos é um assunto de interesse (DENG *et al.*, 2019).

Produtos naturais são uma alternativa frequentemente explorada no tratamento de doenças, pois possuem diversas atividades farmacológicas e poucos efeitos colaterais (DENG *et al.*, 2019). Os polifenóis são um exemplo de classe de compostos químicos encontrados em vários tipos de plantas que proporcionam benefícios para a saúde do cólon através de suas propriedades antioxidante, anti-inflamatória e anticarcinogênica. Dentre esse grupo de substâncias, a CUR possui efeitos no combate ao câncer de cólon (CC) e vem sendo estudada como alternativa para ser usada no seu tratamento (TANG; FANG; NG, 2020).

Devido à baixa estabilidade da CUR, é necessário achar um meio de protegê-la e liberá-la apenas na região de interesse para que ela seja eficaz contra este tipo de câncer. Uma solução de fácil aplicação sugerida pela literatura é utilizar polímeros feitos de fibras alimentares, pois eles resistem ao meio do trato gástrico superior e só

são degradadas ao chegarem no cólon, sendo uma boa alternativa para transportar e liberar o composto. A quitosana (QUIT) é uma fibra alimentar usada na confecção de biopolímeros frequentemente usada em estudos da área médica por ser biocompatível e biodegradável, podendo ser usada como meio de transporte e liberação da CUR no cólon. Esse polímero ainda apresenta efeitos terapêuticos contra o CC (TANG; FANG; NG, 2020) e, na forma de micropartículas (MP), adere melhor às paredes do intestino, beneficiando o tratamento (DENG *et al.*, 2019).

A partir das informações apresentadas, micropartículas de quitosana (MPQUIT) contendo CUR podem se tornar um tratamento alternativo para o CC. Estudos anteriores produziram essas partículas através de técnicas como polimerização por emulsão (JYOTI *et al.*, 2016, 2017), gelatinização iônica, polimerização eletrolítica (AKOLADE *et al.*, 2018) e conjugação química (SARANYA *et al.*, 2018). Todavia, nesse trabalho, será proposto um novo método, que consiste em incorporar a CUR em MPQUIT através de impregnação assistida por fluido supercrítico (IAFSC).

As tecnologias derivadas de fluidos supercríticos utilizam, geralmente, o dióxido de carbono (CO₂) como solvente, pois ele possui um ponto crítico viável em termos operacionais (31,06 °C e 73,8 bar) e o seu custo é relativamente baixo. Outra vantagem é que, do ponto de vista ambiental, ele é considerado um solvente limpo (CEJUDO BASTANTE *et al.*, 2019), o que é importante quando se trabalha com produtos naturais (como a CUR) porque preserva o caráter ambientalmente amigável do processo.

A impregnação supercrítica é um exemplo das diversas técnicas que surgiram a partir do uso de fluidos supercríticos e é utilizada para incorporar compostos ativos em matrizes sólidas a fim de proporcionar alguma característica benéfica ao material. Do ponto de vista teórico, ela é superior a outros processos de impregnação devido às características próprias de um fluido supercrítico (FSC) como alta difusividade e baixa viscosidade, que favorecem a transferência de massa (CEJUDO BASTANTE *et al.*, 2019). Além disso, quando aplicada a polímeros, pode promover um efeito de plasticização, que dá mobilidade às cadeias poliméricas e aumenta a porosidade da matriz, favorecendo ainda mais a difusão (KIKIC; VECCHIONE, 2003). Exemplos de aplicação desse método são diversos, abrangendo diferentes tipos de indústrias, como incorporar compostos ativos em madeira, antioxidantes em nozes e auxiliar no curtimento do couro (WEIDNER, 2018). Além disso, há estudos que também

utilizaram esse método para a incorporação de fármacos em QUIT, como drogas oftálmicas (BRAGA *et al.*, 2008) e dexametasona (DUARTE; MANO; REIS, 2009).

Em suma, o objetivo do trabalho será preparar micropartículas de quitosana impregnadas com curcumina através da impregnação assistida por fluido supercrítico visando uma alternativa para o tratamento do câncer de cólon. A realização dessa tarefa será alcançada em duas etapas: definição da melhor condição de impregnação e avaliação das propriedades do material.

Primeiro, foi feito um planejamento experimental que avaliou três condições de pressão e três misturas de CO₂ e etanol. Utilizou-se de um planejamento fatorial 2³, identificando a combinação que resulta na maior quantidade de CUR impregnada. A segunda etapa consistiu na avaliação das alterações nas propriedades do material como sua morfologia e interações química por MEV e FTIR, respectivamente, e foi realizada a modelagem matemática da liberação de CUR meio fisiológico simulado de PBS (pH 7,4).

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do trabalho é produzir partículas que tenham efeitos terapêuticos contra o câncer de cólon através da impregnação supercrítica de curcumina em micropartículas de quitosana, além de determinar a liberação deste composto em meio teórico que representa a região do cólon.

2.1. Objetivos Específicos

→ Avaliar as melhores condições de processo (pressão e percentual molar do cossolvente etanol) para aumentar a quantidade de curcumina impregnada.

→ Impregnar curcumina em micropartículas de quitosana usando a condição ótima de processo determinada a partir do planejamento experimental.

→ Comparar a morfologia e a estrutura química das partículas de quitosana antes e depois da impregnação.

→ Estudar o comportamento de liberação da curcumina a partir da matriz de quitosana por meio de modelagem matemática.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. CÂNCER DE CÓLON

O CC é uma das mais comuns e agressivas malignidades humanas, sendo o quarto tipo de câncer mais frequente (6,1%) e o segundo mais mortal (5,8%) (JIA *et al.*, 2021). Mesmo com todos os avanços em terapias para combater essa doença, o índice de sobrevivência ao longo de cinco anos é de apenas 30% nos pacientes afetados por essa enfermidade. Esse baixo percentual é produto, principalmente, da recorrência e metástase (WANG *et al.*, 2021).

Identificar a doença em estágios iniciais é crucial para aumentar a chance de sobrevivência, porém, devido à natureza dos sintomas, sua detecção é mais comum apenas quando já está mais avançada (SALMI; RUSTAM, 2019). No início, os indivíduos acometidos notam apenas desconforto abdominal, constipação e episódios frequentes de diarreia, confundindo a enfermidade com simples problemas intestinais. O câncer fica mais evidente apenas quando provoca os sintomas mais característicos como sangue nas fezes ou mudança de coloração nelas e perda de peso sem explicação aparente (ALSAYED *et al.*, 2019).

A maioria dos casos de CC começa com a formação de pequenos coágulos celulares chamados de pólipos de adenoma, que, inicialmente, não são cancerígenos. Os pólipos se espalham de maneira descontrolada com o passar do tempo, transformando-se em adenocarcinomas, que são células cancerígenas capazes de excretar substâncias (LABIANCA *et al.*, 2010; SALMI; RUSTAM, 2019).

Há diversos estágios que determinam o quão severo é desenvolvimento da doença no indivíduo. No primeiro, o câncer ainda não se espalhou porque está bloqueado pela parede do intestino e cresce apenas no intestino grosso. No segundo, as células cancerígenas se espalham por todo o intestino grosso e conseguem penetrar sua parede. No terceiro estágio, os linfonodos adjacentes são consumidos e, na quarta e última etapa de desenvolvimento, outros órgãos são atacados, sendo essa a fase mais severa (SALMI; RUSTAM, 2019).

Fatores genéticos são a principal causa do CC, logo, histórico familiar é o principal sinal de alerta na sua prevenção (LABIANCA *et al.*, 2010; SALMI; RUSTAM, 2019). Além disso, sua ocorrência tem maior incidência na faixa etária de 40 a 50 anos (SALMI; RUSTAM, 2019) e outras condições que contribuem para seu surgimento são

obesidade, sedentarismo, dietas ricas em gorduras, em carnes e deficientes em fibras e consumo de tabaco e álcool (ALSAYED *et al.*, 2019).

O aumento da industrialização é um fator que propicia maior incidência de casos da doença (LABIANCA *et al.*, 2010), pois tem como uma de suas consequências a tendência das pessoas optarem por hábitos menos saudáveis. Por esse motivo, países desenvolvidos como Austrália, Nova Zelândia, EUA, Canadá e a região da Europa Ocidental apresentam mais casos e uma maior mortalidade de CC do que países subdesenvolvidos (ALSAYED *et al.*, 2019).

O tratamento usado contra o CC é a quimioterapia, mas, apesar de ser a alternativa mais eficiente, os compostos usados nesse tratamento causam efeitos colaterais que impactam negativamente na qualidade de vida do paciente tais como náusea, vômito, ulceração, diarreia, neutropenia e neurotoxicidade (DENG *et al.*, 2019).

Alguns compostos derivados de produtos naturais aparecem como opções inovadoras no tratamento de câncer, pois possuem efeitos terapêuticos e poucos colaterais comparado às terapias tradicionais. Um tipo de substâncias com essas propriedades são os polifenóis, que são encontrados em vários tipos de plantas e provém efeitos antioxidante, anti-inflamatório e anticarcinogênico para auxiliar na saúde do cólon (DENG *et al.*, 2019; TANG; FANG; NG, 2020).

A CUR é um polifenol que possui efeitos no combate ao CC e não apresenta efeitos tóxicos ao organismo. Por esses motivos, ela vem sendo estudada como alternativa para ser usada no seu tratamento (DENG *et al.*, 2019; FAN *et al.*, 2020; TANG; FANG; NG, 2020). Por ser um produto de origem natural que tem potencial atividade anticancerígena, justifica-se a escolha do mesmo como foco desse trabalho.

3.1.1. Curcumina

A cúrcuma (*Curcuma longa* L.) é uma planta conhecida por seus usos medicinais, que foram empregados desde a cultura Védica na Índia há 4000 anos, onde era usada como um tempero culinário. Além de ter um significado religioso (HEWLINGS; KALMAN, 2017; SALEHI *et al.*, 2019). Esse vegetal é a principal fonte da CUR, um polifenol, que foi isolado pela primeira vez em 1815 por dois cientistas, Vogel e Pelletier, do Laboratório do Colégio de Harvard. Desde então, o interesse científico pela CUR aumentou gradativamente conforme se descobriam seus benefícios à saúde (GIORDANO; TOMMONARO, 2019).

A CUR possui a aparência de um pó laranja amarelado de cristais e tem sua estrutura química exibida na Figura 3.1. Ela é conhecida também como diferuloilmetano e o seu código IUPAC é (1E,6E)-1,7-bis(4-hidroxi-3-metóxi-fenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona, tendo a fórmula química de $C_{21}H_{20}O_6$. O seu peso molecular é 368,38, o ponto de fusão está entre 179 e 182 °C e a gravidade específica é 0,9348 a 15 °C. Quanto a sua solubilidade, o composto é insolúvel em água e éter (metílico e etílico) e solúvel em álcool etílico ou metílico, ácido acético e acetona (GIORDANO; TOMMONARO, 2019; SALEHI *et al.*, 2019).

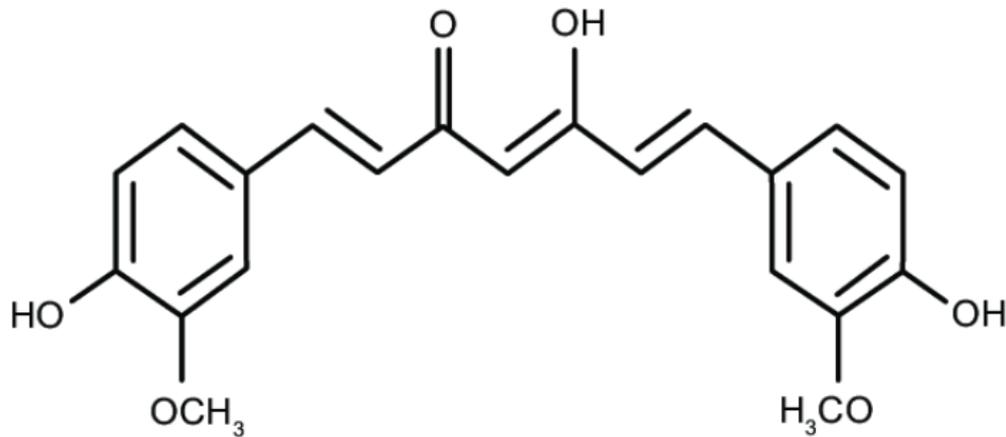


Figura 3.1 – Estrutura química da CUR.

A nível celular, a CUR mostrou ser capaz de interagir com várias moléculas sinalizadoras, o que é o principal mecanismo responsável por seus efeitos benéficos para a saúde (HEWLINGS; KALMAN, 2017; SALEHI *et al.*, 2019). Seus efeitos terapêuticos foram demonstrados contra diversas doenças crônicas como inflamação, artrite, síndrome metabólica, doença do fígado, obesidade, doenças neurodegenerativas e, acima de tudo, vários tipos de câncer (GIORDANO; TOMMONARO, 2019). Todos esses efeitos positivos do uso da CUR estão relacionados, principalmente, a seus efeitos antioxidante e anti-inflamatório (HEWLINGS; KALMAN, 2017).

O principal mecanismo que promove a atividade anticancerígena da CUR se resume a indução de apoptose e a inibição da proliferação e invasão de tumores, que se deve a supressão de múltiplas rotas de sinalização celulares (GIORDANO; TOMMONARO, 2019; TOMEH; HADIANAMREI; ZHAO, 2019). Muitos estudos

demonstraram a atividade antitumoral da CUR contra câncer de mama, câncer de pulmão, câncer de próstata, tumor cerebral e CC, demonstrando sua capacidade de agir em diferentes linhagens celulares (GIORDANO; TOMMONARO, 2019; TANG; FANG; NG, 2020; TOMEH; HADIANAMREI; ZHAO, 2019). Havia 12.595 artigos publicados entre 1924 e 2018 que relacionavam CUR com tratamento de câncer, sendo que entre 37% desses estudos foram publicados entre 1983 e 2018 (GIORDANO; TOMMONARO, 2019).

A literatura mostra que a CUR tem potencial para ser uma droga anticâncer usada sozinha ou em conjunto com outros fármacos. Há indícios que ela possa ser capaz de prevenir a proliferação do CC bloqueando o ciclo celular e acelerando a apoptose (GIORDANO; TOMMONARO, 2019). Testes de apoptose e inibição de proliferação celular *in vitro* identificaram que quantidades entre 2,5 e 160 μM são capazes de produzir esses efeitos (SU *et al.*, 2018; WATSON *et al.*, 2010). Além disso, por ser um polifenol, ela proporciona inúmeros efeitos benéficos para a saúde do cólon e previne outras enfermidades que possam atingir esse órgão como a doença inflamatória de Bowel (TANG; FANG; NG, 2020).

Apesar de todas as vantagens mencionadas acima, a aplicação da CUR é limitada devido a sua baixa solubilidade em água, baixa biodisponibilidade e instabilidade química (KARRI *et al.*, 2016; TANG; FANG; NG, 2020; TOMEH; HADIANAMREI; ZHAO, 2019). Como é hidrofóbica, sua molécula tende a penetrar na membrana celular e se ligar às cadeias de lipídios por ligação de hidrogênio e interações hidrofóbicas, o que é a causa da sua baixa disponibilidade no citoplasma (SALEHI *et al.*, 2019; TOMEH; HADIANAMREI; ZHAO, 2019).

Os problemas citados no parágrafo anterior podem ser solucionados de duas maneiras. A primeira é modificar sua estrutura química para aumentar sua toxicidade seletiva em relação às células cancerígenas, sua biodisponibilidade e sua estabilidade química. A segunda alternativa, que será abordada nesse trabalho, é incorporar a CUR em uma matriz que sirva como veículo de transporte, que irá protegê-la da oxidação até chegar ao local onde deverá ser liberada (TOMEH; HADIANAMREI; ZHAO, 2019).

No contexto do tratamento de câncer cólon, matrizes que podem ser utilizadas como veículo de transporte da CUR são polímeros formados a partir de fibras alimentares. Essas fibras são tipos de carboidratos que são metabolizados apenas quando chegam no cólon, ou seja, liberam a CUR apenas na região onde os tumores

se encontram. A QUIT é um desses polímeros baseados em fibras alimentares e, por ser biocompatível e biodegradável, é utilizada em inúmeras aplicações médicas (TANG; FANG; NG, 2020). Existem estudos que já a usaram em conjunto com a CUR visando o tratamento de CC (CHUAH *et al.*, 2013; JYOTI *et al.*, 2016), mostrando que esse polímero é uma boa opção para transportar o composto ativo. Pelas razões apresentadas, o trabalho irá utilizá-la como veículo de transporte da CUR.

3.1.2. Quitosana

Há 160 anos, o fisiologista francês Charles Rouget aplicou calor a quitina em meio alcalino e descobriu que um material insolúvel se formava a partir desse processo. Apenas 35 depois, em 1894, o fisiologista e químico alemão Felix Hoppe Seyler criou o termo QUIT para esse composto e, 56 anos mais tarde, sua estrutura química, exibida na Figura 3.2, foi definida (MORAMKAR; BHATT, 2021).

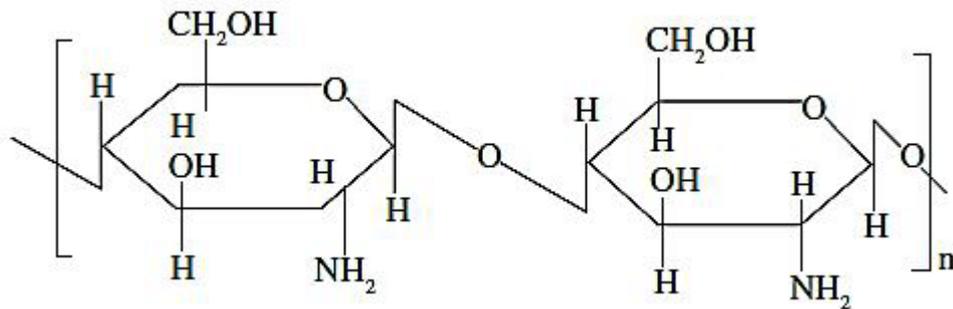


Figura 3.2 – Estrutura química da QUIT.

O monômero da QUIT, quitina, é o segundo polissacarídeo mais abundante depois da celulose, o que contribui para o seu baixo custo. Ela tem origem natural e é encontrada principalmente em micróbios como fungos, microalgas, leveduras, insetos (abelhas e baratas) e em organismos aquáticos tal qual moluscos, camarões e lagostas (MORAMKAR; BHATT, 2021).

A QUIT é um copolímero formado de glucosamina (2-amino-2-deoxi-β-d-glucopiranosose) e N-acetilglucosamina (2-acetamina-2-deoxi-β-d-glucopiranosose). O peso molecular desse polímero varia de 300 a 1000 kDa e o seu grau desacetilenização pode estar entre 30 e 90%. Uma vantagem do ponto de vista comercial, é que ela solúvel em meio aquoso ácido, tornando o seu processamento

mais prático (CHUAH *et al.*, 2013; MORAMKAR; BHATT, 2021; TANG; FANG; NG, 2020).

A biocompatibilidade da QUIT garante que ela não cause reações adversas ao corpo humano e, além disso, ela é biodegradável e seus subprodutos são de fácil remoção e metabolizáveis pelas bactérias do cólon. Dependendo da sua derivação e protocolo de síntese, ela exibe atividade antimicrobiana em pH ácido devido ao fato que seus grupos amino existem em forma catiônica. Essas propriedades a tornam um material promissor para aplicações médicas (CHUAH *et al.*, 2013; MORAMKAR; BHATT, 2021).

Na área do desenvolvimento de transportadores de drogas para liberação localizada, partículas de QUIT se mostram funcionais contra tipos de câncer como de bexiga, pele, pulmão, pâncreas e de cólon, o enfoque do trabalho (JYOTI *et al.*, 2017; MORAMKAR; BHATT, 2021). A propriedade que torna esse polímero uma boa alternativa no tratamento dessas malignidades é sua mucoadesividade, que faz com que suas partículas fiquem aderidas aos tecidos e prolonguem o tempo de residência do fármaco, aumentando a eficiência do tratamento (SENTHIL KUMAR *et al.*, 2020). Isso se deve à propriedade polieletrólítica catiônica da QUIT, que oferece uma robusta interação eletrostática com a superfície negativamente carregada da mucosa (TANG; FANG; NG, 2020).

Em relação ao tratamento do CC, um tempo de contato prolongado é essencial quando é feita uma terapia com polifenóis como a CUR (TANG; FANG; NG, 2020). Como citado no parágrafo anterior, a mucoadesividade da QUIT atende a esse requisito e, além disso, Deng e colaboradores (2019) sugerem que, se o polímero estiver na forma de MP, a adesão aos tecidos é ainda melhor.

Sumarizando as informações apresentadas, MPQUIT são bons veículos de transporte para a CUR visando o tratamento de CC. Essas partículas foram produzidas usando técnicas com polimerização por emulsão (JYOTI *et al.*, 2016, 2017), gelatinização iônica, polimerização eletrolítica (AKOLADE *et al.*, 2018) e conjugação química (SARANYA *et al.*, 2018). Todavia, nesse trabalho, será usado um método alternativo de preparação, que consiste em incorporar a CUR em MPQUIT através de IAFSC.

3.2. IMREGNAÇÃO SUPERCRÍTICA

Um grupo de tecnologias baseadas no uso de fluidos supercríticos, em especial CO₂ supercrítico tem sido estudado como uma alternativa para incorporar ou encapsular fármacos em partículas transportadoras. Esse grupo de técnicas inclui a rápida expansão de soluções supercríticas (RESS), formação de partículas de soluções saturadas de gases (PGSS), precipitação por antissolvente supercrítico (SAS), extração supercrítica de emulsões (SFEE) e IAFSC (GANANÍ *et al.*, 2020).

O CO₂ supercrítico é quase sempre o solvente usado nestes processos por uma série de motivos. O principal deles é que seu ponto supercrítico é facilmente atingível do ponto de vista operacional, sendo 73,8 bar e 31 °C. Além disso, ele é considerado um solvente verde por não apresentar impacto ambiental significativo, o que o torna ainda mais atrativo, e, devido à natureza do processo e sua formação gasosa em temperatura e pressão ambiente, pode ser facilmente separado ao final do processo (KRIVOKAPIĆ *et al.*, 2021).

O grande diferencial dos fluidos supercríticos em relação a outros solventes são suas propriedades únicas, que são uma mescla características de líquidos e gases, como densidade semelhante a dos líquidos, alto poder de solvatação, baixa viscosidade e coeficiente de difusão e transferência de massa aumentados. Essas vantagens os tornam candidatos para substituir solventes convencionais em várias aplicações da indústria (AMERI; SODEIFIAN; SAJADIAN, 2020).

No contexto da incorporação de fármacos em polímeros, dentre os processos que empregam o CO₂ supercrítico, a IAFSC se destaca devido a sua praticidade na aplicação. Como nessa técnica há duas etapas independentes, a síntese da partícula e a impregnação em si, é possível manipular cada uma delas separadamente. O resultado desse controle permite a formação de um veículo de transporte de droga com a morfologia e quantidade de fármaco impregnado desejados (AMERI; SODEIFIAN; SAJADIAN, 2020).

Em relação aos métodos mais tradicionais, as técnicas mais usadas para incorporar fármacos em matrizes poliméricas envolvem misturar soluções do polímero e da droga ou submergir a matriz polimérica em uma solução contendo o composto a ser impregnado. Apesar dessas técnicas serem relativamente mais simples, elas não permitem um controle tão preciso quanto o do processo em questão das

características da morfologia e da quantidade impregnada (AMERI; SODEIFIAN; SAJADIAN, 2020; KRIVOKAPIĆ *et al.*, 2021).

O mecanismo da IAFSC tem três etapas: solubilização do composto ativo pelo solvente, dilatação da matriz polimérica na fase supercrítica e difusão do composto ativo para o interior do polímero. Ao final do processo, a despressurização possibilita a retirada do solvente da matriz, deixando o fármaco impregnado nela. O CO₂ supercrítico é um bom solvente para impregnar substâncias apolares, mas caso o composto de interesse seja polar, cossolventes polares como ET, acetona ou metanol podem ser utilizados para aumentar a eficiência do processo (CEJUDO BASTANTE *et al.*, 2019; GRACIA *et al.*, 2018).

Existem ainda diferentes metodologias para serem usadas na IAFSC. A primeira é em modo estático (ou batelada), que consiste na pressurização de uma célula de impregnação que contém o polímero e a substância a ser impregnada, mantendo contato com o solvente sob agitação. A segunda é o modo dinâmico (ou semicontínuo) cuja única diferença em relação ao estático é que há a passagem de um fluxo de CO₂ pela célula. O primeiro modo de operação é o mais utilizado por ser o mais simples, além disso, para que a impregnação dinâmica seja eficiente, é necessário fazer um estudo de qual seria a vazão que proporcionaria o melhor tempo de contato entre solvente e polímero (AMERI; SODEIFIAN; SAJADIAN, 2020; CEJUDO BASTANTE *et al.*, 2019; DÍEZ-MUNICIO *et al.*, 2011).

Os fenômenos que ocorrem durante o processo da IAFSC também são um ponto importante quando a técnica é aplicada aos polímeros. No momento em que o FSC penetra na matriz, ocorre a dilatação e a plasticização dela, pois o solvente dá mobilidade às cadeias poliméricas. Isso faz com que a porosidade do material aumente, facilitando a difusão do composto ativo, e haja também a formação de poros, criando sítios para suportar as moléculas do fármaco e melhorar sua estabilidade na matriz (GANANÑ *et al.*, 2020; OPARIN *et al.*, 2021).

Apesar da plasticização e a dilatação serem benéficas para o processo, é necessário ter um conhecimento prévio sobre possíveis modificações que elas possam impor ao material. Se uma temperatura ou pressão muito alta for utilizada, a plasticização pode modificar as propriedades mecânicas do polímero, o que, dependendo de sua aplicação, pode ser um problema. Em geral, quando os polímeros são usados como veículo de transporte de fármacos, suas propriedades mecânicas não são tão relevantes, mas, se a impregnação for feita em um suporte de uma

prótese, características que devem estar de acordo com normas técnicas podem ser alteradas e inviabilizar o material. Normalmente, a temperatura de transição vítrea (T_g) é o parâmetro avaliado para verificar o impacto de possíveis alterações (CEJUDO BASTANTE *et al.*, 2019; OPARIN *et al.*, 2021).

Além das alterações físicas que ocorrem na matriz polimérica, a inserção do composto ativo nela pode acarretar mudanças na sua estrutura química. Quando o fármaco é depositado no material, grupos funcionais como hidroxila, amina ou carbonila tanto dos monômeros quanto da substância impregnada podem formar fortes interações intermoleculares. A ocorrência desse fenômeno é, geralmente, positiva, pois garante mais estabilidade do fármaco na matriz, mas também pode impactar nas propriedades mecânicas do material. A presença de uma substância externa na rede de cadeias poliméricas altera a microestrutura e, conseqüentemente, as propriedades mecânicas do material. As implicações disso são as mesmas citadas no parágrafo anterior, podendo ser problemáticas dependendo da aplicação (CEJUDO BASTANTE *et al.*, 2019).

Em relação ao objetivo do trabalho, a IAFSC já foi usada para incorporar CUR em matrizes poliméricas. Um estudo feito por Gracia e colaboradores (2018) buscou impregnar o polifenol em filmes de PLGA. A técnica foi feita usando três cossolventes para melhorar a solubilidade da CUR, que foram acetona, ET e metanol, sendo que a pressão utilizada era 150 bar e a temperatura, 45 °C. O melhor resultado foi obtido usando acetona como cossolvente, atingindo uma eficiência de 84,3%, seguido de metanol (66,5%) e ET (65,8%). A impregnação feita com os três cossolventes superou a eficiência de encapsulamento da CUR em PLGA por SAS (45%) e o método tradicional, que consiste em submergir o polímero na solução do composto com o solvente, dobrando a eficiência em relação a esse método.

3.2.1. Equilíbrio Termodinâmico

O conhecimento da solubilidade de um sólido em fluidos supercríticos é essencial para os processos que utilizam esses solventes. Essa informação, em conjunto com dados experimentais, permite a modelagem matemática do processo, que é o primeiro passo para sua otimização e *scale up* para escala industrial. Além disso, também possibilita uma análise qualitativa para estimar sua viabilidade (SHI *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2020).

Alguns estudos fazem a modelagem de solutos em meio supercrítico usando equações de estado tradicionais, mas, devido dinâmica da interação entre a substância ativa e o solvente, uma abordagem mais simples pode ser utilizada. Como o FSC é insolúvel na fase sólida, o equilíbrio termodinâmico do sistema se assemelha a dissolução de um sólido em um líquido. A partir dessa hipótese, em 1982, o modelo de Chrastil foi criado (Equação 1), que era capaz de prever a solubilidade (S) de um soluto a partir da densidade do FSC (ρ), temperatura (T) e parâmetros ajustáveis (k , α e β). Esse modelo é bastante usado na literatura pela sua simplicidade, tendo aderência a dados experimentais, assim como equações de estado tradicionais (ZHAN *et al.*, 2017).

$$\ln S = k \ln \rho + \frac{\alpha}{T} + \beta \quad (1)$$

Como o uso de cossolvente em processos que envolvem fluidos supercríticos é bem frequente, uma carência que o modelo de Chrastil possui é justamente não levar em conta a presença de um solvente orgânico secundário. Por esse motivo, uma modificação do modelo de Chrastil (Equação 1) feita por González (2001) foi criada para descrever a solubilidade de sólidos em meio supercrítico de CO₂ com a presença de um cossolvente. Ela também possibilita a predição da solubilidade em casos que o cossolvente está em grande quantidade de tal maneira que o solvente não é mais classificado como FSC, mas sim como gases expandidos em líquidos. No modelo abaixo, y_2 e y_3 se referem às frações molares do soluto e do cossolvente, d é a densidade da mistura, T é a temperatura e k , γ , C_1 e C_2 são parâmetros ajustáveis. (CUNICO; TURNER, 2017)

$$\ln y_2 = k \ln d + \gamma \ln y_3 + \frac{C_1}{T} + C_2 \quad (2)$$

Consultando a literatura, é possível encontrar dados de solubilidade da CUR em CO₂ supercrítico (ZHAN *et al.*, 2017) e em CO₂ expandido em ET (CUNICO; ACOSTA; TURNER, 2017). A fração molar de saturação da CUR em CO₂ supercrítico é na ordem 10⁻¹⁰ enquanto, em CO₂ expandido em ET, ela atinge a magnitude de 10⁻³. Como uma alta solubilidade no solvente é essencial para o processo de impregnação supercrítica, é provável que realizar essa técnica em um meio composto

de CO₂ expandido em ET seja mais vantajoso. Esse motivo justifica a escolha de utilizar altas concentrações ET como co-solvente no processo.

3.2.2. Influência das Variáveis do Processo

Existem quatro variáveis que são frequentemente estudadas no processo de impregnação supercrítica. A influência da pressão, temperatura, taxa de despressurização e tempo são pontos bastante explorados na literatura, sendo que os três primeiros possuem diversas peculiaridades em cada caso (AMERI; SODEIFIAN; SAJADIAN, 2020).

A pressão tem uma influência dupla no processo de impregnação supercrítica. Primeiro, ela tem um efeito sobre a difusão do composto ativo na matriz polimérica, sendo que, quanto maior seu valor, menor a mobilidade das moléculas, o que acaba prejudicando a transferência de massa. Entretanto, ela também interfere diretamente na densidade do FSC, que modifica a solubilidade do composto ativo. Com isso, o aumento da pressão aumenta também a densidade do solvente e promove uma maior solubilidade, o que também favorece o processo de difusão por aumentar o gradiente de concentração entre o FSC e a matriz polimérica (DÍEZ-MUNICIO *et al.*, 2011; MÉNDEZ-SANTIAGO; TEJA, 1999). Por esses motivos, o único jeito de saber se valores maiores ou menores de pressão irão favorecer a impregnação é realizando experimentos.

O comportamento da temperatura é semelhante ao da pressão nesse contexto, pois também influencia a difusão e a solubilidade do composto ativo. A diferença é que o aumento da temperatura favorece a transferência de massa, enquanto, em relação à solubilidade do composto ativo, o resultado do seu incremento é incerto. Por um lado, o aumento da intensidade das interações intermoleculares aumentaria a solubilidade, porém, também diminui a densidade do FSC. Essa peculiaridade faz com que seu efeito sobre a solubilidade seja incerto, mas, em geral, sabe-se que em pressões relativamente baixas o aumento da temperatura diminui a solubilidade e, em pressões relativamente altas, a aumenta. O problema desse pressuposto está em determinar qual seria essa faixa de pressões, o que só pode ser feito a partir de experimentos que determinem a solubilidade do composto ativo no solvente (KIKIC; VECCHIONE, 2003). Como os dados de solubilidade da CUR em CO₂ expandido em ET já são conhecidos, é possível responder essa questão e concluir que o aumento

da temperatura é sempre benéfico à solubilidade (DÍEZ-MUNICIO *et al.*, 2011). Outro ponto importante é que estudos demonstram que a CUR sofre degradação térmica a partir de 60 °C (CUNICO, ACOSTA e TURNER, 2017), logo, essa é a temperatura limite do processo para se trabalhar com esse composto.

A taxa de despressurização interfere mais na morfologia da microestrutura da matriz polimérica do que na transferência de massa do processo. A literatura aponta que o uso de menores taxas de despressurização preservam a microestrutura do material, enquanto a rápida despressurização pode danificar a matriz e destruir partes da microestrutura, podendo liberar parte do composto já impregnado (YOKOZAKI *et al.*, 2015).

O aumento do tempo tem uma influência sempre positiva na impregnação. Quanto maior a duração do processo, maior será a quantidade do composto ativo impregnada até que seja atingido o valor de saturação da substância na matriz polimérica (MARIZZA *et al.*, 2016).

3.2.3. Métodos Analíticos para a Quantificação da Curcumina Impregnada em Polímeros

A quantidade de curcumina incorporada em matrizes poliméricas, em métodos como gelatinização iônica ou encapsulamento, pode ser quantificada analisando o residual desse composto que permaneceu na solução usado no preparo das partículas. Dessa forma, é possível saber quanto do fármaco foi adicionado ao material a partir daquilo que restou do processo comparado ao que foi usado inicialmente. Essa análise pode ser feita com um espectrofotômetro medindo a absorvância (AKOLADE *et al.*, 2018; FAHIMIRAD *et al.*, 2021; EL-MAADAWY; MOHAMED; HANNA, 2022).

Tratando-se de IAFSC, analisar a solução residual da impregnação não é interessante em vários casos, pois a solubilidade do composto ativo em alta pressão é maior do que aquela em condições ambientes, podendo ser uma solução supersaturada sem a presença do fluido supercrítico. Sendo assim, uma alternativa é realizar uma extração líquido-líquido da curcumina nas partículas impregnadas, usando um solvente diferente do utilizado no processo, como metanol, e fazer uma análise por espectrometria ou HPLC, semelhante ao que foi feito por Chuah (2013).

3.3. MODELOS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

O conhecimento da maneira como se comporta a taxa de liberação de fármacos a partir de matrizes transportadoras é essencial para sua aplicação. Dependendo da droga e do tratamento, uma taxa baixa e constante pode ser mais vantajosa, como é o caso quando a amenização de inflamações é visada. Por outro lado, uma taxa alta que esgota a substância ativa rapidamente pode ser a melhor solução tratando-se de impedir infecções locais após procedimentos cirúrgicos (JAROSZ *et al.*, 2016a).

A literatura indica que os modelos utilizados para descrever a liberação de fármacos a partir de MPQUIT são: Modelo de Ordem Zero, Primeira Ordem, Higuchi e Korsmeyer-Peppas (HE *et al.*, 2020; ZOU *et al.*, 2015). Abaixo, no Quadro 3.1, foi colocada a equação referente a cada modelo bem como uma breve explicação de sua aplicação.

Quadro 3.1 - Modelos de liberação de fármacos para MPQUIT (equação e descrição).

Modelo	Equação	Descrição
Ordem Zero	$\frac{M_t}{M_\infty} = kt$	Taxa de liberação constante e independente do tempo.
Primeira Ordem	$\ln\left(1 - \frac{M_t}{M_\infty}\right) = kt$	Liberação exponencial do fármaco.
Higuchi	$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^{1/2}$	Liberação de fármacos a partir de matrizes que não degradam ou expandem.
Korsmeyer-Peppas	$\ln\frac{M_t}{M_\infty} = n\ln t + \ln k$	Difusão, expansão e dissolução da matriz.

O modelo de Ordem Zero supõe uma taxa de liberação constante do fármaco. Esse comportamento é associado à degradação da matriz polimérica, sendo esse o fator que controla o processo (ABBASNEZHAD *et al.*, 2021; HUANBUTTA *et al.*, 2021).

A segunda equação do Quadro 3.1, modelo de Primeira Ordem, trata-se de um perfil exponencial, em que a dissolução e geometria da matriz também é levada em conta. O início do processo de liberação é semelhante ao da Ordem Zero, tendo uma rápida liberação da substância, mas a taxa decai com o tempo devido a mudança no gradiente de concentração no meio (ADEPU; KHANDELWAL, 2020).

O modelo de Higuchi tem como fundamento básico a liberação de fármacos em pele humana. Apesar de sua premissa inicial não tão abrangente, algumas suposições do seu modelo o tornam interessante para explicar alguns fenômenos. Sua equação considera que o meio onde o composto é liberado tem a concentração do princípio ativo constante e que a concentração do fármaco no polímero é muito maior que a sua solubilidade no meio. Além disso, supõe-se que há uma difusão estável ocorrendo e apenas em uma direção (ELMAS et al., 2020).

O quarto modelo apresentado no quadro 3.1, Korsmeyer-Peppas, baseia-se num mecanismo de difusão assim como o de Higuchi e permite uma avaliação do fenômeno a partir do valor de n . Se $n < 0,5$ o polímero for categorizado como um filme fino, há a presença de um mecanismo semi-Fickiano. Para n igual à 0,5, entende-se que a liberação do fármaco é controlada por difusão Fickiana. Quando $0,5 < n < 1$, o mecanismo segue um transporte anômalo (difusão e degradação) e n igual à 1 indica que o controle é pela degradação (ELMAS et al., 2020; ABBASNEZHAD et al., 2021).

A seleção do modelo que melhor representa o fenômeno da liberação pode ser feita a partir da análise matemática de dados de experimentos em que o polímero com o fármaco é imerso numa solução de PBS (pH 7,4) sob agitação à temperatura de 37 °C. Essas condições simulam o processo de liberação do composto ativo na região do intestino, cujo pH fica em torno de 7,5. A liberação da substância ao longo do tempo pode ser determinado a partir da absorvância de alíquotas coletadas em diferentes tempos, havendo uma curva de calibração previamente definida para o composto de interesse (KARRI et al., 2016; FAHIMIRAD et al., 2021; EL-MAADAWY; MOHAMED; HANNA, 2022).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia tem três etapas. Na primeira, a CUR foi incorporada às partículas de QUIT, seguindo um planejamento experimental ²³, considerando como variáveis a pressão do processo e a concentração de cossolvente etanol em relação à concentração de CO₂. O objetivo foi encontrar experimentalmente a condição que agrega a maior quantidade de CUR ao polímero. Na sequência, foram realizadas análises de MEV e FTIR das partículas antes e após o processo de impregnação, tendo como meta verificar a ocorrência de mudanças na morfologia ou na estrutura química do polímero. A terceira etapa consistiu na realização de experimentos de liberação da CUR em uma solução de PBS à temperatura de 37 °C, simulando as condições do corpo humano, seguido da modelagem matemática do processo de liberação, considerando os modelos apresentados no Quadro 3.1. As estruturas do Laboratório de Operações Unitárias e Laboratório de Microanálise e Microscopia foram utilizadas durante os experimentos.



Figura 4.1 – Fluxograma de blocos das etapas constituintes da metodologia.

4.1. Materiais

Os reagentes químicos utilizados nos experimentos foram QUIT de médio peso molecular (200-800 cP 1% m/m em ácido acético, Sigma-Aldrich), CUR (98% m/m, Ambeed), Metanol (Química Moderna, PA, 95%) e Etanol Abs (Merck, PA). O CO₂ usado nos experimentos foi fornecido pela Air Products (99,9% de pureza).

4.2. Metodologia da Impregnação

O procedimento de impregnação supercrítica foi realizado no Laboratório de Operações Unitárias da PUCRS em um equipamento cujo fluxograma é ilustrado na Figura 4.1. Em cada experimento, 100 mg de QUIT e 20 mg de CUR foram adicionados dentro da célula de impregnação (4), sendo que cada um dos compostos foi contido por suportes de metal com a intenção de evitar contato entre eles antes do processo iniciar. A razão mássica utilizada e separação do polímero e composto a ser impregnado seguiram o procedimento descrito por Gracia *et al* (2018). Depois, ET foi adicionado de acordo com a quantidade desejada de cossolvente junto com um bastão magnético para promover agitação do meio e, então, a escotilha do recipiente era fechada.

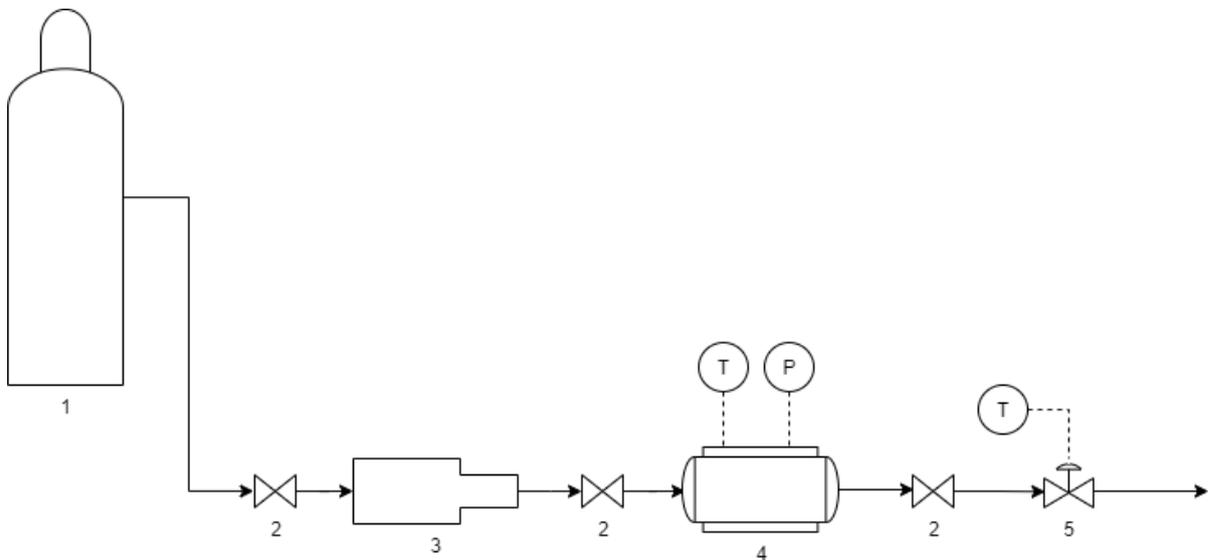


Figura 4.2 – Fluxograma do equipamento da célula de impregnação supercrítica. Legenda: 1 – cilindro de CO₂; 2 – válvula de bloqueio; 3 – bomba seringa; 4 – célula de impregnação com sistema de aquecimento; 5 – válvula micrométrica com sistema de aquecimento.

A temperatura da célula de impregnação (4) foi mantida constante em 55 °C a partir do controle feito pela própria resistência de aquecimento. Esse valor de temperatura não promove a degradação térmica da CUR e possui dados de solubilidade e densidade de mistura na literatura para auxiliar em futuros experimentos de modelagem do processo. Na sequência, a bomba seringa (3) era carregada com CO₂ do cilindro (1) para pressurizar a linha anterior à válvula de bloqueio (2) até a pressão do experimento. Quando a pressão atingia o valor requerido, a válvula de bloqueio foi aberta lentamente enquanto a bomba seringa estabilizava a pressão entre

a linha e a célula de impregnação até o valor do experimento. Assim, o processo de impregnação foi iniciado e mantido por uma hora e trinta minutos. Ao final de cada experimento, a célula foi despressurizada a uma taxa de 10 bar/min e a QUIT foi armazenada em um tubo falcon para ser analisada posteriormente.

4.2.1. Planejamento experimental

Um planejamento experimental fatorial 2^3 foi realizado para avaliar qual a condição de percentual de cossolvente e pressão que resultaria em um maior percentual de impregnação da CUR na QUIT. Os três níveis de percentual em base molar de cossolvente utilizados foram 50%, 60% e 70%, indicados na coluna ET % (percentual molar de etanol no solvente) na Tabela 4.1. Essas quantidades de etanol foram utilizadas porque estão dentro da faixa de equilíbrio conhecida na literatura (CUNICO, ACOSTA e TURNER, 2017). A massa de etanol colocada dentro da célula de impregnação em cada experimento foi calculada pela equação de estado Soave-Redlich-Kwong Preditiva em conjunto com o Software iiSE. Os níveis de pressão foram 100 bar, 150 bar e 200 bar, utilizados também porque há dados de equilíbrio para essa faixa de pressão (CUNICO, ACOSTA e TURNER, 2017). Todos os experimentos foram realizados à temperatura constante de 55 °C e taxa de despressurização de 10 bar/min. O tempo de processo foi de 1 hora e 30 minutos, sendo mais curto do que os experimentos feitos em outros estudos, apenas com a intenção de avaliar o comportamento inicial da impregnação.

Uma análise estatística ANOVA foi aplicado nos dados obtidos para verificar se a diferença entre os tratamentos é significativa. A tabela 4.1 descreve as condições de cada experimento.

Tabela 4.1 – Condições investigadas no planejamento experimental da impregnação de CUR em QUIT, indicando a faixa de pressão em bar e o percentual molar de etanol em relação ao CO₂.

Experimento	Pressão (bar)	ET (%)
1	100	50
2	100	60
3	100	70
4	150	50
5	150	60
6	150	70
7	200	50
8	200	60

9	200	70
---	-----	----

O parâmetro que foi avaliado como resultado no planejamento experimental foi a eficiência de impregnação em percentual (Eficiência %). O seu cálculo é descrito pela equação 2, em que $CUR_{impregnada}$ é a CUR que foi incorporada à QUIT e $CUR_{inicial}$ a CUR introduzida na célula de impregnação.

$$Eficiência \% = \frac{CUR_{impregnada}(mg)}{CUR_{inicial}} * 100\% \quad (2)$$

4.2.2. Análise Estatística

A análise estatística do planejamento experimental foi feita baseada em estudos que avaliaram a influência de parâmetros de processo de impregnação supercrítica na quantidade de composto ativo impregnado (AREDO et al., 2019; JARLES et al., 2023). Foi feita uma análise ANOVA seguida do Teste de Tukey, considerando um intervalo de confiança de 95%, para avaliar diferenças significativas entre a pressão e o percentual de etanol utilizado.

4.3. Quantificação da Impregnação

A quantificação da CUR impregnada foi feita baseada nas técnicas usadas por Chuah (2013) e Akolade (2018). A QUIT utilizada em cada experimento (100 mg) era armazenada em tubo Falcon e imersa em 40 mL de metanol. A solução foi submetida à agitação por 20 min para realizar uma extração líquido-líquido do composto impregnado, sendo uma amostra dela filtrada e diluída 1:5 para ser analisada por espectrofotometria a partir do equipamento UV-VIS UV-M51 Bel Photonics. O comprimento de onda utilizado foi 425 nm. Previamente foi preparada uma curva de calibração para a curcumina em metanol, cujo intervalo de concentração foi de $6 \cdot 10^{-3}$ e $2 \cdot 10^{-4}$ mg/mL, (Equação 3). Esta curva (Equação 3) expressa a concentração de CUR em mg/mL (R^2 de 0,9968), sendo x o logaritmo natural da transmitância e y a concentração de CUR (mg/mL).

$$y = 0,0022x + 0,01 \quad (3)$$

4.4. Microscopia Eletrônica de Varredura das Partículas de Quitosana

Foi feita a MEV da QUIT utilizada nos experimentos. Esse procedimento foi realizado no Laboratório Central de Microscopia e Microanálise da PUCRS, usando o equipamento MEV-FEG Inspect F50 (FEI). Foram utilizados aumentos 100 a 10.000 vezes, HV de 25,00 kV, spot entre 3,5 e 5,0 e WD de 10,3 à 11,5 mm de para visualizar a microestrutura do polímero e identificar e o diâmetro das partículas. Esse procedimento foi realizado antes e depois do processo de impregnação supercrítica para averiguar mudanças resultantes da incorporação do composto no polímero.

4.5. FTIR

As análises FTIR das MP foram feitas num intervalo de número de onda de 3800 cm^{-1} a 800 cm^{-1} , sendo a amostra analisada assim como recebida. Utilizou-se o espectrofotômetro Frontier MIR+SP10 STD (PerkinElmer) com 16 varreduras e acessório de UATR. Essa técnica foi empregada para comparar as ligações químicas presentes no polímero antes e depois da impregnação e identificar qualquer tipo de mudança, semelhante ao que foi feito por Bastante (2019).

4.6. Ensaio de Liberação da CUR

A liberação da CUR foi avaliada meio fisiológico simulado por meio de um procedimento adaptado da metodologia de KARRI *et al.* (2016). As partículas impregnadas eram imersas numa solução de PBS (pH 7,4) e mantidas à 37 °C com agitação constante por determinados intervalos de tempo (2, 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min), sendo feito em triplicata. Ao término de cada intervalo de tempo, a solução era filtrada e analisada por espectrofotometria, utilizando o equipamento UV-VIS UV-M51 Bel Photonics, num comprimento de onda de 424 nm. Previamente, uma curva de calibração foi produzida a partir de experimentos com o padrão de CUR num intervalo de concentração de $2 \cdot 10^{-2}$ e $1 \cdot 10^{-3}$ mg/mL, em meio PBS. A Equação 4 descreve a equação obtida pelo ajuste (R^2 igual a 0,963), sendo x o logaritmo natural da transmitância e y a concentração de CUR em mg/mL.

$$y = 0,1727x + 0,7939 \quad (4)$$

4.6.1. Modelagem Matemática da Liberação

A modelagem matemática foi feita para quatro modelos: Ordem Zero, Primeira Ordem, Higuchi e Korsmeyer-Peppas. O ajuste das curvas foi feito pelo método do

mínimo quadrado e a função objetivo (F_{obj}) é apresentada na Equação 5, em que M_{expt} e M_{eqt} são, respectivamente, a massa experimental de CUR e massa teórica (calculada pela equação do modelo) para um tempo t .

$$F_{obj} = \sum (M_{expt} - M_{eqt})^2 \quad (5)$$

5. RESULTADOS

Os resultados deste estudo de impregnação supercrítica da curcumina em quitosana, a partir do uso das metodologias apresentadas no item 4 são apresentados a seguir.

5.1. Impregnação Supercrítica

Os resultados da impregnação a alta pressão da curcumina em quitosana, aplicando o planejamento experimental é mostrado na Tabela 5.1. Nas condições estudadas a eficiência de impregnação variou entre 8,5 e 15,8%, demonstrando a influência das duas variáveis estudadas, pressão e concentração de etanol, na incorporação do princípio ativo ao polímero, sendo a maior quantidade de curcumina impregnada 3,16 mg. A partir da análise estatística concluiu que não há diferença significativa entre os diferentes percentuais de ET utilizados nos experimentos, assim como entre as pressões de 100 e 150 bar. Isso conclui que a pressão de 200 bar gera uma maior quantidade de CUR impregnada na QUIT, sendo indiferente a quantidade de ET utilizado na faixa de 50 a 70% molar.

Tabela 5.1 – Eficiência de impregnação de curcumina em quitosana em diferentes pressões (100 - 200 bar) e percentuais de etanol (50% - 70%) à 55 °C com taxa de despressurização de 10 bar/min.

Letras iguais (a e b) indicam que não há diferença significativa considerando um intervalo de confiança de 95%.

Pressão (bar)	ET (%)	Eficiência (%)
100	50	8,5 ^a
100	60	9,9 ^a
100	70	10,4 ^a
150	50	10,0 ^a
150	60	10,9 ^a
150	70	11,6 ^a
200	50	12,8 ^b
200	60	13,0 ^b
200	70	15,8 ^b

A escolha do cossolvente no processo de IAFSC foi feita devido ao incremento na solubilidade da CUR no fluido pressurizado, pois, o fator limitante na maioria dos processos que envolvem esse composto era sua solubilização, sendo assim, se pensou que a utilização do ET teria grande impacto na eficiência do processo. Entretanto, mesmo com a os valores de solubilidade da CUR quase dobrando ao

alterar a quantidade de ET de 50% para 70% na faixa de pressões trabalha (CUNICO; ACOSTA; TURNER, 2017), não houve uma diferença significativa em relação à eficiência. Isso ocorre porque, ao aumentar a quantidade de ET, diminui-se a de CO₂, fazendo com que decaia a difusividade do fluido do processo e a transferência de massa (DÍEZ-MUNICIO et al., 2011). Apesar desse contraponto, não significa que o ET possa ser descartado, pois, sem sua presença, a solubilidade da CUR diminuiria 10⁷ vezes (ZHAN et al., 2017).

Em relação à influência da pressão nos resultados, a explicação para o seu efeito na eficiência também envolve mais de um aspecto. Por um lado, o seu incremento diminui a difusividade do processo por limitar a movimentação das moléculas e, por outro, aumenta a solubilidade da CUR no fluido pressurizado. Esse argumento é semelhante ao apresentado para o aumento da quantidade de etanol no processo, mas há um outro fator que é característico da IAFSC que explica a diferença: a plasticização do polímero. O aumento da pressão também faz com que a desorganização da microestrutura do polímero intensifique, podendo aumentar a porosidade do mesmo e favorecer a deposição do composto ativo na matriz (JARLES et al., 2023). Nas imagens obtidas por MEV (Figura 5.2), é possível visualizar essa mudança no material, reforçando essa hipótese. Em suma, a pressão de 200 bar promoveu uma maior modificação na estrutura cristalina do polímero e aumentou a eficiência do processo, enquanto nas pressões de 100 e 150 bar, esse fenômeno pode não ter ocorrido da mesma forma.

5.2. Microscopia das micropartículas

A Figura 5.1 mostra a imagem obtida da microscopia da MPQUIT obtida por MEV. A partir das medições feitas no software do próprio equipamento, foi determinado que o diâmetro das partículas enquadra o polímero na escala micro. Além disso, é possível observar o formato característico de folhas da QUIT.

A amostra selecionada para as análises MEV foi aquela preparada na condição de 200 bar e 70% molar de cossolvente. Na Figura 5.2 são apresentadas as microscopias comparativas entre a QUIT impregnada e sua amostra de QUIT original. Analisando as imagens, notou-se que o processo deformou as partículas do polímero levemente, o que já era esperado devido ao fenômeno da plasticização, que é característico da técnica (KIKIC; VECCHIONE, 2003).

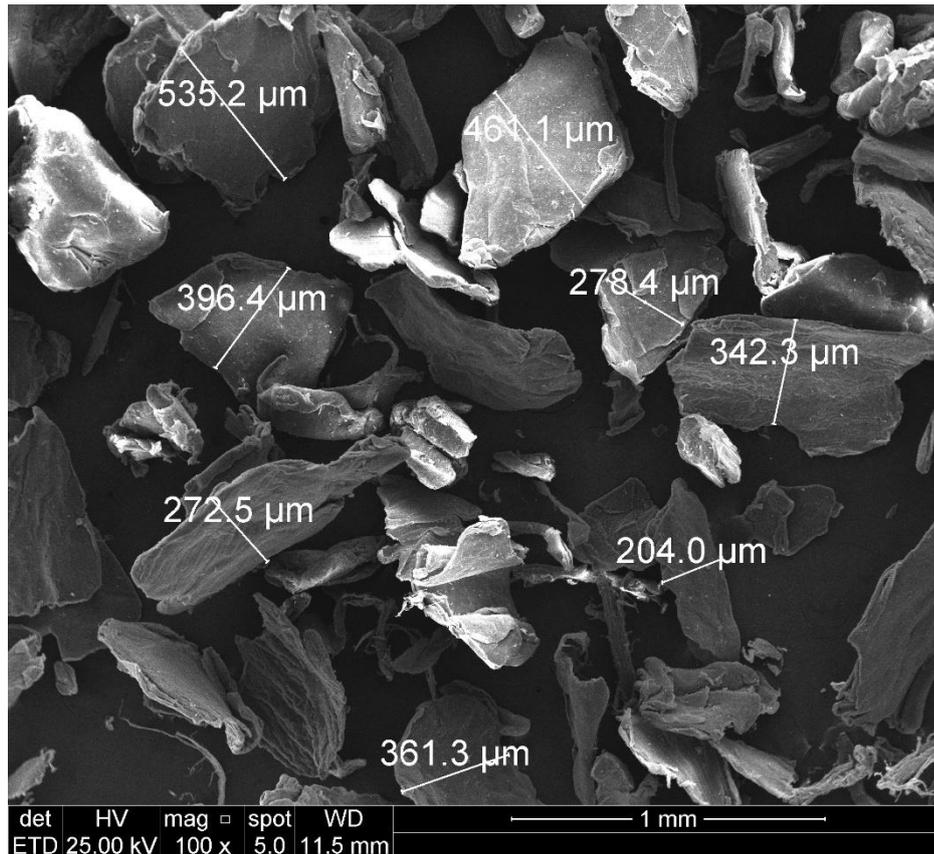


Figura 5.1 – Imagem da MEV da QUIT antes da impregnação.

No aumento de 10000 vezes, fica evidente que a microestrutura foi afetada durante o processo de impregnação, perdendo o seu formato original. Além disso, é possível observar, nas imagens da QUIT impregnada, pequenas estruturas aderidas na superfície do polímero o que sugere que a CUR fica depositada, predominantemente, na superfície da QUIT. Os resultados do teste de liberação indicam uma liberação rápida do composto inicialmente, reforçando a hipótese que a maior parte da CUR está depositada na superfície do polímero.

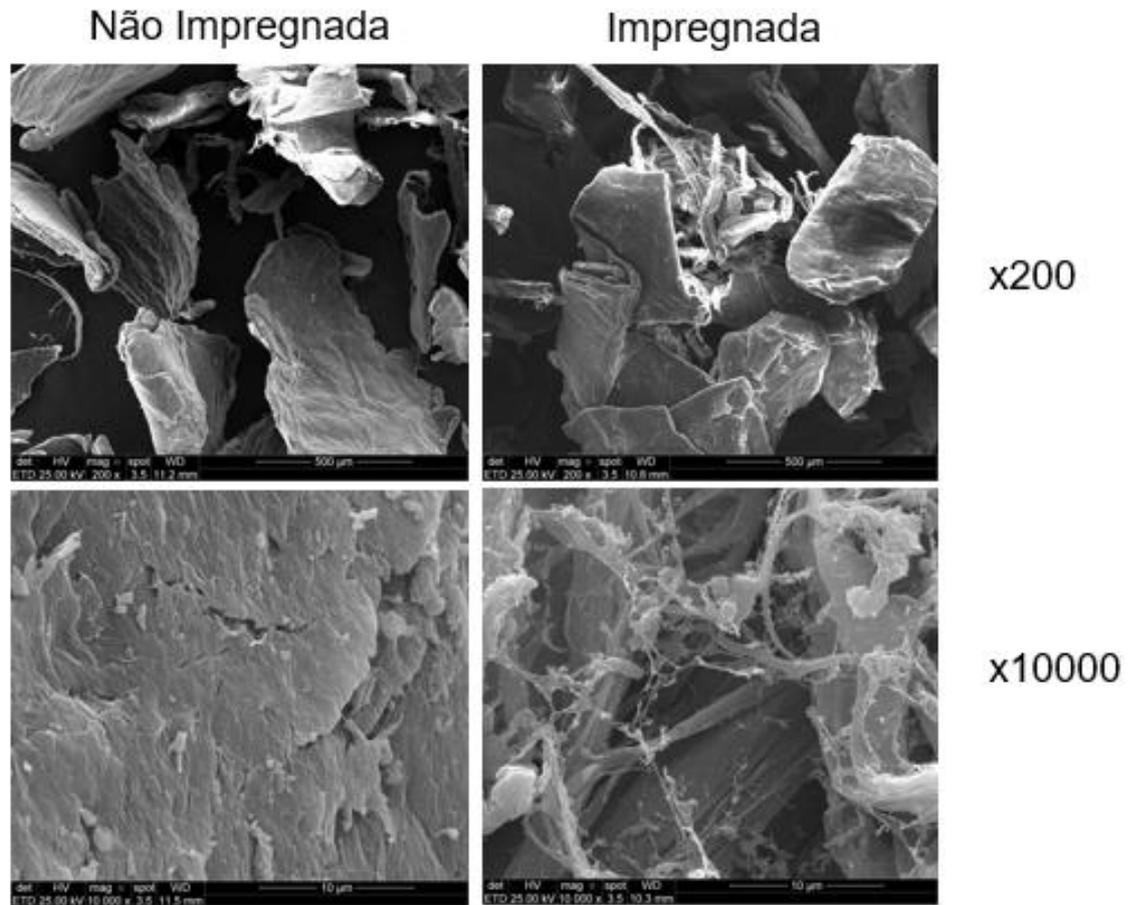


Figura 5.2 – Imagens comparativas entre QUIT impregnada usando 200 bar de pressão e 70% de etanol como cossolvente e QUIT não impregnada.

5.3. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

A análise FTIR teve com objetivo identificar a presença de CUR impregnada nas MPQUIT a partir de diferenças nas ligações químicas do polímero. Na Figura 5.3, está o espectro de transmitância do infravermelho de amostras de QUIT pura (curva preta), CUR (curva vermelha) e QUIT impregnada com CUR (curva azul). A amostra impregnada utilizada foi submetida a um processo a 200 bar usando 70% de etanol na composição de cossolvente. A deposição do composto ativo na matriz polimérica pode ser notada a partir da análise desse espectro e das semelhanças entre as curvas.

Analisando o espectro da QUIT impregnada com curcumina (curva azul na Figura 5.3) percebe-se alterações relevantes comparando com a curva de QUIT original (espectro preto). Essas mudanças são resultantes não apenas da impregnação de CUR na QUIT (que também possuem grupos OH), mas também de

ET. O estudo conduzido por Gracia *et al* (2018) identificou que uma certa quantidade de ET pode permanecer no polímero após a impregnação e o espectro obtida nessa análise mostrou evidências que esse fenômeno também ocorreu nesse caso.

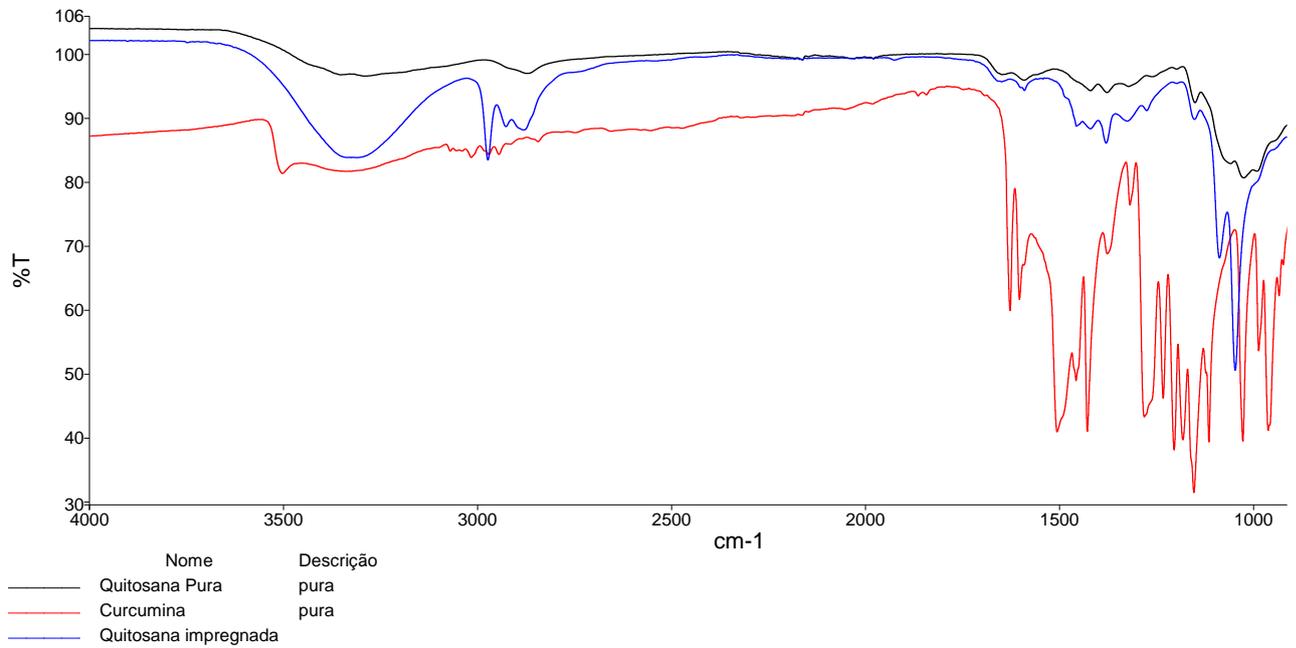


Figura 5.3 – Espectro infravermelho de amostras de QUIT, CUR e de QUIT impregnada com CUR na condição de 200 bar de pressão e 70% de cossolvente.

Na Figura 5.3, a banda referente à ligação O-H, por volta de 3300 cm^{-1} , superposto pela banda de N-H, é mais evidente quando comparado ao do espectro da QUIT pura, que pode ser atribuída ao acréscimo álcoois e fenóis à matriz (etanol e curcumina) (CEJUDO BASTANTE *et al.*, 2019). Outra banda que também ficou mais expressivo após o processo, foi em 2978 cm^{-1} , que é referente à vibração do grupo -C-H de metila e metilenos, proveniente do etanol, e em 2870 cm^{-1} , relacionado à ligação C-H da curcumina (BARBOSA *et al.*, 2019). Em 1597 cm^{-1} , temos a banda do anel benzênico (CHEN *et al.*, 2015), que aumentou sua intensidade devido à presença desse grupo na molécula de CUR. A deformação simétrica angular de CH_3 (1376 cm^{-1}) foi intensificada pela presença de ET. As bandas de C-O aromático (1282 cm^{-1}) C-O e C-O-C ($1052\text{-}1030\text{ cm}^{-1}$) ficaram mais expressivas, sendo isso um resultado da adição de CUR.

A partir das informações obtidas pelo espectro na Figura 5.3, não é possível afirmar que houve a formação de interações intermoleculares fortes entre a QUIT,

CUR ou ET. Isso indica que o processo de impregnação estudado promove apenas uma adsorção dos compostos na matriz polimérica.

5.4. Curva de Liberação de Curcumina

Os experimentos para avaliar a curva de liberação da CUR foram feitos com três ensaios em meio fisiológico simulado de amostras de MPQUIT impregnadas com CUR a 200 bar e utilizando 70% de ET como cossolvente. O resultado referente a essa etapa consta na Tabela 5.2, que expressa a fração M_t/M_∞ em função do tempo. O termo M_∞ refere-se a massa acumulada total de CUR liberada durante todo o experimento e M_t é a massa liberada em um tempo t .

Tabela 5.2 – Dados experimentais da liberação de CUR em meio fisiológico simulado a partir de amostras MPQUIT impregnadas com CUR a 200 bar, usando 70% de ET como cossolvente, numa solução de PBS (pH 7,4) à 37 °C e agitação constante.

Tempo (min)	M_t/M_∞
2	$0,14 \pm 1,1 \cdot 10^{-2}$
5	$0,29 \pm 6,6 \cdot 10^{-3}$
10	$0,44 \pm 4,4 \cdot 10^{-3}$
20	$0,58 \pm 3,8 \cdot 10^{-3}$
30	$0,73 \pm 5,1 \cdot 10^{-3}$
60	$0,85 \pm 5,5 \cdot 10^{-3}$
90	$0,92 \pm 4,6 \cdot 10^{-3}$
120	$0,99 \pm 3,3 \cdot 10^{-3}$
150	$1,0 \pm 0,0$
180	$1,0 \pm 0,0$

Na Quadro 5.1, é apresentada a modelagem matemática dos dados experimentais de liberação da Tabela 5.2 para os quatro modelos estudados. Nas equações expostas no Quadro 5;1, M_t e M_∞ tem o mesmo significado descrito no parágrafo anterior e as letras “n” e “k” são parâmetros ajustáveis de cada modelo.

O modelo de Ordem zero não obteve um coeficiente de determinação satisfatório, além de sua curva não estar visualmente próxima da dados experimentais. Como a premissa dessa equação é de que a degradação da matriz polimérica controla a liberação do fármaco, já é possível constatar que esse fenômeno não o que controla o processo. O estudo feito por Sun, Sheng e Yang (2021) demonstrou que a degradação da quitosana em PBS é próxima à 10% de sua massa

nas primeiras 24 horas, que não aparenta ser um valor suficiente para provocar uma liberação significativa do fármaco no tempo de experimento avaliado.

Quadro 5.1 - Parâmetros e R² obtidos a partir dos experimentos de liberação da CUR para os modelos Ordem Zero, Primeira Ordem, Higuchi e Korsmeyer-Peppas.

Modelo	Equação	Parâmetros	R ²
Ordem Zero	$\frac{Mt}{M_{\infty}} = kt$	k = 8,24.10 ⁻³	0,748
Primeira Ordem	$\ln\left(1 - \frac{Mt}{M_{\infty}}\right) = kt$	k = - 4,28.10 ⁻²	0,990
Higuchi	$\frac{Mt}{M_{\infty}} = kt^{\frac{1}{2}}$	k = 9,03.10 ⁻²	0,898
Korsmeyer-Peppas	$\ln\left(\frac{Mt}{M_{\infty}}\right) = n \ln(t) + \ln(k)$	k = -5,06 n = 8,26.10 ⁻¹	0,971

O segundo modelo avaliado, o de Primeira Ordem, foi que obteve o melhor coeficiente de determinação. Sua curva ficou próxima à dos dados experimentais no início do processo, mostrando que ele se ajustou bem à rápida liberação de CUR. Um ponto que foi levantando na análise das imagens de MEV das MPQUIT impregnadas com CUR foi que a maior parte do composto estaria impregnado na superfície. Isso condiz com o que foi observado por Jarosz et al. (2016): o fármaco depositado na superfície do material é liberado rapidamente, ocorrendo uma diminuição da taxa quando restam apenas as moléculas nos interstícios.

O quarto modelo avaliado possui um R² com um valor próximo ao de primeira ordem e sua curva está relativamente próxima à dos dados experimentais. O valor de n obtido (0,826) indica que o mecanismo que controla o processo é anômalo e ocorre degradação e difusão ao mesmo tempo. Como citado, ocorre uma certa degradação

da QUIT no meio de PBS (SUN; SHENG; YANG, 2021), que não demonstrou ser tão significativa a ponto de controlar o processo. Em relação à difusão, o modelo de Higuchi, que também se baseia na difusão, não foi satisfatório, o que pode indicar que a equação do modelo de Korsmeyer-Peppas possui um resultado numericamente bom, mas não explica devidamente o fenômeno da liberação da CUR das MPQUIT.

O modelo de Primeira Ordem foi considerado como o melhor para descrever a liberação de CUR das MPQUIT. Primeiramente, porque obteve um resultado numericamente melhor no seu coeficiente de correção, além de sua curva no final da liberação estar mais próxima à dos dados experimentais, mostrando que pode prever melhor o fim do processo. Outro fator importante é que foi o único com uma justificativa teórica plausível.

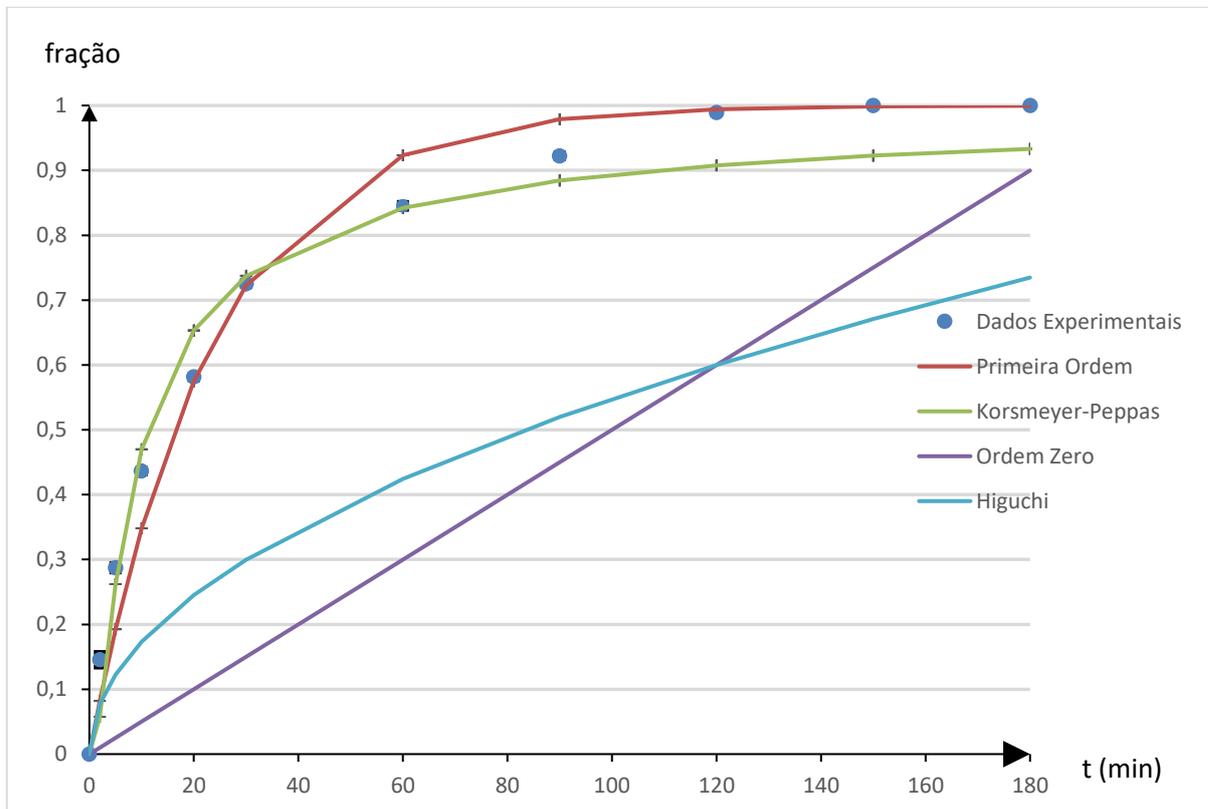


Figura 5.4 – Curvas de liberação de CUR em meio fisiológico simulado: dados experimentais e teóricos.

A Tabela 5.3 mostra um comparativo entre a média do módulo do erro entre os dados teóricos e experimentais para cada um dos modelos avaliados. Verifica-se que os modelos de Primeira Ordem e Korsmeyer-Peppas foram os que também obtiveram as menores médias de erro, tendo valores relativamente próximos de desvio padrão. Essa é uma outra maneira de quantificar os desvios de cada modelo,

reforçando que o de Primeira Ordem e o de Korsmeyer-Peppas tiveram resultados matematicamente próximos.

Tabela 5.3 – Média dos erros (módulo) em relação aos dados experimentos e desvio padrão dos mesmo para cada modelo teórico avaliado.

Modelo	Média do Erro	Desvio Padrão
Ordem Zero	1,71E-01	9,59E-02
Primeira Ordem	2,12E-02	2,21E-02
Higuchi	6,87E-02	4,82E-02
Korsmeyer-Peppas	2,94E-02	1,90E-02

Em relação ao CC, os dados experimentais de liberação mostram que a concentração de CUR no meio fisiológico simulado atingiu um pico de 48 μM e se manteve acima de 20 μM até a marca de 120 min. A literatura mostra que concentrações superiores a 2,5 μM já apresentam efeitos contra células desse tipo câncer, porém, para tempos superiores a 24 horas (SU *et al.*, 2018; WATSON *et al.*, 2010). Isso sugere que as MP liberam quantidades suficiente de fármaco para induzirem apoptose ou inibir a proliferação celular, mas é necessário avaliar se o tempo em que isso ocorre é suficiente para ter um impacto significativo.

6. CONCLUSÃO

A impregnação assistida por fluido supercrítico usando etanol como cossolvente se mostrou uma alternativa promissora para a confecção de micropartículas de quitosana impregnadas com curcumina. As condições de 200 bar de pressão foram as que promoveram as maiores quantidades de curcumina impregnada no polímero, sendo que a análise estatística do planejamento experimental indicou que não houve diferença significativa para os diferentes percentuais de etanol utilizados, considerando um nível de significância de 95%.

A partir das análises de MEV é possível concluir que houve uma modificação na microestrutura do polímero e uma deposição de curcumina predominantemente na superfície do mesmo após a impregnação. Essa hipótese foi reforçada a partir do perfil de liberação obtido nas análises posteriores.

O modelo de liberação de fármaco que mais se enquadrou com o perfil apresentado pelos testes em meio fisiológico simulado com as partículas foi o de primeira ordem. Ele descreveu satisfatoriamente o processo que ocorre, sendo uma liberação rápida inicialmente, que evolui para uma mais gradativa. Ainda, esses experimentos indicaram que as micropartículas liberaram concentrações entre 20 e 48 μM do composto ativo nos primeiros 120 min, que está dentro da faixa de relatada na literatura que propicia efeitos de combate às células de câncer do cólon.

Como sugestões para trabalhos futuros, as mais relevantes são realizar testes em meio fisiológico simulado da ação dessas partículas contra células de câncer de cólon e realizar um estudo da quantidade de curcumina impregnada nas partículas ao longo do tempo. Ambas as etapas se complementariam, pois será possível identificar as concentrações de curcumina necessárias para inibir ou induzir apoptose e o tempo de processo necessária para que as micropartículas de quitosana atinjam essas condições.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASNEZHAD, Navideh et al. Controlled release from polyurethane films: Drug release mechanisms. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 138, n. 12, p. 50083, 2021.

ADEPU, Shivakalyani; KHANDELWAL, Mudrika. Ex-situ modification of bacterial cellulose for immediate and sustained drug release with insights into release mechanism. **Carbohydrate Polymers**, v. 249, p. 116816, 2020.

AKOLADE, J. O.; OLOYEDE, H. O. B.; SALAWU, M. O.; AMUZAT, A. O.; GANIYU, A. I.; ONYENEKWE, P. C. Influence of formulation parameters on encapsulation and release characteristics of curcumin loaded in chitosan-based drug delivery carriers. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 45, n. February, p. 11–19, 2018.

ALSAYED, M. A.; SURRATI, A. M.; ALTAIFI, J. A.; ALHARBI, A. H.; ALFOUTI, R. O.; ALREMAITHI, S. M. Public awareness of colon cancer symptoms, risk factor, and screening at Madinah- KSA. **International Journal of Pharmaceutical Research and Allied Sciences**, v. 8, n. 1, p. 184–197, 2019.

AMERI, A.; SODEIFIAN, G.; SAJADIAN, S. A. Lansoprazole loading of polymers by supercritical carbon dioxide impregnation: Impacts of process parameters. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 164, p. 104892, 2020.

ARAUJO, E. J. S. et al. Supercritical impregnation of polyphenols from passion fruit residue in corn starch aerogels: Effect of operational parameters. **Journal of Food Engineering**, p. 111394, 2022.

AREDO, Victor et al. Formation of lycopene-loaded hydrolysed collagen particles by supercritical impregnation. **LWT**, v. 110, p. 158-167, 2019.

BARBOSA, H. F. G.; FRANCISCO, D. S.; FERREIRA, A. P. G.; CAVALHEIRO, É. T. G. A new look towards the thermal decomposition of chitins and chitosans with different degrees of deacetylation by coupled TG-FTIR. **Carbohydrate Polymers**, v. 225, n. June, p. 115232, 2019.

BHARAT B., A.; CHITRA, S.; NIKITA, M.; HARUYO, I. Curcumin: The Indian solid gold. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 595, p. 1–75, 2007.

BRAGA, M. E. M.; PATO, M. T. V.; SILVA, H. S. R. C.; FERREIRA, E. I.; GIL, M. H.; DUARTE, C. M. M.; DE SOUSA, H. C. Supercritical solvent impregnation of ophthalmic drugs on chitosan derivatives. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 44, n. 2, p. 245–257, 2008.

CEJUDO BASTANTE, C.; CRAN, M. J.; CASAS CARDOSO, L.; MANTELL SERRANO, C.; MARTÍNEZ DE LA OSSA, E. J.; BIGGER, S. W. Effect of supercritical CO₂ and olive leaf extract on the structural, thermal and mechanical properties of an impregnated food packaging film. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 145, n. December 2018, p. 181–191, 2019.

CHEN, X.; ZOU, L. Q.; NIU, J.; LIU, W.; PENG, S. F.; LIU, C. M. The stability, sustained release and cellular antioxidant activity of curcumin nanoliposomes. **Molecules**, v. 20, n. 8, p. 14293–14311, 2015.

CHUAH, L. H.; BILLA, N.; ROBERTS, C. J.; BURLEY, J. C.; MANICKAM, S. Curcumin-containing chitosan nanoparticles as a potential mucoadhesive delivery system to the colon. **Pharmaceutical development and technology**, v. 18, n. 3, p. 591–599, 2013.

CUNICO, L. P.; ACOSTA, M. C.; TURNER, C. Experimental measurements and modeling of curcumin solubility in CO₂-expanded ethanol. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 130, n. June, p. 381–388, 2017.

CUNICO, L. P.; TURNER, C. **Supercritical Fluids and Gas-Expanded Liquids**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. 155–214 p.

DENG, X. Q.; ZHANG, H. B.; WANG, G. F.; XU, D.; ZHANG, W. Y.; WANG, Q. S.; CUI, Y. L. Colon-specific microspheres loaded with puerarin reduce tumorigenesis and metastasis in colitis-associated colorectal cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 570, n. August, p. 118644, 2019.

DÍEZ-MUNICIO, M.; MONTILLA, A.; HERRERO, M.; OLANO, A.; IBÁÑEZ, E. Supercritical CO₂ impregnation of lactulose on chitosan: A comparison between scaffolds and microspheres form. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 57, n. 1, p. 73–79, 2011.

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

ELMAS, Aykut et al. Mathematical modelling of drug release. **Res. Eng. Struct. Mater**, v. 6, n. 4, p. 327-350, 2020.

EL-MAADAWY, M. W.; MOHAMED, R. R.; HANNA, D. H. Preparation of carrageenan/chitosan-based (N, N, N-trimethyl chitosan chloride) silver nanocomposites as pH sensitive carrier for effective controlled curcumin delivery in cancer cells. **OpenNano**, v. 7, p. 100050, 2022.

FAN, X.; ZHU, M.; QIU, F.; LI, W.; WANG, M.; GUO, Y.; XI, X.; DU, B. Curcumin may be a potential adjuvant treatment drug for colon cancer by targeting CD44. **International Immunopharmacology**, v. 88, n. September, p. 106991, 2020.

FAHIMIRAD, S. et al. Wound healing performance of PCL/chitosan based electrospun nanofiber electrospayed with curcumin loaded chitosan nanoparticles. **Carbohydrate polymers**, v. 259, p. 117640, 2021.

GANAN, N.; BORDÓN, M. G.; RIBOTTA, P. D.; GONZÁLEZ, A. Study of chia oil microencapsulation in soy protein microparticles using supercritical CO₂-assisted impregnation. **Journal of CO₂ Utilization**, v. 40, n. May, p. 101221, 2020.

GIORDANO, A.; TOMMONARO, G. Curcumin and cancer. **Nutrients**, v. 11, n. 10, 2019.

GONZÁLEZ, J. C.; VIEYTES, M. R.; BOTANA, A. M.; VIEITES, J. M.; BOTANA, L. M. Modified mass action law-based model to correlate the solubility of solids and liquids in entrained supercritical carbon dioxide. **Journal of Chromatography A**, v. 910, n. 1, p. 119–125, 2001.

GRACIA, E.; GARCÍA, M. T.; RODRÍGUEZ, J. F.; DE LUCAS, A.; GRACIA, I. Improvement of PLGA loading and release of curcumin by supercritical technology. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 141, p. 60–67, 2018.

HE, T.; WANG, W.; CHEN, B.; WANG, J.; LIANG, Q.; CHEN, B. 5-Fluorouracil monodispersed chitosan microspheres: Microfluidic chip fabrication with crosslinking, characterization, drug release and anticancer activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 236, n. February, p. 116094, 2020.

HEWLINGS, S. J.; KALMAN, D. S. Curcumin: A review of its effects on human health. **Foods**, v. 6, n. 10, p. 1–11, 2017.

HUANBUTTA, Kampanart et al. Development of a zero-order kinetics drug release floating tablet with anti–flip-up design fabricated by 3D-printing technique. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 51, n. 2, p. 213-222, 2021.

JAROSZ, M.; PAWLIK, A.; SZUWARZYŃSKI, M.; JASKUŁA, M.; SULKA, G. D. Nanoporous anodic titanium dioxide layers as potential drug delivery systems: Drug release kinetics and mechanism. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 143, p. 447–454, 2016a.

JAROSZ, M.; PAWLIK, A.; SZUWARZYŃSKI, M.; JASKUŁA, M.; SULKA, G. D. Nanoporous anodic titanium dioxide layers as potential drug delivery systems: Drug release kinetics and mechanism. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 143, p. 447–454, 2016b.

JIA, Z.; ZHANG, Z.; TIAN, Q.; WU, H.; XIE, Y.; LI, A.; ZHANG, H.; YANG, Z.; ZHANG, X. Integration of transcriptomics and metabolomics reveals anlotinib-induced cytotoxicity in colon cancer cells. **Gene**, v. 786, n. March, p. 145625, 2021.

JYOTI, K.; BHATIA, R. K.; MARTIS, E. A. F.; COUTINHO, E. C.; JAIN, U. K.; CHANDRA, R.; MADAN, J. Soluble curcumin amalgamated chitosan microspheres augmented drug delivery and cytotoxicity in colon cancer cells: In vitro and in vivo study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 148, p. 674–683, 2016.

JYOTI, K.; PANDEY, R. S.; KUSH, P.; KAUSHIK, D.; JAIN, U. K.; MADAN, J. Inhalable bioresponsive chitosan microspheres of doxorubicin and soluble curcumin augmented drug delivery in lung cancer cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 50–58, 2017.

KARRI, V. V. S. R.; KUPPUSAMY, G.; TALLURI, S. V.; MANNEMALA, S. S.; KOLLIPARA, R.; WADHWANI, A. D.; MULUKUTLA, S.; RAJU, K. R. S.; MALAYANDI,

R. Curcumin loaded chitosan nanoparticles impregnated into collagen-alginate scaffolds for diabetic wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 1519–1529, 2016.

KIKIC, I.; VECCHIONE, F. Supercritical impregnation of polymers. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 7, n. 4–5, p. 399–405, 2003.

KRIVOKAPIĆ, J.; IVANOVIĆ, J.; KRKOBABIĆ, M.; ARSENIJEVIĆ, J.; IBRIĆ, S. Supercritical fluid impregnation of microcrystalline cellulose derived from the agricultural waste with ibuprofen. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 21, n. May, 2021.

LABIANCA, R.; BERETTA, G. D.; KILDANI, B.; MILESI, L.; MERLIN, F.; MOSCONI, S.; PESSI, M. A.; PROCHILO, T.; QUADRI, A.; GATTA, G.; DE BRAUD, F.; WILS, J. Colon cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 74, n. 2, p. 106–133, 2010.

MARIZZA, P.; PONTONI, L.; RINDZEVICIUS, T.; ALOPAEUS, J. F.; SU, K.; ZEITLER, J. A.; KELLER, S. S.; KIKIC, I.; MONEGHINI, M.; DE ZORDI, N.; SOLINAS, D.; CORTESI, A.; BOISEN, A. Supercritical impregnation of polymer matrices spatially confined in microcontainers for oral drug delivery: Effect of temperature, pressure and time. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 107, p. 145–152, 2016.

MÉNDEZ-SANTIAGO, J.; TEJA, A. S. The solubility of solids in supercritical fluids. **Fluid Phase Equilibria**, v. 158–160, p. 501–510, 1999.

MORAMKAR, N.; BHATT, P. Insight into chitosan derived nanotherapeutics for anticancer drug delivery and imaging. **European Polymer Journal**, v. 154, n. February, p. 110540, 2021.

OPARIN, R. D.; VAKSLER, Y. A.; KRESTYANINOV, M. A.; IDRISSE, A.; KISELEV, M. G. Possibility of dopant morphology control in the process of polymer impregnation with pharmaceuticals in a supercritical CO₂ medium. **Journal of Molecular Liquids**, v. 330, p. 115657, 2021.

SALEHI, B.; STOJANOVIĆ-RADIĆ, Z.; MATEJIĆ, J.; SHARIFI-RAD, M.; ANIL KUMAR, N. V.; MARTINS, N.; SHARIFI-RAD, J. The therapeutic potential of curcumin: A review of clinical trials. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 163, p. 527–545, 2019.

SALMI, N.; RUSTAM, Z. Naïve Bayes Classifier Models for Predicting the Colon Cancer. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 546, n. 5, 2019.

SARANYA, T. S.; RAJAN, V. K.; BISWAS, R.; JAYAKUMAR, R.; SATHIANARAYANAN, S. Synthesis, characterisation and biomedical applications of curcumin conjugated chitosan microspheres. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 110, p. 227–233, 2018.

SENTHIL KUMAR, C.; THANGAM, R.; MARY, S. A.; KANNAN, P. R.; ARUN, G.; MADHAN, B. Targeted delivery and apoptosis induction of trans-resveratrol-ferulic acid loaded chitosan coated folic acid conjugate solid lipid nanoparticles in colon cancer cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 231, n. September 2019, p. 115682, 2020.

SHI, K.; FENG, L.; HE, L.; LI, H. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers Thermodynamic modeling of the supercritical CO₂ impregnation process for the preparation ibuprofen / polymethylmethacrylate composite. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 78, p. 471–476, 2017.

SU, P.; YANG, Y.; WANG, G.; CHEN, X.; JU, Y. Curcumin attenuates resistance to irinotecan via induction of apoptosis of cancer stem cells in chemoresistant colon cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 53, n. 3, p. 1343–1353, 1 set. 2018.

TANG, H. Y.; FANG, Z.; NG, K. Dietary fiber-based colon-targeted delivery systems for polyphenols. **Trends in Food Science and Technology**, v. 100, n. March, p. 333–348, 2020.

TOMEH, M. A.; HADIANAMREI, R.; ZHAO, X. A review of curcumin and its derivatives as anticancer agents. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 5, 2019.

WANG, K.; SONG, W.; SHEN, Y.; WANG, H.; FAN, Z. LncRNA KLK8 Modulates Stem Cell Characteristics in Colon Cancer. **Pathology - Research and Practice**, p. 153437, 2021.

WATSON, J. L.; HILL, R.; YAFFE, P. B.; GREENSHIELDS, A.; WALSH, M.; LEE, P. W.; GIACOMANTONIO, C. A.; HOSKIN, D. W. Curcumin causes superoxide anion production and p53-independent apoptosis in human colon cancer cells. **Cancer Letters**, v. 297, n. 1, p. 1–8, nov. 2010.

WEIDNER, E. Impregnation via supercritical CO₂—What we know and what we need to know. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 134, n. October 2017, p. 220–227, 2018.

YOKOZAKI, Y.; SAKABE, J.; NG, B.; SHIMOYAMA, Y. Effect of temperature, pressure and depressurization rate on release profile of salicylic acid from contact lenses prepared by supercritical carbon dioxide impregnation. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 100, p. 89–94, 2015.

ZHAN, S.; LI, S.; ZHAO, Q.; WANG, W.; WANG, J. Measurement and Correlation of Curcumin Solubility in Supercritical Carbon Dioxide. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 62, n. 4, p. 1257–1263, 2017.

ZHAO, Y.; WANG, W.; LIU, W.; ZHU, J.; PEI, X. Density-based UNIFAC model for solubility prediction of solid solutes in supercritical fluids. **Fluid Phase Equilibria**, v. 506, p. 112376, 2020.

ZOU, X.; ZHAO, X.; YE, L.; WANG, Q.; LI, H. Preparation and drug release behavior of pH-responsive bovine serum albumin-loaded chitosan microspheres. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 21, p. 1389–1397, 2015.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Av. Ipiranga, 6681 – Prédio 1 – Térreo
Porto Alegre – RS – Brasil
Fone: (51) 3320-3513
E-mail: propesq@pucrs.br
Site: www.pucrs.br