

**MARCELO RODRIGUES BARBOSA**

**INVESTIGAÇÃO ELETROQUÍMICA DA DEGRADAÇÃO DA CURCUMINA  
LIVRE E NANOENCAPSULADA.**

**GUARAPUAVA**

**2016**

**MARCELO RODRIGUES BARBOSA**

**INVESTIGAÇÃO ELETROQUÍMICA DA DEGRADAÇÃO DA  
CURCUMINA LIVRE E NANOENCAPSULADA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual do Centro-Oeste, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Química Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Chierici Lopes

Co-orientador: Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil

**GUARAPUAVA-PR**

**2016**

Catálogo na Publicação  
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

B238i Barbosa, Marcelo Rodrigues  
Investigação eletroquímica da degradação da curcumina livre e nanoencapsulada / Marcelo Rodrigues Barbosa. -- Guarapuava, 2016  
xiii, 63 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, 2016

Orientador: Mauro Chierici Lopes  
Coorientador: Najeh Maissar Khalil  
Banca examinadora: Karen Wohnra, Fauze Jacó Anaissi, Mauro Chierici Lopes, Najeh Maissar Khalil

Bibliografia

1. Química. 2. Curcumina. 3. Eletroquímica. 4. Nanocápsulas de PLA. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Química.

| CDD 542

MARCELO RODRIGUES BARBOSA

INVESTIGAÇÃO ELETROQUÍMICA DA DEGRADAÇÃO DA CURCUMINA  
LIVRE E NANOENCAPSULADA

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, área de concentração em Físico-Química, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovado \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Prof. Dr. Karen Wohnra– UEPG (Banca)

Prof. Dr. Fauze Jaco Anaissi– UNICENTRO (Banca)

Prof. Dr. Mauro Chierici Lopes

Orientador

Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil

Co-orientador

**GUARAPUAVA–PR**

**2016**

# Agradecimentos

Agradeço inicialmente a Deus, por acreditar que nossa existência pressupõe outra infinitamente superior.

Aos meus pais Milton e Marly e aos meus irmãos Rafael, Thatiane e minha cunhada Maiara.

Ao meu orientador, Professor Mauro pela sua dedicação e ensinamentos partilhado nesse período e o meu co-orientador, Professor Najeh. Muitos trabalhos virão ainda com o apoio de vocês.

Um agradecimento aos meus Amigos do Tocantins, Maiko, Carlos Rangel, Cleusom, Daniel, Rui, Lancaster e Victor pelo companheirismo que construímos no decorrer da vida.

A Jakeline pelo apoio, companheirismo e dedicação, por esta ao meu lado todos os dias nessa árdua batalha do mestrado e me acompanhar na minha jornada mesmo longe.

Um agradecimento aos meus Amigos do Paraná, Lucas, Angello, Alexandre, Artur, Rafael, Gabriel (DK), Rodolpho, João (Pérsia), Bernard, Marcos, Alex, Jessika e Fernanda, por todo apoio e bons momentos que tivemos nessa etapa importante de minha vida.

Aos amigos e colegas da graduação, mestrado e doutorado, Fransley, Evaldo, Cristiano, Willian, Aline e em especial ao Hécio pela paciência e ajuda no primeiro ano de Mestrado.

Ao Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica, em especial ao Junior e Emili pelo auxílio na confecção das nanocurcumina.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada que nos proporcionaram adquirir novos conhecimentos.

Aos professores da UNICENTRO Fauze, Eryza, Andressa e Jociani (UTFPR) pelas contribuições nas bancas de qualificação.

A todos os demais funcionários da UNICENTRO que de alguma forma participaram deste período.

A CAPES pelo período em que recebi bolsa de estudos.

“Sua tarefa é descobrir o seu trabalho e, então,  
com todo o coração, dedicar-se a ele.”

- Buda

Dedico este trabalho primeiramente a Deus que me deu forças e coragem para ir atrás e não desistir dos meus sonhos. Aos meus pais e irmãos que estiveram sempre ao meu lado e me ajudaram para que mais esta etapa da minha vida fosse concluída. Ao meu orientador Prof<sup>o</sup> Dr. Mauro Chierici Lopes que me deu todo o apoio necessário para o desenvolvimento deste trabalho. E aos demais que de alguma forma me apoiaram.

## **Resumo**

A Curcumina é obtida a partir das raízes de *Cúrcuma longa* secas (Açafrão), é um material de cor dourada, utilizada ao redor do mundo como tempero. Desde a antiguidade, curcumina tem sido amplamente utilizada no tratamento de várias. A curcumina é responsável tanto pelas suas características como corantes, bem como as suas atividades biológicas. Por apresentar propriedades antioxidantes e aplicação no tratamento de várias doenças a curcumina tem atraído interesse de muitos pesquisadores. Várias estratégias vêm sendo estudadas para melhorar a biodisponibilidade da curcumina no organismo, uma delas é o encapsulamento da curcumina em nanopartículas, o que possibilita uma melhor aplicação farmacológica. Um polímero que tem sido muito utilizado para essa nanoencapsulação é o poliácido lácteo (PLA) que é um material biocompatível e biodegradável apropriado para as aplicações clínicas. A eletroquímica além de ser uma forma rápida e eficaz na investigação destes aspectos, permite também avaliar se os processos de transferência de carga e sua atividade antioxidante sofrem mudanças com o encapsulamento. A atividade antioxidante de um composto é comumente avaliada por meio da técnica de voltametria cíclica, com base no pico de potencial de oxidação. O presente trabalho tem por objetivo estudar a degradação da curcumina nanoencapsulada de PLA e a curcumina livre em diferentes pHs utilizando métodos eletroquímicos. Todos os estudos eletroquímicos foram efetuados numa cela eletroquímica termostatizada de um único compartimento com capacidade de volume máximo de 8mL. Os estudos alcançados nesse trabalho referente a degradação da curcumina o mostraram que quando a curcumina é nanoencapsulada ela é significativamente mais estável que a curcumina livre, assim percebeu-se que a atividade da curcumina depende diretamente do pH.

Palavra Chave: Curcumina, eletroquímica e nanocápsulas de PLA.



## **Abstract**

Curcumin is obtained from *Curcuma* long dry roots (Saffron), is a gold-colored material used around the world as a seasoning. Since ancient times, curcumin has been widely used in treating various. Curcumin is responsible both for its coloring characteristics as well as their biological activities. Because it has antioxidant properties and application in the treatment of various diseases curcumin has attracted the interest of many researchers. Several strategies are being studied to improve the bioavailability of curcumin in the body, one is the encapsulation of curcumin on nanoparticles, which allows a better pharmacological application. A polymer that has long been used for this nanoencapsulation is milk polyacid (PLA) which is a biocompatible and biodegradable material suitable for clinical applications. Electrochemical and is a quick and effective way in investigating these aspects allows also assess whether the charge transfer processes and their antioxidant activity undergo changes with the package. The antioxidant activity of a compound is often evaluated by cyclic voltammetry technique based on oxidation peak potential. This work aims to study the degradation of nanocoated curcumin PLA and the free curcumin at different pHs using electrochemical methods. All electrochemical studies were performed in a thermostatically controlled electrochemical cell of a single compartment with a maximum volume of 8 mL capacity. Studies achieved in this work regarding the degradation of curcumin showed that when the curcumin is nanocoated it is significantly more stable than the free curcumin, and it was observed that the activity of curcumin directly depends on the pH.

**Keyword:** Curcumin , electrochemistry and PLA nanocapsules .

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	16
2.1 Compostos Fenólicos e os Antioxidantes .....	16
2.2 Curcumina.....	16
2.3 Tratamento de doenças .....	20
2.4 Ação antidiabética.....	22
2.5 Ação antifúngica .....	22
2.6 As nanopartículas poliméricas .....	23
2.7 Voltametria cíclica.....	24
2.8 Voltametria de pulso diferencial.....	25
2.9 Espectrofotômetro.....	26
2.10 Lei de Lambert - Beer .....	27
3. OBJETIVO:.....	29
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	29
4. METODOLOGIA .....	29
4.1 Eletrodos .....	29
4.2 Eletrodo de trabalho.....	30
4.3 Eletrodo auxiliar .....	30
4.4 Eletrodo de referencia .....	30
4.5 Limpeza do eletrodo de trabalho .....	30
4.6 Instrumentação.....	31

4.7	Parâmetros voltamétricos.....	31
4.8	Reagentes e soluções .....	31
4.9	Nanoencapsulação da curcumina.....	32
4.10	Obtenção da curva analítica da curcumina .....	33
5.	RESULTADO E DISCUSSÃO .....	35
5.1	Curcumina livre .....	35
5.2	Estudo Voltamétrico da curcumina Livre .....	37
5.3	Voltametria de Pulso Diferencial da curcumina livre.....	42
5.4	Estudo Voltamétrico da curcumina nanoencapsulada .....	44
5.5	Curva Analítica .....	48
5.6	Caracterização das nanocápsulas de curcumina, tamanho e polidispersão. ....	49
5.7	Estudo da Degradação da curcumina por Pulso diferencial.....	50
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	59
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

## Lista de Figuras

Figura 1 Estrutura da curcumina (JOVANOVIC, 2001).....	17
Figura 2. Tautomerismo da curcumina. (BARZEGAR, 2012).....	18
Figura 3 Biossíntese da curcumina (Adaptado de LUMA, COLLINO 2000).....	19
Figura 4. Produtos da degradação da curcumina (Adaptado WANG et al, 1997). ....	20
Figura 5. Nanopartículas poliméricas (Adaptado de SCHAFFAZICK et al., 2003).....	23
Figura 6. (A) Variação do Potencial com o tempo em voltametria cíclica. (B) Voltamograma cíclico para um sistema reversível. (SKOOG, 2010). ....	25
Figura 7. Voltametria de pulso diferencial (a) e voltamograma de pulso resultante (b). 26	
Figura 8. Esquema óptico dos principais componentes do espectrofotômetro. (a) fonte de luz, (b) colimador, (c) prisma ou rede de difração, (d) fenda seletora de X, (e) compartimento de amostras com cubeta contendo solução, (f) célula fotométrica, (g) amplificador. <b>Fonte:</b> <a href="http://www.ufrgs.br/leo/site_espec/componentes.html">http://www.ufrgs.br/leo/site_espec/componentes.html</a> .....	27
Figura 9.Cela eletroquímica. ....	29
Figura 10. Eletrodo de trabalho CG .....	30
Figura 11. Etapas da limpeza do eletrodo de trabalho.....	31
Figura 12. Etapas de encapsulação da curcumina .....	36
Figura 13. Voltamogramas de dois ciclos obtidos numa solução de curcumina 10uM em tampão acetato 3,5(a), 4,2(b), tampão fosfato 6,9 (c) e 7,4 (d) respectivamente .....	34
Figura 14. Mecanismo proposto por Manaia (2011) para oxidação da curcumina e dos seus produtos de oxidação.....	37
Figura 15. Voltamograma da curcumina 100µm em tampão acetato pH 3,5, em velocidades 0,01, 0,1, 0,5, 1,0, 1,2V.s <sup>-2</sup> . ....	38
Figura 16. Gráfico de linearidade de corrente de pico em função da velocidade (a), da raiz da velocidade (b) .....	39
Figura 17. Voltamograma da curcumina 100µm em tampão acetato pH 4,2, em velocidades 0,01, 0,1, 0,5, 1,0, 1,2V.s <sup>-2</sup> .....	39
Figura 18. Gráfico de linearidade de corrente de pico em função da velocidade (a), da raiz da velocidade (b) .....	40
Figura 19. Voltamograma da curcumina 100µm em tampão fosfato pH 6,9, em velocidades 0,01, 0,1, 0,5, 1,0, 1,2V.s <sup>-2</sup> .....	41
Figura 20. Voltamograma da curcumina 100µm em tampão fosfato pH 7,4, em velocidades 0,01, 0,1, 0,5, 1,0, 1,2V.s <sup>-2</sup> .....	42

Figura 21. Voltamogramas de dois ciclos de pulso diferencial obtidos numa solução de curcumina 10uM em tampão acetato 3,5(a) e 4,2(b) respectivamente.....	42
Figura 22. Voltamogramas de dois ciclos de pulso diferencial obtidos numa solução de curcumina 10uM em tampão fosfato 6,9(a) e 7,4(b) respectivamente. ....	43
Figura 23. Voltamograma de pulso diferencial, obtidos na primeira varredura em solução de curcumina 10uM, em diferentes pHs. 1B relação gráfica do potencial de picos em função do pH. ....	44
Figura 24.. Voltamograma de pulso diferencial, obtidos na segunda varredura em solução de curcumina 10uM, em diferentes pHs. 1b relação gráfica do potencial de picos em função do pH. ....	45
Figura 25. Voltamograma da curcumina nanoencapsulada de PLA a 100µm em tampão acetato pH 3,5, em velocidades 0,01, 0,1, 0,5, 1,0, 1,2V.s-2 .....	46
Figura 26. Voltamograma da curcumina nanoencapsulada de PLA a 100µm em tampão acetato pH 4,2, em velocidades 0,01, 0,1, 0,5, 1,0, 1,2V.s-2 .....	47
Figura 27. Voltamograma da curcumina nanoencapsulada de PLA a 100µm em tampão acetato pH 7,4, em velocidades 0,01, 0,1, 0,5, 1,0, 1,2V.s-2 .....	48
Figura 28. Representação gráfica da curva padrão da curcumina em etanol, através de espectrofotômetro em 426nm. ....	49
Figura 29. Voltamogramas de pulso diferencial da curcumina livre (a) e corrente de pico em função do tempo (b) em 100 µM em tampão acetato pH 3,5 .....	51
Figura 30. Variação da intensidade de corrente no decorrer do tempo da curcumina livre (a) e corrente de pico em função do tempo (b) 100 µM em tampão fosfato pH 6,9. ....	52
Figura 31. Variação da intensidade de corrente no decorrer do tempo da curcumina livre (a) e corrente de pico em função do tempo (b) 100 µM em tampão fosfato pH 7,4. ....	53
Figura 32. Variação da intensidade de corrente no decorrer do tempo da curcumina nanoencapsulada de PLA 100 µM em tampão acetato pH 3,5.....	54
Figura 33. Variação da intensidade de corrente pelo tempo da curcumina nanoencapsulada em tampão fosfato pH 6,9 (a) e tampão fosfato 7,4 (b).....	55
Figura 34. Variação da intensidade de corrente no decorrer do tempo da curcumina livre e da curcumina nanoencapsulada com PLA 100 µM em tampão acetato pH 3,5. ....	56
Figura 35. Variação da intensidade de corrente no decorrer do tempo da curcumina livre e da curcumina nanoencapsulada com PLA 100 µM em tampão fosfato pH 6,9. ....	57
Figura 36. Variação da intensidade de corrente no decorrer do tempo da curcumina livre e da curcumina nanoencapsulada com PLA 100 µM em tampão fosfato pH 7,4. ....	58

## **Lista de Tabelas**

**Tabela 1.** Soluções do eletrólito suporte utilizado no experimento

**Tabela 2.** Caracterização do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta, da nanocápsulas de PLA de curcumina.

## 1. INTRODUÇÃO

As substâncias presentes nos vegetais vêm sendo utilizadas desde os tempos antigos para o tratamento de doenças. Com o desenvolvimento de tecnologias e técnicas de análise na química, surgiram possibilidades de compreender a estrutura e os mecanismos que envolvem as substâncias naturais, de tal forma que podem ser convertidos em soluções para o tratamento de doenças.

Um das substâncias que vem se destacando nos últimos anos é a curcumina, que é utilizada na área farmacológica no estudo do comportamento da espécie e também é bastante empregada na culinária. Devido as suas propriedades antioxidantes e aplicação no tratamento de várias doenças a curcumina tem atraído interesse de muitos pesquisadores.

A eliminação da curcumina pelo organismo é uma das principais razões para a baixa biodisponibilidade deste composto, devido a sua baixa solubilidade em água, perdendo a sua eficácia. No entanto por meios de adjuvantes (adição de outras substâncias), podem melhorar a biodisponibilidade da curcumina melhorando a ação da mesma no organismo.

Outra estratégia para melhorar a disponibilidade é o encapsulamento da curcumina em nanopartículas poliméricas, que tem a função de melhorar a solubilidade da curcumina, possibilitando uma melhor aplicação na farmacologia. Um polímero que tem sido bastante aplicado para essa nanoencapsulação é o poliácido lácteo (PLA) que é um material biocompatível e biodegradável adequado para as aplicações clínicas (SINGH, 2007).

Embora já se fabrique diversas formas de curcumina nanoencapsulada, é importante testar sua biodisponibilidade e sua estabilidade em diferentes meios. A eletroquímica além de ser um meio rápido e eficaz para investigar estes aspectos, permite avaliar se os processos de transferência de carga e sua atividade antioxidante sofrem mudanças com a encapsulação.

A atividade antioxidante de um composto é comumente avaliada por meio da técnica de voltametria cíclica, com base no pico de potencial de oxidação. Quanto mais negativo o potencial de pico de oxidação, maior é a atividade antioxidante. A voltametria também possibilita a investigação do mecanismo de oxidação, proporcionando uma possibilidade para a determinação dos sítios de origem da reatividade da curcumina em condições experimentais apropriadas. (CHEN, 2013).

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Compostos Fenólicos e os Antioxidantes**

Os compostos fenólicos são um dos maiores e mais numerosos grupos distribuídos de metabólitos secundários de plantas. Os polifenóis são produzidos naturalmente e são encontrados em quantidades significativas em vegetais, frutas e bebidas, constituindo uma parcela importante da dieta (SOOBRAATTEE et al., 2005).

Os polifenóis encontrados nas plantas são conhecidos como agentes multifuncionais, ou seja, apresentam uma grande variedade de efeitos biológicos, incluindo antibacteriano, anti-inflamatório, antiviral, anticarcinogênico e antimutagênico, sendo muitas das suas propriedades atribuídas ao seu potencial antioxidante, cuja eficiência pode superar a capacidade antioxidante das vitaminas C e E (ANTUNES et al., 2000; MIDDLETON et al., 2000).

Durante as últimas décadas, os estudos feitos por Halliwell (2001) têm mostrado uma associação inversa entre o consumo de vegetais e frutas e o desenvolvimento de uma grande variedade de doenças relacionadas com a geração de espécies reativas de oxigênio, incluindo doenças neurodegenerativas, câncer, diabetes, doenças inflamatórias e envelhecimento. Estas espécies reativas de oxigênio podem ser altamente prejudiciais ao organismo, pois elas atacam as macromoléculas biológicas, tais como os lipídeos, as proteínas e o DNA, causando a oxidação e provocando danos nas membranas, inativação de enzimas e danos no DNA (HALLIWELL, 2001). Embora os efeitos protetores da dieta tenham sido primariamente atribuídos aos antioxidantes já reconhecidos, tais como as vitaminas C, e o  $\beta$ -caroteno, os compostos fenólicos encontrados nas frutas, chás e vinhos também apresentam um potencial antioxidante significativo que pode ser estudado (AROUMA, 2003).

Estudos feitos por Dajas et al (2003) mostraram os efeitos benéficos da dieta com alto consumo de compostos fenólicos antioxidantes contra o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, mostrando que os compostos fenólicos antioxidantes retardam o desenvolvimento dessas doenças.

### **2.2 Curcumina**

Atualmente, um grande número de compostos provenientes das plantas, como os flavonóides e os polifenóis, tem recebido atenção por apresentarem efeitos no combate a diversas doenças. Dentre esses compostos, a curcumina tem se destacado por ser uma substância promissora devido à sua ação antioxidante.



A curcumina (1,7-bis (4-hidroxi- 3-metóxi)fenil) -1,6- heptadieno-3,5-diona) (Figura 1) é uma substância extraída do açafrão, e tem diversas aplicações farmacológicas para o tratamento de câncer, anti-HIV, transtornos bipolares e mais comumente utilizadas na indústria culinária como corante natural. (ANAND, 2008; DAHMKE, 2014).

A curcumina (Figura 1) é um pó cristalino amarelo-alaranjado praticamente insolúvel em água e éter, porém solúvel em etanol, metanol, acetona, (GRYNKIEWICZ & SLIFIRSKI, 2012); sua estrutura é susceptível à degradação fotoquímica (TOMREN et al., 2007).

Sua composição atômica  $C_{21}H_{20}O_6$  corresponde a uma massa molecular de 368,39 g/mol e um ponto de fusão de  $183^{\circ}C$ , mas esse valor é pouco encontrado na prática, devido aos aditivos naturais presentes nos materiais comerciais utilizados para análise (GRYNKIEWICZ & SLIFIRSKI, 2012; VYAS et al.,2013).

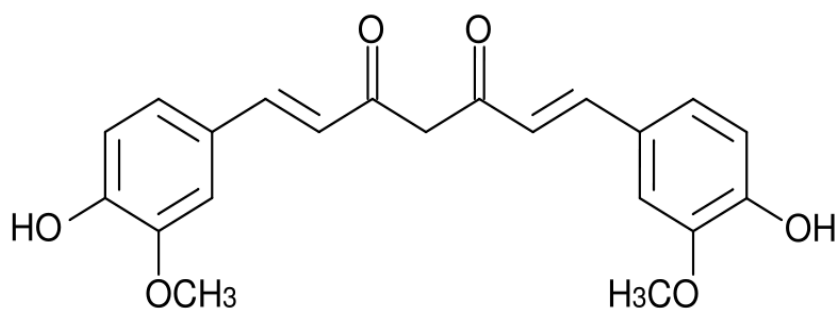


Figura 1 Estrutura da curcumina (JOVANOVIC, 2001).

A atividade antioxidante da curcumina decorre da sua estrutura conjugada única que inclui dois fenóis metoxilados e um grupo  $\beta$ -dicetona. Essa porção da molécula é responsável pela transferência intramolecular do átomo de hidrogênio, o que permite a curcumina exibir um tautomerismo ceto-enólico (Figura 2). Em pH 3-7 temos a predominância da forma cetônica, já em valores de pH acima de 8 a forma enólica da curcumina é a predominante. (BARZEGAR, 2012)

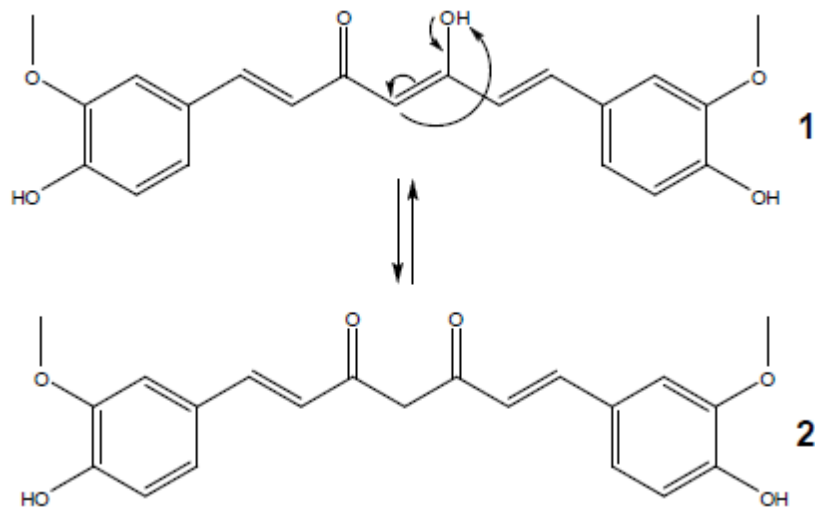


Figura 2. Tautomerismo da curcumina. (BARZEGAR, 2012)

A biossíntese da curcumina ocorre a partir do ácido cinâmico pela via do chiquimato (ácido chiquímico) (Figura 3). O ácido cinâmico é provido da desaminação do aminoácido fenilalanina pela enzima fenilalanina amonialiase (PAL). O ácido cinâmico participa de reações de oxidação e metilação formando o ácido ferúlico. Para a formação de uma molécula de curcumina, duas moléculas de ácido ferúlico participam de uma reação de condensação, na presença da malonil coenzima A (malonil-CoA) (SIMÕES, 2010).

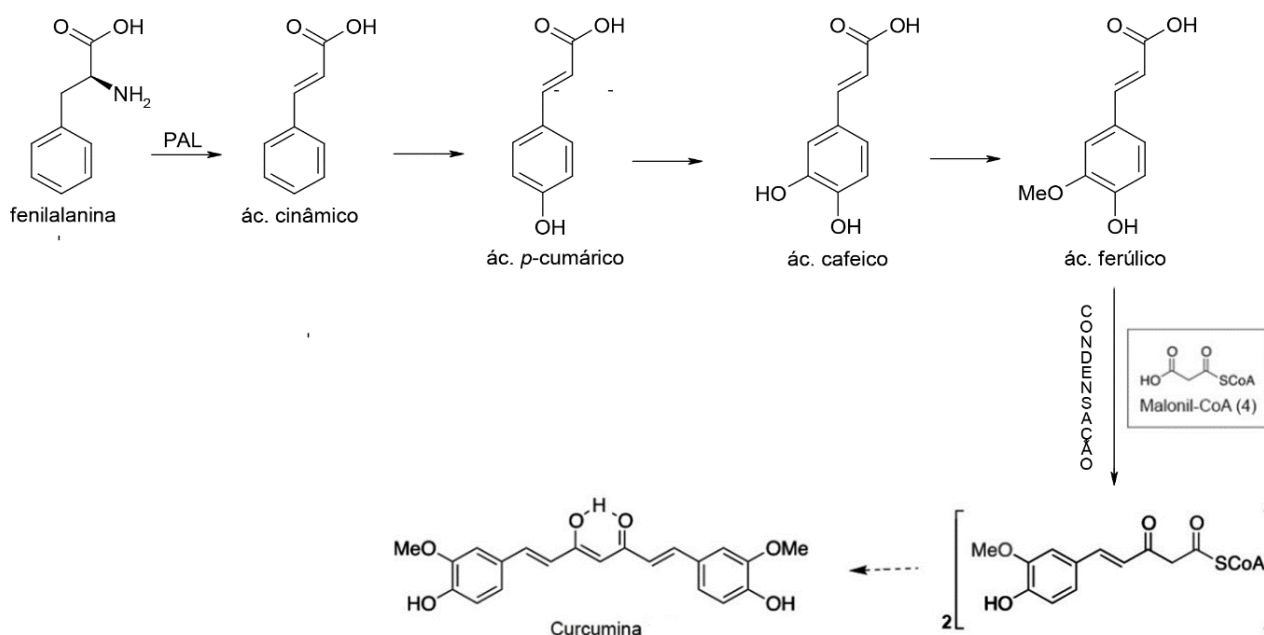


Figura 3 Biossíntese da curcumina (Adaptado de LUMA, COLLINO 2000).

Tonnesen (1985) estudou a cinética da reação de degradação da curcumina no intervalo de pH 1-11, verificando que em pH 1, a solução de curcumina apresenta uma cor avermelhada, que é indicativo da forma protonada. Entre o pH 1 a 7, as moléculas de curcumina estão no estado neutro, sendo de cor amarela e baixa solubilidade em água, enquanto que em pH > 7,5 esta cor se transforma em vermelho. Na forma ceto da curcumina, a ligação heptadianona entre os dois anéis metoxifenol, contém um átomo de carbono altamente ativado e as ligações C-H presentes no carbono são muito fracas, devido à deslocalização do elétron não emparelhado em átomos de oxigênio adjacentes. A curcumina possui três prótons que são ionizáveis em água. O próton enólico apresenta um pKa de cerca de 8,5 enquanto os dois prótons fenólicos têm um pKa de 10 – 10,5 (em solvente alcoólico / água misturada).

Entre a faixa ácida de pH de 3 a 7, a curcumina atua como um potente doador de átomo de H, enquanto em pH acima de 8 (condição básica), a forma enolato, onde predomina a cadeia heptadionona, esse composto atua principalmente como um doador de elétrons semelhante a muitos antioxidantes fenólicos (VYAS, 2013).

Os produtos iniciais da degradação (Figura 4) são formados após 5 minutos e o padrão cromatográfico obtido após 28 h a pH 8,5 é representativo para a degradação alcalina. Inicialmente são formados, ácido ferúlico e ferulometano. O diferulometano é rapidamente

formado e apresenta uma coloração de amarelo ao marrom-amarelos sendo os produtos de condensação. Os produtos de degradação formados pela hidrólise da curcumina são vanilina e acetona e o seu aumento de quantidade com o tempo de incubação (TONNESEN et al, 1985).

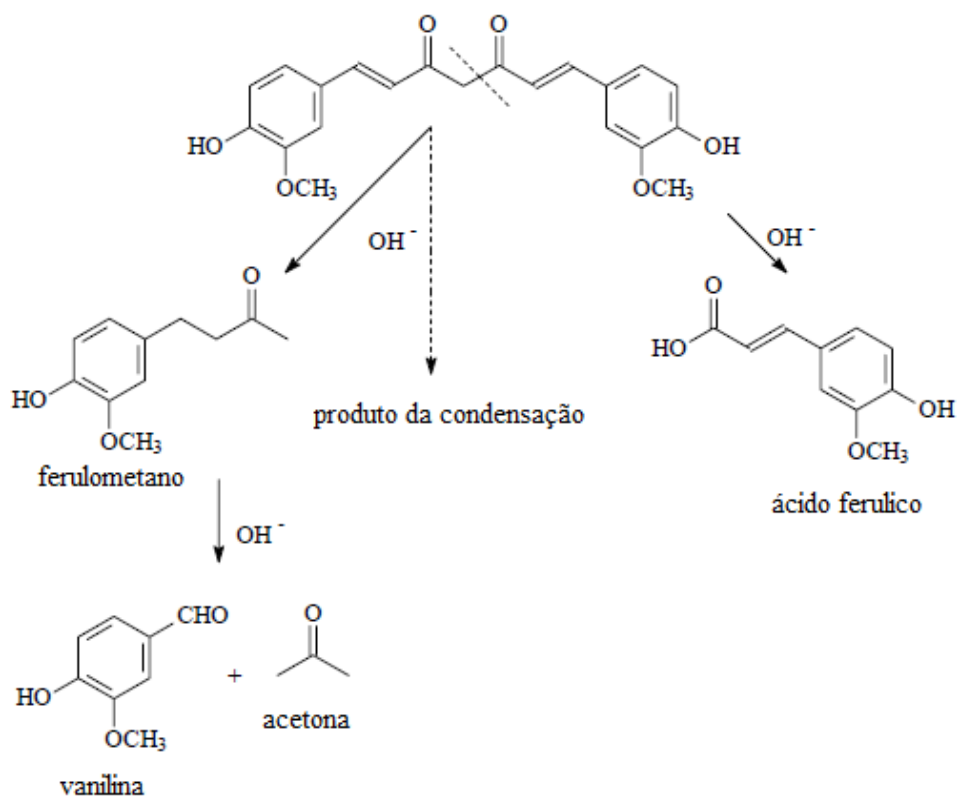


Figura 4. Produtos da degradação da curcumina (Adaptado WANG et al, 1997).

### 2.3 Tratamento de doenças

Estudos feitos por Kuttan et al. (1987); Plummer et al. (2001) mostraram que a curcumina preveniu câncer em muitos tecidos de camundongos e ratos, e também foi associada com a diminuição de tumores em humanos. Porém, os mecanismos de ação da curcumina não são bem conhecidos. (CAO et al., 2006).

Com base em dados experimentais feito por Kelloff et al. (2004), a curcumina foi avaliada como um agente quimioprotetor, pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos. Sharma et al. (2001) realizaram um estudo sobre a farmacocinética da curcumina em pacientes com câncer colorretal, os quais receberam uma cápsula com o extrato, contendo doses de curcumina que variam entre 36-180 mg, por um período de quatro meses. Os

autores chegaram à conclusão que a curcumina possui baixa biodisponibilidade quando administrada pela via oral, porém foi bem tolerada, não mostrando efeitos tóxicos e, o mais importante, apresentou benefícios clínicos para os pacientes com câncer colorretal avançado.

A administração de curcumina na dieta de ratos reduziu em 28% a incidência de tumores mamários induzidos por raios-gama, mostrando que a curcumina tem uma potente atividade preventiva no desenvolvimento de tumor das glândulas mamárias (INANO et al., 1999).

Pesquisas feitas por Alam et al. (2012) demonstram potencial antitumoral da curcumina em estudos “*in-vitro*” e “*in-vivo*”, em que ela foi capaz de inibir o crescimento de várias linhagens de células cancerosas. A curcumina exerce efeitos citotóxicos em linhagens tumorais além do câncer de mama e câncer de cólon. Estes estudos mostram que a curcumina possui um potencial terapêutico nos cânceres de cérebro, mama, trato gastrointestinal, cabeça e pescoço, fígado, pâncreas, cólon, próstata e ovário (ANAND et al., 2008; KUNNUMAKKARA, 2008; AGGARWAL, 2009).

A curcumina apresenta vantagens na terapia anticâncer comparado à quimioterapia com os fármacos convencionais, uma vez que tem uma interação com vários alvos moleculares, enquanto que muitos quimioterápicos convencionais regulam apenas um ou poucos alvos moleculares (AGGARWAL et al, 2003).

A combinação da curcumina com outros agentes quimioterápicos tem apresentado bons resultados. Tal como no câncer de cabeça e pescoço, a curcumina potencializou o efeito da cisplatina que é um agente importante na redução do crescimento celular. A terapia com agentes quimioterápicos e com a curcumina diminuiu o crescimento das células cancerígenas da cabeça e pescoço. Estes resultados indicam que a combinação com a curcumina torna eficaz na redução do crescimento de tumores (WILKEN et al., 2011).

Em alguns tipos de canceres, a curcumina é capaz de potencializar os efeitos da radioterapia na eliminação das células tumorais, inclusive em células que apresentam resistência à radioterapia. (SANDUR et al., 2009; SHI et al., 2012).

Além da sinergia da curcumina com a quimioterapia e radioterapia, os benefícios da terapia juntamente com o quimioterápico e curcumina incluem prevenção ou redução dos efeitos adversos que frequentemente limitam os tratamentos com a quimioterapia e radioterapia. A curcumina é capaz de proteger as células saudáveis dos efeitos tóxicos da

quimioterapia e radioterapia, modulando a expressão genica e aumentando as concentrações celulares das enzimas antioxidantes nas células sadias (AGGARWAL et al, 2003; GOEL; AGGARWAL, 2010).

Outra aplicação encontrada na literatura é juntamente com a vitamina D. A combinação de ambos pode diminuir os custos de tratamento de gonorreia e infecções, bem como prevenir recorrências futuras pelo desenvolvimento de uma memória imunológica (YOUSSEF et al, 2013).

Um estudo demonstrou que a curcumina é eficaz no tratamento da medula espinhal causado por lesão de isquemia-reperfusão aguda. Os efeitos protetores do tratamento com a curcumina foram associados com a diminuição dos níveis de produtos oxidantes e citosinas pró-inflamatórias, bem como o aumento da atividade de enzimas antioxidantes (KURT et al., 2014).

Segundo Reddy et al. (2004) a curcumina parece ser uma molécula antimalárica ideal, especialmente para uso em combinação com anti-maláricos tais como a artemisinina que é um medicamento bastante usado, não só para limitar a utilização deste último, mas para superar os problemas de custo elevado e resistência às drogas.

#### **2.4 Ação antidiabética**

Trabalhos de Nalini et al (2002); Aggawal et al (2009) e Gutierrez et al (2012) têm demonstrado o efeito da curcumina na melhora da hiperglicemia e de suas complicações. Trabalhos como de Nalini et al (2002) e de Aggawal et al (2010) demonstraram o efeito hipoglicemiante da curcumina e também sua capacidade de aumentar a insulinemia. Gutierrez et al. (2012) mostraram que ratos diabéticos tratados com curcumina incorporada ao iogurte, na dose de 90mg/kg durante 31 dias, apresentaram melhoras em vários parâmetros fisiológicos e bioquímicos, quando comparados aos ratos diabéticos tratados com água ou iogurte.

#### **2.5 Ação antifúngica**

Devido à pequena quantidade de medicamentos antifúngicos disponíveis no mercado, aos enormes efeitos colaterais que eles causam e o aumento da resistência antimicrobiana, surge a necessidade de desenvolver novos medicamentos antifúngicos. Estudos feitos por Moghadamtousi et al. (2014) têm demonstrado ação da curcumina contra diversos tipos de fungos. Segundo Martins et al. (2009) a curcumina apresenta um enorme potencial contra diferente fungo como a *Paracoccidioides brasiliensis*, *Sporothrix schenckii*,

*Cryptococcus neoformans* e *C. dubliniensis*, assim como sua eficácia em inibir a aderência de cepas de *Candida spp* às células epiteliais bucais de pacientes portadores de AIDS.

## 2.6 As nanopartículas poliméricas

A nanotecnologia é uma área que se caracteriza pela ampla multidisciplinaridade e pelo fato de envolver a utilização de materiais das mais diversas origens, para o desenvolvimento de dispositivos e sistemas em escala nanométrica. Essa tecnologia tem demonstrado crescimento e inovação em diversas áreas, tais como na física, química, informática, eletrônica e apresenta relevante importância na área farmacêutica. (THUANE, 2011).

As nanopartículas envolvem as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si pela sua composição e organização estrutural (Figura 5). As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico ao redor de um núcleo oleoso, sendo que a curcumina pode estar dissolvida neste núcleo e/ou adsorvida à parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas, que não apresentam núcleo oleoso, são formadas por uma matriz polimérica onde a curcumina pode ficar retida ou adsorvida (Figura 5) (SCHAFFAZICK et al., 2003).

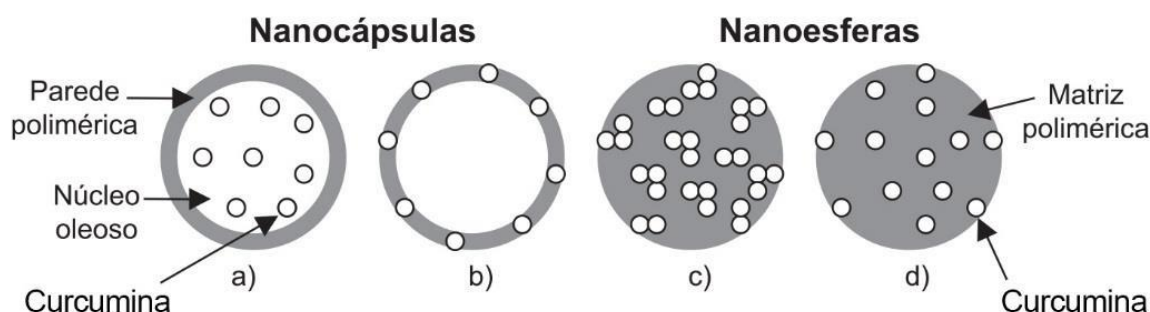


Figura 5. Nanopartículas poliméricas (Adaptado de SCHAFFAZICK et al., 2003).

Nos últimos anos, as nanopartículas poliméricas têm sido extensivamente estudadas devido as suas únicas e importantes propriedades físico-químicas e biológicas. As nanopartículas podem proteger a droga de degradação, melhorar o seu transporte e prolongar a sua liberação; portanto, eles podem melhorar a eficácia do fármaco. Os parâmetros farmacocinéticos são alterados com as nanopartículas, e a sua composição da superfície exerce um papel importante na biodisponibilidade do fármaco (THUANE, 2011). Dentre os polímeros utilizados para a fabricação de nanopartículas, um que se destaca é o Poli (ácido-lático), que possui propriedades de maior interesse para aplicação em fármacos, devido à sua

completa biodegradabilidade não sendo tóxico e bem tolerado pelos tecidos. (GUTERRES, 1995).

As nanopartículas têm sido adequadas para o uso de liberação de fármacos, de tal forma que pelo fato da curcumina apresentar características hidrofóbicas, as nanopartículas podem superar o problema com a solubilidade, sua rápida degradação e sua lenta dissolução. (KAKRAN, 2012).

A escolha do método da encapsulação é muito importante, pois pode afetar diretamente o tamanho das cápsulas. Uma técnica bastante utilizada e eficaz para encapsulação da curcumina é a técnica por emulsão/evaporação de solvente que é uma técnica cabível para encapsular compostos hidrofóbicos como a curcumina. O processo consiste em uma fase orgânica composta por solvente e polímero (o agente de encapsulação) e do composto a ser encapsulado. Um surfactante é adicionado à fase orgânica. A fase orgânica é, em seguida, dispersa na fase aquosa utilizando equipamento de alta energia, tal como um ultrassom. Depois o solvente é retirado por um aparelho roto-evaporador e as nanopartículas são formadas (LEIMANN, 2012; MUSYANOVYCH, 2008).

## **2.7 Voltametria cíclica**

A voltametria é largamente utilizada em todas as áreas da química, incluindo estudos fundamentais de processos de oxidação e de redução e mecanismos de transferência de elétrons em superfícies de eletrodos modificados. (HOLLER, 2009). A voltametria cíclica é uma técnica eletroanalítica importante e amplamente empregada. Embora ela não seja utilizada com frequência em análise quantitativa, ela encontra ampla aplicabilidade no estudo de reações redox, na detecção de intermediários de reações e na observação e no acompanhamento de reações envolvendo produtos formados nos eletrodos.

Durante um experimento de voltametria cíclica, um sistema consistindo de um pequeno eletrodo em uma solução mantida em repouso é excitado na forma de uma onda triangular de potencial e sua resposta em corrente é acompanhada. A onda triangular produz a varredura de potencial no sentido direto e depois no sentido inverso como mostra na Figura 6A. (SKOOG, 2010). Um experimento envolvendo a voltametria cíclica pode empregar um ciclo inteiro, um ciclo parcial ou ainda vários ciclos. (SKOOG, 2010).



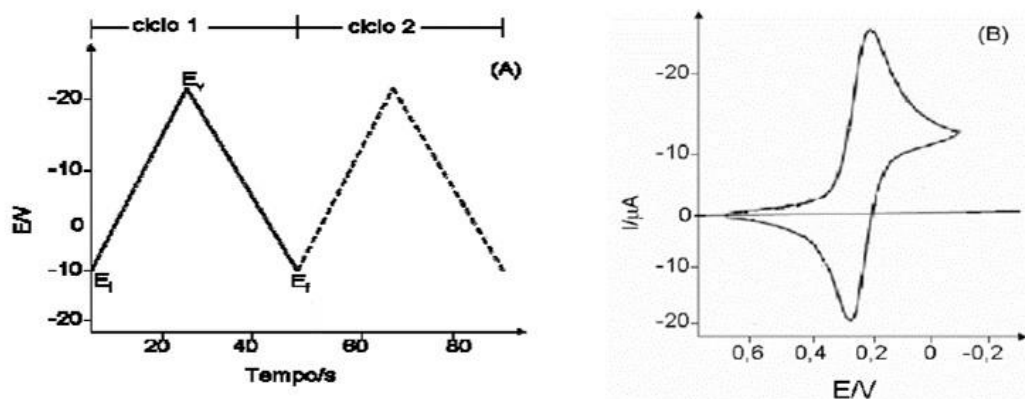


Figura 6. (A) Variação do Potencial com o tempo em voltametria cíclica. (B) Voltamograma cíclico para um sistema reversível. (SKOOG, 2010).

O sinal de corrente dá origem ao voltamograma que se trata da curva de corrente vs. Potencial como mostrado na Figura 6B. A variação de velocidade de varredura em um voltamograma é bastante estudada para se obter parâmetros cinéticos e de reversibilidade do sistema eletroquímico, de tal forma de determinar o processo do qual as espécies chegam à superfície do eletrodo (adsorção e difusão) e na identificação de reações químicas homogêneas acopladas. (SKOOG, 2010)

## 2.8 Voltametria de pulso diferencial

As técnicas de voltametrias de pulso são destinadas a reduzir os limites de detecção das medidas voltamétricas, devido ao fato de aumentar a relação entre as correntes faradaica e capacitiva. Por causa de seu desempenho, modernas técnicas de pulso vêm sendo bastante usado na análise no laboratório. As diferentes técnicas de pulso são todas baseadas em medidas de potencial/corrente. (SKOOG, et al, 2007; BRETT, et al, 1993).

A voltametria de pulso diferencial é uma técnica extremamente útil para medir traços de espécies orgânicas e inorgânicas. Na DPV, a corrente é medida duas vezes, um pouco antes da aplicação do pulso (em  $S_1$ ) como mostra a Figura 7a e de novo no final do pulso (após 50 ms, em  $S_2$ , quando a corrente capacitiva decai). A primeira corrente é instrumentalmente subtraída da segunda, e essa diferença de corrente [ $\Delta i = i(t_2) - i(t_1)$ ] é colocada em gráfico contra o potencial aplicado. O voltamograma de pulso resultante mostrado na Figura 7b consiste de picos de corrente, cuja altura é diretamente proporcional à concentração do experimento de interesse (SKOOG, et al, 2007; BRETT, et al, 1993).

A maior sensibilidade da voltametria de pulso diferencial pode ser atribuída a duas fontes: uma melhora da corrente faradaica ou uma diminuição da corrente capacitiva. Como a corrente capacitiva cai mais rapidamente que a corrente faradaica, na amostragem da corrente, a corrente capacitiva tende a zero, sendo o sinal analítico máximo (a razão sinal-ruído é máxima). O resultado é uma melhora na sensibilidade do método voltamétrico. (SKOOG, et al, 2007; BRETT, et al, 1993).

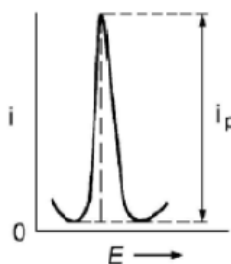
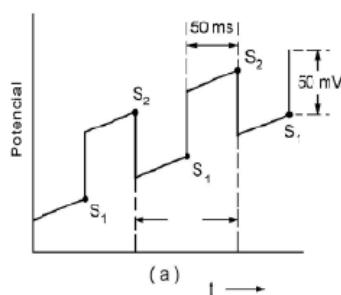


Figura 7. Voltametria de pulso diferencial (a) e voltamograma de pulso resultante (b). (SKOOG, et al, 2007)

## 2.9 Espectrofotômetro

Os espectrofotômetros são instrumentos capazes de registrar dados de absorvância ou transmitância em função de um comprimento de onda. O registro desses dados é chamado de espectro de absorção ou de espectro de transmissão. O espectro de absorção é característico para cada espécie química, sendo possível a identificação de uma espécie química a partir de seu espectro (HOLLER, et al., 2009; SILVERSTEIN, et al., 2000).

A característica mais importante dos espectrofotômetros é a seleção das radiações monocromáticas, possibilitando assim inúmeras determinações quantitativas regidas pela Lei de Beer. Quando a região espectral usada é a ultravioleta/visível, são necessários componentes óticos de quartzo e detectores altamente sensíveis capazes de detectar

radiações nessa extensa faixa espectral em que atua o instrumento. Os espectrofotômetros, em geral, são compostos por cinco componentes principais: fontes de radiação, monocromador, recipientes para conter as soluções, detectores e indicadores de sinal. (HOLLER, et al., 2009; SILVERSTEIN, et al., 2000).

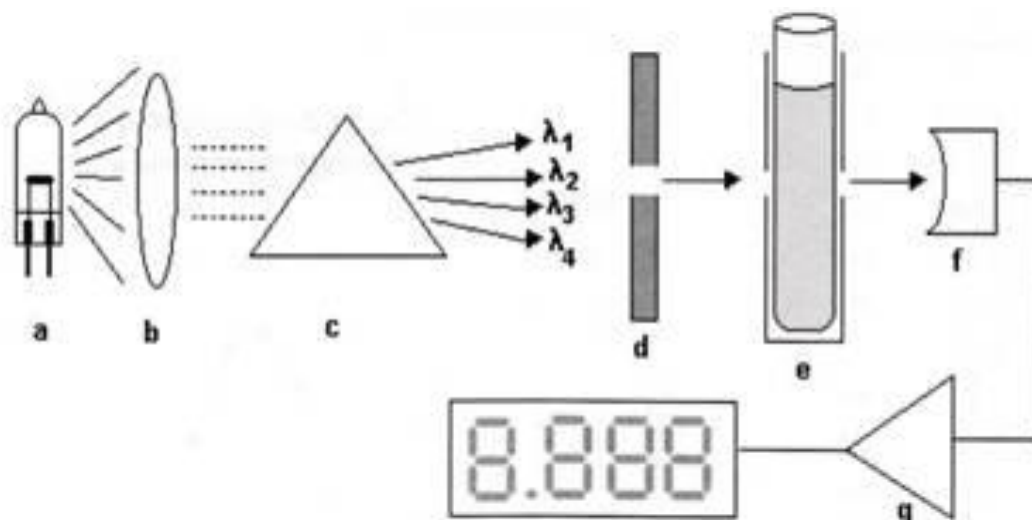


Figura 8. Esquema óptico dos principais componentes do espectrofotômetro. (a) fonte de luz, (b) colimador, (c) prisma ou rede de difração, (d) fenda seletora de X, (e) compartimento de amostras com cubeta contendo solução, (f) célula fotoelétrica, (g) amplificador. **Fonte:** [http://www.ufrgs.br/leo/site\\_espec/componentes.html](http://www.ufrgs.br/leo/site_espec/componentes.html)

## 2.10 Lei de Lambert - Beer

Para que a diminuição na intensidade da radiação possa ser utilizada para a determinação da concentração de um cromóforo, é necessário relacionar estas duas grandezas, o que é realizado pela lei de Lambert-Beer (GARCIA, 2009; LENZ, 1997).

Primeiramente é necessário esclarecer que a luz atravessa um caminho óptico no qual se encontram certa quantidade de moléculas do cromóforo, sendo que somente uma parte destas pode interagir de forma adequada com a luz para que esta possa ser absorvida. Importante mencionar aqui é que a quantidade de cromóforos que interagem com a luz neste caminho óptico é proporcional à concentração do cromóforo na cubeta (recipiente no qual passa a luz). (GARCIA, 2009; LENZ, 1997).

Segundo Garcia (2009) é importante mencionar que a lei de Lambert-Beer somente se aplica quando as seguintes considerações forem obedecidas:

- As espécies (átomos, moléculas ou íons) presentes em solução devem absorver a luz de forma independente entre si;
- A radiação incidente deve ser paralela e deve atravessar a mesma distância durante a qual interage com as partículas existentes em solução;
- A radiação deve ser monocromática, isto é, ser composta por apenas um comprimento de onda selecionado;
- O fluxo da radiação incidente não pode induzir processos que impliquem a desestabilização dos átomos, moléculas ou íons.
- São aplicadas apenas em soluções diluídas.

### 3. OBJETIVO:

Estudar a degradação da curcumina nanoencapsulada de PLA e a curcumina livre em diferentes pHs utilizando métodos eletroquímicos.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Verificar a atividade da curcumina nanoencapsulada em diferentes faixas valores de concentração hidrogeniônica por meio da técnica de voltametria cíclica e pulso diferencial.

- Comparar os resultados obtidos da curcumina nanoencapsulada com a curcumina livre.

- Verificar a eficiência de encapsulação das nanocápsulas de curcumina.

### 4. METODOLOGIA

Esse tópico apresenta em detalhes todo procedimento experimental feito no trabalho, eletrodos utilizados, reagente e soluções, nanoencapsulamento da curcumina, instrumentação e os parâmetros utilizados nas medidas eletroquímicas.

Todos os estudos eletroquímicos foram efetuados numa cela eletroquímica termostaticada de um único compartimento com capacidade de volume máximo de 8mL, como mostra a Figura. 9.



Figura 9. Cela eletroquímica.

#### 4.1 Eletrodos

Foi utilizado no experimento eletroquímicos um sistema composto por 3 eletrodos, sendo um eletrodo de trabalho de carbono vítreo, contra eletrodo de platina e o de referência Ag/AgCl (3M).

#### 4.2 Eletrodo de trabalho

O eletrodo de trabalho utilizado foi um eletrodo de carbono vítreo de disco rotatório de 3mm de diâmetro modelo: Metrohm 6. 1204.300 como mostra a Figura 11.

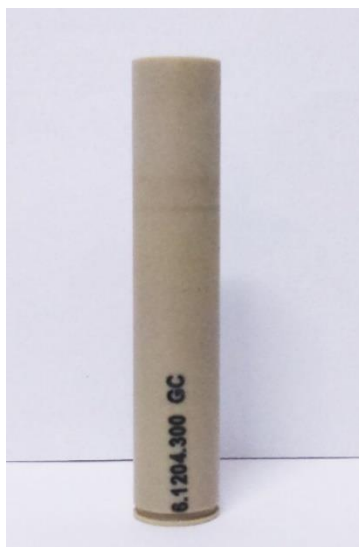


Figura 10. Eletrodo de trabalho CG

#### 4.3 Eletrodo auxiliar

O eletrodo auxiliar utilizado nos experimentos de voltametria cíclica e pulso diferencial foi uma placa de platina 2cm x 2cm x 0,01.

#### 4.4 Eletrodo de referencia

O eletrodo de referência utilizado foi um eletrodo de Ag/AgCl, com uma solução interna de KCl 3M.

#### 4.5 Limpeza do eletrodo de trabalho

A limpeza do eletrodo de trabalho é uma etapa importante do experimento, uma vez que diminui o risco de haver algum contaminante na superfície do eletrodo. A limpeza feita no eletrodo de trabalho consistiu de polimento mecânico com alumina 1 $\mu$ m por cinco minutos, enxágue de água e outro polimento com alumina 0,5 $\mu$ m por cinco minutos, enxágue de água e imersão no ultrassom com uma solução de 1M hidróxido de sódio por 30min, enxágue de água e outra imersão no ultrassom com uma solução de 1M de ácido sulfúrico por 1 hora, enxágue de água. Após o tratamento mecânico, passou por limpeza eletroquímica

em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0,5M) onde o eletrodo foi imerso na solução em que foram feitos 300 ciclos com velocidades de 0,01 a 0,1  $\text{v.s}^{-1}$ .

A Figura 11 mostra o esquema das etapas do polimento do eletrodo e a verificação da limpeza da superfície eletródica realizada por voltametria cíclica.

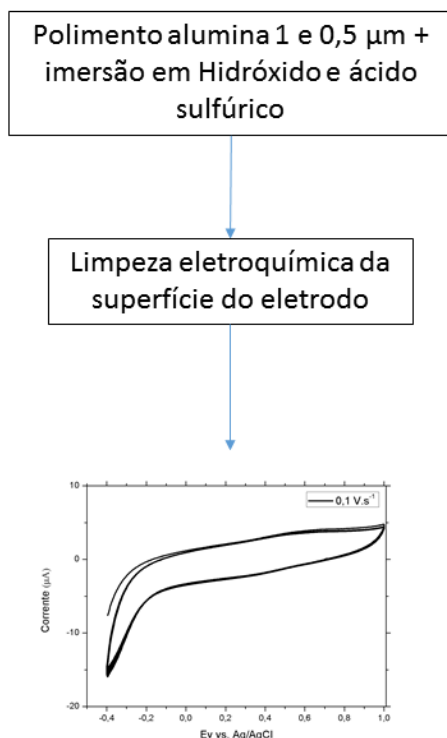


Figura 11. Etapas da limpeza do eletrodo de trabalho.

#### 4.6 Instrumentação

As medidas voltamétricas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato FR2A  $\mu$ Autolab Tipo III, controlado por um computador, o *software* utilizado foi o Nova 1.10.

#### 4.7 Parâmetros voltamétricos

Nas medidas por voltametria cíclica foram aplicadas velocidades de varreduras em um intervalo entre 0.01 e 1.2  $\text{Vs}^{-1}$ . Nas medidas de pulso diferencial utilizou-se uma largura de impulso de 70ms, amplitude de impulso de 50mV e velocidade de varredura de 5  $\text{mVs}^{-1}$ . Para todos os dados tratados utilizou-se o *software* Origin 8.6.

#### 4.8 Reagentes e soluções

Para realizar os experimentos eletroquímicos utilizou-se a curcumina ( $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_6$ )  $\geq$  95% de pureza (Sigma-Aldrich), que foram adquiridos no laboratório de nanotecnologia da UNICENTRO.

Todas as soluções de curcumina foram preparadas em etanol na ausência de luz, e as vidrarias foram cobertas por papel alumínio. As soluções foram preparadas a partir de uma solução estoque e a partir destas, feita a diluição da concentração desejada de 100 $\mu$ M a uma temperatura de 25°C.

As soluções do eletrólito de suporte foram preparadas no laboratório de Interfases e Eletroquímica (LINE), todos os reagentes utilizados são de grau analítico. Foram feitas quatro soluções tampão como mostra a Tabela 1 abaixo.

**Tabela 1.** Soluções do eletrólito suporte utilizado no experimento

Eletrólito suporte	pH
0,2M Acetato de Sódio + 0,2M Ácido acético	3,5
0,2M Acetato de Sódio + 0,2M Ácido acético	4,2
0,2M Fosfato dissódico + 0,2M Fosfato monossódico	6,9
0,2M Fosfato dissódico + 0,2M Fosfato monossódico	7,4

#### **4.9 Nanoencapsulação da curcumina**

Para encapsulação da curcumina foi usado o PLA (poli-acidolácteo) e a encapsulação foi dividido em Lotes, cada lote utilizou-se 10mg de curcumina, 50mg de PLA e um emulsificante que é o PVA a 1%.

Antes de encapsular o PLA e a curcumina foram dissolvidos em diclorometano, em seguida, adicionou-se a solução de PLA e uma alíquota de 1% de PVA. Levou-se para o ultrassom com 2 ciclos de 5 min, onde adicionou gradativamente a solução de curcumina.

A próxima etapa foi à retirada do diclorometano da solução por rotaevaporação durante 15min. 20 $\mu$ L foram retirados da solução para fazer a leitura do tamanho das nanocápsulas e índice de polidispersão.

Em seguida foram feitos a dispersão da nanocápsulas, onde foi isolada da curcumina não encapsulada por dois processos de centrifugação (14000 rpm, 30 min em centrífuga - Centribio).



As nanocápsulas de curcumina foram caracterizadas quanto ao diâmetro médio, índice de polidispersidade, eficiência de encapsulação logo após sua preparação. Na sequência estas foram congeladas. A Figura 12 mostra as etapas da encapsulação da curcumina.

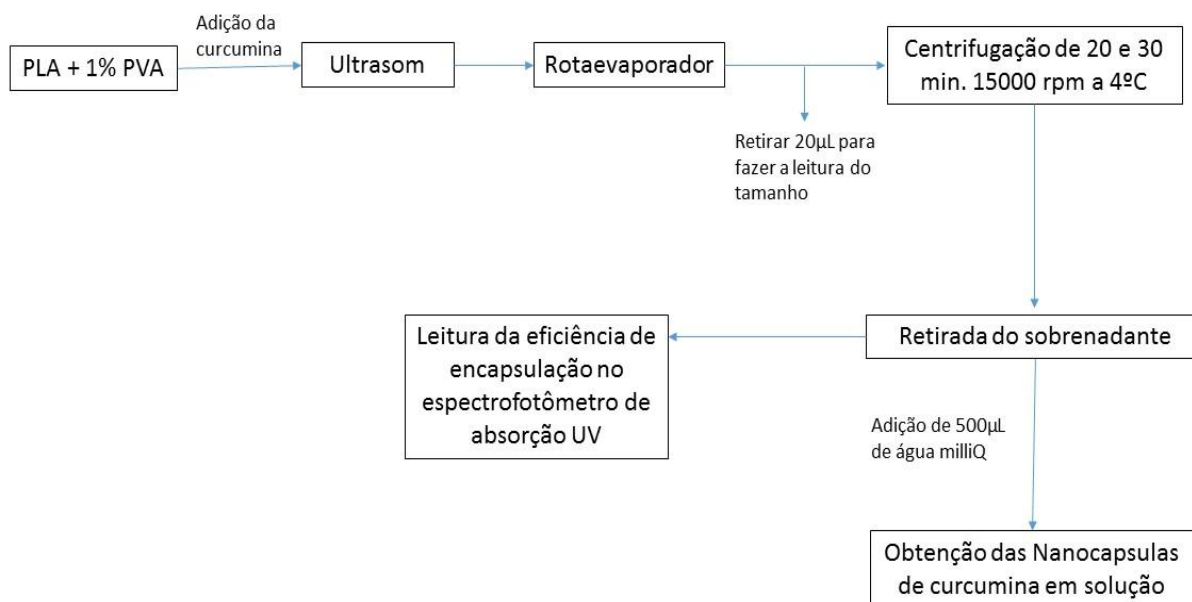


Figura 12. Etapas de encapsulação da curcumina

#### 4.10 Obtenção da curva analítica da curcumina

Foi feita uma curva analítica das concentrações dos padrões da curcumina em etanol para análise da linearidade, em que utilizou concentrações de: 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 3; 6 e 12 µg/mL. Onde que as soluções-padrão foram lida em um espectrofotômetro modelo (Jasco V630 BIO) no comprimento de onda de 426 nm. A partir da absorbância adquirida, foi possível fazer o cálculo da equação da reta através de uma regressão linear, e também para cálculo do coeficiente de correlação ( $r^2$ ), que possibilita mostrar a qualidade da curvam, como também sua linearidade em um intervalo especificado.

#### Determinação do diâmetro médio e distribuição do tamanho das nanocápsulas de PLA

A determinação do diâmetro médio e a distribuição do tamanho das nanocápsulas de curcumina foi feito utilizando a técnica de espectroscopia de correlação de fótons, utilizando

o equipamento (Brookhaven 90 Plus). Para a leitura foram utilizados, 20  $\mu\text{L}$  da dispersão contendo nanocápsulas de curcumina, antes da centrifugação, foram diluídas em água ultrapura e realizadas as medidas de tamanho e de índice de polidispersão.

### **Determinação da eficiência de encapsulação da curcumina nas nanocápsulas de PLA**

A concentração de curcumina ligada às nanocápsulas de PLA foi determinada através de análises indiretas através do sobrenadante, que continha a curcumina livre e analisado por espectrofotometria UV-vis (Jasco V630 BIO). Dessa forma, foi determinada a concentração da curcumina não encapsulada das nanocápsulas. A partir da equação 1 obtém-se o valor da eficiência de encapsulação (EE%).

## 5. RESULTADO E DISCUSSÃO

Nesse capítulo serão apresentados os resultados e discussão da voltametria da curcumina livre e da nanoencapsulada, tal como os resultados dos pulsos diferencial no decorrer do tempo.

### 5.1 Curcumina livre

A Figura 13 mostra os voltamogramas cíclicos da curcumina livre nos quais fica evidenciado que a primeira varredura é distinta da segunda de 4 diferentes pHs. Na primeira varredura da Figura 13a, observa-se um pico anódico (1A) em torno de 0,65 V e o pico catódico correspondente (C1) em torno de 0,42 V. Após a primeira varredura, as varreduras subsequentes apresentam um pico anódico adicional em torno de 0,43 V (2A) e o pico 1A com a intensidade de corrente menor. É interessante destacar que apesar da diminuição da intensidade de corrente do pico 1A, o pico C1 da segunda varredura manteve-se praticamente igual ao da primeira, sugerindo que o produto de ambos os picos de oxidação se reduzem no mesmo potencial.

É observado para todos os pHs estudados, a diferença dos dois primeiros ciclos, a diminuição do primeiro pico e o surgimento e aumento do segundo pico. E quanto maior a velocidade melhor é a definição desses picos.

É importante ressaltar que o comportamento observado na Figura 13 independe do tempo de repouso do eletrodo na solução, descartando a hipótese de adsorção lenta da curcumina sobre a superfície do eletrodo de trabalho e sugerindo a adsorção da espécie produzida pela oxidação da curcumina no pico 1a. Esta hipótese é consistente com o fato de que o pico 2a desaparece se o eletrodo for retirado da solução e limpo. Ressalta-se ainda que este comportamento foi observado em todos os pHs trabalhados.

Este processo de adsorção é cumulativo levando ao envenenamento do eletrodo quando um número grande de varreduras é realizado. Para evitar este envenenamento e garantir a reprodutibilidade das medidas, foi realizada uma limpeza no eletrodo antes de iniciar uma nova varredura com diferente velocidade, dessa forma podíamos garantir que as medidas estavam sendo realizadas sem interferentes.

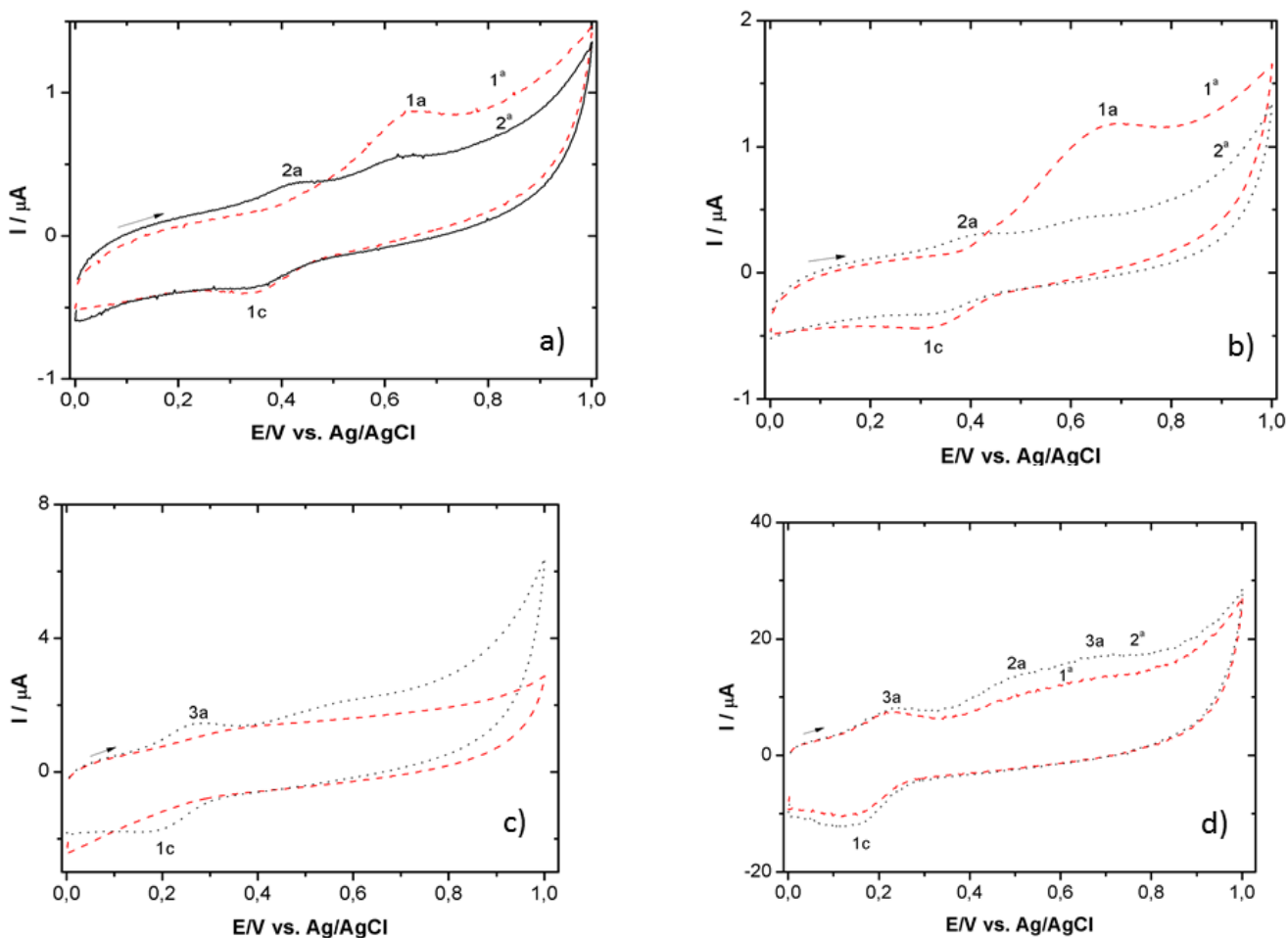


Figura 13. Voltamogramas de dois ciclos obtidos numa solução de curcumina 10 $\mu$ M em tampão acetato 3,5(a), 4,2(b), tampão fosfato 6,9 (c) e 7,4 (d) respectivamente

Manaia (2011) propôs um mecanismo de transferências de elétrons sucessivas mostrado na Figura 14. De acordo com este mecanismo após a primeira transferência de elétrons, dois processos em paralelo ocorrem, sendo responsáveis pelos picos 2A e A3 (que só aparece em pHs superiores).

Entretanto, simulações computacionais realizadas da curcumina mostram que este mecanismo não é adequado, pois produz um único pico, o que é óbvio, já que a espécie formada no pico 1A (espécie 2) se oxidaria imediatamente, não dando lugar à formação do pico 2A e formando diretamente a espécie 3.

Estas considerações sugerem que este mecanismo deve ser modificado, considerando uma etapa intermediária de adsorção da espécie 2 e uma possível transferência de elétrons envolvendo a curcumina livre e a espécie adsorvida que funcionaria como mediadora da transferência de elétrons, dando lugar ao pico 2A.

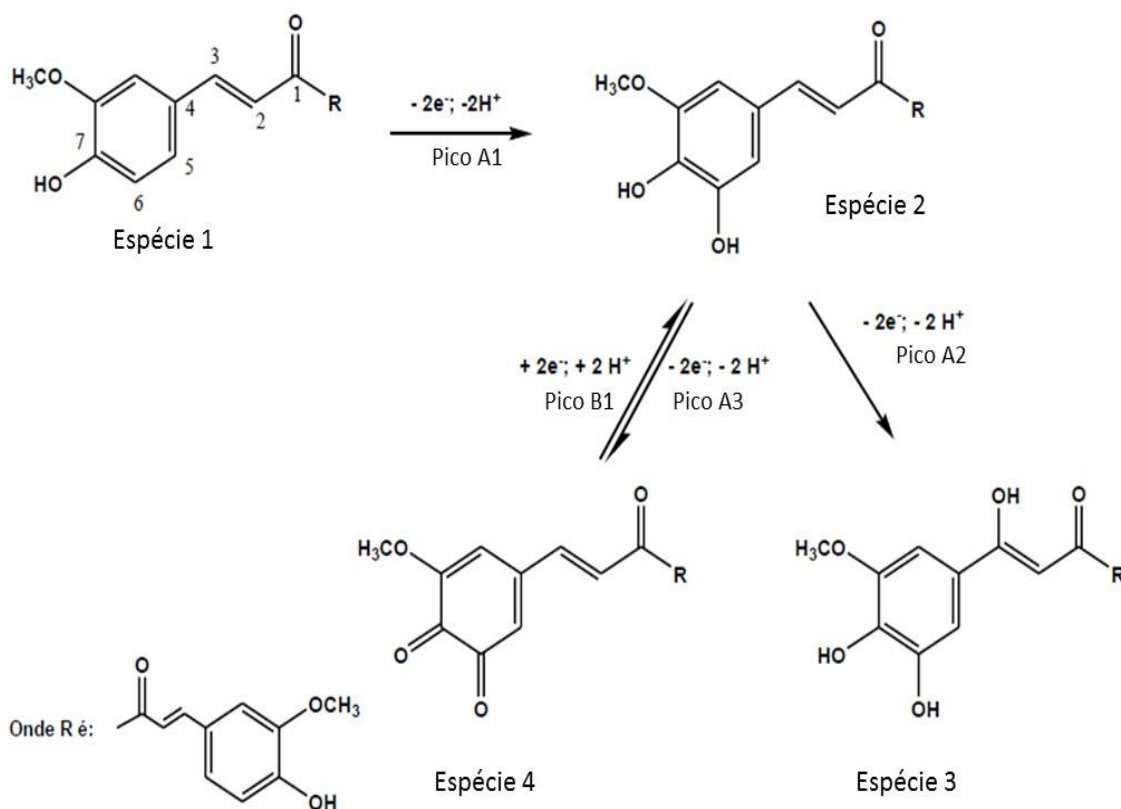


Figura 14. Mecanismo proposto por Manaia (2011) para oxidação da curcumina e dos seus produtos de oxidação.

## 5.2 Estudo Voltamétrico da curcumina Livre

O voltamograma cíclico obtido em tampão ácido acético/acetato de sódio em pH 3,5, em diferentes velocidades de varredura de 0,01 V.s<sup>-1</sup> a 1,2 V.s<sup>-1</sup>, é mostrado na Figura 15.

Observa-se na varredura anódica, o aparecimento de dois picos de oxidação na região  $E_{2A} = +0,46$  e na região  $E_{1A} = +0,73$ , indicando o processo de oxidação da curcumina.

Na varredura catódica, observa-se uma onda de redução no potencial  $E_{C1} = +0,15V$ , indicando o processo de redução da curcumina. Todos os processos aumentam de intensidade com o aumento da velocidade de varredura.

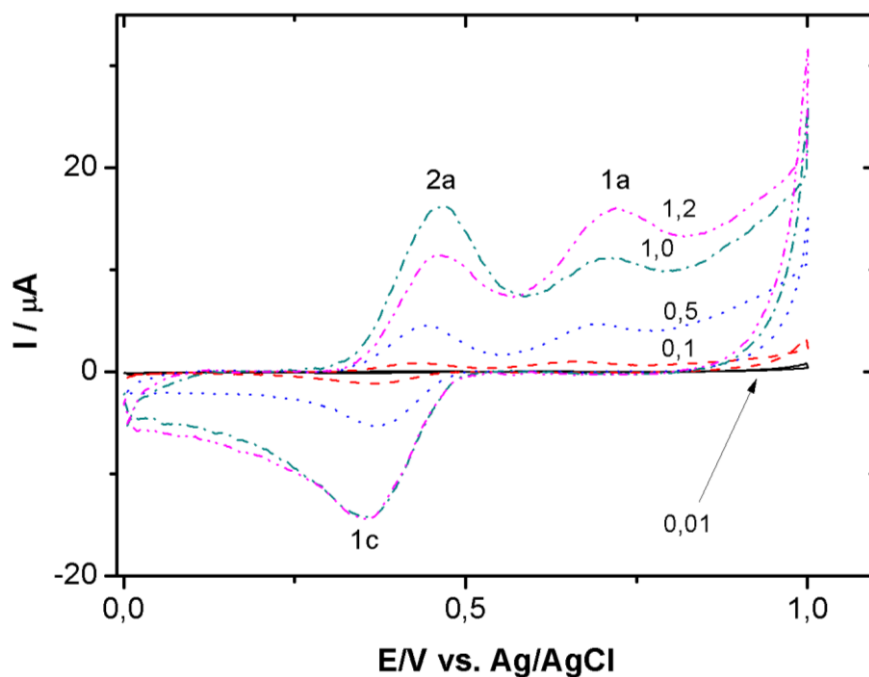


Figura 15. Voltamograma da curcumina  $100\mu m$  em tampão acetato pH 3,5, em velocidades 0,01, 0,1, 0,5, 1,0, 1,2  $V.s^{-2}$ .

Observa-se na figura 16a o gráfico de linearidade de corrente de pico em função da velocidade, indicando uma tendência adsortiva no pico de redução, representado por 3º pico, para outros picos segue uma linearidade, porém em velocidades acima de  $1,0 V.s^{-2}$  não é possível observar, devido a uma interferência da corrente capacitiva. Também é observado que não há tendência difusional mostrado na figura 18b.

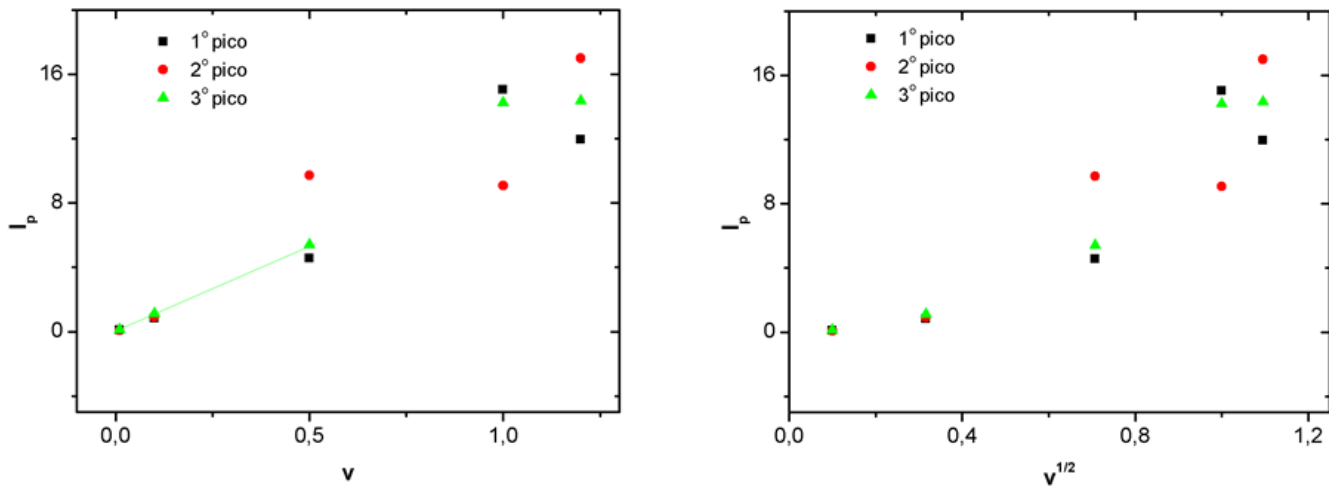


Figura 16. Gráfico de linearidade de corrente de pico em função da velocidade (a), da raiz da velocidade (b)

No voltamograma adquirido da curcumina em tampão acetato a pH 4,2, observou na varredura catódica dois picos do processo de oxidação da curcumina, um pico no potencial  $E_{2A} = +0,45$  e a um potencial  $E_{1A} = +0,72$ .

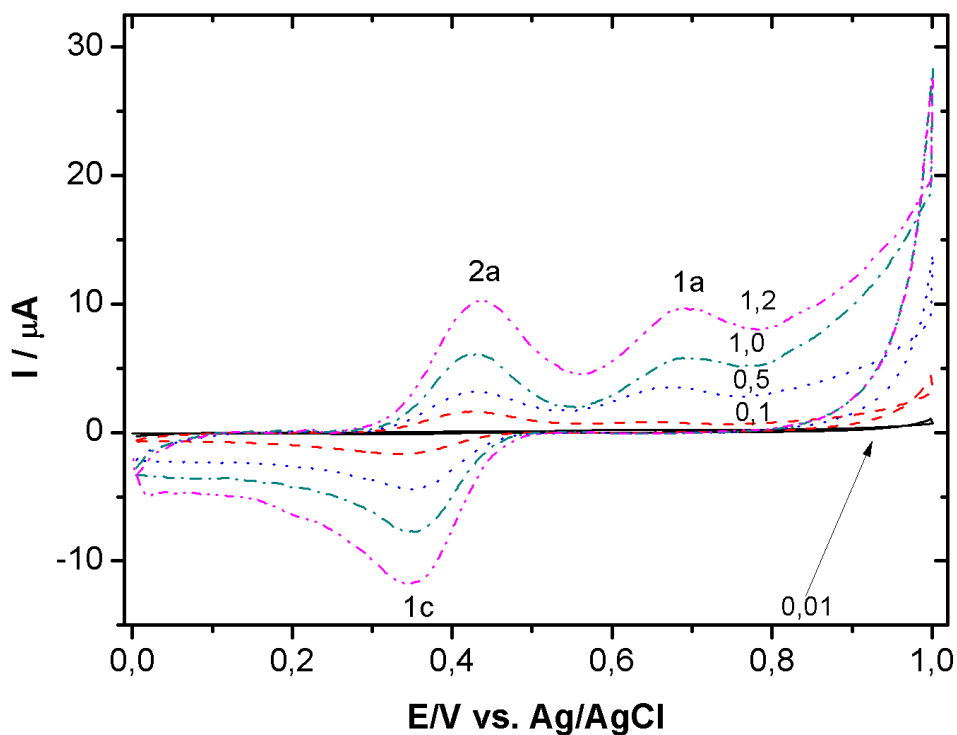


Figura 17. Voltamograma da curcumina  $100 \mu M$  em tampão acetato pH 4,2, em velocidades 0,01, 0,1, 0,5, 1,0, 1,2  $V \cdot s^{-2}$

Na varredura anódica observa um pico de redução a um potencial  $E_{1C} = + 0,37$ , indicando um processo de redução da curcumina

Observa-se na figura 18a o gráfico de linearidade de corrente de pico em função da velocidade, mostra uma tendência de um processo adsorptivo do pico de redução que foi chamado de 3º pico (a) ocorrido em pH 4,2. É visto também uma tendência no 3º pico de um processo difusional, porém devido um intervalo relativamente considerável não sendo possível ter uma boa observação.

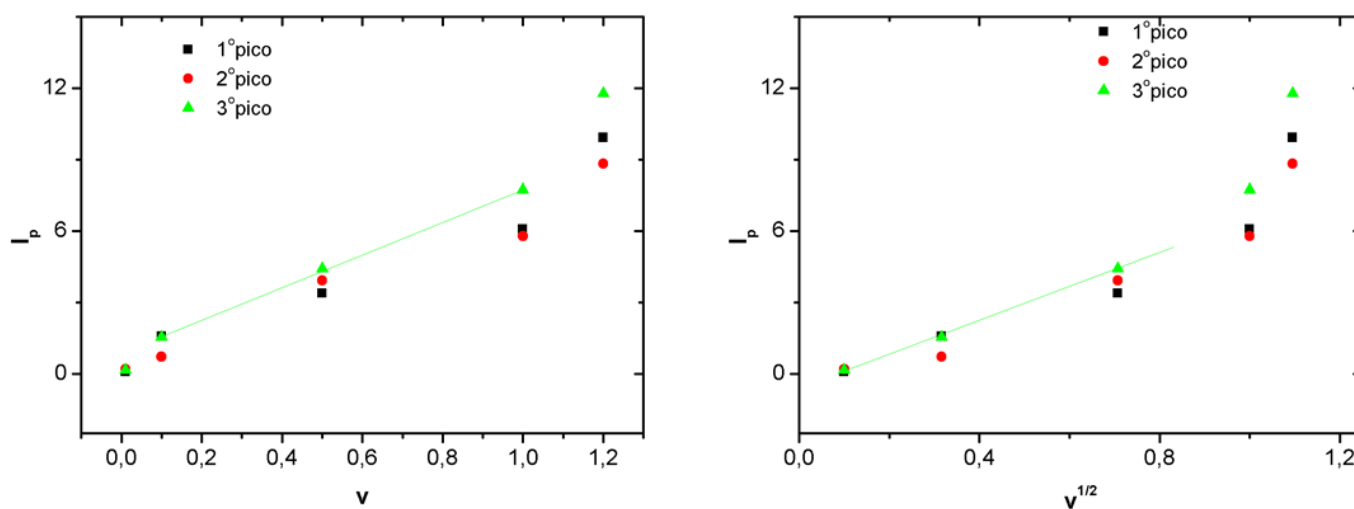


Figura 18. Gráfico de linearidade de corrente de pico em função da velocidade (a), da raiz da velocidade (b).

No voltamograma da curcumina em tampão fosfato a pH 6,9 Figura 19, observou na região anódica um pico a um potencial  $E_{A3} = + 0,33$  e uma onda no potencial  $E_{2A} = + 0,55$ . Na varredura catódica foi observada uma onda em um potencial  $E_{C1} = + 0,17$  indicando o processo de redução da curcumina.



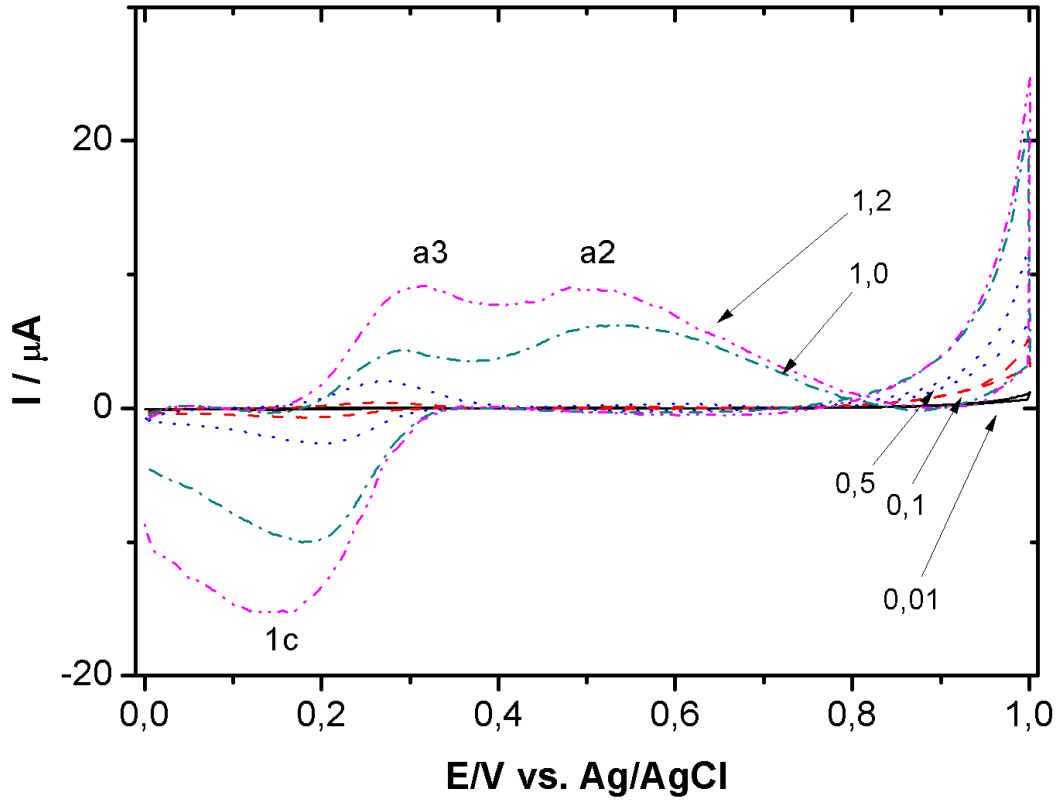


Figura 19. Voltamograma da curcumina 100 $\mu$ m em tampão fosfato pH 6,9, em velocidades 0,01, 0,1, 0,5, 1,0, 1,2V.s-2

O voltamograma da curcumina no tampão fosfato a pH 7,4, foi observado na varredura anódica três processos de oxidação nos potenciais  $E_{2A} = +0,23$ ,  $E_{A3} = +0,49$  e  $E_{1A} = +0,67$  e na varredura catódica é observado uma onda de redução no potencial  $E_{C1} = +0,14$ , como mostra a Figura 20. Não foi possível observar a corrente de pico devido os picos estarem comprometidos.

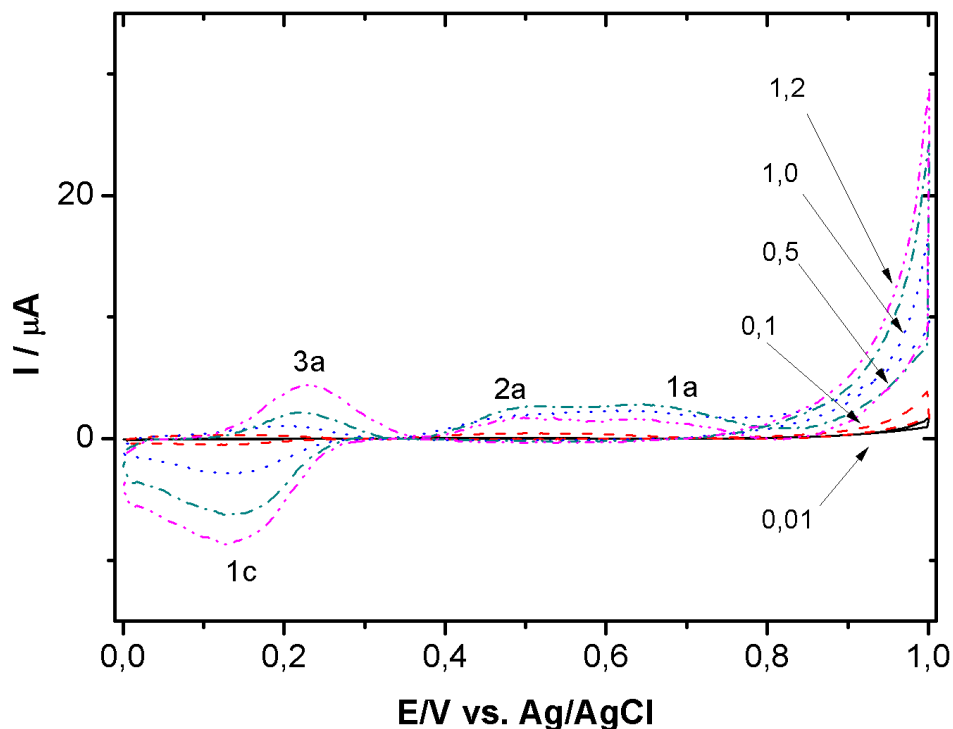


Figura 20. Voltamograma da curcumina 100 $\mu$ m em tampão fosfato pH 7,4, em velocidades 0,01, 0,1, 0,5, 1,0, 1,2V.s-2

### 5.3 Voltametria de Pulso Diferencial da curcumina livre

Foram investigados o comportamento eletroquímico da curcumina em diferente pHs e suas respectivas varreduras. Nos voltamogramas de pulso diferencial observados na figura 21, mostra uma diferença na intensidade de pico quando faz sucessivas varreduras, ocorre a diminuição do primeiro pico e o aumento do segundo pico, isso deve pelo fato da adsorção

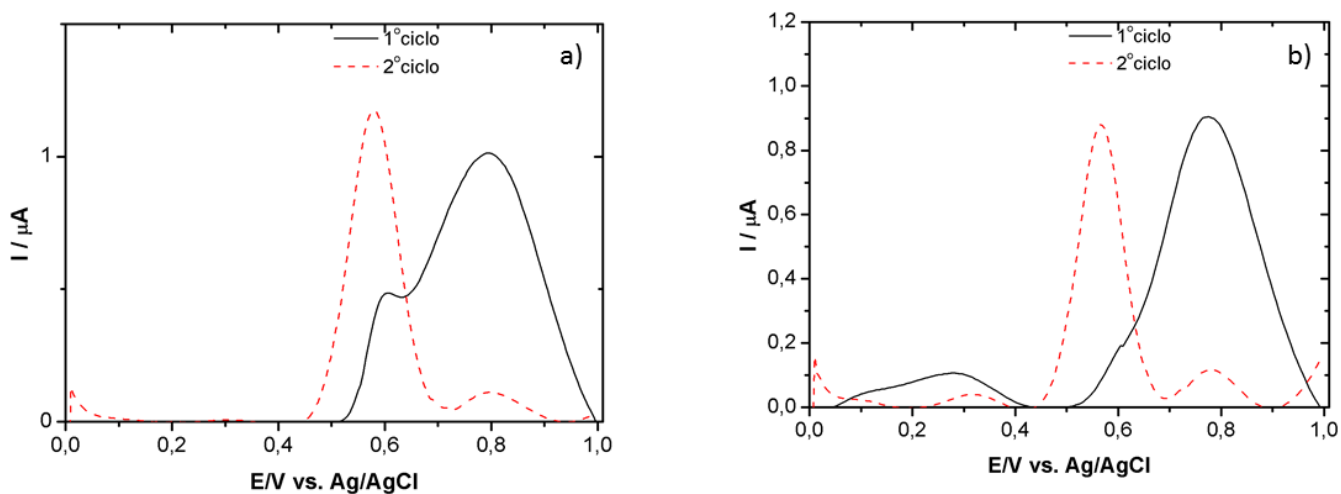


Figura 21. Voltamograma de pulso diferencial, obtidos na primeira varredura em solução de curcumina 10 $\mu$ M, em diferentes pHs. 1B relação gráfica do potencial de picos em função do pH.

dos produtos de oxidação da curcumina livre, intensificando o segundo pico em todos os valores de pH.

Para pH superiores observa-se também na Figura 22 essa diferença na intensidade dos dois picos de oxidação da curcumina, mostrando que independente dos valores de pH, ocorre a adsorção do produto de oxidação da curcumina na superfície do eletrodo.

Na primeira varredura, notou-se o aparecimento de dois picos de oxidação da curcumina como mostra na Figura 22a. Vale ressaltar que à medida que o pH aumenta consequentemente há um deslocamento do potencial. Pelo gráfico do potencial em função do pH do eletrólito de suporte mostrado na Figura 22b, para os dois picos observados na primeira varredura. Essa variação de potencial sugere a reação ocorrida na superfície do eletrodo. Para o primeiro pico observou a diminuição do potencial que segue a relação de  $E_{1a} \text{ (V)} = 0,8 \text{ a } 0,2 \text{ V}$ , com uma reta de inclinação de  $0,6\text{V}$ . Como no primeiro pico o segundo pico mostrado é um valor inferior ao primeiro  $E_{2a} = 0,8 \text{ a } 0,4$  tendo o mesmo valor de inclinação de  $0,4\text{V}$ . Para ambos os picos indica que tem a transferência do mesmo número de elétrons e de prótons na reação.

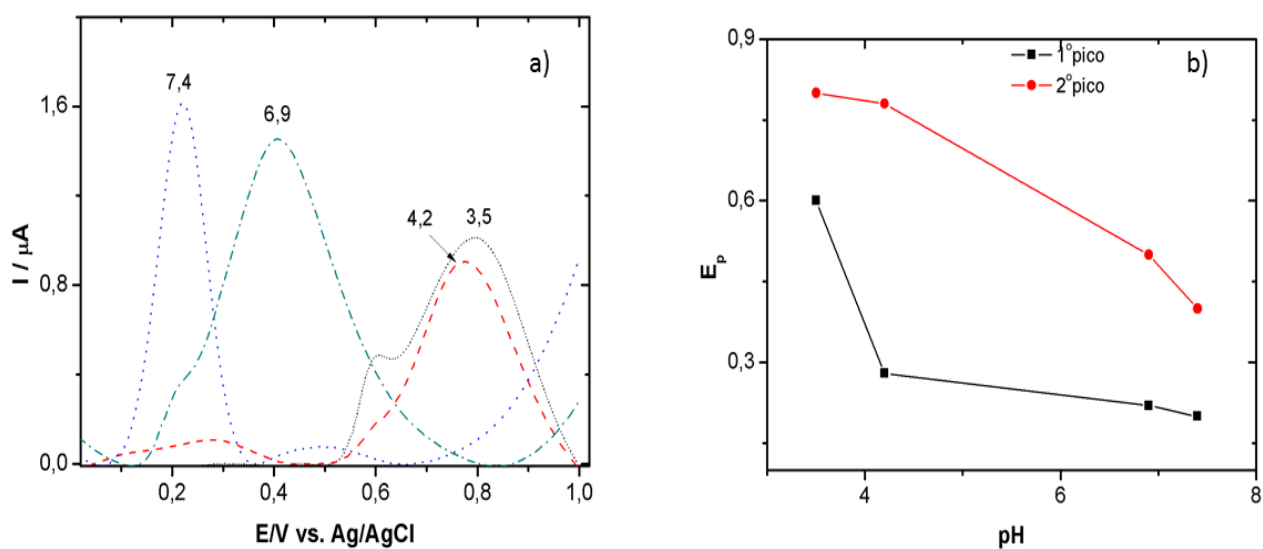


Figura 102. Voltamogramas de dois ciclos de pulso diferencial obtidos numa solução de curcumina 10 $\mu\text{M}$  em tampão fosfato 6,9(a) e 7,4(b) respectivamente.

Na segunda varredura (Figura 23) observa a diminuição da intensidade do primeiro pico e o aumento do segundo pico, isso se dá a formação dos produtos formados da reação, e a da mesma forma que aumenta o pH ocorre o deslocamento do potencial para valores

menos positivos. Para o primeiro pico observa a diminuição do potencial à medida que aumenta os valores de pH,  $E_{1a} = 0,8 - 0,4$  V, com uma inclinação de  $0,4V$ . Para o segundo pico também é observado a diminuição do potencial à medida que aumenta os valores de pH,  $E_{2a} = 0,6 - 0,4$  com uma inclinação de  $0,2mV$ .

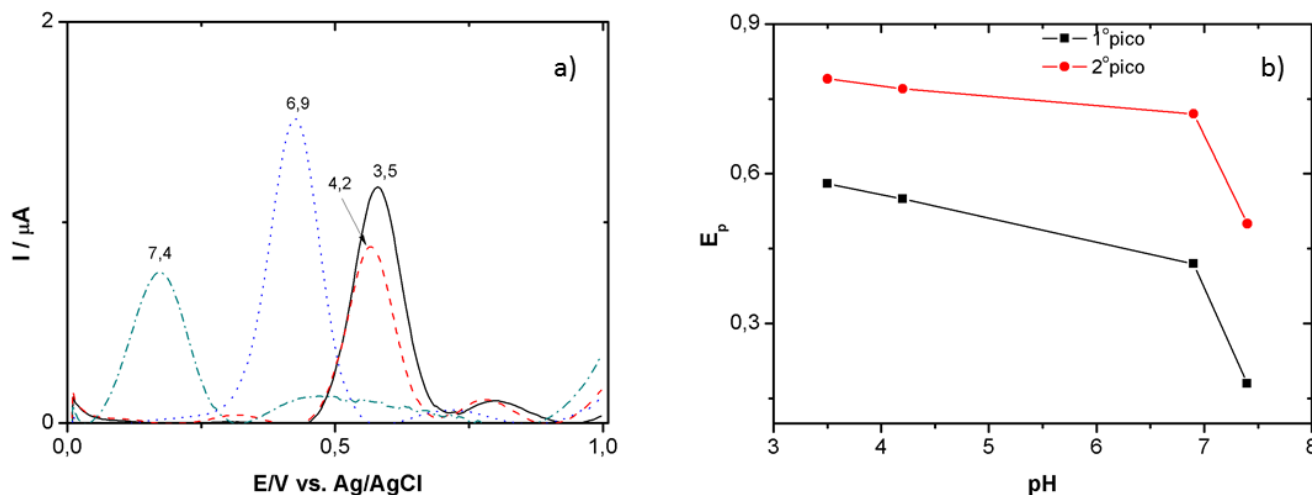


Figura 23. Voltamograma de pulso diferencial, obtidos na segunda varredura em solução de curcumina 10uM, em diferentes pHs. 1b relação gráfica do potencial de picos em função do pH.

#### 5.4 Estudo Voltamétrico da curcumina nanoencapsulada

Nesse subcapítulo são apresentados os resultados da voltametria da curcumina nanoencapsulada onde que na preparação do material se aplicou as mesmas condições que a curcumina livre.

O voltamograma da curcumina nanoencapsulada no tampão acetato a pH 7,4, na varredura anódica foram observado dois processos de oxidação nos potenciais  $E_{2A} = +0,6$ , porém houve um descolamento para direita com a aumento da velocidade nesse potencial e aumento da corrente capacitiva. Outro potencial que foi notado é na região  $E_{1A} = +0,8$ , mas mediante ao aumento da velocidade não foi possível observar o pico. Na varredura catódica é observada uma onda de redução no potencial  $E_{C1} = +0,32$ , como mostra a Figura 24.

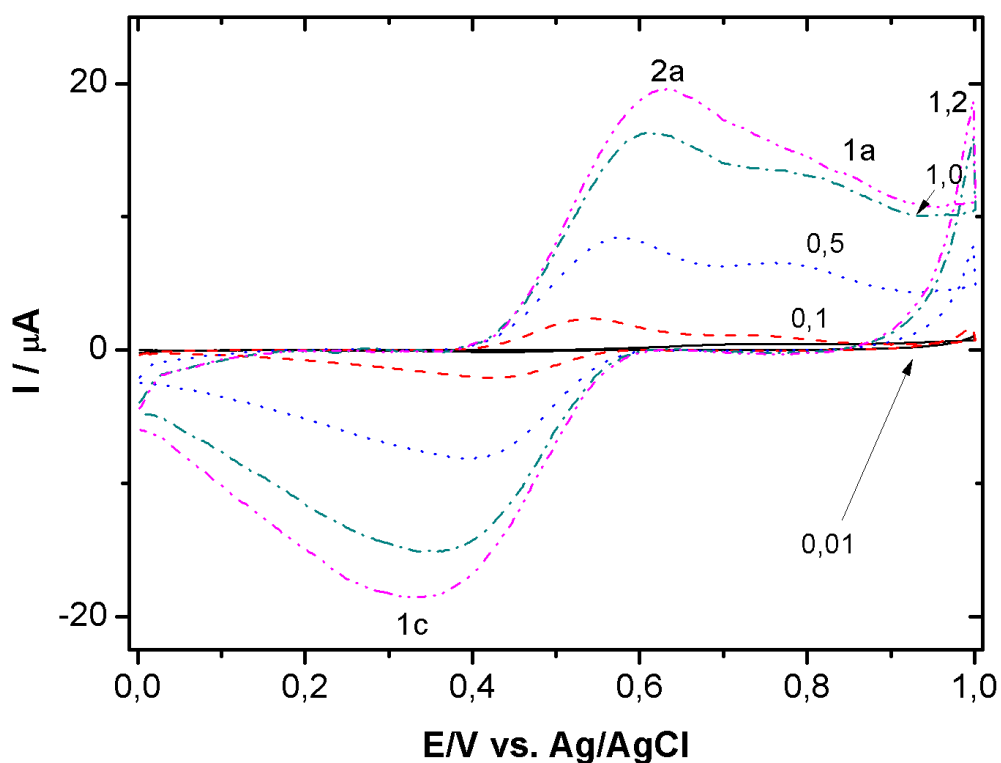


Figura 24. Voltamograma da curcumina nanoencapsulada de PLA a 100 $\mu$ m em tampão acetato pH 3,5, em velocidades 0,01, 0,1, 0,5, 1,0, 1,2V.s-2

No voltamograma apresentado na Figura 25 observou na varredura anódica um pico no potencial  $E_{2A} = +0,57$ . Em velocidades baixa é observado uma onda no potencial  $E_{1A} = +0,78$ , indicando que há processo de oxidação da curcumina nanoencapsulada, porém como aumento da velocidade não é possível mais observar esse pico, devido à corrente capacitiva. Na varredura catódica é observada uma onda no potencial  $E_{C1} = +0,35$ , mostrando que há um processo de redução da curcumina nanoencapsulada.

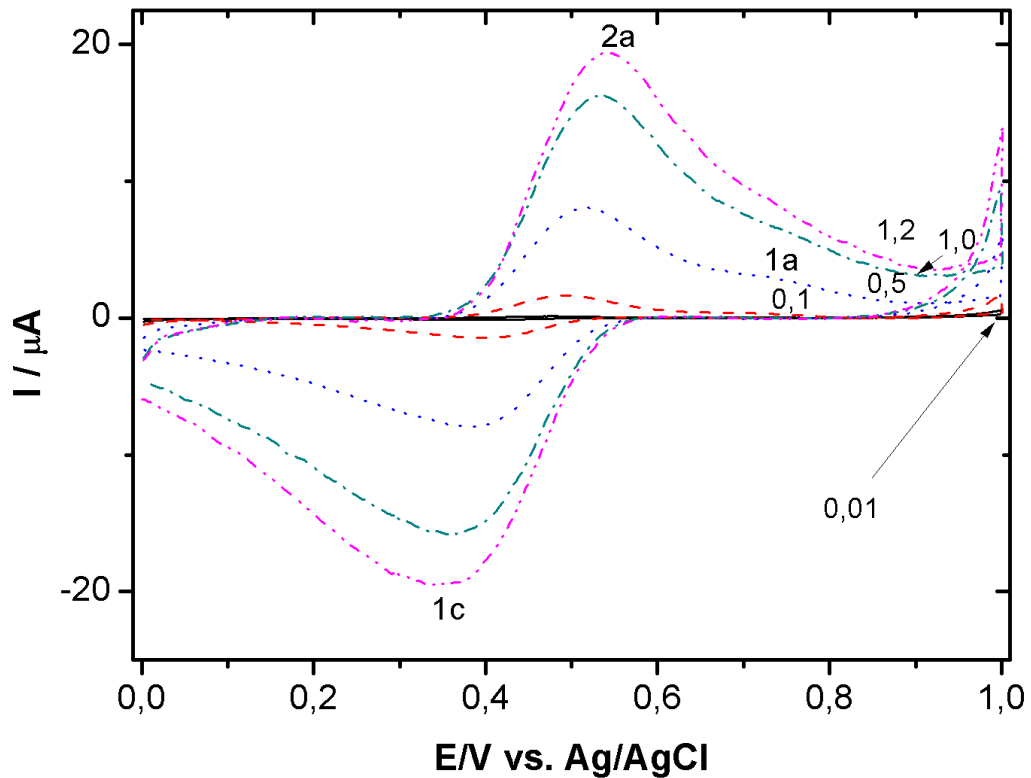


Figura 25. Voltamograma da curcumina nanoencapsulada de PLA a 100 $\mu$ m em tampão acetato pH 4,2, em velocidades 0,01, 0,1, 0,5, 1,0, 1,2V.s<sup>-2</sup>

Para o voltamograma (Figura 26) a pH 6,9, na varredura anódica é observado uma onda a um potencial  $E_{A3} = +0,41$ , ocorrendo um processo de oxidação, onde é também visto que os a onda é mais definida quando se tem um aumento da velocidade. Na varredura catódica é observada uma onda a um potencial  $E_{C1} = +0,17$  ocorrendo um processo de redução da curcumina nanoencapsulada.

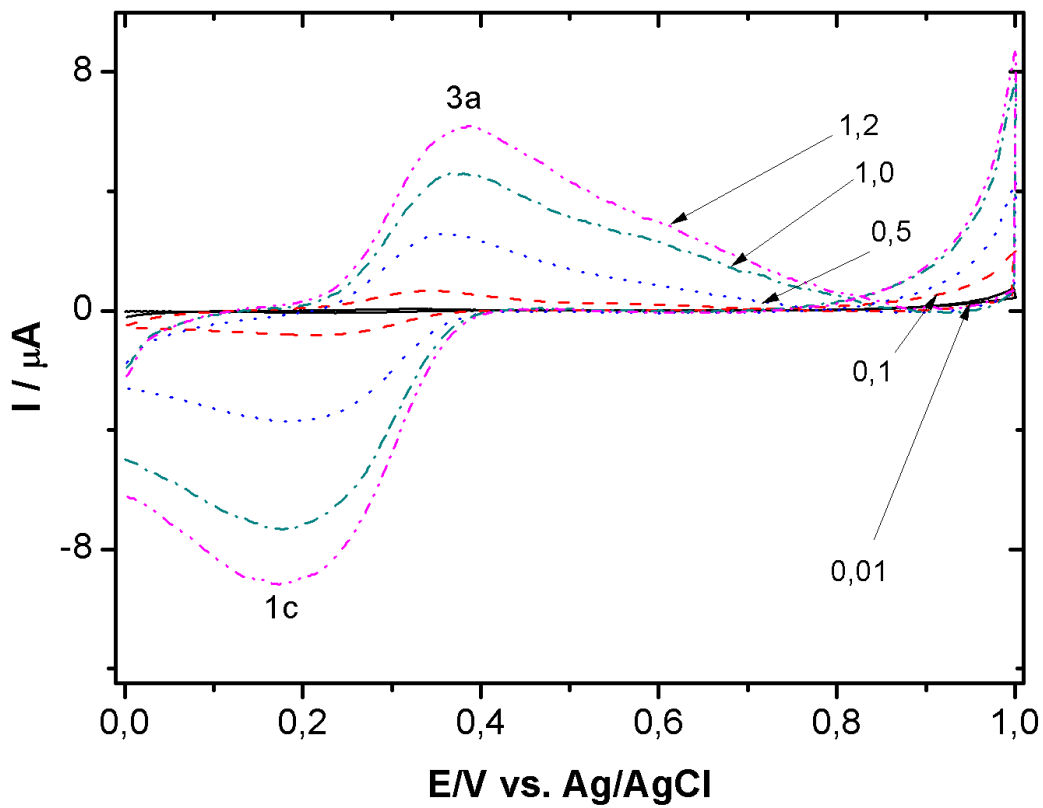


Figura 26. Voltamograma da curcumina nanoencapsulada de PLA a 100 $\mu$ m em tampão acetato pH 7,4, em velocidades 0,01, 0,1, 0,5, 1,0, 1,2V.s-2

Em pH 7,4 (Figura 27) pode-se observar na varredura anódica uma onda a um potencial  $E_{A3} = +0,33$ , indicando um processo de oxidação da curcumina nanoencapsulada. Na varredura catódica observa uma onda a um potencial  $E_{C1} = +0,19$  ocorrendo um processo de redução da curcumina. É verificado que as ondas ficam mais definidas com o aumento da velocidade.

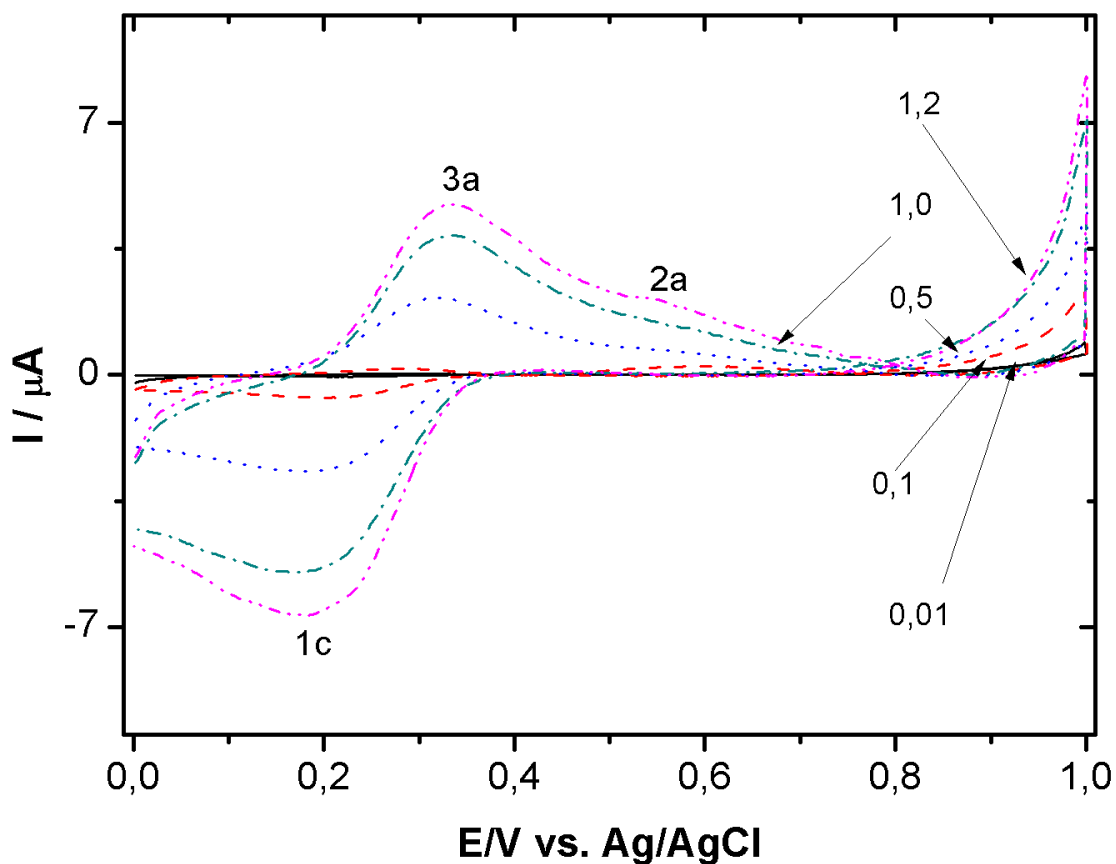


Figura 27. Voltamograma da curcumina nanoencapsulada de PLA a 100 $\mu$ m em tampão acetato pH 7,4, em velocidades 0,01, 0,1, 0,5, 1,0, 1,2V.s-2

### 5.5 Curva Analítica

A primeira etapa realizada foi uma varredura espectrofotométrica na região do UV com a curcumina para identificação do pico com maior absorção em espectrofotômetro de absorção UV. A curcumina apresentou um máximo de absorção, em torno de 426 nm. Esse comprimento de onda foi o utilizado para quantificação da curcumina.

A partir da curva obtida define a regressão linear ( $y = 0,0987 + 0,13476x$ ), onde também apresentou um coeficiente de correlação no valor de 0,9998. De acordo com Ribani et al. (2004) quanto mais próximo a 1,0 o  $r^2$ , menor a dispersão dos pontos e mais confiável será a determinação do analito, mostrando a importância do parâmetro.

Verificada a faixa de linearidade do método. A curva analítica adquirida a partir da concentração entre 0,3 e 12  $\mu$ g/mL, apresentou linearidade do método como mostra na Figura 28.



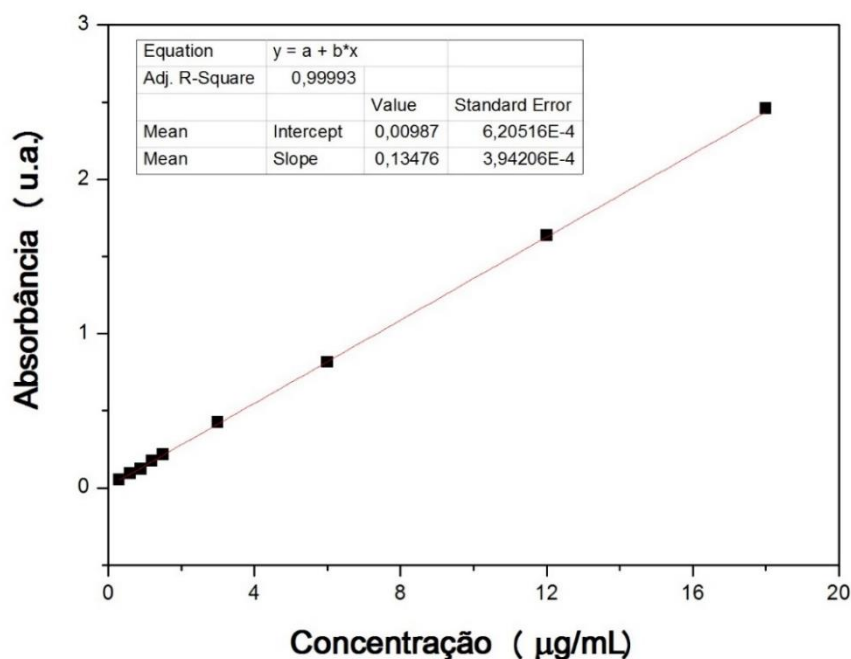


Figura 28. Representação gráfica da curva padrão da curcumina em etanol, através de espectrofotômetro em 426nm.

## 5.6 Caracterização das nanocápsulas de curcumina, tamanho e polidispersão.

Antes de iniciar as medidas eletroquímicas com as nanocápsulas de curcumina, foi medido o tamanho, verificar o índice de polidispersão e o potencial zeta. Foram feitos dois lotes inicialmente de curcumina e feita sua caracterização.

Observando a Tabela 2, mostra que as nanocápsulas de curcumina atingiram o tamanho esperado entre 226nm e 202nm, onde que para as nanocápsulas carregadas de fármacos é aceitável em diâmetros menores que 300nm mediante mostrado na literatura (GUPTA et al., 2006).

**Tabela 2.** Caracterização do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta, da nanocápsulas de PLA de curcumina.

Lotes	Índice de polidispersão	Potencial Zeta	Tamanho (nm)	Eficiência de encapsulação
Primeiro Lote	0,166	17,5mV	226 nm	61%
Segundo Lote	0,152	20,7mV	202 nm	65%

O índice de polidispersão mostra dados sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos, foi inferior ( $< 0,17$ ) para ambos os lotes, não sendo observada diferença significativa entre eles, apresentando a formação de sistemas monodispersos.

Quanto à eficiência de encapsulação, obteve um valor superior a 50% mostrando que o método utilizado foi eficiente.

### **5.7 Estudo da Degradação da curcumina por Pulso diferencial**

No estudo da degradação da curcumina, foi utilizada a técnica de pulso diferencial a fim de detectar a diminuição da atividade do fármaco em solução com o tempo.

A Figura 29 mostra as medidas por pulso diferencial da curcumina livre no decorrer do tempo. Observam-se dois picos deslocados para potenciais menos anódicos quando comparados com os picos observados na voltametria cíclica.

Para ambos os picos se observa um aumento de intensidade de corrente com o decorrer do tempo até aproximadamente 15 horas. Após 15 horas, a corrente de pico mantém-se constante. Para melhor observação deste fenômeno na Figura 27b a corrente de pico foi representada em função do tempo.

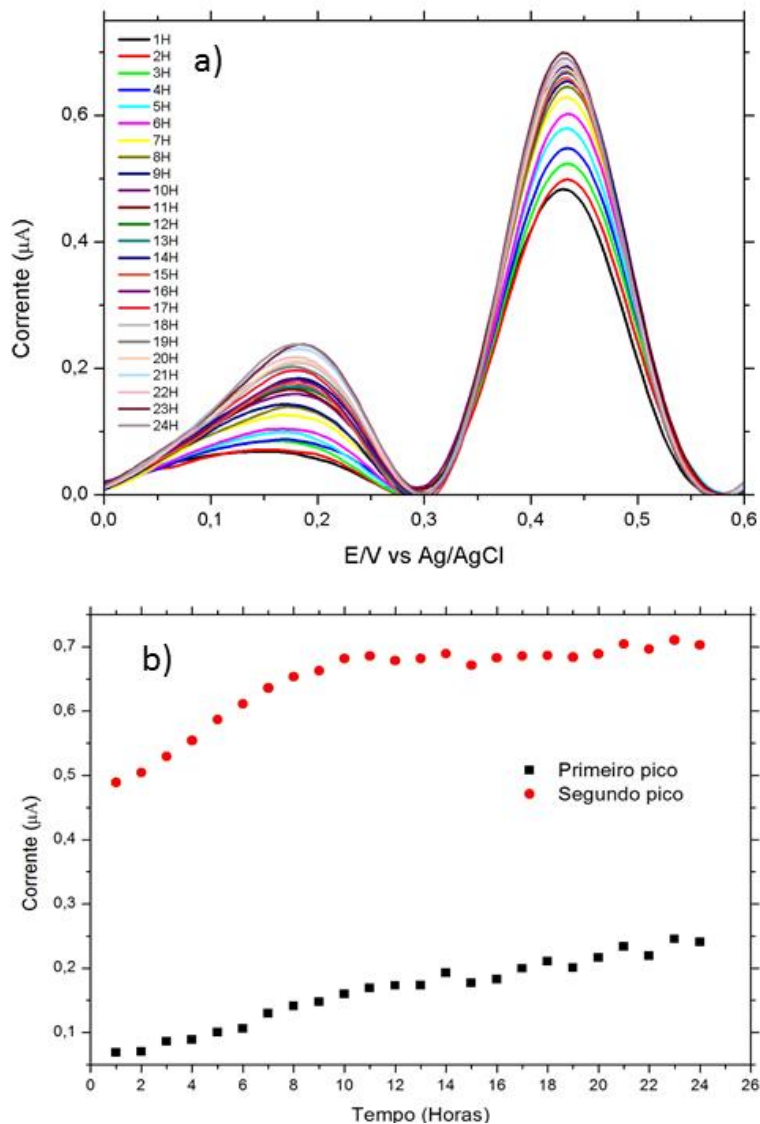


Figura 29. Voltamogramas de pulso diferencial da curcumina livre (a) e corrente de pico em função do tempo (b) em 100  $\mu\text{M}$  em tampão acetato pH 3,5

Quando trabalha a valores de pH próximo e acima de 7,0 percebe uma mudança significativa no comportamento da curcumina livre no decorrer do tempo. Na Figura 30 ocorre uma diminuição da intensidade do segundo pico de 0,41 $\mu\text{A}$  para 0,11 $\mu\text{A}$ , mostrando uma diminuição da atividade da curcumina em solução. Para melhor observação deste fenômeno na figura 30b a corrente de pico foi representada em função do tempo.

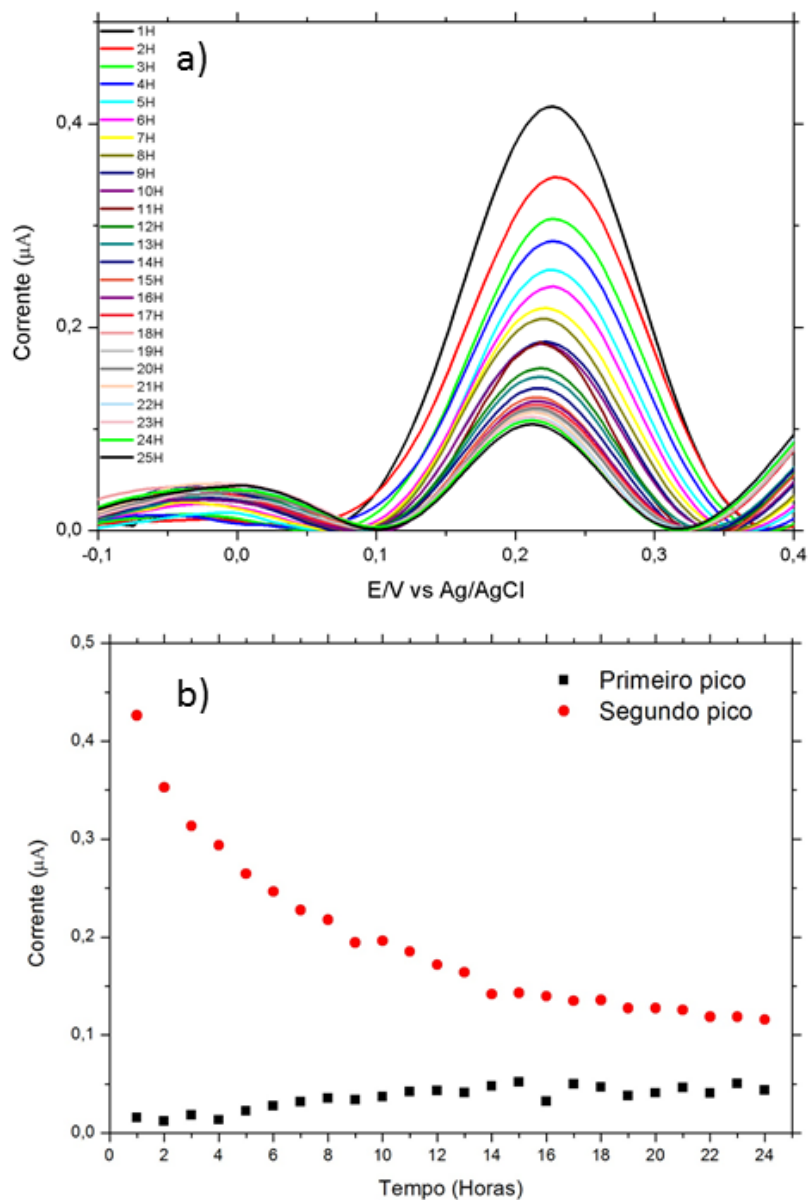


Figura 30. Variação da intensidade de corrente no decorrer do tempo da curcumina livre (a) e corrente de pico em função do tempo (b) 100  $\mu\text{M}$  em tampão fosfato pH 6,9.

Na Figura 31a apresenta a degradação da curcumina livre em tampão fosfato em pH 7,4, onde no decorrer do tempo houve uma diminuição significativa do pico de 0,43  $\mu\text{A}$  para 0,11  $\mu\text{A}$ , mostrando a diminuição da sua atividade na solução. Para uma melhor representação foi destacado na Figura 31b a corrente de pico em função do tempo.

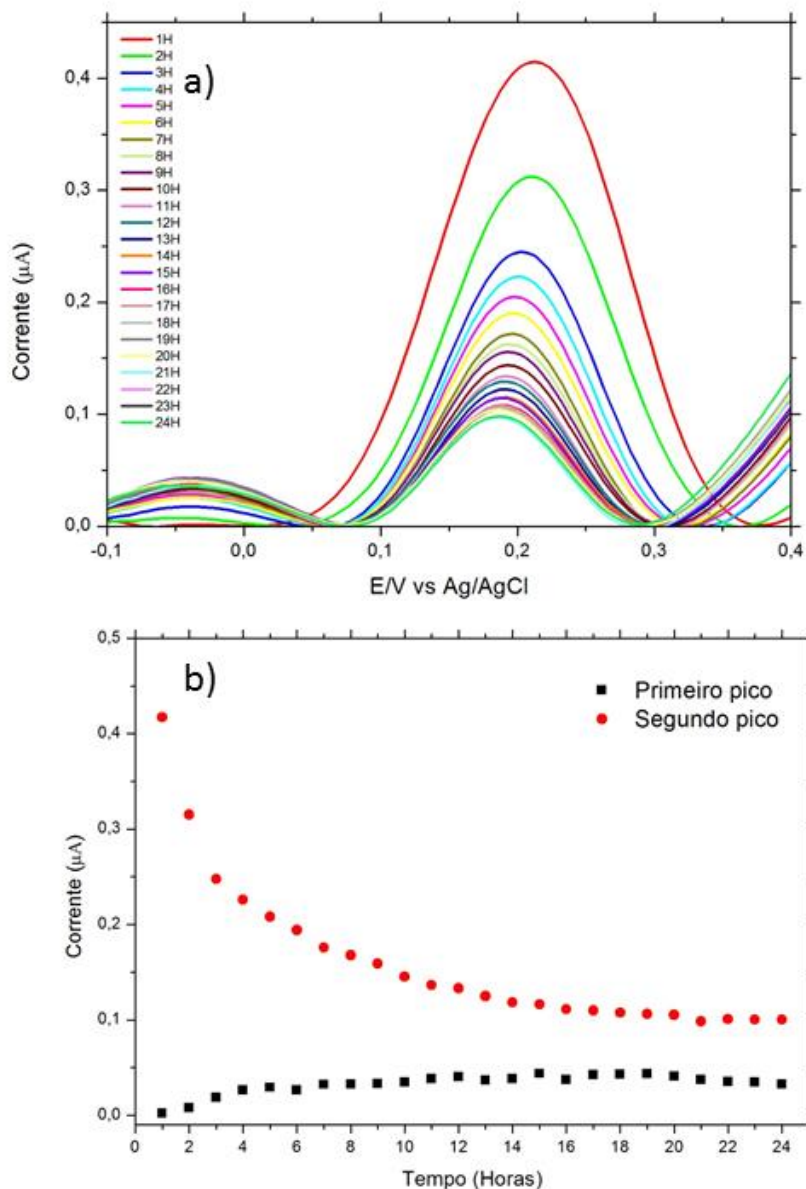


Figura 31. Variação da intensidade de corrente no decorrer do tempo da curcumina livre (a) e corrente de pico em função do tempo (b) 100 µM em tampão fosfato pH 7,4.

#### 6.4 Estudo da degradação da curcumina nanoencapsulada por Voltametria de Pulso Diferencial

Os parâmetros utilizados para fazer as medidas com a curcumina nanoencapsulada de PLA foram os mesmos utilizados na curcumina livre. No tampão acetato pH 3,5 houve um problema com a solução, onde após 14 horas a solução secou, impossibilitando fazer medidas de 24 horas. A Figura 32 mostra um aumento da atividade da curcumina

nanoencapsulada de  $0,35\mu\text{A}$  para  $0,61\mu\text{A}$ . Observa também no decorrer do tempo ela estabiliza em alta corrente.

Desta forma houve uma variação na intensidade de pico nas primeiras 2 horas, porém no decorrer do tempo, a corrente teve um aumento.

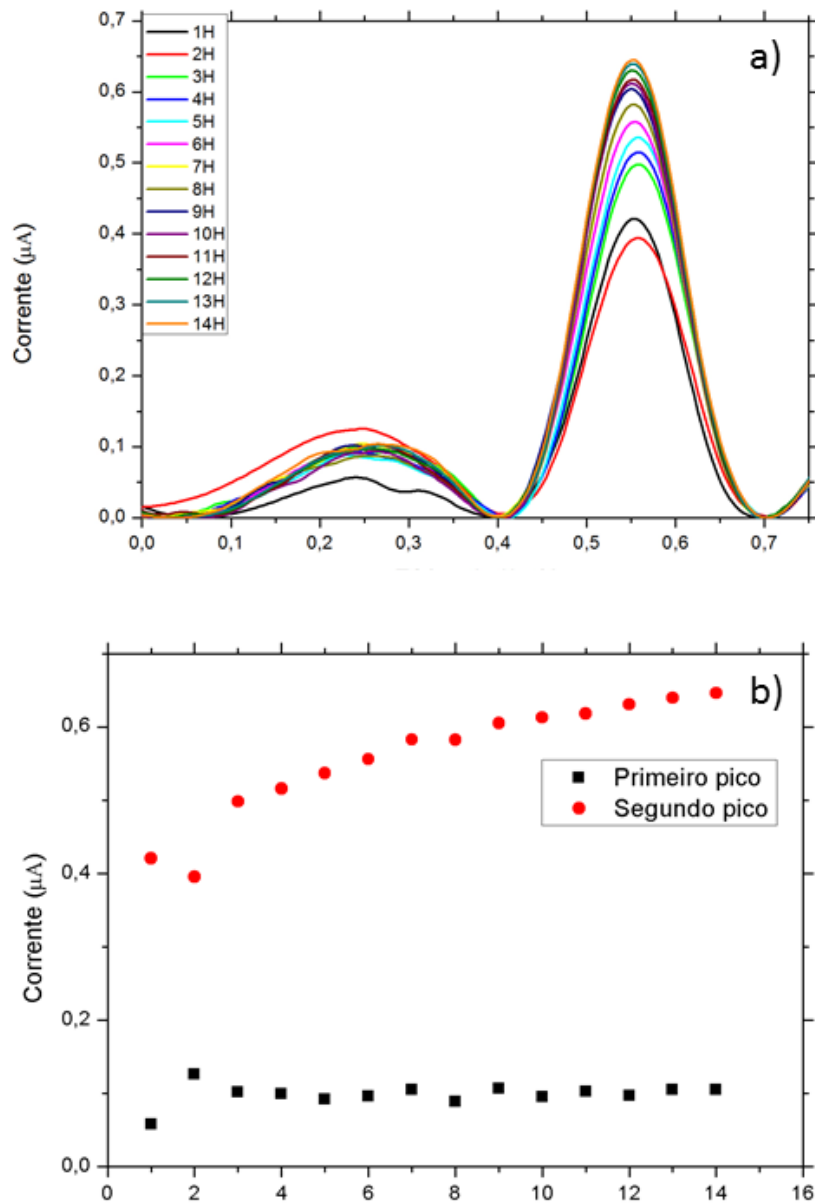


Figura 32. Variação da intensidade de corrente no decorrer do tempo da curcumina nanoencapsulada de PLA 100  $\mu\text{M}$  em tampão acetato pH 3,5.

Na Figura 33 observa variação da intensidade de corrente pelo tempo da curcumina nanoencapsulada em tampão fosfato pH 6,9 (a) e tampão fosfato 7,4 (b). Percebe que na primeira hora apresentou uma intensidade alta de corrente no segundo pico, porém no decorrer do tempo esse pico foi diminuindo, ocasionando uma diminuição da atividade. No primeiro pico houve um leve aumento, mas não muito significativo.

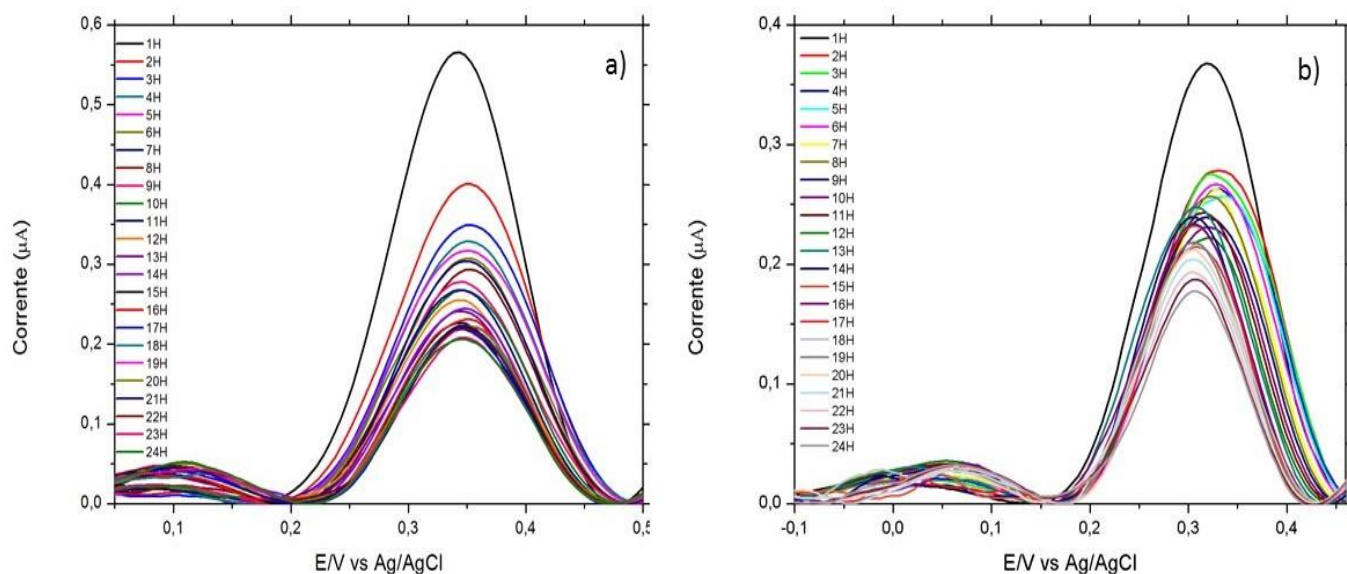


Figura 33. Variação da intensidade de corrente pelo tempo da curcumina nanoencapsulada em tampão fosfato pH 6,9 (a) e tampão fosfato 7,4 (b).

Para comparação entre a curcumina livre e a curcumina nanoencapsulada, a variação das correntes de pico em função do tempo para as duas espécies foi representada em único gráfico. A partir das medidas de pulso diferencial da curcumina livre e nanoencapsulada, foram destacados os picos e colocados em um gráfico para verificar valores de corrente no decorrer do tempo.

No pH 3,5 percebeu um aumento de 0,45 para 0,66 µA nas primeiras 11 horas no segundo pico, depois disso o pico se estabilizou havendo pouca variação. No primeiro pico observou variação no decorrer do tempo, houve um aumento de 0,23 µA. A curcumina apresenta estabilidade a pH baixo, pois não houve decaimento no decorrer do tempo. Para curcumina nanoencapsulada, no segundo pico, houve pouca alteração durante o tempo apresentando uma pequena diminuição na intensidade de corrente comparado com a curcumina livre, como mostra a Figura 34.

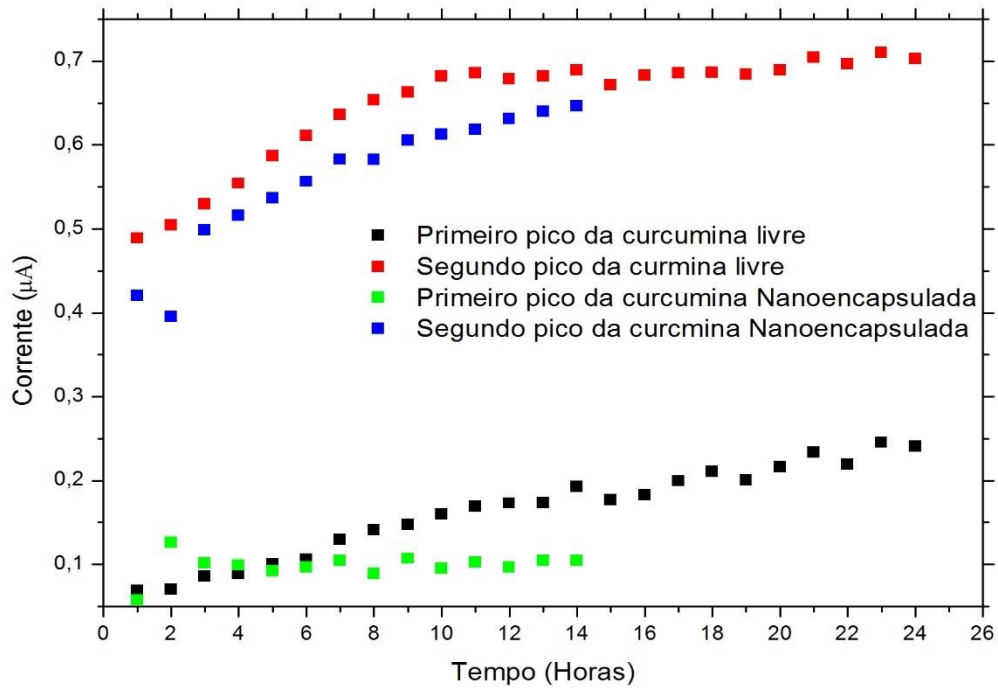


Figura 34. Variação da intensidade de corrente no decorrer do tempo da curcumina livre e da curcumina nanoencapsulada com PLA 100  $\mu$ M em tampão acetato pH 3,5.

No pH 6,9 inicialmente nas primeiras 15 horas houve uma diminuição da atividade da curcumina livre e da curcumina nanoencapsulada, porém é observado que no segundo pico da curcumina nanoencapsulada é maior do que a curcumina livre, apresentando uma maior atividade, com uma diferença próxima a 0,1 $\mu$ . Para o primeiro pico não houve uma diferença significativa, pois, os valores ficaram próximos, como mostra a Figura 35.



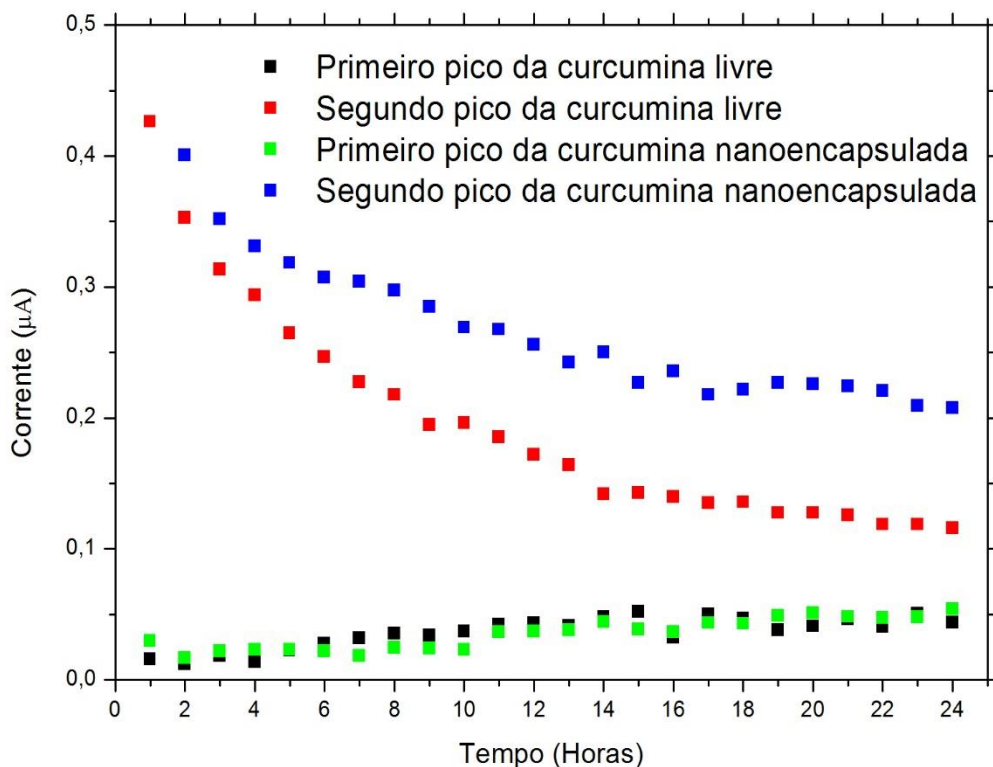


Figura 35. Variação da intensidade de corrente no decorrer do tempo da curcumina livre e da curcumina nanoencapsulada com PLA 100  $\mu\text{M}$  em tampão fosfato pH 6,9.

Em tampão fosfato pH 7,4 como mostra na Figura 36, observou uma diferença significativa no segundo pico da curcumina livre e da curcumina nanoencapsulada. Para curcumina nanoencapsulada nas duas primeiras horas teve um decaimento da atividade, em seguida ela se mantém relativamente estável no decorrer do tempo e uma leve diminuição nas horas finais.

No segundo pico da curcumina livre há decaimento durante o tempo de 0,43 para 0,11  $\mu\text{A}$ , ocasionando uma diminuição da atividade na solução, observa para ambos os primeiros picos apresentado na figura, que não houve uma diferença significativa.

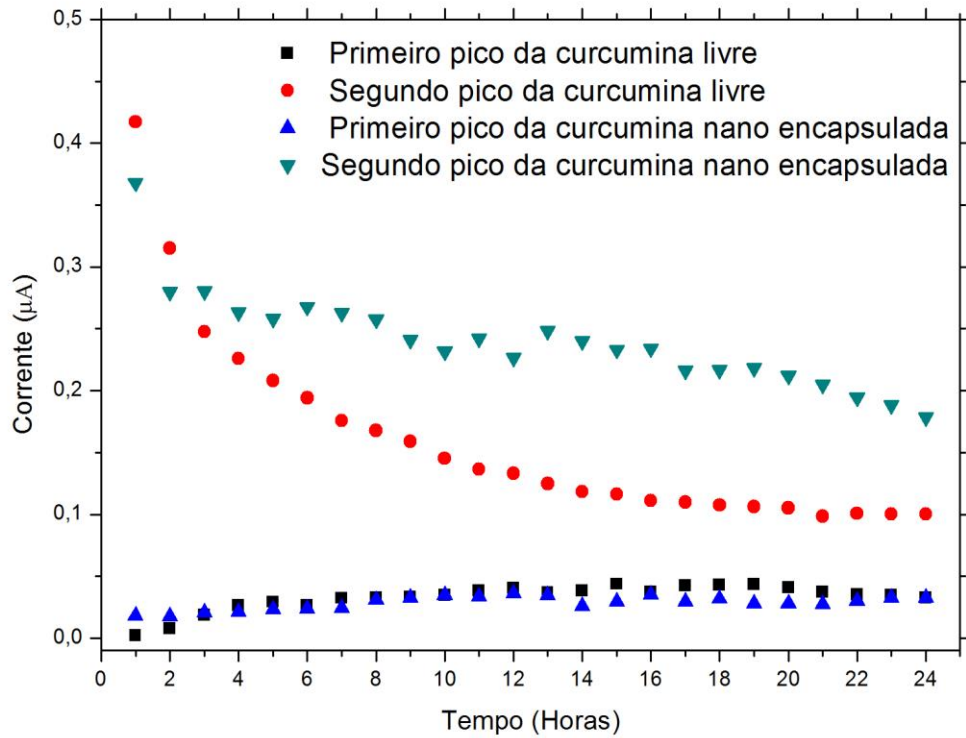


Figura 36. Variação da intensidade de corrente no decorrer do tempo da curcumina livre e da curcumina nanoencapsulada com PLA 100  $\mu$ M em tampão fosfato pH 7,4.

Desta forma percebe-se que a curcumina nanoencapsulada apresenta uma maior estabilidade do que a curcumina livre, isso está relacionado com a atividade do fármaco no decorrer do tempo, verificado através da técnica de voltametria de pulso diferencial.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Por meio do estudo eletroquímico da curcumina livre e da curcumina nanoencapsulada de PLA, por voltametria cíclica e voltametria por pulso diferencial em diferentes valores de pH, possibilitou identificar o processo de oxidação, bem como acompanhar a atividade no decorrer o tempo.

É importante ressaltar que a limpeza do eletrodo de trabalho é importante para obter boas medidas, não só do eletrodo de trabalho, mas dos materiais que estão sendo trabalhados, e o cuidado de preparar os materiais.

As técnicas de voltametria de pulso diferencial traz uma maneira eficaz de acompanhar a atividade do fármaco no decorrer do tempo, podendo assim trazer novas abordagens ao estudo de outros fármacos.

Os estudos de degradação mostraram que a curcumina nanoencapsulada é significativamente mais estável que a curcumina livre, de tal forma que a atividade da curcumina depende diretamente do pH.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, S. K; SARMA., L.; KESAVAN, P.C. **Protective effects of chlorogenic acid, curcumina and beta-carotene against gamma-radiation-induced in vivo chromosomal damage.** *Mutarion research*, Amsterdam, v. 3030, n. 3, p. 109-112,1993.

AGGARWAL, B. B.; et al. **Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies.** *Anticancer Research*, Athens, v. 23, n. 1A, p. 363-398,2003.

AGGARWAL, B. B.; HARIKUMAR, K. B. **Potential Therapeutic Effects of Curcumin, the Anti-inflammatory Agent, Against Neurodegenerative, Cardiovascular, Pulmonary, Metabolic, Autoimmune and Neoplastic Diseases.** *Int J Biochem Cell Biol*, v. 41, n. 1, p. 40–59, 2009.

ALAM, S. et al. **Novel dipeptide nanoparticles for effective curcumina delivery.** *International Journal of nanomedicine*, Auckland, v. 7, p. 4207-4221, 2012.

ANAND, P. *et al.* **Biological activities of curcumin and its (Congeners) made by man and Mother Nature.** *Biochemical pharmacology*. v. 76,p. 1590–1611, 2008.

ANAND, P. et al. **Curcumin and cancer: an "old-age" disease with an "age-old" solution.** *Cancer Lett*, v. 267, n. 1, p. 133-64, 2008.

ANTUNES, L. M., et al. **Effects of the antioxidants curcumin and vitamin C on cisplatin-induced clastogenesis in wistar rat bone marrow cells.** *Mutation Research*, Amsterdam, v. 465, n. 1-2,p. 131-137,2000.

ARUOMA, O. I. **Free radicals, antioxidants and international nutrition.** *Asia Pacific. J. Clin. Nutr.*, v. 8, p. 53-63, 1999.

BARZEGAR, A. **The role of electron-transfer and H-atom donation on the superb antioxidant activity and free radical reaction of curcumin.** *FoodChemistry*, v. 135, p. 1369–1376, 2012.

CAO, J. et al. **Mitochondrial and nuclear DNA damage induced by curcumin in human hepatoma G2 cells.** *Toxicol. Sci.*, v. 91, p. 476-83, 2006.

CHEN, C. *et al.* **pH Dependence of reactive sites of curcumin possessing antioxidant activity and free radical scavenging ability studied using the electrochemical and ESR techniques: Polyaniline used as a source of the free radical.** *Journal of Electroanalytical Chemistry*. v. 713, p. 22-27. 2014.

DAHMKKE, I. N. *et al.* **Cooking enhances curcumin anti-carcinogenic activity through pyrolytic formation of “deketenecurcumin”.** *Food Chemistry*. v. 151, p. 514–519, 2014.

GOEL, A.; AGGARWAL, B. B. **Curcumin, the golden spice from Indian saffron, is a chemosensitizer and radiosensitizer for tumors and chemoprotector and radioprotector for normal organs.** *Nutrition and cancer, London*, v. 62, n. 7, p. 919-930, 2010.

GRYNKIEWICZ, G.; ŚLIFIRSKI, P. **Curcumin and curcuminoids in quest for medicinal status.** *Acta Biochim Pol*, v. 59, n. 2, p. 201-12, 2012.

GUPTA, R.B.; *et al.* **Nanoparticles Technology for Drug Delivery.** Taylor & Francis: New York, vol.159, 2006.

GUTERRES, S.S. *et al.* **F. Poly (DLlactide) nanocapsules containing diclofenac: I. formulation and stability study.** *Int. J. Pharm.* v. 113, p. 57-63, 1995.

Gutierrez, V.O.; *Dissertação de Mestrado.* **Avaliação dos Efeitos Fisiológicos e Bioquímicos do tratamento com Curcumina Incorporada ao Iogurte no Diabetes Experimental**, 2011.

HALLIWELL, B. **Role of free radicals in the neurodegenerative diseases; therapeutic implications for antioxidant treatment.** *Drugs & Aging, Auckland*, v. 18, n. 9, p. 685-716, 2001.

HOLLER, F. J. *et al.* **Princípios de análise instrumental.** 6. ed. Porto Alegre: Bookman, p. 1055, 2009.

INANO, H. *et al.* **Chemoprevention by curcumin during the promotion stage of tumorigenesis of mammary gland in rats irradiated with gamma-rays.** *Carcinogenesis*, v. 20, n. 6, p. 1011-8, 1999.

JOVANOVIC, S. V. *et al.* **How Curcumin Works Preferentially with Water Soluble Antioxidants.** J. American Chemical Society. v. 123, n. 13, 2001.

KAKRAN, M. *et al.* **Preparation of nanoparticles of poorly water-soluble antioxidant curcumin by antisolvent precipitation methods.** J.Nanopart Res, v.14, n.757, p.1-11, 2012.

KELLOFF, G. J. *et al.* **Chemopreventive drug development: perspective and progress.** Cancer Epidem. Biom. Prev., v. 3, p. 85-98, 1994.

KUNNUMAKKARA, A. B. *et al.* **Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins.** Cancer Lett, v. 269, n. 2, p. 199-225, 2008.

KURT, G. *et al.* **Effects of curcumin on acute spinal cord ischemia-reperfusion injury in rabbits.** J.Neurosurg Spine, v. 20, p. 464-470, 2014.

KUTTAN, R.; SUDHEERAN, P. C.; JOSPH, C. D. **Turmeric and curcumin as topical agents in cancer therapy.** *Tumori.*, v. 73, p. 29-31, 1987.

LI, M., *et al.* **Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches.** Int. J. Pharm. v.363, p. 26-39, 2008.

LI, Y. *et al.* **Targeting cancer stem cells by curcumin and clinical applications.** Cancer Letters, v. 346, p. 197–205, 2014.

MIDDLETON, E., *et al.* **The effects on plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer.** Pharmacological Reviews, Baltimore, v. 52, n.4 . 673-751, 2000.

REDDY, S. C. **Curcumin for malaria therapy.** Rev. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 326, p. 472–474, 2005.

RIBANI, M. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.** Quimica nova, 27, 771-780, 2004.

SANDUR, S. K., et al. **Curcumin modulates the radiosensitivity of colorectal cancer cells by suppressing constitutive and inducible NF-kappaB activity.** International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics, New York, v.75, n. 2, p. 534-542, 2009.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. **Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos.** Química Nova, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SHI, H. S., et al. **A systemic administration of liposomal curcumin inhibits radiation pneumonitis and sensitizes lung carcinoma to radiation.** International Journal of Nanomedicine, Auckland, v. 7, p. 2601-2611, 2012.

SINGH, U., et al. **Reactions of reactive oxygen species (ROS) with curcumin analogues: Structure-activity relationship.** Free Radical Research, Yverdon, v. 45, n. 3, p. 317-325, 2011.

SKOOG, D. A. *et al.* **“Fundamentos de Química Analítica.”** - São Paulo: Cengage Learning, 2010.

SKOOG, D. A. *et al.* **Fundamentos de química analítica.** 8°. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental.** 6°. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** 2°. ed. São Paulo: LTC, 2000.

TEXEIRA, K. C. **Estudo das propriedades eletroluminescentes de novos complexos tetrakis beta-dicetonatos de európio utilizados em OLEDs.** Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, p. 111. 2010.

GARCIA, A. R. **Métodos Instrumentais,** 2009. Disponível em: <<https://pt.scribd.com/doc/110540884/Tecnica-de-analise-instrumental-I-Espectroscopia-molecular>>. Acesso em: 07 Abril 2015.

LENZ, G. **Determinação Fotométrica.** UFRGS, 1997. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/biofisica/Bio10003/Metfoto.pdf>>. Acesso em: 29 Março 2015.

SOOB RATTEE, M. A., et al. **Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions.** Mutation Research, Amsterdam, v. 579, n. 1-2, p. 200-213, 2005.

THUANE, C. F. N. **Desenvolvimento e avaliação farmacocinética de nanopartículas de PLGA e PLGA-PEG contendo curcumina.** Dissertação de Ciências Farmacêutica. UNICENTRO-PR, 2011.

TOMREN, M. A. et al. **Studies on curcumin and curcuminoids XXXI. Symmetric and asymmetric curcuminoids: Stability, activity and complexation with cyclodextrin.** Int. J. Pharm, v. 338, p. 27-34, 2007.

TONNESEN, H.H, *et al.* **Studies on curcumin and curcuminoids. VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solution.** Z LebensmUntersForsch. v. 180: p. 402. 1985.

Tonnesen, H.H. & Karlsen, J. 1985. **Studies of curcumin and curcuminoids: VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solutions.** Z. Lebensm. Unters. Forsch. 180: 402-404.

VYAS, A. et al. **Perspectives on New Synthetic Curcumin Analogs and their Potential Anticancer Properties.** Curr Pharm Des, v. 19, n. 11, p. 2047–2069, 2013.

VYAS, A.*et al.* **Perspectives on New Synthetic Curcumin Analogs and their Potential Anticancer Properties.** Current Pharmaceutical Design. V 19, p. 2047-2069, 2013.

Wan, Y.J., Pan, M.H., Cheng, A.L., Lin, L.I., Ho, Y.S., Hsieh, C.Y., & Lin, J.K. 1997. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. J. Pharm. Biomed. Anal., 15(12): 1867-1876.

WILKEN, R. et al. **Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma.** Mol Cancer, v.10, p. 12, 2011.

YOUSSEF, D. A. *et al.* **The possible roles of vitamin D and curcumin in treating gonorrhoea.** Medical Hypotheses, v. 81, p. 131–135, 2013.