# LÍVIA CONTINI MASSIMINO

Nanopartículas de Curcumina: Obtenção e Caracterização

# LÍVIA CONTINI MASSIMINO

# Nanopartículas de Curcumina: Obtenção e Caracterização

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia — Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof. Dr. Sergio Akinobu Yoshioka

Versão corrigida

São Carlos 2016 AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Massimino, Lívia Contini

M417n

Nanopartículas de curcumina : obtenção e caracterização / Lívia Contini Massimino; orientador Sergio Akinobu Yoshioka. São Carlos, 2016.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia e Área de Concentração em Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos; Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, 2016.

Curcumina. 2. Nanopartículas. 3. Caracterização.
 Título.



#### LÍVIA CONTINI MASSIMINO

Título: "Nanopartículas de curcumina: obtenção e caracterização"

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO INTERUNIDADES EM BIOENGENHARIA - EESC/FMRP/IQSC DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS NA ÁREA DE BIOENGENHARIA.

Data da defesa: 26/01/2016

Prof. Dr. Sergio Akinobu Yoshioka (Orientador)

Assinatura: Dugo A. Julia Resultado: Aprovada

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – EESC/FMRP/IQSC-USP

Assinatura: Manha Hon Resultado: Aprovada

Prof. Dr. Valtencir Zucolotto

Assinatura: Homologado em: \_\_/\_\_/

Homologado em: \_\_/\_/

### **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, Aparecido e Rosana, e meus irmãos, Ana Carolina, Rafael e Isadora, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando, incentivando e auxiliando durante todo o meu percurso. E ao meu companheiro, André, pelo carinho e por tornar meus dias mais leves e felizes.

#### **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho e contribuíram de alguma forma para que o caminho percorrido fosse trilhado da melhor forma.

Ao Prof. Dr. Sergio Akinobu Yoshioka, pela oportunidade, orientação e aprendizado, possibilitando que os objetivos desse projeto fossem atingidos.

À Dra. Virginia da Conceição Amaro Martins, pela amizade e por todo o apoio, indispensável para a conclusão deste trabalho.

Ao pessoal do CAQI pelas análises realizadas.

Ao Prof. Dr. Laudemir Carlos Varanda pela utilização do equipamento de sonicação.

À Profa. Dra. Janice Rodrigues Perussi e à Dra. Claudia Bernal pelos testes de fluorescência e ensaios de citotoxicidade.

Ao Prof. Dr. Valtencir Zucolotto e o doutorando Henrique A. Mendonça Faria por toda ajuda e pelos testes de DLS, potencial Zeta e AFM.

Aos amigos do laboratório de Bioquímica e Biomateriais pela amizade, risadas e companheirismo.

Ao pessoal do serviço do Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia por todo o auxílio durante esse período, em especial a Sra. Marcia Maria Hyppolito Geromini.

À indústria Evonik (São Paulo – SP), representada pela Sra. Arianne Matos, pelo gentil fornecimento do Eudragit S100®.

À CAPES pela bolsa concedida, me apoiando financeiramente durante a elaboração desta pesquisa.

Aos meus familiares por todo o apoio e por compreenderem a importância deste projeto e os momentos em que estive ausente para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao meu companheiro, que mesmo nas horas difíceis me ajudou a fazer um trabalho melhor e compreendeu os sacrifícios que fiz para que este trabalho fosse elaborado da melhor forma possível.

### **EPÍGRAFE**

"A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original".

Albert Einstein

#### **RESUMO**

MASSIMINO, L. C. Nanopartículas de curcumina: obtenção e caracterização. 2016. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia - Escola Engenharia de São Carlos - EESC / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP / Instituto de Química de São Carlos - IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Curcumina é um composto natural presente na Curcuma longa, que apresenta diversas atividades medicinais, porém sua baixa solubilidade limita sua aplicação médica. Para solucionar esse problema e viabilizar seu uso, diversas pesquisas no campo da nanotecnologia estão sendo feitas. Neste estudo foram obtidas nanopartículas de curcumina utilizando como solventes o etanol (E) e o clorofórmio (C), e através dos procedimentos de agitação magnética e sonicação. As nanopartículas foram caracterizadas por espalhamento de luz dinâmico (DLS), potencial Zeta, microscopia de força atômica (AFM) e pelas espectroscopias no infravermelho (FTIR), no ultravioleta/visível (UV-Vis) e de fluorescência. Foram feitos ensaios de solubilidade, fotodegradação e citotoxicidade. As nanopartículas obtidas com o solvente **E** e pelos processos de agitação e sonicação foram denominadas de NEA e NES, e com o solvente C de NCA e NCS, respectivamente. Teste inicial de liberação *in vitro* foi feito para a amostra **NCA** dispersas em gelatina com posterior recobrimento com Eudragit S100®; esse teste foi feito em HCl (pH 2,0) e tampão fosfato (pH 7,5). A morfologia dessas membranas recobertas ou não com Eudragit S100® foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As nanopartículas tiveram um rendimento entre 60 e 78%. O resultado de DLS mostrou a obtenção de partículas nanométricas entre 189 e 248 nm para as **NEA**, **NES** e NCS e de 591 nm para NCA, com potencial Zeta acima de | 25 | mV para todas as amostras. As nanopartículas apresentaram uma fotodegradação mais lenta do que o produto comercial. As espectroscopias de FTIR, UV-Vis e fluorescência apresentaram bandas características da curcumina comercial, indicando que as nanopartículas têm as mesmas características químicas e físicas do bioativo. As nanopartículas mostraram um aumento na solubilidade de 37 a 56 vezes em relação à curcumina comercial. Os ensaios de citotoxicidade indicam que as nanopartículas não apresentaram toxicidade para a linhagem VERO, enquanto que para a linhagem HEp-2 ocasionaram morte celular. Assim, os procedimentos utilizados para o preparo das nanopartículas de curcumina foram eficientes, sendo que uso do solvente E mostrou ser o mais indicado para se obter nanopartículas. A morfologia por MEV das membranas de gelatina/NCA mostra um recobrimento uniforme com Eudragit S100®. Os testes iniciais de liberação in vitro mostraram que as nanopartículas de curcumina são protegidas pelo sistema em pH ácido e liberadas apenas quando em pH 7,5.

Palavras-chave: curcumina, nanopartículas, caracterização.

### **ABSTRACT**

MASSIMINO, L. C. Nanoparticles of curcumin: preparation and characterization. 2016. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia - Escola Engenharia de São Carlos - EESC / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP / Instituto de Química de São Carlos - IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Curcumin is a natural compound present in Curcuma longa, which has several medicinal effects but due to its low solubility, its medical application gets constrained. To solve this problem and make it feasible to use, several studies are being made in the nanotechnology field. In this study curcumin nanoparticles were obtained using different solvents, ethanol (E) and chloroform (C), with two procedures, magnetic stirring and sonication. The nanoparticles were characterized by dynamic light scattering (DLS), Zeta potential, atomic force microscopy (AFM) and by infrared spectroscopy (FTIR), ultraviolet/visible spectroscopy (UV-vis), fluorescence spectroscopy. Solubility, photodegradation and cytotoxicity trials were made. The nanoparticles were named **NEA** and **NES** when prepared with **E** solvent, by magnetic stirring and sonication processes, and named NCA and NCS with C solvent, respectively. A preliminary in vitro release test was made with the NCA sample. It was dispersed in gelatin with the Eudragit S100® coating; this release test was done in HCl (pH 2.0) and phosphate buffer (pH 7.5). The membranes with and without Eudragit S100® coating were morphologically analyzed by scanning electron microscopy (SEM). The nanoparticles yield between 60 and 78%. The DLS results showed nanometric particles between 189 and 248 nm for NEA, NES and NCS samples and 591 nm for NCA sample. Moreover, a Zeta potential superior to 25 mV was obtained for all samples. The nanoparticles showed a slower photodegradation compared to the commercial curcumin. The FTIR, UV-vis and fluorescence spectroscopy resulted in characteristic bands, indicating that these nanoparticles have the same chemical and physical characteristics of the commercial curcumin. Likewise, an increase in solubility of 37 to 56 times was observed in comparison with the commercial product. Furthermore, the cytotoxicity assays suggested no toxicity to VERO cell lineage, while death for HEp-2 cell lineage. The procedures used for the curcumin nanoparticles preparation were efficient; however, the most suitable nanoparticles were obtained with E solvent. The morphology by SEM of gelatin/NCA membranes indicates a uniform coating with Eudragit S100®. In vitro release tests showed that curcumin nanoparticles were protected by this system at acid pH and released at pH 7.5.

Keywords: curcumin, nanoparticles, characterization.

### **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - <b>(A)</b> <i>Curcuma longa</i> Linn: planta com flor, <b>(B)</b> rizoma e <b>(C)</b> curcumina em pó25
Figura 2 - Estrutura química dos curcuminóides26
Figura 3 - Esquema das possíveis aplicações para a curcumina em estudo28
Figura 4 - Esquema para os diferentes produtos contendo curcumina encontrados no mercado
Figura 5 - Esquema para escala de medida31
Figura 6 - Fluxograma (A) método de obtenção de nanopartículas de curcumina com solvente E e (B) método de obtenção de nanopartículas de curcumina com solvente C
Figura 7 - Fotografias digitais da curcumina comercial e das amostras de nanopartículas de curcumina: (A) curcumina comercial, (B) NEA, (C) NES, (D) NCA e (E) NCS
Figura 8 - Gráfico do rendimento das nanopartículas de curcumina: <b>NEA</b> , <b>NES</b> , <b>NCA</b> e <b>NCS</b>
Figura 9 - Espectros no infravermelho de: curcumina comercial (—), <b>NEA</b> (—) e <b>NES</b> (—).
Figura 10 - Espectro no infravermelho de: curcumina comercial (—), <b>NCA</b> (—) e <b>NCS</b>
Figura 11 - Efeito Tyndall nas amostras em meio aquoso (0,8 mg mL <sup>-1</sup> ): <b>(A)</b> curcumina comercial, <b>(B) NEA</b> , <b>(C) NES</b> , <b>(D) NCA</b> e <b>(E) NCS</b> 55
Figura 12 - Distribuição de tamanho por DLS da amostra de curcumina comercial em meio aquoso (0,8 mg mL <sup>-1</sup> )58
Figura 13 - Distribuição de tamanho por DLS das amostras em meio aquoso (0,8 mg mL <sup>-1</sup> ): <b>(A) NEA</b> e <b>(B) NES</b> 58

Figura 14 - Distribuição de tamanho por DLS das amostras em meio aquoso (0,8 mg mL <sup>-1</sup> ): <b>(A) NCA</b> e <b>(B) NCS</b> 59
Figura 15 - Distribuição de tamanho por DLS das amostras em meio ISCOVE'S (0,8 mg mL <sup>-1</sup> ): <b>(A)</b> meio ISCOVE'S, <b>(B)</b> curcumina comercial, <b>(C) NEA</b> , <b>(D) NES</b> , <b>(E) NCA</b> e <b>(F) NCS</b> .
Figura 16 - Distribuição de tamanho por DLS das amostras em meio ISCOVE'S (0,8 mg mL <sup>-1</sup> ) após 24 horas: <b>(A)</b> curcumina comercial, <b>(B) NEA</b> , <b>(C) NES</b> , <b>(D) NCA</b> e <b>(E) NCS</b>
Figura 17 - Imagens de topografia por microscopia de força atômica das amostras de nanopartículas de curcumina e da curcumina comercial (0,8 mg mL <sup>-1</sup> ), depositadas em substrato de mica: <b>(A)</b> Mica vazia, <b>(B)</b> Curcumina comercial, <b>(C)</b> NEA, <b>(D)</b> NES <b>(E)</b> NCA e <b>(F)</b> NCS.
Figura 18 - Imagens de fase por microscopia de força atômica das amostras de nanopartículas de curcumina e da curcumina comercial (0,8 mg mL <sup>-1</sup> ), depositadas em substrato de mica: <b>(A)</b> Mica vazia, <b>(B)</b> Curcumina comercial, <b>(C)</b> NEA, <b>(D)</b> NES <b>(E)</b> NCA e <b>(F)</b> NCS
Figura 19 - Imagem de topografia por microscopia de força atômica da amostra <b>NEA</b> (0,8 mg mL <sup>-1</sup> ), depositadas em substrato de mica com a determinação de diâmetro de partículas (n=30)
Figura 20 - Absorbância em função do tempo de degradação para as amostras em meio aquoso (0,8 mg mL <sup>-1</sup> ) de: curcumina comercial (—), <b>NEA</b> (—), <b>NES</b> (—), <b>NCA</b> (—) e <b>NCS</b> (—).
Figura 21 - Espectros na região do ultravioleta-vis das amostras em meio aquoso (pH 6,1) na concentração de 0,8 mg mL <sup>-1</sup> para: <b>(A)</b> Curcumina comercial (—); <b>(B)</b> nanopartículas <b>NEA</b> (—) e <b>NES</b> (—) e <b>(C)</b> nanopartículas <b>NCA</b> (—) e <b>NCS</b> (—)72
Figura 22 - <b>(A)</b> Espectros na região do ultravioleta para a amostra <b>NEA</b> nas concentrações de 3,2 mg mL <sup>-1</sup> (—), 1,6 mg mL <sup>-1</sup> (—), 0,8 mg mL <sup>-1</sup> (—); 0,4 mg mL <sup>-1</sup> (—), 0,2 mg mL <sup>-1</sup> (—), 0,05 mg mL <sup>-1</sup> (—) e 0,02 mg mL <sup>-1</sup> (—) e <b>(B)</b> Curva da absorbância à 280 nm em função da concentração da amostra <b>NEA</b>
Figura 23 - <b>(A)</b> Espectroscopia na região do ultravioleta para a amostra <b>NES</b> nas concentrações de 3,2 mg mL <sup>-1</sup> (—), 1,6 mg mL <sup>-1</sup> (—), 0,8 mg mL <sup>-1</sup> (—); 0,4 mg mL <sup>-1</sup>

(—), 0,2 mg mL <sup>-1</sup> (—), 0,05 mg mL <sup>-1</sup> (—) e 0,02 mg mL <sup>-1</sup> (—) e <b>(B)</b> Curva da absorbância à 280 nm em função da concentração da amostra <b>NES</b> 73
Figura 24 - <b>(A)</b> Espectroscopia na região do ultravioleta para a amostra <b>NCA</b> nas concentrações de 3,2 mg mL <sup>-1</sup> (—), 1,6 mg mL <sup>-1</sup> (—), 0,8 mg mL <sup>-1</sup> (—); 0,4 mg mL <sup>-1</sup> (—), 0,2 mg mL <sup>-1</sup> (—), 0,05 mg mL <sup>-1</sup> (—) e 0,02 mg mL <sup>-1</sup> (—) e <b>(B)</b> Curva da absorbância à 280 nm em função da concentração da amostra <b>NCA</b>
Figura 25 - <b>(A)</b> Espectros na região do ultravioleta para a amostra <b>NCS</b> nas concentrações de 3,2 mg mL <sup>-1</sup> (—), 1,6 mg mL <sup>-1</sup> (—), 0,8 mg mL <sup>-1</sup> (—); 0,4 mg mL <sup>-1</sup> (—), 0,2 mg mL <sup>-1</sup> (—), 0,05 mg mL <sup>-1</sup> (—) e 0,02 mg mL <sup>-1</sup> (—) e <b>(B)</b> Curva da absorbância à 280 nm em função da concentração da amostra <b>NCS</b>
Figura 26 - <b>(A)</b> Espectro de fluorescência da curcumina comercial (—) e <b>NEA</b> nas concentrações de 50,0 mg mL <sup>-1</sup> (—), 25,0 mg mL <sup>-1</sup> (—), 12,5 mg mL <sup>-1</sup> (—), 6,2 mg mL <sup>-1</sup> (—), 3,2 mg mL <sup>-1</sup> (—),1,6 mg mL <sup>-1</sup> (—) e 0,5 mg mL <sup>-1</sup> (—) com excitação em 420nm e <b>(B)</b> Curva de λ máximo em função da concentração da amostra <b>NEA</b> 75
Figura 27 - <b>(A)</b> Espectro de fluorescência da curcumina comercial (—) e <b>NES</b> nas concentrações de 25,0 mg mL <sup>-1</sup> (—), 12,5 mg mL <sup>-1</sup> (—), 6,2 mg mL <sup>-1</sup> (—), 3,2 mg mL <sup>-1</sup> (—), 1,6 mg mL <sup>-1</sup> (—) e 0,5 mg mL <sup>-1</sup> (—) com excitação em 420nm e <b>(B)</b> Curva de λ máximo em função da concentração da amostra <b>NES</b>
Figura 28 - <b>(A)</b> Espectro de fluorescência da curcumina comercial (—) e <b>NCA</b> nas concentrações de 50,0 mg mL <sup>-1</sup> (—), 25,0 mg mL <sup>-1</sup> (—), 12,5 mg mL <sup>-1</sup> (—), 6,2 mg mL <sup>-1</sup> (—), 3,2 mg mL <sup>-1</sup> (—), 1,6 mg mL <sup>-1</sup> (—) e 0,5 mg mL <sup>-1</sup> (—) com excitação em 420nm e <b>(B)</b> Curva de λ máximo em função da concentração da amostra <b>NCA</b> 75
Figura 29 - <b>(A)</b> Espectro de fluorescência da curcumina comercial (—) e <b>NCS</b> nas concentrações de 25,0 mg mL <sup>-1</sup> (—), 12,5 mg mL <sup>-1</sup> (—), 6,2 mg mL <sup>-1</sup> (—), 3,2 mg mL <sup>-1</sup> (—), 1,6 mg mL <sup>-1</sup> (—) e 0,5 mg mL <sup>-1</sup> (—) com excitação em 420nm e <b>(B)</b> Curva de λ máximo em função da concentração da amostra <b>NCS</b>
Figura 30 - Gráfico da viabilidade celular nas linhagens VERO (A) e HEp-2 (B) para a curcumina comercial e as amostras, NEA ( ), NES ( ), NCA ( ) e NES ( ). Resultados expressos em porcentagem de células viáveis
Figura 31 - Imagem da membrana de gelatina/nanopartículas de curcumina recoberta com Eudragit S100®80

Figura 32 - Fotomicrografias da membrana de gelatina/nanopartículas de curcumina		
sem recobrimento: (A) superfície, (B) transversal e (C) transversal	.81	
Figura 33 - Fotomicrografias da membrana de gelatina/nanopartículas de curcum		
recoberta com Eudragit S100®: (A) superfície, (B) transversal e (C) transversal		
Figura 34 - Perfil de liberação da membrana de gelatina/nanopartículas		
curcumina recoberta com Eudragit S100®: (■) pH 7,5 e (■) pH 2,0	.82	

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Bandas (cm <sup>-1</sup> ) características no espectro de infravermelho para curcumina comercial e amostras de nanopartículas
Tabela 2 - Potencial Zeta para as amostras de nanopartículas de curcumina e curcumina comercial (0,8 mg mL <sup>-1</sup> ) quando em diferentes meios, por DLS
Tabela 3 - Tamanho médio (nm) e PDI das amostras de nanopartículas de curcumina e da curcumina comercial em meio aquoso (0,8 mg mL <sup>-1</sup> ), por DLS59
Tabela 4 - Tamanho médio (nm) e PDI das amostras de nanopartículas de curcumina e da curcumina comercial em meio ISCOVE'S (0,8 mg mL <sup>-1</sup> ) no tempo zero, por DLS.
Tabela 5 - Tamanho médio (nm) e PDI das amostras de nanopartículas de curcumina e da curcumina comercial em meio ISCOVE'S (0,8 mg mL <sup>-1</sup> ) após 24 h por DLS
Tabela 6 - Diâmetro das amostras de nanopartículas de curcumina e da curcumina comercial (0,8 mg mL <sup>-1</sup> ) obtido por medida das imagens de topografia de AFM68
Tabela 8 - Solubilidade da curcumina comercial e das nanopartículas, <b>NEA</b> , <b>NES NCA</b> e <b>NCS</b>
Tabela 7 - Fotodegradação para a curcumina comercial e para as nanopartículas de curcumina
Tabela 9 - Índice de sobrevivência celular da linhagem VERO para cada amostra de nanopartículas de curcumina comercial nas três diferentes concentrações e para a curcumina comercial em concentração 100 μM86
Tabela 10 - Índice de sobrevivência celular da linhagem HEp-2 para cada amostra de nanopartículas de curcumina comercial nas três diferentes concentrações e para a curcumina comercial em concentração 100 μΜ87

### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

λmax – comprimento de onda no máximo de absorção

ε - absortividade molar

(NF)-κB - fator nuclear kappa B

A - absorbância

AFM - atomic force microscope (microscopia de força atômica)

APSP - antisolvent precipitation with a syringe pump (precipitação anti-solvente com bomba de seringa)

ATCC - american type culture collection

C - concentração da amostra

CO2 - dióxido de carbono

COX-2 - cicloxigenase-2

DLS - dynamic light scattering (espalhamento de luz dinâmico)

DMSO - dimethyl sulfoxide (dimetilsulfóxido)

DP - desvio padrão

EDTA - etilenodiaminotetraacetato de sódio

EPN - evaporative precipitation of nanosuspension (precipitação evaporativa de nanosuspensão)

FTIR - fourier transform infrared spectroscopy (infravermelho por transformada de Fourier)

GSK3b - glycogen synthase kinase 3 beta (enzima glicogênio sintase quinase 3 beta)

HIV - human immunodeficiency virus (vírus da imunodeficiência humana)

IS - índice de sobrevivência

KBr - brometo de potássio

I - caminho óptico

MEV - microscopia eletrônica de verredura

MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio)

NIPAAM - N-isopropylacrylamide (N-isopropilacrilmida)

PA - pureza analítica

PBS - phosphate buffered saline (tampão de fosfato salino)

PDI - índice de polidispersidade

PEG - polyethylene glycol (polietileno glicol)

PEG-A - acrylamide-polyethylene glycol (poli(etilenoglicol)monoacrilato)

pH - potencial hidrogenionico

PLGA - poly(lactide-co-glycolide) (ácido poli-(láctico-coglicólico))

PVP K-30 - polyvinylpyrrolidone (polivinilpirrolidona)

ROS - reactive oxygen species (espécies de oxigênio reativo)

Rpm - rotação por minuto

UI - unidades internacionais

UV-vis - ultravioleta-visível

v - volume

VP - N-vinyl-2-pirrolidone (N-vinil-2-pirrolidona)

# SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	15
SUMÁRIO	17
1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	22
3 JUSTIFICATIVA	23
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
4.1 Curcumina	25
4.2 Nanotecnologia	30
4.3 Sistemas de liberação de fármacos	32
4.3.1 Processos de obtenção de nanopartículas	37
4.4 Nanotecnologia viabilizando o uso da curcumina	38
5 MATERIAIS E MÉTODOS	41
5.1 Materiais utilizados	41
5.2 Obtenção de nanopartículas de curcumina	41
5.3 Espectroscopia no infravermelho (FTIR)	42
5.4 Preparo das amostras e análise de efeito Tyndall	43
5.5 Análise do potencial Zeta	43
5.6 Análise por espalhamento de luz dinâmico (DLS)	43
5.7 Análise por Microscopia de Força Atômica (AFM)	44

5.8 Teste de fotodegradação	44
5.9 Ensaio de solubilidade	45
5.10 Espectroscopia no ultravioleta/visível (UV-vis)	45
5.11 Espectroscopia de fluorescência	45
5.12 Ensaio de citotoxicidade	46
5.12.1 Linhagens celulares	46
5.12.2 Preparo das placas de cultura	46
5.12.3 Preparo das amostras	47
5.12.4 Ensaio de citotoxicidade celular	47
5.12.5 Análise estatística	48
5.13 Obtenção de membranas de gelatina/nanopartículas de cu recobertas com Eudragit S-100®	
 5.13.1 Preparo das membranas de gelatina/nanopartículas de cu	
5.13.2 Recobrimento das membranas com Eudragit S-100®	49
5.14 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	49
5.15 Teste in vitro de liberação	50
5.15.1 Curva de Calibração	50
5.15.2 Ensaio de liberação	50
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
6.1 Obtenção de nanopartículas	51
6.2 Espectroscopia no infravermelho (FTIR)	52
6.3 Análise de efeito Tyndall	54
6.4 Análise do potencial Zeta	55
6.5 Análise por espalhamento de luz dinâmico (DLS)	57
6.6 Análise por Microscopia de Força Atômica (AFM)	64
6.6.1 Imagens topográficas por AFM	64
6.6.2 Determinação de diâmetro das partículas	67

	6.7 Teste de fotodegradação	69
	6.8 Ensaio de solubilidade	70
	6. 9 Espectroscopia no ultravioleta/visível (UV-vis)	71
	6.10 Espectroscopia de fluorescência	74
	6.11 Ensaio de citotoxicidade	77
	6.12 Obtenção de membranas de gelatina/nanopartículas de	curcumina
	recobertas com Eudragit S-100®	79
	6.13 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	80
	6.14 Teste in vitro de liberação	82
7	CONCLUSÃO	84
8	3 ANEXOS	85
R	REFERÊNCIAS	88

Introdução 20

### 1 INTRODUÇÃO

Curcumina é o principal bioativo extraído do rizoma da *Curcuma longa* Linn (*Zingiberaceae*), popularmente conhecida como açafrão (BASNET; ŠKALKO-BASNET, 2011). É muito utilizada na culinária indiana e por séculos foi empregada na medicina Ayurveda para tratar diversas enfermidades. Atualmente é utilizada na indústria de alimentos como agente flavorizante, preservante e corante.

Esse ativo é um polifenol de fórmula química C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>, massa molar de 368,38 q mol<sup>-1</sup> e com ponto de fusão de 183°C (SHISHODIA; CHATURVEDI; AGGARWAL, 2007). É denominada [(E,E)-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-1,6heptadieno-3,5-dional, sendo praticamente insolúvel em água (SHISHODIA; CHATURVEDI: AGGARWAL, 2007; BASNET; ŠKALKO-BASNET, 2011). O extrato alcóolico da Curcuma longa contém três curcuminóides principais, sendo eles a curcumina, a desmetoxicurcumina e a bisdesmetoxicurcumina, os quais constituem aproximadamente 3 a 5% (m/m) da maioria das preparações de cúrcuma e fornece a coloração amarela ao pó (BASNET; ŠKALKO-BASNET, 2011). A curcumina disponível comercialmente é composta pela mistura de 75-80% (massa/massa) de curcumina, 15-20% (massa/massa) de desmetoxicurcumina e 3-5% (massa/massa) de bisdesmetoxicurcumina (AHMED; GILANI, 2014). Estudos apontaram efeito sinérgico entre elas, mostrando uma melhora na atividade nematicida e no combate da doença de Alzheimer (KIUCHI et al., 1993; ANDERSON; MITCHELL; MOHAN, 2000; AHMED; GILANI, 2014). Além do efeito sinérgico entre os curcuminóides, a curcumina comercial tem um custo muito inferior. Com isso, o emprego da curcumina comercial em estudos pode, além de manter suas propriedades medicinais, gerar produtos com custo final mais acessível.

Atualmente, estudos mostraram que a curcumina combate diversas doenças, possui atividade antioxidante, anti-inflamatória, anti-HIV, antimicrobiana, antiangiogênica e antitumoral (JI; HUANG; ZHU, 2012; NAKSURIYA *et al.*, 2014; PRASAD; TYAGI; AGGARWAL, 2014; VISHVAKARMA, 2014). Além disso, a curcumina não apresenta toxicidade, possuindo um perfil de segurança ótimo para a administração oral de altas doses (ANAND *et al.*, 2007; NAKSURIYA *et al.*, 2014). Entretanto, apesar de possuir inúmeras propriedades medicinais, esse composto

Introdução 21

apresenta uma enorme limitação em sua aplicação clínica relacionada com sua baixa solubilidade em água, bem como sua pouca biodisponibilidade e rápida metabolização (ANAND et al., 2007; NAKSURIYA et al., 2014; SUN et al., 2014).

Para viabilizar sua aplicação clínica novos estudos de formulações e sistemas de direcionamento de fármacos são necessários. Muitas dessas pesquisas são feitas na área da nanotecnologia, na qual materiais de tamanho nanométrico nanomateriais - são obtidos, e esse tamanho reduzido mostra expressiva mudança em suas propriedades físicas e químicas (THORLEY; TETLEY, 2013; TIAN et al., 2013). Como exemplos de estudos que estão sendo feitos com o objetivo de obter um produto final com uma melhor biodisponibilidade da curcumina temos: nanopartículas poliméricas, lipossomas, hidrogéis, microemulsões, nanoconjugados e nanocápsulas (SUN et al., 2012).

Diante disso, este estudo visou à obtenção de nanopartículas a partir de curcumina comercial por diferentes procedimentos de nanodimensionamento e sua caracterização, tendo em vista o aumento de sua solubilidade. Com isso, a sua aplicação clínica seria factível e o custo do produto final seria mais baixo. Além disso, foi proposto um modelo de transporte para as nanopartículas através de membranas de gelatina/nanopartículas de curcumina recobertas com Eudragit S-100® visando a liberação dessas nanopartículas em pH específico.

*Objetivos* 22

### **2 OBJETIVOS**

Este trabalho teve como objetivo geral a obtenção e caracterização de nanopartículas de curcumina, com a finalidade de melhorar a sua solubilidade para aplicação na clínica médica. Como exemplo de aplicação, foi proposto o preparo de uma membrana de gelatina/nanopartículas de curcumina recobertas com Eudragit S-100® com estudo inicial de liberação *in vitro* em diferentes pHs.

Justificativa 23

### 3 JUSTIFICATIVA

A curcumina é uma substância natural que apresenta diversas propriedades medicinais, entre elas a atividade antitumoral (JI; HUANG; ZHU, 2012; NAKSURIYA et al., 2014; VISHVAKARMA, 2014) e combatendo a doença de Alzheimer (AHMED; GILANI, 2014). Entretanto, esse bioativo possui uma solubilidade limitada, o que restringe sua aplicação clínica (SUN et al., 2014). Visando solucionar esse problema, estudos para obter nanopartículas de curcumina estão sendo feitos, os quais empregam principalmente procedimentos que utilizam, por exemplo, polímeros, lipídeos e altas concentrações de solventes. Além disso, na maioria dessas pesquisas a curcumina utilizada é a isolada, ou seja, aquela que não possui outro curcuminóide junto, o que encarece sua aplicação.

Neste trabalho, focou-se na obtenção de nanopartículas de curcumina através de procedimentos que não empregam grande quantidade de solvente ou qualquer outra substância além da curcumina. Para isso, foram utilizados dois procedimentos, um por agitação magnética e outro por sonicação, com variação do solvente.

Outro diferencial deste trabalho foi obter as nanopartículas a partir de curcumina comercial, a qual consiste na mistura de três curcuminóides. Estudos recentes apontaram efeito semelhante entre a curcumina comercial e a isolada (AHMED; GILANI, 2014), porém a comercial tem um custo inferior ao da curcumina isolada, o que viabilizaria muito sua aplicação na clínica.

Logo, este trabalho baseou-se na obtenção de nanopartículas de curcumina visando melhorar a solubilidade deste bioativo. Com isso, a sua aplicação clínica seria factível e o custo do produto final seria mais baixo.

Uma das aplicações para essas nanopartículas seria no tratamento do câncer, como o do intestino. Neste caso, as nanopartículas de curcumina devem percorrer todo o trato gastrointestinal sem perder sua atividade e atingir o intestino para sua possível atuação, e neste caso o pH é acima de 7,0 (HUA *et al.*, 2015). Para tanto foi sugerido um modelo de transporte desse bioativo, o qual protege as nanopartículas na parte superior do trato gastrointestinal. Assim, as nanopartículas

Justificativa 24

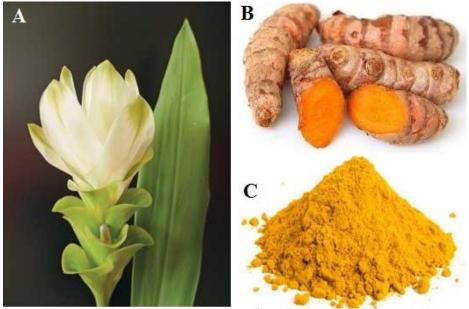
de curcumina foram dispersas em gelatina com posterior recobrimento com Eudragit S100®, cuja solubilidade só ocorre a pH acima de 7,0 (KHATIK *et al.*, 2013).

### **4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### 4.1 Curcumina

Curcuma longa Linn, da família Zingiberaceae, é uma planta perene de haste curta com cerca de 100 cm de altura, que possuí belas flores brancas e rizomas cilíndricos (BASNET; ŠKALKO-BASNET, 2011), como pode ser observado na Figura 1. Esta planta é amplamente cultivada na Índia, na China e no sudeste da Ásia, devido ao clima tropical e subtropical, sendo a Índia o maior produtor de cúrcuma com uma produção de aproximadamente 80% (ROHMAN, 2012). Na culinária indiana é popularmente conhecida como açafrão e o principal polifenol biologicamente ativo extraído de seu rizoma é a curcumina.

Figura 1 - (A) Curcuma longa Linn: planta com flor, (B) rizoma e (C) curcumina em pó.



Fonte: Adaptado de BASNET e ŠKALKO-BASNET, 2011.

Em 1748, foi publicado o primeiro artigo científico referente à *Curcuma spp.* e 67 anos depois apareceu a primeira revisão farmacológica sobre a cúrcuma (BASNET; ŠKALKO-BASNET, 2011). Vogel e Pelletier em 1815 realizaram a primeira tentativa de purificação da curcumina e quase um século depois, em 1910, foi estabelecida sua estrutura como diferuloilmetano (JI; HUANG; ZHU, 2012; SUN

et al., 2014). Sua estrutura química foi confirmada em 1973 por Roughley e Whiting (ROUGHLEY; WHITING, 1973); e o primeiro uso documentado como fármaco foi em 1937 para o tratamento de doença biliar (JI; HUANG; ZHU, 2012).

Curcumina é um polifenol denominado  $[(E,E)-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona], de fórmula química <math>C_{21}H_{20}O_6$ , massa molar de 368,38 g mol<sup>-1</sup> e com ponto de fusão a 183°C (SHISHODIA; CHATURVEDI; AGGARWAL, 2007). É pouco solúvel em dimetilsulfóxido (DMSO), etanol e acetona sendo praticamente insolúvel em água (BASNET; ŠKALKO-BASNET, 2011).

Por séculos a curcumina foi utilizada na medicina tradicional indiana, conhecida como Ayurveda, para tratar diversas enfermidades, como anorexia, reumatismo, doenças de pele, dores no corpo, vermes intestinais, diarreia, desordens hepáticas, dispepsia, febre intermitente, tosse, coriza, inflamação, sinusite, amenorreia e constipação, bem como para várias condições respiratórias (asma, hiperatividade bronquial e alergia) (BASNET; ŠKALKO-BASNET, 2011; PRASAD; TYAGI; AGGARWAL, 2014). Atualmente é utilizada na indústria de alimentos como agente flavorizante, preservante e corante.

O extrato alcóolico da *Curcuma longa* contém três curcuminóides principais, sendo eles a curcumina, a desmetoxicurcumina e a bisdesmetoxicurcumina (Figura 2), os quais constituem aproximadamente 3 a 5% da maioria das preparações de cúrcuma e fornece a coloração amarela ao pó (BASNET; ŠKALKO-BASNET, 2011). A curcumina disponível comercialmente é composta pela mistura desses três curcuminóides, sendo a proporção de 75-80% (m/m) de curcumina, 15-20% (m/m) de desmetoxicurcumina e 3-5% (m/m) de bisdesmetoxicurcumina (AHMED; GILANI, 2014).

Figura 2 - Estrutura química dos curcuminóides.

Bisdesmetoxicurcumina

Fonte: Adaptado de BASNET e ŠKALKO-BASNET, 2011.

Estudos recentes apontaram efeito sinérgico entre os curcuminóides, mostrando uma melhora na atividade nematicida (KIUCHI et al., 1993; ANDERSON; MITCHELL; MOHAN, 2000) e também no combate da doença de Alzheimer (AHMED; GILANI, 2014). O estudo de Ahmed e Gilani (2014) mostrou ainda que a curcumina isolada pode ser menos efetiva do que a mistura dos três curcuminóides – curcumina comercial – uma vez que cada composto apresenta individualmente uma determinada atividade farmacológica atuando em alvos específicos, complementado a ação um do outro e permitindo assim uma atuação por diversas vias, o que ocasiona propriedades cumulativas ou sinérgicas. Por esse motivo, a curcumina comercial oferece melhor potencial terapêutico para o tratamento da doença de Alzheimer quando comparada com a curcumina isolada (AHMED; GILANI, 2014).

Além do efeito sinérgico entre os curcuminóides que potencializa as propriedades terapêuticas, a curcumina comercial tem um custo inferior. A curcumina isolada, também chamada de pura, tem o valor médio de R\$ 196,00 a cada 5 g (Sigma Aldrich, 2014). Já a curcumina comercial, ou seja, a mistura dos curcuminóides, o valor é de cerca de R\$ 1,25 o pacote de 5 g em farmácias de manipulação. Sendo assim, o emprego da curcumina comercial em estudos poderá gerar produtos com um custo final mais acessível, além de manter ou potencializar suas propriedades medicinais.

Estudos mostraram que a curcumina apresentou atividade farmacológica contra diabetes tipo II, artrite reumatoide, fibrose cística, esclerose múltipla e aterosclerose (JI; HUANG; ZHU, 2012; NAKSURIYA et al., 2014). A curcumina também inibe a agregação plaquetária, suprimi trombose, protege contra formação da catarata e melhora a cicatrização de feridas (NAKSURIYA et al., 2014). Ainda possui atividade antioxidante, anti-inflamatória, anti-HIV e antimicrobiana (NAKSURIYA et al., 2014; PRASAD; TYAGI; AGGARWAL, 2014) (Figura 3).

Outra atividade que tem sido extensivamente estudada é a atividade antitumoral, colocando-a como um agente em potencial tanto para a prevenção quanto para o tratamento de uma grande variedade de cânceres incluindo gastrointestinal, cólon, pancreático, fígado, melanoma, genito-urinário, próstata, mama, linfoma, ovário, pulmão, leucemia, cabeça e pescoço, neurológico e sarcoma (JI; HUANG; ZHU, 2012; NAKSURIYA *et al.*, 2014; VISHVAKARMA, 2014).

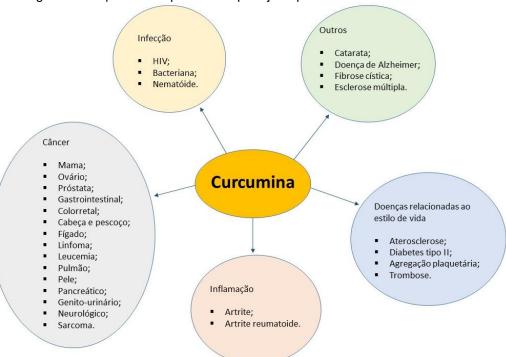


Figura 3 - Esquema das possíveis aplicações para a curcumina em estudo.

Fonte: Autoria própria.

Por conta de suas excelentes propriedades medicinais, a curcumina é comercializada por mais de 100 indústrias farmacêuticas em diversos países, incluindo Estados Unidos, Japão, Índia, Coréia, Tailândia, China, Turquia, África do Sul, Nepal e Paquistão, em diferentes formas como cápsula, tablete, pomada, creme, extrato, gel, spray nasal e como cosméticos, seja para necessidades diárias ou médicas (YALLAPU; JAGGI; CHAUHAN, 2012; PRASAD; TYAGI; AGGARWAL, 2014) (Figura 4).

Figura 4 - Esquema para os diferentes produtos contendo curcumina encontrados no mercado.



Fonte: Adaptado de PRASAD, TYAGI e AGGARWAL, 2014.

Estudos sugerem que os efeitos biológicos desse polifenol se devem a sua habilidade de modular o estado redox intracelular, bem como de ligar-se diretamente em diversas proteínas como a lipoxigenase, cicloxigenase-2 (COX-2), enzima glicogênio sintase quinase 3 beta (GSK3b) e várias outras enzimas regulatórias (JI; HUANG; ZHU, 2012). Enquanto que a ação anti-inflamatória da curcumina se deve principalmente a habilidade de inibir o fator de transcrição (NF)-kB (fator nuclear kappa B), que tem papel central nas vias de sinalização celular inflamatória e também na atividade antitumoral desse polifenol (VISHVAKARMA, 2014).

A potente atividade antioxidante da curcumina deve-se a sua habilidade de regular citocinas pró-inflamatórias e fatores de transcrição, e através disso eliminar espécies de oxigênio reativo (ROS), como os radicais O<sub>2\*</sub>-, OH•, NO•, ONOO•- (BASNET; ŠKALKO-BASNET, 2011). Essa atividade antioxidante da curcumina auxilia em sua ação antitumoral, pois ROS estão envolvidas na fisiopatologia de inflamações crônicas e desordens degenerativas, como o câncer. Já em nível molecular, a curcumina não só inibi a proliferação celular e a metástase, mas também induz a apoptose por modulação de vários fatores pró-inflamatórios, fatores de crescimento, receptores, fatores de transcrição e proteínas quinases (NAKSURIYA *et al.*, 2014).

Por conta de suas diversas propriedades pleiotrópicas, ou seja, sua capacidade de modulação de várias moléculas sinalizadoras sugere-se que a curcumina seja mais efetiva para combater o câncer do que os tratamentos tradicionais que atuam em uma única via (NAKSURIYA et al., 2014; PRASAD; TYAGI; AGGARWAL, 2014). Embora diversos estudos tenham sido feitos, os mecanismos da ação antitumoral da curcumina continuam longe de serem completamente entendidos, visto que o processo da biologia tumoral é extremamente complexo (VISHVAKARMA, 2014). Além disso, apesar de possuir inúmeras propriedades medicinais, esse composto apresenta uma enorme limitação em sua aplicação clínica relacionada com sua baixa solubilidade em água, bem como sua pouca biodisponibilidade e rápida metabolização.

O consumo médio de cúrcuma pela população na Índia é maior que 2,5 g por dia, o que corresponde a aproximadamente 100 mg de curcumina; mesmo com esse consumo diário, estudos não relataram possível toxicidade ou efeitos adversos

(BASNET; ŠKALKO-BASNET, 2011). A curcumina também possui um perfil de segurança ótimo para a administração oral de altas doses, existindo uma tolerância de doses de 12 g por dia em humanos (ANAND *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2012; NAKSURIYA *et al.*, 2014). Por conta de seu perfil de toxicidade e segurança, e baseado em vários ensaios clínicos, a dose recomendada para a administração de curcumina deve ser entre 4 e 8 g, sendo possível assim obter o máximo de efeitos terapêuticos (BASNET; ŠKALKO-BASNET, 2011).

A curcumina pode atravessar livremente a membrana celular devido sua lipofilicidade, contudo, essa substância apresenta uma solubilidade muito baixa em meio aquoso e é susceptível a degradação em meio alcalino e quando exposta à luz (SOUZA; OSME; GLÓRIA, 1997; PARIZE, 2009; NAKSURIYA *et al.*, 2014). Estudo feito em 1978 por Wahlstrom e Blennow mostrou que após administração oral de 1 g/kg de curcumina em ratos Sprague-Dawley, quantidades insignificantes de concentração de curcumina foram observadas no plasma sanguíneo (WAHLSTRÖM; BLENNOW, 1978). Recentemente foi observado que a administração oral de curcumina em ratos na dose de 1000 mg/kg mostrou uma concentração no plasma sanguíneo de 15 ng mL<sup>-1</sup> após 50 minutos (CHANG *et al.*, 2013). Já a administração oral de 4 a 8 g de curcumina em humanos mostrou um pico de 0,41-1,75 μmol L<sup>-1</sup> no plasma após 1 hora (CHEN *et al.*, 2001).

Características como a baixa atividade intrínseca, pouca absorção, altas taxas de metabolismo, inatividade dos produtos metabólicos e/ou rápida eliminação e *clearence* do organismo influenciam criticamente a baixa biodisponibilidade da curcumina, resultando em uma concentração sanguínea abaixo da ideal o que limita seu grande potencial terapêutico (ANAND *et al.*, 2007; NAKSURIYA *et al.*, 2014; SUN *et al.*, 2014). Devido a essa baixa biodisponibilidade sistêmica após a administração oral da curcumina, diversos estudos na área da nanotecnologia estão sendo feitos na tentativa de solucionar esse problema.

#### 4.2 Nanotecnologia

Nanotecnologia pode ser definida como a ciência que envolve o planejamento, síntese, caracterização e aplicação de materiais e dispositivos que possuem dimensões na escala nanométrica (WEISSIG; PETTINGER; MURDOCK,

2014). Um nanômetro equivale a um bilionésimo de metro (10<sup>-9</sup> m) e tem como unidade nm (Figura 5). O prefixo "nano" vem do grego e significa "anão" (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007), enquanto que o termo nanodimensionamento refere-se a redução do tamanho da partícula do ativo farmacológico abaixo da faixa submicrométrica, a qual varia do tamanho de 10 a 1000 nm (SUN *et al.*, 2012).

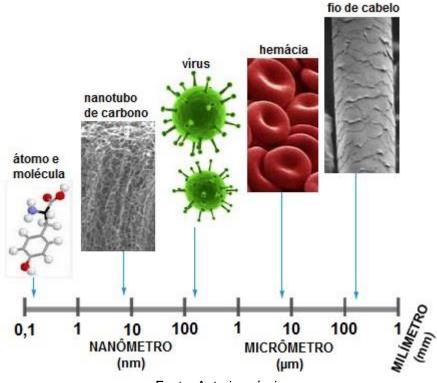


Figura 5 - Esquema para escala de medida.

Fonte: Autoria própria.

Os primeiros conceitos de nanotecnologia foram introduzidos pelo físico americano Richard Feynman em sua famosa palestra "There´s plenty of room at the bottom", no ano de 1959 (SAFARI; ZARNEGAR, 2014). Nesta palestra Feynman explorou a ideia de manipular a matéria na escala de átomos e moléculas individuais, comparando com o ato de escrever toda a enciclopédia britânica na cabeça de um alfinete. Entretanto, o termo "nanotecnologia" foi criado somente em 1974 por Norio Taniguchi, pesquisador da universidade de Tóquio e foi usado para descrever a habilidade de se criar materiais na escala nanométrica (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007).

A nanotecnologia é uma área em rápida expansão, sendo tratada como a tecnologia do presente. É considerada um dos mais importantes campos da ciência dos materiais, pois, a partir dela, pesquisadores estão conseguindo entender e

manipular materiais na escala de átomos e moléculas, para aplicar nos mais diversos campos (TIAN et al., 2013; SAFARI; ZARNEGAR, 2014).

As estruturas com dimensões dentro da escala nanométrica - nanomateriais - são projetadas através de procedimentos que exibem absoluto controle sobre suas características químicas e físicas (TIAN *et al.*, 2013; SAFARI; ZARNEGAR, 2014). Devido a esse tamanho extremamente reduzido as propriedades químicas e físicas (como propriedade ótica, elétrica, térmica e magnética) do nanomaterial tornam-se únicas, apresentando mudanças expressivas quando comparado ao material na macroescala e trazendo vantagens em sua aplicação (THORLEY; TETLEY, 2013; TIAN *et al.*, 2013).

Pesquisas de novos nanomateriais podem trazer avanços em diferentes áreas, como na engenharia, química, física, medicina, biologia e robótica. Entretanto um campo em particular que a aplicação de novos nanomateriais tem o potencial de revolucionar é a medicina; também conhecida como nanomedicina, que serve para monitorar, reparar, construir e controlar sistemas biológicos a nível molecular, através do uso de nanocomponentes e nanossistemas (DRBOHLAVOVA *et al.*, 2013; THORLEY; TETLEY, 2013). A nanomedicina é o mais novo membro do ramo da nanotecnologia molecular e pode trazer avanços tecnológicos não somente no desenvolvimento de novos fármacos, mas também na reformulação daqueles já existentes, visando melhorar sua eficácia, direcionamento e diminuir os efeitos colaterais (DRBOHLAVOVA *et al.*, 2013; THORLEY; TETLEY, 2013).

### 4.3 Sistemas de liberação de fármacos

Desde seu surgimento em 1970, sistemas de liberação controlada de fármacos têm atraído crescente atenção (SAFARI; ZARNEGAR, 2014). O objetivo desses sistemas é transportar quantidades adequadas de fármaco para sítios específicos, como por exemplo um tumor, e liberar a substância ativa em doses e período de tempo específicos, o que minimiza possíveis efeitos adversos em tecidos saudáveis (SAFARI; ZARNEGAR, 2014).

O desenvolvimento de novos materiais com auxílio da nanotecnologia tem contribuído para o avanço dos sistemas de liberação controlada, ocasionando assim um maior desenvolvimento nessa área (THORLEY; TETLEY, 2013; ZHANG; CHAN;

LEONG, 2013). Estruturas mais complexas e sistemas biodegradáveis, biocompatíveis, responsivos ao ambiente e com liberação direcionada para um alvo específico vêm sendo desenvolvidos através de pesquisas da química de materiais (ZHANG; CHAN; LEONG, 2013). Além disso, sistemas de direcionamento em micro e nanoescala são considerados promissores, pois podem aumentar a eficácia de tratamentos terapêuticos devido a sua habilidade de detectar e responder rapidamente a determinadas condições de doenças diretamente no alvo, sem atingir células e tecidos fisiologicamente saudáveis, o que diminui os efeitos colaterais e consequentemente melhora a qualidade de vida do paciente (ZHANG; CHAN; LEONG, 2013; SAFARI; ZARNEGAR, 2014).

Esses sistemas de direcionamento também mudaram a economia do desenvolvimento de medicamentos, pois transformar um fármaco existente em formulações de liberação controlada deve não somente melhorar o desempenho, mas também estender seu tempo de patente como um novo produto (ZHANG; CHAN; LEONG, 2013). O custo médio e tempo para desenvolver um novo sistema de liberação são de aproximadamente 20-50 milhões de dólares e 3 a 4 anos, respectivamente, enquanto para um novo fármaco o custo é de aproximadamente 500 milhões de dólares e pode levar mais de 10 anos (ZHANG; CHAN; LEONG, 2013). Por conta desse custo investido no desenvolvimento de novos sistemas de direcionamento ser significativamente mais baixo e o tempo de pesquisas também ser menor o foco para novos estudos está voltado para eles.

Os sistemas de liberação de fármacos estão sendo amplamente empregados para melhorar a biodisponibilidade de bioativos, uma vez que são conhecidas inúmeras substâncias com alto potencial terapêutico, mas que não são aplicadas na clínica médica devido sua baixa biodisponibilidade no organismo. Essa melhora na biodisponibilidade ocorre devido ao sistema de liberação utilizado prevenir a degradação prematura do bioativo, manter a concentração do fármaco dentro da janela terapêutica pelo controle da sua taxa liberação e reduzir os efeitos colaterais pelo direcionamento da substância ativa ao alvo específico da doença (ZHANG; CHAN; LEONG, 2013).

A biodisponibilidade pode também ser aumentada substancialmente com redução do tamanho da partícula do fármaco, o que melhora significativamente a sua taxa de dissolução (SUN *et al.*, 2012). Logo, os sistemas de liberação controlada

podem ser considerados uma tecnologia prática no melhoramento da solubilidade e biodisponibilidade de ativos farmacológicos insolúveis. Como exemplos de sistemas de liberação têm-se:

- lipossomas: consiste em uma ou mais bicamadas fosfolipídica encapsulando um núcleo aquoso, similar à membrana citoplasmática (DRBOHLAVOVA et al., 2013; NAKSURIYA et al., 2014) e seu tamanho pode variar de 25 nm até 2,5 mm (GHALANDARLAKI; ALIZADEH; ASHKANI-ESFAHANI, 2014). Foi o primeiro carreador utilizado como sistema de direcionamento de agentes quimioterápicos para câncer aprovado pelo U.S. Food and Drug Administration (SUN et al., 2012). O lipossoma pode carregar tanto fármacos lipofílicos em sua camada lipídica, quanto hidrofílicos em seu núcleo aquoso (DRBOHLAVOVA et al., 2013; NAKSURIYA et al., 2014). A baixa eficiência de encapsulamento, rápida taxa de liberação fármaco hidrofílico encapsulado e baixa estabilidade armazenamento são os principais desafios para sua aplicação como sistema de liberação controlada (SUN et al., 2012).
- nanopartículas poliméricas: têm tamanho inferior a 1.000 nm e são compostas por polímeros e copolímeros biodegradáveis e bioestáveis (SAFARI; ZARNEGAR, 2014). As moléculas de fármaco podem ser encapsuladas com a partícula, fisicamente adsorvidas na superfície, ou quimicamente ligadas com a superfície (SAFARI; ZARNEGAR, 2014). São considerados sistemas de liberação de fármaco promissores, pois atuam no direcionamento do ativo para o local de ação específico, protegem a individualidade do fármaco e sua atividade na circulação sistêmica, alteram sua distribuição nos órgãos e tecidos, controlam o *clearence* do fármaco, e podem ser usados por diversas vias de administração incluindo oral, nasal e parenteral (SUN *et al.*, 2012).
- micelas: com tamanho entre 10 e 100 nm, são compostas por blocos anfifílicos de copolímeros ou lipídeos com uma estrutura core-shell (NAKSURIYA et ALIZADEH; al., 2014; GHALANDARLAKI; ASHKANI-ESFAHANI, Normalmente são utilizadas para carregar fármacos hidrofóbicos e como sistemas termodinamicamente estáveis. protegem 0 bioativo encapsulado de hidrólise/enzimólise e são absorvidos pelo sistema do retículo endotelial (SUN et al., 2012). Entretanto, a quantidade de fármaco carreada e o complicado processo de

carreamento são parâmetros críticos que precisam ser melhorados (SUN *et al.*, 2012; DRBOHLAVOVA *et al.*, 2013).

- nanogéis: são compostos por ligações tridimensionais entre a rede de cadeias poliméricas, e suas propriedades podem ser modificadas alterando os grupos funcionais e a densidade dessas ligações (SUN et al., 2012; DRBOHLAVOVA et al., 2013). Possuem uma alta capacidade de carreamento para diversos tipos de substâncias ativas, geram o melhoramento da biodisponibilidade do ativo, possuem alta estabilidade e sua penetração transdérmica é efetiva, levando-os a ser candidatos ideais para sistema de liberação de fármaco intracelular (SUN et al., 2012; DRBOHLAVOVA et al., 2013; GHALANDARLAKI; ALIZADEH; ASHKANI-ESFAHANI, 2014).
- nanoemulsões: são dispersões termodinamicamente estáveis, que podem ser facilmente produzidas através de emulsificação, com tamanho das partículas controlado, o que melhora a solubilidade e efetividade do fármaco (SUN et al., 2012). Seu uso como carreador *in vivo* pode ser limitado devido as grandes quantidades de surfactantes na formulação, o que pode gerar um potencial efeito tóxico (SUN et al., 2012).
- complexo de inclusão: é uma mistura de moléculas de fármaco localizadas na cavidade de moléculas hospedeiras (SUN et al., 2012). Um exemplo é a ciclodextrina, que é formada pela ligação entre oligossacarídeos cíclicos, no interior do qual forma uma cavidade relativamente hidrofóbica, enquanto que a parte externa é hidrofílica, permitindo a sua dissolução em meio aquoso (SUN et al., 2012; GHALANDARLAKI; ALIZADEH; ASHKANI-ESFAHANI, 2014). São empregados em diferentes áreas, como na indústria farmacêutica para carreamento de fármacos, na indústria química e também na alimentícia (GHALANDARLAKI; ALIZADEH; ASHKANI-ESFAHANI, 2014).
- dendrímeros: consiste de três componentes estruturais principais: um núcleo central, blocos com várias camadas no interior compostas de unidades repetidas e múltiplos grupos funcionais periféricos (SAFARI; ZARNEGAR, 2014; GHALANDARLAKI; ALIZADEH; ASHKANI-ESFAHANI, 2014). São carreadores ideais devido sua organização bem definida com tamanho reduzido, alta capacidade de carreamento, a funcionalidade da superfície pode ser controlada através da modificação dos grupos funcionais, diminui a toxicidade do fármaco carreado e é

biocompatível (SUN *et al.*, 2012, GHALANDARLAKI; ALIZADEH; ASHKANI-ESFAHANI, 2014).

Apesar dessa ampla variedade de sistemas de liberação de fármacos, problemas como capacidade de transporte do fármaco, possibilidade direcionamento da substância ativa, destino do transportador in vivo (taxa de degradação e acúmulo em órgãos), toxicidade dos carreadores ou de seus metabólitos, ampliação da produção, estabilidade de armazenamento e custo global são dificuldades para se resolver (SUN et al., 2012). Entre esses problemas a toxicidade in vivo de nanoformulações é um dos mais preocupantes, pois os nanoparticulados podem ultrapassar barreiras biológicas, como a barreira hematoencefálica, devido seu tamanho reduzido; entretanto esse mecanismo é considerado hipotético já que nenhuma pesquisa específica foi conduzida nessa linha (SUN et al., 2012). Outro fator que contribui para uma possível toxicidade é a quantidade de carreadores e surfactantes utilizada para a obtenção dos sistemas de liberação, uma vez que pode render formulações com baixa segurança (SUN et al., 2012). Mesmo com os possíveis riscos, os sistemas de liberação de fármacos são considerados estratégias promissoras para o tratamento de diversas doenças, entre elas o câncer. Por isso, mais pesquisas a serem realizadas são necessárias para solucionar as questões de toxicidade.

Dentre os vários materiais que podem ser empregados como transportadores de fármacos têm-se os lipídeos, os polissacarídeos e os polímeros. Como exemplo de polímeros utilizados para liberação controlada encontra-se o Eudragit S100® e a gelatina. O Eudragit S100® é um polímero aniônico sintetizado a partir do ácido metacrilato e do ácido metilmetacrilato (proporção 1:2). Sua solubilidade é dependente do pH, e por isso tem uma baixa solubilização nas regiões do trato gastrointestinal com pH ácido (como o estômago) ou neutro (como jejuno-íleo) e na região mais alcalina (como intestino) apresenta uma forte solubilização. É empregado como revestimento de formas farmacêuticas, protegendo o ativo contra a degradação pelo suco gástrico e permitindo sua liberação na região do trato gastrointestinal de pH maior que 7,0, como o intestino e cólon (KHATIK et al., 2013). A gelatina é um polímero natural derivado do colágeno, comumente utilizado para aplicações médicas e farmacêuticas devido a sua biodegradabilidade e biocompatibilidade em meio fisiológico (GÓMEZ-GUILLÉN et

al., 2011). É muito empregada para transportar fármacos para liberação com alvo específico, como também para aumentar significativamente a estabilidade do ativo (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011).

## 4.3.1 Processos de obtenção de nanopartículas

Diante de todas as possibilidades de sistemas de liberação de fármaco para se estudar, as nanopartículas foram as que melhor atenderam as necessidades impostas nessa pesquisa. Isso porque o emprego do fármaco como nanopartículas pode reduzir significativamente a dosagem, otimizar as propriedades de direcionamento e atuação do bioativo, melhorar a biodisponibilidade e reduzir a toxicidade.

Para o preparo de nanopartículas duas estratégias podem ser empregadas, *top-down* e *bottom-up*. O processo de fabricação *top-down*, consiste em um material em seu tamanho original ser quebrado através de processo químico, mecânico ou utilizando outras formas de energia até atingir a escala nanométrica (PATEL; PATEL; PAREKH, 2014). Já o método *bottom-up* é um processo de obtenção de nanopartículas que ocorre a partir da síntese do material a partir de átomos e moléculas através de reações químicas (PATEL; PATEL; PAREKH, 2014).

Métodos de moagem são exemplos de *top-down*, enquanto que os processos baseados em duas etapas, como emulsificação e precipitação, são exemplos de métodos que utilizam a técnica *bottom-up* (ZHANG; CHAN; LEONG, 2013). A precipitação é o método de obtenção de nanopartículas mais utilizado e consiste na adição de uma solução orgânica que contém polímeros e o fármaco lipofílico em uma solução aquosa adicionada gota a gota sob agitação constante, formando normalmente partículas com 200 nm de tamanho (ZHANG; CHAN; LEONG, 2013). Neste trabalho foi proposta uma metodologia *bottom-up* para o nanodimensionamento da curcumina, sem o emprego de outras substâncias.

## 4.4 Nanotecnologia viabilizando o uso da curcumina

Como muitos polifenóis naturais, a curcumina é pouco solúvel em água e possui um rápido metabolismo, o que ocasiona uma baixa biodisponibilidade, limitando assim seu uso na clínica médica. Para viabilizar a sua aplicação clínica novos estudos na área de sistemas de direcionamento de fármacos estão sendo desenvolvidos, visando aumentar a solubilidade, estabilidade e atividade farmacológica. Muitas dessas pesquisas estão sendo feitas na área da nanotecnologia e têm como objetivo central obter um produto final com uma melhor biodisponibilidade, permitindo que a curcumina, essa substância tão promissora, seja aplicada como medicamento.

Uma estratégia muito estudada para melhorar a solubilidade da curcumina é a obtenção desse ativo na forma de nanopartículas. O sistema chamado "nanocurcumin" foi considerado promissor, o qual consiste em nanopartículas poliméricas de curcumina encapsulada em sistema micelar formado por *N*-isopropilacrilmida (NIPAAM), *N*-vinil-2-pirrolidona (VP) e poli(etilenoglicol)monoacrilato (PEG-A). Esse sistema pode ser prontamente disperso em meio aquoso e tem potencial anticâncer confirmado em testes pré-clínicos em modelos *in vivo* (BISHT *et al.*, 2007).

Sun et al. (2014) obteve sistemas de nanopartículas de curcumina, quitosana e tripolifosfato através da técnica de gelação ionotrópica, conseguindo alto índice de eficiência de retenção e de carreamento de fármaco. Além disso, o estudo farmacocinético do sistema mostrou uma melhora da biodisponibilidade oral da curcumina, além de inibir significativamente o crescimento de células tumorais (SUN et al., 2014).

Raghavendra et al. (2014) propõe um método sustentável, também chamado eco-friendly, para obtenção de nanopartículas de curcumina com gelatina e fibras de celulose para aplicação antimicrobiana. Os autores compararam o potencial antimicrobiano da formulação contendo nanopartículas de curcumina com uma formulação contendo a curcumina em sua forma original e, de acordo com os resultados, a amostra desenvolvida com nanopartículas apresentou uma maior eficiência (RAGHAVENDRA et al., 2014).

Lipossomas também estão sendo empregados para viabilizar o uso da curcumina. Lipossomas de curcumina e doxorubicina foram estudados por Barui *et al.* (2014) para uso como fármaco anticâncer. Uma pronunciada inibição de crescimento do tumor foi observada em ratos tratados com a formulação contendo ambos os fármacos (BARUI *et al.*, 2014). Com esses resultados, os autores esperam que o sistema lipossomal possa ser utilizado futuramente como sistema de direcionamento de fármaco para combate ao câncer. Já Berginc *et al.* (2014) desenvolveu lipossomas mucoadesivos de quitosana ou Carbopol para liberação de curcumina. Ambos os sistemas se mostraram uma boa alternativa para liberação controlada de fármaco quando comparada com as formulações vaginais convencionais (BERGINC *et al.*, 2014).

A obtenção de nanogel para otimizar a aplicação da curcumina também vem sendo estudada, como no trabalho de Gonçalves, *et al.* (2012). Nesse estudo nanogéis obtido com dextrina se mostraram efetivos no carreamento de curcumina, no aumento da solubilidade em água, na melhora da estabilidade e no controle da liberação da curcumina. Também foi verificado sua atividade biológica para a cultura celular HeLa, se mostrando efetivo contra essas células tumorais (GONÇALVES, *et al.*, 2012). Já Danafar, *et al.*, (2014) encapsulou curcumina em micelas de monometoxipoli(etilenoglicol)-poli(ε-caprolactona) (mPEG-PCL) através de um simples método de precipitação, gerando micelas mPEG-PCL carreadas de curcumina. Esse método obteve micelas esféricas com alta encapsulação de curcumina (88%) e podem ser consideradas como uma estratégia efetiva para tratamento de câncer (DANAFAR, *et al.*, 2014).

Outras diversas estratégias estão sendo estudadas visando a aplicação da curcumina na clínica médica. Na pesquisa de Bergonzi *et al.*, (2014) diversas formulações de microemulsão contendo curcumina foram estudadas para avaliar aquela que apresentava melhores resultados para o aumento da biodisponibilidade oral da curcumina. A microemulsão de fórmula vitamina E (3,3 g/100 g), Tween 20 (53,8 g/100 g), etanol (6,6 g/100 g) e água (36,3 g/100 g) teve os melhores resultados quanto a solubilidade da curcumina, 14,57 mg mL<sup>-1</sup>, e porcentagem de permeação de 70% após 24 horas (BERGONZI *et al.*, 2014). Essa formulação pode futuramente ser utilizada para aplicação farmacológica, principalmente em dietas suplementares para uso pediátrico (BERGONZI *et al.*, 2014). Já Coradini *et al.* 

(2014) obteve nanocápsulas de resveratrol e curcumina. A nanoencapsulação aumentou a fotoestabilidade do resveratrol, melhorou a atividade antioxidante dos polifenóis e as nanocápsulas exibiram um perfil de liberação controlado para ambas as substâncias (CORADINI *et al.*, 2014).

Em estudo recente, nanofibras de ácido poli-(láctico-coglicólico) (sigla em inglês PLGA) carregadas com curcumina foram sintetizadas e caracterizadas (SAMPATH *et al.*, 2014). Os testes de viabilidade celular mostraram que as nanofibras carregadas de curcumina são eficientes contra câncer de pele (SAMPATH *et al.*, 2014). E, por fim, Popat *et al.* (2014) obtiveram nanoconjugados de quitosana, curcumina e ciclodextrina. Esferas de curcumina com ciclodextrina apresentaram uma alta solubilidade (3 mg mL<sup>-1</sup>) e posteriormente foram encapsuladas com quitosana gerando as nanopartículas (POPAT *et al.*, 2014). Esse sistema mostrou uma alta citotoxicidade contra linhagem de células SCC25, correspondente a câncer de pele (POPAT *et al.*, 2014).

Mediante os estudos descritos acima, observa-se a abrangência de pesquisas relacionadas à curcumina visando a melhora de sua solubilidade e, consequentemente, o aumento de sua biodisponibilidade. Além disso, o emprego de sistemas de direcionamento de fármacos mostra-se como uma alternativa promissora para solucionar os problemas apresentados pela curcumina, permitindo assim sua aplicação na clínica médica.

# **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### 5.1 Materiais utilizados

Curcumina comercial, Kampo de Ervas Produtos Naturais, lote 2014-2/1; álcool etílico desnaturalizado 40B, J. T. Baker; clorofórmio, Merck; acetona, Aldrich; gelatina comercial, Sigma; Eudragit S100®, Evonik; água desionizada. Todos os reagentes e solventes usados foram de grau PA. O Eudragit S100® foi gentilmente cedido pela indústria Evonik (São Paulo – SP).

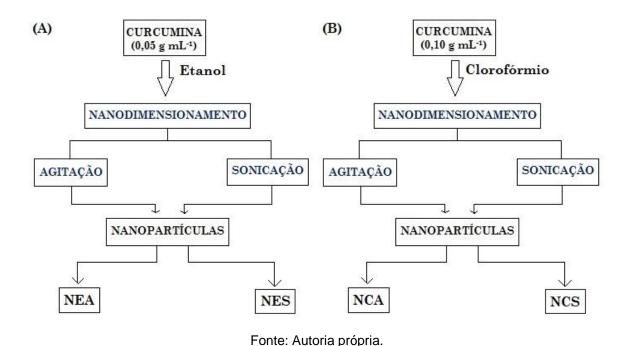
# 5.2 Obtenção de nanopartículas de curcumina

Para a obtenção das nanopartículas foram preparadas soluções de curcumina comercial nos solventes etanol e clorofórmio como descrito abaixo.

Solução de curcumina comercial foi preparada a 0,05 g mL<sup>-1</sup> em etanol, denominado de solvente **E**, e a 0,10 g mL<sup>-1</sup> em clorofórmio, denominado de solvente **C**. 100 mL de solução foram adicionados em volume definido de água desionizada submetida à agitação magnética (200-1000 rpm) ou sonicação (120 W), originando quatro amostras. Parte das dispersões de nanopartículas de curcumina formadas foi liofilizada, obtendo-se um pó amarelo, e parte foi mantida como dispersão.

As amostras das nanopartículas foram denominadas de: **NEA** preparadas com solvente **E** e pelo processo de agitação magnética; **NES**, com solvente **E** e pelo processo de sonicação; **NCA** com o solvente **C** e pelo processo de agitação magnética; e **NCS** com o solvente **C** e pelo processo de sonicação (Figura 6).

Figura 6 - Fluxograma (A) método de obtenção de nanopartículas de curcumina com solvente E e (B) método de obtenção de nanopartículas de curcumina com solvente C.



Os rendimentos dos processos foram obtidos utilizando-se 3 mL da solução de nanopartículas liofilizados até peso constante e em quintuplicata. O peso médio final obtido para os 3 mL foi relacionado com o volume total da solução de nanopartículas em cada amostra. O rendimento foi calculado como se segue:

$$\% Rend. = \frac{massa \ final}{massa \ inicial} \ x \ 100 \tag{1}$$

#### 5.3 Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho foi feita no Centro de Análises Químicas Instrumentais do IQSC/USP, com auxílio do técnico de laboratório Aldimar T. J. Constante.

Os espectros foram feitos em pastilhas de KBr em um intervalo entre 400 a 4000 cm<sup>-1</sup>, com resolução de 4 cm<sup>-1</sup> e 32 *scans*, utilizando um equipamento Shimadzu IRAffinity-1.

## 5.4 Preparo das amostras e análise de efeito Tyndall

Foram preparadas dispersões das nanopartículas de curcumina e solução de curcumina comercial na concentração de 0,8 mg mL<sup>-1</sup>, em água e em meio ISCOVE'S. As amostras em água foram utilizadas nas caracterizações e para verificação do efeito Tyndall. As amostras em meio ISCOVE'S foram utilizadas na análise de potencial Zeta e DLS já que foi nesse meio que se fez o ensaio de citotoxicidade.

Para verificar o efeito Tyndall, um feixe de laser de comprimento de onda de  $650 \pm 10$  nm com potência máxima de 5 mW da marca Force Line foi incidido sobre as amostras em água.

## 5.5 Análise do potencial Zeta

A análise do potencial Zeta foi feita no Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia do IFSC/USP, com auxílio do doutorando, Henrique A. Mendonça Faria, sob orientação do Prof. Dr. Valtencir Zucolotto.

Para a análise do potencial Zeta, utilizaram-se as amostras preparadas no item 5.4, em água e em meio ISCOVE'S, sendo que neste último foram feitas medidas logo após o preparo das amostras e depois de 24 h. Foi utilizado o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments), cubeta DTS1070, a 25°C. Foram feitas 3 determinações independentes.

## 5.6 Análise por espalhamento de luz dinâmico (DLS)

A análise de tamanho de partícula foi feita no Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia do IFSC/USP, com auxílio do doutorando, Henrique A. Mendonça Faria, sob orientação do Prof. Dr. Valtencir Zucolotto.

A análise foi determinada por espalhamento de luz dinâmico (DLS) usando Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments), cubeta DTS0012, a 25°C. Para isso, utilizaram-se as amostras preparadas no item 5.4, em água e em meio

ISCOVE'S, sendo que neste último foram feitas medidas logo após o preparo das amostras e depois de 24 h. Foram feitas 3 determinações independentes.

## 5.7 Análise por Microscopia de Força Atômica (AFM)

A análise da morfologia das partículas por Microscopia de Força Atômica foi feita no Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia do IFSC/USP, com auxílio do doutorando, Henrique A. Mendonça Faria, sob orientação do Prof. Dr. Valtencir Zucolotto.

Para isso 10 µL de cada amostra de nanopartículas de curcumina e de curcumina comercial, em água conforme descrito no item 5.4, foram depositados em substrato de mica. O substrato com a amostra permaneceu por 2 h em temperatura de 25°C para secagem inicialmente lenta, em seguida foi colocado por 48 h em dessecador em temperatura de 25°C.

Foram feitas imagens de topografia para estudo de morfologia e de contraste de fase para diferenciação entre compostos utilizando microscópio de força atômica Nanosurf FlexAFM em câmara a pressão atmosférica ambiente, temperatura de 23°C e umidade de 30%. Todas as medidas foram feitas com um cantilever de silício operando no modo dinâmico, com frequência de 300 kHz e constante elástica de 40 N m<sup>-1</sup>. O software livre Gwyddion foi utilizado para tratamento e análise das imagens. Os diâmetros das partículas presentes nas amostras foram obtidos com auxílio do software UTHSCA Image Tool®.

#### 5.8 Teste de fotodegradação

Para esta análise 10 mL de amostras em água conforme descrito no item 5.4, foram mantidas sob agitação constante (100 rpm) e temperatura de 25°C, e expostas a luz de uma lâmpada incandescente de 200 W, disposta a 20 cm de distância das amostras, de modo a assegurar que a intensidade de irradiação fosse constante para todas as amostras. Alíquotas foram retiradas em tempos determinados e analisadas por espectrofotometria no ultravioleta em 280 nm,

utilizando um espectrofotômetro HITACHI U-3000, cela de quartzo de 1 cm de caminho óptico e fenda de 0,5 nm.

#### 5.9 Ensaio de solubilidade

Uma quantidade em excesso de amostra foi adicionada a 4,0 mL de água desionizada. A mistura foi submetida à agitação constante em temperatura ambiente por 24 h a 500 rpm. Após esse período, as amostras foram filtradas em membrana filtrante com 1,2 µm de porosidade e 3,0 mL do filtrado foram liofilizados e pesados. Os ensaios foram feitos em quintuplicata.

## 5.10 Espectroscopia no ultravioleta/visível (UV-vis)

A medida de espectroscopia no ultravioleta foi feita em espectrofotômetro HITACHI U-3000 nas concentrações de 3,2, 1,6, 0,8, 0,4, 0,2, 0,1 e 0,05 mg mL<sup>-1</sup>. Os espectros de emissão foram obtidos de 210 a 750 nm em cela de quartzo de 1 cm de caminho óptico e fenda de 0,5 nm.

#### 5.11 Espectroscopia de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência foi feita no Laboratório de Fotossensibilizadores – IQSC/USP, com auxílio da técnica responsável, Dra. Cláudia Bernal, sob orientação da Profa. Dra. Janice Rodrigues Perussi.

A medida da fluorescência foi feita em espectrofotômetro de fluorescência Hitachi F-2500 nas concentrações de 50,0, 25,0, 12,5, 6,2, 3,2, 1,6 e 0,5 mg mL<sup>-1</sup>. Os espectros de emissão foram registrados de 430 a 700 nm com uma onda de excitação em 420 nm em cela de quartzo de 1 cm de caminho óptico e fenda de 0,5 nm.

#### 5.12 Ensaio de citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade *in vitro* foram feitos no Laboratório de Fotossensibilizadores – IQSC/USP, pela técnica responsável, Dra. Cláudia Bernal, sob orientação da Profa. Dra. Janice Rodrigues Perussi.

#### 5.12.1 Linhagens celulares

Para fazer os ensaios biológicos foram utilizadas as linhagens:

- VERO (ATCC CCL-81), linhagem de fibroblastos de rim de macaco verde africano, *Cercopithecus aethiops*.
- HEp-2 (ATCC CCL-23), linhagem de células epiteliais de carcinoma epidermóide de laringe humana.

Ambas as linhagens celulares crescem aderidas devido sua morfologia (ATCC, 2014), em garrafas de polipropileno contendo meio de cultura Dulbecco modificado por Iscove suplementado com 10% de soro fetal bovino e 0,1% v/v de antibióticos, penicilina 10 000 UI mL<sup>-1</sup> e estreptomicina 10 mg mL<sup>-1</sup>. As células foram mantidas a 37°C, em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> (FRESHNEY, 2010). Os repiques foram feitos de 1 a 3 vezes por semana, conforme as características de cada linhagem. Todas as manipulações celulares foram feitas em ambiente estéril, em capela de fluxo laminar, com materiais esterilizados, a fim de se evitar contaminação celular.

#### 5.12.2 Preparo das placas de cultura

Para a determinação da viabilidade e concentração celular foi utilizado o método da contagem em câmara de Neubauer e o teste da exclusão do corante (FRESHNEY, 2010). Neste teste o corante *trypan blue* é incorporado pelas células mortas devido rompimento da integridade da membrana celular. Para isso, o meio de cultura contido nas garrafas foi descartado e solução de PBS (tampão de fosfato salino) foi utilizada para retirar o resto do meio de cultura. Após lavagem das garrafas com PBS, foi adicionada solução Tripsina-EDTA 0,02%, para remoção das

células da garrafa armazenadora. Após 5 minutos, o conteúdo foi transferido para um tubo cônico e centrifugado a 1000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas no meio de cultura. Uma alíquota de 100 µL da suspensão celular foi retirada e adicionada a 400 µL de PBS e 500 µL de solução 0,4% de *trypan blue*. Essa mistura foi colocada na câmara de Neubauer, sendo as células vivas e as mortas contadas com auxílio de um microscópio óptico e a porcentagem de viabilidade foi calculada conforme equação 2:

% de viabilidade = 
$$\frac{número de células não coradas}{número total de células} \times 100$$
 (2)

As células foram plaqueadas, em placa de cultura de 96 poços, na concentração de  $1x10^5$  células  $mL^{-1}$  em meio de cultura. Para isso, foram distribuídos  $100~\mu L$  da suspensão celular por cavidade da placa de cultura estéril. Incubou-se por 24 h em estufa, a  $37^{\circ}$ C e 5% de  $CO_2$ .

## 5.12.3 Preparo das amostras

As amostras de nanopartículas de curcumina foram preparadas nas concentrações de 50 e 100 µmol L<sup>-1</sup>, enquanto que a de curcumina comercial foi preparada na concentração de 100 µmol L<sup>-1</sup>. Para isso, cada amostra foi previamente solubilizada em PBS e esterilizada através de filtração (filtro Millex® da Millipore, com tamanho de poro de 0,22 µmol L<sup>-1</sup>). Depois de esterilizadas, quantidade suficiente de meio de cultura ISCOVE´S foi adicionada para obtenção das concentrações mencionadas.

#### 5.12.4 Ensaio de citotoxicidade celular

Para o ensaio de citotoxicidade celular foi utilizado o método baseado na capacidade das células viáveis de reduzir o anel tetrazólico presente no sal de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) pela ação de enzimas

desidrogenases presentes na mitocôndria ativa, formando cristais de formazan, de coloração roxa (MOSMANN, 1983).

Às placas de cultura estéreis foram distribuídos 100 μL da solução celular por cavidade, em sextuplicata. As placas foram incubadas por 24 h a 37°C em estufa contendo tensão constante de 5% de CO<sub>2</sub>, conforme item 5.12.2.

Após este tempo, o sobrenadante foi removido por aspiração e 200 µL de cada amostra preparada conforme item 5.12.3 foi adicionada em poços determinados. Para o controle negativo de células foi adicionada mistura de PBS com meio ISCOVE´S na proporção 1:1. Incubou-se nas mesmas condições por 24 h.

Posteriormente, foram acrescentados 20 μL de uma solução de MTT a 5 mg mL<sup>-1</sup> e as placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 3 h. Após esse período, o sobrenadante foi removido por aspiração e 50 μL de etanol puro foram adicionados, para diluição dos cristais formados. Após completa diluição, as células foram tratadas com 150 μL de álcool isopropílico com PBS na proporção 1:1. A leitura da densidade ótica foi determinada em leitor Turnable Microplate Reader (VERSA MAX) em 570 nm. O índice de sobrevivência celular foi calculado conforme equação 3, considerando o controle negativo como 100% de viabilidade.

Índice de sobrevivência (%) = 
$$\frac{\text{média das absorbâncias da amostra}}{\text{média das absorbâncias controls}} \times 100$$
 (3)

#### 5.12.5 Análise estatística

A análise estatística foi feita utilizando um método de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste *t*-Student na versão de comparações múltiplas de Tukey-Kramer para avaliar a diferença significativa entre pares. Valores de p<0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

# 5.13 Obtenção de membranas de gelatina/nanopartículas de curcumina recobertas com Eudragit S-100®

# 5.13.1 Preparo das membranas de gelatina/nanopartículas de curcumina

Preparou-se uma mistura de gelatina/nanopartículas de curcumina contendo 3% de gelatina e 5% de nanopartículas de curcumina. Essa mistura foi aquecida a 60°C, sob agitação por 30 min. Para cada membrana foi pesada 15 g da mistura e colocada em molde de teflon® (5 x 5 x 0,5 cm) para a formação da membrana, sendo mantida por 2 h a temperatura de 15°C e posteriormente colocada sob fluxo de ar até secagem completa, a temperatura ambiente.

#### 5.13.2 Recobrimento das membranas com Eudragit S-100®

Para revestimento, as membranas secas foram mergulhadas em solução de 10% de Eudragit S100® em acetona e seca em ar a temperatura ambiente.

### 5.14 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As membranas obtidas no item 5.13 foram caracterizadas por MEV para verificação de sua morfologia superficial e transversal. Para isso, foi utilizado o equipamento LEO 440 (LEO Electron Microscopy Ltda), com um detector Oxford (Oxford Instruments Inc.), utilizando-se feixe de 20 keV. As amostras foram previamente recobertas com 20 nm de ouro em um metalizador Balsers modelo SDC 050. A espessura das membranas foi observada com auxílio do software UTHSCA Image Tool®.

# 5.15 Teste in vitro de liberação

## 5.15.1 Curva de Calibração

Para a curva de calibração preparou-se uma solução estoque de nanopartículas de curcumina em tampão fosfato pH 7,5, obtendo-se uma concentração final de 6,6 mg mL<sup>-1</sup>. A partir desta solução estoque preparou-se, por diluição com o tampão fosfato, as soluções para a curva de calibração com concentrações variando entre 0,05 e 6,6 mg mL<sup>-1</sup>, estas soluções foram analisadas em espectrofotômetro de UV-visível modelo U-3000 da HITACHI, em um comprimento de onda de 280 nm. Essa curva foi feita para solução de ácido clorídrico pH 2,0 nas mesmas condições.

#### 5.15.2 Ensaio de liberação

Para os ensaios iniciais de liberação, as membranas foram colocadas em recipientes contendo 50 mL de tampão fosfato (pH 7,5) ou de ácido clorídrico (pH 2,0) em banho Dubnoff com agitação de 50 rpm e temperatura de 37°C, por 24 h. Alíquotas foram retiradas em tempos específicos e analisadas por espectroscopia no UV-visível em comprimento de onda de 280 nm em espectrofotômetro HITACHI U-3000. As concentrações de nanopartículas de curcumina foram determinadas através de interpolação na curva de calibração. Esse ensaio foi feito em quintuplicata para cada pH.

# **6 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A curcumina é uma substância com ampla aplicação nas áreas médica e de alimentos, contudo, sua solubilidade é muito baixa limitando sua aplicação. Assim a obtenção de nanopartículas de curcumina introduz uma maior probabilidade de êxito na grande variedade de seu emprego.

## 6.1 Obtenção de nanopartículas

As amostras das nanopartículas de curcumina foram preparadas com o solvente **E** ou **C** pelos processos de agitação magnética e sonicação. A Figura 7 mostra as imagens digitais da curcumina comercial e das quatro amostras de nanopartículas de curcumina obtidas neste trabalho.

B C E

Figura 7 - Fotografias digitais da curcumina comercial e das amostras de nanopartículas de curcumina: (A) curcumina comercial, (B) NEA, (C) NES, (D) NCA e (E) NCS.

Fonte: Autoria própria.

Diferenças macroscópicas significativas não foram observadas nos diferentes solventes e processos utilizados. As nanopartículas preparadas tanto com

etanol quanto com clorofórmio tiveram um aspecto semelhante, sendo um pó fino e de cor amarelo opaco para a curcumina e amarelo ouro para as nanopartículas.

O rendimento dos processos foi de  $78.8 \pm 1.0\%$  para **NEA**,  $76.8 \pm 2.4\%$  para **NES**,  $72.3 \pm 1.4\%$  para **NCA** e  $61.4 \pm 1.6\%$  para **NCS** (Figura 8). De acordo com os resultados, os procedimentos que utilizaram o solvente **E** mostraram um rendimento ligeiramente maior do que os obtidos com o solvente **C**, principalmente pelo processo por sonicação.

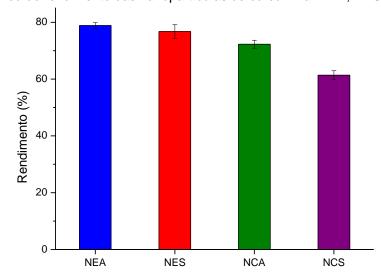
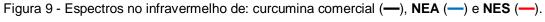


Figura 8 - Gráfico do rendimento das nanopartículas de curcumina: NEA, NES, NCA e NCS.

## 6.2 Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho foi feita para verificar se as características químicas estruturais da curcumina comercial foram mantidas após os processos de nanodimensionamento. A radiação infravermelha corresponde à parte do espectro eletromagnético entre as regiões do visível e das micro-ondas, sendo a região entre 4000 e 400 cm<sup>-1</sup> a de maior utilidade para a análise de grupos funcionais de estruturas orgânicas, como da curcumina comercial (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). Essa radiação emitida no infravermelho faz com que átomos de compostos orgânicos vibrem com amplitude aumentada ao redor das ligações covalentes que os ligam e, dessa forma, as linhas se sobrepõem dando origem a uma série de bandas observadas no espectro vibracional (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Os espectros para as quatro amostras estudadas estão apresentados na Figura 9 e 10 e as bandas características para as amostras estão descritas na Tabela 1. Não foram observadas alterações nos valores das bandas teóricas. Os espectros de FTIR mostraram bandas características na região de 3300-3410 cm<sup>-1</sup> referente às vibrações do grupo OH livre do fenol. As bandas intensas em 1640, cm<sup>-1</sup> 1647 referem-se à vibração 1645 do grupo carbonila, C=O. As bandas na região 1340-1470 cm<sup>-1</sup> são referentes às vibrações C=C do anel aromático e elongação da ligação C-O. Bandas na região de 1020-1155 cm<sup>-1</sup> são referentes ao estiramento do grupo C-O de éter. Na região de 700-900 cm<sup>-1</sup> são referentes a C-H dos grupos alcenos (DEL SOCORRO; TEVES; MADAMBA, 2013; KIM et al., 2013). Esse mesmo padrão de bandas para as amostras de **NEA**, **NES**, NCA, NCS e curcumina comercial indica que as características químicas da curcumina comercial foram mantidas após os processos de nanodimensionamento.



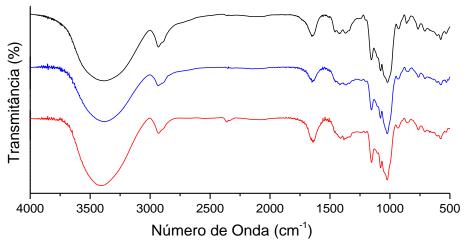


Figura 10 - Espectro no infravermelho de: curcumina comercial (—), NCA (—) e NCS (—).

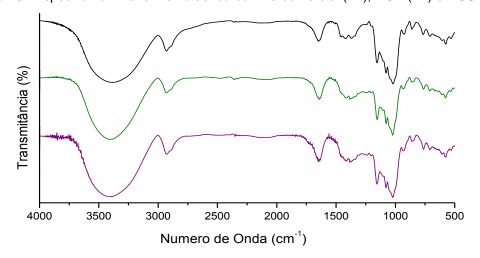


Tabela 1 - Bandas (cm<sup>-1</sup>) características no espectro de infravermelho para curcumina comercial e amostras de nanopartículas.

	ν (cm <sup>-1</sup> )				
Amostra	OH livre do fenol	Carbonila C=O	C=C anel aromático e ligação C-O	Estiramento C-O	C-H do grupo alceno
Curcumina comercial	3400	1647	1380-1470	1020-1155	760-900
NEA	3380	1647	1340-1460	1022-1155	760-920
NES	3400	1640	1340-1460	1022-1155	760-920
NCA	3410	1640	1340-1460	1022-1155	760-920
NCS	3410	1645	1350-1460	1020-1155	760-920

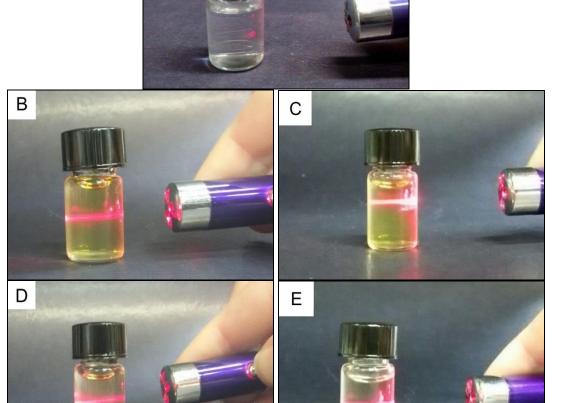
Fonte: Autoria própria

## 6.3 Análise de efeito Tyndall

Essa análise foi feita para verificar a presença de nanopartículas nas amostras. Efeito Tyndall é o efeito óptico da dispersão da luz pelas partículas coloidais, ou seja, dispersões nas quais suas partículas têm tamanho médio entre 1 nm e 1000 nm. Esse efeito ocorre quando há o espalhamento da luz pelas partículas em suspensão, sendo possível visualizar o trajeto da luz, pois estas partículas, ao espalhar os raios luminosos, atuam como fontes luminosas secundárias (VOGEL, 1981).

As amostras de nanopartículas apresentaram o efeito Tyndall, sugerindo a presença de nanopartículas no sistema, como pode ser visto na Figura 11.

Figura 11 - Efeito Tyndall nas amostras em meio aquoso (0,8 mg mL<sup>-1</sup>): **(A)** curcumina comercial, **(B) NEA**, **(C) NES**, **(D) NCA** e **(E) NCS** 



# 6.4 Análise do potencial Zeta

A análise do potencial Zeta foi feita para avaliar a estabilidade das partículas. Potencial Zeta é a medida da carga de superfície da partícula em meio específico, sendo usado para analisar e prever interações entre as partículas em suspensão (HUNTER, 1981). A manipulação dessa carga de superfície é uma estratégia para melhorar a estabilidade de formulações farmacêuticas, sendo também empregada no tratamento de água para controle da velocidade de floculação (MALVERN INSTRUMENTS LTDA, 2013).

As partículas presentes na suspensão que apresentam um grande potencial Zeta, positivo ou negativo, tendem a se repelir. Assim não existe tendência de flocular, ou seja, é considerado um sistema mais estável; sendo que partículas com potencial +/- 30 mV ou acima são consideradas estáveis (MALVERN INSTRUMENTS LTDA, 2013).

A amostra **NEA** apresentou um valor de potencial Zeta igual a -26 mV, **NES** de -25 mV, **NCA** de -27 mV e **NCS** de -34 mV. Esses valores mostram que as nanopartículas são estáveis em suspensão. Já a curcumina comercial apresentou um valor de 0,2 mV, indicando uma instabilidade no meio aquoso. Esses resultados estão mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Potencial Zeta para as amostras de nanopartículas de curcumina e curcumina comercial (0,8 mg mL<sup>-1</sup>) quando em diferentes meios, por DLS.

A	Potencial Zeta (mV)			
Amostra -	meio aquoso	meio ISCOVE'S 0h	meio ISCOVE'S 24h	
Meio ISCOVE'S	-	0,3	0,3	
Curcumina comercial	0,2	-7	-0,4	
NEA	-26	-6	-0,1	
NES	-25	-7	-0,3	
NCA	-27	-8	-0,5	
NCS	-34	-9	-1	

Fonte: Autoria própria

Estudos sobre sistemas de nanopartículas de curcumina descrito por Anitha *et al.* (2011), envolveu nanopartículas obtidas por curcumina e *O*-carboximetil-quitosana que mostram um potencial Zeta de -30 mV para as nanopartículas e para as nanopartículas sem curcumina um potencial de -35,12 mV. Esse potencial negativo foi atribuído à presença de grupos carboxílicos, enquanto que a redução na carga de superfície das nanopartículas carregadas com curcumina foi explicada pelas ligações de hidrogênio entre os grupos carboxílicos da *O*-carboximetil-quitosana e grupos hidroxílicos da curcumina.

Tsai et al. (2011) obtiveram um potencial Zeta igual a | 12,5 | mV para sistemas de curcumina e ácido poli-(láctico-coglicólico) (PLGA), apresentando uma

carga de superfície mais baixa, que pode levar a uma menor estabilidade das partículas. Recentemente, Sun *et al.* (2014) obtiveram nanopartículas de curcumina, quitosana e tripolifosfato de sódio que apresentaram um potencial de | 18,3 | mV, que também pode ser considerado baixo, ocasionando um sistema mais instável.

Assim, observa-se que o nanodimensionamento da curcumina descrito neste trabalho produz partículas mais estáveis que aquelas obtidas conjuntamente com polímeros, como mencionado acima e com valores próximos àqueles observados no estudo de Anitha *et al.* (2011).

Quando em meio ISCOVE'S **NEA** apresentaram um potencial de -6 mV, **NES** de -7 mV, **NCA** de -8 mV e **NCS** de -9 mV, semelhante à curcumina comercial, com potencial de -7 mV. Após 24 h os valores se aproximaram mais de zero, sendo eles de -0,1 mV para **NEA**, -0,3 mV para **NES**, -0,5 mV para **NCA**, -1 mV para **NCS** e -0,4 mV para curcumina comercial (Tabela 2). O meio de cultura apresenta um potencial de 0,3 mV. Esses valores devem-se a interação que ocorre entre as nanopartículas, que originalmente possuem uma carga negativa, com substâncias presentes no meio de cultura, como aminoácidos, sendo esse efeito é conhecido como efeito corona (SAFI *et al.*, 2011; MIRSHAFIEE *et al.*, 2013; MA; BAI; JIANG, 2015).

## 6.5 Análise por espalhamento de luz dinâmico (DLS)

A análise por DLS foi feita para verificar o tamanho das nanopartículas. O espalhamento de luz dinâmico (DLS) é uma técnica utilizada para medir a distribuição de tamanho de partículas na escala nanométrica. Essa técnica é precisa, confiável, de fácil reprodução e necessita de pouca quantidade de amostra (HIEMENZ; RAJAGOPALAN, 1997). Por esta técnica obtém-se o tamanho das nanopartículas e o índice de polidispersividade (PDI) que é o índice de distribuição de tamanho que representa a semelhança entre partículas. Um valor de PDI mais próximo a 1 indica que os tamanhos de partícula são diferentes (TSAI et al., 2011).

Para análise por DLS utilizou-se as amostras em meio aquoso ou ISCOVE'S na concentração de 0,8 mg mL<sup>-1</sup>. A análise de tamanho de partículas para a amostra de curcumina comercial, quando em meio aquoso, apresentou um

máximo de distribuição em  $814,6 \pm 180,5$  nm (Figura 12) e um PDI de  $0,89 \pm 0,14$ . As nanopartículas obtidas com o solvente **E** mostrou para **NEA** um máximo de distribuição de tamanho em  $226,9 \pm 11,2$  nm e PDI igual a  $0,49 \pm 0,05$  em meio aquoso e para **NES** foi observado um máximo de distribuição em  $189,2 \pm 4,2$  nm e um PDI de  $0,34 \pm 0,01$  em meio aquoso. A distribuição de tamanho de partículas para **NEA** e **NES** está mostrada na Figura 13.

Figura 12 - Distribuição de tamanho por DLS da amostra de curcumina comercial em meio aquoso (0,8 mg mL<sup>-1</sup>).

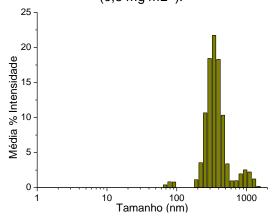
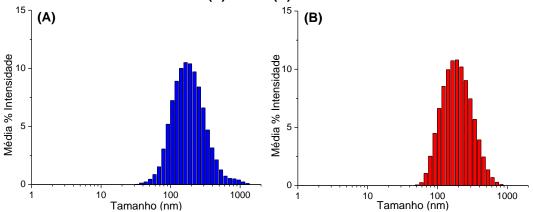


Figura 13 - Distribuição de tamanho por DLS das amostras em meio aquoso (0,8 mg mL<sup>-1</sup>): **(A) NEA** e **(B) NES**.



Já para as nanopartículas obtidas com o solvente  $\mathbf{C}$ , em meio aquoso tiveram seus máximos em  $591.2 \pm 60.5$  nm e PDI de  $0.64 \pm 0.10$  para  $\mathbf{NCA}$  e em  $248.4 \pm 7.2$  nm e PDI igual a  $0.43 \pm 0.04$  para  $\mathbf{NCS}$ . A distribuição de tamanho de partículas para  $\mathbf{NCA}$  e  $\mathbf{NCS}$  está mostrada na Figura 14. Os valores de PDI e tamanho também estão mostrados na Tabela 3.

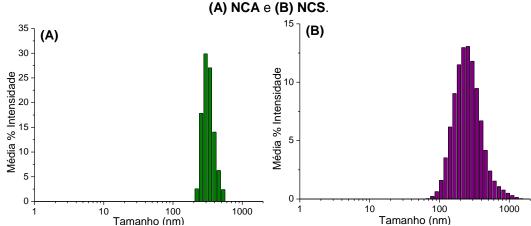


Figura 14 - Distribuição de tamanho por DLS das amostras em meio aquoso (0,8 mg mL<sup>-1</sup>):

Tabela 3 - Tamanho médio (nm) e PDI das amostras de nanopartículas de curcumina e da curcumina comercial em meio aquoso (0,8 mg mL<sup>-1</sup>), por DLS.

Amostra	Tamanho médio (nm)	PDI
Curcumina comercial	814,6 ± 180,5	$0.89 \pm 0.14$
NEA	226,9 ± 11,2	$0,49 \pm 0,05$
NES	$189,2 \pm 4,2$	$0.34 \pm 0.01$
NCA	$591,2 \pm 60,5$	$0,64 \pm 0,10$
NCS	$248,4 \pm 7,2$	$0,43 \pm 0,04$

Fonte: Autoria própria

Uma ordem de faixa de distribuição de tamanho pode ser inferida como:

#### NES < NEA < NCS < NCA < Curcumina comercial

Esses resultados mostram que o processo de sonicação é mais eficiente que o de agitação quando comparamos o nanodimensionamento no mesmo solvente, sendo que a maior diferença é notada nas amostras preparadas com o solvente **C**. A comparação dos resultados entre os dois solventes (**C** e **E**), independentemente do procedimento utilizado, mostra que para o solvente **E** as partículas apresentaram um tamanho menor, contudo a faixa de distribuição de tamanho é maior.

Vários estudos de obtenção de nanopartículas de curcumina observaram o tamanho de partículas por DLS em meio aquoso, como o descrito por Anitha *et al.* (2011), que envolveu nanopartículas obtidas por curcumina e *O*-carboximetil-quitosana e mostram um tamanho de partículas entre 120 e 180 nm. Enquanto que

Tsai *et al.* (2011) obtiveram tamanho de 163 nm e PDI 0,053 para sistemas de curcumina e PLGA.

Sun et al. (2014) obtiveram nanopartículas de curcumina, quitosana e tripolifosfato de sódio que apresentaram tamanho de 110 nm, enquanto que o sistema de nanopartículas de curcumina, quitosana e polietileno glicol 400 (PEG) estudado por Krausz et al. (2015) mostrou um tamanho de 222 nm. Recentemente estudo feito por Xiao et al. (2015) mostra para as nanopartículas de kafirina e curcumina um tamanho médio de 200,1 nm e para as nanopartículas de kafirina, curcumina e carboximetil-quitosana um tamanho médio de 236 nm.

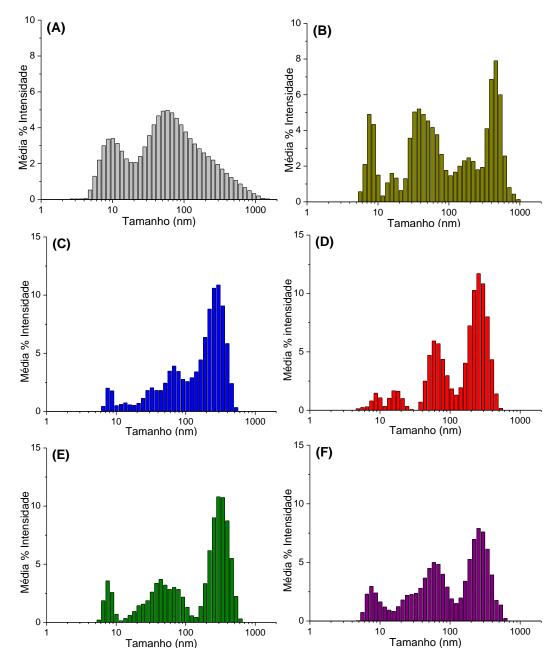
As nanopartículas deste estudo preparadas com solvente **E** apresentaram um tamanho médio de 189 nm e 227 nm em meio aquoso, o que as coloca na mesma faixa das nanopartículas dos trabalhos citados acima. Contudo, as nanopartículas preparadas com o solvente **C** estão com tamanhos maiores, entre 248 e 590 nm. Entretanto, os sistemas de nanopartículas desenvolvidos nos trabalhos descritos utilizaram outras substâncias associadas à curcumina, diferentemente das nanopartículas obtidas pelos procedimentos empregados neste trabalho.

Em relação ao índice de polidispersividade, as amostras de nanopartículas de curcumina apresentaram um PDI baixo quando em meio aquoso indicando uma distribuição de tamanho semelhante entre as partículas. Entretanto, as **NCA** apresentaram um PDI maior e próximo ao da curcumina comercial, sugerindo a presença de partículas de diferentes tamanhos. Essa diferença entre os tamanhos das nanopartículas presentes no sistema podem levar a parâmetros farmacocinéticos irregulares, afetando a eficiência terapêutica de uma formulação (TSAI *et al.*, 2011).

A análise por DLS em meio ISCOVE'S foi feita no tempo zero, ou seja, logo após o preparo das amostras, e depois de 24 h. A curcumina comercial apresentou inicialmente um tamanho de  $128 \pm 50,1$  nm e um PDI de  $0,71 \pm 0,10$ . Enquanto que as nanopartículas obtidas com o solvente **E** apresentaram um tamanho de  $96,5 \pm 14,7$  nm e PDI de  $0,72 \pm 0,20$  para **NEA** e de  $96,6 \pm 5,5$  nm e PDI de  $0,72 \pm 0,10$  para **NES**. Para aquelas preparadas no solvente **C**, as **NCA** mostraram um tamanho de  $64,8 \pm 4,3$  nm e PDI de  $0,95 \pm 0,01$  e **NCS** apresentaram

um tamanho de  $50,1 \pm 2,1$  nm e PDI de  $0,90 \pm 0,08$  no tempo zero. Esses resultados estão mostrados na Figura 15 e na Tabela 4.

Figura 15 - Distribuição de tamanho por DLS das amostras em meio ISCOVE'S (0,8 mg mL<sup>-1</sup>): (A) meio ISCOVE'S, (B) curcumina comercial, (C) NEA, (D) NES, (E) NCA e (F) NCS.



A análise dos resultados sugere que as nanopartículas são menores em meio de cultura do que em meio aquoso, porém este fato deve-se a presença do soluto do qual o meio é composto. O meio ISCOVE'S é composto por diversas substâncias (GELIFESCIENCES, 2015), entre elas partículas que são menores do que as nanopartículas de curcumina e isso faz com que se tenham valores totais

menores. Isto é evidenciado na Figura 15 (A) referente ao meio de cultura que mostra máximos de tamanhos de partículas em 10 e 59 nm.

Tabela 4 - Tamanho médio (nm) e PDI das amostras de nanopartículas de curcumina e da curcumina comercial em meio ISCOVE'S (0,8 mg mL<sup>-1</sup>) no tempo zero, por DLS.

Amostra	Tamanho médio (nm)	PDI
Meio ISCOVE'S	$30.8 \pm 2.6$	$0,71 \pm 0,10$
Curcumina comercial	$128,0 \pm 50,1$	$0,48 \pm 0,02$
NEA	$96,5 \pm 14,7$	$0,72 \pm 0,20$
NES	$96,6 \pm 5,5$	$0,72 \pm 0,10$
NCA	$64.8 \pm 4.3$	$0.95 \pm 0.01$
NCS	50,1 ± 2,1	$0.90 \pm 0.08$

Fonte: Autoria própria

Após 24 h o tamanho da curcumina comercial foi de  $181,4 \pm 87,3$  nm com PDI de  $0,55 \pm 0,16$ . Já as **NEA** apresentaram um tamanho de  $90,0 \pm 1,3$  nm e PDI de  $0,89 \pm 0,02$  e as **NES** de  $98,4 \pm 10,6$  nm e PDI de  $0,72 \pm 0,23$  depois desse período. Para **NCA** observou-se um tamanho de  $75,9 \pm 14,2$  nm e PDI de  $0,91 \pm 0,15$  e para **NCS** de  $49,1 \pm 2,6$  nm e PDI de  $0,97 \pm 0,03$  após 24 h. Esses resultados estão mostrados na Tabela 5 e na Figura 16.

Tabela 5 - Tamanho médio (nm) e PDI das amostras de nanopartículas de curcumina e da curcumina comercial em meio ISCOVE'S (0,8 mg mL<sup>-1</sup>) após 24 h, por DLS.

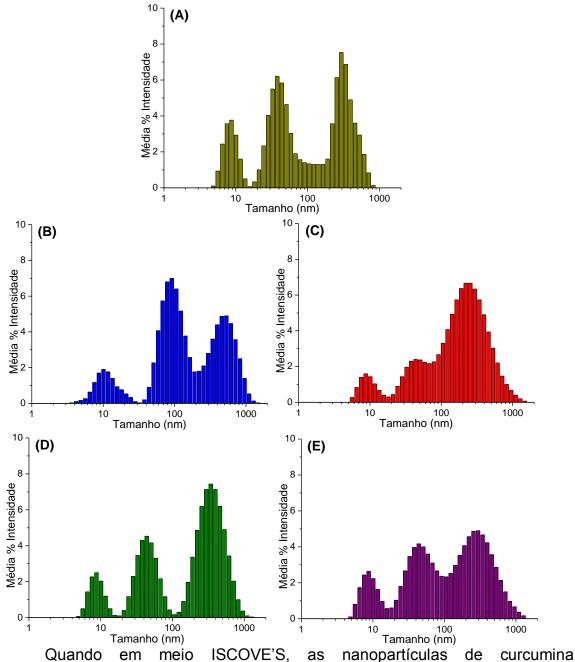
Amostra	Tamanho médio (nm) 24h	PDI 24h
Meio ISCOVE'S	$30.8 \pm 2.6$	$0,71 \pm 0,10$
Curcumina comercial	$181,4 \pm 87,3$	$0,55 \pm 0,16$
NEA	$90,0 \pm 1,3$	$0.89 \pm 0.02$
NES	$98,4 \pm 10,6$	$0,72 \pm 0,23$
NCA	$75,9 \pm 14,2$	$0.91 \pm 0.15$
NCS	49,1 ± 2,6	$0.97 \pm 0.03$

Fonte: Autoria própria

Após 24 h observou-se uma tendência de aumento no tamanho da curcumina comercial e das nanopartículas **NES** e **NCA**, que pode ser devido à interação das amostras com as substâncias presentes no meio de cultura, como

aminoácidos e biomacromoléculas. Esse efeito de corona proteica consiste em um processo dinâmico e competitivo determinado pela afinidade das proteínas pela superfície da partícula (SAFI *et al.*, 2011; MA; BAI; JIANG, 2015). Já para **NEA** e **NCS** não foi observado aumento no tamanho médio após 24 h o que sugere que essas amostras estão menos sujeitas a esse efeito.

Figura 16 - Distribuição de tamanho por DLS das amostras em meio ISCOVE'S (0,8 mg mL<sup>-1</sup>) após 24 horas: **(A)** curcumina comercial, **(B) NEA**, **(C) NES**, **(D) NCA** e **(E) NCS**.



Quando em meio ISCOVE'S, as nanopartículas de curcumina apresentaram um PDI muito alto (acima de 0,7) sugerindo que as partículas presentes no sistema são de diferentes tamanhos (BIOPHYSICS, 2015).

## 6.6 Análise por Microscopia de Força Atômica (AFM)

A microscopia de força atômica é uma técnica de análise que consiste na varredura da superfície de uma amostra com uma sonda a fim de obter sua imagem topográfica com altíssima resolução. Essa sonda é formada pelo conjunto de ponteira com cerca de 100 a 200 µm de comprimento, geralmente com menos de 20 nm de diâmetro e que termina em um conjunto de átomos, integrada em um cantilever flexível (FERREIRA; YAMANAKA, 2006). A ponta sofre repulsão ou atração pela superfície dependendo da topografia da amostra e das interações que podem ser atrativas ou repulsivas, sendo a força de Van der Waals a mais comum de deflexão do cantilever (FERREIRA; YAMANAKA, 2006). Essas variações são detectadas pelo movimento do laser incidindo no fotodetector e, assim, é possível formar uma imagem topográfica digitalmente da superfície bi e tridimensional e obter diversas informações sobre a amostra, como por exemplo, rugosidade e variação de altura (FERREIRA; YAMANAKA, 2006).

# 6.6.1 Imagens topográficas por AFM

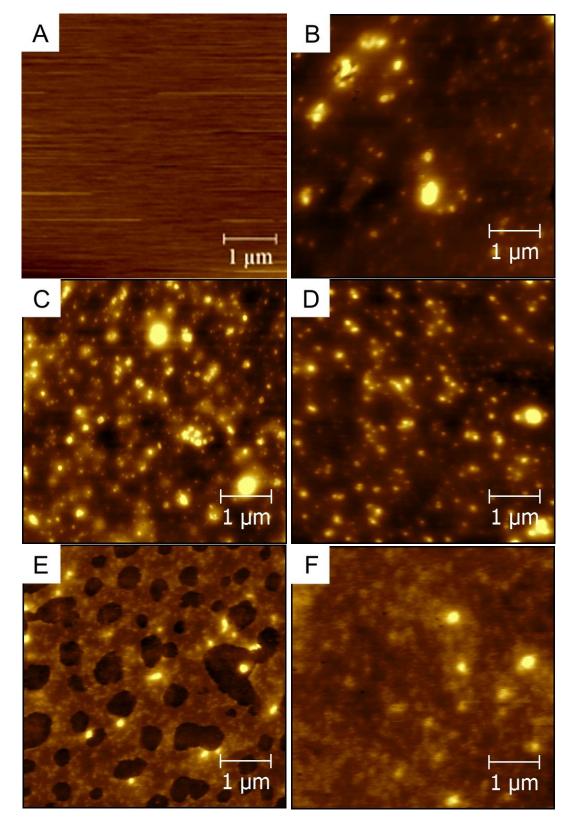
A AFM foi feita para verificar a morfologia das nanopartículas de curcumina e suas imagens podem ser observadas na Figura 17.

Todas as amostras de nanopartículas de curcumina e a de curcumina comercial apresentaram formato esférico. Na amostra de curcumina comercial observaram-se partículas com diferentes tamanhos (Figura 17 (B)). Contudo, nas amostras **NEA** e **NES**, Figura 17 (C) e (D), ocorreu uma redução significativa do tamanho das partículas após o nanodimensionamento, como o esperado.

As amostras **NCA** e **NCS**, Figura 17 (E) e (F), apresentaram baixa concentração de partículas, além da formação de um material aderido ao substrato, o qual poderia ser a mistura do solvente clorofórmio (**C**) com a água gerando uma emulsão. Este material provocou a formação de poços e platôs distribuídos na superfície, conforme observado na imagem de topografia. Nestes casos, poucas partículas foram encontradas, tanto nos poços como nos platôs.

Figura 17 - Imagens de topografia por microscopia de força atômica das amostras de nanopartículas de curcumina e da curcumina comercial (0,8 mg mL<sup>-1</sup>), depositadas em substrato de mica:

(A) Mica vazia, (B) Curcumina comercial, (C) NEA, (D) NES, (E) NCA e (F) NCS.

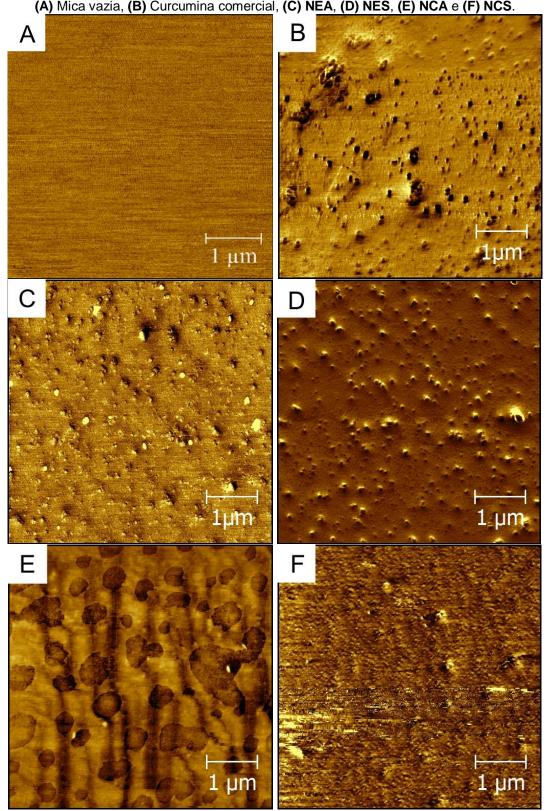


A presença de partículas nas amostras de curcumina comercial, **NEA** e **NES** foi comprovada através das imagens de fase por comparação com o substrato

de mica no estado natural, como mostrado na Figura 18. Pode-se observar ainda a presença de um material aderido na superfície da mica nas amostras **NCA** e **NCS**.

Figura 18 - Imagens de fase por microscopia de força atômica das amostras de nanopartículas de curcumina e da curcumina comercial (0,8 mg mL<sup>-1</sup>), depositadas em substrato de mica:

(A) Mica vazia, (B) Curcumina comercial, (C) NEA, (D) NES, (E) NCA e (F) NCS.

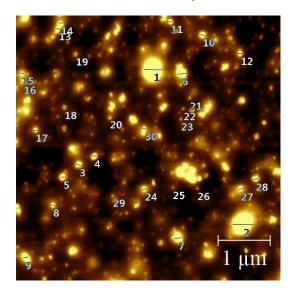


Assim, os dois processos de nanodimensionamento, por agitação magnética e por sonicação, que utilizaram o solvente **E** foram capazes de fracionar a maioria das partículas de curcumina comercial. O mesmo resultado não foi observado por AFM para o caso do solvente **C**, devido à formação de um material aderente ao substrato em consequência da mistura de água e clorofórmio, gerando uma emulsão.

# 6.6.2 Determinação de diâmetro das partículas

A determinação do diâmetro das partículas por AFM está exemplificada na Figura 19, para a formulação **NEA**. Os resultados obtidos para as medidas dos diâmetros das nanopartículas podem ser observados na Tabela 6.

Figura 19 - Imagem de topografia por microscopia de força atômica da amostra **NEA** (0,8 mg mL<sup>-1</sup>), depositadas em substrato de mica com a determinação de diâmetro de partículas (n=30).



As imagens da Figura 17 mostram uma grande variação no tamanho das nanopartículas, entretanto quando analisamos o conjunto percebemos que a maior parte das partículas possui um mesmo tamanho médio, como na amostra **NEA** que apresentou partículas que variam de 50 a 330 nm, entretanto a maioria das nanopartículas tem o tamanho médio de 100 nm (Tabela 6).

(5,5 1119 111=	(6,6 9 / 5 / 5			
Amostras	n <sup>(a)</sup>	Diâmetro mínimo	Diâmetro máximo	Diâmetro médio
Curcumina comercial	15	130	460	230
NEA	30	50	330	100
NES	30	50	140	90
NCA	15	120	270	170
NCS	10	110	200	160

Tabela 6 - Diâmetro das amostras de nanopartículas de curcumina e da curcumina comercial (0,8 mg mL<sup>-1</sup>) obtido por medida das imagens de topografia de AFM.

(a) número de amostras analisadas Fonte: Autoria própria

Pelos resultados, uma ordem de faixa de distribuição de tamanho, considerando o diâmetro médio observado, pode ser inferida como:

#### NES < NEA < NCS < NCA < Curcumina comercial

Quando se compara a faixa de distribuição de tamanho das nanopartículas analisadas por DLS e AFM observa-se a mesma ordem de distribuição de tamanho para ambas. Os resultados obtidos por AFM apresentaram tamanhos menores do que aqueles obtidos por DLS. Isso ocorre devido à análise por AFM ser feita com as partículas secas, o que causa um achatamento das partículas.

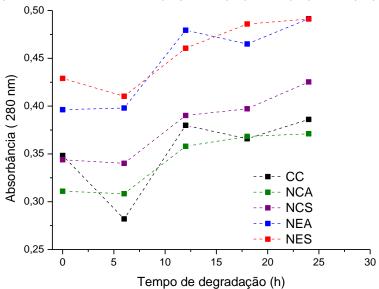
Em estudo feito por Xiao *et al.* (2015) foram observadas por AFM nanopartículas esféricas de kafirina e curcumina com diâmetro médio de 193 nm e de kafirina, curcumina e carboximetil-quitosana com valor médio de 255 nm. Esses valores se relacionam com aqueles mostrados na análise por DLS sendo 200,1 nm e 236 nm, respectivamente. A diminuição de diâmetro observada por AFM está relacionada com os diferentes sistemas de medida e métodos de cálculo usados (XIAO; NIAN; HUANG, 2015).

As amostras de nanopartículas de curcumina obtidas neste trabalho apresentaram um diâmetro menor devido à utilização de somente curcumina comercial para o preparo das nanopartículas.

## 6.7 Teste de fotodegradação

Fotossensibilidade é o quanto uma determinada substância reage ao receber a estimulação de fótons de luz, especialmente de luz visível. Os produtos químicos que são fotossensíveis podem ser submetidos a reações químicas quando exposta à luz (RANBY; RABEK, 1975). Sabe-se que a curcumina é fotossensível (SOUZA; OSME; GLÓRIA, 1997; PARIZE, 2009; XIAO; NIAN; HUANG, 2015) e, portanto, é necessário fazer o teste de fotodegradação para verificar se as amostras de nanopartículas de curcumina sofrem uma degradação maior ou menor ao serem expostas a luz quando comparadas à curcumina comercial. Os resultados estão mostrados na Figura 20 abaixo e na Tabela 7 (Anexo A).

Figura 20 - Absorbância em função do tempo de degradação para as amostras em meio aquoso (0,8 mg mL<sup>-1</sup>) de: curcumina comercial (—), **NEA** (—), **NES** (—), **NCA** (—) e **NCS** (—).



Como pode ser observado na Figura 20 as amostras preparadas com o solvente **C**, **NCA** e **NCS**, apresentam padrão semelhante de degradação. Enquanto que as amostras obtidas com o solvente **E** apresentaram perfis de degradação diferentes. A curcumina comercial tem um processo de degradação mais intenso que as amostras de nanopartículas como observado nas primeiras 6h de exposição.

#### 6.8 Ensaio de solubilidade

O ensaio de solubilidade foi feito para verificar se as amostras de nanopartículas de curcumina tiveram a sua solubilidade aumentada quando comparada à curcumina comercial. Este ensaio foi feito liofilizando-se as dispersões de nanopartículas e obtendo-se um pó (Figura 7) para posterior solubilização.

Os resultados do ensaio de solubilidade podem ser vistos na Tabela 8.

Tabela 8 - Solubilidade da curcumina comercial e das nanopartículas, NEA, NES, NCA e NCS.

Amostra	Solubilidade (mg mL <sup>-1</sup> )
Curcumina comercial	1,2 ± 0,1
NEA	$67.0 \pm 8.4$
NES	$46.1 \pm 7.9$
NCA	$55.3 \pm 9.6$
NCS	$44.0 \pm 3.8$

Fonte: Autoria própria

Este ensaio mostrou que a solubilidade da curcumina comercial utilizada neste trabalho foi de 1,2 mg mL<sup>-1</sup>, enquanto que as nanopartículas tiveram um aumento de 56 vezes na solubilidade para **NEA**, de 38 para **NES**, de 46 para **NCA** e de 37 para **NCS**. Esse aumento mostra que os processos de nanodimensionamento empregados neste estudo são eficientes na obtenção de nanopartículas de curcumina solúveis, isso porque com a diminuição do tamanho de partícula a solubilidade tende a aumentar devido às amostras sofrerem maior efeito de solvatação (KECK; MÜLLER, 2006; KAKRAN *et al.*, 2012).

Singh *et al.* (2013) mostra a preparação de diferentes amostras de nanopartículas por dois métodos - fundido a quente (*hot melt*) e evaporação do solvente (*solvent evaporation*) - utilizando os polímeros PEG 4000, PEG 6000, polivinilpirrolidona (PVP K-30), resultando em uma solubilidade 75 vezes maior para preparação feita por evaporação do solvente com PVP K-30 (1:2) e de 1000 vezes para o fundido a quente com PEG 6000 (1:8), utilizando um filtro no ensaio de solubilidade de 11 μm, o que permitiria a passagem de micropartículas.

Kakran *et al.* (2012) obteve nanopartículas de curcumina por dois diferentes procedimentos, precipitação anti-solvente com bomba de seringa (antisolvent precipitation with a syringe pump - APSP) e precipitação evaporativa de nanosuspensão (evaporative precipitation of nanosuspension - EPN), sendo que a análise da solubilidade usando filtro 0,2 μm mostrou que o método EPN é 14 vezes mais solúvel (8,23 μg mL<sup>-1</sup>) e o método APSP (7,48 μg mL<sup>-1</sup>) é 10 vezes mais solúvel quando comparado com a curcumina (0,58 μg mL<sup>-1</sup>).

Neste trabalho utilizou-se um filtro de 1,2 µm e obtiveram-se valores intermediários aos observados nos estudos descritos. Entretanto, pode-se afirmar que os resultados são promissores, uma vez que os processos de nanodimensionamento são simples e as nanopartículas não têm outra substância associada que sirva como carreador, não necessitando, portanto de liberação de prévia.

## 6. 9 Espectroscopia no ultravioleta/visível (UV-vis)

A espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível utiliza radiação eletromagnética cujos comprimentos variam entre 160 a 780 nm. Quando estimulada com esse tipo radiação, a molécula do composto pode sofrer transições eletrônicas por meio de absorção de energia (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). Para isso, a quantidade de luz absorvida pela amostra é medida e relacionada com a concentração do soluto, sendo a Lei de Lambert-Beer (Equação 4) fundamental na espectrofotometria. Essa lei mostra que a absorbância é diretamente proporcional a concentração da espécie que absorve radiação (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

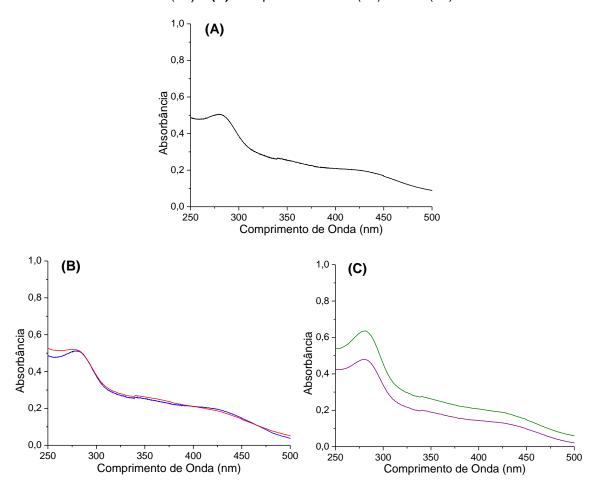
$$A = \varepsilon * l * C \tag{4}$$

onde: A é a absorbância; ε a absortividade molar; I o caminho óptico e C a concentração da amostra.

A espectroscopia no UV-vis foi aplicada para caracterização da curcumina comercial e das nanopartículas. Além disso, os resultados foram utilizados para comparação com os resultados da espectroscopia de fluorescência para escolha da técnica mais adequada para medidas dos testes de liberação *in vitro*. Espectros na

região do ultravioleta para curcumina comercial e nanopartículas em água (cujo pH é de 6,1), mostram bandas com  $\lambda_{max}$  em 280 nm e 420 nm (Figura 21), de modo similar ao encontrado em soluções etanol:água (20:80 a pH 7,0) cujo  $\lambda_{max}$  foi observado em 429 nm (PARIZE, 2009).

Figura 21 - Espectros na região do ultravioleta-vis das amostras em meio aquoso (pH 6,1) na concentração de 0,8 mg mL<sup>-1</sup> para: **(A)** Curcumina comercial (—); **(B)** nanopartículas **NEA** (—) e **NES** (—) e **(C)** nanopartículas **NCA** (—) e **NCS** (—).



Espectros na região do ultravioleta para as amostras de nanopartículas de curcumina em meio aquoso (pH 6,1) e em diferentes concentrações estão mostrados nas Figuras 22, 23, 24 e 25.

Figura 22 - **(A)** Espectros na região do ultravioleta para a amostra **NEA** nas concentrações de 3,2 mg mL<sup>-1</sup> (—), 1,6 mg mL<sup>-1</sup> (—), 0,8 mg mL<sup>-1</sup> (—); 0,4 mg mL<sup>-1</sup> (—), 0,2 mg mL<sup>-1</sup> (—), 0,05 mg mL<sup>-1</sup> (—) e **(B)** Curva da absorbância à 280 nm em função da concentração da amostra **NEA**.

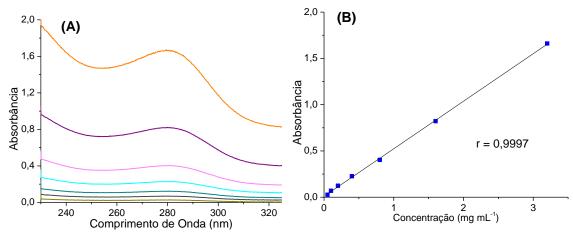


Figura 23 - **(A)** Espectroscopia na região do ultravioleta para a amostra **NES** nas concentrações de 3,2 mg mL<sup>-1</sup> (—), 1,6 mg mL<sup>-1</sup> (—), 0,8 mg mL<sup>-1</sup> (—); 0,4 mg mL<sup>-1</sup> (—), 0,2 mg mL<sup>-1</sup> (—), 0,05 mg mL<sup>-1</sup> (—) e 0,02 mg mL<sup>-1</sup> (—) e **(B)** Curva da absorbância à 280 nm em função da concentração da amostra **NES**.

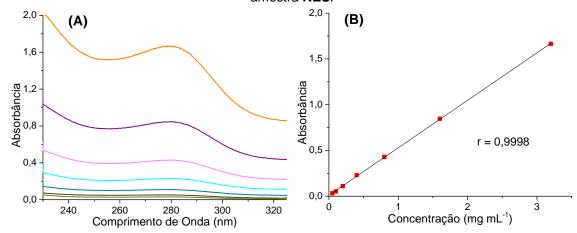


Figura 24 - **(A)** Espectroscopia na região do ultravioleta para a amostra **NCA** nas concentrações de 3,2 mg mL<sup>-1</sup> (—), 1,6 mg mL<sup>-1</sup> (—), 0,8 mg mL<sup>-1</sup> (—); 0,4 mg mL<sup>-1</sup> (—), 0,2 mg mL<sup>-1</sup> (—), 0,05 mg mL<sup>-1</sup> (—) e 0,02 mg mL<sup>-1</sup> (—) e **(B)** Curva da absorbância à 280 nm em função da concentração da amostra **NCA**.

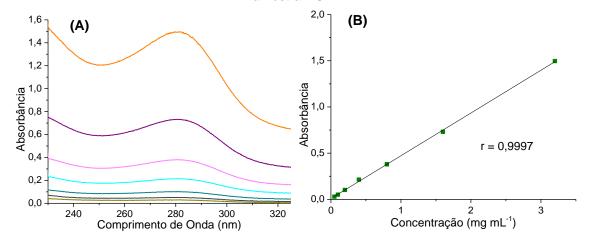
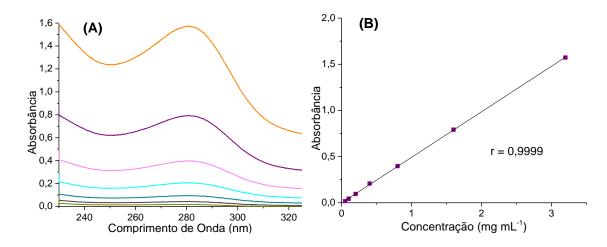


Figura 25 - **(A)** Espectros na região do ultravioleta para a amostra **NCS** nas concentrações de 3,2 mg mL<sup>-1</sup> (—), 1,6 mg mL<sup>-1</sup> (—), 0,8 mg mL<sup>-1</sup> (—); 0,4 mg mL<sup>-1</sup> (—), 0,2 mg mL<sup>-1</sup> (—), 0,05 mg mL<sup>-1</sup> (—) e 0,02 mg mL<sup>-1</sup> (—) e **(B)** Curva da absorbância à 280 nm em função da concentração da amostra **NCS**.



Utilizando-se o máximo de absorbância em 280 nm na variação de concentrações estudadas é possível observar a concordância com a lei de Lambert-Beer, indicando que não há agregação nessas condições.

#### 6.10 Espectroscopia de fluorescência

Fluorescência é a capacidade de uma substância emitir luz a partir de estados eletronicamente excitados (LAKOWICZ, 2006). Esse fenômeno ocorre quando uma molécula ou um átomo é excitado para um estado quântico mais energético e ao retornar rapidamente ao seu estado fundamental emiti um fóton de luz (LAKOWICZ, 2006).

A espectroscopia de fluorescência foi aplicada para caracterização da curcumina comercial e das nanopartículas. Para a espectroscopia de fluorescência obteve-se os espectros mostrados nas Figuras 26, 27, 28 e 29.

Figura 26 - **(A)** Espectro de fluorescência da curcumina comercial (—) e **NEA** nas concentrações de 50,0 mg mL<sup>-1</sup> (—), 25,0 mg mL<sup>-1</sup> (—), 12,5 mg mL<sup>-1</sup> (—), 6,2 mg mL<sup>-1</sup> (—), 3,2 mg mL<sup>-1</sup> (—),1,6 mg mL<sup>-1</sup> (—) e 0,5 mg mL<sup>-1</sup> (—) com excitação em 420nm e **(B)** Curva de λ máximo em função da concentração da amostra **NEA**.

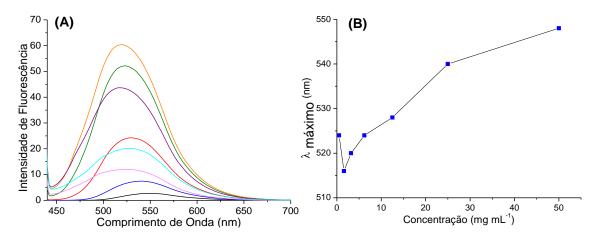


Figura 27 - **(A)** Espectro de fluorescência da curcumina comercial (—) e **NES** nas concentrações de 25,0 mg mL<sup>-1</sup> (—), 12,5 mg mL<sup>-1</sup> (—), 6,2 mg mL<sup>-1</sup> (—), 3,2 mg mL<sup>-1</sup> (—), 1,6 mg mL<sup>-1</sup> (—) e 0,5 mg mL<sup>-1</sup> (—) com excitação em 420nm e **(B)** Curva de λ máximo em função da concentração da amostra **NES**.

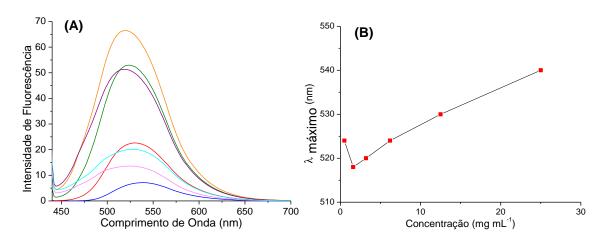


Figura 28 - **(A)** Espectro de fluorescência da curcumina comercial (—) e **NCA** nas concentrações de 50,0 mg mL<sup>-1</sup> (—), 25,0 mg mL<sup>-1</sup> (—), 12,5 mg mL<sup>-1</sup> (—), 6,2 mg mL<sup>-1</sup> (—), 3,2 mg mL<sup>-1</sup> (—), 1,6 mg mL<sup>-1</sup> (—) e 0,5 mg mL<sup>-1</sup> (—) com excitação em 420nm e **(B)** Curva de λ máximo em função da concentração da amostra **NCA**.

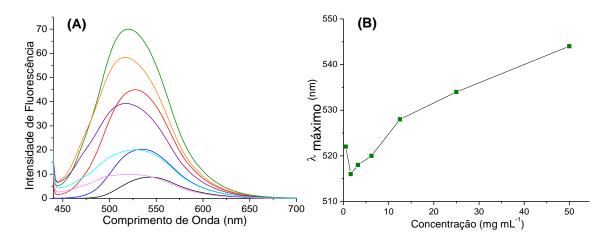
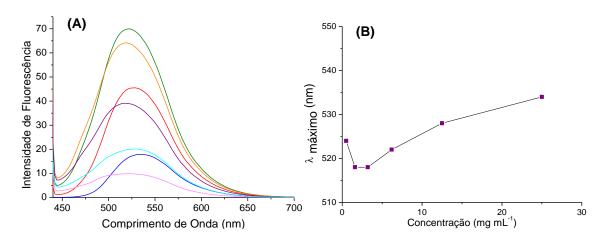


Figura 29 - **(A)** Espectro de fluorescência da curcumina comercial (—) e **NCS** nas concentrações de 25,0 mg mL<sup>-1</sup> (—), 12,5 mg mL<sup>-1</sup> (—), 6,2 mg mL<sup>-1</sup> (—), 3,2 mg mL<sup>-1</sup> (—), 1,6 mg mL<sup>-1</sup> (—) e 0,5 mg mL<sup>-1</sup> (—) com excitação em 420nm e **(B)** Curva de λ máximo em função da concentração da amostra **NCS**.



Os espectros mostram que o aumento do comprimento de onda máximo de fluorescência está diretamente relacionado à concentração, o que sugere uma agregação do tipo J. J-agregados são caracterizados pelo deslocamento batocrômico, ou seja, uma mudança de posição da banda espectral na absorção, reflectância, transmitância ou espectro de emissão de uma molécula de maior comprimento de onda (menor frequência) (KOBAYASHI; DU; KIDA, 2012; PESCITELLI; DI BARI; BEROVA, 2014). Esse efeito pode ocorrer devido a uma mudança nas condições ambientais, como alteração do solvente ou concentração. Entretanto, em altas concentrações pode ocorrer o efeito filtro, que leva a mudança na intensidade de fluorescência emitida. Isso ocorre devido à alta concentração de moléculas absorventes presentes, as quais impedem que a intensidade de luz de excitação seja constante e, consequentemente, apenas uma pequena percentagem dessa luz atinge os fluoróforos que são visíveis para o sistema de detecção (LAKOWICZ, 2006). Sendo assim, não é possível definir qual dos efeitos está demonstrado nos resultados.

Portanto, quando comparamos os resultados de ambas as espectroscopias, no UV-vis e de fluorescência, percebemos que a técnica mais adequada para uma análise de liberação *in vitro* de curcumina foi a espectroscopia no UV-vis.

#### 6.11 Ensaio de citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* foi utilizado como uma avaliação inicial do índice de sobrevivência das células após tratamento com as amostras de nanopartículas de curcumina estudadas a fim de detectar um potencial efeito citotóxico no sistema biológico. A determinação da viabilidade celular foi feita segundo o método do MTT, o qual se baseia na capacidade das células viáveis de reduzir o anel tetrazólico presente no sal de MTT, através da ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria ativa, formando cristais de formazan, de coloração roxa (MOSMANN, 1983).

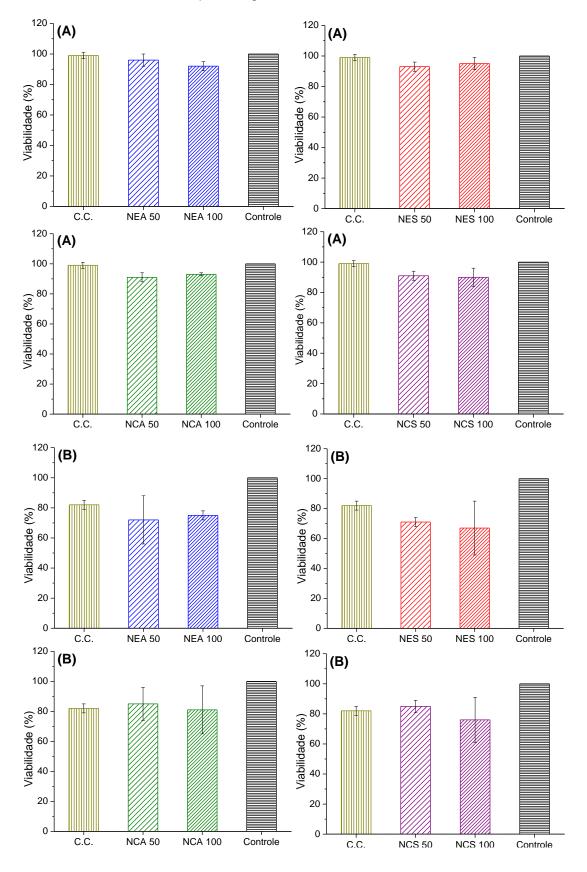
Usualmente, em ensaios biológicos é utilizado dimetilsulfóxido (DMSO) para a pré-solubilização da curcumina, porém esse solvente torna-se tóxico para células a partir da concentração de 5% (PEREIRA; WILLIAMS, 2007). Com a metodologia utilizada neste trabalho não é necessária essa pré-solubilização, que pode ser prejudicial para as células normais, interferindo, assim, nos resultados dos testes.

O índice de sobrevivência celular de cada amostra analisada para ambas as linhagens, VERO e HEp-2, foi calculado a partir das medidas de absorbâncias lidas, conforme item 5.12.4, e pode ser observado nas Tabelas 9 e 10 (Anexo B).

Os resultados do índice de sobrevivência (IS) para a linhagem VERO foram todos acima de 90%, o que indica uma baixa citotoxicidade para todas as amostras de nanopartículas.

Já os resultados para a linhagem HEp-2, devido a diminuição dos IS, sugerem que as nanopartículas possuem maior citotoxicidade para células tumorais quando comparados com os IS da linhagem VERO. Quando consideramos o IS da curcumina comercial е das nanopartículas mesma concentração na (100 µmol L<sup>-1</sup>), nota-se um aumento na morte celular para todas as amostras de nanopartículas. As amostras preparadas com o solvente E, apresentaram IS de 75% para **NEA** e de 67% para **NES**. Já as nanopartículas obtidas com o solvente **C** apresentaram IS de 81% para NCA e de 76% para NCS. A análise desses resultados sugere que nanopartículas preparadas com o solvente E tem uma maior atuação em células tumorais, principalmente as NES. Os resultados foram expressos em percentual de viabilidade e estão mostrados na Figura 30.

Figura 30 - Gráfico da viabilidade celular nas linhagens VERO (A) e HEp-2 (B) para a curcumina comercial e as amostras, NEA (■), NES (■), NCA (■) e NES (■). Resultados expressos em porcentagem de células viáveis.



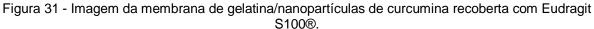
A linhagem celular HEp-2 (linhagem de células epiteliais de carcinoma epidermóide de laringe humana) foi utilizada apenas como modelo para verificar a ação antitumoral da curcumina comercial e das nanopartículas. Entretanto, essa linhagem não é normalmente empregada em estudos de citotoxicidade com curcumina, como descrito por Ji *et al.* (2012). Para avaliar a atividade antitumoral da curcumina são utilizadas linhagens de células de carcinoma de mama, células de câncer de pâncreas humano, células de câncer de cólon humano, células de melanoma de rato, entre outras (JI; HUANG; ZHU, 2012). Por isso, os valores de IS para todas as amostras foram maiores do que o esperado para a linhagem HEp-2. Contudo, a atividade antitumoral pode ser mostrada pela diferença que existe entre o índice de sobrevivência das células VERO (>90%) e o das células HEp-2 (<81%).

As nanopartículas possuem potencial para uso na clínica médica, pois apresentaram baixa citotoxicidade para células normais e atividade antitumoral, apesar da linhagem utilizada não ser adequada para esse experimento com curcumina.

# 6.12 Obtenção de membranas de gelatina/nanopartículas de curcumina recobertas com Eudragit S-100®

Nanopartículas de curcumina estão sendo estudadas para tratamento de vários tipos de câncer (JI; HUANG; ZHU, 2012; NAKSURIYA *et al.*, 2014; VISHVAKARMA, 2014), dentre eles o de intestino. Para que o tratamento de câncer de intestino seja efetivo as nanopartículas devem percorrer todo o trato gastrointestinal sem perder sua atividade e atingir o intestino para exercer sua função. O trato gastrointestinal tem diferentes pHs, como no estômago onde o pH é 2,0 e enquanto no intestino o pH é 7,0 (HUA *et al.*, 2015), e por isso é necessário a proteção das nanopartículas até chegarem no intestino. Assim, foi sugerido um modelo de transporte dessas nanopartículas a partir da dispersão das mesmas em gelatina com posterior recobrimento com Eudragit S100®, sendo que neste caso a liberação só ocorre em pH acima de 7,0 (KHATIK *et al.*, 2013).

As membranas de gelatina/nanopartículas de curcumina revestidas com Eudragit S100® foram obtidas para as amostras de nanopartículas de curcumina denominadas **NCA** (Figura 31) para ser utilizadas como exemplo.





#### 6.13 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O princípio da MEV consiste em utilizar um feixe de elétrons para varrer a superfície da amostra (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007). Esse feixe faz com que a própria amostra emita elétrons, os quais são detectados e, assim, a imagem pode ser construída à medida que a varredura da amostra está ocorrendo. Para isso é utilizado um microscópio eletrônico de varredura, que fornece informações sobre a morfologia de uma amostra sólida, rapidamente. Esse aparelho produz imagens de alta resolução, com aparência tridimensional e também permite o exame em pequenos aumentos e com grande profundidade de foco (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

As fotomicrografias obtidas por MEV foram feitas para verificar a morfologia das membranas de gelatina/nanopartículas de curcumina sem e com recobrimento de Eudragit S100®. As fotomicrografias por MEV das membranas não recobertas e recobertas com Eudragit S100® podem ser observadas na Figura 32 e 33, respectivamente.

Figura 32 - Fotomicrografias da membrana de gelatina/nanopartículas de curcumina sem recobrimento: **(A)** superfície, **(B)** transversal e **(C)** transversal.

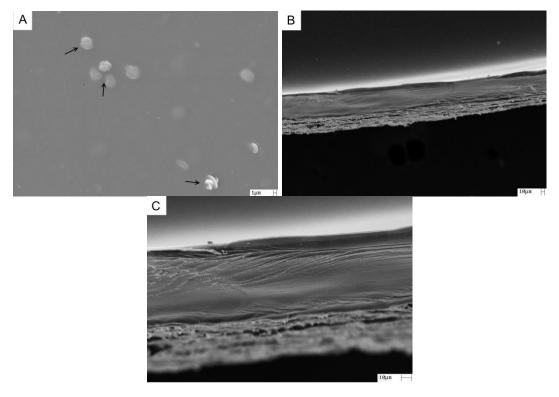
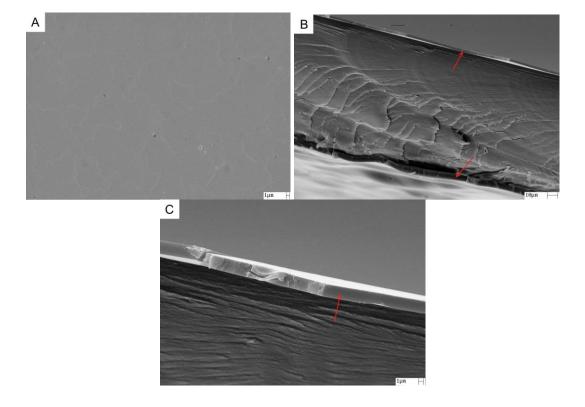


Figura 33 - Fotomicrografias da membrana de gelatina/nanopartículas de curcumina recoberta com Eudragit S100®: **(A)** superfície, **(B)** transversal e **(C)** transversal.

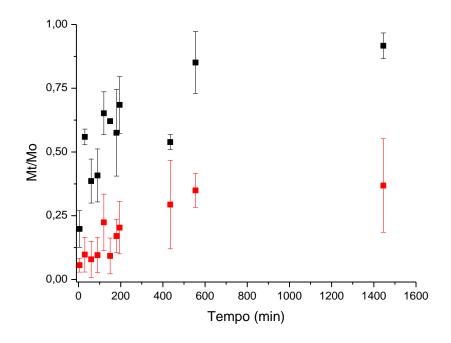


As fotomicrografias da superfície das membranas mostram para a membrana sem recobrimento de Eudragit S100® aglomerados de nanopartículas de curcumina, que não foi observado para as membranas recobertas. Esses aglomerados indicados pela seta preta apresentam um tamanho médio de 1,94  $\pm$  1,54  $\mu$ m (Figura 32 (A)). Quando se observa as fotomicrografias das secções transversais tem-se a membrana de gelatina/nanopartículas (Figura 32) com espessura de 153  $\pm$  22,35  $\mu$ m e de 135,65  $\pm$  3,13  $\mu$ m para a recoberta com Eudragit S100® (Figura 33) setas em vermelho, sendo que o revestimento apresentou 3,12  $\pm$  0,18  $\mu$ m (na face superior) e 6,57  $\pm$  0,38  $\mu$ m (na face inferior).

#### 6.14 Teste in vitro de liberação

O perfil de liberação observado para as membranas de gelatina/nanopartículas de curcumina revestidas com Eudragit S100® está mostrado na Figura 34. Observa-se uma liberação máxima de 40,1% em pH ácido (pH 2,0) após 24 h. Contudo, sabe-se que no metabolismo humano a permanência no estomago é de cerca de 2 h (HUA *et al.*, 2015) onde teríamos a liberação máxima de 10% de nanopartículas. Para o ensaio de liberação a pH 7,5 observou-se a dissolução da membrana após 30 min e uma liberação máxima de 91,7% após 24 h.

Figura 34 - Perfil de liberação da membrana de gelatina/nanopartículas de curcumina recoberta com Eudragit S100®: (■) pH 7,5 e (■) pH 2,0.



Diante disso, o sistema de liberação revestido com o Eudragit S100® protege as nanopartículas de curcumina quando a pH ácido, como o do estômago, e as libera por dissolução do sistema, a pH neutro, como o do cólon.

Conclusão 84

# 7 CONCLUSÃO

O nanodimensionamento da curcumina gerou nanopartículas com características químicas estruturais e físicas iguais a curcumina comercial em todos os métodos, sendo que o processo que utiliza etanol como solvente foi o mais eficaz devido à formação de nanopartículas de menor tamanho e mais uniformes.

As nanopartículas de curcumina apresentaram um tamanho menor como mostrado por DLS e AFM, além de uma maior estabilidade devido ao elevado potencial Zeta, em relação à curcumina comercial. Essas características levaram a uma maior solubilidade, o que contribui com o aumento de sua disponibilidade para uma possível absorção no organismo. Além disso, a baixa citotoxicidade apresentada pelas nanopartículas permitiria sua aplicação na clínica médica.

O sistema de liberação com as nanopartículas de curcumina em gelatina recobertas por Eudragit S100® exemplifica uma liberação eficiente a pH 7,5 com proteção a pH 2,0.

# 8 ANEXOS

ANEXO A

Tabela 7 - Fotodegradação para a curcumina comercial e para as nanopartículas de curcumina.

	Abs (280 nm)				
Amostra	0 h	6 h	12 h	18 h	24 h
Curcumina comercial	0,3483	0,2820	0,3799	0,3659	0,3861
NEA	0,3963	0,3980	0,4794	0,4650	0,4914
NES	0,4290	0,4103	0,4606	0,4859	0,4911
NCA	0,3110	0,3084	0,3579	0,3683	0,3711
NCS	0,3439	0,3401	0,3902	0,3972	0,4253

Fonte: Autoria própria

### **ANEXO B**

Tabela 9 - Índice de sobrevivência celular da linhagem VERO para cada amostra de nanopartículas de curcumina comercial nas três diferentes concentrações e para a curcumina comercial em concentração 100 μΜ.

Amostra	Concentração (µM)	Média das Absorbâncias ± DP <sup>A</sup>	IS <sup>B</sup> (%) ± DP <sup>A</sup>
Controle	-	1,897 ± 0,059	100
Curcumina comercial	100	1,882 ± 0,049	99 ± 2
NEA	50	$1,829 \pm 0,080$	96 ± 4
	100	$1,752 \pm 0,066$	92 ± 3*
NES	50	$1,770 \pm 0,058$	93 ± 3*
	100	1,801 ± 0,074	95 ± 4*
NCA	50	1,725 ± 0,064	91 ± 3*
	100	$1,771 \pm 0,030$	93 ± 1*
NCS	50	1,720 ± 0,071	91 ± 3*
	100	1,710 ± 0,131	90 ± 6*

<sup>&</sup>lt;sup>A</sup> Desvio Padrão, <sup>B</sup> Índice de Sobrevivência.

Fonte: Autoria própria

<sup>\*</sup> valores significativamente distintos ao controle (teste *t*-Student não pareado para desvios padrão que não diferem significativamente com 95% de confiança).

Tabela 10 - Índice de sobrevivência celular da linhagem HEp-2 para cada amostra de nanopartículas de curcumina comercial nas três diferentes concentrações e para a curcumina comercial em concentração 100 µM.

Amostra	Concentração (µM)	Média das Absorbâncias ± DP <sup>A</sup>	IS <sup>B</sup> (%)± DP <sup>A</sup>
Controle	-	1,186 ± 0,077	100
Curcumina comercial	100	$0.977 \pm 0.043$	82 ± 3*
NEA	50	$0,851 \pm 0,206$	72 ± 16*
	100	$0,891 \pm 0,040$	75 ± 3*
NES	50	$0.836 \pm 0.044$	71 ± 3*
	100	$0,798 \pm 0,236$	67 ± 18*
NCA	50	$1,010 \pm 0,140$	85 ± 11*
	100	$0,965 \pm 0,203$	81 ± 16*
NCS	50	$1,008 \pm 0,047$	85 ± 4*
	100	$0,900 \pm 0,198$	76 ± 15*

<sup>&</sup>lt;sup>A</sup> Desvio Padrão, <sup>B</sup> Índice de Sobrevivência.

\* valores significativamente distintos ao controle (teste *t*-Student não pareado para desvios padrão que não diferem significativamente com 95% de confiança). Fonte: Autoria própria

## **REFERÊNCIAS**

AHMED, T.; GILANI, A.H. Therapeutic potential of tumeric in Alzheimer's disease: curcumin or curcuminoids?. **Phytotherapy Research**, v.28, p.517-25, 2014.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. **Cell lines**. Disponível em:<a href="http://www.atcc.org">em:<a href="http://www.atcc.org">http://www.atcc.org</a>. Acesso em: 16 Sept. 2014.

ANAND, P. et al. Bioavailability of curcumin: problems and promises. **Molecular Pharmaceutics**, v.4, n.6, p.807-18, 2007.

ANDERSON, A.M.; MITCHELL, M.S.; MOHAN, R.S. Isolation of curcumin from turmeric. **Journal of Chemical Education**, v.77, n.3, p.359-60, 2000.

ANITHA, A. et al. Efficient water soluble O-carboxymethyl chitosan nanocarrier for the delivery of curcumin to cancer cells. **Carbohydrate Polymers**, v.83, p.452-61, 2011.

BARUI, S. et al. Simultaneous delivery of doxorubicin and curcumin encapsulated in liposomes of pegylated RGDK-lipopeptide to tumor vasculature. **Biomaterials**, v.35, p.1643-56, 2014.

BASNET, P.; ŠKALKO-BASNET, N. Curcumin: an anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. **Molecules**, v.16, p.4567-98, 2011.

BERGINC, K. et al. Mucoadhesive liposomes as new formulation for vaginal delivery of curcumin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.87, p.40-6, 2014.

BERGONZI, M.C. et al. Optimization, characterization and in vitro evaluation of curcumin microemulsions. **LWT** – food science and technology, v.59, p.148-55, 2014.

BIOPHYSICS. **Dynamic light scattering common terms defined**. Dsponível em:<a href="http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/wp-content/uploads/2011/02/DLS\_Terms\_defined\_Malvern.pdf">http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/wp-content/uploads/2011/02/DLS\_Terms\_defined\_Malvern.pdf</a>. Acesso em: 10 Nov. 2015.

BISHT, S. et al. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin ("nanocurcumin"): a novel strategy for human cancer therapy. **Journal of Nanobiotechnology**, v.5, n.3, p.1-18, 2007.

CHANG, M.T. et al. Elevating bioavailability of curcumin via encapsulation with a novel formulation of artificial oil bodies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, p.9666-71, 2013.

CHEN, A.L. et al. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agente, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. **Anticancer Research**, v.21, p.2895-900, 2001.

CORADINI, K. et al. Co-encapsulation of resveratrol and curcumin in lipid-core nanocapsules improves their *in vitro* antioxidant effects. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.88, p.178-85, 2014.

DANAFAR, H. et al. Biodegradable m-PEG/PCL core-shell micelles: preparation and characterization as a sustained release formulation for curcumin. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v.4, p.501-10, 2014.

DEDAVID, B.A.; GOMES, C.I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura**: aplicações e preparação de amostras. Porto Alegre: EdiPUCRS, 2007. v.1, p.9-10.

DEL SOCORRO, M.M.L.; TEVES, F.G.; MADAMBA, M.R.S.B. DNA-binding activity and partial characterization by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) of *Curcuma longa* L. SC-CO2 extracts. **International Research Journal of Biological Sciences**, v.2, n.5, p.40-4, 2013.

DRBOHLAVOVA, J. et al. Nanocarriers for anticancer drugs – new trends in nanomedicine. **Current Drug Metabolism**, v.14, p.547-64, 2013.

FERREIRA, A.A.P.; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoensaios. **Química Nova**, v.29, n.1, p.137-42, 2006.

FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells**: a manual of basic technique and specialized applications. 6<sup>th</sup>ed. New York: Wiley BlackWell, 2010. v.1.

GELIFESCIENCES. **Hyclone**. Disponível em:<a href="http://www.gelifesciences.com/hyclone">http://www.gelifesciences.com/hyclone</a>>. Acesso em: 16 Oct. 2015.

GHALANDARLAKI, N.; ALIZADEH, A.M.; ASHKANI-ESFAHANI, S. Nanotechnology-applied curcumin for different diseases therapy. **BioMed Research Internatinal**, v.2014, p.23, 2014.

GÓMEZ-GUILLÉN, M.C. et al. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: a review. **Food Hydrocolloids**, v.25, p.1813-27, 2011.

GONÇALVES, C. et al. Self-assembled dextrin nanogel as curcumin delivery system. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v.3, p.178-84, 2012.

HIEMENZ, P.C.; RAJAGOPALAN, R. **Principles of colloid and surfasse chemistry**. 3<sup>rd</sup>ed. New York: CRC Press, 1997.

HUA, S. et al. Advances in oral nano-delivery systems for colon targeted drug delivery in inflammatory bowel disease: Selective targeting to diseased versus

healthy tissue. **Nanomedicine**: nanotechnology, biology, and medicine, v.11, p.1117-32, 2015.

HUNTER, R.J. **Zeta potential in colloid science**: principles and applications. New York: Academic Press, 1981.

JI, J.L.; HUANG, X.F.; ZHU, H.L. Curcumin and its formulations: potential anticancer agents. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v.12, p.210-8, 2012.

KAKRAN, M. et al. Preparation of nanoparticles of poorly water-soluble antioxidant curcumin by antisolvent precipitation methods. **Journal of Nanoparticle Research**, v.14, p.757, 2012.

KECK, C.M.; MÜLLER, R.H. Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.62, p.3-16, 2006.

KHATIK, R. et al. Colon-specific delivery of curcumin by exploiting eudragit-decored chitosan nanoparticles in vitro and in vivo. **Journal of Nanoparticle Research**, v.15, p.1893, 2013.

KIM, H.J. et al. Curcumin dye extracted from *Curcuma longa* L. used as sensitizers for efficient dye-sensitized solar cells. **International Journal of Electrochemical Science**, v.8, n.6, p.8320-8, 2013.

KIUCHI, F. et al. Nematocidal activity of turmeric - synergistic action of curcuminoids. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.41, n.9, p.1640-3, 1993.

KOBAYASHI, T.; DU, J.; KIDA, Y. **J-Aggregates**. Singapore: World Scientific, 2012. v.2.

KRAUSZ, A.E. et al. Curcumin-encapsulated nanoparticles as innovative antimicrobial and wound healing agente. **Nanomedicine**: nanotechnology, biology, and medicine, v.11, p.195-206, 2015.

LAKOWICZ, J.R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3<sup>rd</sup>ed. New York: Springer Science, 2006.

MA, Z.; BAI, J.; JIANG, X. Monitoring of the enzymatic degradation of protein corona and evaluating the accompanying cytotoxicity of nanoparticles. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v.7, p.17614-22, 2015.

MALVERN INSTRUMENTS LTDA. Zetasizer nano: user manual. England, 2013.

MIRSHAFIEE, V. et al. Protein corona significantly reduces active targeting yield. **Chemical Communications**, v.49, n.25, p.2557-9, 2013.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and citotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

NAKSURIYA, O. et al. Curcumin nanoformulatios: a review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment. **Biomaterials**, v.35, p.3365-83, 2014.

PARIZE, A.L. **Desenvolvimento de sistemas microparticulados e de filmes a base de quitosana e corante natural cúrcuma**. 2009. 187 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) - Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

PATEL, S.P.; PATEL, P.B.; PAREKH, B.B. Application of nanotechnology in cancers prevention, early detection and treatment. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v.10, n.3, p.479-86, 2014.

PEREIRA, D.A.; WILLIAMS, J.A. Review: historical perspectives in pharmacology origin and evolution of high throughput screening. **British Journal of Pharmacology**, v.152, p.53-61, 2007.

PESCITELLI, G.; DI BARI, L.; BEROVA, N. Application of electronic circular dichroism in the study of supramolecular systems. **Chemical Society Reviews**, v.43, p.5211-33, 2014.

POPAT, A. et al. Curcumin-cyclodextrin encapsulated chitosan nanoconjugates with enhanced solubility and cell cytotoxicity. **Colloids and Surfaces B**: biointerfaces, v.117, p.520-7, 2014.

PRASAD, S.; TYAGI, A.K.; AGGARWAL, B.B. Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: the golden pigment from golden spice. **Cancer Research and Treatment**, v.46, n.1, p.2-18, 2014.

RAGHAVENDRA, G.M. et al. Microbial resistant nanocurcumin-gelatin-cellulose fibers for advanced medical applications. **RSC Advances**, v.4, p. 3494-501, 2014.

RANBY, B.; RABEK, J.F. **Photodegradation, photo-oxidation and photostabilization of polymers**: principles and applications. New York: John Wiley, 1975.

ROHMAN, A. Analysis of curcuminoids in food and pharmaceutical products. **International Food Research Journal**, v.19, n.1, p.19-27, 2012.

ROUGHLEY, P.J.; WHITING, D.A. Experiments in the biosynthesis of curcumin. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, v.20, p.2379-88, 1973.

SAFARI, J.; ZARNEGAR, Z. Advanced drug delivery systems: nanotechnology of health design a review. **Journal of Saudi Chemical Society**, v.18, p.85-99, 2014.

SAFI, M. et al. The Effects of aggregation and protein corona on the cellular internalization of iron oxide nanoparticles. **Biomaterials**, v.32, p.9353-63, 2011.

SAHOO, S.K.; PARVEEN, S.; PANDA, J.J. The Present and the future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine**: nanotechnology, biology, and medicine, v.3, p.20-31, 2007.

SAMPATH, M. et al. Curcumin loaded poly (lactic-co-glycolic) acid nanofiber for the treatment of carcinoma. **Colloids and Surfaces B**: biointerfaces, v.117, p.128-34, 2014.

SHISHODIA, S.; CHATURVEDI, M.M.; AGGARWAL, B.B. Role of curcumin in cancer therapy. **Current Problems in Cancer**, v.31, n.4, p.243-305, 2007.

SIGMA ALDRICH. **Products**. Disponível em:<a href="http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/">http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/</a>>. Acesso em: 13 Nov. 2014.

SINGH, D.P. et al. Enhancement of aqueous solubility of curcumin by solid dispersion technology. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.2, n.5, p.4109-20, 2013.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SOUZA, C.R.A.; OSME, S.F.; GLÓRIA, M.B.A. Stability of curcuminoid pigments in model systems. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.21, p.353-63, 1997.

SUN, M. et al. Advances in nanotechnology-based delivery systems for curcumin. **Nanomedicine**, v.7, n.7, p.1085-100, 2012.

SUN, W. et al. Construction and characterization of curcumin nanoparticles system. **Journal of Nanoparticle Research**, v.16, p.2317, 2014.

THORLEY, A.J.; TETLEY, T.D. New perspectives in nanomedicine. **Pharmacology & Therapeutics**, v.140, p.176-85, 2013.

TIAN, J. et al. Application of nanomaterials in sample preparation. **Journal of Chromatography A**, v.1300, p.2-16, 2013.

TSAI, Y.M. et al. Curcumin and its nano-formulation: the kinetics of tissue distribution and blood-brain barrier penetration. **International Journal of Pharmaceutics**, v.416, p.331-8, 2011.

VISHVAKARMA, N.K. Novel antitumor mechanisms of curcumin: implication of altered tumor metabolism, reconstituted tumor microenvironment and augmented myelopoiesis. **Phytochemistry Reviews**, v.13, p.717-24, 2014.

VOGEL, A.I. Química analítica qualitativa. 5.ed. São Paulo: Mestre Jou, 1981.

WAHLSTRÖM, B.; BLENNOW, G. A Study on the fate of curcumin in the rat. **Acta Pharmacolica et Toxicologica**, v.43, n.2, p.86-92, 1978.

WEISSIG, V.; PETTINGER, T.K.; MURDOCK, N. Nanopharmaceuticals (part I): products on the market. **International Journal of Nanomedicine**, v.9, p.4357-73, 2014.

XIAO, J.; NIAN, S.; HUANG, Q. Assembly of kaferin/carboxymetil chitosan nanoparticles to enhance the cellular uptake of curcumin. **Food Hydrocolloids**, v.51, p.166-75, 2015.

YALLAPU, M.M.; JAGGI, M.; CHAUHAN, S.C. Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer. **Drug Discovery Today**, v.17, n.1/2, p.71-80, 2012.

ZHANG, Y.; CHAN, H.F.; LEONG, K.W. Advanced materials and processing for drug delivery: the past and the future. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.65, p.104-20, 2013.