

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE - UNICENTRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
ASSOCIAÇÃO AMPLA ENTRE A UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-
OESTE E A UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
UNICENTRO/UEPG

**NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS DE PALMITATO DE
METILA PARA CARREAMENTO DA CURCUMINA**

VANESSA FALCHETTI LOPES

Guarapuava

2021

VANESSA FALCHETTI LOPES

**NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS DE PALMITATO DE
METILA PARA CARREAMENTO DA CURCUMINA**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Fármacos, Medicamentos e Bociências aplicadas à Farmácia, da Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil

Coorientadora: Prof(a). Dra. Rubiana Mara Mainardes

Guarapuava

2021

Catálogo na Publicação
Rede de Bibliotecas da Unicentro

L864n Lopes, Vanessa Falchetti
 Nanopartículas lipídicas sólidas de palmitato de metila para
 carreamento da curcumina / Vanessa Falchetti Lopes. – – Guarapuava,
 2021.

 xix, 169 f. : il. ; 28 cm

 Tese (doutorado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa
 de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração:
 Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia, 2021.

 Orientador: Najeh Maissar Khalil

 Coorientadora: Rubiana Mara Mainardes

 Banca examinadora: Christiane Schineider Machado Kolc, Daniel de
 Paula, Guilherme Barroso Langoni de Freitas, Luiz Fernando Cótica

 Bibliografia

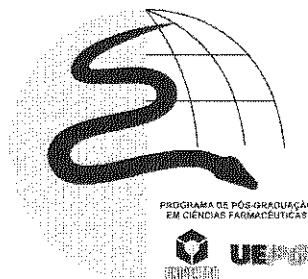
 1. Nanotecnologia. 2. Farmacocinética. 3. Biodisponibilidade. 4.
 Delineamento. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências
 Farmacêuticas.

CDD 615



Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Associação Ampla entre a
Universidade Estadual do Centro-Oeste e a
Universidade Estadual de Ponta Grossa



ATA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO Nº 05/2021

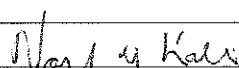
Ata de Defesa de Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas da pós-graduanda **Vanessa Falchetti Lopes**, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Unicentro e Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG.

Aos vinte e quatro dias do mês de junho do ano de dois mil e vinte e um, às oito horas e trinta minutos, de forma remota, via sistema de web conferência, sob a presidência do Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil, reuniu-se a Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas da pós-graduanda **Vanessa Falchetti Lopes**, constituída pelos professores: Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil (Orientador) - Unicentro, Prof.^a Dr.^a Christiane Schneider Machado Kolc (Membro Titular) – Unicentro, Prof. Dr. Daniel de Paula (Membro Titular) – Unicentro, Prof. Dr. Guilherme Barroso Langoni de Freitas (Membro Titular) – UFPI e o Prof. Dr. Luiz Fernando Cótica – UEM. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da Banca e a candidata das normas que regem a defesa de Tese e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para a arguição. A seguir, a candidata passou à defesa de sua Tese de Doutorado intitulada: **"Nanopartículas Lipídicas Sólidas de Palmitato de Metila para Carreamento da Curcumina"**. Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento, tendo sido a candidata APROVADA. A Presidência ressaltou que a obtenção do Título de DOUTOR EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biotecnologias aplicadas à Farmácia está condicionada apresentação da versão definitiva da TESE, bem como das cópias em CD (PDF), com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador(a) no prazo de trinta dias, comprovante de submissão de artigo científico, e demais exigências da legislação vigente. O não atendimento ao prazo anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Esta Ata de Defesa deverá ser homologada pelo Colegiado do Programa e o título obtido deverá ser homologado pelo Comitê de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, CPS. Nada mais havendo a tratar foi lavrada esta Ata e assinada pelos membros da Comissão Examinadora.
Guarapuava, 24 de junho de 2021.

Observação (se necessário): _____

Alteração de Título: Sim Não

Novo título: _____


Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil
Unicentro.
Presidente

Prof.^a Dr.^a Christiane Schneider Machado Kolc
Unicentro.
Membro Titular

Prof. Dr. Daniel de Paula
Unicentro.
Membro Titular

Prof. Dr. Guilherme Barroso Langoni de Freitas
UFPI.
Membro Titular

Prof. Dr. Luiz Fernando Cótica
Unicentro.
Membro Titular

- Ata de Defesa homologada pelo Colegiado do PPGCF, conforme Ata da Reunião nº _____, de ____/____/____.

- Título homologado pela CPS, conforme Resolução nº _____, de ____/____/____.

Este documento não substitui o diploma.

Dedico esse trabalho a Dona Natalina, meu exemplo e inspiração de força e perseverança.

AGRADECIMENTOS

Gratidão pelo caminho percorrido, chamado Ciência. Nele encontrei mentores os quais me ensinaram a melhor forma de “trilhar” esse trajeto: Najeh e Rubiana, gratidão.

Deparei-me com “ferramentas” as quais nem sabia manusear, mas ao mesmo tempo, precisava aprender, pois nesse caminho não há um “atalho” ... a viagem é longa, mas nunca sozinha. Foi aí que esbarrei com pessoas que compartilharam as dádivas de se fazer ciência: colegas do laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica, gratidão.

Em meio as inúmeras exigências e responsabilidades que esse caminho nos traz, são comuns as intempéries: dúvida; cansaço; sensação de incapacidade..., mas para todos esses contei com a resiliência e alicerces: Deus, família, esposo e amigos, gratidão.

Devo mencionar quem um dia apresentou-me esse caminho e com tanta confiança em mim, disse: “vou te levar lá”, Luciana gratidão. Por fim, não poderia deixar de citar que esse caminho foi percorrido, pois há uma instituição que permite a existência de todo esse trajeto, Unicentro e Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, gratidão.

E nesse caminho... a semente foi plantada, a árvore cresceu, as flores e frutos nasceram e depois de muitos cuidados, é chegada a hora de partir com sensação de “caminho” realizado, CIÊNCIA gratidão.

RESUMO

Nanopartículas lipídicas sólidas são consideradas uma via promissora para encapsulação de compostos que apresentam limitações físico-químicas, como a curcumina, que apesar de exibir inúmeras aplicações terapêuticas, possui baixa biodisponibilidade após administração oral e baixa solubilidade em soluções fisiológicas. Com isso, destaca-se o uso da nanotecnologia farmacêutica como ferramenta de ampliação das propriedades físico-químicas da curcumina. O palmitato de metila é um lipídio solúvel em etanol e endógeno do metabolismo, contudo, ainda não utilizado para obtenção de sistemas nanoestruturados. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi obter, caracterizar e realizar ensaios de avaliação biológica das nanopartículas lipídicas sólidas de palmitato de metila contendo curcumina. Para isso, um delineamento fatorial foi utilizado a fim de otimizar as condições de obtenção das nanopartículas desenvolvidas pelo método de homogeneização de alto cisalhamento. Como resultado, as nanopartículas contendo curcumina apresentaram: diâmetro médio de $162,41 \pm 5,7$ nm com perfil de distribuição monomodal; $0,10 \pm 0,05$ de índice de polidispersão, caracterizando homogeneidade das partículas suspensas; potencial zeta de $-18,00 \pm 0,2$ mV e $68,42\% \pm 0,7$ de eficiência de encapsulação. Após o processo de liofilização com manitol (5%), as nanopartículas de curcumina apresentaram ao término de 150 dias $261,63 \pm 8,75$ nm, índice de polidispersão $0,25 \pm 0,03$ e potencial zeta $-19,45 \pm 0,78$ mV, podendo-se sugerir o uso do manitol para crioproteção e estabilidade do sistema durante o armazenamento. Além disso, o sistema nanoestruturado apresentou, através da técnica de difratometria de raios X, menor índice de cristalinidade em relação à curcumina e palmitato de metila isolados e, de acordo com os espectrogramas de infravermelho, não houve nenhuma interação química que pudesse modificar os grupos funcionais caracterizados. Os resultados da análise térmica mostraram que a curcumina foi dispersa de forma amorfa nas nanopartículas e as imagens de microscopia confirmaram o tamanho nanométrico. Nos ensaios de liberação *in vitro*, as nanopartículas apresentaram estabilidade quando submetidas aos fluidos gastrointestinais simulados, protegendo a molécula das variações de pH e em tampão fosfato salino (TFS) 60% da curcumina foi liberada através da matriz lipídica. A

aplicabilidade das nanopartículas foi avaliada pelo estudo do potencial antioxidante, e também através da avaliação da citotoxicidade em eritrócitos e em cepas de *Candida sp.* Em relação ao estudo antioxidante, o sistema nanoestruturado demonstrou inibição semelhante a curcumina livre frente ao Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS^{•+}). A citotoxicidade sobre eritrócitos foi maior com a curcumina livre do que com a nanoencapsulada. A atividade antifúngica das nanopartículas foi dose dependente, com concentração inibitória mínima (CIM50) em 7,5 µg.mL⁻¹ sob todas as cepas testadas. No ensaio farmacocinético observou-se uma melhora significativa nos parâmetros farmacocinéticos da curcumina quando nanoencapsulada, após administração oral de dose única em ratos. A quantidade de curcumina disponível no plasma era maior quando veiculada nas nanopartículas (ASC0-t = 117,85 ± 10,63 ng.h/mL⁻¹) em comparação com a molécula livre (ASC0-t = 34,36 ± 13,76 ng.h/mL⁻¹) e a biodisponibilidade da curcumina nas nanopartículas foi três vezes maior que a apresentada pela molécula livre. Por fim, os resultados deste inédito estudo apontam que o palmitato de metila pode ser utilizado no desenvolvimento e aplicação de nanopartículas lipídicas pela via oral, e que o sistema apresenta potencial para melhora da biodisponibilidade da curcumina.

Palavras chaves: nanotecnologia; farmacocinética; biodisponibilidade; delineamento.

ABSTRACT

Solid lipid nanoparticles are considered a promising way for compounds encapsulation that show physical and chemical limitations, such as curcumin, which despite exhibiting several therapeutic applications, has a lower bioavailability after an oral administration and low solubility in physiological solutions. Therefore, the use of pharmaceutical nanotechnology as a tool to expand the physical-chemical properties of curcumin stands out. Methyl palmitate is an ethanol soluble lipid and endogenous from the metabolism, however, not yet used to obtain nanostructured systems. Thus, the goal of this study was to obtain, characterize and perform biological evaluation assays of solid lipid nanoparticles of methyl palmitate with curcumin in it. For this, a factorial design was used in order to optimize the conditions of obtaining the developed nanoparticles by the high shear homogenization method. As a result, the nanoparticles which contain curcumin presented: average diameter of 162.41 ± 5.7 nm with monomodal distribution profile; 0.10 ± 0.05 polydispersion index, characterizing homogeneity of the suspended particles; zeta potential of -18.00 ± 0.2 mV and $68.42\% \pm 0.7$ of encapsulation efficiency. After the lyophilization process with mannitol (5%), the nanoparticles presented at the end of 150 days, 261.63 ± 8.75 nm, polydispersion index of 0.25 ± 0.03 and zeta potential -19.45 ± 0.78 mV, suggesting the use of mannitol for a cryoprotection and stability of the system during storage. In addition, the nanostructured system presented, through the X ray diffraction technique, lower crystallinity index value in relation to isolated methyl curcumin and methyl palmitate and, according to the infrared spectrograms, there was no chemical interaction that could modify the characterized functional groups. The results of the thermal analysis showed that curcumin was dispersed amorphally in the nanoparticles and the microscopy images confirmed the nanometric size. In the *in vitro* assays, the nanoparticles showed stability when submitted to simulated gastrointestinal fluids, protecting the molecule from pH variations and in phosphate buffer saline (PBS), 60% of the curcumin was released through the lipid matrix. The applicability of the nanoparticles was evaluated by the potential antioxidant study, and also by evaluating cytotoxicity in erythrocytes and *Candida* sp. Regarding the antioxidant study, the nanostructured system

demonstrated a similar inhibition to free curcumin against Acid2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazolin-6-sulphonic (ABTS^{•+}). Cytotoxicity on erythrocytes was higher with free curcumin than with the nano-encapsulated. The anti-fungal activity of the nanoparticles was dose-dependent, with minimal inhibitory concentration (MIC₅₀) at 7.5 µg.mL⁻¹ under all tested strains. In the pharmacokinetic assay, a significant improvement was observed in the pharmacokinetic parameters of curcumin when nano-encapsulated to, after oral single-dose administration in mice. The amount of curcumin available in plasma was higher when transmitted in the nanoparticles (AUC_{0-t} = 117.85 ± 10,63 ng.h/mL⁻¹) compared to the free molecule (AUC_{0-t} = 34.36 ± 13,76 ng.h/mL⁻¹) and the bioavailability of curcumin in the nanoparticles was three times higher than that presented by the free molecule. Finally, the results of this unprecedented study indicate that methyl palmitate can be used in the development and application of oral lipid nanoparticles, and that the system has the potential to improve curcumin bioavailability.

Keywords: nanotechnology; pharmacokinetics; bioavailability; design.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Estrutura química da curcumina..... | 11 |
| Figura 2 – Principais diferenças estruturais entre nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN)..... | 20 |
| Figura 3 – Modelos teóricos para os três tipos de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) com relação a estrutura da matriz e incorporação do composto ativo..... | 21 |
| Figura 4 - Modelos teóricos para os três tipos de carreadores lipídicos nanoestruturados com relação a estrutura da matriz e incorporação do composto ativo | 22 |
| Figura 5 - Fórmula estrutural do lipídio palmitato de metila..... | 31 |
| Figura 6 - Esquema representativo da obtenção de nanopartículas lipídicas de palmitato de metila pelo método de homogeneização de alto cisalhamento pelo ultrassom..... | 39 |
| Figura 7 – Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para avaliação da influência das variáveis: massa de curcumina (mg), do lipídio palmitato de metila (mg) e percentual de tensoativo Tween (%) e suas interações sobre a resposta diâmetro médio das nanopartículas lipídicas..... | 60 |
| Figura 8 – Gráfico dos efeitos principais da variável massa de curcumina (mg) na resposta diâmetro médio (nm) das nanopartículas lipídicas..... | 61 |
| Figura 9 - Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para avaliação da influência das variáveis: massa de curcumina (mg); do lipídio palmitato de metila (mg); percentual de tensoativo Tween (%) e suas interações sobre a resposta índice de polidispersão IPD das nanopartículas lipídicas | 64 |
| Figura 10 - Gráfico dos efeitos principais da variável massa de curcumina (mg) na resposta índice de polidispersão (IPD)..... | 65 |
| Figura 11 - Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para avaliação da influência das variáveis: massa de curcumina (mg); do lipídio palmitato de metila (mg); percentual de tensoativo Tween (%) e suas interações sobre a resposta eficiência de encapsulação (EE%) da Curcumina em nanopartículas lipídicas. | 67 |
| Figura 12 - Gráfico dos efeitos principais da variável massa de curcumina (mg) na resposta eficiência de encapsulação (EE%) | 68 |

| | |
|---|----|
| Figura 13 – Gráfico de interação dos efeitos para o tensoativo Tween (%) na resposta eficiência de encapsulação (EE%) da curcumina em nanopartículas de palmitato de metila | 69 |
| Figura 14 - Distribuição de diâmetros de uma amostra representativa de nanopartículas lipídicas de palmitato de metila contendo curcumina com diâmetro médio (nm) e índice de polidispersão (IPD) | 74 |
| Figura 15 – Reta da regressão linear da curva de calibração da curcumina em diferentes concentrações (5,0; 10; 15; 20; 30; 35; 40 e 50,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), sendo y a equação da reta | 77 |
| Figura 16 – Sobreposição dos cromatogramas: amostra do padrão de curcumina (A); sobrenadante de nanopartículas carregadas (B); sobrenadante de nanopartículas vazias (C) e espectro UV com λ máximo em 428 nm (D) ... | 78 |
| Figura 17 - Estabilidade das nanopartículas lipídicas sob diferentes condições de armazenamento (refrigerada e ambiente) para o parâmetro diâmetro médio (nm)..... | 80 |
| Figura 18 - Estabilidade das nanopartículas lipídicas sob diferentes condições de armazenamento (refrigerada e ambiente) para o parâmetro índice de polidispersão (IPD)..... | 82 |
| Figura 19 - Estabilidade das nanopartículas lipídicas sob diferentes condições de armazenamento (refrigerada e ambiente) para o parâmetro potencial zeta (mV). | 83 |
| Figura 20 - Microscopia eletrônica de varredura de nanopartículas de palmitato de metila contendo curcumina..... | 88 |
| Figura 21 - Microscopia eletrônica de varredura de nanopartículas de palmitato de metila sem curcumina..... | 88 |
| Figura 22- Perfil de DRX das nanopartículas vazias, nanopartículas carregadas, curcumina livre e lipídio palmitato de metila | 89 |
| Figura 23 - Estrutura da curcumina com as respectivas posições das bandas elencadas na Tabela 11 | 92 |
| Figura 24 - Estrutura do palmitato de metila com as respectivas posições das bandas elencadas na Tabela 12 | 93 |
| Figura 25 – Espetroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) das nanopartículas vazias, carregadas, mistura física (curcumina + palmitato de metila), curcumina livre e palmitato de metila..... | 94 |
| Figura 26- Espectrograma da curcumina livre e nanopartículas carregadas e vazias em região selecionada (3500 cm^{-1}) | 95 |

| | |
|---|-----|
| Figura 27- Análise termogravimétrica (TG) e derivada (DTG) da curcumina livre | 95 |
| Figura 28- Análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) da curcumina livre | 97 |
| Figura 29- Análise termogravimétrica (TG) e derivada (DTG) do palmitato de metila..... | 97 |
| Figura 30- Análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) do palmitato de metila | 98 |
| Figura 31- Análise termogravimétrica (TG) e derivada (DTG) das nanopartículas carregadas..... | 99 |
| Figura 32- Análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) das nanopartículas carregadas..... | 99 |
| Figura 33- Análise termogravimétrica (TG) e derivada (DTG) das nanopartículas vazias..... | 100 |
| Figura 34- Análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) das nanopartículas vazias..... | 101 |
| Figura 35 - Perfil de liberação da curcumina a partir das nanopartículas de palmitato de metila no tampão fosfato salino (TFS) 10 mmol.L ⁻¹ , pH 7,4 por 120 horas, à 37°C e 150 rpm | 102 |
| Figura 36 - Perfil de liberação <i>in vitro</i> das nanopartículas de palmitato de metila contendo curcumina no FGS (pH 1,2) por 2 horas, e após no FIS (pH 6,8) por 4 horas, à 37°C e 150 rpm. | 103 |
| Figura 37 - Percentual de inibição do radical ABTS ^{•+} para curcumina livre (3,5 µg.mL ⁻¹ ; 7,5 µg.mL ⁻¹ ; 15,0 µg.mL ⁻¹ e 30,0 µg.mL ⁻¹) e nanopartículas de palmitato de metila carregadas com curcumina (3,5 µg.mL ⁻¹ ; 7,5 µg.mL ⁻¹ ; 15,0 µg.mL ⁻¹ e 30,0 µg.mL ⁻¹), por 30 min de incubação em tampão fosfato salino (TFS) 10,0 mmol.L ⁻¹ , pH 7,4, à 37°C..... | 105 |
| Figura 38 – Atividade antifúngica da curcumina livre (7,5 µg.mL ⁻¹ ; 15,0 µg.mL ⁻¹ ; 30,0 µg.mL ⁻¹ ; 50,0 µg.mL ⁻¹ ; 65,0 µg.mL ⁻¹) e nanopartículas de palmitato de metila sem e com curcumina (7,5 µg.mL ⁻¹ ; 15,0 µg.mL ⁻¹ ; 30,0 µg.mL ⁻¹ ; 50,0 µg.mL ⁻¹ ; 65,0 µg.mL ⁻¹), frente unidades formadoras de colônias de: a) <i>Candida albicans</i> 10231 VITROIDS™; b) <i>Candida albicans</i> ; c) <i>Candida parapsilosis</i> e d) <i>Candida glabrata</i> | 108 |
| Figura 39 - Perfil da variação da solubilidade da curcumina: suspensão de curcumina (25,0 mg.mL ⁻¹) em tampão fosfato salino (TFS) 10,0 mmol.L ⁻¹ , pH 7,4 (A); solução de curcumina (25,0 mg.mL ⁻¹) em etanol (99,5 %) (B) e solução | |

| | |
|--|-----|
| de nanopartículas de palmitato de metila contendo curcumina (25,0 mg.mL ⁻¹) em tampão fosfato salino (TFS) 10,0 mmol.L ⁻¹ , pH 7,4 (C)..... | 111 |
| Figura 40 - Atividade hemolítica da curcumina solubilizada em tampão e etanol (20,0 µg.mL ⁻¹); etanol puro (20,0 µg.mL ⁻¹); controle tampão 20,0 µg.mL ⁻¹ e nanopartículas vazias e carregadas (20,0 µg.mL ⁻¹) sob modelo de hemólise por 24 horas à 37°C | 113 |
| Figura 41 – Cromatogramas de monitoramento de reações múltiplas (MRM) representativos de PI (<i>m/z</i> 306, 95 → 228, 924) e Cur (<i>m/z</i> 367,05 → 216,91) em plasma de ratos..... | 115 |
| Figura 42 – Curva analítica da curcumina em acetonitrila e curcumina em plasma de ratos (área <i>versus</i> concentração de curcumina) nas concentrações de: 10,0; 50,0; 100,0; 200,0; 300,0; 400,0 e 500 ng.mL ⁻¹ | 116 |
| Figura 43 - Inclinação das curvas analíticas da curcumina em plasma e acetonitrila obtidas nas concentrações de: 10,0; 50,0; 100,0; 200,0; 300,0; 400,0 e 500 ng.mL ⁻¹ | 117 |
| Figura 44 -Curvas da concentração plasmática em função do tempo obtidos por administração oral de 50 mg.Kg ⁻¹ da curcumina livre e nanopartículas carregadas, em ratos (n=6). | 121 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1- Estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> conduzidos com nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo curcumina..... | 30 |
| Tabela 2- Condições cromatográficas para quantificação de curcumina. | 41 |
| Tabela 3 - Condições para quantificação de curcumina no plasma de rato por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial (UPLC/MS-MS). | 53 |
| Tabela 4 - Respostas e matriz do planejamento fatorial completo com superfície de resposta aplicado no desenvolvimento de nanopartículas de palmitato de metila para carregamento da curcumina. | 58 |
| Tabela 5 - Efeitos e seus respectivos erros padrão para as variáveis analisadas no planejamento fatorial completo com superfície de resposta para a resposta diâmetro médio (nm) | 59 |
| Tabela 6 - Efeitos e seus respectivos erros padrão para as variáveis analisadas no planejamento fatorial completo com superfície de resposta para a resposta índice de polidispersão (IPD). | 63 |
| Tabela 7 - Efeitos e seus respectivos erros padrão para as variáveis analisadas no planejamento fatorial completo com superfície de resposta para a resposta eficiência de encapsulação (EE%) | 66 |
| Tabela 8 - Perfil de caracterização físico-química em relação aos parâmetros diâmetro médio (nm), índice de polidispersão (IPD), potencial zeta (mV) e eficiência de encapsulação (EE%) de nanopartículas de palmitato de metila contendo curcumina e livre de curcumina. | 71 |
| Tabela 9 - Dados da análise de regressão linear no nível de 95% de confiança | 76 |
| Tabela 10- Estabilidade das nanopartículas lipídicas de palmitato de metila contendo curcumina em relação aos parâmetros diâmetro médio (nm), índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta (mV), durante um período de cento e cinquenta dias. | 85 |
| Tabela 11 - Número de onda e os respectivos grupos funcionais da amostra curcumina livre | 92 |
| Tabela 12 - Número de onda e os respectivos grupos funcionais da amostra palmitato de metila | 93 |
| Tabela 13 - Parâmetros da calibração da curcumina no solvente e no plasma de ratos | 116 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 14 - Parâmetros de calibração e linearidade da análise da regressão linear para curcumina..... | 118 |
| Tabela 15- Valores obtidos para LD, LQ, repetibilidade, precisão intermediária e exatidão da curcumina em Plasma. | 119 |
| Tabela 16 -Estabilidade da curcumina em plasma de ratos em três condições de armazenamento (n=3)..... | 120 |
| Tabela 17 -Parâmetros farmacocinéticos da curcumina, após administração oral de dose única (50 mg.kg ⁻¹) de suspensão de curcumina livre e nanopartículas lipídicas sólidas contendo curcumina, em ratos (n=6). | 123 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS•+ - Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6- sulfônico
ANOVA - Análise de variância
AUC – Área sob a curva
ASD - Ágar Sabouraud Dextrose
A549 - Células de adenocarcinoma de pulmão
A2780S/A2780CP - Células de câncer de ovário
B16 - Células de melanoma murino
BCS – Sistema de classificação Biofarmacêutica
Bax/Bcl-2 - Proteínas apoptóticas
Brij 78 - Éter octadecílico de eicosatilenol glicol
BxPC-3 - Células de câncer pancreático
CLAE – DAD Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodos
CLN – Carreadores lipídicos nanoestruturados
CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*
CMI – Concentração mínima inibitória
C-myc - Oncogene
Cur – Curcumina
COMEP - Comitê de ética em pesquisa com seres humanos
COX-2 - enzima ciclooxigenase-2
DLS - *Dynamic Light Scattering*
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucleico
Dp - Desvio padrão
DPR – Desvio padrão relativo
DPPH - 2,2–difetil–1–picril–hidrazila
DTA - Análise térmica diferencial
DSC - Calorimetria exploratória diferencial
DRX - Difração de Raios X
DR4 e DR5 - Receptores de membrana plasmática
EE – Eficiência de encapsulação
ERO's – Espécies reativas de oxigênio
EGF - Fator de crescimento epidérmico
EGFR - Receptor do fator de crescimento epidérmico
EPR - *Enhanced permeability and Retention*
FA – Fase aquosa
FGS – Fluido gástrico simulado
FIS – Fluido intestinal simulado
FO – Fase orgânica
FTIR - Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier
FDA - *Food and Drug Administration*
HCC - Células de carcinoma hepatocelular
HPH – *High Pressure Homogenizer*
HepG2 – Células de carcinoma hepatocelular
HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana
IC50 - Metade da concentração inibitória máxima
ICH - *International Conference on Harmonization*
IL – Interleucina

IPD - Índice de polidispersão
IUPAC – União Internacional de química pura e aplicada
KCL – Cloreto de potássio
LD - Limite de detecção
LQ - Limite de quantificação
LH - Linfoma de Hodgkin
MCF-7/ADR - Células de câncer de mama
MDA-MB-231 - Células de câncer de mama
MEV - Microscopia eletrônica de varredura
Mia Paca-2 – Células de câncer pancreático
MOPS – tampão ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico
NaCl – Cloreto de sódio
Np's – Nanopartículas
NCI – *National Cancer Institute*
NLS – Nanopartículas lipídicas sólidas
NO - Óxido nítrico (NO)
NF- KB – Fator nuclear kappa B
O/A – Óleo água
Panc-1 – Células de câncer pancreático
TFS - Tampão Fosfato Salino
PDA - *Photodiode Detector Array*
pH – Potencial hidrogeniônico
P-gp – Glicoproteína P
PC12 - Células das adrenais
PVA – Álcool polivinílico
PCS- 100-020TM - Células endoteliais da artéria
 r – coeficiente de correlação
 R^2 – Coeficiente de determinação
RES – Sistema retículo endotelial
RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
RPM - Rotações por minuto
RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*
STAT 3 - Fator de transcrição
SK-OV-3- Células de adenocarcinoma ovariano
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
TPGS – Succinato de D-tocoferil polietileno glicol
TLR-4 - Proteína inflamatória
UFC' s – Unidades formadoras de colônias
UPLC/MS-MS _ Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial
 $\lambda_{\text{máx}}$ - Máxima absorção
VEGF – Fator de crescimento e angiogênese tumoral
XIAP - Gene antiapoptótico

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|--------------------------------------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 9 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | 11 |
| 2.1 | Curcumina..... | Erro! Indicador não definido. |
| 2.2 | Nanotecnologia farmacêutica e sistemas nanoestruturados | 15 |
| 2.3 | Sistemas nanoestruturados compostos por nanopartículas lipídicas .. | 16 |
| 2.4 | Principais Métodos de obtenção de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS)..... | 23 |
| 2.5 | Nanopartículas lipídicas e lipossomas contendo curcumina | 24 |
| 2.6 | Palmitato de metila..... | 31 |
| 3 | OBJETIVO GERAL | 33 |
| 3.1 | Objetivos específicos | 33 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 35 |
| 4.1 | Materiais: reagentes..... | 35 |
| 4.2 | Equipamentos | 35 |
| 5 | METODOLOGIA | 38 |
| 5.1 | Otimização do protocolo para obtenção de nanopartículas lipídicas de palmitato de metila contendo curcumina | 38 |
| 5.2 | Obtenção das nanopartículas lipídicas sólidas com e sem curcumina | 38 |
| 5.3 | Determinação de diâmetro médio e índice de polidispersão (IPD) | 40 |
| 5.4 | Potencial Zeta | 40 |
| 5.5 | Determinação da eficiência de encapsulação (EE) da curcumina | 41 |
| 4.6.1 | Linearidade..... | 42 |
| 4.6.2 | Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)..... | 42 |
| 5.6 | Avaliação da estabilidade do sistema nanoestruturado | 43 |
| 5.7 | Microscopia eletrônica de varredura (MEV) | 44 |
| 5.8 | Difratometria de raios X (DRX)..... | 45 |
| 5.9 | Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de fourier (FTIR)..... | 45 |
| 5.10 | Análise térmica..... | 45 |
| 5.11 | Caracterização do perfil de liberação da curcumina em TFS e fluido Gastrointestinal simulado (FGS/FIS)..... | 46 |
| 4.12. 1 | Teste de solubilidade da Cur..... | 46 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.12.2 | Ensaio de liberação em TFS (pH 7,4) | 47 |
| 4.12.3 | Ensaio do perfil de liberação gastrointestinal simulado | 47 |
| 5.12 | Estudo de atividade antioxidante sobre radical ABTS ^{•+} | 48 |
| 5.13 | Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de diluição em caldo do CLSI..... | 49 |
| 5.14 | Avaliação da citotoxicidade da curcumina e nanopartículas sobre hemácias – ensaio <i>ex vivo</i> | 50 |
| 4.15. 1 | Preparação das Hemácias | 50 |
| 4.15.2 | Atividade citotóxica <i>ex vivo</i> sobre hemácias. | 51 |
| 5.15 | Análise Estatística | 51 |
| 5.16 | Estudo Farmacocinético..... | 52 |
| 5.16.1 | Desenvolvimento e validação do método analítico para detecção da cur em plasma de rato..... | 52 |
| 5.16.2 | Estudo Farmacocinético da curcumina e nanopartículas lipídicas sólidas de palmitato de metila contendo curcumina em ratos | 56 |
| 6 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 58 |
| 6.1 | Obtenção de Nanopartículas de palmitato de metila para carreamento da CUR por delineamento fatorial completo com superfície de resposta | 58 |
| 6.2 | Parâmetros físico–químicos: Diâmetro médio; índice de polidispersão e potencial zeta | 70 |
| 6.3 | Avaliação da Linearidade; LD e LQ..... | 75 |
| 6.4 | Eficiência de encapsulação (EE%) | 78 |
| 6.5 | Testes de estabilidade do sistema nanoestruturado de palmitato de metila mantido em suspensão..... | 79 |
| 6.6 | Testes de estabilidade do sistema nanoestruturado de palmitato de metila após liofilização | 84 |
| 6.7 | Microscopia eletrônica de varredura (MEV) | 87 |
| 6.8 | Difratometria de raios X (DRX)..... | 89 |
| 6.9 | Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de fourier (FTIR)..... | 91 |
| 6.10 | Análise térmica..... | 95 |
| 6.11 | Perfil de liberação <i>in vitro</i> da cur a partir das nanopartículas lipídicas sólidas em TFS | 101 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 6.12 | Perfil de liberação <i>in vitro</i> da cur a partir das nanopartículas lipídicas sólidas nos FGS e FIS. | 103 |
| 6.13 | Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antioxidante sobre um modelo de geração de ABTS ^{•+} | 105 |
| 6.14 | Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antifúngica das NLS frente <i>Candida albicans</i> 10231 Vitroids™ E CEPAS CLÍNICAS (<i>C. albicans</i> ; <i>parapsilosis</i> e <i>glabrata</i>) | 107 |
| 6.15 | Avaliação da atividade citotóxica sobre hemácias | 112 |
| 6.16 | Farmacocinética da curcumina e das nanopartículas | 114 |
| 6.16.1 | Validação do método analítico | 114 |
| 6.17 | Avaliação dos parâmetros farmacocinéticos após administração oral de dose única em ratos | 121 |
| 7 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 126 |
| 8 | CONCLUSÃO | 128 |
| 9 | BIBLIOGRAFIA | 129 |
| 10 | ANEXOS | 159 |

1 INTRODUÇÃO

A curcumina (Cur) é um polifenol de característica hidrofóbica e coloração amarelo-alaranjado, extraído do rizoma da *Curcuma longa*, uma planta herbácea da família do gengibre, endêmica da Ásia (KUNNUMAKKARA et al., 2017; RAUF et al., 2018).

Entre as suas propriedades medicinais, apontam-se: antimicrobiana (ZHENG et al., 2020); anti-inflamatória (PENG et al., 2019); antifúngica (KIM et al., 2017); antiviral (MATHEW; HSU, 2018); antioxidante (KARIMI et al., 2018) e anticancerígena (MARIN et al., 2017; PASTORELLI et al., 2018; ABDELAZIZ; FREAG; ELZOGHBY, 2019).

De fato, estudos de fase I e II relataram a eficácia terapêutica da Cur em tratamentos de: dermatites oriundas de radioterapia (RYAN et al., 2013); câncer pancreático (DHILLON et al., 2008); leucoplasia (KURIAKOSE et al., 2016) e neoplasia cervical (GATTOC et al., 2016). Além disso, pesquisas indicam que a administração oral da Cur demonstrou tolerabilidade e perfil de segurança adequados para consumo humano (CHOI et al., 2019; EATON et al., 2019).

Porém, apesar da sua ampla ação terapêutica, a Cur apresenta algumas limitações para o seu efetivo uso clínico: i) baixa biodisponibilidade após ingestão oral; ii) rápido metabolismo; iii) alta taxa de eliminação e iv) baixa solubilidade e estabilidade em soluções aquosas (SURESH; NANGIA, 2018; SLIKA; PATRA, 2020).

Essas barreiras podem ser transpostas através da nanotecnologia farmacêutica, via desenvolvimento de sistemas nanoestruturados, compostos por polímeros biodegradáveis e atóxicos, que possam ser utilizados como carreadores da Cur, com objetivo de potencializar sua eficácia terapêutica por meio da modificação das suas propriedades físico-químicas (MURTHY et al., 2018; NASERY et al., 2020).

Segundo Patil et al. (2018) e Hajjalyani et al. (2018) esses sistemas contribuem com inúmeras vantagens: liberação prolongada do fármaco com doses concentradas no sítio alvo específico, pelo efeito de permeabilidade e retenção aumentadas, melhorando o índice terapêutico e reduzindo a

possibilidade de efeitos tóxicos. Além disso, promovem aumento da solubilidade e biodisponibilidade e protegem o fármaco frente degradação nos fluidos fisiológicos (TALEGAONKAR; BHATTACHARYYA, 2019).

Entre esses nanossistemas, destacam-se as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), caracterizadas pela presença de um núcleo lipídico sólido (MULLER, RADTKE e WISSING 2002). São consideradas veículos promissores para aprimorar as propriedades farmacêuticas de moléculas hidrofóbicas, como a Cur, pois possibilitam maior alcance terapêutico via aumento da solubilidade (IPAR; DSOUZA; DEVARAJAN, 2019; BAN et al., 2020).

Corroborando o exposto acima, Gaur et al. (2015); Wang et al. (2017) e Malvajerd et al. (2018), através de estudos farmacocinéticos com NLS contendo Cur, demonstraram aumento da biodisponibilidade via acréscimo da concentração plasmática e tempo médio de residência da Cur, quando essa foi veiculada nas NLS.

Destarte, a Cur foi selecionada, uma vez que, apesar da sua comprovada ação biológica, possui limitações farmacocinéticas, por ser uma molécula com reduzida solubilidade em água e baixa biodisponibilidade (condições interessantes para a nanoencapsulação). Com efeito, a possibilidade de usar a nanotecnologia farmacêutica para aperfeiçoar a eficácia terapêutica da Cur pode ser uma alternativa para agregar valor a um produto amplamente comercializado e de grande interesse medicinal.

Deve-se destacar também que até o momento da definição do trabalho, não foram encontrados relatos na literatura científica da associação da Cur com o lipídio utilizado para o desenvolvimento do sistema, o palmitato de metila e, portanto, a presente pesquisa propõe o desenvolvimento e a caracterização de um inovador sistema nanoestruturado lipídico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

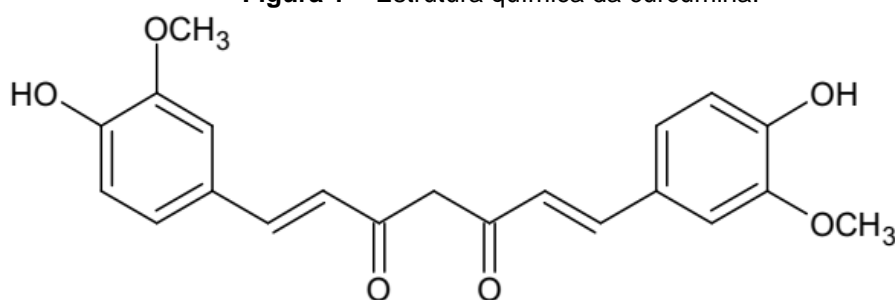
2.1 CURCUMINA

A Cur é extraída da planta *Curcuma longa* e possui diversas propriedades biológicas, sendo dessa forma, um importante agente terapêutico para várias doenças humanas (FOROUZANFAR et al., 2019).

Muitos estudos têm demonstrado seus benefícios medicinais, entre os quais: antiviral (BALASUBRAMANIAN et al., 2019); imunomoduladora (SHEGOKAR, 2018); anti-inflamatória (GHANDADI; SAHEBKAR, 2017; KARIMIAN et al., 2017); tratamento de doenças neurológicas (ZHANG et al., 2018); hepáticas (ZABIHI et al., 2017); respiratórias (LELLI et al., 2017); efeitos antioxidante (PANAHI et al., 2015; BOROUMAND; SAMARGHANDIAN; HASHEMY, 2018) e anticâncer (MIRZAEI et al., 2016; THORNTHWAITE et al., 2017; KOUHPEIKAR et al., 2019).

Em relação as suas características, é um pigmento de cor amarelo-alaranjado brilhante, sensível à luz, instável em soluções fisiológicas neutras a básicas (PRASAD et al., 2014; HEWLINGS; KALMAN, 2017) e sua estrutura química foi definida por Milobedzka, Kostanecki e Lampe em 1910 como [1,7-bis(hidroxi-3-metoxifenil),1,6-heptadieno-3,5-diona], sendo quimicamente uma bis- α - β -insaturada β -dicetona (Figura 1).

Figura 1 – Estrutura química da curcumina.



Fonte: Imagem editada pela autora no programa Chems sketch.

Observações experimentais demonstraram que a polaridade do solvente no qual a Cur está solubilizada interfere no comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{m\acute{a}x}$), sendo assim, ao se alterar a polaridade do solvente, observa-

se o efeito solvatocrômico. Dessa forma, a Cur apresenta-se de cor vermelha em metanol e amarela em etanol e diclorometano. Ademais, ao se alterar o pH da solução, a Cur apresenta tautomerismo ceto-enólico, no qual a molécula assume a forma ceto em soluções ácidas à neutras (pH 3,0 a 7,0) e enólica acima de pH 8,0 (SHARMA; GESCHER; STEWARD, 2005; PRIYADARSINI, 2013; SUETH-SANTIAGO et al., 2015).

A expressiva atividade antioxidante da Cur parece estar relacionada ao mecanismo explicado acima, conforme descrito por Jovanovic et al., (2001). Nesse estudo, foi observado a existência de um equilíbrio ceto-enólico, deslocado preferivelmente para o sentido enol, em razão da presença da ligação de hidrogênio intramolecular, além da maior planaridade da molécula, o que por sua vez, favorece a conjugação da cadeia carbônica.

De acordo com os autores acima, a Cur apresenta baixa solubilidade em soluções aquosas básicas e, nessas circunstâncias ocorre a retirada de um próton ácido, gerando uma espécie carregada negativamente, assim a base conjugada da Cur deve funcionar como doador de elétrons, contudo, em soluções básicas a molécula é facilmente degradada. A forma cetônica (1,3-dicetônica) é de suma importância para as propriedades antioxidantes da Cur, pois nessa subunidade há um metileno com deficiência de elétrons, o que a torna um excelente doador de hidrogênio.

Dessa forma, há um consenso que a atividade antioxidante da Cur é atribuída às duas subunidades estruturais: o metileno α às carbonilas e as hidroxilas fenólicas, sendo que ambos os casos, há estabilização do radical formado por ressonância e doação de hidrogênio radicalar, o qual reage com espécies reativas de oxigênio (ERO's), assegurando a capacidade antioxidante da Cur (SHARMA; GESCHER; STEWARD, 2005; ANAND et al., 2008).

Segundo Lin e Lin-shiau (2001), a Cur é um dos produtos naturais mais utilizados em pesquisas contra o câncer, eleita pelo *National Cancer Institute* (NCI) como agente quimiopreventivo de terceira geração, ou seja, a mais recente, além disso, seu uso é aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) e, portanto, atualmente vários esforços estão sendo feitos para melhorar a sua eficácia terapêutica.

Além disso, o RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS- incluiu a *Curcuma longa* entre as plantas medicinais aprovadas pelo governo e distribuídas pelo SUS (BRASIL, 2009).

Em consonância o exposto acima e, partindo do pressuposto que o câncer é em suma decorrente da desregulação de inúmeras vias de sinalização do ciclo celular, muitos autores corroboram o argumento de que, muito possivelmente, a Cur é um propício agente antitumoral com atividade protetiva ao desenvolvimento da doença devido a grande inter-relação estabelecida entre os seus efeitos biológicos e a sua propriedade antioxidante (KOCAADAM; ŞANLIER, 2015; HEWLINGS; KALMAN, 2017; FARZAEI et al., 2018).

Nesse contexto, alguns autores têm relatado a atividade anticancerígena da Cur encapsulada por formulações lipídicas contra células tumorais de pulmão (WANG et al., 2013); mama (BHATT et al., 2018; WANG et al., 2018a); cerebral (MAITI et al., 2019) e sistema linfático (GUORGUI et al., 2018).

De fato, a Cur não só é capaz de agir sobre vários alvos moleculares envolvidos na gênese da mutação, na multiplicação celular desregulada, mas também na progressão dos canceres, via modulação e ou inibição dos fatores de crescimento; de transcrição; enzimas quinases e proteínas citocinas inflamatórias (SCHWERTHEIM et al., 2017; BACHMEIER; KILLIAN; MELCHART, 2018).

Contudo, a Cur apresenta um dualismo peculiar, pois apesar da mesma possuir um vasto conjunto de aplicações biológicas, há dificuldades voltadas para seu uso terapêutico e ou como nutracêutico, seja em alimentos e ou bebidas funcionais, uma vez que, essa molécula além de fotossensível, possui limitações físicas, como baixa solubilidade; químicas, como instabilidade em soluções fisiológicas (CHEN et al., 2014, MARIN et al., 2017) e farmacocinéticas como baixa absorção e biodisponibilidade (CHUAH et al., 2014).

Como o postulado pelo Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS), o qual inclui a Cur como substância de classe IV, baixa solubilidade e permeabilidade, (Wang et al., 2017), sugere-se que sua absorção oral seja afetada por diferentes faixas de pH e, além disso, a mesma apresenta

instabilidade em fluidos intestinais, fatores os quais limitam o seu avanço clínico.

De fato, constata-se que após administração oral, a maior parte da Cur é excretada via fezes (Liu et al., 2016) e ou urina (Heath et al., 2003) e assim, apenas pequenas quantidades são detectadas no plasma sanguíneo (Yan et al., 2007).

Aliado a esses fatores, a farmacocinética da Cur é influenciada pela atividade da glicoproteína P (P-gp). Essa proteína transportadora de membrana é responsável pelo efluxo ativo da molécula, o que por sua vez, ocasiona uma rápida depuração metabólica e conseqüentemente baixa biodisponibilidade da Cur nos fluidos intracelulares (PUNFA et al., 2012, LOPES-RODRIGUES et al., 2017).

Bianchi et al. (2018) testaram *in vivo* a ação anticâncer (melanoma murino B16) da Cur. Nos ratos tratados com Cur houve redução significativa do crescimento tumoral. Além disso, esse polifenol foi capaz de inibir a atividade da enzima mitocondrial ATP sintase, o que comprometeu o metabolismo energético do tumor, e devido a geração de (ERO's) foi observado um efeito apoptótico na viabilidade celular de B16.

Contudo, apesar do efeito antimutagênico da Cur, Mendonça et al. (2009) relataram genotoxicidade *in vitro*, na qual $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de Cur teve efeito genotóxico superior ao controle, pois induziu mais mutações do que as observadas nas células das adrenais (PC12) não tratadas com Cur.

Nesse cenário, o mercado nanotecnológico tem ganhado muito interesse, pois requer menor investimento do que a descoberta de uma nova molécula, dado que os sistemas nanoestruturados são veículos de entrega prolongada e controlada de compostos com propriedades terapêuticas (FONTANA et al., 2016; QIU et al., 2017).

Diante disso, para contornar esse e outros problemas relacionados às propriedades físico-químicas da Cur, é possível o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados, os quais promovem liberação controlada de compostos ativos encapsulados. Esses sistemas têm potencial de minimizar a toxicidade e efeitos colaterais, diminuir a frequência de administração e aumentar o efeito

terapêutico no sítio alvo (ZHANG et al., 2007; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010 e LIM; CHUNG; CHUNG, 2018).

Com isso, cabe evidenciar o papel da nanotecnologia farmacêutica, via criação de sistemas de transporte que consigam encapsular e vetorizar moléculas, como a Cur, com intuito de aprimorar sua ação terapêutica, proteger contra a degradação nos fluidos gastrointestinais, além de aperfeiçoar a absorção e biodisponibilidade via liberação prolongada e em concentração fisiologicamente segura.

2.2 NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA E SISTEMAS NANOESTRUTURADOS

Várias doenças são tratadas com uso de fármacos que não só podem apresentar efeitos colaterais, mas também, acabam sendo responsáveis por um mecanismo de seleção natural de microrganismos resistentes. Dessa forma, há um grande desafio frente à criação de novas terapias que garantam a liberação específica do composto ativo no sítio alvo de células infectadas, além da possibilidade de maior contato entre o fármaco e o antígeno (MOSELHY et al., 2018).

Nesse contexto, destaca-se o papel da nanotecnologia farmacêutica aplicada ao desenvolvimento de nanopartículas (np's) a partir de polímeros sintéticos e ou naturais, para a entrega não só controlada e sustentada de medicamentos, mas também, direcionada a alvos específicos, aumentando dessa forma a eficácia terapêutica, biodisponibilidade e estabilidade do composto ativo (GAO et al., 2014; WICKI et al., 2015).

O termo np's se refere às partículas que apresentam características peculiares, tais como: tamanho reduzido (50-1000 nm) e elevada proporção entre área superficial e seu volume permitindo alcançar áreas inacessíveis por moléculas convencionais (MOSTAFAVI; SOLTANTABAR; WEBSTER, 2019).

Verifica-se que o uso de sistemas nanoestruturados consiste em uma promissora estratégia para carrear drogas e ou macromoléculas entre as quais: produtos naturais, hormônios, enzimas, vacinas e ácidos nucleicos, sendo

dessa forma, uma alternativa para transpor os problemas farmacocinéticos e farmacodinâmicos presentes nas formulações convencionais (SIDDIQUI et al., 2009).

Em relação à natureza das np's, sabe-se que dependendo do método preparação é possível obter nanoesferas, nas quais o composto se encontra disperso e ou adsorvido na superfície, ou nanocapsulas, nas quais o produto encapsulado se encontrará aprisionado no núcleo envolvido pela parede do polímero. Com relação à composição das np's, apesar da matriz polimérica ser habitualmente a mais utilizada, há ainda, aquelas que são feitas com outros materiais tais como lipídios (REIS et al., 2006; ALEXIS et al., 2008; RASHID; AHMAD; TAJUDDIN, 2019).

Um dos objetivos a ser alcançado com o desenvolvimento de np's é promover liberação sustentada do material encapsulado, permitindo maior permanência da molécula no corpo, além é claro de melhorar a biodistribuição devido à maior absorção do composto (GHOSH et al., 2013, RAJENDRAN et al., 2013). Ressalta-se ainda que esses sistemas utilizam polímeros atóxicos, biocompatíveis e biodegradáveis (BAMRUNGSAP et al., 2012, PARHI; MOHANTY; SAHOO, 2012).

Além dessas vantagens supracitadas, destaca-se que as np's permitem proteção do composto encapsulado contra possíveis instabilidades de pH no organismo; possibilidade de incorporação de substâncias hidrofílicas e lipofílicas; manutenção dos níveis plasmáticos em concentrações constantes e, dessa forma, diminuição da dose terapêutica e do número de administrações do medicamento. Em suma, enfatiza-se que as np's permitem melhoras farmacocinéticas e farmacológicas dos compostos encapsulados (ALEXIS et al., 2008; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

2.3 SISTEMAS NANOESTRUTURADOS COMPOSTOS POR NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS

Entre os nanocarreadores utilizados para aumentar a absorção e, conseqüentemente assegurar maior biodisponibilidade oral de fármacos e ou

compostos pouco solúveis em água, podemos citar a aplicação dos lipossomas e as np's lipídicas (MARTINS et al., 2007).

Basicamente a diferença entre lipossomas e np's lipídicas é a característica estrutural, sendo que, no primeiro caso há fluidez, enquanto que por outro lado, as np's apresentam pouco ou nenhuma fluidez caracterizada pela presença de núcleo sólido (MULLER, RADTKE e WISSING 2002).

O uso de lipídios em sistemas nanoestruturados favorece a absorção oral do composto encapsulado, via assimilação pelos enterócitos intestinais e captação seletiva pelo sistema linfático, pois há associação com lipoproteínas presentes nesse sistema. Dessa forma, as np's atingem à circulação sistêmica mediante o ducto linfático torácico, o que por sua vez, reduz o metabolismo de primeira passagem, garantindo por tempo prolongado maior concentração plasmática do componente ativo (CHARMAN 2000; PORTER 2001; YAO, XIAO e MCCLEMENTS 2014; BAEK e CHO, 2017 e OBINU et al., 2021)

O uso desses sistemas inclui inúmeras vantagens, entre as quais destacam-se: biocompatibilidade pela existência fisiológica de lipídios nas membranas biológicas; biodegradabilidade; baixa toxicidade e imunogênicidade; protegem o composto contra o catabolismo enzimático *in vivo* e podem ser produzidos em escala industrial (KRAFT et al., 2014).

Por outro lado, de acordo com Dwivedi et al. (2014), há uma desvantagem na utilização de sistemas lipídicos, intrínseca ao uso dos lipossomas, que incluem curto tempo de prateleira devido sua baixa estabilidade e possível remoção pelo sistema retículo-endotelial (RES). Contudo, de acordo com Das e Chaudhury (2010), no caso das nanopartículas com diâmetro entre 120 a 200 nm, raramente há depuração via RES.

Os lipossomas foram os primeiros carreadores de natureza lipídica a ser desenvolvidos, o termo sugere que tais estruturas são constituídas de moléculas fosfolipídicas dispostas em vesículas esféricas com uma cavidade aquosa circundada por uma ou mais bicamadas de membranas anfipáticas contíguas (HUA; WU, 2013, MONTEIRO et al., 2014).

Em função dessa organização, os sistemas lipossômicos podem atuar no carregamento de moléculas hidrofílicas e ou lipofílicas, em razão das moléculas hidrofílicas serem aprisionadas no centro aquoso enquanto que, as

hidrofóbicas serão inseridas na membrana da bicamada. Ademais, são potenciais agentes em aplicações terapêuticas, uma vez que, melhoram a biodistribuição dos compostos encapsulados e, ainda podem promover liberação controlada de diferentes fármacos em tecidos alvos específicos (ALLEN; CULLIS, 2013, COLE; HOLLAND, 2015).

Já as np's lipídicas, podem ser classificadas em nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) de primeira geração e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) de segunda geração. A primeira classe é derivada de emulsões óleo em água (O/A) por substituição do óleo por um lipídio sólido. Já a segunda classe, compreende uma mistura de lipídios sólidos e líquidos (óleos) à temperatura ambiente (JORES et al., 2004, PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009).

As NLS e CLN foram desenvolvidas na década de 90 como veículos substitutos principalmente para os lipossomas, pois em relação a esses, as np's lipídicas possuem maior estabilidade e liberação prolongada (NASERI; VALIZADEH; ZAKERI-MILANI, 2015). Ambas podem ser empregadas na aplicação de medicamentos por diferentes vias de administração: dérmica, pulmonar, oral e parenteral (SHASTRI, 2018).

As NLS são caracterizadas por conter um núcleo lipídico sólido e são estabilizadas por tensoativos como Tween e álcool polivinílico (PVA) em dispersão aquosa. São capazes de vetorizar moléculas lipofílicas e hidrofílicas, sendo consideradas promissoras carreadoras de diferentes fármacos, pois essa matriz lipídica sólida é capaz de proteger as substâncias encapsuladas contra degradações e melhorar sua passagem através de barreiras fisiológicas (WEBER; ZIMMER; PARDEIKE, 2014).

Adicionalmente, entre as vantagens adquiridas pelo uso das NLS estão: excelente tolerabilidade devido sua biocompatibilidade, baixa toxicidade e facilidade de transposição do método de produção à escala industrial (MULLER; SHEGOKAR; KECK, 2011).

Contudo, podem apresentar baixa taxa de incorporação do composto a ser encapsulado em função da completa cristalinidade da matriz, ou seja, formação de estruturas muito ordenadas, nas quais há pouco espaço para a retenção do composto com possibilidade de rápida expulsão da droga, devido às transições entre as formas polimórficas e estrutura cristalina do lipídio, além

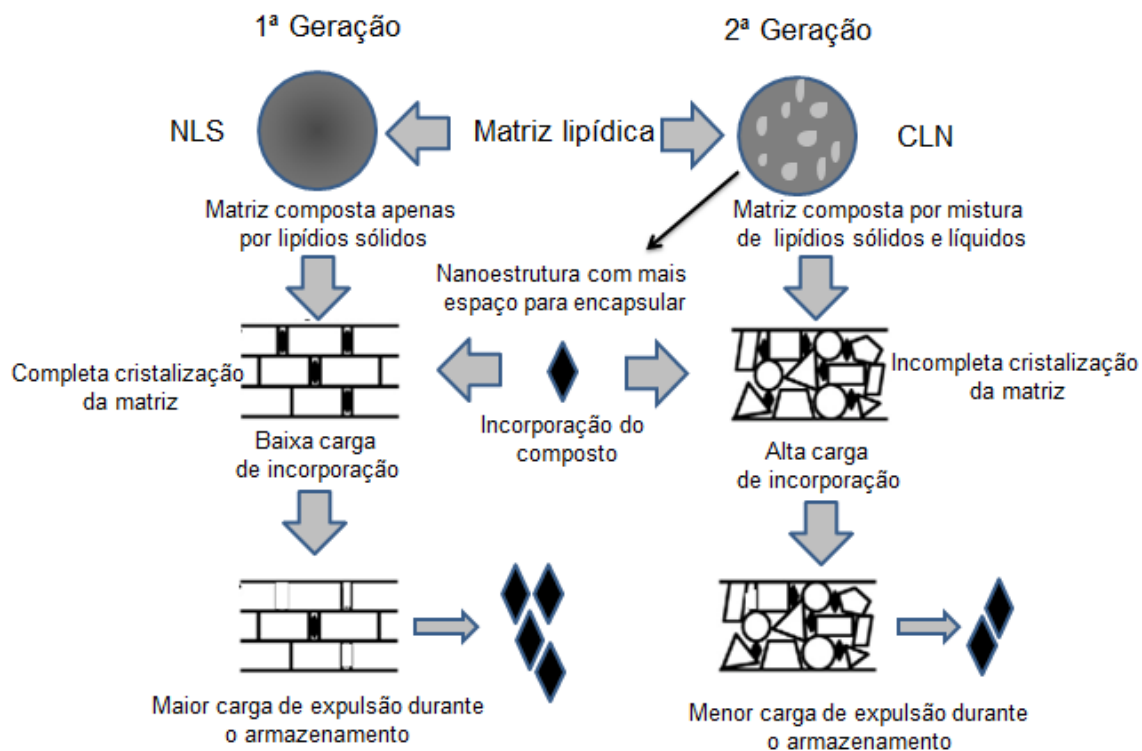
da imprevisível tendência a gelificação devido ao sobreaquecimento gerado na preparação (DAS; CHAUDHURY, 2010; SINHA et al., 2010; ANDONOVA; PENEVA, 2018).

Em relação ao polimorfismo das NLS, esse fenômeno pode ocorrer durante o armazenamento, devido a transição das formas cristalinas dos lipídios, sendo que a forma α (hexagonal) é menos instável em relação as formas β (triclínica) e β' (ortorrômbica). Essa transformação pode levar a formação de uma matriz lipídica com menos espaço para armazenamento e consequente expulsão do composto ativo (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002; SOUTO e MULLER, 2011).

Para transpor essas barreiras, foram desenvolvidos os CLN, os quais diferem das NLS pela composição da matriz, pois para a produção das CLN utiliza-se uma mistura de lipídios sólidos e líquidos, cujo ponto de fusão deve ser igual ou superior a 40°C, promovendo uma cristalização incompleta, ou seja, uma matriz lipídica menos ordenada. Com isso, torna-se possível incorporar uma maior carga do composto, diminuir as perdas do conteúdo durante o armazenamento e melhorar a estabilidade do sistema (TEERANACHAIDEEKUL; MULLER; JUNYAPRASERT, 2007, DAS; NG; TAN, 2012).

Na Figura 2, podemos observar as principais diferenças estruturais entre as NLS e CLN com relação à matriz lipídica, carga de incorporação e perda do composto.

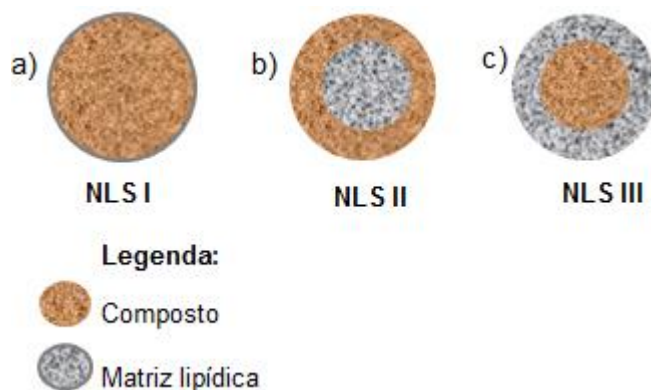
Figura 2 – Principais diferenças estruturais entre nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN)



Fonte: Adaptado de Weber, Zimmer e Pardeike (2014).

No que diz respeito à incorporação dos compostos e a morfologia das NLS, Muller, Mader e Gohla (2000); Mehnert e Mader (2012) destacam a existência de três modelos teóricos (Figura 3), baseados principalmente na composição, ou seja, natureza química do bioativo encapsulado e técnica de produção.

Figura 3 – Modelos teóricos para os três tipos de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) com relação a estrutura da matriz e incorporação do composto ativo



Fonte: adaptado de Naseri, Valizadeh e Zakeri-milani (2015).

O tipo I, Figura 3a, é designado como matriz homogênea, na qual o composto encapsulado é muito lipofílico e está disperso no núcleo da partícula ou presente em aglomerados amorfos. São preparadas por homogeneização a alta pressão (*HPH - High Pressure Homogenizer*) a quente ou frio e nesse modelo o composto pode exibir liberação prolongada (MEHNERT e MADER 2012).

Já o modelo II, Figura 3b, é designado como parede de substância ativa, com um invólucro exterior enriquecido com o composto ativo que cobre o núcleo lipídico. As partículas são obtidas ao se aplicar a HPH a quente. Desse modo, haverá uma separação das fases durante o processo de resfriamento, no qual o lipídio precipitará antes do composto, formando NLS enriquecidas com moléculas na camada externa das partículas. Esse tipo de NLS é formado quando a concentração da substância ativa é baixa no lipídio fundido (NASERI; VALIZADEH; ZAKERI-MILANI, 2015).

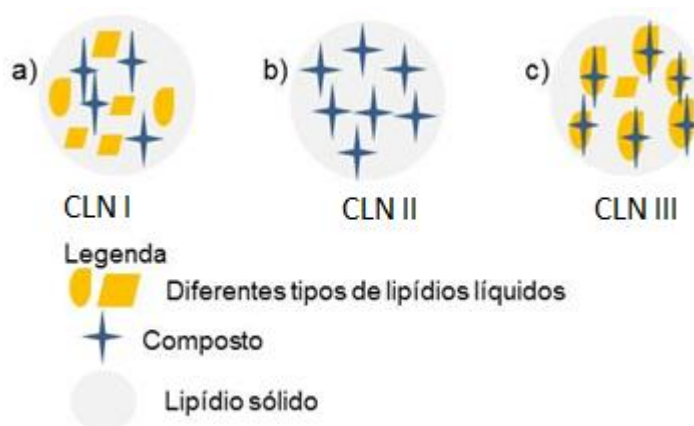
Wissing e Müller (2002) afirmam que esse modelo consiste em uma estratégia interessante para ser utilizado em formulações visando administração tópica por exibirem uma liberação rápida e imediata e, dessa forma, aumentar a biodisponibilidade e penetração da substância.

E por fim, o modelo III (Figura 3c), chamado de núcleo de substância ativa, possui estrutura inversamente ao encontrado no modelo II, uma vez que, o composto ativo precipita primeiro e assim a camada lipídica em torno deste

núcleo terá menos droga. Essa configuração também é formada por HPH a quente, porém a quantidade do composto ativo solubilizada no lipídio se encontra na sua concentração de saturação ou muito próxima a essa condição (MOHAMMADI-SAMANI; GHASEMIYEH, 2018).

Com relação aos modelos dos CLN, podemos encontrar três tipos de organização: (I) tipo imperfeito, (II) tipo amorfo e (III) tipo múltiplo, esquematizadas na Figura 4 (MULLER; SHEGOKAR; KECK, 2011, JAGDEVAPPA et al., 2013). As técnicas de produção de CLN são semelhantes às da NLS, com destaque para a HPH a quente ou a frio (BATTAGLIA; GALLARATE, 2012, SEVERINO; SANTANA; SOUTO, 2012).

Figura 4 - Modelos teóricos para os três tipos de carreadores lipídicos nanoestruturados com relação à estrutura da matriz e incorporação do composto ativo



Fonte: Adaptado de Naseri, Valizadeh e Zakeri-milani (2015).

No caso I, Figura 4a, utilizam lipídios sólidos com pequenas quantidades de lipídios líquidos, promovendo uma mistura de cadeias longas e curtas, levando a cristalização desordenada e imperfeições da matriz. Dessa forma, verifica-se a formação de lacunas entre as cadeias de ácidos graxos e conseqüentemente haverá mais espaço para encapsulação dos compostos (JAISWAL; GIDWANI; VYAS, 2014).

No tipo II, Figura 4b, as partículas são sólidas de estrutura amorfa, não cristalina, uma vez que durante o resfriamento a cristalização é evitada, misturando lipídios e, dessa forma, há menos liberação do composto encapsulado (TAMJIDI et al., 2013).

No último modelo, Figura 4c, os CLN também são constituídos por uma mistura de lipídios, porém a solubilidade das moléculas do lipídio líquido no lipídio sólido é excedida, ocasionando uma separação das fases e formação de gotículas oleosas dentro da matriz lipídica sólida. Observa-se nesse modelo, um aumento da capacidade de incorporação de substâncias ativas solúveis em óleos do que nos lipídios sólidos. (MULLER; RADTKE; WISSING, 2002).

2.4 PRINCIPAIS MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS (NLS)

Entre os métodos de obtenção das NLS, destacam-se HPH (quente ou a frio) e a ultrasonicação. Porém é possível obter NLS por outros meios de produção: emulsificação evaporação do solvente, fluidos supercríticos, microemulsão, inversão de fases e emulsificação difusão do solvente (BATTAGLIA; GALLARATE, 2012, YOON; PARK; YOON, 2013, NASERI; VALIZADEH; ZAKERI-MILANI, 2015, ANDONOVA; PENEVA, 2018).

A HPH (quente ou a frio), envolve a incorporação do fármaco no lipídio solubilizado ou previamente fundido (UNER, 2006, WEISS et al., 2008). O termo alta pressão (100-2000 bar) descreve a tensão e a alta velocidade (cerca de 100 km/h), pela qual o fluido será impulsionado a mover-se por uma estreita cavidade denominada *gap* do equipamento até o encontro de uma barreira e essa colisão possibilitará a formação de np's com estreita faixa de diâmetro (TAMJIDI et al., 2013).

A homogeneização à quente é indicada para moléculas lipofílicas e é realizada a temperatura acima do ponto de fusão do lipídio, enquanto a homogeneização à frio é preferida para drogas hidrofílicas solubilizadas ou dispersas, com auxílio de tensoativos, no lipídio fundido e posteriormente deve-se concluir com o resfriamento utilizando gelo seco ou nitrogênio líquido (SHIRODKAR et al., 2019).

Com relação à ultrasonicação, também conhecida por homogeneização por cisalhamento, tem-se o fenômeno de cavitação pela formação de microbolhas que causam a quebra das partículas. Nessa técnica, a fase

orgânica (lipídio) será dispersa na fase aquosa constituída por tensoativo. Porém, observa-se que, as np's formadas nem sempre possuem uma estreita distribuição de tamanhos, o que por sua vez, pode levar a instabilidade durante o armazenamento (MEHNERT; MÄDER, 2012).

Tanto a homogeneização a alta pressão, quanto a ultrassonicação são técnicas utilizadas pela nanotecnologia farmacêutica para obtenção de NLS e CLN como veículos de entrega e aperfeiçoamento das propriedades terapêuticas de diferentes compostos (GANESAN; NARAYANASAMY, 2017).

2.5 NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS E LIPOSSOMAS CONTENDO CURCUMINA

Aponta-se que os sistemas nanoestruturados lipídicos podem ser elaborados para transpor as limitações farmacocinéticas da Cur, conforme demonstrado por Peng et al. (2018), que conseguiram por meio de NLS aumentar a biodisponibilidade da Cur *in vivo*. Segundo os autores, esse fato é explicado devido a maior bioacessibilidade da Cur encapsulada em relação ao composto livre.

Ramalingam, Yoo e Ko (2016) desenvolveram NLS revestidas com quitosana para carreamento da Cur, as quais apresentaram aumento da biodisponibilidade em relação ao composto livre e estabilidade física prolongada durante o armazenamento. Dado semelhante foi obtido por Ban et al. (2020), NLS (revestidas com estearina e polietilenoglicol) apresentaram, *in vitro*, absorção intestinal e, *in vivo*, biodisponibilidade maiores em relação a Cur livre.

Nesses trabalhos, é proposto pelos autores que esses sistemas lipídicos podem ser úteis no que tange à aplicação da Cur em alimentos funcionais, suplementos e ou produtos farmacêuticos, uma vez que, possibilitam maior solubilidade e estabilidade, devido à melhora farmacocinética do composto encapsulado.

Rompicharla et al. (2017) desenvolveram através de um delineamento fatorial NLS com Cur e testaram *in vitro* sua aplicação biológica sob células de

câncer de mama (MDA-MB-231). Em relação ao composto livre, as np's carregadas apresentaram elevada endocitose, maior citotoxicidade, sendo que após 24 horas a viabilidade das MDA-MB-231 foi de apenas 39%. Os autores enfatizam que as NLS vazias não apresentaram atividade significativa e demonstraram que as NLS aumentaram o potencial citotóxico da Cur encapsulado de maneira dependente do tempo de incubação e concentração utilizada.

Nesse estudo, os autores propõem que devido a eficiente internalização das NLS, maiores quantidades de Cur estavam disponíveis nas células, o que por sua vez induziu expressiva apoptose das MDA-MB-231.

Para averiguar o efeito anti-inflamatório da Cur em macrófagos murinos (RAW 264.7), Nahar, Slitt e Seeram (2015) desenvolveram NLS, as quais foram responsáveis por reduzir significativamente os níveis de prostaglandinas e interleucinas, além de inibir a atividade transcricional do fator NF-kB, ligado a doenças inflamatórias e autoimunes. Essas np's demonstraram nesse modelo maior redução dos mediadores pró-inflamatórios em relação ao composto livre.

Um estudo *in vivo* conduzido por Zhao et al. (2015), NLS foram utilizadas para coencapsular doxorrubicina e Cur (np's Cur/Dox), com objetivo de avaliar o efeito dessas sob células de carcinoma hepatocelular (HCC). Esse estudo demonstrou ação sinérgica das np's (Cur/Dox), pois essas aumentaram a produção de proteínas apoptóticas (Caspase/Bax/Bcl-2), além de diminuir a expressão de oncogenes (C-myc) e de fatores ligados ao crescimento e angiogênese tumoral tal como o VEGF.

Cabe ressaltar, que no trabalho referenciado acima, os autores afirmam que a atividade das np's (Cur/Dox) na diminuição do dano hepático foi mais expressiva do que o observado para as np's apenas com (Dox), uma vez que as np's (Cur/Dox) demonstraram maior citotoxicidade, diminuição do IC50 e da resistência à droga, via diminuição da atividade da P-gp de membrana.

Baek e Cho (2017) coencapsularam a Cur e o paclitaxel em NLS conjugadas com folato, para entrega controlada via direcionamento específico às células de câncer de mama MCF-7/ADR, nas quais há superexpressão de receptores para o folato. Esse sistema combinou interessantes vantagens terapêuticas entre as quais: liberação sustentada da Cur e paclitaxel, aumento

da captação celular, devido à internalização mediada por receptor e redução significativa do efluxo das np's via inibição da P-gp, superando dessa maneira, a resistência celular às drogas, além de exibir expressiva atividade citotóxica para linhagem celular MCF-7/ADR.

Segundo Wang et al. (2016a), para assegurar a estabilidade das NLS em condições gastrointestinais simuladas e propor um sistema eficaz para administração oral da Cur, o revestimento das np's com polímeros naturais (caseína e pectina) pode ser uma alternativa. Nesse estudo, as np's revestidas apresentaram alta eficiência de encapsulação, liberação prolongada em fluidos gastrointestinais simulados e estabilidade durante o armazenamento, demonstrando ser um promissor sistema para carreamento da Cur.

De acordo com Guorgui et al. (2018), o tratamento para o linfoma de Hodgkin (LH) ainda exibe alta toxicidade e, portanto, terapias alternativas são necessárias. Nesse trabalho as NLS contendo Cur exibiram *in vivo* efeito antitumoral, tolerabilidade em relação às doses administradas, efeito sob a cascata de sinalização do LH, uma vez que inibiram a expressão de gene anti apoptótico (XIAP) e a síntese do fator de transcrição (STAT 3), responsáveis pela proliferação e sobrevivência das células e, ainda incrementaram a expressão de proteínas apoptóticas.

Ainda em relação ao trabalho referenciado acima, as NLS desenvolvidas melhoraram os parâmetros farmacocinéticos em comparação ao composto livre, via maior concentração plasmática e biodisponibilidade aumentada.

Sharma, Sharma e Wadhwa (2019) desenvolveram NLS para carreamento da Cur, objetivando averiguar *in vivo* seu potencial terapêutico frente modelo de doença inflamatória intestinal, colite. As NLS foram preparadas pelo método de emulsificação e evaporação do solvente e, após administração oral, as np's apresentaram estabilidade gastrointestinal, captação aumentada pelos tecidos inflamados, os quais após tratamento exibiram estrutura colônica histologicamente semelhante ao grupo animal saudável. Os testes *in vitro* demonstraram redução significativa de estresse oxidativo, leucócitos, e citocinas pró-inflamatórias (TNF- α).

Outra modalidade de np's lipídicas são os CLN, Bondi et al. (2017) investigaram *in vitro* a ação antitumoral de CLN contendo Cur sob células de

câncer de ovário (A2780S/A2780CP). O sistema potencializou a atividade anticâncer das np's em relação ao exibido pelo composto livre e garantiu maior biodisponibilidade e liberação prolongada da Cur.

Uma alternativa para aumentar a solubilidade e absorção gastrointestinal da Cur é a utilização de nanosuspensões Wang et al. (2017), ou CLN com excipientes como o éter octadecílico de eicosaetileno glicol (Brij78) ou succinato de D-tocoferil polietileno glicol (TPGS) Ji et al. (2014). Esses excipientes foram utilizados como estabilizadores e potenciais moduladores da atividade da proteína de membrana P-gp. Dessa forma, as np's conseguiram melhorar a absorção *in vivo* da Cur, via incremento da sua taxa de dissolução e biodisponibilidade oral.

Um parâmetro de grande interesse para a indústria farmacêutica é a farmacocinética do composto ativo após a sua administração. Wang et al. (2017) investigaram *in vivo* a biotransformação da Cur e a possível atividade anticancerígena dos CLN sob células de adenocarcinoma de pulmão (A549). Nesse estudo, as CLN aumentaram a biodisponibilidade da Cur; a depuração das np's foi mais lenta em relação ao composto livre e, além disso, os CLN apresentaram diminuição da viabilidade celular (A549) mais pronunciada do que a Cur livre.

Em um estudo *in vivo* comparativo envolvendo NLS e CLN para vetorização da Cur até o cérebro, Malvajerd et al. (2018) comprovaram que os CLN foram mais eficazes em relação às NLS, pois promoveram liberação sustentada e foram capazes de aumentar a absorção do composto enquanto que a Cur livre não foi detectada no órgão.

Os autores propõem que o menor tamanho das np's, no caso dos CLN, possa explicar a captação e maior acúmulo do composto no cérebro, uma vez que, a redução do tamanho afeta o padrão de opsonização das np's e a eliminação pelo RES, além disso, o tensoativo Tween seja capaz de inibir a P-gp e evitar o efluxo, dessa forma, diminuindo o mecanismo de resistência celular.

Wang et al. (2020a) demonstraram *in vitro* a eficácia de CLN contendo Cur, não só na inibição da proliferação, mas também na indução de apoptose em células HepG2 de carcinoma hepatocelular. Segundo os autores, o efeito

anticâncer foi possível via regulação da expressão de receptores de membrana (DR4 e DR5) sinalizadores da morte e ativação das proteínas caspases 3, 8 e 10 indutoras da apoptose celular.

Para avaliar a atividade antitumoral da Cur *in vitro* em três linhagens celulares BxPC-3, Panc-1 e Mia Paca-2, todas essas de câncer pancreático, Le, Hartman e Pillai (2017) elaboram lipossomas conjugados com o fator de crescimento epidérmico (EGF), o qual pode ser reconhecido pelo receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), expresso por células cancerosas. Os autores propõem que a citotoxicidade das np's com Cur, está associada ao revestimento destas com EGF, pois houve não só uma maior internalização dos lipossomas, mas também, possibilitou uma liberação controlada das np's no sítio alvo específico.

Um estudo de fase I foi conduzido por Greil et al. (2018), para investigar a segurança e tolerabilidade de doses crescentes de Cur lipossomal (Lipocurc™) em 32 pacientes com câncer metastático. A dose máxima tolerada pelos pacientes foi de 300 mg/m², sendo que, nessa dosagem apenas um paciente desenvolveu hemólise e durante a perfusão a concentração plasmática de Cur lipossomal se manteve estável, contudo, após 8 horas foi observado um rápido declínio para níveis indetectáveis.

Em relação à tolerabilidade, apenas dois pacientes não apresentaram algum tipo de reação adversa ao tratamento, porém, nenhuma toxicidade limitante tal como cardíaca, renal, pulmonar ou hepática foi observada, contudo, não foi constatada regressão tumoral em nenhum indivíduo.

Outro trabalho com Cur lipossomal (Lipocurc™) foi conduzido por Zhang et al. (2018), para o tratamento de câncer de pulmão via inalação do pó liofilizado. Nessa pesquisa, o lipossoma apresentou alta citotoxicidade para as células adenocarcinoma de pulmão (A549) e, por outro, lado baixa propriedade nociva para células brônquicas humanas. Em comparação ao composto livre, a formulação apresentou elevada endocitose celular, via permeabilidade dos lipossomas e apoptose induzida com efeito anticancerígeno mais expressivo.

Um campo que tem apresentado grande interesse na oncologia é o uso da terapia fotodinâmica. Duse et al. (2018) desenvolveram lipossomas contendo Cur que demonstraram efeito fototóxico *in vitro* e *in vivo*, (células de

adenocarcinoma ovariano SK-OV-3) por meio da geração de ERO's e baixo potencial hemolítico para o modelo de células endoteliais da artéria (PCS - 100-020TM). Esses efeitos ocorreram, pois, após excitação com comprimento de onda específico a Cur produz ERO's exibindo efeito citotóxico para os tecidos circundantes.

Esse efeito também foi registrado no estudo de Kamel, Fadel e Louis (2019), onde CLN potencializaram *in vitro* a penetração celular e propriedades anticâncer da Cur após terapia fotodinâmica em células de câncer de mama (MCF-7).

Diante do exposto, verifica-se que esses estudos são de grande relevância clínica, pois propõem estratégias farmacológicas alternativas para aumentar a solubilidade e biodisponibilidade da Cur e, dessa forma, poderão potencializar e melhorar sua utilização como composto terapêutico, não só na profilaxia, mas também, no tratamento de várias doenças.

A seguir apresentamos na Tabela 1 algumas das recentes atividades biológicas de NLS contendo Cur.

Tabela 1- Estudos *in vitro* e *in vivo* conduzidos com nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo curcumina

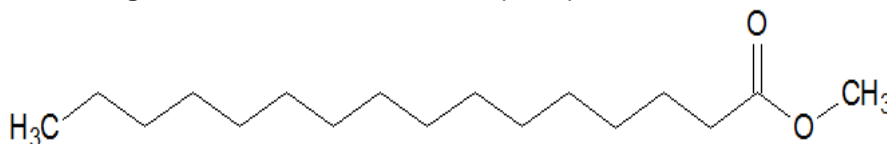
| Condução do estudo | Ensaio realizado | Principais resultados | Referência |
|---------------------------|--|--|---------------------------|
| <i>In vitro</i> | Caracterização físico-química e ensaios de citotoxicidade e ação antineuroinflamatório | Diâmetro médio 86,0 nm; ausência de toxicidade em células cerebrais (bend.3) e proteção contra neuroinflamação em células BV-2 <i>in vitro</i> . | Ganesan et al. (2019) |
| <i>In vitro e in vivo</i> | Ensaio de citotoxicidade em células (CFPAC-1 e PANC-1 adenocarcinoma pancreático) e endoteliais (HUVEC) e biodistribuição. | Viabilidade celular ↑ 80% em células endoteliais humanas (HUVEC). Inibição do crescimento de CFPAC-1 e PANC-1 dose dependente e maior concentração de NLS (fígado, baço, pulmão, cérebro e pâncreas) em relação à Cur livre. | Chirio et al. (2019) |
| <i>In vitro</i> | Ensaio de radiosensibilização com NLS em células de câncer de mama (MCF10A; MCF7 e MDA-MB-231 BC) | Eficácia da formulação como radiosensibilizador (exibiu efeitos antioxidantes e antitumorais). As células MCF10A e MCF7 foram mais sensíveis às NLS do que Cur livre. | Minafra et al. (2019) |
| <i>In vitro</i> | Caracterização físico-química e ensaios: citotoxicidade (fibroblastos) e antimicrobiano | Diâmetro médio: 401,0 nm; EE%: 84%; Baixa citotoxicidade em L929 (75% viabilidade celular); NLS (CIM 62,5 µg.ml ⁻¹ maior capacidade de inibição do crescimento <i>Staphylococcus aureus</i> em comparação com a Cur livre (CIM 500 µg.ml ⁻¹). | Luan et al. (2019) |
| <i>In vitro</i> | Caracterização físico-química; ensaio de citotoxicidade em células Caco-2 | Diâmetro médio 141,0 nm; Estabilidade de armazenamento (4 meses/4 °C) Biocompatibilidade em células Caco-2 (viabilidade superior a 80%) superior a Cur livre (32-36%) | Perteghella et al. (2020) |
| <i>In vitro e in vivo</i> | Avaliação da inibição da glicoproteína P (PGP) em câncer de mama triplo negativo (TNBC). | Diâmetro médio 175,0 a 190,0 nm; NLS com Cur permitiram maior retenção intracelular da doxorubicina em TNBC por inibição da PGP, em relação ao composto livre. NLS com Cur/doxorubicina foram eficazes na redução do crescimento tumoral. | Abd-ellatef et al. (2020) |
| <i>In vitro e ex vivo</i> | Método analítico de validação para Cur; desenvolvimento de NLS (gel e creme) e estudo de permeação (células de Franz) | Método foi desenvolvido em dois sistemas (metanol e tampão) ambos demonstraram alta reprodutibilidade para quantificar a concentração de Cur (encapsulação e liberação) da formulação. | Rapalli et al. (2020) |
| <i>In vitro</i> | Ensaio de citotoxicidade em células de linfoma não Hodgkin (Jurkat e Ramos B) | CLN conjugados (Cur e imatinib com anticorpo rituximabe) apresentaram ↑ efeito citotóxico que as drogas livres. Jurkat/Ramos B (Cur IC 50: 8,3 e 9,1 µg.ml ⁻¹ ; Imatinib 4,0 e 11,1 µg.ml ⁻¹ e CLN 1,3 e 1,4 µg.ml ⁻¹). | Varshosaz et al. (2020) |
| <i>In vitro e in vivo</i> | Caracterização físico-química; liberação gastrointestinal e ensaio farmacocinético | Diâmetro médio: 347,9 nm; EE 83%; estabilidade 90 dias; liberação sustentada e maior biodisponibilidade (até 72h) em relação à Cur livre. | Mohamed et al. (2021) |

2.6 PALMITATO DE METILA

Atualmente se observa que os estudos a respeito do desenvolvimento de np's com base na utilização do lipídio palmitato de metila são escassos e ou pouco descritos, especialmente no que tange a estudos *in vitro* e *in vivo* de caracterização de NLS como vetores para fármacos, produtos naturais e ou outras moléculas. Nesse sentido, o trabalho em questão emprega o uso de um lipídio que até então possui comportamento não caracterizado e explorado pela nanotecnologia farmacêutica.

O lipídio metil palmitato, oficialmente nomeado como palmitato de metila pela IUPAC, é um éster de ácido graxo (éster metílico saturado), endógeno do metabolismo animal (AMMAR, 2013) e com fórmula molecular $C_{17}H_{34}O_2$. Sua fórmula estrutural está demonstrada na Figura 5.

Figura 5 - Fórmula estrutural do lipídio palmitato de metila.



Fonte: Imagem editada pela autora no programa Chemscketch.

É uma molécula altamente hidrofóbica, solúvel em etanol, diclorometano, clorofórmio e dimetilsulfóxido (DMSO), comercializado no estado sólido com coloração esbranquiçada a transparente e com ponto de fusão $\geq 30^{\circ}C$ (DUNN, 2008; CHANWATTANAKIT et al., 2019).

Curiosamente estudos *in vitro* e também *in vivo*, já relataram que esse lipídio possui atividade acaricida (WANG et al., 2010) e, em pesquisas conduzidas em modelos animais o mesmo demonstrou promissora ação anti-inflamatória, antifibrótica, além de, reduzir a expressão do fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina-10 (IL-10). Também foi responsável por impedir, após transplante hepático, a fagocitose mediada por células de Kupffer, macrófagos do RES, (MARZI et al., 1991; CAI; KAPHALIA; ANSARI, 2005; SARKAR et al., 2006; EL-DEMERDASH, 2011; MANTAWY et al., 2012; SHARAWY et al., 2013).

Os autores corroboram que o palmitato de metila possui ação anti-inflamatória e antifibrótica através de múltiplas vias, entre as quais: atenuar a gravidade do estresse oxidativo, por redução do óxido nítrico (NO) e enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), diminuir a expressão do TNF- α , um potente estimulador da resposta inflamatória, além de, mediar a resposta imunitária por aumentar a produção de citocinas.

Em consonância com esses resultados, Temiz et al. (2015) averiguaram, *in vivo*, a eficácia do palmitato de metila no controle de doenças inflamatórias, especificamente no caso de doença respiratória, asma crônica. O lipídio exibiu efeito anti-inflamatório pois reduziu significativamente os níveis de interleucina-5 (IL-5). De acordo com os autores, as interleucinas desempenham um papel central no desenvolvimento da inflamação crônica das vias aéreas, via acumulação e ativação dos eosinófilos e através das análises histológicas, foi possível averiguar que na presença do palmitato de metila houve melhora significativa das lesões teciduais.

Em outro estudo, El-agamy, Elkablawy e Abo-haded (2017) investigaram *in vivo* o efeito cardioprotetor do palmitato de metila após danos cardíacos induzidos por ciclofosfamida, utilizado em terapias antineoplásicas. Nesse trabalho, a ciclofosfamida exibiu toxicidade miocárdica e, por outro lado, o palmitato de metila apresentou efeitos cardioprotetores benéficos contra essa cardiotoxicidade, uma vez que, foi capaz de suprimir o estresse oxidativo, por proteger as membranas cardíacas da peroxidação lipídica. Ademais, houve redução da expressão da proteína TLR-4 e o fator nuclear NF-kB, relacionados ao aumento da resposta inflamatória e desencadeamento do dano cardíaco.

Nesse sentido, como os trabalhos envolvendo o uso do palmitato de metila no desenvolvimento de np's lipídicas para carreamento da Cur são escassos e ou pouco descritos, ressalta-se que a presente pesquisa colaborou com informes no que tange ao comportamento desse lipídio como matriz para elaboração de sistemas aplicados a nanotecnologia farmacêutica.

3 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um sistema nanoestruturado lipídico sólido para o carreamento da curcumina, com características físico-químicas voltadas para aplicação na nanotecnologia farmacêutica.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar um delineamento fatorial, através do software Minitab® (versão 16.1.1), visando otimizar os principais parâmetros nanotecnológicos: Diâmetro Médio, Índice de Polidispersão e Eficiência de Encapsulação;
- Estabelecer um protocolo de produção de nanopartículas lipídicas sólidas contendo curcumina, através do método de ultrasonicação por cisalhamento;
- Caracterizar as partículas obtidas em relação aos seguintes parâmetros: Diâmetro Médio; Índice de Polidispersão e Potencial Zeta por técnicas de espectroscopia de correlação de fótons (*Dynamic Light Scattering*) e análise da mobilidade eletroforética respectivamente;
- Determinar a Eficiência de Encapsulação no que se refere ao percentual de encapsulação da curcumina, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência;
- Avaliar a estabilidade físico-química das nanopartículas em suspensão e liofilizadas contendo curcumina, em relação aos parâmetros: Diâmetro Médio; Índice de Polidispersão e Pontencial Zeta, sob condições diferenciadas de armazenamento;
- Quantificar o percentual de curcumina liberado do sistema nanoparticulado frente aos fluidos gastrointestinais simulados e tampão fosfato salino;
- Caracterizar o sistema nanoestruturado de acordo com as técnicas físico-químicas de: Difractometria de Raios X; Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier; Análise Termogravimétrica; Calorimetria Exploratória Diferencial e Microscopia Eletrônica de Varredura;

- Avaliar a atividade antioxidante, *in vitro*, do sistema nanoestruturado e curcumina livre sobre um modelo de geração de ABTS^{•+};
- Investigar a atividade antifúngica, *in vitro*, das nanopartículas e curcumina livre frente a diferentes cepas de *Candida sp*;
- Avaliar a citotoxicidade *ex vivo* da curcumina livre e das nanopartículas sobre hemácias humanas;
- Desenvolver e validar metodologia analítica por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial para análise quantitativa de curcumina em plasma de rato e
- Investigar *in vivo* a biodisponibilidade da curcumina livre e encapsulada, através de um estudo farmacocinético.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS: REAGENTES

Curcumina, palmitato de metila, persulfato de potássio, 2,2'-azinobis ácido 3-etilbenzenotiazolinona-6-sulfônico (ABTS), pancreatina, pepsina, tampão ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico (MOPS) e meio de cultura (*Instituto Roswell Park Memorial*) RPMI foram adquiridos na Sigma-Aldrich (Missouri, EUA). Ácido clorídrico, diclorometano, fosfato de sódio dibásico e manitol foram adquiridos da Vetec (Duque de Caxias, Brasil). Cloreto de sódio, etanol e hidróxido de sódio foram adquiridos da Biotec (Lages, Brasil). Acetonitrila e metanol grau HPLC foram adquiridos de Liochrosolv (Darmstadt, Alemanha). Cloreto de potássio e fosfato de potássio monobásico foram adquiridos da Química Moderna (São Paulo, Brasil). Ágar e tween 80 foram adquiridos da Synth (São Paulo, Brasil). Água ultrapura foi obtida através dos sistemas de purificação de água MilliQ.

4.2 EQUIPAMENTOS

Agitador de tubos tipo Vórtex (Quimis®) - Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica - UNICENTRO;

Agitador magnético (Quimis®) - Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica - UNICENTRO;

Autoclave vertical AV Plus (Phoenix®) - Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica - UNICENTRO;

Balança analítica M214A (Tecnal®) - Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica - UNICENTRO;

Banho ultratermostático (Solab®) - Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica - UNICENTRO;

Calorímetro SDT Q600-TA simultâneo DSC/TGA (Instruments®) – Central de análises – UTFPR – Pato Branco;

Capela de fluxo laminar vertical (Veco®) - Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica - UNICENTRO;

Capela para exaustão de gases (Lucadema®) - Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica - UNICENTRO;

Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) (Waters®) acoplado a um detector de arranjo de fotodiodo (DAD) e coluna fase reversa C18 (125mm X 4mm) (Xterra Waters®) - Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica - UNICENTRO;

Cromatógrafo líquido de ultra eficiência (UPLC) (Waters®) acoplado a um espectromêtro de massas triplo quadrupolo XEVO-TQD com fonte de ionização por eletropulverização Z spray™ (Waters®, Milford) - Centro de Ciências Moleculares e Nanotecnologia - UNICENTRO;

Difratômetro de raios X - D2 PHASER (Bruker®) - Central de análises – UTFPR – Pato Branco;

Disruptor ultrassônico (Unique®) - Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica - UNICENTRO;

Equipamento para análise do potencial zeta - ZetaSizer ZS (Malvern®) - DEQ – UNICENTRO;

Equipamento para medida do espalhamento dinâmico da luz - Dynamic Light Scattering (Brookhaven 90 Plus®) - Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica - UNICENTRO;

Espectrômetro de infravermelho IR200 FT-IR (Nicolet® - Thermo Scientific, EUA) - Central de análises – UTFPR – Pato Branco;

Incubadora de bancada com agitação Orbital Q816M22 (Quimis®) - Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica - UNICENTRO;

Leitor de microplacas Spectra Max 190 (Molecular Devices®) - Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica - UNICENTRO;

Liofilizador (Terroni®) - Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica UNICENTRO;

Membranas filtrantes (acetato de celulose 0,22 µm e PTFE 0,45 µm) (Millipore®);

Microscópio eletrônico de varredura de duplo feixe (MEV-FEI Scios) Complexo de Centrais de Apoio a Pesquisa – COMCAP – UEM;

Osiose reversa laboratorial (Vexer Indústria e Comércio de Equipamentos LTDA®) - Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica - UNICENTRO;

Pipetas monocal (Labmate®) - Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica
- UNICENTRO;

Sistema de ultrapurificação de água (Milli-Q Gradiente Millipore®) - Laboratório
de Nanotecnologia Farmacêutica - UNICENTRO;

Ultracentrífuga refrigerada - Z36HKI (Hermle®) - Laboratório de Nanotecnologia
Farmacêutica – UNICENTRO

5 METODOLOGIA

5.1 OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS DE PALMITATO DE METILA CONTENDO CURCUMINA

O preparo de NLS envolve alguns fatores, tais como massa do lipídio, do composto a ser encapsulado e percentual do tensoativo, que em conjunto são de grande complexidade e importância para o desenvolvimento das nanoformulações (YANG et al., 2010; PINK et al., 2019).

Dessa forma, para otimizar a obtenção do sistema nanoestruturado com parâmetros físico-químicos aplicáveis para a nanotecnologia farmacêutica foi realizado um planejamento fatorial completo com superfície de resposta, utilizando o software Minitab® (versão 16.1.1).

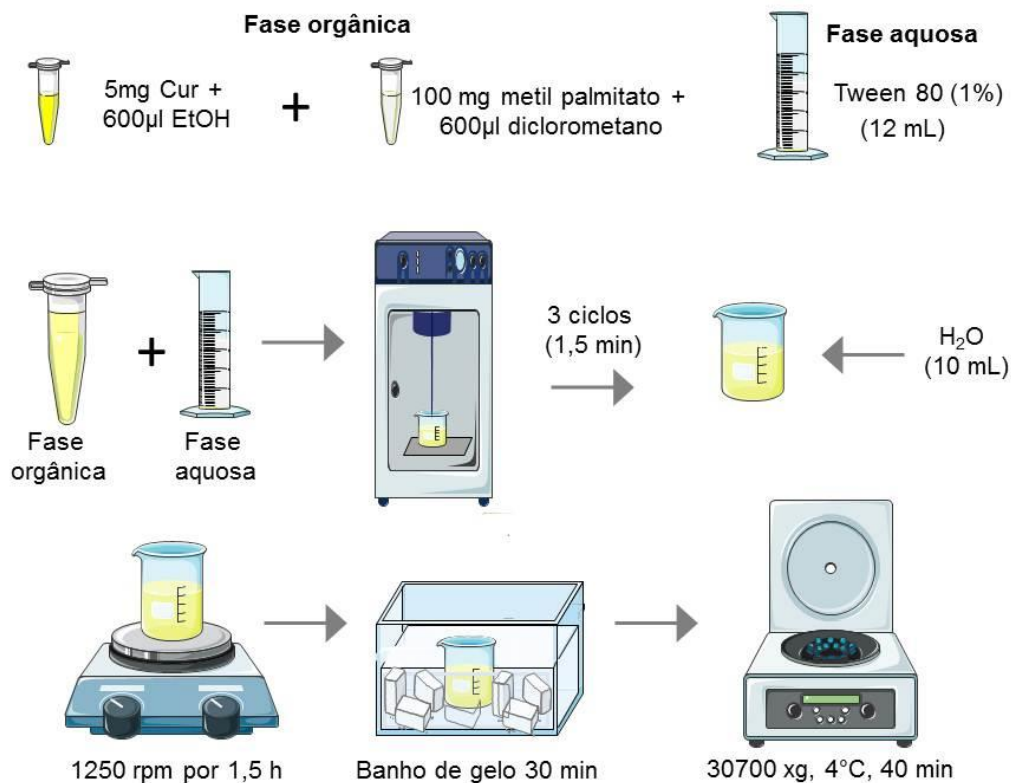
Nesse delineamento, as variáveis independentes foram: massa de Cur (mg), do lipídio palmitato de metila (mg) e concentração do tensoativo tween 80 (%). Para elaboração da matriz do planejamento fatorial, os valores máximo e mínimo dessas variáveis foram plotados baseados em estudos envolvendo o uso da Cur em sistemas nanoestruturados lipídicos sólidos desenvolvidos por meio de delineamento experimental (ABDELBARY e FAHMY 2009; ALI et., 2015; BEHBAHANI et al., 2017; ROMPICHARLA et al., 2017; MALVAJERD et al., 2018; NADAF e KILEDAR 2018).

As variáveis dependentes analisadas foram: diâmetro médio (nm), índice de polidispersão (IPD) e eficiência de encapsulação (EE%), conforme Tabela 3, apresentada no item 5.1 dos resultados.

5.2 OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS COM E SEM CURCUMINA

As NLS com e sem a Cur foram preparadas pelo método de homogeneização de alto cisalhamento e fusão-emulsificação, que consiste na fusão prévia do lipídio, incorporando o princípio ativo por dissolução (NASERI; VALIZADEH; ZAKERI-MILANI, 2015), através de um desruptor ultrassônico (Desruptor – Unique®), (Figura 6).

Figura 6 - Esquema representativo da obtenção de nanopartículas lipídicas de palmitato de metila pelo método de homogeneização de alto cisalhamento pelo ultrassom



Fonte: Imagem editada pela autora utilizando banco de dados disponibilizados em LES LABORATOIRES SERVIER.

A fase orgânica (FO) composta de 5 mg de Cur em 600 µL de etanol foi adicionada a 100 mg do lipídio palmitato de metila em 600 µL de diclorometano. A fase aquosa (FA) foi composta pelo tensoativo tween 1% (polisorbato 80) na proporção de 1:10 (v/v) em relação à FO. Para formação das np's, a FO foi gotejada na FA em três ciclos de sonicação de duração 1,5 minutos cada.

Após essa etapa, foram adicionados 10 mL de água gelada, para promover a solidificação do lipídio e formação da matriz lipídica. Em seguida, a solução foi submetida a agitação magnética 1250 rpm por 1 hora e 30 minutos, durante essa etapa, as np's foram formadas em função da diminuição da

solubilidade do lipídio no solvente e sua consequente precipitação (JANNIN et al., 2018).

Um banho de gelo foi utilizado (30 minutos) para resfriar a emulsão e garantir a cristalinidade da matriz lipídica após o período de agitação magnética. Posteriormente a essa etapa, a solução foi centrifugada a uma temperatura de 4°C, 30700 xg, durante 40 minutos e ressuspensa em água ultrapura para um volume total de 2 mL.

5.3 DETERMINAÇÃO DE DIÂMETRO MÉDIO E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO (IPD)

Para determinação do diâmetro médio e do IPD foi utilizada a espectroscopia de correlação de fótons ou (*Dynamic Light Scattering*, DLS - BIC 90 Plus, Brookhaven Instruments Corp., Holtsville, NY). Para tanto, uma alíquota das np's recém preparadas foi diluída em água ultrapura (1:300 v/v) e acondicionada em uma cubeta de poliestireno, que foi colocada na câmara para análise (BHATTACHARJEE, 2016).

As análises foram realizadas a um ângulo de espalhamento de luz de 90°, 25 °C e comprimento de onda do laser de 659 nm. As leituras foram realizadas em triplicata (n=3), utilizando três corridas sendo de 1 minuto cada. Para cada amostra, a média e o desvio padrão do diâmetro e do índice de polidispersão foram determinados.

5.4 POTENCIAL ZETA

A análise do potencial Zeta foi determinada através do rastreamento da mobilidade eletroforética das nanopartículas carregadas e vazias em um campo de tensão, utilizando o equipamento Zetasizer Nano S90 (*Malvern Instruments Limited, UK*).

Nesta análise, 10 µL da suspensão de nanopartículas foram diluídas em 2 mL de KCl 1 mM (1:200 v/v), para manter uma constante de força iônica durante a medida e, submetidas à uma célula eletroforética de ± 150 mV

adaptado de (RIGHESCHI et al., 2016). Os valores de potencial zeta foram expressos como média e desvio padrão, sendo a análise realizada em triplicata (n = 3).

5.5 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE) DA CURCUMINA

A quantificação da Cur foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando o cromatógrafo à líquido Waters® 2695 Alliance, com detector de Arranjo de Diodo DAD 2998, considerando-se os parâmetros estabelecidos no ICH (*International Conference on Harmonization*) 2005. As condições cromatográficas para quantificação da Cur estão dispostas na Tabela 2 e os parâmetros avaliados foram: linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) e especificidade.

Tabela 2- Condições cromatográficas para quantificação de curcumina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

| Características | Condições Cromatográficas |
|------------------------|--|
| Coluna | C18 (250mm x 4,6mm), μm |
| Detecção | UV ($\lambda = 428\text{nm}$) |
| Fluxo | 0,8mL/min |
| Fase Móvel | água:acetonitrila:etanol (10:10:80v/v/v) |
| Volume de injeção | 20 μl |
| Temperatura da coluna | 30°C |
| Temperatura da amostra | 25°C |
| Tempo de corrida | 5min |
| Tempo de retenção | 3,3min |

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando o modo isocrático.

5.5.1 Linearidade

Para avaliação deste parâmetro foi construída uma curva analítica, na qual foram analisadas triplicatas de 8 concentrações diferentes de Cur (5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 40,0; e 50,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) derivadas de uma solução estoque de concentração 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Dessa forma, a partir da regressão linear da curva analítica (altura do pico versus concentração), foi avaliado o coeficiente de correlação (r) o qual permite estimar a qualidade da curva e, conseqüentemente sua linearidade no intervalo testado. A análise de regressão linear e o teste de falta de ajuste no nível de confiança de 95% foram aplicados aos dados de calibração usando o software estatístico Minitab® (versão 16.1.1). Intervalos de confiança e de predição foram construídos no mesmo nível de confiança.

5.5.2 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) e LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

Para a análise do limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram utilizadas as equações 1 e 2 e, os dados fornecidos pela curva analítica construída para a determinação da linearidade.

$$LD=(3,3\times\sigma) b \quad (\text{Equação 1})$$

$$LQ=(10\times\sigma) b \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: (σ) corresponde ao desvio padrão médio do intercepto com o eixo y e (b) a inclinação da curva analítica ou *slope*.

É importante ressaltar que o LQ corresponde a menor quantidade do analito na amostra que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais estabelecidas e o LD é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que poder ser detectado, mas, não necessariamente quantificado (ICH, 2005).

4.5.3 Especificidade

Nesse estudo foi avaliado o grau de interferência dos componentes utilizados no preparo das NLS, através do sobrenadante obtido a partir do

preparo dos sistemas nanoestruturados. Essa avaliação foi feita por comparação dos cromatogramas do sobrenadante dos sistemas carregados com o sobrenadante dos sistemas vazios.

Dessa forma, a determinação da EE%, ou seja, a quantidade de Cur encapsulada às nanopartículas foi determinada pelo método indireto, que quantifica o composto que não foi associado às nanopartículas por meio da análise do sobrenadante resultante do processo de ultracentrifugação pelo método validado por CLAE-DAD.

Portanto, as alíquotas da triplicata do sobrenadante anteriormente armazenado, foram diluídas na fase móvel na proporção 1:10 (v/v), filtradas em filtro milipore de 0,22 µm e analisadas. A quantidade de Cur encapsulada foi calculada utilizando a equação 3 (SHARMA; SHARMA; WADHWA, 2019) e, os valores do percentual da eficiência de encapsulação (EE%) foram expressos em média e desvio padrão (n=3).

$$EE\% = (Massa\ teórica - Massa\ analítica / Massa\ teórica) \times 100$$

(Equação 3)

FONTE: (SHARMA; SHARMA; WADHWA, 2019)

Onde:

- Massa analítica é a quantidade de Cur (em mg) mensurada no sobrenadante pelo método de CLAE-DAD.
- Massa teórica é a quantidade (em mg) de Cur pesada e utilizada no início do experimento.

5.6 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO SISTEMA NANOESTRUTURADO

A estabilidade do sistema nanoestruturado lipídico em suspensão foi determinada a partir do monitoramento dos seguintes parâmetros: diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e teor de Cur liberada, conforme itens 5.3; 5.4 e 5.5.

Estas medidas foram realizadas semanalmente, em um período de 30 dias, após isso, quinzenalmente até o final de 150 dias para as np's ($n = 3$) em suspensão armazenadas em temperatura ambiente (25°C) e temperatura refrigerada (8°C), com exceção do teor de Cur liberado, o qual foi avaliado mensalmente.

O estudo de estabilidade também foi conduzido com as NLS liofilizadas utilizando concentrações de: 5%; 10% e 15% com diferentes crioprotetores (sacarose, trealose, maltose e manitol), segundo Doktorovova et al. (2013); Ali e Lamprecht (2017) e Wang et al. (2018b). Dessa forma, as np's foram congeladas no freezer -80°C por 24 horas e após essa etapa procedeu-se a secagem com duração de 48 horas em um liofilizador L101 da Liotop® (pressão $179\ \mu\text{Hg}$; -56°C , vácuo 212 Vca).

Após a liofilização as np's foram armazenadas à temperatura refrigerada (8°C) e durante 150 dias os parâmetros elencados acima foram analisados.

5.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A morfologia das np's vazias e carregadas foi examinada por MEV. Para tanto, as suspensões foram diluídas em água ultrapura nas proporções 1:25 e 1:50 (v/v). Em seguida, $10\ \mu\text{L}$ destas soluções foram gotejadas em suportes metálicos de aço inoxidável (*stubs*). As np's foram secas a temperatura ambiente durante 24 horas. Após a secagem, as amostras foram metalizadas com ouro sob vácuo e submetidas a análises utilizando o microscópio eletrônico de varredura de duplo feixe (FEI Scios) com uma tensão de aceleração de 20 kV. As imagens foram obtidas com um aumento de 65.000 (NLS carregada) e 100.000 vezes (NLS vazia). As análises foram realizadas com o apoio do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

5.8 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DRX)

A cristalinidade da Cur, palmitato de metila e np's vazias e carregadas liofilizadas, foram caracterizadas pela técnica de DRX. Os difratogramas da Cur livre, palmitato de metila, nanopartículas contendo Cur e np's vazias, foram obtidos no difratômetro de raios X de alta resolução D2 PHASER (Bruker®). Utilizou-se radiação $K\alpha$ do Cu ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) e as amostras foram analisadas sobre ângulo de 2θ à um alcance de 4 a 70° em uma razão de escaneamento de $4^\circ.\text{min}^{-1}$, tensão de 40 kV e corrente de 10 mA (MALVAJERD et al., 2018).

5.9 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Os espectros da Cur livre, np's vazias e np's contendo Cur, foram obtidos a partir de espectrômetro de infravermelho IR200 FT-IR (Nicolet® - Thermo Scientific, EUA). As amostras contendo 2 mg do composto livre, do lipídio e np's liofilizadas foram analisadas na faixa de varredura de 500 – 4000 cm^{-1} com 32 varreduras com resolução de 4 cm^{-1} (WANG et al., 2016a).

5.10 ANÁLISE TÉRMICA

Para os estudos de análise térmica, 10 mg de NLS carregadas e vazias previamente liofilizadas foram submetidas à termogravimetria (TG/DTG), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise térmica diferencial (DTA) em um analisador térmico (SDT Q600 V20.9 Build 20, TA Instruments). A mesma massa foi utilizada para as análises do palmitato de metila e da Cur. As avaliações foram conduzidas em cadinho de alumina sob atmosfera de ar sintético, com vazão de 100 $\text{mL}.\text{min}^{-1}$ em uma faixa de aquecimento que variou de 0°C até 900°C com taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$ (MALVAJERD et al., 2018).

5.11 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO DA CURCUMINA TFS E FLUIDO GASTROINTESTINAL SIMULADO (FGS/FIS)

5.11. 1 Teste de solubilidade da Cur

A primeira etapa realizada a fim de avaliar o perfil de liberação do composto foi a avaliação da solubilidade da Cur no meio receptor TFS 10 mmol.L⁻¹, pH 7,4 e nos fluidos gástrico (pH 1,2) e intestinal simulados pH 6,8). Esse procedimento foi realizado a fim de que o experimento seja efetuado em condição *sink*, ou seja, condição na qual a quantidade de nanopartículas utilizadas não deve exceder 15% de sua solubilidade máxima (GIBALDI & FELDMAN, 1967).

Para execução desse ensaio, estabeleceu-se como meio receptor o tampão fosfato salino (TFS) 10 mmol.L⁻¹, pH 7,4, e como agente tensoativo tween 80 (5%), no tampão descrito, com o objetivo de manter a Cur liberada suspensa no sistema.

Além disso, utilizou-se os fluidos gástrico simulado FGS com pH 1,2 e o fluido intestinal simulado FIS com pH 6,8. Estes fluidos foram preparados seguindo a metodologia proposta na Farmacopeia Brasileira (2010) com adição das enzimas pepsina e pancreatina de acordo com Xue et al. (2018).

Os ensaios de solubilidade foram determinados individualmente para os fluidos supracitados. Para isso 1,0 mL de cada fluido foi utilizado para solubilizar a Cur (10mg) até que fosse notada a precipitação de uma alíquota do composto, como indício de saturação do meio. Em seguida, as amostras foram submetidas a incubação em agitação orbital em incubadora *shaker* (150 rpm, 37 °C durante 48 h). Depois de decorrido o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas a 30700 xg, à 4°C, durante 40 minutos.

Os sobrenadantes obtidos foram filtrados em filtro milipore de 0,22 µm e diluídos na fase móvel na proporção 1:10 (v/v) e tiveram suas concentrações máximas de solubilidade determinada pelo método analítico CLAE-DAD descrito no subitem 5.5 (n = 3).

5.11.2 Ensaio de liberação em tampão fosfato salino (TFS) pH 7,4

Para a análise do perfil de liberação *in vitro* das NLS/Cur, utilizou-se o método de agitação em *shaker*, com posterior ultracentrifugação (HASAN et al., 2019). Uma alíquota contendo aproximadamente 15% da concentração da solubilidade do composto no meio dissolutor (condição *sink*), foi ressuspensa em 1 mL de solução final com o TFS 10 mmol.L⁻¹, pH 7,4. A dispersão foi mantida sob agitação (150 rpm, 37 ± 1°C) e em tempos predeterminados (1, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 48, 72 e 120 h), foi centrifugada (30700 xg, à 4°C, durante 20 minutos) e posteriormente seu sobrenadante foi armazenado para quantificação da Cur liberada, conforme item 4.6. O precipitado foi então novamente suspenso com novo meio dissolutor (1 mL) e a dispersão foi incubada até a próxima leitura.

5.11.3 Ensaio do perfil de liberação gastrointestinal simulado

Para esse ensaio o volume de suspensão de nanopartículas utilizado foi de 200 µL (condição *sink*), de acordo com o estudo de solubilidade realizado e com base na quantidade de Cur encapsulada. Cabe ressaltar que, o tempo de ensaio foi determinado em seis horas para simular a condição de trânsito gastrointestinal *in vivo* (XUE et al., 2017; XUE et al., 2018).

Primeiramente as suspensões de nanopartículas foram inseridas em 1 mL de fluido gástrico, em seguida foram mantidas na incubadora (*shaker*) às condições de 37 °C, 150 rpm durante o período de 2 horas, sendo que nos intervalos de 0,5, 1 e 2 horas as amostras foram centrifugadas a 30700 xg, à 4°C, durante 20 minutos, após cada etapa de centrifugação, as nanopartículas foram novamente ressuspensas com 1mL do mesmo FGS, para que se fosse mantido as mesmas condições de meio durante o período de incubação.

Depois de decorrido o tempo de simulação gástrica, as suspensões de nanopartículas foram centrifugadas e, de forma análoga, foram inseridas e incubadas também em 1 mL de FIS. As centrifugações e retiradas de sobrenadante foram realizadas a cada intervalo de uma hora até um total de 4 horas de ensaio de simulação intestinal.

Os sobrenadantes coletados foram devidamente filtrados em filtro milipore 0,22 μm , diluídos na fase móvel na proporção 1:10 (v/v) e a concentração de Cur liberada durante o tempo analisado foi determinada por CLAE-DAD, conforme descrito no subitem 5.5 (n = 3).

5.12 ESTUDO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE SOBRE RADICAL ABTS^{•+}

A atividade antioxidante da Cur, np's contendo Cur e das np's vazias foi avaliada por medida colorimétrica da redução do ABTS^{•+}. Inicialmente, uma mistura aquosa de ABTS (7,0 mmol.L⁻¹) e persulfato de potássio (2,45 mmol.L⁻¹) foi incubada em temperatura ambiente e sob o abrigo da luz por 12 horas, para a geração do ABTS^{•+}. O ABTS^{•+} foi diluído em tampão fosfato de potássio 10,0 mmol.L⁻¹, pH 7,4 e registrada absorvância de 0,70 ($\lambda=734$ nm).

No presente ensaio, foram testadas Cur livre, np's vazias e carregadas todas essas amostras, nas concentrações de: 3,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 7,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 15,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 30,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As np's e a Cur foram diluídas previamente em tampão fosfato de potássio 10,0 mmol.L⁻¹, pH 7,4 até atingirem a concentração desejada.

Após essa etapa, foram aliqüotados 10 μL de cada amostra nas concentrações determinadas, e adicionados em microplacas de ELISA, em seguida adicionou-se 190 μL do ABTS^{•+}. A redução do ABTS^{•+} foi monitorada espectrofotometricamente após 30 minutos de incubação à 37°C e a absorvância expressa a $\lambda=734$ nm foi registrada (AK, GÜLÇİN, 2008). O resultado foi expresso em porcentagem de inibição de acordo com a equação 4.

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

(Equação 4)

Onde:

A_c é a absorvância do controle, registrada à $\lambda=734$ nm.

A_s é a absorvância da amostra, registrada à $\lambda=734$ nm.

Para o cálculo da metade da concentração inibitória máxima (IC₅₀), foi utilizada a equação da reta, gerada no programa originPro8, substituindo o x

por 50, para obtenção da concentração da amostra com capacidade de reduzir 50% do ABTS^{•+} (AK, GÜLÇİN, 2008).

5.13 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM CALDO DO CLSI

O ensaio para a determinação da atividade antifúngica foi realizado a partir de adaptação do método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) de 2008, documento M27-A2 (2002).

A atividade antifúngica do composto livre e NLS foi avaliada frente cepas de *Candida spp* previamente identificadas, sendo uma cepa padrão de *C. albicans* 10231 VitroidsTM (Sigma-Aldrich) e três cepas clínicas de *C. albicans*, *C. glabrata*, e *C. parapsilosis*, oriundas do Instituto Adolfo Lutz (2018). As cepas foram mantidas preservadas sobre refrigeração em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD).

O presente ensaio possui parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP – UNICENTRO), número 3.231.864 conforme anexo I.

As leveduras foram cultivadas duas vezes antes dos ensaios em (ASD), por 24 horas a 35 °C. Após o repique de 24 horas, preparou-se uma suspensão de células em solução salina estéril 0,85% de NaCl, padronizadas de acordo com a escala de 0,5 McFarland (aproximadamente $0,5-2,5 \times 10^3$ células. mL⁻¹). A densidade celular foi confirmada por espectrofotometria, $\lambda = 530$ nm, absorvância entre (0,08 – 0,1). A partir desta suspensão, foi realizada uma diluição (1:50 e 1:20) em meio de cultura (RPMI- 1640) e tampão MOPS pH 7,0, sendo que a concentração final das células testadas na microplaca foi de $1,0 \times 10^3$ a $5,0 \times 10^3$ células. mL⁻¹.

Foram preparadas soluções-mãe das amostras a serem testadas: (a) composto livre solubilizado em etanol; (b) NLS vazias e (c) NLS carregadas, solubilizadas em água, todas na concentração de 2000 µg.mL⁻¹. A concentração foi definida a partir da EE% e a NLS vazia foi preparada com concentração de palmitato de metila proporcional à EE% da Cur.

A partir das soluções mãe, foram preparadas diluições, em RPMI-1640 e tampão MOPS (pH 7,0) de: (a), (b) e (c) nas concentrações de 7,5; 15,0; 30,0; 50,0 e 65,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. As diluições foram realizadas em microplacas estéreis de 96 poços de fundo plano. O meio de cultura foi esterilizado por processo de filtração utilizando membrana 0,22 μm com auxílio de bomba a vácuo. Utilizou-se 100 μL de cada diluição e 100 μL da suspensão de células, volume final de 200 μL em cada pocinho.

Também foi incluído ao ensaio o controle positivo de crescimento (com a suspensão de células e o meio de cultura RPMI) e um controle negativo de crescimento (com o meio de cultura RPMI) e o controle dos solventes (100 μL de etanol; 100 μL água e 100 μL RPMI contendo o inóculo).

As microplacas foram incubadas a 35 °C por 24 horas. Após 24 horas, 20 μL de cada pocinho foi diluído (1:200) em um tubo de ensaio contendo em 3,98 mL de água. Dessa diluição, 100 μL foi inoculado em ASD, realizando-se o estriamento com swab, e as placas de cultura foram incubadas por 24 horas a 35 °C.

Após 24 h, a eficácia *in vitro* do Cur livre e das NLS foi verificada pela contagem das unidades formadoras de colônias (UFC's) das concentrações plaqueadas. Todas as análises foram realizadas em triplicata (n=3).

5.14 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA CURCUMINA E NANOPARTÍCULAS SOBRE HEMÁCIAS – ENSAIO *EX VIVO*

5.14. 1 Preparação das Hemácias

Para a obtenção das hemácias foram coletados 10 mL de sangue de indivíduos voluntários, com idade acima de 18 anos. A coleta foi efetuada na Farmácia escola, Campus CEDETEG – Guarapuava, por punção venosa periférica. O doador que consentiu em participar foi sentado confortavelmente em cadeira, seu braço foi esticado sobre bancada limpa, obedecendo as normas de biossegurança, como assepsia do local da punção com a utilização de álcool 70% e equipamento de proteção individual e luva de procedimento

pelo responsável pela coleta. Em seguida, o braço do colaborador foi garroteado pelo menor tempo possível e a agulha conectada à seringa descartável de 5 mL foi introduzida a fim de coletar 10 mL de sangue.

Após a coleta, o sangue obtido foi colocado em tubo de vidro contendo 10 μ L de heparina, homogeneizado e então centrifugado (5 minutos, 4°C, 1200g), foram retirados o plasma e a camada de leucócitos por aspiração. Em seguida, a suspensão de hemácias foi lavada com tampão fosfato de sódio salino (0,85% de NaCl) 10,0 mmol.L⁻¹, pH 7,4 por três vezes, acertando-se o volume globular para 3% (BANERJEE et al., 2008). O presente ensaio possui parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa CEP – UNICENTRO, número 3.231.864 conforme anexo I.

5.14.2 Atividade citotóxica *ex vivo* sobre hemácias.

As amostras de Cur livre, np's carregadas, vazias e controles (etanol; tampão e hemácias e 100% hemólise (20,0 μ g.mL⁻¹), foram mantidas na incubadora (*shaker*) às condições de 37 °C, 150 rpm com a solução de hemácias (3%) contendo 1,08 g.L⁻¹ de glicose, 0,3 g.L⁻¹ de penicilina e 0,5 g.L⁻¹ de estreptomicina (BANERJEE et al., 2008). Nos tempos de 1; 3; 6; 12 e 24 h, as amostras foram centrifugadas (5 minutos., 4°C, 1200 xg) e o conteúdo de hemoglobina liberado, devido à ação citotóxica das preparações, foi determinado pela leitura do sobrenadante, através do registro da absorbância $\lambda = 540$ nm.

5.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos dados quanto às características físico-químicas e testes biológicos dos sistemas nanoestruturados foi utilizado o programa estatístico OriginPro8. No ensaio de hemólise foi aplicada a análise de variância One-way ANOVA seguido de pós teste de Dunnett para comparar as médias das amostras com a média do controle, e pós teste de Tukey para os demais ensaios. Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas significativas para valores obtidos nos experimentos. O programa Minitab® (versão 16.1.1) foi

utilizado para execução do teste *F*, com objetivo de averiguar a linearidade da curva analítica padrão da Cur e o mesmo também foi utilizado para plotagem do delineamento.

5.16 ESTUDO FARMACOCINÉTICO

5.16.1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA DETECÇÃO DA CUR EM PLASMA DE RATO

5.16.1.1 Condições cromatográficas

A validação e as posteriores quantificações em plasma foram realizadas por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (*UPLC/MS-MS*). As condições cromatográficas para quantificação da Cur em plasma de ratos foram: coluna C18 de fase reversa (100 mm × 2.1 mm), fase móvel composta por acetonitrila e acetato de amônio 5 mM com pH 3 ajustado com ácido fórmico (70:30 v/v), a qual foi eluída de modo isocrático com taxa de fluxo de 0,3 mL.min⁻¹ com tempo total de execução de 3,0 minutos e volume de injeção de 2 µL. O forno da coluna foi mantido a 40 °C (Tabela 3).

As amostras foram mantidas a 10 °C no amostrador automático. A detecção por espectrometria de massa para determinação da Cur e nimesulida padrão interno (PI) foram realizadas em modo negativo (ESI⁻). As condições do MS foram: voltagem do capilar a 3,5 kV, temperatura da fonte 150 °C, temperatura de dessolvatação 500 °C, fluxo do gás do cone 30 L.Hr e 500 L.Hr do fluxo do gás de dessolvatação. A quantificação foi realizada no modo de monitoramento de reação múltipla (MRM) em *m/z* 367.03 → 148.88 (qualificador) e 367.03 → 216.91 (quantificador) para Cur e *m/z* 306.95 → 198.00 (qualificador) e 306.95 → 228.92 (quantificador) para a nimesulida.

Tabela 3 - Condições para quantificação de curcumina por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial (*UPLC/MS-MS*).

| Características | Condições Cromatográficas |
|--------------------------------|---|
| Coluna | C18 (100 mm x 2,1 mm) |
| Modo de ionização | Negativo |
| Fluxo | 0,3 mL.min ⁻¹ |
| Fase Móvel | Acetonitrila:acetato de amônio (70:30v/v) |
| Volume de injeção | 2 µl |
| Temperatura do forno da coluna | 40°C |
| Temperatura da amostra | 10°C |
| Tempo de corrida | 3,0 min |
| Voltagem do Cone (PI) | 38,0 V |
| Energia de Colisão (PI) | 14,0 eV |
| Voltagem do Cone (Cur) | 34,0 V |
| Energia de Colisão (Cur) | 12,0 eV |

5.16.1.2 Preparação dos padrões, amostras de controle de qualidade (CQ) e amostras de plasma

Soluções estoque de Cur e nimesulida (PI) foram feitas separadamente em etanol, resultando em uma solução estoque de 1000 µg.mL⁻¹. As soluções estoque de Cur e PI foram diluídas em acetonitrila, para se obter soluções de trabalho com concentração de 500 e 5000 ng.mL⁻¹, respectivamente. As amostras de CQ, usadas para validar e monitorar o desempenho do método analítico, foram obtidas adicionando-se três concentrações de Cur: 50, 200 e 400 ng.mL⁻¹ em plasma.

As amostras de plasma de ratos foram tratadas por extração líquido-líquido com acetonitrila. Uma alíquota de 50 µL de amostra de plasma foi adicionada com 50 µL de solução trabalho do PI concentração final de 250 ng.mL⁻¹ e 300 µL de acetonitrila. Posteriormente, os tubos foram agitados vigorosamente em vórtex durante 2,0 min e centrifugados a 10000 rpm por 10,0

min a 4°C. O sobrenadante foi filtrado através de filtros 0,22 µm e transferido para um frasco de injeção, em seguida, uma alíquota de 2 µL foi injetada para análise no *UPLC/MS-MS*.

5.16.1.3 Validação do método por *UPLC/MS-MS*

O método foi validado de acordo com as recomendações (ICH, 2005; FDA, 2001), determinando as características de desempenho de: seletividade; linearidade; limite de detecção e limite de quantificação; precisão; exatidão e estabilidade. Para este estudo, foram utilizadas amostras de plasma de ratos fortificados com Cur.

A seletividade foi avaliada extraindo-se o plasma branco de ratos para investigar possíveis interferências de compostos endógenos. O cromatograma da amostra de plasma branco foi comparado com o da amostra de plasma enriquecido com analito e PI e com amostra proveniente de ratos tratados com a Cur livre e np's carregadas (KAKKAR et al., 2010a). Foram realizadas análises para averiguar o efeito matriz da Cur em solvente (acetonitrila) e plasma.

A curva analítica foi obtida na faixa de concentração de: 10; 50; 100; 200; 300; 400 e 500 ng.mL⁻¹, com sete níveis de concentração de Cur (no plasma de ratos e acetonitrila), em triplicata. As curvas de calibração foram construídas com base na razão da área de pico (analito/PI) versus concentração.

A linearidade das curvas analíticas foi verificada através da técnica de regressão linear e um teste de falta de ajuste com nível de confiança de 95% foi aplicado aos dados de calibração usando o software estatístico Minitab® versão 16.1.1. Também foi calculado o intervalo de confiança da inclinação para cada método de padronização (padrão externo e adição de padrão) com o objetivo de verificar se havia efeito matriz.

Para a análise do limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram utilizados padrões de Cur nas concentrações de 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0 e 35,0 ng.mL⁻¹ em 3 replicatas, os cálculos foram feitos através das

equações 5 e 6 e, os dados fornecidos pela curva analítica construída para a determinação da linearidade.

$$LD=(3,3\times\sigma) b \quad (\text{Equação 5})$$

$$LQ=(10\times\sigma) b \quad (\text{Equação 6})$$

Onde: (σ) corresponde ao desvio padrão médio do intercepto com o eixo y e (b) a inclinação da curva analítica ou *slope*.

A precisão foi estimada por precisão intermediária e repetibilidade (AOAC, 2012). Para ambas as análises foram utilizados padrões de Cur nas concentrações de 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0 30,0 e 35,0 ng.mL⁻¹ em 3 replicatas. Os testes de precisão intermediária foram avaliados através da determinação de amostras com concentração baixa, média e alta em três dias consecutivos. Nos testes de repetibilidade, três soluções foram preparadas, como descrito acima, e analisadas no mesmo dia. A precisão foi expressa como média \pm desvio padrão relativo (DPR%).

A exatidão do método foi avaliada através do estudo de recuperação por adição padrão (padrões foram preparados na suspensão de plasma) para garantir que não houvesse perda de analito durante o processo de extração (NATA, 2013). Amostras fortificadas foram preparadas em triplicata (50,0; 200,0; 400,0 ng.mL⁻¹) e as taxas de recuperação foram calculadas a partir da Equação 7. As taxas de recuperação foram associadas com sua precisão através do erro padrão relativo (EPR).

$$\% \text{ de recuperação} = (\text{concentração fortificada}/\text{concentração adicionada}) \times 100$$

(Equação 7)

Por fim a estabilidade da Cur no plasma de ratos foi investigada sob três condições de armazenamento utilizando três padrões nas concentrações baixa, média e alta: (1) Estabilidade de congelamento e descongelamento: durante três ciclos entre intervalo de 24 h; (2) Estabilidade de bancada: estabilidade de curto prazo à temperatura ambiente por 6 h; (3) Estabilidade do amostrador automático: estabilidade pós-preparativa a 10 °C por 24 h.

5.16.2 ESTUDO FARMACOCINÉTICO DA CURCUMINA E NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS DE PALMITATO DE METILA CONTENDO CURCUMINA EM RATOS

O estudo farmacocinético foi realizado em Guarapuava, no Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica. Para tanto, foram utilizados 16 ratos machos adultos *Wistar* com peso médio de 200 a 300 g, oriundos do Biotério da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os procedimentos seguiram as normas de conduta com pesquisa animal e foram realizados após a autorização do comitê de ética em uso de animais da Universidade Estadual do Centro-Oeste CEUA/UNICENTRO (ofício número 008/2020, protocolo número 004/2020 - Anexo II).

Os animais foram alojados em gaiolas e mantidos em biotério com alimentação e água *ad libitum*, exceto durante a realização dos experimentos, com ciclos de 12 horas claro-escuro, temperatura (25 ± 2 °C) e umidade (50 a 60%). Os animais permaneceram em jejum de ração por um período de 12 horas antes e 4 horas após a administração dos fármacos. O jejum de líquidos iniciou após a administração dos fármacos e permaneceu até 4 horas após.

Os animais foram divididos em três grupos: Grupo A (n=4) grupo branco que foi utilizado para padronização do método analítico de quantificação da Cur no plasma; Grupo B (n=6) que recebeu Cur livre e Grupo C (n=6) que recebeu nanopartículas lipídicas contendo Cur. Tanto a Cur livre quanto as NLS/Cur foram ressuspensas em água (1 mL) e administradas em dose única ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), por meio de gavagem.

Amostras de sangue de ratos *Wistar* foram coletadas (0,3 mL), através de punção da veia caudal em intervalos de tempo predeterminados após a administração (0,5, 1, 2, 4, 8, 12 e 24 h), para isso no momento da coleta, os animais foram imobilizados em contensores artificiais, afim de facilitar o procedimento e a contenção foi realizada por um menor tempo possível para evitar estresse.

As alíquotas coletadas (0,3 mL) foram transferidas para microtúbulos heparinizados, os quais foram centrifugados a 3500 rpm por 15 minutos a 4°C, para separação do plasma. Em seguida, 500 µL das amostras foram

acondicionados em tubos eppendorf e armazenados a - 80 °C para posterior análise pelo método validado por (UPLC-MS/MS).

Após os experimentos os animais foram anestesiados com Cetamina (60 mg.kg⁻¹) e Xilazina (5 mg.kg⁻¹) via intraperitoneal e em seguida eutanasiados por guilhotina. Após essa etapa, os animais foram acondicionados em sacos brancos de risco biológico, e congelados em freezer destinado ao acondicionamento de carcaças, para posterior captação por empresa de coleta de material contaminado.

5.16.2.1 Análise dos dados e estatística

Os dados adquiridos das amostras de plasma sanguíneo de ratos Wistar foram tratados via software MassLynx™ 4.1. A disposição cinética da Cur foi avaliada seguindo um modelo monocompartimental aberto, com base em pares de dados concentração versus tempo, obtidos pelo delineamento da coleta de amostras sanguíneas após administração extravascular em ratos. A partir da construção da curva logarítmica da concentração versus tempo foi obtida a curva de declínio caracterizada por fase de decaimento relativa à eliminação da Cur.

Os parâmetros farmacocinéticos calculados foram: pico de concentração plasmática (C_{max}), tempo em que ocorreu o pico de concentração plasmática (T_{max}), área sob a curva da concentração plasmática de um fármaco *versus* tempo (ASC_{0-t}), área sob a curva da concentração plasmática de um fármaco *versus* tempo extrapolado ao infinito (ASC_{0-∞}), meia vida de eliminação (T_{1/2}), volume de distribuição aparente (V_d) e clearance (Cl).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PALMITATO DE METILA PARA CARREAMENTO DA CUR POR DELINEAMENTO FATORIAL COMPLETO COM SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Com a finalidade de compreender os dados obtidos e primordialmente a análise das variáveis, foi elaborada a Tabela 4, na qual há os resultados para as três respostas: eficiência de encapsulação (EE%); diâmetro médio (nm) e índice de polidispersão (IPD) com suas respectivas médias e desvios padrão.

Tabela 4 - Respostas e matriz do planejamento fatorial completo com superfície de resposta aplicado no desenvolvimento de nanopartículas de palmitato de metila para carreamento da curcumina.

| Ensaio | Curcumina (mg) | Palmitato de Metila (mg) | Tween (%) | Eficiência de encapsulação (%) | Diâmetro médio (nm) | Índice de polidispersão (IPD) |
|--------|-------------------|--------------------------------|--------------|--------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| 1 | 6,00 | 80,00 | 0,75 | 60,34±1,32 ^a | 202,30±1,60 ^a | 0,12±0,08 ^a |
| 2 | 4,95 | 109,0 | 1,09 | 64,20±2,43 ^b | 210,70±2,43 ^b | 0,09±0,01 ^a |
| 3 | 7,65 | 94,50 | 1,09 | 61,30±4,78 ^a | 304,20±3,90 ^c | 0,23±0,02 ^b |
| 4 | 7,65 | 94,50 | 1,09 | 64,65±2,43 ^b | 307,80±1,54 ^c | 0,22±0,02 ^b |
| 5 | 9,30 | 80,00 | 1,25 | 25,78±3,45 ^h | 364,20±2,45 ^e | 0,27±0,05 ^c |
| 6 | 6,00 | 109,0 | 0,75 | 61,34±1,23 ^a | 202,40±2,45 ^a | 0,13±0,05 ^a |
| 7 | 7,65 | 94,50 | 1,09 | 56,34±5,45 ^d | 302,10±8,91 ^c | 0,27±0,03 ^c |
| 8 | 7,65 | 94,50 | 1,09 | 56,73±2,34 ^d | 298,30±3,45 ^c | 0,26±0,04 ^c |
| 9 | 10,3 | 80,00 | 0,50 | 30,23±1,42 ^g | 410,30±6,54 ^g | 0,41±0,02 ^e |
| 10 | 9,30 | 80,00 | 0,75 | 37,65±4,32 ^f | 378,30±4,67 ^f | 0,32±0,03 ^d |
| 11 | 9,30 | 109,0 | 1,56 | 33,88±4,56 ^h | 376,30±4,54 ^f | 0,28±0,01 ^c |
| 12 | 4,95 | 109,0 | 1,09 | 65,45±2,16 ^{b,c} | 203,10±5,81 ^a | 0,13±0,04 ^a |
| 13 | 7,65 | 94,50 | 1,09 | 54,65±3,67 ^e | 336,80±3,33 ^d | 0,31±0,02 ^d |
| 14 | 10,3 | 94,50 | 1,09 | 36,98±1,56 ^f | 409,50±8,10 | 0,42±0,05 ^e |
| 15 | 7,65 | 94,50 | 1,56 | 35,34±2,43 ^f | 354,20±8,63 ^e | 0,34±0,04 ^d |
| 16 | 7,65 | 118,17 | 1,09 | 54,34±3,65 ^e | 324,00±7,00 ^d | 0,27±0,03 ^c |
| 17 | 7,65 | 70,82 | 1,09 | 51,45±4,43 ^e | 328,30±7,44 ^d | 0,32±0,01 ^d |
| 18 | 4,95 | 109,0 | 1,09 | 67,12±1,45 ^c | 201,20±1,60 ^a | 0,11±0,02 ^a |

Os dados são apresentados na forma de média ± DP para um conjunto amostral de n = 3. Médias sinalizadas com letras diferentes em uma mesma coluna apresentam diferenças estatísticas para um nível de confiança de 95% pelo teste Tukey (p<0,05).

Nesse contexto, para melhor entendimento dos resultados do planejamento fatorial, foi realizada a análise da significância dos efeitos no nível de 95% de confiança, utilizando o erro padrão, com o auxílio do software Minitab® (versão 16.1.1). Para tanto, dividimos a discussão em três partes: diâmetro médio, índice de polidispersão e por último a eficiência de encapsulação.

De maneira geral, é possível observar na Tabela 4 que para o parâmetro diâmetro médio (nm), as np's apresentaram variações de valores entre $201,20 \pm 1,60$ (ensaio 18) a $410,30 \pm 6,54$ (ensaio 9), logo, sugere-se que todas as formulações continham np's com valores nanométricos.

No entanto, para verificar a influência dos três fatores, quanto de suas interações sobre a resposta diâmetro médio, foi elaborada a Tabela 5, que mostra os efeitos e seus respectivos erros padrão.

Tabela 5 - Efeitos e seus respectivos erros padrão para as variáveis analisadas no planejamento fatorial completo com superfície de resposta para a resposta diâmetro médio (nm)

| Efeitos | Estimativa \pm Erro Padrão |
|--|------------------------------|
| Média Global | $311,97 \pm 7,15$ |
| Efeitos Principais: | |
| Massa de Curcumina (A) | $70,98 \pm 14,3$ |
| Massa de Palmitato de Metila (B) | $0,84 \pm 14,3$ |
| Concentração de Tensoativo (C) | $10,92 \pm 14,3$ |
| <i>Efeitos de Interação entre Dois Fatores</i> | |
| A x B | $-9,9 \pm 14,3$ |
| A x C | $7,6 \pm 14,3$ |
| B x C | $-8,6 \pm 14,3$ |
| A x A | $-13,94 \pm 14,3$ |
| B x B | $-7,53 \pm 14,3$ |
| C X C | $12,98 \pm 14,3$ |

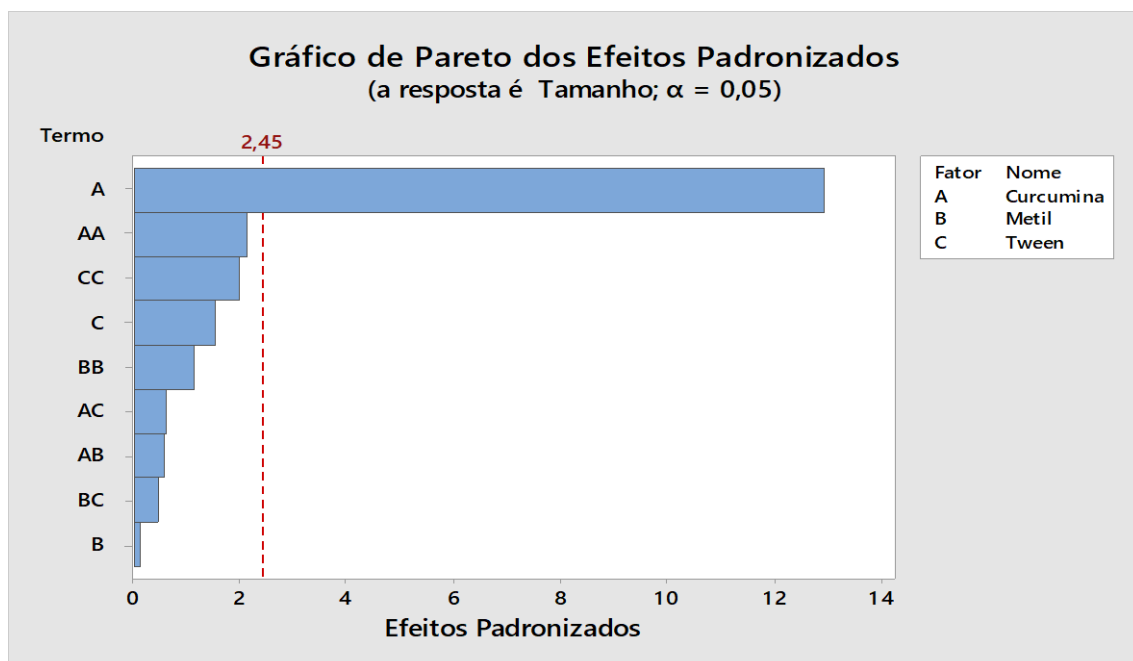
Através da Tabela 5, pode-se notar que entre todos os valores de estimativa dos efeitos calculados, apenas o item (A) massa de Cur foi significativo, ou seja, foi maior do que 35.03. Além disso, tal estimativa tem o valor positivo, indicativo de relação diretamente proporcional para a resposta analisada, conforme (Figura 8).

Observa-se que o valor de erro padrão (14,3) para a variável (A) massa de Cur foi inferior ao valor da estimativa (70,98) o que revela a informação de que esse efeito foi significativo para a resposta analisada.

Ao contrário disso, percebe-se que o valor de erro padrão para os fatores (B e C) quanto para quaisquer das interações entre dois fatores foi superior aos valores das estimativas, o que sugere a informação de que nenhum desses efeitos e ou interações foram significativos para o diâmetro médio.

Corroborando essas informações, através do Gráfico de Pareto (Figura 7) foi possível esclarecer qual efeito e ou interações exerceram influência significativa sobre a resposta a ser considerada. Esse gráfico é elaborado através da divisão das estimativas dos efeitos pelo valor do erro padrão originando-se as barras horizontais de tal gráfico.

Figura 7 – Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para avaliação da influência das variáveis: massa de curcumina (mg), do lipídio palmitato de metila (mg) e percentual de tensoativo Tween (%) e suas interações sobre a resposta diâmetro médio das nanopartículas lipídicas de palmitato de metila



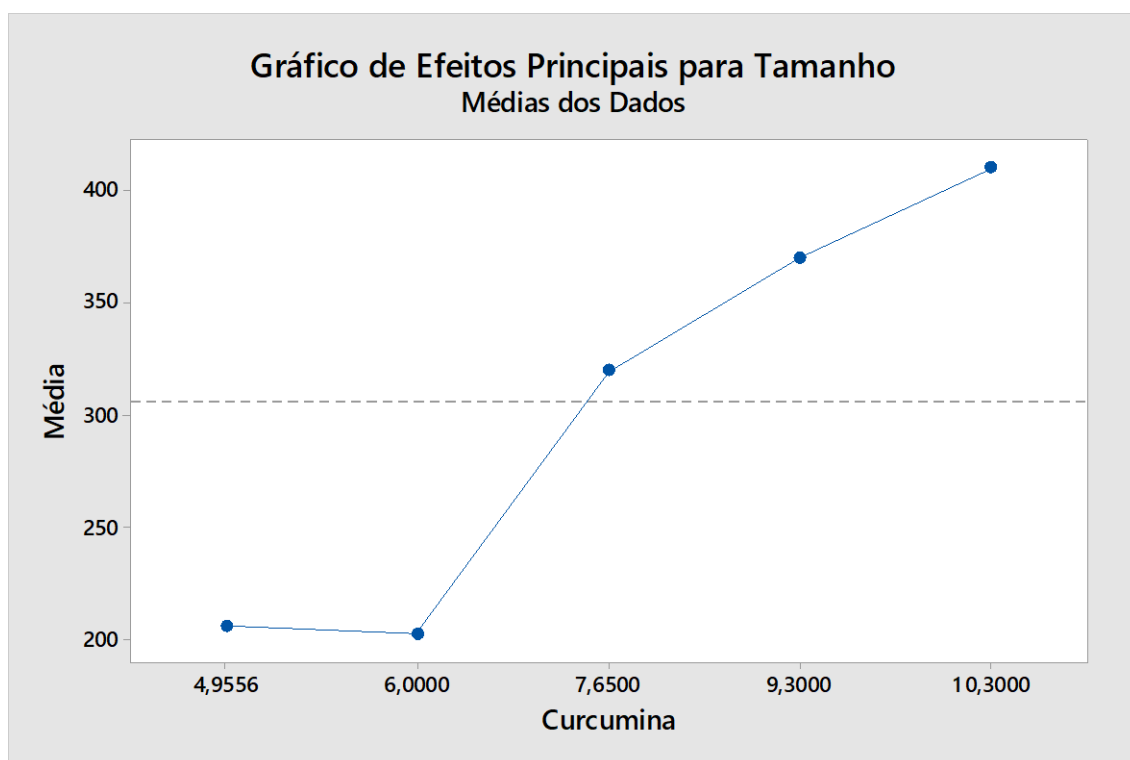
Com base no Gráfico de Pareto, a linha pontilhada se refere ao valor de t crítico para 6 graus de liberdade, no intervalo de 95% de confiança, indicando o limite de significância de cada fator para a resposta diâmetro médio. Verifica-

se, portanto, que apenas o fator (mg) de Cur foi significativo para a resposta tamanho da partícula pois ultrapassou a linha vermelha.

O próximo passo foi averiguar a influência do fator (mg) de Cur através do gráfico dos efeitos principais, o qual tem por finalidade elucidar o comportamento de cada fator e ou das possíveis interações para a resposta pretendida. Com base nisso, pode-se estimar a condição que fornece o tamanho de partícula adequado perante as variações de valores para mg de Cur.

Podemos observar como a variável (mg) de Cur influenciou na resposta tamanho das np's (Figura 8). Após análise do gráfico, evidencia-se que valores superiores à 6,0 mg de Cur são responsáveis pelo aumento do diâmetro médio das np's de forma diretamente proporcional.

Figura 8 – Gráfico dos efeitos principais da variável massa de curcumina (mg) na resposta diâmetro médio (nm) das nanopartículas lipídicas de palmitato de metila



Através de um delineamento experimental para obtenção e caracterização de NLS, Behbahani et al. (2017) também averiguaram que a massa de Cur influenciou no tamanho das np's, uma vez que, maiores

quantidades do composto foram responsáveis por aumentar o diâmetro médio e, segundo os autores, isso pode acontecer pois há maiores chances de incorporação da Cur dentro do núcleo lipídico e, conseqüentemente formação de partículas maiores.

He et al. (2012) demonstraram que np's com tamanhos inferiores a 300 nm são ideais para administração oral, uma vez que apresentaram maior transporte intestinal em relação as partículas de tamanhos maiores. Resultado semelhante também foi reportado por Li et al. (2016), nesse estudo, foi demonstrado que a administração de np's com até 300 nm possibilitou maior absorção intestinal.

Além disso, de acordo com Hagan, Medik e Wang (2018a), a farmacocinética e a biodistribuição favoráveis para administração terapêutica envolvem np's entre 100 nm a 300 nm. Em nossa pesquisa, nota-se que np's com tamanhos inferiores a 300 nm foram obtidas entre 4,95 e 6,0 (mg de Cur) e, isso é um indicativo de que esses valores poderiam ser utilizados para o desenvolvimento de uma nanoformulação final.

Outra resposta avaliada foi o índice de polidispersão IPD, o qual conforme Tabela 4, obtivemos variação de valores entre $0,09 \pm 0,01$ (ensaio 2) a $0,42 \pm 0,05$ (ensaio 14).

Ressalta-se que valores de $IPD > 0,3$ não são indicados quando se deseja trabalhar com np's voltadas para aplicação terapêutica, pois indicam heterogeneidade do tamanho das partículas em suspensão (MORAES et al., 2010; MAZZARINO et al., 2012).

Objetivando averiguar quais os fatores e suas respectivas interações afetaram significativamente a resposta IPD, foi elaborada a Tabela 6 para os efeitos e os respectivos erros padrão considerando as variáveis anteriormente mencionadas.

Tabela 6 - Efeitos e seus respectivos erros padrão para as variáveis analisadas no planejamento fatorial completo com superfície de resposta para a resposta índice de polidispersão (IPD).

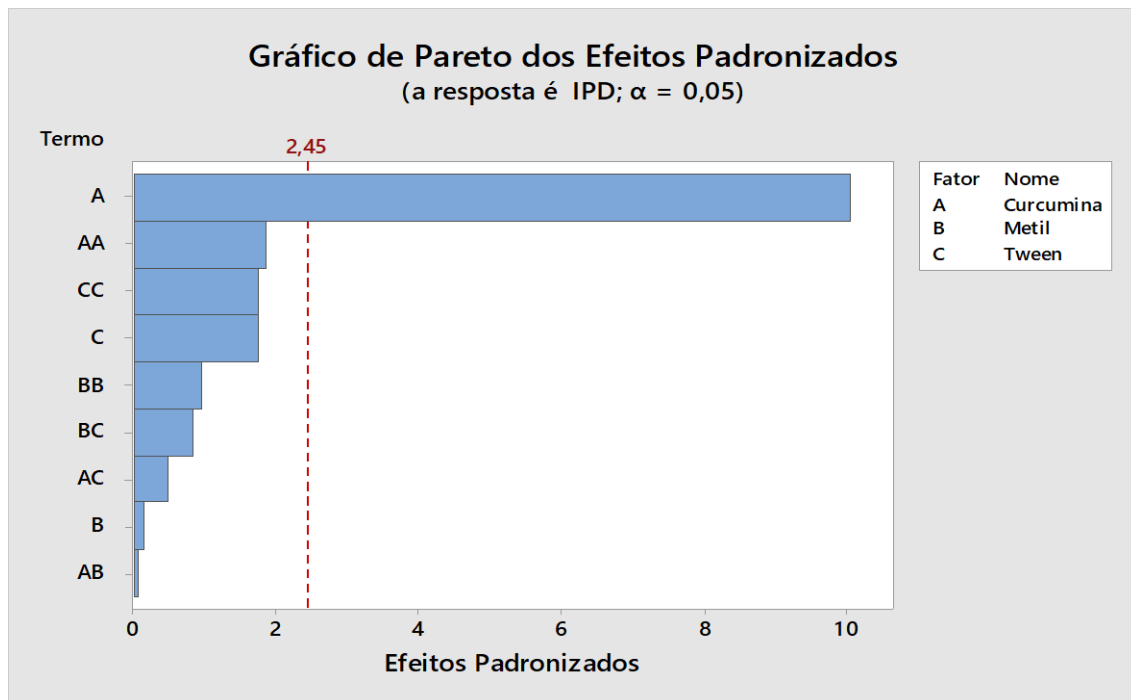
| Efeitos | Estimativa ± Erro Padrão |
|--|---------------------------------|
| Média Global | 0,266 ± 0,011 |
| Efeitos Principais: | |
| Massa de Curcumina (A) | 0,085 ± 0,022 |
| Massa de Palmitato de Metila (B) | - 0,001 ± 0,022 |
| Concentração do Tensoativo (C) | - 0,012 ± 0,022 |
| <i>Efeitos de Interação entre Dois Fatores</i> | |
| A x B | 0,001 ± 0,022 |
| A x C | - 0,005 ± 0,022 |
| B x C | - 0,009 ± 0,022 |
| A X A | - 0,018 ± 0,022 |
| B X B | - 0,010 ± 0,022 |
| C X C | 0,011 ± 0,022 |

Novamente, entre todos os valores de estimativa dos efeitos calculados, apenas o item (A) massa de Cur foi significativo, ou seja, foi maior do que 0,05. Além disso, tal estimativa apresentou o valor positivo indicando relação diretamente proporcional para a resposta IPD, conforme (Figura 10).

Nota-se que o valor de erro padrão (0,022) para a variável (A) massa de Cur foi inferior ao valor da estimativa (0,085) o que revela a informação de que esse efeito foi significativo para a resposta analisada. Ao contrário disso, percebe-se que o valor de erro padrão para os fatores (B e C) quanto para quaisquer das interações entre dois fatores foi superior aos valores das estimativas, o que sugere a informação de que nenhum desses efeitos foi significativo para a resposta analisada.

Para elucidar essas informações, através do Gráfico de Pareto (Figura 9) foi possível averiguar qual efeito e ou interações tiveram influência significativa sobre cada resposta IPD.

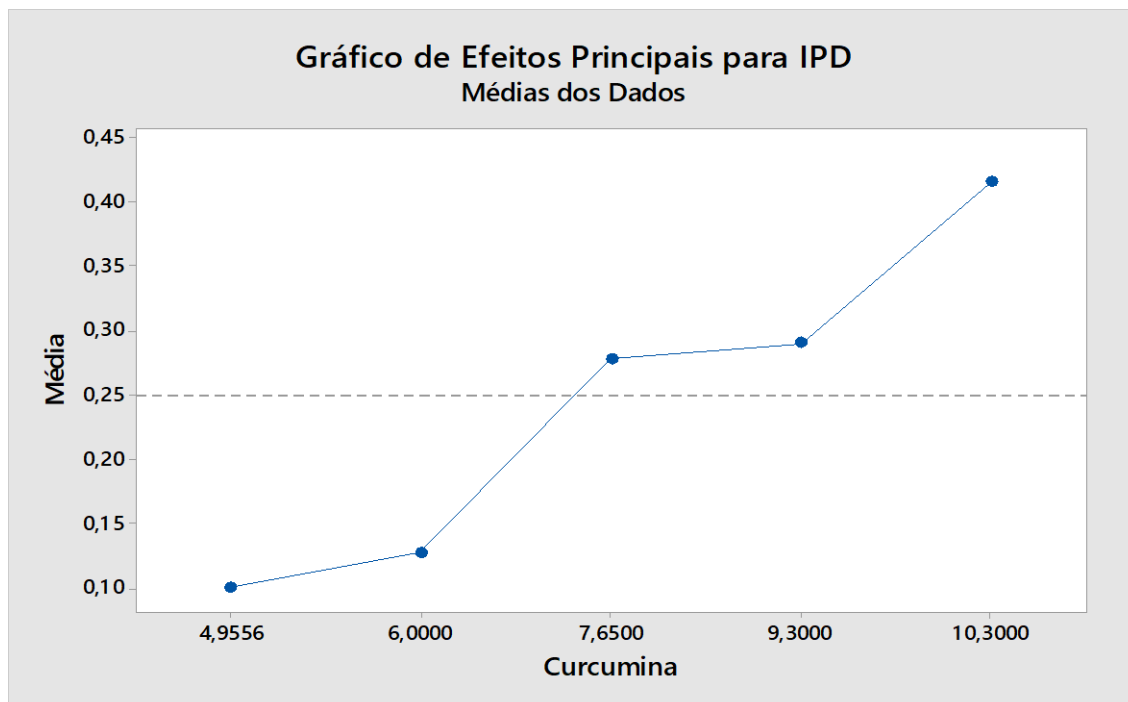
Figura 9 - Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para avaliação da influência das variáveis: massa de curcumina (mg); do lipídio palmitato de metila (mg); percentual de tensoativo Tween (%) e suas interações sobre a resposta índice de polidispersão IPD das nanopartículas lipídicas de palmitato de metila



Corroborando a Tabela 6, o Gráfico de Pareto nos fornece claramente a influência dos efeitos, no qual verifica-se que apenas o fator (mg) de Cur ultrapassou a linha vermelha e, portanto, foi significativo para a resposta IPD.

Com relação a influência da Cur no IPD das np's, podemos perceber na Figura 10, os efeitos principais encontrados para esse parâmetro. Novamente massas de Cur com valores entre 4,95 e 6,0 seriam favoráveis para o desenvolvimento de uma nanoformulação final, pois nesse intervalo obtivemos menores IPD, indicando dessa forma, sistemas menos dispersos.

Figura 10 - Gráfico dos efeitos principais da variável massa de curcumina (mg) na resposta índice de polidispersão (IPD)



Ademais, concentrações superiores a 6,0 mg de Cur foram responsáveis pelo crescente aumento de IPD e, portanto, não seriam indicadas, pois de acordo com Moraes et al. (2010); Mazzarino et al. (2012) valores de IPD superiores a 0,3 não são viáveis quando se trabalha com np's, pois indicam que a distribuição do tamanho se encontra fora de uma faixa estreita, caracterizando heterogeneidade do tamanho das partículas em suspensão.

Através de um delineamento fatorial aplicado para obter NLS com Cur, Ali et al. (2015) obtiveram por ultrasonicação np's de 50 a 200 nm, com IPD variando entre 0,12 a 0,8. Segundo os autores, o IPD aumentou com o tamanho das np's e, foi constatado a influência da massa da Cur no tamanho das NLS, independente da massa lipídica, sendo esse dado também reportado em nosso trabalho.

Além disso, no trabalho de Ali et al., (2015), as maiores concentrações de Cur foram acompanhadas por np's com maior diâmetro médio; maior IPD e, por outro lado, menor EE%, sendo que essa relação (\uparrow Cur/ \uparrow diâmetro médio/ \uparrow IPD/ \downarrow EE%) também foi obtida em nossa pesquisa, conforme discutiremos a seguir.

Em referência ao percentual de EE%, encontramos variação de valores entre $30,23 \pm 1,42$ (ensaio 9) a $67,12 \pm 1,45$ (ensaio 18) Tabela 4. Analisando-se a eficiência de encapsulação obtida para os ensaios descritos, foi elaborada a Tabela 7, que mostra os efeitos e seus respectivos erros padrão, para verificar a influência dos três fatores sobre a resposta eficiência de encapsulação da Cur.

Tabela 7 - Efeitos e seus respectivos erros padrão para as variáveis analisadas no planejamento fatorial completo com superfície de resposta para a resposta eficiência de encapsulação (EE%)

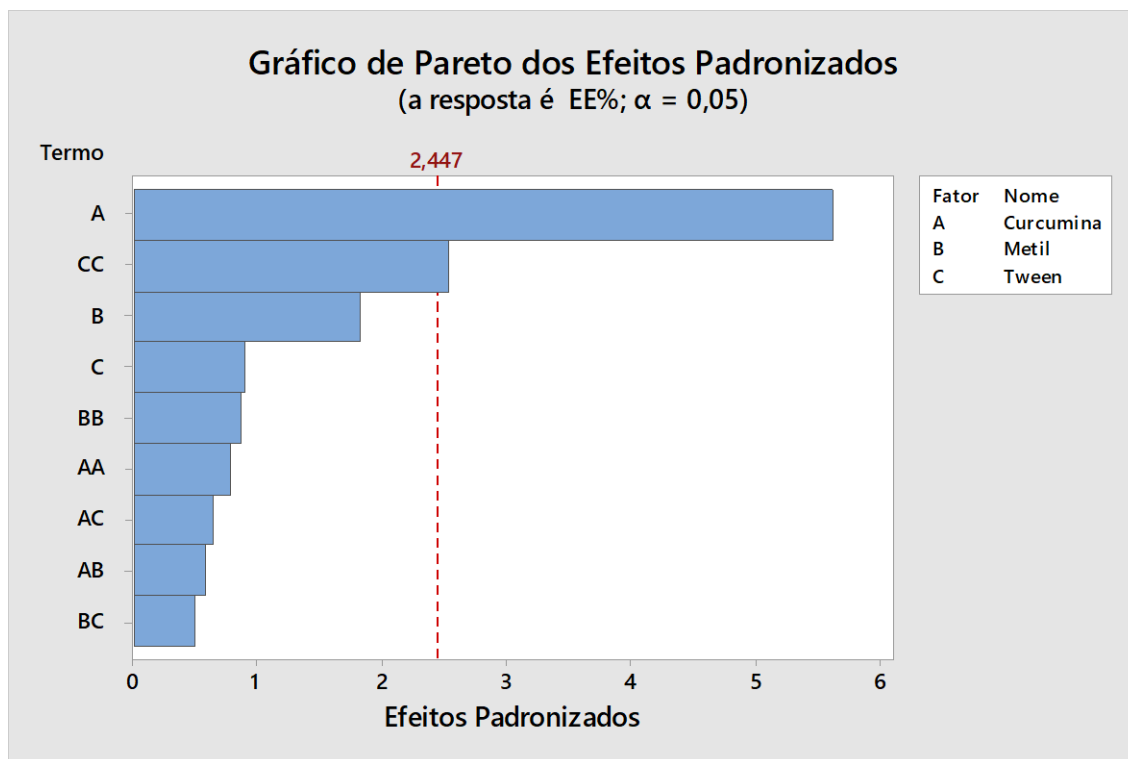
| Efeitos | Estimativa \pm Erro Padrão |
|--|------------------------------|
| Média Global | $58,55 \pm 2,15$ |
| Efeitos Principais: | |
| Massa de Curcumina (A) | $-25,29 \pm 4,3$ |
| Massa de Palmitato de Metila (B) | $3,20 \pm 4,3$ |
| Concentração de Tensoativo (C) | $-2,45 \pm 4,3$ |
| <i>Efeitos de Interação entre Dois Fatores</i> | |
| A x B | $2,93 \pm 4,3$ |
| A x C | $-1,36 \pm 4,3$ |
| B x C | $2,77 \pm 4,3$ |
| A x A | $-1,55 \pm 4,3$ |
| B x B | $-1,72 \pm 4,3$ |
| C x C | $-10,92 \pm 4,3$ |

Pode-se notar que os valores de estimativa dos efeitos calculados para o item (A), bem como das interações entre esses efeitos, nesse caso, apenas o item (C x C), foram significativos, ou seja, foram maiores do que 10.52.

Cabe ressaltar que o fator que exerceu maior influência sobre a resposta a EE% foi a massa de Cur (A), sendo o valor negativo (-25,29) um indicativo da relação inversamente proporcional, ou seja, quanto maior o valor da massa de Cur, menor o valor da EE% obtido, conforme (Figura 12). Em seguida, temos a interação (C x C) que também exerceu influência sobre a resposta EE%.

Dessa maneira, foi elaborado um gráfico de Pareto para melhor visualização dessa influência na resposta EE% (Figura 11). Corroborando o exposto na Tabela 7, verifica-se que o fator (mg) de Cur (A) e a interação percentual de tensoativo (C x C) ultrapassaram a linha vermelha e, portanto, foram significativos para a resposta EE%.

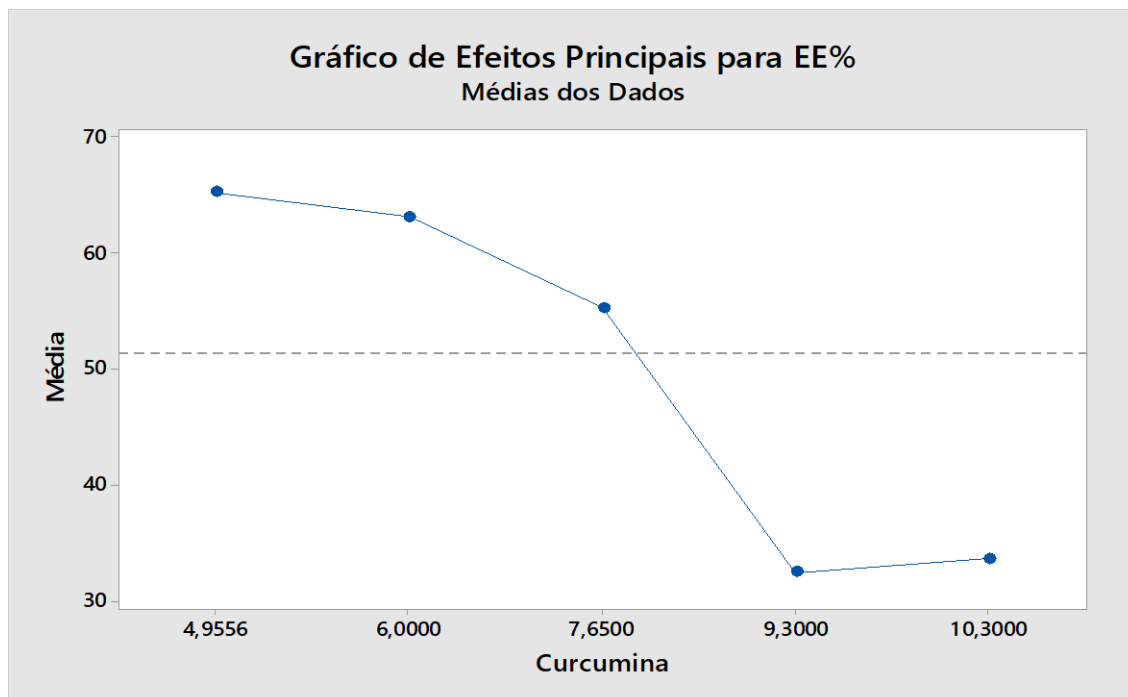
Figura 11 - Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para avaliação da influência das variáveis: massa de curcumina (mg); do lipídio palmitato de metila (mg); percentual de tensoativo Tween (%) e suas interações sobre a resposta eficiência de encapsulação (EE%) da curcumina em nanopartículas lipídicas de palmitato de metila



A influência dos fatores e suas interações foram apresentadas através de gráficos de interação e dos efeitos principais e com base nisso, pode-se estimar, a condição que fornece a maior EE%.

De acordo com a Figura 12, podemos observar que há uma relação inversamente proporcional entre a massa de Cur (mg) e a EE% alcançada, visto que, o crescente aumento de Cur (mg) foi acompanhado pela diminuição nos percentuais de encapsulação da molécula.

Figura 12 - Gráfico dos efeitos principais da variável massa de curcumina (mg) na resposta eficiência de encapsulação (EE%)



Após análise do gráfico, verifica-se que as maiores EE% foram obtidas para valores entre 4,95 e 6,0 mg de Cur. Provavelmente as formulações nas quais predominavam maiores quantidades de Cur e, menores percentuais de EE% foram obtidos, havia mais Cur do que o comportado pela matriz lipídica. Dessa forma, nem todas as moléculas de Cur foram incorporadas nas np's, pois de acordo com Andonova e Peneva (2018), durante a preparação das NLS pode ocorrer a formação de np's com estruturas cristalinas muito ordenadas e com pouco espaço para encapsulação.

A interação dos efeitos (C x C) também foi significativa na EE% e na Figura 13, observa-se que a maior EE% (58%) foi atingida com a concentração de 1% do tensoativo e, por outro lado, percentuais menores ou maiores que este foram responsáveis por uma EE% com valores inferiores ao referenciado para tween 1%.

Figura 13 – Gráfico de interação dos efeitos para o tensoativo Tween (%) na resposta eficiência de encapsulação (EE%) da curcumina em nanopartículas de palmitato de metila



Em relação ao efeito do tensoativo na EE%, quando a concentração de tensoativo presente no meio é elevada, uma maior quantidade do composto ativo pode ser solubilizada na face externa, levando portanto à uma baixa EE% (ABDELBARY e FAHMY 2009). Esse fato foi observado em nosso estudo, pois menores EE% foram obtidas quando soluções de Tween acima de 1% foram utilizadas.

A respeito da encapsulação das moléculas de Cur, cabe ressaltar que a mesma é um molécula lipofílica e essa característica pode favorecer seu aprisionamento no núcleo lipídico das np's (MEHNERT e MADER (2012). Além disso, outros fatores como a solubilidade da molécula no lipídio fundido, a estrutura física e o polimorfismo da matriz lipídica podem influenciar na encapsulação dos compostos ativos (SANTOS; RIBEIRO; SANTANA, 2019).

Nadaf e Killedar (2018) através de um delineamento fatorial, desenvolveram lipossomas carreadores de Cur com tamanho de partícula (204,14 nm) e eficiência de encapsulação (84,21%). Segundo os autores, o

projeto estatístico foi fundamental para predizer qual formulação apresentaria as melhores características físico-químicas para aplicabilidade nanotecnológica.

Nesse sentido, em nosso estudo também se propõe que, o delineamento experimental utilizado constituiu uma ferramenta eficiente, pois através da variação simultânea dos fatores selecionados, foi possível predizer qual formulação deveria ser utilizada para os ensaios biológicos e de caracterização físico-químicas do sistema nanoestruturado lipídico.

Após execução do delineamento experimental, foi selecionada a formulação, para execução dos ensaios de caracterização físico-químicas e biológicos. A formulação escolhida foi aquela que apresentou menor diâmetro médio, baixo IPD e maior percentual de eficiência de encapsulação.

Nesse sentido, após análises dos gráficos dos efeitos e de interação, propõe-se que a melhor condição para tamanho das np's, IPD e EE% seria uma formulação contendo: 1,0% do tensoativo tween; 5,0 mg de Cur e, cabe ressaltar que como a massa do lipídio não foi influente, optamos por usar 100 mg de palmitato de metila (massa aproximada de lipídio usada nos ensaios com os valores de Cur e tensoativo mencionados).

6.2 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS: DIÂMETRO MÉDIO; ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO E POTENCIAL ZETA

Os valores descritos para os parâmetros: diâmetro médio (nm), IPD e EE% (Tabela 8) estão em concordância com o obtido nas condições testes do delineamento experimental, indicando dessa forma, reprodutibilidade e robustez de preparação das NLS de palmitato de metila a partir da formulação escolhida pelo delineamento.

Os valores obtidos para o diâmetro médio das np's com Cur e sem Cur foram de $162,41 \pm 5,7$ nm e $225,12 \pm 5,2$ nm respectivamente (Tabela 8). Nota-se que o diâmetro médio das np's contendo Cur foi estatisticamente inferior ao encontrado para as np's vazias, dessa forma, aponta-se que a presença da Cur na formulação influenciou na redução desse parâmetro.

Tabela 8 - Perfil de caracterização físico-química em relação aos parâmetros diâmetro médio (nm), índice de polidispersão (IPD), potencial zeta (mV) e eficiência de encapsulação (EE%) de nanopartículas de palmitato de metila contendo curcumina e livre de curcumina.

| | Diâmetro médio (nm) | Índice de polidispersão | Potencial Zeta (mV) | Eficiência de encapsulação (%) |
|--------------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| Nanopartícula carregada | 162,41 ^a ± 5,7 | 0,10 ^a ± 0,05 | - 18,00 ^a ± 0,2 | 68,42 ± 0,7 |
| Nanopartícula vazia | 225,12 ^b ± 5,2 | 0,04 ^a ± 0,06 | - 8,41 ^b ± 0,1 | N/A |

Os dados são apresentados na forma de média ± DP para um conjunto amostral de n = 3. Médias sinalizadas com letras diferentes em uma mesma coluna apresentam diferenças estatísticas para um nível de confiança de 95% pelo teste Tukey (p<0,05). N/A: não se aplica.

Semelhante ao obtido em nossa pesquisa, NLS contendo Cur desenvolvidas por ultrasonicação também apresentaram diâmetro médio inferior a 300 nm (RIGHESCHI et al., 2016; BHATT et al., 2018). Sobre isso, Sango et al. (2014) destaca que nesse método, o sonicador ocasiona a cisão da amostra, devido às forças geradas em um fenômeno físico chamado de cavitação, ocasionando a formação de partículas em nanoescala. Além disso, é um processo econômico e reprodutível para obtenção de NLS (RIGHESCHI et al. (2016).

Silva-Buzanello et al., (2012) relatam que a aplicação do ultrassom na forma de pulsos, como foi feito em nosso estudo, é o ideal para não ocasionar o superaquecimento da amostra próxima à sonda geradora de ultrassom e degradação do lipídio.

Nesse sentido, sugere-se que a ultrasonicação foi eficaz em formar NLS de palmitato de metila com tamanho nanométrico, sendo essa uma importante característica quando se quer evitar a depuração via sistema retículo-endotelial e contornar o metabolismo de primeira passagem, permitindo maior tempo de circulação das np's (DAS E CHAUDHURY, 2010).

Corroborando essa informação, o processo de internalização celular é entre, outros fatores, parcialmente influenciado pelo tamanho das partículas (FOROOZANDEH; AZIZ, 2018) e a transcitose ocorre mais facilmente com

partículas de menor diâmetro, ou seja, a absorção poderá ser menor quanto maior o tamanho (DESAI et al., 1997).

Com relação ao IPD, esse parâmetro refere-se à distribuição das famílias de partículas existentes na solução, logo, quanto mais próximo a zero, maior é o indicativo de homogeneidade dos diâmetros das partículas. Na Tabela 8, observa-se os baixos valores obtidos para a distribuição do tamanho das np's com Cur IPD $0,10 \pm 0,05$ e sem Cur IPD $0,04 \pm 0,06$, indicando homogeneidade das partículas em suspensão.

IPD menores que 0,2 são comumente ideais e aceitáveis para a desenvolvimento de np's (GAUMET et al., 2008) e, quando se trata especificamente do uso de lipídios em nanoformulações, como o usado nesse trabalho, IPD menores de 0,3 são admissíveis, pois indicam população homogênea, ou seja, que as partículas estão em uma estreita faixa de distribuição de tamanho (DANAIEI et al., 2018). Dessa forma, considera-se que ambos os sistemas nanoestruturados lipídicos (com e sem Cur) apresentam valores de IPD aplicáveis na nanotecnologia.

Com relação aos parâmetros diâmetro médio e IPD, há indícios de que o tensoativo (Tween 80) possa revestir a superfície das np's e, através de suas cadeias de caráter hidrofílico formar uma barreira estérica na interface (AZHARI et al., 2016), impedindo a aproximação e agregação das np's dispersas na fase aquosa e, assim sistemas mais homogêneos são formados, com NLS de tamanho relativamente pequeno e uniforme (RAMALINGAM; YOO; KO, 2016), como foi obtido nesse estudo.

De acordo com Mohanraj e Chen (2007), o potencial zeta deve exibir um valor o mais distante da neutralidade, visto que há maior garantia de não ocorrer atrações entre as partículas, evitando a formação de aglomerados, o que por sua vez, poderia resultar em aumento do diâmetro médio das np's

Nesse contexto, tanto as np's com Cur ($-18,0 \pm 0,2$ mV), quanto as np's vazias ($-8,41 \pm 0,1$ mV) apresentaram valores negativos. Em relação a estes resultados, aponta-se que a carga negativa encontrada para as NLS se deve provavelmente a presença dos ácidos graxos levemente ionizados (PRABHU et al., 2016).

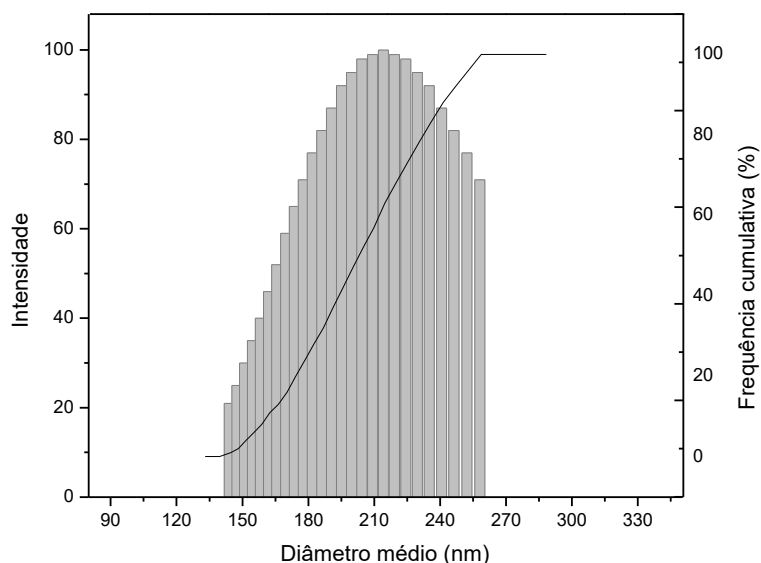
Ademais, observa-se que a presença da Cur exerceu influência nesse parâmetro, pois os nanosistemas apresentaram valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Outros estudos também demonstraram essa diferença de potencial zeta entre NLS vazias e carregadas com Cur (PERTEGHELLA et al., 2020; GUPTA et al., 2020) e, isso possivelmente possa ser atribuído a presença da Cur livre dispersa na fase aquosa (XU et al., 2016) e a hidroxila do grupo fenólico (-OH) da molécula (PATHAK; KANWAL; AGRAWAL, 2015).

Segundo Zhang et al. (2018), há uma relação entre carga superficial e a penetração celular das np's. Priwitaningrum et al. (2016) demonstraram que np's com maiores valores absolutos de potencial zeta apresentaram maior transcitose do que as com menores valores, isso porque houve penetração tecidual mais profunda via interação das np's com sítios específicos da membrana.

Em nosso estudo, percebe-se que as NLS apresentaram potencial zeta distante da neutralidade e, de acordo com o exposto acima, esse resultado é favorável para o processo de internalização celular das np's, o qual por sua vez, poderia potencializar a ação terapêutica e reduzir o efluxo da Cur pela atividade da P-gp (BAEK e CHO, 2017; MALVAJERD et al., 2018).

Na Figura 14, está representado o gráfico que corresponde à distribuição das famílias de uma amostra representativa entre as triplicatas obtidas. Nessa imagem evidencia-se os grupos de partículas que ocorreram em uma mesma faixa de diâmetros médios e suas respectivas intensidade de ocorrência.

Figura 14 - Distribuição de diâmetros de uma amostra representativa de nanopartículas lipídicas de palmitato de metila contendo curcumina com diâmetro médio (nm) e índice de polidispersão (IPD)



Podemos observar ampla frequência de partículas na faixa de diâmetro com variação entre 140 até 260 nm, demonstrando perfil monomodal, com tendência de o conjunto de partículas pertencerem a uma mesma família, confirmado pelo IPD ($0,10 \pm 0,05$), caracterizando homogeneidade das partículas em suspensão.

O tamanho das np's desempenha papel crucial não só no tempo de circulação sanguínea, mas também, na penetração celular, uma vez que, a taxa de difusão é inversamente proporcional ao tamanho das np's, ou seja, partículas menores são transportadas mais rapidamente em relação às maiores. Contudo, partículas muito pequenas (<5,5 nm) são rapidamente eliminadas pelos rins e, dessa forma, apresentam menor tempo de circulação sistêmica (WANG et al., 2015; HOSHYAR et al., 2016).

De acordo com Hagan, Medik e Wang (2018a), o desenvolvimento de np's entre 100 nm a 300 nm e com potencial zeta ± 10 mV, pode resultar em sistemas que promovam maior absorção e biodisponibilidade dos compostos encapsulados e, portanto, poderiam ser utilizados em estudos de avaliação biológica. Dessa maneira, como as NLS apresentaram tamanho de $162,41 \pm 5,7$ nm e potencial zeta $-18,0 \pm 0,2$ mV, aponta-se que o sistema

nanoestruturado possa melhorar as propriedades farmacocinéticas da Cur, conforme discutido no item 6.17.

Em suma, sugere-se que o método utilizado para preparação das NLS de palmitato de metila com Cur foi adequado, pois resultou em partículas com tamanho nanométrico, baixo IPD, potencial zeta distante da neutralidade e alta eficiência de encapsulação e, portanto, o sistema apresenta em relação a esses parâmetros físico-químicos, características promissoras para aplicação na nanotecnologia farmacêutica.

6.3 AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE; LD E LQ

Os dados do experimento de calibração de altura dos picos cromatográficos e suas concentrações foram ajustados por meio da aplicação da técnica de regressão linear no nível de 95% de confiança ($p < 0,05$). Foi realizado um teste de falta de ajuste (F_{faj}) para verificar se o modelo linear era apropriado (Tabela 9).

Os resultados indicam que o modelo linear é adequado para estabelecer a relação entre a altura dos picos cromatográficos dos padrões e suas respectivas concentrações. O valor de F_{faj} obtido 0,71 foi menor que o valor de $F_{crítico} (0.05; 6, 16)$ (2,79), e o valor de p 0,64 indicou que o modelo linear gerado não teve falta de ajuste no nível de 95% de confiança ($p > 0,05$). Este fato também é ressaltado pelo valor do $F_{regressão}$ 59450,04 o qual foi maior do que o valor de $F_{crítico}$, ($F_{crítico} (0.05; 1, 22) = 4,35$) sendo altamente significativo ($p = 0,000$) no mesmo nível de confiança (Tabela 9).

Tabela 9 - Dados da análise de regressão linear no nível de 95% de confiança

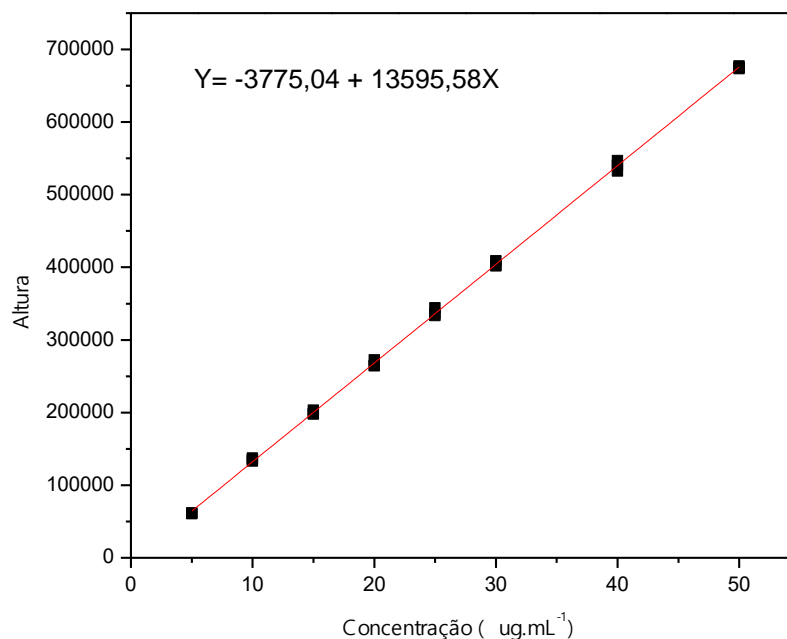
| Molécula | t_R (min) | λ_{max} (nm) (UV-PDA) | Parâmetros da | | Linearidade | | | |
|-----------|----------------|-------------------------------------|----------------------------|--------|-----------------|--------------|--------------------|--------------|
| | | | Regressão | | * Regressão | | ** Falta de ajuste | |
| | | | Equação | r | $F_{regressão}$ | Valor de p | F_{raj} | Valor de p |
| Curcumina | 3.3 | 428 | $y = -3775,04 + 13595,58x$ | 0,9998 | 59450,04 | 0.000 | 0,71 | 0,64 |

$$*F_{crítico}(0.05; 1, 22) = 4,35; **F_{crítico}(0.05; 6, 16) = 2,79$$

Com relação a menor quantidade do analito presente em uma amostra que poder ser detectado e confiavelmente distinguida de zero, mas, não necessariamente quantificado (LD) obtivemos o valor de $0,91 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A menor quantidade do analito na amostra que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis (LQ) obtivemos o valor de $2,76 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados desse estudo foram muito próximos ao reportado por Wichitnithad et al. (2009), pois em seu trabalho os autores obtiveram LD $0,90 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e LQ $2,73 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para determinação da Cur presente nas amostras.

Como podemos observar na Figura 15, a curva de calibração, baseada na altura dos picos cromatográficos da Cur, foi linear na faixa de concentração entre $5,0$ e $50,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A análise de regressão linear revelou que a equação da reta de melhor ajuste do gráfico de calibração foi $y = -3775,04 + 13595,58x$ com coeficiente de correlação (r) $0,9998$, sugerindo uma relação linear entre os dados cromatográficos e concentração do analito detectada, ou seja, que esse método produziu resultados que foram diretamente proporcionais à concentração do analito presente nas amostras (ANVISA, 2003; INMETRO, 2011).

Figura 15 – Reta da regressão linear da curva de calibração da curcumina em diferentes concentrações (5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 30,0; 35,0 40,0 e 50,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), sendo y a equação da reta

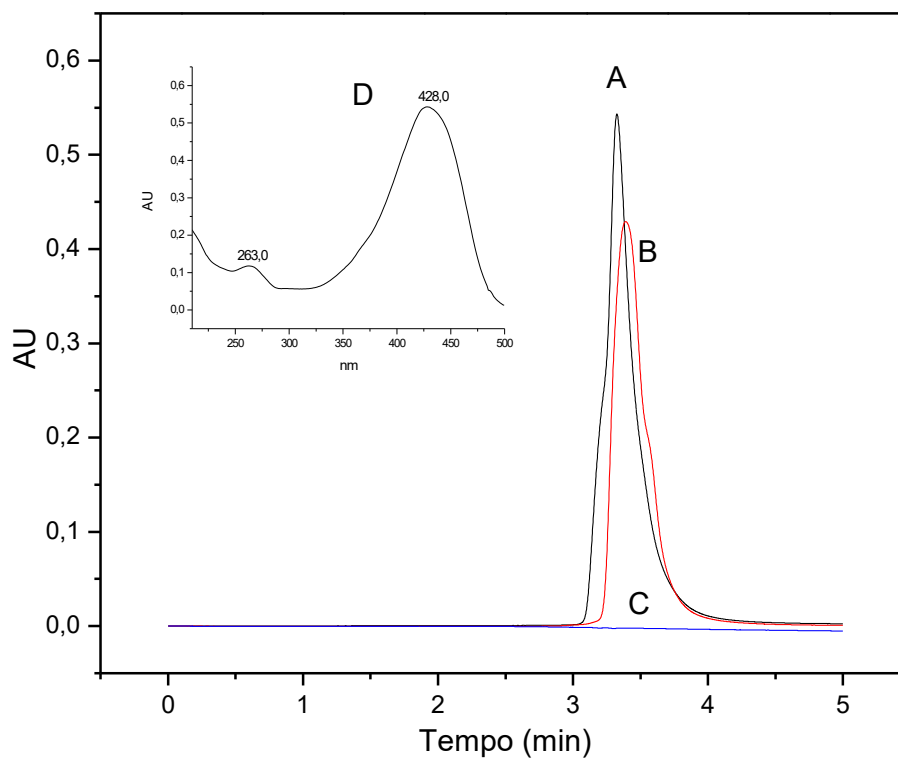


Logo, pode concluir-se que a curva de calibração por padrão externo para todos os analitos foram lineares nas faixas de concentrações estudadas. Não houve evidência de falta de ajuste e, conseqüentemente, os modelos de regressão linear foram adequados para a determinação de todos os analitos.

Na Figura 16, podemos observar a sobreposição dos picos cromatográficos de uma amostra padrão de Cur (A) e dos sobrenadantes oriundos das np's carregadas (B) e ainda o espectro (D) corroborando λ máximo em 428 nm. Ademais, o cromatograma obtido com o sobrenadante das np's vazias (C) não apresentou nenhuma absorvância no comprimento de onda da região $\lambda = 428$ nm.

Logo, ressalta-se que as demais substâncias utilizadas no processo de obtenção da nanoformulação não interferem na absorvância da Cur nesse comprimento e a curva de calibração pode ser utilizada na quantificação da molécula encapsulada e ou liberada pelas np's.

Figura 16 – Sobreposição dos cromatogramas: amostra do padrão de curcumina (A); sobrenadante de nanopartículas carregadas (B); sobrenadante de nanopartículas vazias (C) e espectro UV com λ máximo em 428 nm (D)



6.4 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE%)

Conforme demonstrado na Tabela 7, a EE% para Cur foi de aproximadamente 69% ($68,42 \pm 0,7$). Trabalhos nos quais np's lipídica foram desenvolvidas para carrear a Cur, apontam EE% com valores próximos ao obtido em nosso trabalho, 72% como o encontrado por Prabhu et al. (2016); Wang et al. (2018a) e 68% em Bhatt et al. (2018).

De acordo com o exposto por Muller, Mader e Gohla (2000); Mehnert e Mader (2012) as NLS são conhecidas por encapsular moléculas lipofílicas, como a Cur, em seu núcleo lipídico. Por outro lado, Andonova e Peneva (2018) pontuam que em função da organização estrutural das NLS, pode-se registrar baixa capacidade de retenção do composto, isso porque durante a formação das np's pode ocorrer completa cristalinidade da matriz lipídica com formação de estruturas muito ordenadas com pouco espaço para encapsulação.

Nesse sentido, como a Cur é uma substância lipofílica, pressupõe-se que a mesma teve solubilidade no lipídio fundido e, isso tenha favorecido a encapsulação da molécula na matriz lipídica (BEHBAHANI et al., 2017).

Doktorovova, Souto e Silva (2017) afirmam que no caso das NLS é possível que as moléculas lipofílicas possam também ser incorporados à superfície da partícula, além do aprisionamento no núcleo lipídio, conforme o observado por Noack, Hause e Mäder (2012). Nesse estudo os autores comprovaram por fluorescência a presença de moléculas de Cur dispersas na superfície e no interior da matriz das NLS.

Em suma, perante os resultados obtidos para os parâmetros: diâmetro médio, IPD, potencial zeta e a EE%, evidencia-se a possibilidade de utilizar o palmitato de metila como matriz lipídica e a eficácia do método homogeneização de alto cisalhamento para obtenção de NLS contendo Cur.

6.5 TESTES DE ESTABILIDADE DO SISTEMA NANOESTRUTURADO DE PALMITATO DE METILA MANTIDO EM SUSPENSÃO

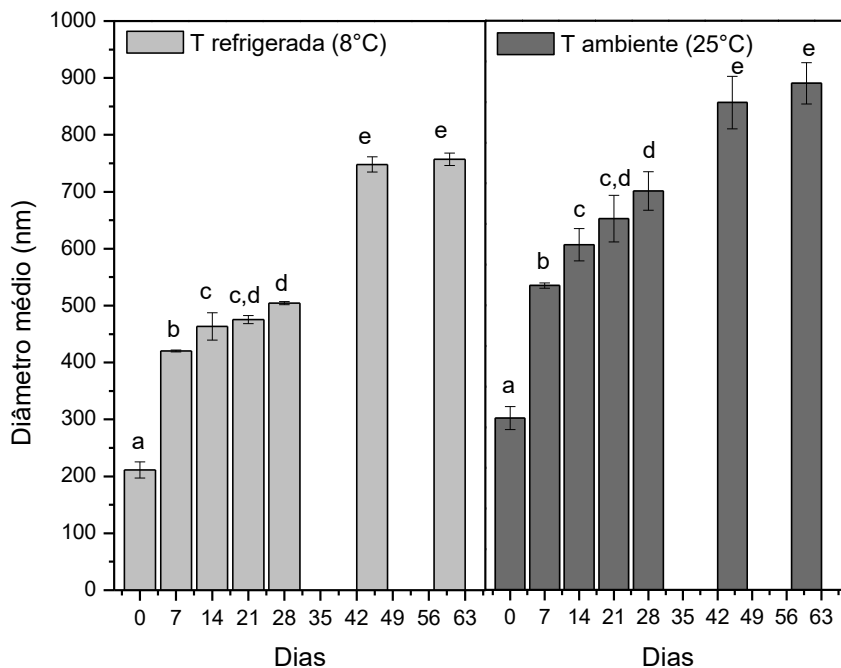
Os testes de estabilidade das amostras fornecem evidências se a nanoformulação e mais especificamente se os principais parâmetros físico-químicos podem variar ou não durante o período de estocagem em relação às diferentes condições de armazenamento.

Dessa forma, pode-se estabelecer qual melhor acondicionamento deve ser adotado para preservar as características do momento da preparação. Em relação a isso, os principais métodos de estocagem para os sistemas nanoestruturados são a liofilização e a nanosuspensão.

Como podemos observar na Figura 17, o diâmetro médio das amostras apresentou diferenças estatísticas a partir do 7º dia em ambas as condições de armazenamento (refrigerada: $200,0 \pm 4,01$ nm para $374,0 \pm 1,02$ nm e ambiente: $227,0 \pm 4,11$ nm para $474,0 \pm 1,76$ nm), muito possivelmente devido à formação de agregados, o que por sua vez, pode aumentar o tamanho das np's, demonstrando perda da estabilidade.

Esse aumento do diâmetro médio das np's também foi observado no trabalho conduzido por Prabhu et al. (2016) no qual as NLS contendo Cur após cinco dias de armazenamento à temperatura ambiente (25°C) passaram de 440 nm para 639 nm.

Figura 17 - Estabilidade das nanopartículas lipídicas sob diferentes condições de armazenamento (refrigerada e ambiente) para o parâmetro diâmetro médio (nm)



Os dados são apresentados na forma de média \pm DP para um conjunto amostral de $n = 3$. Médias sinalizadas com letras diferentes apresentam diferenças estatísticas para um nível de confiança de 95% pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

De fato, apesar das np's em suspensão serem utilizadas no transporte de drogas pouco solúveis em água, algumas apresentam baixa estabilidade física e química em suspensões aquosas mesmo com o uso de tensoativos (DU et al., 2015).

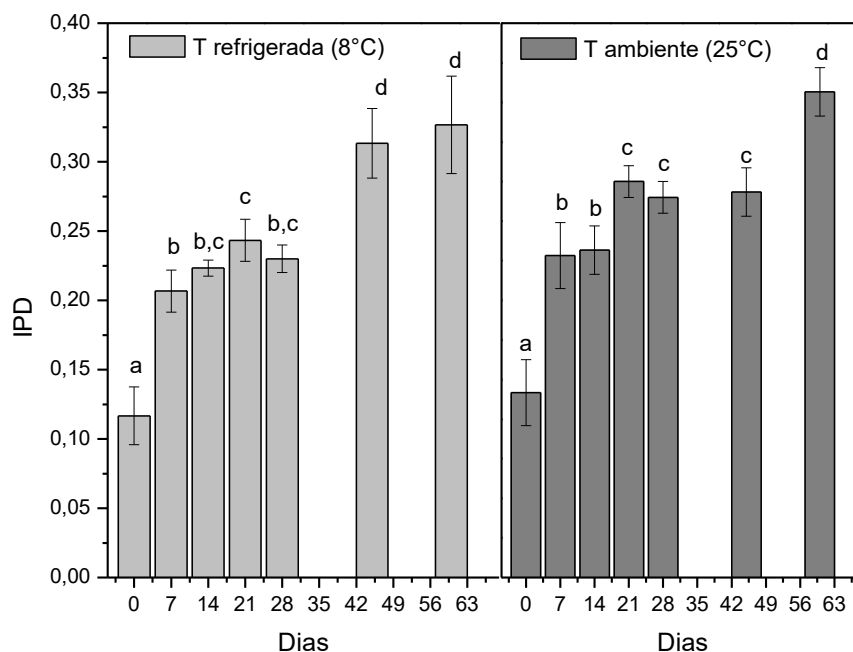
Em relação ao exposto acima, durante o armazenamento da NLS em suspensão, pode ocorrer um aumento do tamanho das np's, provavelmente em consequência do fenômeno no qual as partículas em suspensão tendem a se redissolver e depositar sua massa em partículas maiores, ocasionando formação e crescimento dos cristais lipídicos (MAKONI; KASONGO; WALKER, 2019).

Contudo, se levarmos em consideração o exposto por Fang, Nakamura e Maeda (2011) e Moghimi e Simberg (2018) enquanto o endotélio vascular é composto por fenestrações de tamanho entre 5 e 10 nm, nos tumores sólidos os neovasos têm fenestrações bem maiores e heterogêneas (100 a 800 nm). Dessa forma, as NLS de Cur desenvolvidas nessa pesquisa, sob acondicionamento refrigerado apresentaram diâmetro médio inferior a 800 nm, e poderiam ser utilizadas em futuros estudos de aplicação antitumoral.

A distribuição do tamanho das partículas deve ser tão estreita a fim de manter a homogeneidade do produto, assim valores de IPD menores que 0,3 indicam uma estreita distribuição de tamanho e, por outro lado, valores superiores a 0,3 indicam uma ampla distribuição de tamanho (CHO et al., 2013; DANAELI et al., 2018).

Em relação a esse parâmetro, na Figura 18, apesar do IPD das amostras apresentar diferenças estatísticas a partir do 7º dia em ambas as condições de armazenamento, observa-se que o IPD, sob a condição refrigerada 8°C, manteve-se dentro do limite aceitável até o final de 30 dias (IPD 0,24) e no acondicionamento ambiente 25°C até o período de 45 dias de estudo (IPD 0,28).

Figura 18 - Estabilidade das nanopartículas lipídicas sob diferentes condições de armazenamento (refrigerada e ambiente) para o parâmetro índice de polidispersão (IPD)



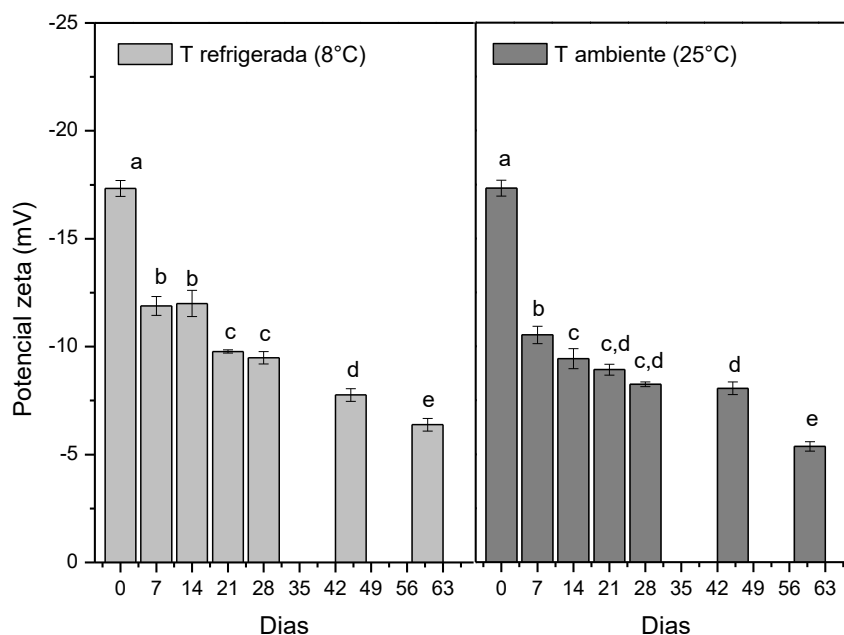
Os dados são apresentados na forma de média \pm DP para um conjunto amostral de $n = 3$. Médias sinalizadas com letras diferentes apresentam diferenças estatísticas para um nível de confiança de 95% pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

O potencial zeta é um parâmetro significativo para manter a estabilidade das np's em suspensão, por meio da repulsão eletrostática entre as partículas. Dessa forma, a estabilidade física das suspensões de np's pode ser garantida quando o potencial zeta encontra-se acima de ± 30 mV, no qual as np's encontram-se mais dispersas, ou seja, afastadas umas das outras evitando aglomerações (CLOGSTON e PATRI 2010).

Como podemos perceber na Figura 19, o potencial zeta das amostras apresentou diferenças estatísticas a partir do 7º dia, em ambas as condições de armazenamento. Além disso, observam-se em relação a esse parâmetro, valores decrescentes ao longo do estudo de estabilidade para ambas as condições de armazenamento.

Dessa forma, propõe-se que possivelmente, devido à ausência de repulsão eletrostática, houve formação de aglomerados ocasionando o aumento do diâmetro e IPD das np's, conforme observado nas Figuras 17 e 18.

Figura 19 - Estabilidade das nanopartículas lipídicas sob diferentes condições de armazenamento (refrigerada e ambiente) para o parâmetro potencial zeta (mV).



Os dados são apresentados na forma de média \pm DP para um conjunto amostral de $n = 3$. Médias sinalizadas com letras diferentes apresentam diferenças estatísticas para um nível de confiança de 95% pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Esse fenômeno de instabilidade física e química das NLS durante o período de estocagem, observado em nosso estudo, também foi reportado por Souto et al. (2011) e, segundo os autores, esse resultado pode estar associado ao aumento do tamanho e possível agregação das partículas lipídicas, além da expulsão do composto encapsulado.

No que diz respeito ao teor de Cur liberado pelas NLS em suspensão, mantidas sob as condições de armazenamento ambiente (25°C) e refrigerada (8°C), o mesmo foi avaliado mensalmente, por um período de sessenta dias, pelo método CLAE-DAD a partir da leitura do sobrenadante após centrifugação.

Desse modo, ao final do primeiro mês de estudo, obtivemos um percentual muito próximo de Cur liberada para ambas as condições: 5,48% \pm 1,15 (25°C) e 5,34% \pm 1,09 (8°C), diferentemente do obtido após sessenta dias: 9,00% \pm 0,82 (25°C) e 6,53% \pm 1,16 (8°C), totalizando respectivamente 14,48 e 11,87% de Cur liberada.

O motivo pelo qual há risco de expulsão dos compostos encapsulados durante o armazenamento das NLS pode acontecer devido ao elevado grau de cristalinidade da matriz lipídica adquirido durante a preparação das np's não ser mantido durante todo o período de estocagem (ANDONOVA e PENEVA 2018).

Esse fenômeno pode resultar na diminuição da solubilidade do composto na matriz e conseqüentemente expulsão do encapsulado (TALEGAONKAR e BHATTACHARYYA 2019). Além disso, a instabilidade pode acontecer durante o período de armazenamento das NLS, devido às transições entre as diferentes formas polimórficas da estrutura cristalina do lipídio (MEHNERT e MADER 2012; MAKONI; KASONGO; WALKER, 2019).

Como em nossa pesquisa o menor percentual cumulativo de Cur liberado ocorreu durante o armazenamento a 8°C, bem como verificou-se a instabilidade físico-química do sistema, as NLS de palmitato de metila eram preparadas e acondicionadas sob refrigeração um dia anterior a execução dos ensaios biológicos.

Em função dos resultados do estudo de estabilidade obtidos com as np's em suspensão, optamos por liofilizar as amostras para tentar contornar a instabilidade físico-química apresentada pelas NLS.

6.6 TESTES DE ESTABILIDADE DO SISTEMA NANOESTRUTURADO DE PALMITATO DE METILA APÓS LIOFILIZAÇÃO

Como na literatura científica não está estabelecido qual crioprotetor é utilizado durante a liofilização de NLS de palmitato de metila, foram conduzidos testes com diferentes crioprotetores (sacarose, trealose, maltose e manitol) em distintas concentrações (5%, 10% e 15%), com intuito de investigar qual desses apresentaria potencial para crioproteção do sistema nanoestruturado.

Diante dos resultados da liofilização, o manitol foi escolhido para evitar a desestabilização do nanosistema, devida sua reduzida higroscopicidade, falta de reatividade química (WANG et al., 2018b) e capacidade de diminuir a agregação das NLS, pois, interage com os grupos polares dos tensoativos

formando um biofilme de pseudo-hidratação com efeito plastificante (HAZZAH et al., 2015). Além disso, na presença dos demais crioprotetores não alcançamos um resultado favorável, ou seja, np's no estado sólido pulverulento.

Cabe ressaltar que as NLS foram liofilizadas utilizando diferentes concentrações de manitol (5%, 10% e 15%), porém nas duas últimas concentrações não foi possível ressolubilizar totalmente as amostras. Houve a formação de agregados durante o processo de secagem, isso porque na solução há baixo teor de água, alto teor de partículas e alta pressão osmótica (WANG et al., 2018b). Por outro lado, utilizando-se manitol 5% não encontramos esse problema, pois o produto seco foi redisperso totalmente.

As NLS ressuspendidas em solução de manitol 5% inicialmente tinham $238,31 \pm 1,34$ nm, IPD $0,14 \pm 0,03$ e potencial zeta de $-19,0 \pm 0,53$ mV e, após o processo de liofilização, apresentaram no tempo zero (t_0) diâmetro médio de $234,92 \pm 0,67$ nm, IPD $0,12 \pm 0,01$ e potencial zeta $-22,73 \pm 0,51$ mV (Tabela 10).

Tabela 10- Estabilidade das nanopartículas lipídicas de palmitato de metila contendo curcumina em relação aos parâmetros diâmetro médio (nm), índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta (mV), durante um período de cento e cinquenta dias.

| | Antes da liofilização | Após a liofilização (t_0) | 30 dias | 60 dias | 90 dias | 120 dias | 150 dias |
|----------------------------|-----------------------|-------------------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|----------------------|----------------------|
| Diâmetro médio (nm) | $238,31^{a\pm} 1,34$ | $234,92^{a\pm} 0,67$ | $238,62^{a,b\pm} 4,08$ | $235,26^{a\pm} 11,05$ | $242,74^{a,b\pm} 10,35$ | $272,43^{b\pm} 8,70$ | $261,63^{b\pm} 8,75$ |
| IPD | $0,14^a \pm 0,03$ | $0,12^{a\pm} 0,01$ | $0,13^{a\pm} 0,01$ | $0,12^{a\pm} 0,02$ | $0,27^{b\pm} 0,01$ | $0,28^{b\pm} 0,03$ | $0,25^{b\pm} 0,03$ |
| Potencial zeta (mV) | $-19,0^a \pm 0,53$ | $-22,73^{a\pm} 0,51$ | $-23,74^{a\pm} 1,41$ | $-22,76^{a\pm} 0,11$ | $-19,83^{b\pm} 0,60$ | $-19,53^{b\pm} 0,56$ | $-19,45^{b\pm} 0,78$ |

Os dados são apresentados na forma de média \pm DP para um conjunto amostral de $n = 3$. Médias sinalizadas com letras diferentes em uma mesma linha apresentam diferenças estatísticas para um nível de confiança de 95% pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Diante desses dados, constatou-se que as np's liofilizadas apresentaram diâmetro médio, IPD e potencial zeta com valores muito próximos do obtido pelas np's em suspensão, sugerindo que o processo de liofilização não descaracterizou esses parâmetros.

Além disso, observa-se na Tabela 10, que as NLS liofilizadas apresentaram ao término do estudo, diâmetro médio inferior a 300 nm, IPD menor que 0,3 e potencial zeta distante da neutralidade, comprovando o potencial do manitol para crioproteção e manutenção da estabilidade do sistema.

O processo de liofilização é uma maneira de aumentar a estabilidade física e química das NLS (WANG et al., 2018b), pois a transformação das np's em uma forma sólida impedirá o fenômeno de formação de cristais, que em solução tendem a se redissolver e depositar sua massa em partículas maiores (MEHNERT, 2001). Além disso, a liofilização permite que o produto final possa ser comercializado na forma de pastilhas, comprimidos ou cápsulas.

De fato, a instabilidade das np's em suspensão foi contornada e verificou-se que o processo de secagem forneceu um produto final em pó e, além disso, garantiu durante o período de estudo np's estáveis com vida útil prolongada por 150 dias.

Outros estudos também registraram essa manutenção dos principais parâmetros físico-químicos após a liofilização. Jourghanian et al. (2016) também utilizaram manitol 5% como crioprotetor para NLS contendo Cur e, após o processo de liofilização as np's que inicialmente possuíam 112 nm exibiram diâmetro médio de 163 nm.

Prabhu et al. (2016) desenvolveram NLS para carreamento de Cur e, de acordo com os autores, o processo de liofilização utilizando manitol não alterou inicialmente os parâmetros: diâmetro médio, IPD e potencial zeta das nanoformulações.

Contudo, em ambos os trabalhos mencionados, não foi feito um estudo temporal de estabilidade frente ao uso do crioprotetor, como o realizado nessa pesquisa, o qual colaborou com informes para a literatura científica, uma vez que, trabalhos com np's de palmitato de metila são escassos e ou pouco descritos.

6.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Nas Figuras 20 e 21, estão disponíveis as micrografias eletrônicas obtidas para as np's carregadas e vazias. É possível verificar a morfologia dessas partículas, as quais se apresentaram esféricas, com presença de alguns aglomerados.

A confirmação de um reduzido diâmetro médio é de suma importância, pois nesse caso, há possibilidade de maior coeficiente de difusão durante o transporte das np's, aliado ao fato de a morfologia esférica facilitar a migração das partículas do endotélio vascular para os tecidos, devido a elevada superfície de contato (CARBONI et al., 2014).

Pela MEV, as partículas (carregadas e vazias) apresentaram diâmetros próximos de 100 nm, inferiores ao diâmetro médio medido pelo equipamento de espalhamento dinâmico da luz, (*Dynamic Light Scattering*, DLS) que foi de 162,41 e 225,12 nm para as np's carregadas e vazias respectivamente.

Diferenças de tamanhos de NLS também foram reportadas por Wang et al. (2016) com NLS de Cur. O estudo apontou que pelo espalhamento de luz, o diâmetro médio obtido foi de 300 nm e, pela microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi de 200 nm.

Segundo Couvreur et al. (2002); Eaton et al. (2017); as diferenças nos valores obtidos através do DLS e MEV podem ser pelo fato que os princípios desses métodos são diferentes, no qual a microscopia fornece a imagem das partículas secas, de forma isolada, enquanto que a espectroscopia de correlação de fótons considera a camada de hidratação que envolve as partículas, determinando dessa forma, o raio hidrodinâmico dessas partículas em suspensão.

Dessa forma, sugere-se que através da técnica (MEV) foi confirmado o tamanho nanométrico das np's, comprovando juntamente com o registrado pela técnica DLS, que o método de homogeneização de alto cisalhamento foi eficaz na obtenção de NLS com diâmetro reduzido.

Figura 20 - Microscopia eletrônica de varredura de nanopartículas de palmitato de metila contendo curcumina

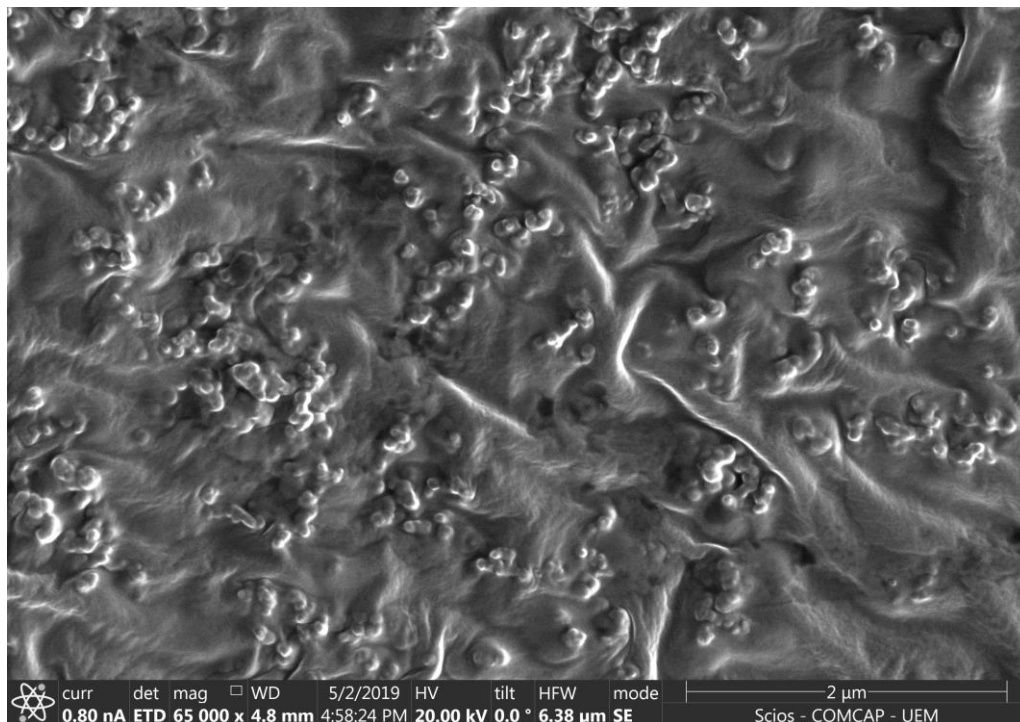
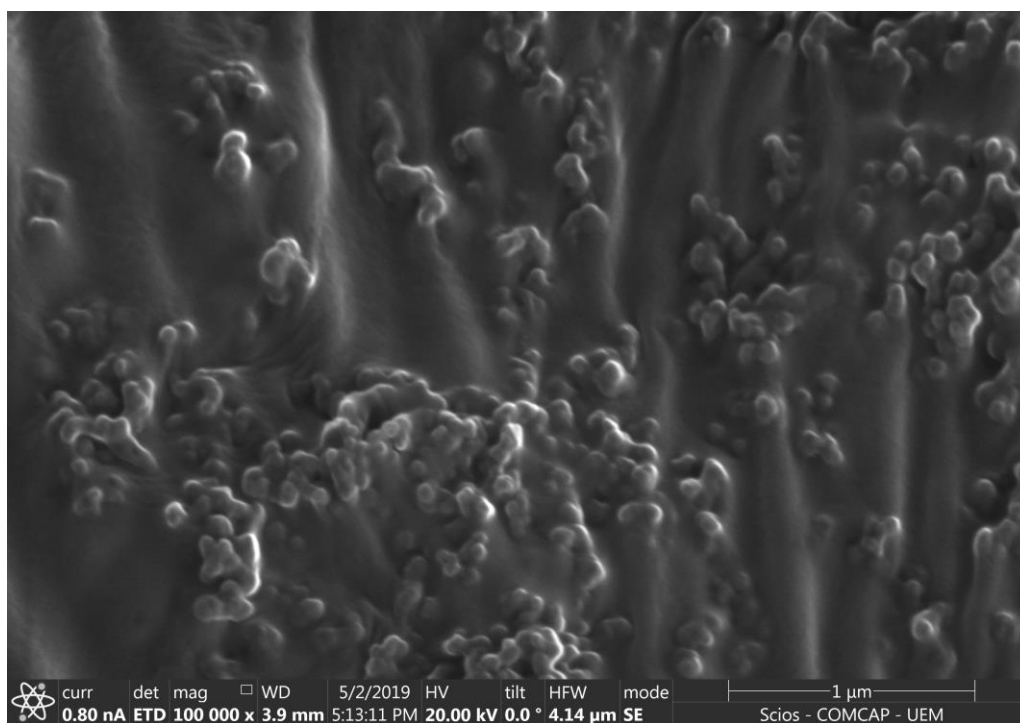


Figura 21 - Microscopia eletrônica de varredura de nanopartículas de palmitato de metila sem curcumina



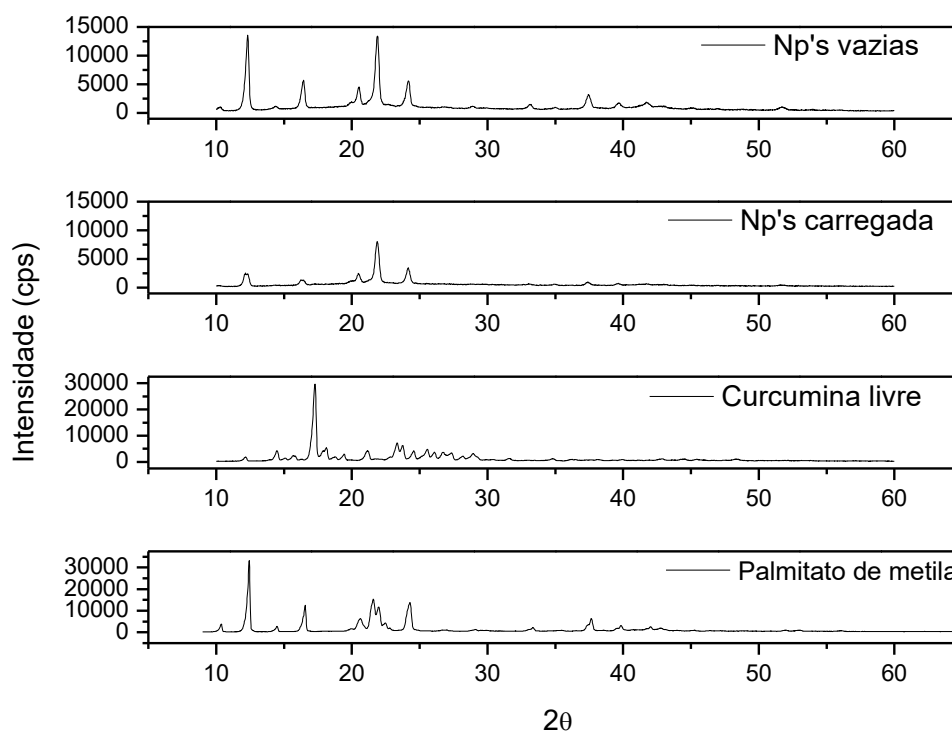
6.8 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DRX)

Os difratogramas da Cur, NLS vazias e NLS de Cur são mostrados na Figura 22, na qual é possível verificar a natureza cristalina da Cur e propor um perfil de polimorfismo das NLS vazias e carregadas.

O perfil de difração da Cur livre mostrou picos entre 10° e 30° , finos, típicos de compostos cristalinos, com pico estreito distinto em 17° , e corroborando esses resultados, Behbahani et al. (2017); Wang et al. (2018) também encontraram para a molécula livre a mesma característica descrita nessa pesquisa.

Além disso, observa-se que nos difratogramas das np's carregadas não foi possível observar os picos característicos da Cur livre, tais resultados corroboram o apresentado por Wang et al., (2012) e Malvajerd et al., (2018) que sugerem que essa característica dos difratogramas indica que a Cur foi solubilizada e incorporada na matriz lipídica dos nanossistemas carregados.

Figura 22- Perfil de DRX das nanopartículas vazias, nanopartículas carregadas, curcumina livre e lipídio palmitato de metila



Mulik et al., (2010) também reportaram diferença entre o padrão de difração da Cur livre em relação às NLS carregadas, reforçando que

possivelmente a Cur esteja aprisionada nos nanossistemas lipídicos sólidos em função de sua hidrofobicidade.

De fato, os picos característicos da Cur ausentes nas np's carregadas, sugere que o método de preparação e a presença do tensoativo não permitiram a cristalização da molécula após preparação das NLS (SHROTRIYA et al., 2017).

Cabe ressaltar que como o processo de obtenção das NLS requer a fusão prévia do lipídio sólido seguido do seu resfriamento, para formação das np's, a viscosidade das moléculas aumenta durante essa solidificação e, por consequência será mais difícil a acomodação das mesmas, e assim, haverá formação de cristais com diferentes conformações tridimensionais caracterizando um polimorfismo, oriundo do fenômeno de recristalização do lipídio (Souto et al., 2011).

Essas formas polimórficas podem ser identificadas por padrões de difração de raios X, já que cada polimorfo tem seu próprio padrão de difração. Assim os lipídios podem cristalizar em estrutura desordenada do tipo α (hexagonal) e durante o armazenamento as moléculas lipídicas podem gradualmente ser arranjadas nos estados polimorfos: β (triclínica) ou β' (ortorrômbica) mais ordenados do que forma polimórfica α (TALEGAONKAR; BHATTACHARYYA, 2019).

Segundo Souto, Mehnert e Müller (2006); Lee et al. (2007); Windbergs, Strachan e Kleinebudde (2009) e Gordillo-galeano e Mora-huertas (2018), picos existentes entre 19° e 23° reportam para a presença de estruturas polimórficas β (triclínica) ou β' (ortorrômbica). Nesse sentido, os picos de ocorrência entre 21° e 23° que foram registrados nesse trabalho, tendem a indicar a presença desses tipos de polimorfismo nas NLS. Propõe-se que esse fenômeno poderia justificaria a expulsão da Cur que foi observado durante o armazenamento das np's em suspensão (item 6.5) (MEHNERT e MADER 2012; MAKONI; KASONGO; WALKER, 2019).

Ademais, tanto vazias quanto as carregadas, as np's apresentaram o mesmo perfil de caracterização com cinco principais picos dispostos entre 10° e 30° . Tal característica está de acordo com os resultados encontrados por Wang, Zhu e Xie (2012) que apontam que a adição da Cur nas np's não alterou

a natureza das NLS, ou seja, manteve o padrão de formação com recristalização do lipídio e aprisionamento do composto ativo.

No entanto, apesar de apresentarem padrões similares na caracterização por DRX, as np's vazias apresentaram intensidade superior dos picos dispostos no difratograma e, segundo Malvajerd et al., (2018), isso ocorre devido ao fato de a Cur estar intercalada entre as partes da rede cristalina do lipídio, levando a uma menor cristalinidade da matriz lipídica da formulação que contém Cur em relação à cristalinidade do lipídio na ausência da Cur.

Comparando o difratograma do lipídio puro com ambas nanoformulações (vazias e carregadas), pode-se notar que nessas o índice de cristalinidade é mais baixo, sugerindo que o método de obtenção das NLS foi determinante na diminuição dessa cristalinidade do palmitato de metila.

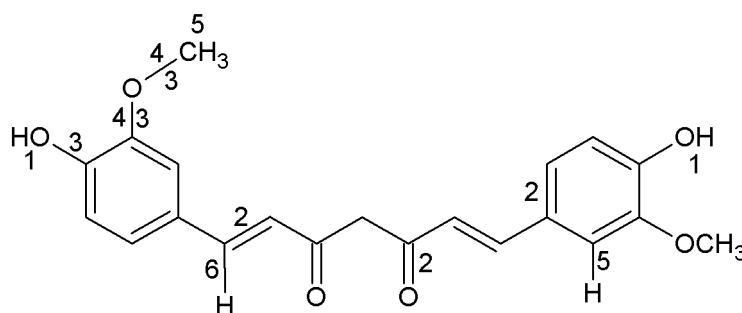
Por fim, Gumireddy et al. (2019) sugere que obter NLS com cristalinidade diminuída pode melhorar a solubilidade da Cur em relação à molécula não encapsulada e permitir via liberação prolongada maior ação biológica.

6.9 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Os grupos funcionais das amostras analisadas estão dispostos na Tabela 11. Observa-se que a Cur livre apresentou bandas características as quais estão de acordo com o reportado por (ROMPICHARLA et al., 2017; WANG et al., 2018; SHARMA; SHARMA; WADHWA, 2019) entre as quais, podemos destacar as bandas dos grupos funcionais: cetona, fenol e éter característicos dessa molécula (Figura 23).

Tabela 11 - Número de onda e os respectivos grupos funcionais da amostra curcumina livre

| Posição | Número de onda | CURCUMINA |
|---------|-----------------------------|---|
| 1 | 3550-3200 cm ⁻¹ | Estiramento das ligações O-H da hidroxila do fenol; |
| 2 | 1600-1400 cm ⁻¹ | Estiramento das ligações C=C do fenol; Estiramento das ligações C=C da cadeia alifática; Forte banda de estiramento das ligações C=O dos grupos cetônicos com conjugação C=C; |
| 3 | 1300-1100 cm ⁻¹ | Estiramento das ligações C-O do fenol; Forte banda resultante da interação entre C-O do éter; Estiramento assimétrico das ligações C-O-C dos grupamentos éter; |
| 4 | 1020-1075 cm ⁻¹ | Estiramento simétrico das ligações C-O-C dos grupamentos éter; |
| 5 | 810-750 cm ⁻¹ | Deformação angular das ligações C-H do grupamento éter e do anel aromático; |
| 6 | 1000 e 650 cm ⁻¹ | Deformação angular das ligações C-H dos grupos vinil; |

Figura 23 - Estrutura da curcumina com as respectivas posições das bandas elencadas na Tabela 11

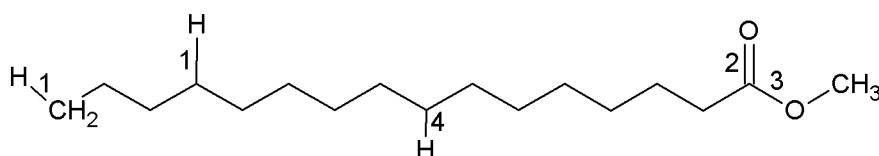
Na Tabela 12, estão apresentadas as principais bandas presentes no espectro de FTIR do lipídio puro, o qual está evidenciado a ocorrência de bandas específicas como, por exemplo, as bandas correspondentes aos estiramentos do ânion carboxilato de éster, sendo que esses resultados

corroboram com o exposto por Xu et al., (2014). A representação dessas bandas se encontra na Figura 24.

Tabela 12 - Número de onda e os respectivos grupos funcionais da amostra palmitato de metila

| Posição | Número de onda | PALMITATO DE METILA |
|---------|----------------------------|--|
| 1 | 3000-2850 cm^{-1} | Estiramento assimétrico das ligações C-H dos grupos CH_3 e CH_2 ; Estiramento simétrico das ligações C-H dos grupos CH_3 e CH_2 ; |
| 2 | 1730-1715 cm^{-1} | Estiramento das ligações C=O de éster saturado e alifático; |
| 3 | 1300-1050 cm^{-1} | Estiramento das ligações C-O de éster saturado e alifático; |
| 4 | 900-700 cm^{-1} | Deformação angular de ligações C-H; |

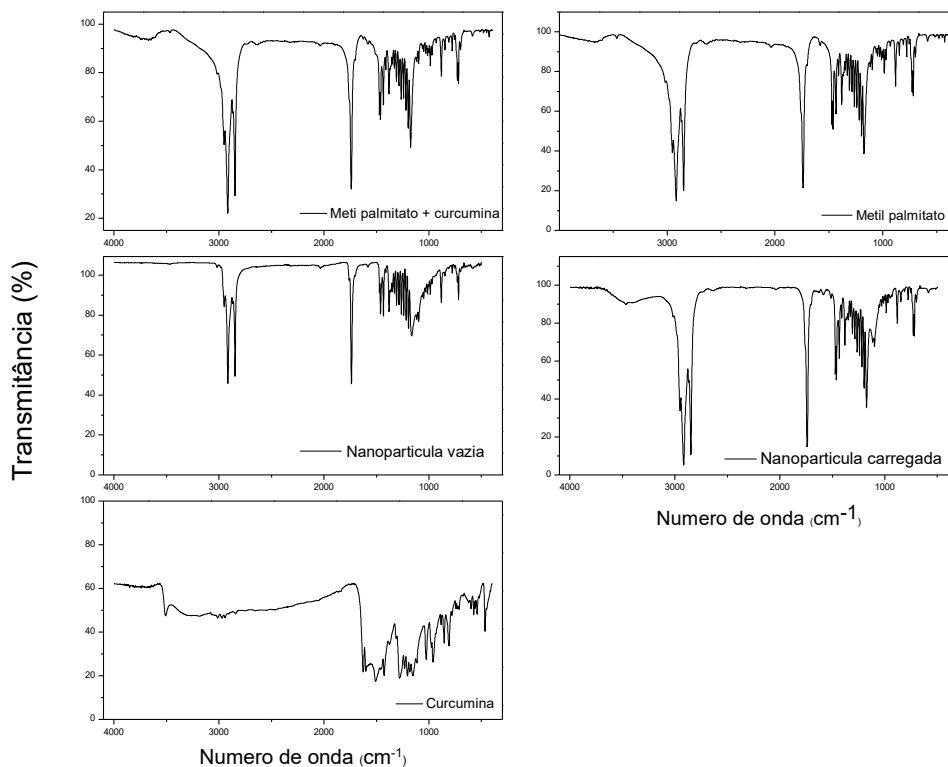
Figura 24 - Estrutura do palmitato de metila com as respectivas posições das bandas elencadas na Tabela 12



Os espectros na região do infravermelho das np 's vazias; carregadas; mistura física (Cur + palmitato de metila); Cur livre e palmitato de metila estão representados na Figura 25. Com relação ao espectro das np 's vazias, é possível observar que as bandas se apresentaram correspondentes às encontradas no espectro do palmitato de metila. Isso sugere que durante o processo de obtenção das np 's não ocorreu nenhuma interação química que pudesse modificar os grupos funcionais caracterizados.

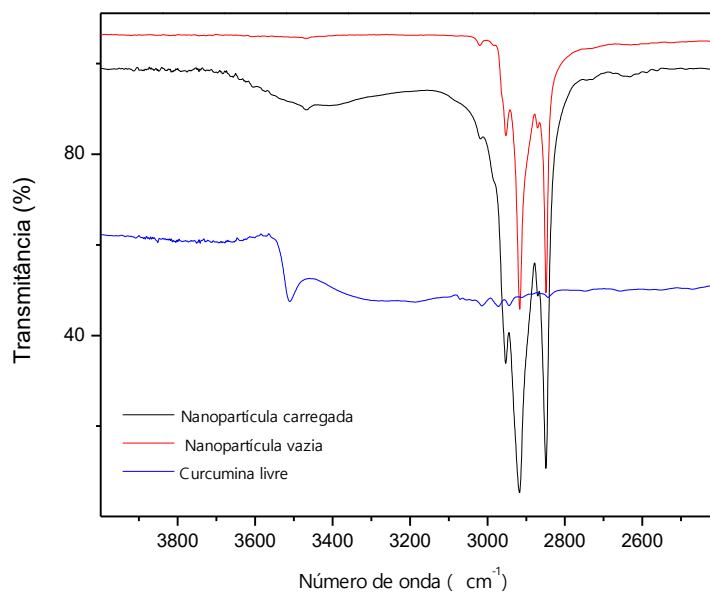
Além disso, no espectro do lipídio, comparado com o da mistura física é possível averiguar bandas referentes ao palmitato de metila e a Cur livre, em 3500 cm^{-1} , a qual se apresentou em baixa intensidade, provavelmente devido a proporção de Cur em relação à concentração de lipídio.

Figura 25 – Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) das nanopartículas vazias, carregadas, mistura física (curcumina + palmitato de metila), curcumina livre e palmitato de metila



Por fim, em referência aos espectros das np's carregadas e vazias, não foram observadas diferenças nos perfis das bandas, com exceção à banda 3500 cm^{-1} correspondente ao estiramento da ligação (O-H) da hidroxila livre do fenol que aparece no espectro da Cur livre e sutilmente no das np's carregadas e, por outro lado, não foi encontrado no espectro das np's vazias, conforme Figura 26. Isso sugere que as NLS carregadas continham Cur.

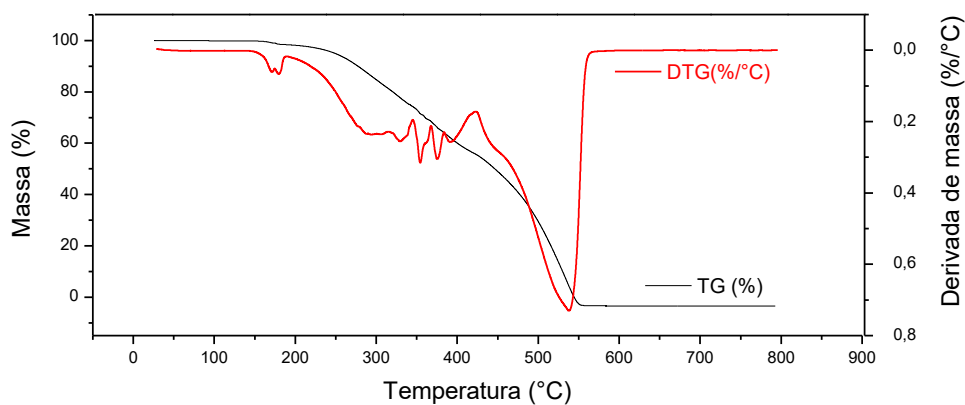
Figura 26- Espectrograma da curcumina livre e nanopartículas carregadas e vazias em região selecionada (3500 cm^{-1})



6.10 ANÁLISE TÉRMICA

A primeira modificação da massa da Cur, em decorrência do aumento gradual da temperatura, teve início em 142°C e tem seu término marcado em aproximadamente 173°C . Essa mudança representa um percentual de 1,5% na perda de massa conforme curva DTG (Figura 27) e possivelmente está relacionada à fusão da molécula (CHIRIO et al., 2019).

Figura 27- Análise termogravimétrica (TG) e derivada (DTG) da curcumina livre



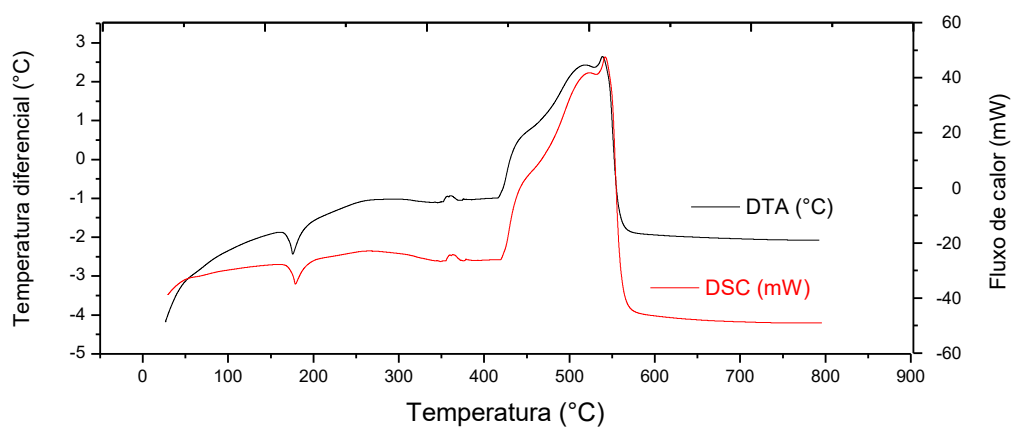
Em temperaturas superiores a 173°C, após o término da fusão, inicia-se o processo de decomposição térmica da Cur, sendo esse dado também reportado por Ramalingam et al., (2016) e Behbahani et al., (2017). Nessa decomposição foi evidente a perda de massa principalmente em duas principais etapas.

A primeira (173°C – 300°C) correspondeu à perda de 14% da massa da molécula e, de acordo com Chen et al. (2014), esse estágio é devido à decomposição dos grupos substituintes da Cur. A segunda etapa (300°C – 540°C) referente à degradação total corresponde à decomposição das estruturas aromáticas da Cur e decomposição oxidativa do material orgânico (CHEN et al., 2014).

É importante destacar que no início da segunda etapa de degradação, nas temperaturas que variam entre 300 e 415°C, estão dispostos picos de menores intensidades em TG e DTG que possivelmente podem estar atribuídos à rearranjos moleculares. Isso pode ser confirmado com dados da curva DTA/DSC em que o início do pico exotérmico referente às decomposições ocorre em 415°C.

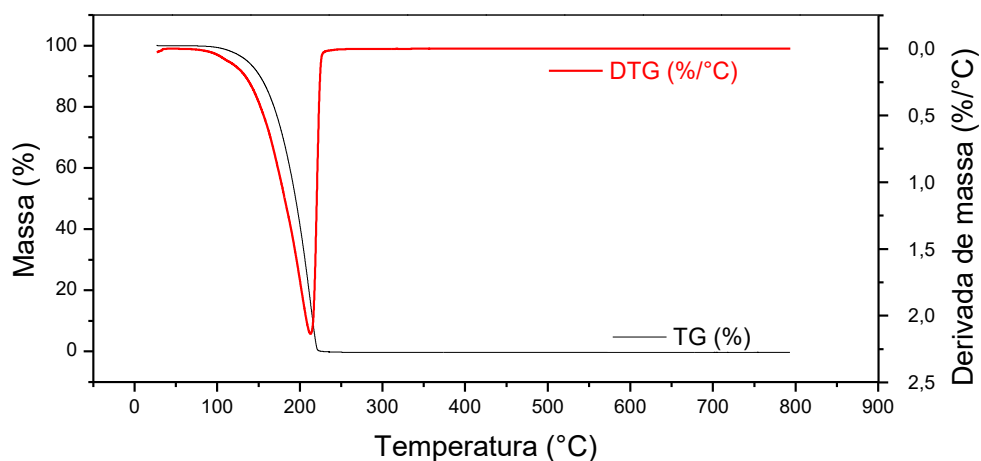
Tais afirmativas podem ser corroboradas na curva DTA para a Cur (Figura 28), na qual é possível verificar a presença do pico endotérmico associado à fusão da molécula em 173°C. Tais dados encontram-se em acordo com o apresentado por Jourghanian et al. (2016), no qual a curva TG da Cur também demonstrou temperatura de fusão em 173°C. De acordo com o reportado por Shrotriya et al., (2017), a transição de fusão marcada em um único pico endotérmico pode ser um indicativo da natureza cristalina da Cur.

Figura 28- Análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) da curcumina livre



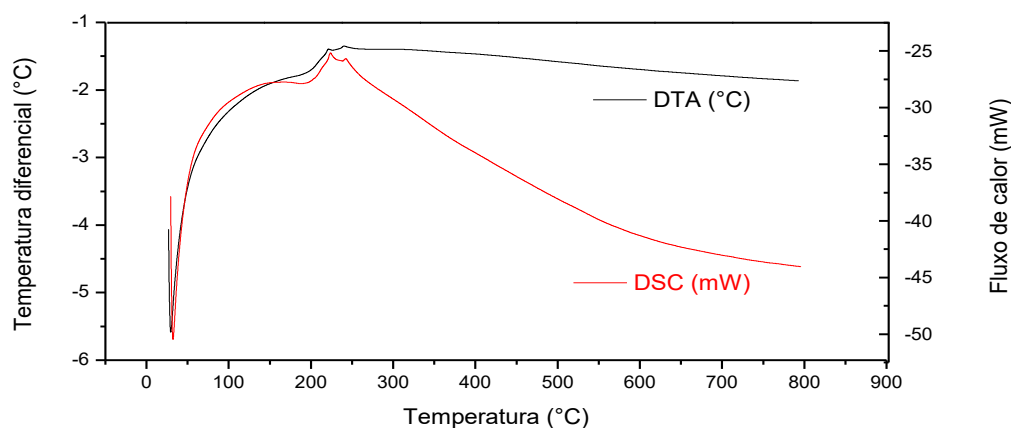
Na sequência, estão apresentadas as curvas TG/DTG do lipídio do palmitato de metila (Figura 29). Na curva TG está evidenciado apenas um declínio de perda de massa que representa a decomposição térmica da massa total do composto analisado. A partir do pico da curva DTG, é possível notar que a degradação térmica desse lipídio se inicia na temperatura de 100°C e tem o seu término marcado na temperatura de 220°C.

Figura 29- Análise termogravimétrica (TG) e derivada (DTG) do palmitato de metila



As curvas DTA e DSC para o palmitato de metila (Figura 30) iniciam com o pico endotérmico referente à fusão em 30°C, sendo que esse dado também foi reportado por Saeed et al. (2017) e Chanwattanakit et al., (2019).

Figura 30- Análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) do palmitato de metila

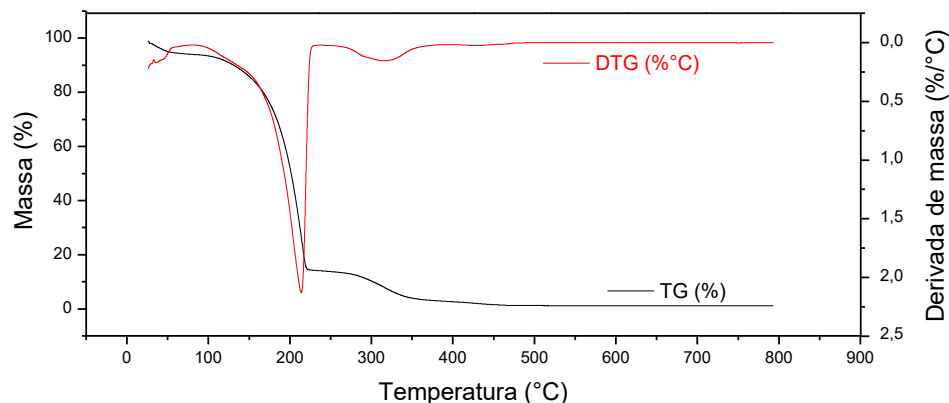


Na temperatura correspondente à fusão do palmitato de metila (30°C) não foi registrado em TG/DTG nenhum pico de perda de massa, como ocorreu para a Cur. Isso pode ser justificado devido ao caráter hidrofóbico do lipídio e ausência de água ligada em meio à estrutura cristalina desse composto (SAEED et al., 2017).

Além disso, nas curvas DSC/DTA do palmitato de metila é possível observar em 220°C, a ocorrência de um pico exotérmico correspondente a decomposição térmica, que estão de acordo com os dados obtidos em TG/DTG.

Na Figura 31 estão apresentadas as curvas TG/DTG para as np's carregadas. O perfil de decomposição e perda de massa ocorreu em duas etapas, sendo que a primeira (110°C - 220°C) correspondeu a 85% de perda massa e a segunda etapa (220°C - 460°C) foi responsável por atingir a completa degradação.

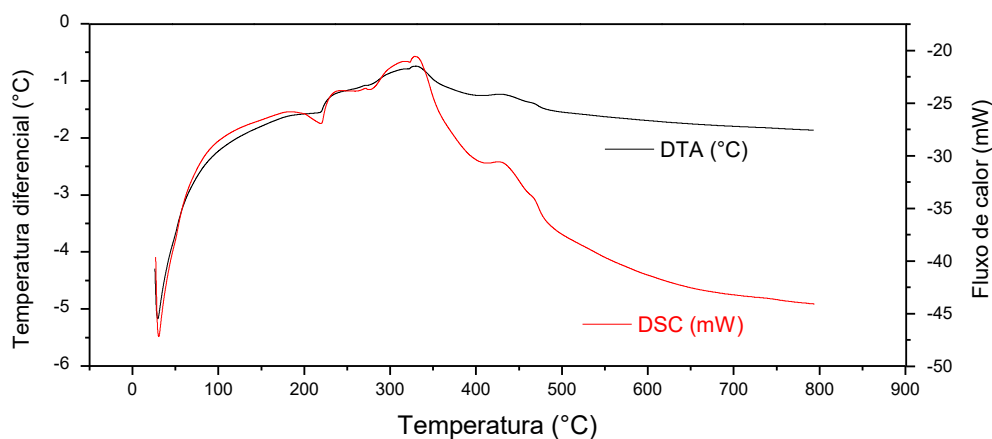
Figura 31- Análise termogravimétrica (TG) e derivada (DTG) das nanopartículas carregadas



Os perfis de DTA/DSC das np's carregadas e np's vazias (Figuras 32 e 34) são similares ao apresentado para o lipídio puro, no entanto, após pico endotérmico de fusão, observam-se entre 100°C e 450°C, para as np's (vazia e carregada) regiões diferentes às do lipídio puro, as quais, segundo Ferreira; Lima e Zanotto (2010) podem estar relacionadas à presença dos outros componentes da formulação solubilizados no lipídio.

Cabe ressaltar que nas np's carregadas não foi obtido o pico endotérmico referente à fusão da Cur e, segundo Shrotriya et al., (2017); Behbahani et al., (2017) e Malvajerd et al. (2019) isso pode estar relacionado à transição do estado cristalino para um estado amorfo e da encapsulação da Cur na matriz lipídica das np's.

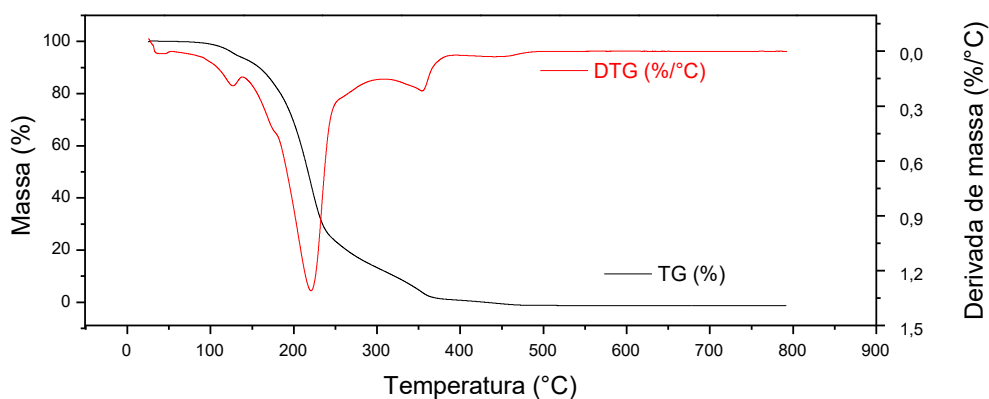
Figura 32- Análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) das nanopartículas carregadas



Sobre esse resultado, Yan et al, (2011) ressalta que transformar o estado cristalino de um composto para a forma amorfa ou parcialmente amorfa leva a uma condição de alta energia e alta desordem, resultando em maior solubilidade do composto.

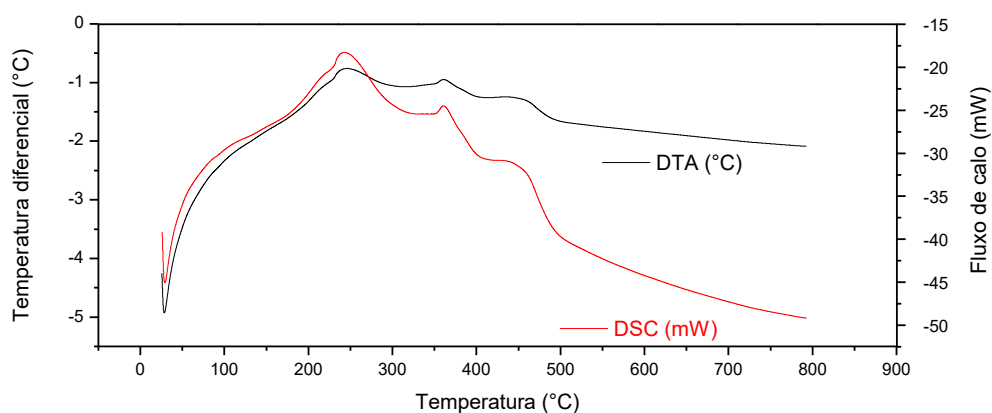
Na Figura 33 estão dispostos os perfis DTG/TG das np's vazias. Na curva DTG é possível visualizar três diferentes momentos referente à degradação térmica da amostra. A primeira apresenta um pico de perda de 10% de massa com início em 28°C até 138°C, o segundo momento (138°C a 300°C) com 70% de perda de massa e o terceiro (300°C a 500°C) até completa degradação.

Figura 33- Análise termogravimétrica (TG) e derivada (DTG) das nanopartículas vazias



De forma análoga às curvas representadas no DTA/DSC das np's carregadas, as curvas DTA/DSC das np's vazias (Figura 34) evidenciaram o processo de fusão através do pico endotérmico em 28°C e regiões exotérmicas referentes às etapas subsequentes de oxidação da matéria orgânica.

Figura 34- Análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) das nanopartículas vazias



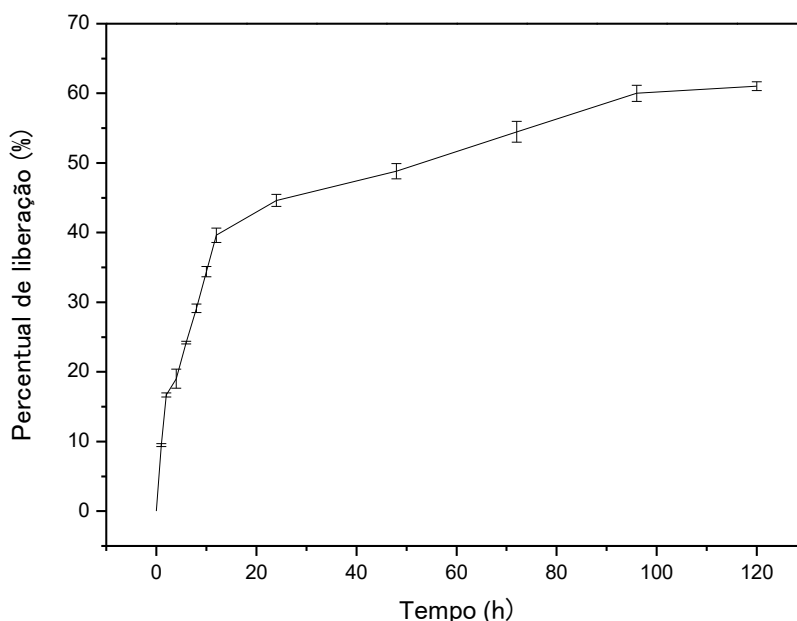
Contudo, NLS carregadas mostraram um pico endotérmico a 32°C, enquanto NLS livres de Cur mostraram um pico endotérmico a 28°C. Uma hipótese para essa alteração da temperatura de fusão observada pode ter ocorrido devido à incorporação da Cur na matriz lipídica (GUMIREDDY et al., 2019).

Além disso, o pico endotérmico correspondente a fusão do palmitato de metila (30°C) foi ligeiramente alterado em NLS vazias e carregadas por causa da transformação do lipídio em uma forma de np's e a presença do tensoativo, Cur e aditivos de formulação (Ramalingam et al., 2016).

6.11 PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DA CUR A PARTIR DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS NO TFS

O perfil de liberação da Cur a partir das NLS foi avaliado e o resultado está apresentado (Figura 35). Um perfil de liberação bifásico é observado, caracterizado por uma fase de liberação inicial rápida, que foi lançada cerca de 40% ± 1,0 da Cur em 12h, e uma fase sustentada, que liberou cerca de 20% ± 0,8 da Cur após 120h.

Figura 35 - Perfil de liberação da curcumina a partir das nanopartículas de palmitato de metila no tampão fosfato salino (TFS) 10 mmol.L⁻¹, pH 7,4 por 120 horas, à 37°C e 150 rpm



A liberação inicial rápida está associada com o efeito *burst*, que pode ser explicado como a quantidade de composto, que possa ter ficado aderido externamente à matriz, conforme demonstrado no estudo de Hasan et al. (2019).

Enquanto a segunda fase era prolongada, e isso pode estar relacionado à lenta liberação da Cur da matriz lipídica (MEHNERT e MÄDER, 2012; MUÉLLER, MADER e GOHLA, 2000). Outros estudos também demonstraram essa liberação prolongada da Cur a partir de NLS (TANG et al., 2016; ROMPICHARLA et al., 2017; RAPALLI et al., 2020).

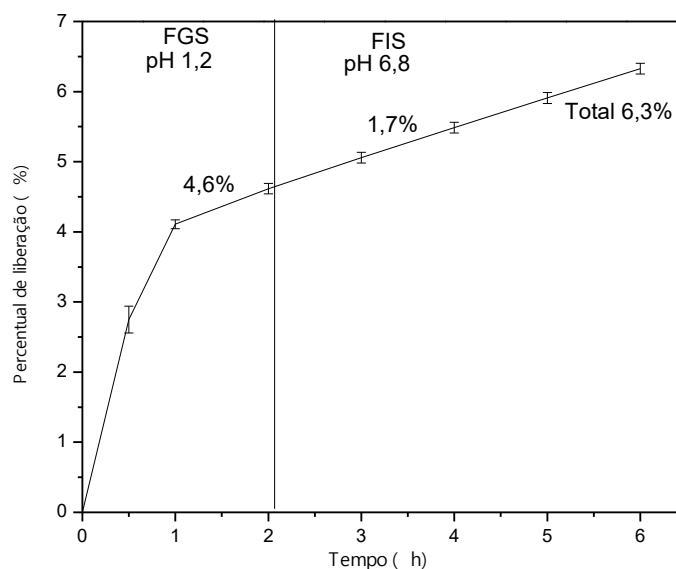
A liberação sustentada colabora com a manutenção da concentração plasmática efetiva da Cur, evitando o efeito da baixa biodisponibilidade, que ocorrer pela instabilidade da molécula em solução aquosa e meio fisiológico. Esse resultado confirma o que se observou nos ensaios biológicos *in vitro* efetuados, como antioxidante e antifúngico (itens 6.13 e 6.14), nos quais a atividade da Cur manteve-se em relação ao tempo, comprovando a manutenção da liberação sustentada.

6.12 PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DA CUR A PARTIR DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS NOS FGS E FIS.

A Figura 36 apresenta o perfil de liberação da Cur a partir de np's palmitato de metila *in vitro* nos FGS e FIS, por 6 horas a 37°C.

Como podemos observar na Figura 36, as NLS liberaram em meio as variações de pH, um baixo percentual de Cur (6,3%), ocorrendo uma maior liberação da molécula ($4,6\% \pm 0,4$ em duas horas) em meio gástrico pH 1,2, em relação ao quantificado em meio intestinal pH 6,8 ($1,7\% \pm 0,6$ em 4 horas).

Figura 36 - Perfil de liberação *in vitro* das nanopartículas de palmitato de metila contendo curcumina no FGS (pH 1,2) por 2 horas, e após no FIS (pH 6,8) por 4 horas, à 37°C e 150 rpm.



Esse reduzido percentual de liberação sugere que as NLS de palmitato de metila protegeram a liberação precoce de Cur no trato gastrointestinal, uma vez que mais de 90% da concentração do composto foi retido pelas np's.

Ademais, pela composição lipídica das np's é possível o transporte linfático, com a manutenção de moléculas lipofílicas na corrente sanguínea por um tempo prolongado (PALIWAL et al., 2009; YAO; XIAO; MCCLEMENTS, 2014) e presumivelmente maior alcance terapêutico.

Yan et al. (2011) elaboraram NLS para carreamento da Cur, as quais apresentaram rápida dissolução da matriz frente as mudanças de pH, uma vez

que, mais de 90% da Cur foi liberada dentro de cinco minutos em meio gástrico, portanto, diferentemente do obtido nesse trabalho, o sistema nanoestruturado não apresentou estabilidade.

NLS de Compritol ATO 888[®] revestidas com caseinato de sódio e pectina, contendo Cur, foram desenvolvidas por WANG et al. (2016a) e, apresentaram no total de seis horas um cumulativo de liberação gastrointestinal da molécula muito superior (40%) ao encontrado em nosso trabalho, porém, comparado ao obtido em nossa pesquisa, as NLS também exibiram perfil de liberação prolongada durante o ensaio.

Righeschi et al. (2016) utilizaram o mesmo lipídio citado acima para desenvolver NLS contendo Cur. Nesse estudo foi simulado apenas a condição intestinal, na qual obtiveram um perfil de liberação com percentual cumulativo de 60% em 12 horas. Esse resultado foi atribuído à presença de enzimas e sais biliares, os quais promoveram a degradação da matriz lipídica e uma pronunciada liberação da Cur.

Objetivando melhorar a absorção intestinal da Cur por meio de CLN, Tian et al. (2017) obtiveram no total de 24 horas um perfil de liberação controlada e sustentada da molécula na região alvo. O percentual cumulativo foi de aproximadamente 70%. Apenas 5% da Cur foi liberada nas primeiras duas horas (meio gástrico), enquanto que, no fluido intestinal o restante foi sendo liberado lentamente. Segundo os autores, a formulação desenvolvida pode ser utilizada como estratégia para aumentar a biodisponibilidade oral da Cur.

Cabe ressaltar que há uma vantagem em utilizar NLS em sistemas de administração oral, uma vez que, após a absorção intestinal, considera-se que as np's lipídicas transferem-se favoravelmente para a linfa, o que por sua vez, pode diminuir o efeito de primeira passagem e assim aumentar a biodisponibilidade oral do composto ativo (CHAUDHARY et al., 2014)

As condições fisiológicas inerentes ao trato gastrointestinal impõem basicamente dois critérios para que os sistemas nanocarreadores sejam eficientes na administração oral de fármacos ou outros compostos ativos. Devem ser resistentes à degradação por ação de enzimas e ou pH, e o composto encapsulado nas partículas deve apresentar eficiente permeabilidade

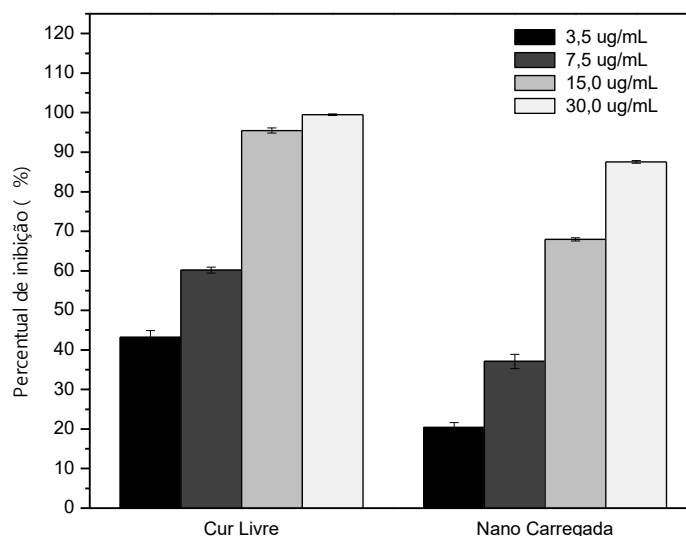
e absorção intestinal para que possa atingir a circulação sistêmica e ser terapeuticamente ativo (AUGUSTIJNS et al., 2014; ASHFORD, 2017).

De fato, sugere-se a eficácia das NLS de palmitato de metila para o carreamento da Cur no que tange não apenas às alterações de pH, mas também proteção à ação hidrolítica das enzimas utilizadas nesse ensaio. Da mesma forma, aponta-se ainda, indícios de estabilidade dessas np's como veículo para administração da Cur, aumentando assim sua absorção. Isso foi comprovado, pois no ensaio farmacocinético (item 6.17), a Cur apresentou superior biodisponibilidade quando veiculada nas np's.

6.13 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE SOBRE UM MODELO DE GERAÇÃO DE ABTS^{•+}

A atividade antioxidante sobre o ABTS^{•+} das NLS carregadas e vazias foi investigada e comparada com a Cur livre. Na Figura 37, estão representados os percentuais de inibição do ABTS^{•+} para as NLS carregadas e Cur livre. Cabe ressaltar que as NLS vazias, não apresentaram capacidade antioxidante.

Figura 37 - Percentual de inibição do radical ABTS^{•+} para curcumina livre (3,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 7,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 15,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 30,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e nanopartículas de palmitato de metila carregadas com curcumina (3,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 7,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 15,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 30,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), por 30 min de incubação em tampão fosfato salino (TFS) 10,0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,4, à 37°C.



Em todas as concentrações as médias das amostras apresentam entre si diferenças estatísticas para um nível de confiança de 95% pelo teste ANOVA + pós Tukey ($p < 0,05$).

Observa-se que a Cur livre, nas concentrações de 3,5; 7,5; 15,0 e 30,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentou respectivamente: $43,0 \pm 2,0\%$; $60,0 \pm 0,7\%$; $95,0 \pm 0,6\%$ e $99,0 \pm 0,2\%$ de inibição do $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Dessa forma, a ação antioxidante da Cur livre foi proporcional ao aumento das suas concentrações, atingindo praticamente inibição total em 30,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Além disso, o IC50 foi alcançado na concentração de 4,86 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Cur livre.

Apesar de a Cur apresentar aplicabilidades biológicas multifuncionais, uma das principais e a mais descrita é a atividade antioxidante, devido ao seu grande número de substituintes hidroxilados (AK E GÜLÇİN 2008). Dessa forma, a ação antioxidante da Cur é notável tanto sobre espécies reativas de oxigênio (ERO's), bem como sob radicais artificiais como DPPH e $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e, sobre modelos *in vivo* de dano oxidativo (ASOURI et al., 2013; GAZAL et al., 2014; MOŁOVSKÁ et al., 2016; ERTURK et al., 2018).

Em referência à essa ação, Cheung; Nigam; Owusu-Apenten (2016) testaram *in vitro* a atividade antioxidante da Cur livre, solubilizada em metanol, frente ao $\text{ABTS}^{\bullet+}$ por 30 minutos e, diferentemente do obtido em nosso trabalho, foi necessária uma concentração maior (7,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de Cur para atingir o IC50.

Em relação à atividade das np's, observa-se que as NLS contendo Cur, exibiram atividade antioxidante dose dependente, pois nas concentrações de 3,5; 7,5; 15,0 e 30,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentaram respectivamente $20,0 \pm 1\%$; $37,0 \pm 2\%$, $68,0 \pm 0,4\%$ e $88,0 \pm 0,3\%$ de inibição do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (Figura 37). Ademais, o IC50 foi alcançado na concentração de 12,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Cur nas NLS.

Observa-se que as np's atingiram quase 90,0% de inibição na concentração de 30,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, demonstrando dessa forma, que o processo de encapsulação da Cur pelo lipídio não afetou suas propriedades antioxidantes. De fato, constata-se que tanto a Cur livre como as NLS carregadas, exibiram um crescente perfil de inibição do $\text{ABTS}^{\bullet+}$, proporcional ao aumento das concentrações utilizadas.

Wang et al. (2016a) averiguaram a atividade antioxidante de NLS contendo Cur e em todas as concentrações utilizadas (0,1; 1,0 e 10,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) as NLS de Compritol ATO 888[®] revestidas com caseinato de sódio e pectina exibiram após 10 minutos, atividade inibitória maior que a da Cur livre. Os autores propõem que, muito provavelmente como a Cur apresenta baixa solubilidade e instabilidade em solução fisiológica, houve pouca interação entre essa e o ABTS^{•+}. Por outro lado, as NLS permitiram uma liberação sustentada, garantindo atividade prolongada e maior que a Cur livre.

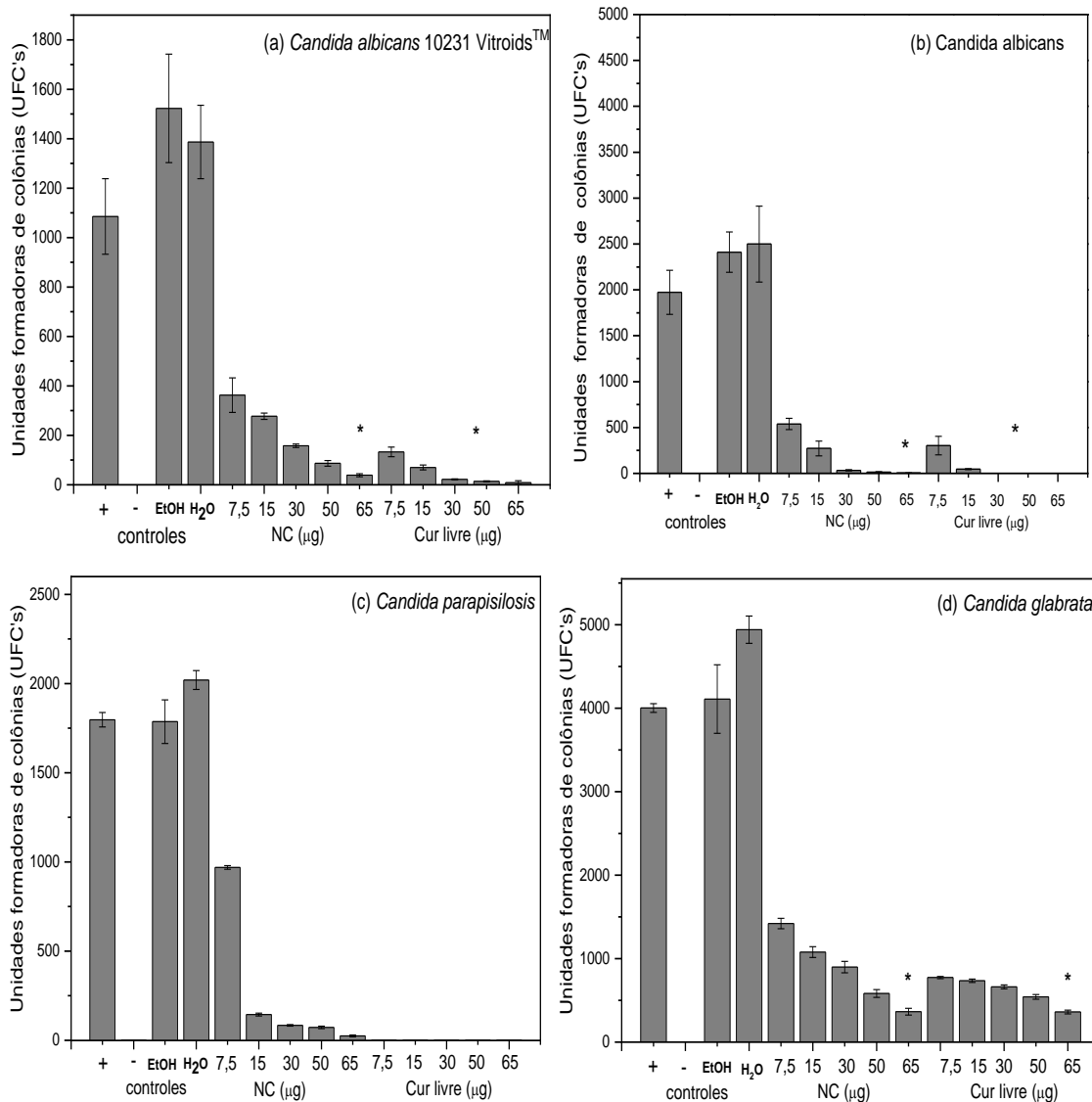
Leo et al. (2018) desenvolveram lipossomas (Lipoid S100) e diferentemente do obtido em nossa pesquisa, as np's livres de Cur exibiram atividade frente ao ABTS^{•+}, a qual foi atribuída à fosfatidilcolina utilizada para montagem das vesículas que, por sua vez, age como um estabilizador oxidativo. Além disso, semelhante ao obtido em nosso trabalho, a capacidade antioxidante dos lipossomas carregados foi próxima da Cur livre.

Em suma, evidencia-se que o lipídio utilizado como matriz para o preparo das NLS, permitiu a dispersão da Cur em condições aquosas, proporcionando contato desta com os radicais livres, favorecendo a eliminação dos mesmos, e manteve a ação antioxidante da molécula de modo dose dependente.

6.14 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DAS NLS FRENTE *Candida albicans* 10231 VITROIDS[™] E CEPAS CLÍNICAS (*C. albicans*; *parapsilosis* e *glabrata*)

Foram realizados ensaios *in vitro* para avaliar a atividade antifúngica das NLS e Cur livre frente o crescimento de colônias de *C. albicans* 10231 Vitroids[™]; *C. albicans*; *C. parapsilosis* e *C. glabrata*, (Figura 38).

Figura 38 – Atividade antifúngica da curcumina livre ($7,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $15,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $30,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $50,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $65,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e nanopartículas de palmitato de metila com curcumina ($7,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $15,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $30,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $50,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $65,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), frente unidades formadoras de colônias de: a) *Candida albicans* 10231 VITROIDS™; b) *Candida albicans*; c) *Candida parapsilosis* e d) *Candida glabrata*



* Não há diferença estatística, entre a amostra de np's carregadas e as amostras de Cur livre, para um nível de confiança de 95% pelo teste ANOVA + pós Tukey ($p < 0,05$).

Podemos observar que Cur livre e as NLS carregadas exibiram atividade antifúngica frente todas as espécies citadas, por outro lado, esse efeito não foi constatado para as NLS vazias, salvo exceção para a cepa clínica de *C. albicans*, pois nas concentrações de $50,0$ e $65,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi registrado ação antifúngica, porém inferior ao exibido pelas np's carregadas e Cur livre (dados não mostrados na Figura 38).

O efeito inibitório das NLS carregadas e Cur livre frente o crescimento das cepas testadas foi dose dependente (Figura 38). Cabe ressaltar que para a espécie *C. parapsilosis* (Figura 38 c) a Cur livre exibiu em todas as doses testadas CFM (concentração fungicida mínima) e, para as demais cepas atingiu o CIM50 (concentração inibitória mínima) em $7,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Resultado semelhante foi observado para as NLS carregadas, pois foi registrada CIM50 para todas as espécies *Candida sp* (a, b, c e d) já na concentração inicial ($7,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Ademais, observa-se na Figura 38 (a e b) que na concentração de ($65,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) o efeito das NLS carregadas igualou-se ao exibido pela Cur livre nas concentrações de $15,0$; $30,0$; $50,0$ e $65,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, uma vez que não houve diferença estatística entre as médias das NLS carregadas e Cur livre ($p>0,05$).

Essa equivalência também pode ser observada para a espécie *C. glabrata* (Figura 38 d), pois na concentração de ($65,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) NLS e Cur livre não demonstraram diferença estatística entre suas médias ($p>0,05$).

Como esses patógenos são de grande importância clínica, esses resultados são promissores no que tange a eficácia do sistema na entrega e manutenção da atividade biológica da Cur frente aos microrganismos estudados.

Sabe-se que, o fungo *C. albicans* é um constituinte comensal da flora humana, podendo ser encontrado em superfícies mucocutâneas: pele, cavidade oral, do trato gastrointestinal e vaginal (CHEN et al., 2016). Esse patógeno possui grande importância clínica, sendo agente etiológico predominante em infecções fúngicas invasivas, nas quais segundo estudos, o crescimento expressivo de suas hifas pode estar relacionado à patogenicidade (HÖFS; MOGAVERO; HUBE, 2016; SHRIVASH et al., 2018) e, portanto, vias alternativas de tratamento, como o uso da nanotecnologia, são relevantes.

Corroborando esses dados, Sudbery, Gow e Berman (2004); Noble, Gianetti e Witchley (2016) relataram que o genoma de *C. albicans* tem revelado alterações alélicas responsáveis por codificarem fatores proteicos ligados à virulência e, dessa forma, esse organismo tem demonstrado resistência para a maioria das drogas usadas, por isso, novos alvos terapêuticos antifúngicos são de grande interesse para a comunidade científica.

Entre as espécies do gênero *Candida*, a *C. parapsilosis* é uma das mais frequentemente isolada de pacientes hospitalizados. Aliado a isso, *C. parapsilosis* possui um transcriptoma fúngico diverso, o que por sua vez, provavelmente seja um dos motivos dessa espécie empregar diferentes mecanismos de resistência antifúngica (TÓTH et al., 2018; TÓTH et al., 2019).

Outra espécie que apresenta intrínseca resistência e também variação de suscetibilidade antimicótica é a *C. glabrata*, sendo que essa diversidade pode resultar em persistência da doença por meio da seleção de cepas resistentes (DOVIDO et al., 2011).

Nesse contexto, se faz necessário o desenvolvimento de vias alternativas de tratamento, pois fungos do gênero *Candida* afligem primordialmente indivíduos cujo sistema imunológico encontra-se debilitado tais como em casos de câncer, HIV e ou pacientes transplantados. Ademais, quando há um expressivo crescimento dos filamentos, esses fungos podem ser liberados na corrente sanguínea e, dessa forma, ocasionar devido às lesões em diferentes órgãos, infecções sistêmicas fatais (BRAND, 2012; MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

Com relação ao efeito antifúngico da Cur e a atividade indutora de apoptose frente ao crescimento de *Candida sp*, parece ocorrer através de danos à integridade da membrana celular do fungo e esse mecanismo antifúngico já foi relatado por Sharma et al. (2010); Shahzad et al. (2014); Lee e Lee (2014) e Thakre et al. (2016).

Basnet et al. (2012) desenvolveram lipossomas contendo Cur para o tratamento de infecção vaginal crônica, a qual pode ser comumente causada por *C. albicans*. Os lipossomas contendo Cur demonstraram *in vitro* ações antioxidante e anti-inflamatória, via aumento da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e redução na expressão citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e TNF- α), sugerindo que o nanossistema poderia exibir efeito preventivo em casos de inflamação vaginal.

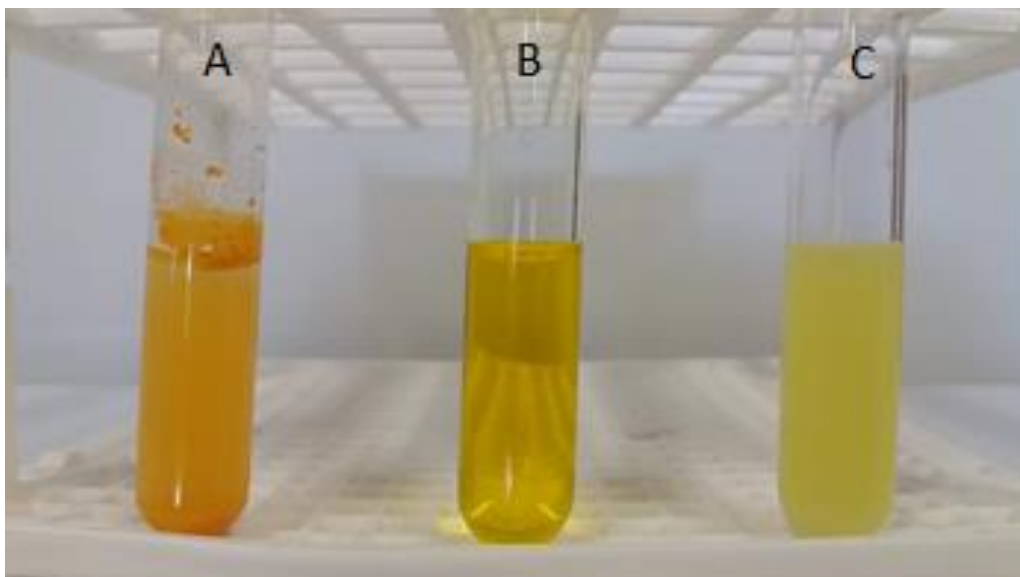
Resultado semelhante foi obtido por Rodero et al. (2018) com sistemas lipídicos mucoadesivos constituídos por quitosana e Cur, para tratamento da candidíase vulvovaginal. As np's demonstraram *in vitro* e *in vivo* atividade antifúngica e modulação da reação inflamatória via redução de citocinas com

controle da infecção vaginal mais eficaz que a droga fluconazol. Em função disso, os autores propõem que o sistema desenvolvido representa uma possível estratégia para o tratamento dessa patogênese.

Cabe ressaltar que apesar da atividade antifúngica da Cur livre, em algumas concentrações, ser superior à das NLS, os resultados também demonstraram que o sistema nanoestruturado atingiu CIM50 em todas as espécies estudadas e em algumas cepas, não houve diferenças estatísticas entre as médias da Cur livre e NLS carregadas, demonstrando que o sistema foi eficaz em assegurar a atividade antifúngica da Cur frente diferentes microrganismos do gênero *Candida*.

Apesar da ação biológica da Cur como agente antifúngico, sabe-se que a mesma possui limitações como baixa solubilidade e fraca biodisponibilidade (GUPTA; CHANDRA; AGGARWAL, 2019) e as np's desenvolvidas nesse estudo, poderiam constituir uma alternativa para melhorar a solubilidade da Cur, o que está ilustrado na Figura 39.

Figura 39 - Perfil da variação da solubilidade da curcumina: (A) suspensão de curcumina ($25,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) em tampão fosfato salino (TFS) $10,0 \text{ mmol.L}^{-1}$, pH 7,4; (B) solução de curcumina ($25,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) em etanol (99,5 %) e (C) solução de nanopartículas de palmitato de metila contendo curcumina ($25,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) em tampão fosfato salino (TFS) $10,0 \text{ mmol.L}^{-1}$, pH 7,4 (C).



É possível notar que as amostras de Cur encapsuladas foram completamente solubilizadas em solução sem agregação, ao contrário do observado para a Cur livre, que exibiu pouca solubilidade (Figura 39).

Por fim, sugere-se que as NLS com Cur demonstraram ser tão efetivas quanto a molécula livre e, esses dados juntamente com o obtido no ensaio antioxidante, sugerem o potencial da Cur para futuros estudos de tratamentos antifúngicos e antioxidantes, bem como a possibilidade de desenvolvimento de NLS através da associação do palmitato de metila com outras moléculas que apresentam ação terapêutica.

6.15 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA SOBRE HEMÁCIAS

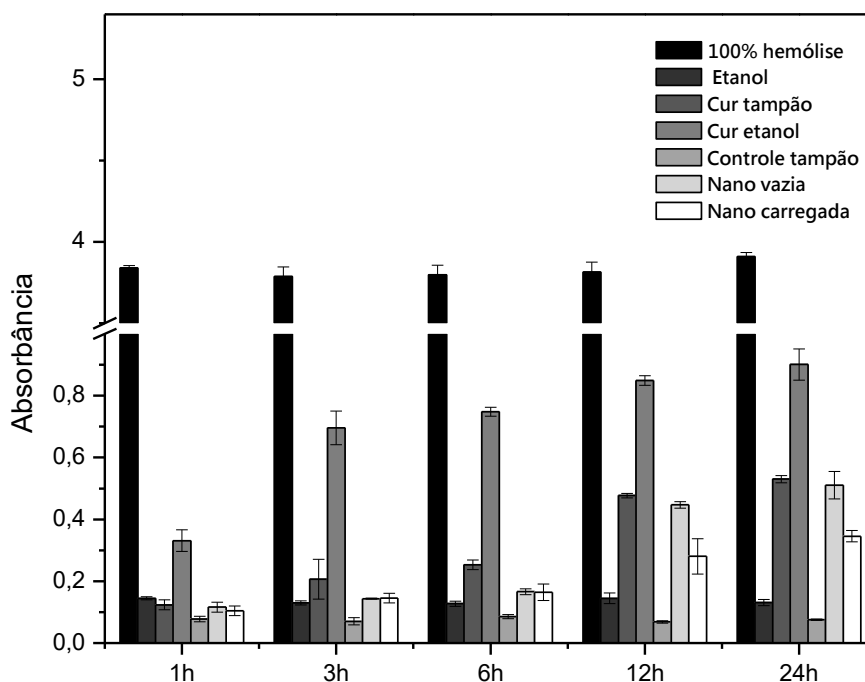
Esse estudo avaliou a citotoxicidade da Cur livre, solventes e das NLS sobre hemácias e o resultado está representado na Figura 40.

Cabe ressaltar que para a confiabilidade do ensaio, foi utilizado o controle 100% hemólise, composto por água destilada e hemácias, sendo que esse exibiu em todos os tempos maior atividade hemolítica, com absorbância (Abs) próxima a 4,0 ($3,91 \pm 0,02$). Além disso, tampão/hemácias foi utilizado como controle positivo (Abs $0,07 \pm 0,02$), a ser comparado com as médias das Abs das demais amostras.

No tempo de 24h, com exceção do etanol (Abs $0,1 \pm 0,009$), dentre as amostras estudadas (Cur em etanol Abs $1,2 \pm 0,05$; Cur em tampão Abs $0,57 \pm 0,01$; np's vazias Abs $0,6 \pm 0,04$ e np's carregadas Abs $0,36 \pm 0,01$), as np's contendo Cur induziram menor atividade hemolítica, uma vez que, sua média foi a mais próxima do valor de Abs registrado para o controle positivo (tampão/hemácias).

Dessa forma, sugere-se que as NLS exibiram maior hemocompatibilidade com modelo estudado. Além disso, comparando os resultados obtidos para as NLS, em 12 e 24 horas, as np's vazias foram responsáveis por maior dano aos eritrócitos em relação às np's carregadas (Figura 40).

Figura 40- Atividade hemolítica da curcumina solubilizada em tampão e etanol ($20,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$); etanol puro ($20,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$); controle tampão ($20,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e nanopartículas de palmitato de metila vazias e carregadas ($20,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) sob modelo de hemólise por 24 horas à 37°C



Todas as amostras foram comparadas com o controle positivo para um nível de confiança de 95% pelo teste ANOVA + pós Dunnett ($p < 0,05$).

Observa-se também que as np's carregadas provocaram menor atividade hemolítica quando comparada à Cur solubilizada em etanol, sendo assim, aponta-se que o efeito hemolítico possa ser atribuído à molécula, pois a amostra etanol não induziu hemólise, mantendo constância de Abs ao longo do tempo.

Corroborando esses dados, Adahoun et al. (2016) relataram que após 60 minutos de incubação, a Cur livre provocou atividade hemolítica em aproximadamente 20%. Outro estudo, também reportou a atividade hemolítica da Cur dose dependente durante 15 dias, a qual foi atribuída principalmente a peroxidação lipídica da membrana das hemácias (RAVIKUMAR; HSIEH; RAJASHEKHARAI AH, 2016).

Contudo, em hemácias humanas submetidas à estresse oxidativo, foi observado um efeito protetor da Cur, pois essa molécula diminuiu o transporte

de ânions que poderiam provocar alterações osmóticas e consequentemente hemólise (MORABITO et al., 2015).

Também, é possível notar, que as amostras Cur solubilizada em etanol e em tampão, exibiram crescente ação hemolítica ao longo do ensaio. No entanto, a Cur em etanol exibiu maior ação hemolítica em comparação a Cur em tampão. Isso possivelmente possa estar relacionado à solubilidade e instabilidade da molécula em soluções fisiológicas neutras a básicas (PRASAD et al., 2014; HEWLINGS; KALMAN, 2017).

Wang et al. (2016b) também relataram hemocompatibilidade de NCL contendo Cur, os quais exibiram atividade hemolítica inferior a 5%. Lipossomas contendo Cur também apresentaram baixa hemotoxicidade (<2,0%) (KANGARLOU et al., 2016). Contudo, diferentemente do conduzido em nossa pesquisa, em ambos os trabalhos citados, não foram realizadas análises com a Cur livre nem np's vazias.

Em suma, a citotoxicidade sobre eritrócitos foi maior com a Cur livre do que com a nanoencapsulada. Sobre isso, considera-se que o sistema nanoestruturado foi eficiente em reduzir a hemólise provocada pela Cur no modelo estudado.

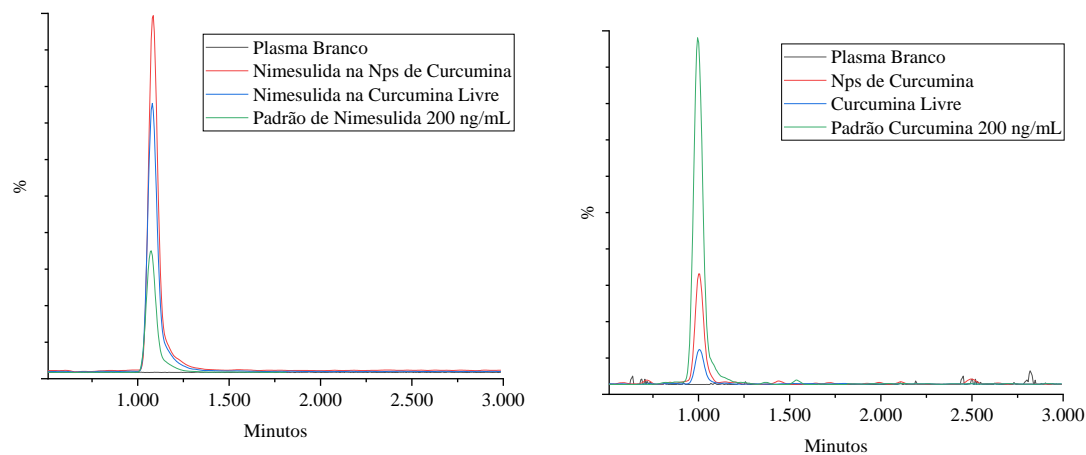
6.16 FARMACOCINÉTICA DA CURCUMINA E DAS NANOPARTÍCULAS

6.16.1 Validação do método analítico

6.16.1.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada através da comparação dos cromatogramas representativos de: plasma branco; plasma de ratos fortificado com Cur e PI, e amostras do estudo farmacocinético (Figura 41). Esse parâmetro é importante, pois permite averiguar se o método foi seletivo em quantificar o analito de interesse, mesmo na presença de outros elementos, os quais possam interferir na análise (CHAWLA; RANJAN, 2016).

Figura 41 – Cromatogramas de monitoramento de reações múltiplas (MRM) representativos de: plasma branco; padrões Nimesulida e curcumina; plasma fortificado com (PI) (m/z 306, 95 → 228, 924) e Cur (m/z 367,05 → 216,91)

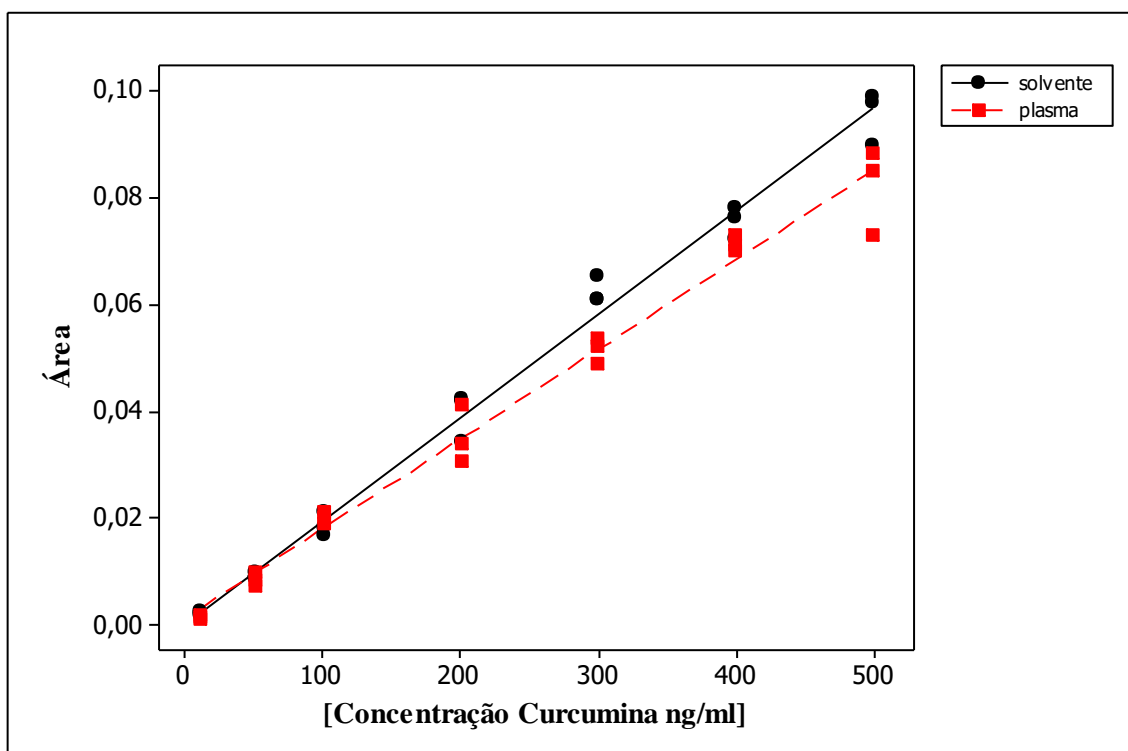


Nesse sentido, o tempo de retenção foi de 1,08 minutos para o PI e 1,00 minutos para a Cur livre e np's e com relação aos cromatogramas das amostras de plasma branco, não foi observada a presença de interferentes eluindo no mesmo tempo de retenção do analito de interesse. Além disso, semelhanças nos tempos de retenção para o padrão no plasma fortificado e para as amostras (Cur livre e np's) foram observadas nos cromatogramas (Figura 41). Assim, o método foi considerado específico com seletividade adequada para análise da Cur em amostras de plasma de rato.

6.16.1.2 Linearidade, LD e LQ

Como podemos observar na Figura 42, a curva de calibração, baseada na área dos picos cromatográficos da Cur, foi linear na faixa de concentração entre 10 e 500 ng.mL⁻¹. A análise de regressão linear revelou coeficiente de determinação (R^2) 0,992 (Cur em plasma) e (R^2) 0,995 (Cur em acetonitrila), sugerindo uma relação linear entre os dados cromatográficos e concentração do analito detectada (ANVISA, 2003; INMETRO, 2011).

Figura 42 – Curva analítica da curcumina em acetonitrila e curcumina em plasma de ratos (área versus concentração de curcumina/PI) nas concentrações de: 10; 50; 100; 200; 300; 400 e 500 ng.mL⁻¹

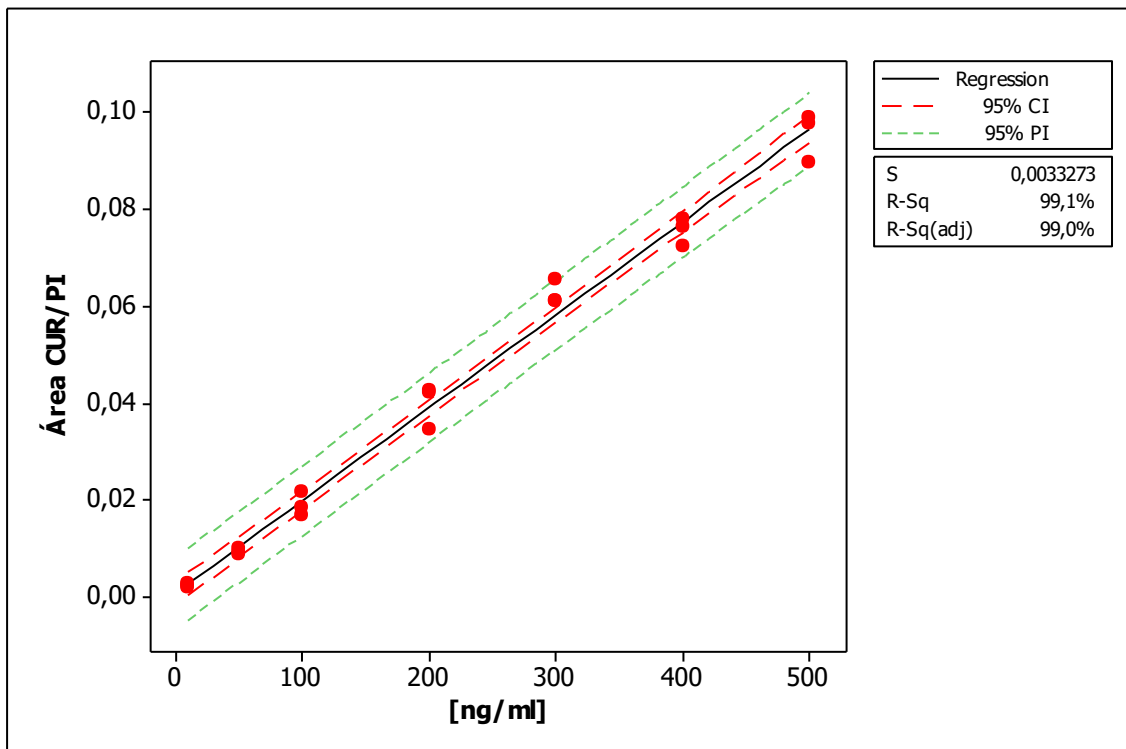


Foram verificadas diferenças significativas na inclinação das curvas analíticas da CUR em plasma e acetonitrila, com fator de 0,87 (Tabela 13), o que indica que a extração da CUR no plasma é diferente em solvente e, portanto, há efeito de matriz (Figura 43).

Tabela 13 - Parâmetros da calibração da curcumina no solvente e no plasma de ratos

| | | Parâmetros da calibração | | |
|-----------|--------|--------------------------|--|-------|
| | | R^2 | Equação (Intervalo de confiança da Inclinação) | Razão |
| Curcumina | Plasma | 0,992 | $A = 0,00145 + 0,000167$ $(\pm 0,000010465)$ | 0,87 |
| | ACN | 0,995 | $A = 0,00057 + 0,000192$ $(\pm 0,0000087432)$ | |

Figura 43 - Inclinação das curvas analíticas da curcumina em plasma obtidas nas concentrações de: 10; 50; 100; 200; 300; 400 e 500 ng.mL⁻¹



Os dados da calibração experimental da área dos picos cromatográficos e sua concentração foram aplicados pela técnica de regressão linear e calculado o intervalo de confiança da inclinação no nível de 95% de confiança ($p < 0,05$). Foi realizado um teste de falta de ajuste (F_{faj}) para verificar se o modelo linear era apropriado (Tabela 14).

Os resultados indicam que o modelo linear é adequado para estabelecer a relação entre a área do pico cromatográfico e suas respectivas concentrações, pois o coeficiente de determinação (R^2) foi superior a 98, indicando um excelente ajuste dos dados para a linha de regressão. Outros estudos também reportaram que o método (*UPLC/MS-MS*) foi eficaz para quantificação da Cur em ensaio farmacocinético (KAKKAR et al., 2010b; AHMAD; AHMAD; AHMAD, 2016).

Tabela 14 - Parâmetros de calibração e linearidade da análise da regressão linear para curcumina

| Curvas Analíticas | Parâmetros de regressão | | | Linearidade | | | |
|-------------------|--|--------------|-------|-------------------|--------------|--------------------------|--------------|
| | Equação (Faixa Linear) | Fator P/S | R^2 | Regressão | | Teste de falta de ajuste | |
| | | | | $F_{regressão}^*$ | Valor de p | F_{faj}^{**} | Valor de p |
| Cur-Plasma | A = 0,00145 + 0,000167 (± 0,000010465) | 0,87 | 98,2 | 1120,46 | 0,000 | 1,05 | 0,427 |

* $(F_{crítico (0.05; 1, 19)} = 4,35)$; ** $F_{crítico (0.05; 5, 14)} = 2,90$ *

Fator (P/S) Relação entre o coeficiente angular da curva analítica no plasma e solvente

O valor de F_{faj} obtido 1,05 foi menor que o valor de $F_{crítico (0.05; 5, 14)} 2,90$, e o valor de p 0,427 indicou que o modelo linear gerado não teve falta de ajuste no nível de 95% de confiança ($p > 0,05$). Este fato também é ressaltado pelo valor do $F_{regressão} 1120,46$ o qual foi maior do que o valor de $F_{crítico}$, ($F_{crítico (0.05; 1, 19)} = 4,35$), sendo altamente significativo ($p = 0,000$) no mesmo nível de confiança (Tabela 14).

Para avaliarmos a detectabilidade da metodologia aplicada, foram registrados os valores de LD e LQ. Para a menor quantidade do analito presente em uma amostra que poder ser detectado e confiavelmente distinguida de zero, mas, não necessariamente quantificado (LD) obtivemos o valor de 0,69 ng.mL⁻¹. A menor quantidade do analito na amostra que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis (LQ), obtivemos o valor de 2,31 ng.mL⁻¹ (Tabela 15).

Os valores de LD e LQ foram relativamente baixos, indicando que o método desenvolvido é sensível à determinação da Cur.

Tabela 15 - Valores obtidos para LD, LQ, repetibilidade, precisão intermediária e exatidão da curcumina em Plasma.

| Curvas analíticas | Concentração (ng.mL ⁻¹) | | Precisão | | Exatidão | | |
|-------------------|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------------|-----------------------|--------|------|
| | LD (ng.mL ⁻¹) | LQ (ng.mL ⁻¹) | Repetibilidade (DPR%) n=3 | Precisão intermediária (DPR%) n=3 | Recuperação (%) n = 3 | (EPR%) | |
| Cur-Plasma | 0,69 | 2,31 | 50 | 10,21 | 13,70 | 97,21 | 6,11 |
| | | | 200 | 4,01 | 11,04 | 107,57 | 8,35 |
| | | | 400 | 3,50 | 4,93 | 112,87 | 1,63 |

Com relação aos resultados dos testes de precisão, avaliados por DPR da repetibilidade e precisão intermediária, obtivemos valores entre 3,50% a 13,70%, para as três concentrações (Tabela 15). Sabe-se que valores abaixo de 15% são aceitáveis para DPR, tanto para precisão, quanto exatidão (AOAC, 2012; EMA 2012). Logo, sugere-se que os valores obtidos fornecem indícios de que a metodologia desenvolvida apresenta boa precisão e é adequada para analisar as amostras.

Por fim, as porcentagens de recuperação da Cur em plasma foram de $97,21 \pm 7,49\%$; $107,57 \pm 8,23\%$ e $112,87 \pm 1,99\%$ nas concentrações de 50, 200 e 400 ng.mL⁻¹, respectivamente. Observa-se que esses valores estão dentro do intervalo aceito 70-120% para esse parâmetro (FDA, 2001), sugerindo que a extração é eficiente e reproduzível. Além disso, o método cromatográfico não apresenta efeito matricial significativo (EPR abaixo de 15%) e apresenta exatidão na análise da Cur plasmática.

6.16.1.3 Estabilidade

Os dados de estabilidade de congelamento-descongelamento, curto e a longo prazo com o percentual de recuperação (PR) e desvio padrão relativo (DPR) estão dispostos na (Tabela 16).

Tabela 16 -Estabilidade da curcumina em plasma de ratos em três condições de armazenamento (n=3)

| Condições de armazenamento | Solução Padrão (ng.mL⁻¹) | Recuperação (%) | DPR (%) |
|--|--|------------------------|----------------|
| Três ciclos de congelamento e descongelamento | 50 | 112,32 | 13,28 |
| | 200 | 99,12 | 11,44 |
| | 400 | 94,26 | 3,41 |
| Estabilidade de temperatura a curto prazo 6h (Temperatura ambiente) | 50 | 96,64 | 13,76 |
| | 200 | 111,79 | 10,95 |
| | 400 | 112,42 | 5,82 |
| Estabilidade pós - preparo (10°C durante 24 h) | 50 | 94,78 | 8,06 |
| | 200 | 112,52 | 3,80 |
| | 400 | 106,64 | 4,91 |

Como resultado, a Cur obteve pequenas variações, com DPR de 3,41 a 13,76%, depois que as amostras foram submetidas as condições de armazenamento descritas acima. A tabela 16 indica que todas as amostras e analitos foram estáveis sob as diferentes circunstâncias de armazenamento com valores de DPR dentro de $\pm 15\%$.

Ademais, o percentual de recuperação em todas as condições de armazenamento está dentro do intervalo aceito 70-120% para esse parâmetro (FDA, 2001), sugerindo estabilidade das amostras.

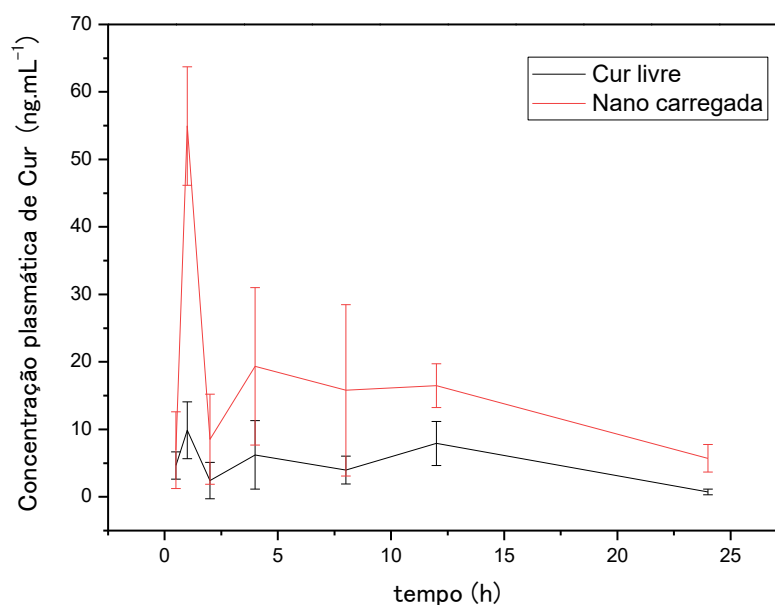
Em suma, o método desenvolvido, pode ser considerado adequado para quantificação da Cur no estudo farmacocinético, uma vez que apresentou parâmetros aceitáveis de validação.

6.17 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS APÓS ADMINISTRAÇÃO ORAL DE DOSE ÚNICA EM RATOS

As curvas de concentração plasmática da Cur versus tempo, obtidas após administração oral de única dose (50 mg.Kg^{-1}) da Cur livre e NLS carregadas, em ratos, estão demonstradas na Figura 44.

A administração oral de Cur livre resultou em uma C_{max} de $9,86 \pm 4,19 \text{ ng.mL}^{-1}$ dentro de 30 minutos, depois disso a concentração plasmática diminuiu ($2,41 \pm 1,70 \text{ ng.mL}^{-1}$ em 2h) e após 12h, há indícios de intenso metabolismo, com registro de $0,74 \pm 0,42 \text{ ng.mL}^{-1}$ em 24h (Figura 44).

Figura 44 - Curvas da concentração plasmática em função do tempo obtidos por administração oral de 50 mg.Kg^{-1} da curcumina livre e nanopartículas carregadas, em ratos (n=6)



Outros estudos também registraram esse perfil farmacocinético para a Cur livre (Liu et al., 2006 e Yang et al., 2007) e mesmo em doses superiores (200 mg.Kg^{-1}) a utilizada nesse estudo, a Cur apresentou baixa disponibilidade sistêmica (WANG et al., 2013). Corroborando essa informação STOHS et al. (2017); BOYANAPALLI et al. (2018) e WANG et al. (2020b), demonstraram que independente da via de administração, a Cur exibiu concentrações plasmáticas muito baixas e rápido metabolismo.

Em relação a esse fato, a glucuronidação e sulfatação da Cur podem explicar sua baixa biodisponibilidade sistêmica, uma vez que, os metabólitos (glucuronídeo e o sulfato de Cur) são os principais produtos da biotransformação da Cur encontrados no trato intestinal e plasma (ASAI; MIYAZAWA, 2000; IRESON et al., 2001).

Estudos pré-clínicos em animais e clínicos envolvendo pacientes com câncer, também demonstraram a baixa biodisponibilidade sistêmica da Cur, após sua administração oral (SHARMA, STEWARD e GESCHER 2007). Esse fato se deve as propriedades biofarmacêuticas limitantes da Cur, entre as quais: baixa absorção, rápido metabolismo intestinal e hepático e intensa depuração, restringindo, dessa forma, sua biodisponibilidade (STOHS et al., 2020).

Com relação a Cur, quando a mesma foi administrada em NLS, registramos dentro de 1h superior C_{max} ($54,95 \pm 8,78 \text{ ng.mL}^{-1}$) e até 24 h foi possível detectar Cur no plasma ($5,70 \pm 1,75 \text{ ng.mL}^{-1}$) (Figura 44). Sugere-se que houve aumento significativo da biodisponibilidade ($p < 0,05$), via maior absorção da Cur na circulação sanguínea, quando essa foi veiculada nas np's.

Além disso, os tempos para alcançar a C_{max} foram distintos ($p < 0,05$) (Tabela 17). Enquanto a Cur livre atingiu sua C_{max} nos primeiros 30 minutos, as NLS precisaram de 1 h. O T_{max} retardado para as NLS já era esperado, visto que a Cur livre se encontra bem mais disponível para absorção, enquanto que a Cur presente nas np's, deve passar por processos de dissociação da matriz lipídica para então estar disponível para absorção. Esse resultado está de acordo com o observado no ensaio *in vitro*, no qual uma parte da Cur foi liberada lentamente a partir das NLS.

Utilizando a mesma dose (50 mg.Kg^{-1}) em ratos, Kakkar et al. (2010a) também demonstraram uma melhora significativa na concentração plasmática, após administração oral de NLS em relação à Cur livre e, ainda, foi observado que a administração de doses crescentes de Cur não resultaram em maior absorção da molécula.

Malvajerd et al. (2018), estudou o perfil farmacocinético da Cur no cérebro de ratos e foi averiguado que as NLS foram responsáveis por aumentar significativamente a biodisponibilidade cerebral em comparação com a

molécula livre. Os autores apontam que o tamanho nanométrico e o uso do tensoativo Tween 80 como possíveis estratégias para diminuir a captação pelo sistema retículo endotelial.

Na Tabela 17, observa-se que houve diferença estatística para o parâmetro ASC entre Cur livre ($34,36 \pm 13,76$) e np's ($117,85 \pm 10,63$) ($p < 0,05$). A ASC demonstrou um aumento de três vezes, indicando maior biodisponibilidade da Cur, quando essa foi veiculada nas np's. Outros estudos também reportaram a eficiência das NLS em aumentar as propriedades farmacocinéticas da Cur, incluindo maior C_{max} e ASC (GUORGUI et al., 2018; MALVAJERD et al., 2018 e DOLATABADI et al., 2021).

Nesse sentido, aponta-se que as NLS de palmitato de metila promoveram diferenças significativas ($p < 0,05$) nos parâmetros (C_{max} e ASC) em relação ao Cur livre, resultando em melhor perfil farmacocinético para uma molécula, a qual ainda é objeto de estudo em função da sua baixa biodisponibilidade.

Tabela 17 - Parâmetros farmacocinéticos da curcumina, após administração oral de dose única (50mg.kg^{-1}) de suspensão de curcumina livre e nanopartículas lipídicas sólidas carregadas, em ratos ($n=6$).

| Parâmetros Farmacocinéticos | Cur livre | NLS-Cur |
|--|---------------------|----------------------|
| C_{max} (ng.mL^{-1}) | $9,86 \pm 4,19^a$ | $54,95 \pm 10,78^b$ |
| T_{max} (h) | $0,5 \pm 0,01^a$ | $1,0 \pm 0,01^b$ |
| ASC_{0-t} (ng.h/mL^{-1}) | $34,36 \pm 13,76^a$ | $117,85 \pm 10,63^b$ |
| $ASC_{0-\infty}$ (ng.h/mL^{-1}) | $50,27 \pm 7,27^a$ | $202,16 \pm 5,33^b$ |
| $T_{1/2}$ (h) | $11,71 \pm 6,16^a$ | $12,57 \pm 2,11^a$ |
| Kel (1/h) | $0,07 \pm 0,03^a$ | $0,05 \pm 0,01^a$ |
| Vd (L) | $3,76 \pm 0,98^a$ | $1,25 \pm 0,51^b$ |
| Cl (L/h) | $0,43 \pm 0,17^a$ | $0,08 \pm 0,01^b$ |

Valores apresentados como média \pm DP ($n=6$). C_{max} : concentração máxima; T_{max} : tempo para atingir a máxima concentração; ASC_{0-t} : área sob a curva da concentração plasmática de um fármaco *versus* tempo; $ASC_{0-\infty}$: área sob a curva da concentração plasmática de um fármaco *versus* tempo extrapolado ao infinito; $T_{1/2}$: tempo de meia-vida; Vd: volume de distribuição aparente, Kel: constante de eliminação e Cl: clearance. Médias sinalizadas com letras diferentes em uma mesma linha apresentam diferenças estatísticas para um nível de confiança de 95% pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Apesar de não haver diferença estatística ($p > 0,05$) nos parâmetros $T_{1/2}(h)$ e K_{el} , entre a Cur livre e NLS (Tabela 17), os valores de volume de distribuição (V_d) e clearance (Cl) das NLS, ambos cerca de 3 vezes menor em relação molécula livre ($p < 0,05$), indicam que possivelmente devido a maior absorção ($\uparrow C_{max}$) e biodisponibilidade ($\uparrow ASC$), a Cur poderia ter um tempo de ação prolongado, via maior permanência sistêmica, o que seria favorável para potencializar suas propriedades farmacológicas.

Essa depuração mais lenta também foi observada no estudo de Gupta et al. (2020), pois as NLS de Cur apresentaram maior biodisponibilidade e menor clearance. Diante disso, reforça-se que encapsular uma molécula com baixa solubilidade e biodisponibilidade, utilizando NLS, seja uma vantagem para administração oral, pois será possível maior alcance da Cur nos diferentes sistemas fisiológicos.

Sobre isso, ressalta-se que o uso das NLS de palmitato de metila pode não só ser aplicado no aprimoramento da biodisponibilidade oral da Cur, contribuindo para sua absorção, mas também em função da sua matriz lipídica, favorecer a captação via sistema linfático, reduzindo dessa forma, o metabolismo hepático de primeira passagem e garantir por tempo prolongado maior C_{max} do componente ativo (CHARMAN, 2000; PORTER, 2001 e YAO, XIAO e MCCLEMENTS 2014).

De fato, estudos têm demonstrado que as NLS não só apresentam permeabilidade aos diferentes epitélios, em função da sua elevada proporção entre área superficial e seu volume, mas também melhoram a biodistribuição devido à maior captação celular linfática, potencializando os efeitos farmacológicos das np's carregadas com o composto ativo (KIM et al., 2014; BAEK e CHO 2017; OBINU et. al., 2021).

Esse efeito maior biodisponibilidade e atividade, via modificação das propriedades físico-químicas da Cur, através do uso de NLS, tem sido amplamente estudado e foi averiguado que esses carreadores podem ser utilizados como estratégia para potencializar o efeito terapêutico da Cur seja na profilaxia ou tratamento de várias doenças (ABD-ELLATEF et al., 2020; BAN et al., 2020; MOHAMED et al., 2021 e SHARMA et al., 2021).

Propõe-se que o processo de incorporação da Cur na matriz lipídica possa ter contribuído não apenas reduzindo a exposição, mas também, permitiu maior biodisponibilidade via maior absorção, sendo esse, um relevante resultado, isso porque a biodistribuição limitada e rápido metabolismo dificultam que essa molécula alcance concentrações eficazes para exercer seus efeitos benéficos. Em função disso, destacamos que a proposta de encapsular a Cur utilizando o palmitato de metila resultou no desenvolvimento de um inédito e eficaz sistema de entrega oral da Cur.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através do delineamento, determinamos que os fatores massa da Cur e percentual do tensoativo tween 80, foram significantes sobre cada resposta pretendida na obtenção da np's de palmitato de metila. Essa ferramenta estatística, tem sido utilizada para obtenção de NLS de Cur (ALI et al., 2015; BEHBAHANI et al., 2017; ROMPICHARLA et al., 2017; NADAF e KILEDAR 2018) e em concordância com esses trabalhos, ressaltamos que o controle do tamanho das partículas, entre outros fatores, é de suma importância para otimizar o uso das NLS como carreadores da Cur.

A inédita associação do lipídio palmitato de metila com a Cur se demonstrou eficaz, visto que, as np's obtidas pelo método de homogeneização de alto cisalhamento, apresentaram tamanho nanométrico ($162,41 \pm 5,7$ nm); homogeneidade de diâmetro médio ($0,10 \pm 0,05$); potencial zeta distante da neutralidade ($-18,0 \pm 0,2$ mV) e alta taxa de EE% ($68,42 \pm 0,7$).

Uma limitação das formulações lipídicas sólidas é a sua instabilidade em suspensão, esse fato foi reportado nesse e também em outros estudos (Souto et al., 2011; Mehnert e Mader 2012). Contudo, tal característica foi contornada através da liofilização com manitol (5%), conferindo as NLS de Cur estabilidade de armazenamento (150 dias), sem perder suas propriedades.

Todos esses parâmetros físico-químicos representam um conjunto de características as quais possibilitam às np's alcançarem áreas inacessíveis por moléculas convencionais aumentando a eficácia terapêutica dos compostos ativos (DUAN et al., 2020). Por isso esses sistemas, como o desenvolvido nessa pesquisa, podem levar a maior exploração destas formulações como alternativas para estudos clínicos de novos medicamentos.

Corroborando essas informações, as np's foram estáveis no fluido gástrico intestinal simulado (mais de 90% da concentração da Cur foi retida pelas np's) e a liberação lenta e sustentada (60%) em TFS confirmaram que o processo de nanoencapsulação foi capaz de prolongar a liberação de uma molécula que é instável em fluidos fisiológicos. Além disso, na análise da interação matriz lipídica e a Cur, a encapsulação do composto não resultou na formação de novas moléculas e foi registrado a amorfização da Cur nas np's.

Nos ensaios biológicos, as NLS foram significativamente menos tóxicas que a Cur livre frente eritrócitos; a atividade antioxidante corroborou que a matriz lipídica assegurou a ação da Cur em solução fisiológica, alcançando um percentual de inibição do ABTS^{•+} próximo a 90%.

Fato semelhante foi observado no ensaio antimicrobiano, pois as np's mantiveram a ação antifúngica da Cur, com CIM50 para todas as espécies de *Candida sp* testadas. Cabe ressaltar que essas espécies apresentam resistência para a maioria das drogas (ARENDRUP; PATTERSON, 2017 e BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020) e, por isso, novos alvos com ação terapêutica, como o desenvolvido nesse estudo, são de grande interesse para a comunidade científica.

Entre os nanocarreadores utilizados para aumentar a solubilidade e assegurar maior biodisponibilidade, as NLS têm sido utilizadas pela indústria farmacêutica como sistemas de administração e liberação de moléculas pouco solúveis em água, como a Cur (MISHRA et al., 2018; DHIMAN et al., 2021). Essa propriedade foi demonstrada no ensaio *in vivo*, isso porque esse inédito sistema de NLS de palmitato de metila, quando administrado em dose única, por via oral, pode ser uma alternativa para aprimorar o perfil farmacocinético, pois promoveu maior absorção da Cur (ASC três vez maior).

Por fim, pode-se dizer que o objetivo principal do trabalho foi atingido, as NLS de palmitato de metila com Cur foram produzidas com êxito e destacamos a aplicabilidade dessas np's, com características físico-químicas voltadas para aplicação na nanotecnologia farmacêutica. Além disso, demonstraram ser eficientes no carregamento da molécula, mantiveram o potencial antioxidante e antifúngico da Cur e foram capazes de melhorar consideravelmente sua biodisponibilidade, sendo essa uma vantagem para sua aplicação terapêutica.

8 CONCLUSÃO

Esse estudo mostrou que o delineamento fatorial foi importante para otimizar o processo de obtenção de NLS e alcançar uma formulação com características físico-químicas voltadas para aplicação na nanotecnologia farmacêutica. Através de difratogramas, foi possível averiguar que o método de obtenção das NLS foi determinante na diminuição da cristalinidade das np's em relação aos compostos livres, e a partir dos espectrogramas evidenciamos que não ocorreu nenhuma interação química que pudesse modificar os grupos funcionais caracterizados.

Além disso, a aplicabilidade biológica testada *in vitro* demonstrou que as np's contendo Cur exibiram atividades antioxidante sobre o radical ABTS, antifúngica frente diferentes espécies *Candida sp*, baixa hematotoxicidade e estabilidade em condições gastrointestinais simuladas. Sugere-se que o método de obtenção das NLS combinado com a liberação sustentada e biodisponibilidade aprimorada são vantagens significativas desse inovador sistema nanoestruturado com aplicação antifúngica e antioxidante, sendo uma alternativa para encapsulamento e liberação da Cur. Por fim, considera-se que essa pesquisa não só contribuiu com informes científicos a cerca de np's desenvolvidas a partir de um lipídio ainda não utilizado pela nanotecnologia farmacêutica, mas também, apresentou resultados, os quais confirmaram que as NLS de palmitato de metila podem atuar como promissor sistema nanoestruturado para carreamento e entrega oral da Cur.

9 BIBLIOGRAFIA

ABDELAZIZ, Hadeer M.; FREAG, May S.; ELZOGHBY, Ahmed O. Solid Lipid Nanoparticle-Based Drug Delivery for Lung Cancer. **Nanotechnology-based Targeted Drug Delivery Systems For Lung Cancer**, [s.l.], p.95-121, 2019. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-815720-6.00005-8>.

ABD-ELLATEF, Gamal-eldein Fathy; GAZZANO, Elena; CHIRIO, Daniela; HAMED, Ahmed Ragab; BELISARIO, Dimas Carolina; ZUDDAS, Carlo; PEIRA, Elena; ROLANDO, Barbara; KOPECKA, Joanna; MARIE, Mohamed Assem Said. Curcumin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles Bypass P-Glycoprotein Mediated Doxorubicin Resistance in Triple Negative Breast Cancer Cells. **Pharmaceutics**, [s.l.], v. 12, n. 2, p.96-116, 24 jan. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics12020096>.

ABDELBARY, Ghada; FAHMY, Rania H. Diazepam-Loaded Solid Lipid Nanoparticles: Design and Characterization. **Aaps Pharmscitech**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.211-219, mar. 2009. Springer Nature America, Inc. <http://dx.doi.org/10.1208/s12249-009-9197-2>.

ADAHOUN, Mo'ath A.; AL-AKHRAS, Mohammed-Ali H.; JAAFAR, Mohamad S. Enhanced anti-cancer and antimicrobial activities of curcumin nanoparticles. **Artificial Cells, Nanomedicine, And Biotechnology**, [s.l.], v. 45, n. 1, p.98-107, 8 jan. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/21691401.2015.1129628>.

AHMAD, Niyaz; AHMAD, Rizwan; AHMAD, Farhan Jalees. Stressed Kinetics and Pharmacokinetics of Curcumin Nanoemulsion Using Validated Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography–Synapt Mass Spectrometry (UPLC–MS/MS–ESI-Q-TOF). **Iranian Journal Of Science And Technology, Transactions A: Science**, [S.L.], v. 40, n. 2, p. 109-123, 30 abr. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s40995-016-0016-9>.

AK, Tuba; GÜLÇİN, İlhami. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. **Chemico-biological Interactions**, [s.l.], v. 174, n. 1, p.27-37, jul. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2008.05.003>.

ALEXIS, Frank; PRIDGEN, Eric; MOLNAR, Linda K; FAROKHZAD, Omid C. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, [s.l.], v. 5, n. 4, p.505-515, ago. 2008. American Chemical Society (ACS).

ALLEN, Theresa M.; CULLIS, Pieter R.. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 65, n. 1, p.36-48, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.037>.

ALI, Hassan Hajj; MICHAUX, Florentin; Ntsama, Isabelle S. B.; Janiewski, Perrick D. J.; Linder, Michel. Shea butter solid nanoparticles for curcumin encapsulation: Influence of nanoparticles size on drug loading. **European Journal of Lipid Science And Technology**, [s.l.], v. 118, n. 8, p.1168-1178, 2 dez. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.201500348>.

ALI, Mohamed Ehab; LAMPRECHT, Alf. Spray freeze drying as an alternative technique for lyophilization of polymeric and lipid-based nanoparticles. **International Journal of**

Pharmaceutics, [s.l.], v. 516, n. 1-2, p.170-177, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.11.023>.

AMMAR, El-sayed M. Effects of methyl palmitate and lutein on LPS-induced acute lung injury in rats. **World Journal Of Respiriology**, [s.l.], v. 3, n. 2, p.20-28, 2013. Baishideng Publishing Group Inc.. <http://dx.doi.org/10.5320/wjr.v3.i2.20>.

ANAND, Preetha; THOMAS, Sherin G.; Kunnumakkara, Ajaikumar B.; Sundaram Chitra; Harikumar, Kuzhuveli B.; Sung, Bokyung; Tharakan, SheejaT.; Misra, Krishna; Priyadarsini, Indira K.; Rajasekharan, Kaiikat N; Aggarwal, Bharat B. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. **Biochemical Pharmacology**, [s.l.], v. 76, n. 11, p.1590-1611, dez. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2008.08.008>.

ANDONOVA, Velichka; PENEVA, Petya. Characterization Methods for Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC). **Current Pharmaceutical Design**, [s.l.], v. 23, n. 43, p.6630-6642, 15 fev. 2018. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1381612823666171115105721>.

AOAC International. Official methods of analysis. **Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance**. 19th ed, 2012.

ARENDRUP, Maiken Cavling; PATTERSON, Thomas F. Multidrug-Resistant Candida: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. **The Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 216, n. 3, p. 445-451, 15 ago. 2017. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jix131>.

ASHFORD, Marianne. Gastrointestinal tract –physiology and drug absorption. In: Michael E. Aulton, Kevin M.G. Taylor. **Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines**. Elsevier Health Sciences, 2017, 944p. cap 19, p. 300-318.

ASOURI, Mohsen; ATAEE, Ramin; AHMADI, Ali A.; AMINI, Abdolhossein; MOSHAEI, Mashoumeh R. Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of Curcumin. **Asian Journal of Chemistry**, [s.l.], v. 25, n. 13, p.7593-7595, 2013. Asian Journal of Chemistry. <http://dx.doi.org/10.14233/ajchem.2013.15308>.

ASAI, Akira; MIYAZAWA, Teruo. Occurrence of orally administered curcuminoid as glucuronide and glucuronide/sulfate conjugates in rat plasma. *Life Sciences*, [s.l.], v. 67, n. 23, p. 2785-2793, out. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0024-3205\(00\)00868-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0024-3205(00)00868-7).

AUGUSTIJNS, Patrick; WUYTS, Benjamin; HENS, Bart; ANNAERT, Pieter; BUTLER, James; BROUWERS, Joachim. A review of drug solubility in human intestinal fluids: Implications for the prediction of oral absorption. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 57, p.322-332, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2013.08.027>.

AZHARI, Hanisah; STRAUSS, Mike; HOOK, Sarah; BOYD, Ben J.; RIZWAN, Shakila B. Stabilising cubosomes with Tween 80 as a step towards targeting lipid nanocarriers to the blood–brain barrier. **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, [s.l.], v. 104, p.148-155, jul. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.05.001>.

BACHMEIER, Beatrice; KILLIAN, Peter; MELCHART, Dieter. The Role of Curcumin in Prevention and Management of Metastatic Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 19, n. 6, p.1-18, 9 jun. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19061716>.

BAEK, Jong-suep; CHO, Cheong-weon. A multifunctional lipid nanoparticle for co-delivery of paclitaxel and curcumin for targeted delivery and enhanced cytotoxicity in multidrug resistant breast cancer cells. **Oncotarget**, [s.l.], v. 8, n. 18, p.69-82, 13 mar. 2017. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.16153>.

BALASUBRAMANIAN, Anuradha; PILANKATTA, Rajendra; TERAMOTO, Tadahisa; SAJITH, Ayyiliath M. S.; NWULIA, Evaristus; KULKARNI, Amol; PADMANABHAN, Radhakrishnan. Inhibition of dengue virus by curcuminoids. **Antiviral Research**, [s.l.], v. 162, p.71-78, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.12.002>.

BAN, Choongjin; JO, Myeongsu; Park, Young H.; KIM, Jae H.; HAN, Jae Y.; LEE, Ki W.; KWEON, Dae-Hyuk; CHOI, Young J. Enhancing the oral bioavailability of curcumin using solid lipid nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 302, jan. 2020. Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125328>.

BAMRUNGSAP, Suwussa; ZHAO, Zilong; CHEN, Tao; WANG, Li; LI, Chunmei; FU, Ting; TAN, Weihong. Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. **Nanomedicine**, [s.l.], v. 7, n. 8, p.1253-1271, ago. 2012. Future Medicine Ltd. <http://dx.doi.org/10.2217/nnm.12.87>.

BANERJEE, Arnab; KUNWAR, A.; MISHRA, B.; PRIYADARSINI, K.I.. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin: Studies from AAPH induced hemolysis of RBCs **Chemico-Biological Interactions**, [S.L.], v. 174, n. 2, p. 134-139, jul. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2008.05.009>.

BASNET, Purusotam; HUSSAIN, Haider; THO, Ingunn; BASNET, Natasa S. Liposomal Delivery System Enhances Anti-Inflammatory Properties of Curcumin. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 101, n. 2, p.598-609, fev. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.22785>.

BATTAGLIA, Luigi; GALLARATE, Marina. Lipid nanoparticles: state of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery. **Expert Opinion On Drug Delivery**, [s.l.], v. 9, n. 5, p.497-508, 22 mar. 2012. Informa Healthcare. <http://dx.doi.org/10.1517/17425247.2012.673278>.

BEHBAHANI, Elham S; GHAEDI, Mehrorang; ABBASPOUR, Mohammadeza; ROSTAMIZADEH, Kobra. Optimization and characterization of ultrasound assisted preparation of curcumin-loaded solid lipid nanoparticles: Application of central composite design, thermal analysis and X-ray diffraction techniques. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s.l.], v. 38, p.271-280, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.03.013>.

BIANCHI, Giovanna; RAVERA, Silva; TRAVERSO, Chiara; AMARO, Adriana; PIAGGIO, Francesca; EMIONITE, Laura; BACHETTI, Tiziana; PEFEFFER, Ulrich; RAFAGHELLO, Lizzia. Curcumin induces a fatal energetic impairment in tumor cells in vitro and in vivo by inhibiting ATP-synthase activity. **Carcinogenesis**, [s.l.], p.1-29, 31 maio 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgy076>

BHATT, Himanshu; ROMPICHARLA, Sri V. K.; NEERAJA, Komanduri; AASHMA, Shah; PARADKAR, Sateja; GHOSH, Balaram; BISWAS, Swati. Development of Curcumin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles Utilizing Glyceryl Monostearate as Single Lipid Using QbD Approach: Characterization and Evaluation of Anticancer Activity Against Human Breast Cancer Cell Line. **Current Drug Delivery**, [s.l.], v. 15, n. 9, p.1271-1283, 25 set. 2018. <http://dx.doi.org/10.2174/1567201815666180503120113>.

BHATTACHARJEE, Sourav. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, [s.l.], v. 235, p.337-351, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>.

BHATTACHARYA, Somanon; SAE-TIA, Sutthichai; FRIES, Bettina C.. Candidiasis and Mechanisms of Antifungal Resistance. **Antibiotics**, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 312, 9 jun. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics9060312>.

BOYANAPALLI, S. S. S.; Huang, Y.; Su, Z.; Cheng, D.; Zhang, C.; Guo, Y.; Rao, R.; Andoulakis, I. P.; Kong, A. N. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin in regulating anti-inflammatory and epigenetic gene expression. **Biopharm Drug Dispos**, 2018, 39, 289-297.

BONDÌ, Maria Luisa; EMMA, Maria R.; BOTTO, Chiara; AUGELLO, Giuseppa; AZZOLINA, Antonina; GAUDIO, Francesca Di; CRAPARO, Emanuela, F.; CAVALLARO, Genara; BACHAVAROV, Dimcho; CERVELLO, Melchiorre. Biocompatible Lipid Nanoparticles as Carriers To Improve Curcumin Efficacy in Ovarian Cancer Treatment. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 65, n. 7, p.1342-1352, 7 fev. 2017. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04409>.

BOROUMAND, Nadia; SAMARGHANDIAN, Saeed; HASHEMY, Seyed Isaac. Immunomodulatory, anti-inflammatory, and antioxidant effects of curcumin. **Journal of Herbmед Pharmacology**, [s.l.], v. 7, n. 4, p.211-219, 6 out. 2018. International Society for Phytocosmetic Sciences. <http://dx.doi.org/10.15171/jhp.2018.33>.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 1v, 546p 2010.

BRAND, Alexandra. Hyphal Growth in Human Fungal Pathogens and Its Role in Virulence. **International Journal of Microbiology**, [s.l.], v. 2012, p.1-11, 2012. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/517529>.

BRASIL. Ministério da Saúde. **RENISUS**. Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS. Espécies vegetais, 2009.

CAI, P.; KAPHALIA, B.s.; ANSARI, G.a.s.. Methyl palmitate: Inhibitor of phagocytosis in primary rat Kupffer cells. **Toxicology**, [s.l.], v. 210, n. 2-3, p.197-204, jun. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2005.02.001>.

CARBONI, Erik; TSCHUDI, Katherine; NAM, Jaewook; LU, Xiuling; MA, Anson. Particle Margination and Its Implications on Intravenous Anticancer Drug Delivery. **Aaps Pharmscitech**, [s.l.], v. 15, n. 3, p.762-771, 2 abr. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1208/s12249-014-0099-6>.

CHANWATTANAKIT, Jarussri; SCAMEHORN, John F.; SABATINI, David A.; CHAVADEJ, Sumaeth. Laundry Detergency of Solid Nonparticulate Soil or Waxy Solids: part ii. effect of the surfactant type. *Journal Of Surfactants And Detergents*, [S.L.], v. 22, n. 3, p. 571-585, 4 jan. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jsde.12243>.

CHAUDHARY, Shilpa; GARG, Tarun; MURTHY, Goutam, Rath; GOYAL, Amit, K. Recent approaches of lipid-based delivery system for lymphatic targeting via oral route. *Journal of Drug Targeting*, [s.l.], v. 22, n. 10, p.871-882, 22 ago. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/1061186x.2014.950664>.

CHARMAN, William N. Lipids, Lipophilic Drugs, and Oral Drug Delivery—Some Emerging Concepts. *Journal Of Pharmaceutical Sciences*, [s.l.], v. 89, n. 8, p.967-978, ago. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1002/1520-6017\(200008\)89:83.0.co;2-r](http://dx.doi.org/10.1002/1520-6017(200008)89:83.0.co;2-r).

CHAWLA, Gita; RANJAN, Chanda. Principle, Instrumentation, and Applications of UPLC: a novel technique of liquid chromatography. *Open Chemistry Journal*, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 1-16, 6 maio 2016. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1874842201603010001>.

CHEN, Zhipeng et al. Thermal degradation kinetics study of curcumin with nonlinear methods. *Food Chemistry*, [s.l.], v. 155, p.81-86, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.034>.

CHEN, Jin; HE, Zheng-Min; WANG, Feng-Ling; ZHANG, Zheng S.; LIU, Xiu, Z.; ZHAI, Dan D.; CHEN, Wei D. Curcumin and its promise as an anticancer drug: An analysis of its anticancer and antifungal effects in cancer and associated complications from invasive fungal infections. *European Journal of Pharmacology*, [s.l.], v. 772, p.33-42, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.12.038>.

CHEUNG, T; NIGAM, P; OWUSU-APENTEN, R. Antioxidant Activity of Curcumin and Neem (*Azadirachta indica*) Powders: Combination Studies with ALA Using MCF-7 Breast Cancer Cells. *Journal Of Applied Life Sciences International*, [s.l.], v. 4, n. 3, p.1-12, 10 jan. 2016. Sciencedomain International. <http://dx.doi.org/10.9734/jalsi/2016/22273>.

CHIRIO, Daniela; PEIRA, Elena; DIANZANI, Chiara; MUNTONI, Elisabetta; GIGLIOTTI, Casimiro; FERRARA, Benedetta; SAPINO, Simona; CHINDAMO, Giulia; GALLARATE, Marina. Development of Solid Lipid Nanoparticles by Cold Dilution of Microemulsions: curcumin loading, preliminary in vitro studies, and biodistribution. *Nanomaterials*, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 230-247, 8 fev. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nano9020230>.

CHUAH, Ai Mey; JACOB, Bindya; JIE, Zhang; RAMESH, Subbarayan; MANDAL, Shibajee; PUTHAN, Jithesh; DESHPANDE, Parag; VAIDYANATHAN, Vadakkanchery V.; GELLING, Richard W.; PATEL, Gaurav; SHREERAM, Tapas Das S. Enhanced bioavailability and bioefficacy of an amorphous solid dispersion of curcumin. *Food Chemistry*, [s.l.], v. 156, p.227-233, ago. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.108>.

CHOI, Youngju; TANABE, Yoko; AKAZAWA, Nobuhiko; ZEMPO-MIYAKI, Asako; MAEDA, Seiji. Curcumin supplementation attenuates the decrease in endothelial function following eccentric exercise. *Journal Of Exercise Nutrition & Biochemistry*, [S.L.], v. 23, n. 2, p. 7-12, 30 jun. 2019. Korea Society for Exercise Nutrition. <http://dx.doi.org/10.20463/jenb.2019.0010>.

CHO, Eun Jung; HOLBACK, Hillary; LIU, Karen C.; ABOEULMAGD, Sara A.; PARK, Joonyoung; YEO, Yoon. Nanoparticle Characterization: State of the Art, Challenges, and Emerging Technologies. **Molecular Pharmaceutics**, [s.l.], v. 10, n. 6, p.2093-2110, 21 mar. 2013. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/mp300697h>.

CLOGSTON, Jeffrey D.; PATRI, Anil K.. Zeta Potential Measurement. **Methods In Molecular Biology**, [s.l.], p.63-70, 19 out. 2010. Humana Press. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1_6.

CLSI- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Método de referência para teste de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade de leveduras terapia antifúngica: Norma Aprovada**. 2ed. Norma M27-A2 do CLSI. Pennsylvania, 51p, 2008.

COLE, James T.; HOLLAND, Nolan B.. Multifunctional nanoparticles for use in theranostic applications. **Drug Delivery And Translational Research**, [s.l.], v. 5, n. 3, p.295-309, 24 fev. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s13346-015-0218-2>.

COUVREUR, Patrick; BARRATT, Gillian; FATTAL, Elias. Nanocapsule Technology: A Review. **Critical Reviews In Therapeutic Drug Carrier Systems**, [s.l.], v. 19, n. 2, p.99-134, 2002. Begell House. <http://dx.doi.org/10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v19.i2.10>.

DANAEI, M.; DEGHANKHOLD, M.; ATAEI, S.; DAVARANI, Hasanzadeh F.; JAVANMARD, R.; DOKHANI, A.; KHORASANI, S.; MOZAFARI, M. R. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, [s.l.], v. 10, n. 2, p.57-74, 18 maio 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>.

DAS, Surajit; CHAUDHURY, Anumita. Recent Advances in Lipid Nanoparticle Formulations with Solid Matrix for Oral Drug Delivery. **Aaps Pharmscitech**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.62-76, 21 dez. 2010. American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS). <http://dx.doi.org/10.1208/s12249-010-9563-0>

DAS, Surajit; NG, Wai Kiong; TAN, Reginald B.h.. Are nanostructured lipid carriers (NLC's) better than solid lipid nanoparticles (SLN's): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLN's and NLC's?. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 47, n. 1, p.139-151, ago. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2012.05.010>.

DESAI, Manisha P.; LABHASETWAR, Vinod; WALTER, Elke; LEVY, Robert, J.; AMIDON, Gordon L. The Mechanism of Uptake of Biodegradable Microparticles in Caco-2 Cells Is Size Dependent. **Pharmaceutical Research**, [s.l.], v. 14, n. 11, p.1568-1573, 1997. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1012126301290>.

DHILLON, N.; AGGARWAL, Bharat B.; WOLFF, Newman R. A.; KUNNUMAKKARA, Ajaikumar B.; ABBRUZZE, James L.; NG, Chaan S.; BADMAEV, Vladmir; KURZROCK, Razelle. Phase II Trial of Curcumin in Patients with Advanced Pancreatic Cancer. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 14, n. 14, p.4491-4499, 15 jul. 2008. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-08-0024>.

DHIMAN N, Awasthi R, Sharma B, Kharkwal H, Kulkarni GT. Lipid Nanoparticles as Carriers for Bioactive Delivery. **Frontiers in Chemistry**. v. 9, p.580118, abr. 2021. doi:10.3389/fchem.2021.580118

DOLATABADI, Shabnam; KARIMI, Maryam; NASIRIZADEH, Samira; HATAMIPOUR, Mahdi; GOLMOHAMMADZADEH, Shiva; JAAFARI, Mahmoud Reza. Preparation, characterization and in vivo pharmacokinetic evaluation of curcuminoids-loaded solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs). **Journal Of Drug Delivery Science And Technology**, [S.L.], v. 62, p. 102352, abr. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102352>.

DOVIGO, Livia N.; PAVARINA, Ana C.; CARMELLO, Juliana C.; MACHADO, Ana L.; BRUNETTI, Iguatemy L.; BAGNATO, Vanderlei S. Susceptibility of clinical isolates of Candida to photodynamic effects of curcumin. **Lasers In Surgery And Medicine**, [s.l.], v. 43, n. 9, p.927-934, 17 out. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/lsm.21110>.

DOKTOROVOVA, Slavomira; SHEGOKAR, Ranjita; FERNANDES, Lisete; LOPES, Paula M.; MULLER, Rainer H.; SOUTO, Eliana B. Trehalose is not a universal solution for solid lipid nanoparticles freeze-drying. **Pharmaceutical Development And Technology**, [s.l.], v. 19, n. 8, p.922-929, 7 out. 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/10837450.2013.840846>.

DOKTOROVOVA, Slavomira; SOUTO, Eliana B.; SILVA, Amélia M. Hansen solubility parameters (HSP) for prescreening formulation of solid lipid nanoparticles (SLN): in vitro testing of curcumin-loaded SLN in MCF-7 and BT-474 cell lines. **Pharmaceutical Development And Technology**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.96-105, 10 out. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10837450.2017.1384491>.

DUAN, Yongtao; DHAR, Abhishek; PATEL, Chetan; KHIMANI, Mehul; NEOGI, Swarnali; SHARMA, Prolay; KUMAR, Nadavala Siva; VEKARIYA, Rohit L. A brief review on solid lipid nanoparticles: part and parcel of contemporary drug delivery systems. **RSC Advances**, [S.L.], v. 10, n. 45, p. 26777-26791, 2020. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/d0ra03491f>.

DU, Juan; LI, Xiaoguang; ZHAO, Huanxin; ZHOU, Yuqi; WANG, Lulu; TIAN, Shushu; WANG, Yancai. Nanosuspensions of poorly water-soluble drugs prepared by bottom-up technologies. **International Journal of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 495, n. 2, p.738-749, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.09.021>.

DUNN, Robert O. Crystallization Behavior of Fatty Acid Methyl Esters. **Journal Of The American Oil Chemists' Society**, [S.L.], v. 85, n. 10, p. 961-972, 9 ago. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-008-1279-x>.

DUSE, Lili; PINNAPIREDDY, Shashank R.; STREHLOW, Boris; JEDELSKÁ, Jarmila; BAKOWSKY, Udo. Low level LED photodynamic therapy using curcumin loaded tetraether liposomes. **European Journal of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, [s.l.], v. 126, p.233-241, maio 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.10.005>.

DWIVEDI, Chandraprakash; SAHU, Roshni; TIWARI, Sandip P.; SATAPATHY, Trilochan, ROY Amit. ROLE OF LIPOSOME IN NOVEL DRUG DELIVERY SYSTEM. **Journal Of Drug Delivery And Therapeutics**, [s.l.], v. 4, n. 2, p.119-126, 15 mar. 2014. Society of Pharmaceutical Technocrats. <http://dx.doi.org/10.22270/jddt.v4i2.768>.

EATON, P.; QUARESMA, P.; SOARES, C.; NEVES, C.; ALMEIDA, M. P.; PEREIRA E.; WEST, P. A direct comparison of experimental methods to measure dimensions of synthetic nanoparticles. **Ultramicroscopy**, [s.l.], v. 182, p.179-190, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultramic.2017.07.001>.

EATON, John E.; NELSON, Kevin M.; GOSSARD, Andrea A.; CAREY, Elizabeth J.; TABIBIAN, James H; LINDOR, Keith D.; LARUSSO, Nicholas F. Efficacy and safety of curcumin in primary sclerosing cholangitis: an open label pilot study. **Scandinavian Journal Of Gastroenterology**, [S.L.], v. 54, n. 5, p. 633-639, 4 maio 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/00365521.2019.1611917>.

EL-AGAMY, Dina S.; ELKABLAWY, Mohamed A.; ABO-HADED, Hany M.. Modulation of cyclophosphamide-induced cardiotoxicity by methyl palmitate. **Cancer Chemotherapy And Pharmacology**, [s.l.], v. 79, n. 2, p.399-409, 27 jan. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00280-016-3233-1>.

EL-DEMERDASH, Ebtehal. Anti-inflammatory and antifibrotic effects of methyl palmitate. **Toxicology And Applied Pharmacology**, [s.l.], v. 254, n. 3, p.238-244, ago. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2011.04.016>.

EMA, European Medicine Agency (EMA). **Guideline on bioanalytical method validation**. p. 4–10, 2012.

ERTURK, Nazile; ELBE, Hulya; DOGAN, Zumurut; AKTAS, Serdar; DEMIRBILEK, Savas; OZTURK, Feral. Curcumin prevents renal oxidative stress and tissue damage induced by renal ischemia/reperfusion in rats. **International Surgery Journal**, [s.l.], v. 5, n. 10, p.3192-3197, 25 set. 2018. Medip Academy. <http://dx.doi.org/10.18203/2349-2902.isj20184066>.

FANG, Jun; NAKAMURA, Hideaki; MAEDA, Hiroshi. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 63, n. 3, p.136-151, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2010.04.009>.

FARZAEI, Mohammad; ZOBEIRI, Mahdi; PARVIZI, Fatemeh; EL-SENDUNY, Fardous, F.; MARZOUZI, Ilias, Coy-BARRERA, Ericsson; NASERI, Rosita; NABAVI, Seyed M.; RAHIMI, Roja; ABDOLLAHI, Mohammad. Curcumin in Liver Diseases: A Systematic Review of the Cellular Mechanisms of Oxidative Stress and Clinical Perspective. **Nutrients**, [s.l.], v. 10, n. 7, p.22-28, 1 jul. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu10070855>.

FERREIRA, Eduardo Bellini; LIMA, Moysés L.; ZANOTTO, Edgar D.. DSC Method for Determining the Liquidus Temperature of Glass-Forming Systems. **Journal Of The American Ceramic Society**, [S.L.], v. 93, n. 11, p. 3757-3763, 12 ago. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1551-2916.2010.03976.x>.

FDA - Food and Drug Administration. Guidance for industry: Bioanalytical Method Validation. **Center for Drug Evaluation and Research**, 2001.

FONTANA, Flavia; LIU, Dongfei; HIRVONEN, Jouni; SANTOS, Helder A. Delivery of therapeutics with nanoparticles: what's new in cancer immunotherapy?. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.14-21, 29 jul. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/wnan.1421>.

FOROOZANDEH, Parisa; AZIZ, Azlan Abdul. Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles. **Nanoscale Research Letters**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.339-351, 25 out. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s11671-018-2728-6>

FOROUZANFAR, Fatemeh; READ, Morgayn I.; BARRETO, George E.; SAHEBKAR, Amirhossein. Neuroprotective effects of curcumin through autophagy modulation. **Iubmb Life**, [S.L.], v. 72, n. 4, p. 652-664, 5 dez. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/iub.2209>.

GAO, Y.; XIE, J.; CHEN, H.; GU, S.; ZHAO, R.; SHAO, J.; JIA, L. Nanotechnology-based intelligent drug design for cancer metastasis treatment. **Biotechnology Advances**. v. 32, n. 4, p. 761–777, 2014.

GANESAN, Poovi; NARAYANASAMY, Damodharan. Lipid nanoparticles: different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery. **Sustainable Chemistry And Pharmacy**, [S.L.], v. 6, p. 37-56, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scp.2017.07.002>.

GANESAN, Palanivel; KIM, Byungwook; RAMALINGAM, Prakash; KARTHIVASHAN, Govindarajan; REVURI, Vishnu; PARK, Shinyoung; KIM, Joon; KO, Young; CHOI, Dong-kug. Antineuroinflammatory Activities and Neurotoxicological Assessment of Curcumin Loaded Solid Lipid Nanoparticles on LPS-Stimulated BV-2 Microglia Cell Models. **Molecules**, [s.l.], v. 24, n. 6, p.1170-1181, 25 mar. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24061170>.

GATTOC, Leda; FREW, Paula M.; THOMAS, Shontell; EASLEY, Kirk; WARD, Laura; CHOW, H-H Sherry; URA, Chiemi A; FLOWERS, Lisa. Phase I dose-escalation trial of intravaginal curcumin in women for cervical dysplasia. **Open Access Journal Of Clinical Trials**, [s.l.], v. 9, p.1-10, dez. 2016. Dove Medical Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2147/oajct.s105010>.

GAUMET, Marie; VARGAS, Angelica; GURNY, Robert; DELIE, Florence. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, [s.l.], v. 69, n. 1, p.1-9, maio 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.08.001>.

GAUR, Praveen Kumar; MISHRA, Shikha; VERMA, Anurag; VERMA, Navneet. Ceramide–palmitic acid complex based Curcumin solid lipid nanoparticles for transdermal delivery: pharmacokinetic and pharmacodynamic study. **Journal of Experimental Nanoscience**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.38-53, 10 abr. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/17458080.2015.1025301>.

GAZAL, Marta; VALENTE; ACOSTA, Bruna A.; KAUFMANN, Fernanda N.; Braganhol, Elisandra; LENCINA, Claiton L.; STEFANELLO, Francieli M.; GHISLENI, Gabriele; KASTER, Manuella P. Neuroprotective and antioxidant effects of curcumin in a ketamine-induced model of mania in rats. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 724, p.132-139, fev. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.12.028>.

GUMIREDDY, Ashwini; CHRISTMAN, Ryann; KUMARI, Dunesh; TIWARI, Amit; NORTH, E. Jeffrey; CHAUHAN, Harsh. Preparation, Characterization, and In vitro Evaluation of Curcumin and Resveratrol-Loaded Solid Lipid Nanoparticles. **Aaps Pharmscitech**, [S.L.], v. 20, n. 4, p. 145-159, 18 mar. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1208/s12249-019-1349-4>.

GUPTA, Tanvi; SINGH, Joga; KAUR, Sandeep; SANDHU, Simarjot; SINGH, Gurpal; KAUR, Indu Pal. Enhancing Bioavailability and Stability of Curcumin Using Solid Lipid Nanoparticles (CLEN): a covenant for its effectiveness. **Frontiers In Bioengineering And Biotechnology**, [S.L.], v. 8, p. 879, 15 out. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2020.00879>.

GHANDADI, Morteza; SAHEBKAR, Amirhossein. Curcumin: An Effective Inhibitor of Interleukin-6. **Current Pharmaceutical Design**, [s.l.], v. 23, n. 6, p.921-931, 27 mar. 2017. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1381612822666161006151605>.

GHOSH, Vijayalakshmi; SARANYA, S; MUKHERJEE, Amitava; CHANDRASEKARAN, Natarajan. Antibacterial microemulsion prevents sepsis and triggers healing of wound in wistar rats. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 105, p.152-157, maio 2013. Elsevier BV.

GIBALDI, M.; FELDMAN, S. Establishment of sink conditions in dissolution rate determinations. Theoretical considerations and application to nondisintegrating dosage forms. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, n. 10, p. 1238 -1242, 1967.

GUORGUI, Jacob; WANG, Ruixue; MATTHEOLABAKIS, George; MACKENZIE, Gerardo G. Curcumin formulated in solid lipid nanoparticles has enhanced efficacy in Hodgkin's lymphoma in mice. **Archives of Biochemistry And Biophysics**, [s.l.], v. 648, p.12-19, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2018.04.012>.

GREIL, Richard; RESSLER, Sigrun G.; WEISS, Lukas; SCHONLIEB, Charlotte; MAGNES, Teresa; RADL, Bianca; BOLGER, Gordon T.; VCELAR, Brigitta; SORDILO, Peter P. A phase 1 dose-escalation study on the safety, tolerability and activity of liposomal curcumin (Lipocurc™) in patients with locally advanced or metastatic cancer. **Cancer Chemotherapy And Pharmacology**, [s.l.], v. 82, n. 4, p.695-706, 3 ago. 2018. Springer Nature America, Inc. <http://dx.doi.org/10.1007/s00280-018-3654-0>.

GORDILLO-GALEANO, Aldemar; MORA-HUERTAS, Claudia Elizabeth. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release. **European Journal of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, [s.l.], v. 133, p.285-308, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.10.017>.

GUPTA, Madhu; CHANDRA, Akhilesh; AGGARWAL, Geeta. Curcumin: Potential Therapeutic Moiety for Fungal Infections. **Current Traditional Medicine**, [s.l.], v. 4, n. 4, p.249-262, 12 fev. 2019. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/2215083805666181120124245>.

HAGAN, C. Tilden; MEDIK, Yusra B.; WANG, Andrew Z.. Nanotechnology Approaches to Improving Cancer Immunotherapy. **Advances In Cancer Research**, [s.l.], p.35-56, 2018. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.acr.2018.05.003>.

HAJIALYANI, Marziyeh; TEWARI, Devesh; SANCHEZ, Eduardo S.; NABAVI, Seyed M.; FARZAEI, Mohammad H.; ABDOLLAHI, Mohammad. Natural product-based nanomedicines for wound healing purposes: therapeutic targets and drug delivery systems. **International Journal**

of **Nanomedicine**, [s.l.], v. 13, p.5023-5043, set. 2018. Dove Medical Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2147/ijn.s174072>.

HASAN, Mahmoud; ELKHOURY, Kamil; KAHN, Cyril J. F.; ARAB-TEHRANY, Elmira; LINDER, Michel. Preparation, Characterization, and Release Kinetics of Chitosan-Coated Nanoliposomes Encapsulating Curcumin in Simulated Environments. **Molecules**, [S.L.], v. 24, n. 10, p. 2023-2037, 27 maio 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24102023>.

HAZZAH, Heba A.; FARID, Ragwa M.; NASRA, Maha M A.; EL-MASSIK, Magda A.; ABDALLAH, Ossama Y. Lyophilized sponges loaded with curcumin solid lipid nanoparticles for buccal delivery: Development and characterization. **International Journal Of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 492, n. 1-2, p.248-257, ago. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.06.022>.

HEATH, Dennis D; PRUITT Milagros A; BRENNER Dean E; ROCK Cheryl L. Curcumin in plasma and urine: quantitation by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, [s.l.], v. 783, n. 1, p.287-295, jan. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1570-0232\(02\)00714-6](http://dx.doi.org/10.1016/s1570-0232(02)00714-6).

HEWLINGS, Susan; KALMAN, Douglas. Curcumin: A Review of Its' Effects on Human Health. **Foods**, [s.l.], v. 6, n. 10, p.1-11, 22 out. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/foods6100092>.

HÖFS, Sarah; MOGAVERO, Selene; HUBE, Bernhard. Interaction of Candida albicans with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. **Journal of Microbiology**, [s.l.], v. 54, n. 3, p.149-169, 27 fev. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12275-016-5514-0>.

HOSHYAR, Nazanin. GRAY, Samantha; HAN, Honghin; BAO, Gang. The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. **Nanomedicine**, [s.l.], v. 11, n. 6, p.673-692, mar. 2016. Future Medicine Ltd. <http://dx.doi.org/10.2217/nnm.16.5>.

HUA, Susan; WU, Sherry Y.. The use of lipid-based nanocarriers for targeted pain therapies. **Frontiers In Pharmacology**, [s.l.], v. 4, p.1-7, 2013. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2013.00143>.

ICH. Validation of a analytical Procedures: text and methodology Q2(R1) **Guidance. Anais**, 2005.

IPAR, Vinod S.; DSOUZA, Anisha; DEVARAJAN, Padma V. Enhancing Curcumin Oral Bioavailability Through Nanoformulations. **European Journal of Drug Metabolism And Pharmacokinetics**, [s.l.], p.1-22, 15 fev. 2019. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s13318-019-00545-z>.

IRESON, Christopher; SAMANTHA Orr; DON J. L. JONES, Richard V.; CHANG-Kee Li, JIN-Li Luo; LYNNE Howells; SIMON Plummer; REBEKAH Jukes; MARION Williams; WILLIAM P. Steward; ANDREAS Gescher. Characterization of Metabolites of the Chemopreventive Agent Curcumin in Human and Rat Hepatocytes and in the Rat in Vivo, and Evaluation of Their Ability to Inhibit Phorbol Ester-induced Prostaglandin E2 Production1. **CANCER RESEARCH** v. 61, p. 1058–1064, 1 Febr. 2001.

JAISWAL, Piyush; GIDWANI, Bina; VYAS, Amber. Nanostructured lipid carriers and their current application in targeted drug delivery. **Artificial Cells, Nanomedicine, And**

Biotechnology, [s.l.], v. 44, n. 1, p.27-40, 9 maio 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/21691401.2014.909822>.

JAGDEVAPPA P, Prashant G, Ravindra K, Sachin J, Satish M, Meghanath S. Applications of Solid Lipid Nanoparticle in Novel Drug Delivery System. **Br Biomed Bull** 2013;1(2):103-18.

JANNIN, Vincent; BLAS, Lucia; CHEVRIER, Stéphanie; MIOLANE, Cédric; DEMARNE, Frédéric; SPITZER, Denis. Evaluation of the digestibility of solid lipid nanoparticles of glyceryl dibehenate produced by two techniques: ultrasonication and spray-flash evaporation. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 111, p. 91-95, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2017.09.049>.

JI, Hongyu; TANG, Jungling; LI, Mengting; REN, Jinmei; ZHENG, Nannan; WU, Linhua. Curcumin-loaded solid lipid nanoparticles with Brij78 and TPGS improved in vivo oral bioavailability and in situ intestinal absorption of curcumin. **Drug Delivery**, [s.l.], v. 23, n. 2, p.459-470, 3 jun. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/10717544.2014.918677>.

JORES, Katja; MEHNERT, Wolfgang; DRECHSLER, Markus; BUNJES, Heike; JOHANN, Cristoph; MADER, Karsten. Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy. **Journal Of Controlled Release**, [s.l.], v. 95, n. 2, p.217-227, mar. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2003.11.012>.

JOURGHANIAN, Parisa; GHAFARI, Solmaz; ARDJMAND, Mehdi; HAGHIGHAT, Setareh; MOHAMMADNEJAD, Mahdieh. Sustained release Curcumin loaded Solid Lipid Nanoparticles. **Advanced pharmaceutical bulletin** vol. 6, n.1, p.17-21, (2016).

JOVANOVIC, Slobodan V.; BOONE, Charles W.; STEENKEN, Steen; TRINOVA, Manuela; KASKEY, Robert B. How Curcumin Works Preferentially with Water Soluble Antioxidants. **Journal Of The American Chemical Society**, [s.l.], v. 123, n. 13, p.3064-3068, abr. 2001. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ja003823x>.

KAKKAR(a), Vandita; SINGH, Sukhjait; SINGLA, Dinesh; KAUR, Indu Pal. Exploring solid lipid nanoparticles to enhance the oral bioavailability of curcumin. **Molecular Nutrition & Food Research**, [s.l.], v. 55, n. 3, p. 495-503, 11 out. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.201000310>.

KAKKAR(b), Vandita; SINGH, Sukhjeet; SINGLA, Dinesh; SAHWNEY, Sudhir; CHAUHAN, Anurag Singh; SINGH, Gangandee; KAUR, Indu Pal. Pharmacokinetic applicability of a validated liquid chromatography tandem mass spectroscopy method for orally administered curcumin loaded solid lipid nanoparticles to rats. **Journal Of Chromatography B**, [S.L.], v. 878, n. 32, p. 3427-3431, dez. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.10.017>.

KAMEL, Amr Ehab; FADEL, Maha; LOUIS, Dina. Curcumin-loaded nanostructured lipid carriers prepared using Peceol™ and olive oil in photodynamic therapy: development and application in breast cancer cell line. **International Journal Of Nanomedicine**, [S.L.], v. 14, p. 5073-5085, jul. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/ijn.s210484>

KANGARLOU, Sogol ; RAMEZANPOUR, Sorour; BALALAIE, Saeed; MOHAMMADI, Shahla R.; HARIRIAN, Ismaeil. Curcumin-loaded nanoliposomes linked to homing peptides for integrin targeting and neuropilin-1-mediated internalization. **Pharmaceutical Biology**, [s.l.], v. 55, n. 1,

p.277-285, 10 dez. 2016. Informa UK Limited.
<http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2016.1261301>.

KARIMIAN, Maryam S.; PIRRO, Matteo; MAJEED, Muhammed; PHARM, Amirhossein S. Curcumin as a natural regulator of monocyte chemoattractant protein-1. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, [s.l.], v. 33, p.55-63, fev. 2017. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2016.10.001>.

KARIMI, Nayyer; GHANBARZADEH, Babak; HAMISHEHKAR, Hamed; MEHRAMUZ, Bahareh; KAFIL, Hossien S. Antioxidant, Antimicrobial and Physicochemical Properties of Turmeric Extract-Loaded Nanostructured Lipid Carrier (NLC). **Colloid And Interface Science Communications**, [s.l.], v. 22, p.18-24, jan. 2018. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.colcom.2017.11.006>.

KRAFT, John C.; FRELING, Jennifer P.; WANG, Ziyao; HO, Rodney J. Y. Emerging Research and Clinical Development Trends of Liposome and Lipid Nanoparticle Drug Delivery Systems. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 103, n. 1, p.29-52, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.23773>.

KIMURA, Shunsuke; KIRIYAMA, Akiko; ARAKI, Kaeko; YOSHIKUMI, Mai; ENOMURA, Masakazu; INOUE, Daisuke; FURUBAYASHI, Tomoyuki; YUTANI, Reiko; TAREOKA, Reiko; TANAKA, Akiko; KUSAMORI, Kosuke; KATSUMI, Hidemasa; YAMAMOTO, Akira; IGA, Katsumi; SAKANE, Toshiyasu. Novel strategy for improving the bioavailability of curcumin based on a new membrane transport mechanism that directly involves solid particles. **European Journal of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, [s.l.], v. 122, p.1-5, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.09.017>.

KIM, Dae-Duk; CHO, Hyun-Jong; PARK, Jin Woo; YOON, In-Soo. Surface-modified solid lipid nanoparticles for oral delivery of docetaxel: enhanced intestinal absorption and lymphatic uptake. **International Journal Of Nanomedicine**, [S.L.], p. 495, jan. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/ijn.s56648>.

KIM, Esther J.; LEWIS, Daniel J.; DABAJA, Bouthaina; DUVIC, Madeleine. Curcumin for the treatment of tumor-stage mycosis fungoides. **Dermatologic Therapy**, [s.l.], v. 30, n. 4, p.1-2, 6 jun. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/dth.12511>.

KOCAADAM, Betül; ŞANLIER, Nevin. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, [s.l.], v. 57, n. 13, p.2889-2895, 3 nov. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2015.1077195>.

KOUHPEIKAR, Hamideh; BUTLER, Alexandra E.; BAMIAN, Faeze, BARRETO, George E.; MAJEED, Muhammed; SAHEBKAR, Amirhossein. Curcumin as a therapeutic agent in leukemia. **Journal of Cellular Physiology**, [s.l.], p.1-11, 4 jan. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.28072>.

KUMARI, Avnesh; YADAV, Sudesh Kumar; YADAV, Subhash C.. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 75, n. 1, p.1-18, jan. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.001>.

KUNNUMAKKARA, Ajaikumar B.; BORDOLOI, Devivasha; PADMAVATHI, Ganesan; MONISHA, Javadi; ROY, Nand K.; PRASAD, Sahdeo; AGGARWAL, Bharat B. Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. **British Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 174, n. 11, p.1325-1348, 21 out. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.13621>.

KURIAKOSE, Moni Abraham; RAMDAS, Kunnambath; DEY, Bindu; IYER, Subramanya; RAJAN, Gunaseelan; ELANGO, Kalavathy K.; SURESH, Amritha; RAVINDRAN, Divya; KUMAR, Rajneesh R.; R, Prathiba. A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Phase IIB Trial of Curcumin in Oral Leukoplakia. **Cancer Prevention Research**, [S.L.], v. 9, n. 8, p. 683-691, 7 jun. 2016. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1940-6207.capr-15-0390>

LE, Uyen Minh; HARTMAN, Amanda; PILLAI, Gopalakrishna. Enhanced selective cellular uptake and cytotoxicity of epidermal growth factor-conjugated liposomes containing curcumin on EGFR-overexpressed pancreatic cancer cells. **Journal of Drug Targeting**, [s.l.], v. 26, n. 8, p.676-683, dez. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/1061186x.2017.1408114>.

LEE, Geun S.; LEE, Dong H.; KANG, Ki C.; LEE, Chun L.; PYO, Hyeong B.; CHOI, Tae B. Preparation and characterization of bis-ethylhexyloxyphenolmethoxy-phenyltriazine (BEMT) loaded solid lipid nano-particles (SLN). **J Ind Eng Chem**. 13:1180-1187, 2007.

LEE, Wonyoung; LEE, Dong Gun. An antifungal mechanism of curcumin lies in membrane-targeted action within *Candida albicans*. **Iubmb Life**, [s.l.], v. 66, n. 11, p.780-785, nov. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/iub.1326>.

LELLI, Diana; SAHEBKAR, Amirhossein; JOHNSTON, Thomas P.; PEDONE, Claudio. Curcumin use in pulmonary diseases: State of the art and future perspectives. **Pharmacological Research**, [s.l.], v. 115, p.133-148, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2016.11.017>.

LEO, Vincenzo De; MILANO, Francesco; MANCINI, Erminia; COMPARELLI, Roberto; GIOTTA, Livia; NACCI, Angelo; LONGOBARDI, Francesco; GARBETTA, Antonella; AGOSTIANO, Angela; CATUCCI, Lucia. Encapsulation of Curcumin-Loaded Liposomes for Colonic Drug Delivery in a pH-Responsive Polymer Cluster Using a pH-Driven and Organic Solvent-Free Process. **Molecules**, [s.l.], v. 23, n. 4, p.739-754, 23 mar. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23040739>.

LIM, Eun-kyung; CHUNG, Bong Hyun; CHUNG, Sang J.. Recent Advances in pH-Sensitive Polymeric Nanoparticles for Smart Drug Delivery in Cancer Therapy. **Current Drug Targets**, [s.l.], v. 19, n. 4, p.300-317, 19 fev. 2018. Bentham Science Publishers Ltd. <http://dx.doi.org/10.2174/1389450117666160602202339>.

LIN*, Jen-kun; LIN-SHIAU, Shoei-yn. Mechanisms of Cancer Chemoprevention by Curcumin. **Proc. Natl. Sci. Coun. Roc(b)**, China, p.59-66, 2001.

LIU, Anchang; LOU, Hongxiang; ZHAO, Lixia; FAN, Peihong. Validated LC/MS/MS assay for curcumin and tetrahydrocurcumin in rat plasma and application to pharmacokinetic study of phospholipid complex of curcumin. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 40, n. 3, p. 720-727, fev. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2005.09.032>.

LUAN, Lin; CHI, Zhe; LIU, Chenguang. Chinese White Wax Solid Lipid Nanoparticles as a Novel Nanocarrier of Curcumin for Inhibiting the Formation of Staphylococcus aureus Biofilms. **Nanomaterials**, [s.l.], v. 9, n. 5, p.763-776, 17 maio 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nano9050763>.

MAITI, Panchanan; SCOTT, Jason; SENGUPTA, Dipanwita; GHARAIBEH, Abeer Al; DUNBAR, Gary L. Curcumin and Solid Lipid Curcumin Particles Induce Autophagy, but Inhibit Mitophagy and the PI3K-Akt/mTOR Pathway in Cultured Glioblastoma Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 20, n. 2, p.399-419, 18 jan. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20020399>.

MAKONI, Pedzisai A.; KASONGO, Kasongo Wa; WALKER, Roderick B.. Short Term Stability Testing of Efavirenz-Loaded Solid Lipid Nanoparticle (SLN) and Nanostructured Lipid Carrier (NLC) Dispersions. **Pharmaceutics**, [S.L.], v. 11, n. 8, p. 397, 8 ago. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics11080397>.

MALVAJERD, Soroor S.; AZADI, Amir; IZADI, Zhila; KURD, Masoumed; DARA, Tahered; DIBAEI, Maryam; ZADEH, Mohammad S.; JAVAR, Hamid A.; HAMIDI, Mehrdad. Brain Delivery of Curcumin Using Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Preparation, Optimization, and Pharmacokinetic Evaluation. **ACS Chemical Neuroscience**, [s.l.], p.13-34, 24 out. 2018. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acscchemneuro.8b00510>.

MALVAJERD, Soroor Sadegh; IZADI, Zhila; AZADI, Amir; KURD, Masoumeh; DERAKHSHANKHAH, Hossein; SHARIFZADEH, Mohammad; JAVAR, Hamid Akbari; HAMIDI, Mehrdad. Neuroprotective Potential of Curcumin-Loaded Nanostructured Lipid Carrier in an Animal Model of Alzheimer's Disease: behavioral and biochemical evidence. **Journal Of Alzheimer'S Disease**, [S.L.], v. 69, n. 3, p. 671-686, 4 jun. 2019. IOS Press. <http://dx.doi.org/10.3233/jad-190083>.

MANTAWY, Eman M.; TADROS, Mariane G.; AWAD, Azza S.; HASSAN, Dina A. A.; DEMERDASH, Ebtehal El. Insights antifibrotic mechanism of methyl palmitate: Impact on nuclear factor kappa B and proinflammatory cytokines. **Toxicology And Applied Pharmacology**, [s.l.], v. 258, n. 1, p.134-144, jan. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2011.10.016>.

MARIN, Edgar; BRICENO, Maria I.; TORRES, Alicia; GEORGE, Catherina C. New Curcumin-Loaded Chitosan Nanocapsules: In Vivo Evaluation. **Planta Medica**, [s.l.], v. 83, n. 10, p.877-883, 6 mar. 2017. Georg Thieme Verlag KG.

MARTINS, Susana; SARMENTO, Bruno; FERREIRA, Domingos C.; SOUTO, Eliana B. "Lipid-Based Colloidal Carriers for Peptide and Protein Delivery – Liposomes versus Lipid Nanoparticles." **International Journal of Nanomedicine** v. 2, n. 4, p.595–60, dez. 2007.

MARZI, Ingo; COWPER, Katherine; TAKEI, Yoshiyuki; LINDERT, Kelly; LEMASTERS, Jonh J.; THURMAN Ronald G. Methyl palmitate prevents Kupffer cell activation and improves survival after orthotopic liver transplantation in the rat. **Transplant International**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.215-220, jan. 1991. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-2277.1991.tb01983.x>.

MATHEW, Dony; HSU, Wei-li. Antiviral potential of curcumin. **Journal of Functional Foods**, [s.l.], v. 40, p.692-699, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2017.12.017>.

MAZZARINO, Leticia; TRAVELET, Christophe; MURILLO, Sonia O.; OTSUKA, Issei; PAINTRAND, P.; SENNA, Elenara L; BORSALI, Redouane. Elaboration of chitosan-coated nanoparticles loaded with curcumin for mucoadhesive applications. **Journal of Colloid And Interface Science**, [s.l.], v. 370, n. 1, p.58-66, mar. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2011.12.063>.

MAYER, François L.; WILSON, Duncan; HUBE, Bernhard. Candida albicans pathogenicity mechanisms. **Virulence**, [s.l.], v. 4, n. 2, p.119-128, 15 fev. 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/viru.22913>.

MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 47, n. 2-3, p.165-196, 25 abr. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x\(01\)00105-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x(01)00105-3).

MEHNERT, Wolfgang; MÄDER, Karsten. Solid lipid nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 64, p.83-101, dez. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.021>.

MENDONÇA, Leonardo M.; SANTOS, Graciela C.; ANTONUCCI, Gilmara A.; SANTOS, Antonio C.; BIANCHI, Maria L. P.; ANTUNES, Lusânia M. G. Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of curcumin in PC12 cells. **Mutation Research/genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**, [s.l.], v. 675, n. 1-2, p.29-34, abr. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.02.003>.

MILOBEDZKA, J.; KOSTANECKI, St. V.; LAMPE, V.. Zur Kenntnis des Curcumins. **Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, [s.l.], v. 43, n. 2, p.2163-2170, abr. 1910. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cber.191004302168>.

MINAFRA, Luigi; PORCINO, Nunziatina; BRAVATÀ, Valentina; GAGLIO, Daniela; BONANOMI, Marcella; AMORE, Erika; CAMMARATA, Francesco Paolo; RUSSO, Giorgio; MILITELLO, Carmelo; SAVOCA, Gaetano. Radiosensitizing effect of curcumin-loaded lipid nanoparticles in breast cancer cells. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.11134-11150, 31 jul. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-47553-2>.

MISHRA, Vijay; BANSAL, Kuldeep; VERMA, Asit; YADAV, Nishika; THAKUR, Sourav; SUDHAKAR, Kalvatala; ROSENHOLM, Jessica. Solid Lipid Nanoparticles: emerging colloidal nano drug delivery systems. **Pharmaceutics**, [S.L.], v. 10, n. 4, p. 191, 18 out. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics10040191>.

MIRZAEI, Hamed; NASERI, Gholamreza; REZAEI, Ramin; MOHAMMADI, Mohsen; BANIKAZEMI, Zarrin; MIRZAEI, Hamid R.; SALEHI, Hossein; PEYVANDI, Mostafa; PAWELEK, John M; SAHEBKAR, Amirhossein. Curcumin: A new candidate for melanoma therapy?. **International Journal of Cancer**, [s.l.], v. 139, n. 8, p.1683-1695, 4 jul. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.30224>.

MOGHIMI, S. M.; SIMBERG, D. Nanoparticle transport pathways into tumors. **Journal of Nanoparticle Research**, [s.l.], v. 20, n. 6, p.1-4, jun. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11051-018-4273-8>.

MOHAMMADI-SAMANI, Soliman; GHASEMIYEH, Parisa. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: applications, advantages and disadvantages. **Research In Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 13, n. 4, p.288-304, 2018. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/1735-5362.235156>.

MOHAMED, J. Muthu; ALQAHTANI, Ali; AHMAD, Fazil; KRISHNARAJU, V.; KALPANA, K.. Pectin co-functionalized dual layered solid lipid nanoparticle made by soluble curcumin for the targeted potential treatment of colorectal cancer. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 252, p. 117180, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117180>.

MOHANRAJ, V J; CHEN, y. Nanoparticles - A review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.561-573, 31 jul. 2007. African Journals Online (AJOL). <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v5i1.14634>.

MOĽOVSKÁ, Silvia; PETAKOVA, Patrícia; KALINAK, Michal; MIKULAJOVA, Anna. Antioxidant properties of curcuminoids isolated from *Curcuma longa* L. **Acta Chimica Slovaca**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.130-135, 1 out. 2016. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/acs-2016-0022>.

MONTEIRO, N.; MARTINS, Albino; REIS, Rui L.; NEVES, Nuno M. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. **Journal of The Royal Society Interface**, [s.l.], v. 11, n. 101, p.20140459-20140459, 29 out. 2014. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2014.0459>.

MORABITO, Rossana; FALLITI, Giuseppe; GERACI, Antonella; SPADA, Giuseppa; MARINO, Angela. Curcumin Protects -SH Groups and Sulphate Transport after Oxidative Damage in Human Erythrocytes. **Cellular Physiology And Biochemistry**, [s.l.], v. 36, n. 1, p.345-357, 2015. Cell Physiol Biochem Press GmbH and Co KG. <http://dx.doi.org/10.1159/000430256>.

MORAES, Carolina M.; PAULA, Eneida; ROSA, André H.; FRACETO, Leonardo F. Physicochemical stability of poly(lactide-co-glycolide) nanocapsules containing the local anesthetic Bupivacaine. **Journal of The Brazilian Chemical Society**, [s.l.], v. 21, n. 6, p.995-1000, 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-50532010000600008>.

MOSTAFAVI, Ebrahim; SOLTANTABAR, Pooneh; WEBSTER, Thomas J.. Nanotechnology and picotechnology. **Biomaterials In Translational Medicine**, [s.l.], p.191-212, 2019. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-813477-1.00009-8>.

MOSELHY, Said S.; RAZVI, Saif S. M.; HASAN, Najmul; BALAMASH, Khadijah S. A.; ABULNAJA, Khalid O.; YAGHMOOR, Soonham S.; YOUSSEFI, M. A.; KUMOSANI, Taha A.; AL-MALKI, Abdulrahman L. Multifaceted Role of a Marvel Golden Molecule, Curcumin: a Review. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 80, n. 3, p.400-412, 2018. OMICS Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.4172/pharmaceutical-sciences.1000372>.

MULIK, Rohit S.; MONKKONEN, Jukka; JUVONEN, Risto O.; MAHADIK, Kakasaheb R.; PARADKAR, Anant R. Transferrin mediated solid lipid nanoparticles containing curcumin: Enhanced in vitro anticancer activity by induction of apoptosis. **International Journal Of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 398, n. 1-2, p.190-203, out. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.07.021>.

MULLER, R; MADER, K; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, [s.l.], v. 50, n. 1, p.161-177, 3 jul. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0939-6411\(00\)00087-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0939-6411(00)00087-4).

MULLER, Rainer H.; RADTKE, M.; WISSING, S.a. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 54, p.131-155, nov. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x\(02\)00118-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x(02)00118-7).

MULLER, Rainer H.; SHEGOKAR, Ranjita; KECK, Cornelia M.. 20 Years of Lipid Nanoparticles (SLN & CLN): Present State of Development & Industrial Applications. **Current Drug Discovery Technologies**, [s.l.], v. 8, n. 3, p.207-227, 1 set. 2011. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/157016311796799062>.

MURTHY, Kotamballi. N. C.; PATIL, Bhimanagouda S.; JAYAPRAKASHA, Guddadarangavvanahally K.; MONIKA P. Nanoencapsulation: An Advanced Nanotechnological Approach To Enhance the Biological Efficacy of Curcumin. **Advances in Plant Phenolics: From Chemistry to Human Health**. p.383-405, 2018. Oxford University Press Publisher.

NADAF, Sameer J.; KILLEDAR, Suresh G.. Curcumin nanocochleates: Use of design of experiments, solid state characterization, in vitro apoptosis and cytotoxicity against breast cancer MCF-7 cells. **Journal of Drug Delivery Science And Technology**, [s.l.], v. 47, p.337-350, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2018.06.026>.

NAHAR, Pragati P.; SLITT, Angela L.; SEERAM, Navindra P.. Anti-Inflammatory Effects of Novel Standardized Solid Lipid Curcumin Formulations. **Journal of Medicinal Food**, [s.l.], v. 18, n. 7, p.786-792, jul. 2015. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/jmf.2014.0053>.

NATA. Technical Note 17. Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods. **Canberra: National Association of testing Authorities**, pp. 32, 2013.

NASERI, Neda; VALIZADEH, Hadi; ZAKERI-MILANI, Parvin. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Structure, Preparation and Application. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, [s.l.], v. 5, n. 3, p.305-313, 19 set. 2015. International Society for Phytocosmetic Sciences. <http://dx.doi.org/10.15171/apb.2015.043>.

NASERY, Moballeg, M.; ABADI, Banafshe; POORMOGHADAM, Delaram; ZARRABI Ali; KEYHANVAR, Peyman; KHANBABAEI, Hashem; ASHRAFIZADEH, Milad; MOHAMMADINEJAD, Reza; TAVAKOL, Shima; SETHI, Gautam. Curcumin Delivery Mediated by Bio-Based Nanoparticles: A Review. **Molecules**, v.25, n.3, 6 fev. 2020. [Http://dx.doi.org/10.3390/molecules25030689](http://dx.doi.org/10.3390/molecules25030689)

NOACK, Andreas; HAUSE, Gerd; MÄDER, Karsten. Physicochemical characterization of curcuminoid-loaded solid lipid nanoparticles. **International Journal Of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 423, n. 2, p.440-451, fev. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.12.011>.

NOBLE, Suzanne M.; GIANETTI, Brittany A.; WITCHLEY, Jessica N.. Candida albicans cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. **Nature Reviews Microbiology**,

[s.l.], v. 15, n. 2, p.96-108, 21 nov. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2016.157>.

OBINU, Antonella; BURRAI, Giovanni Pietro; CAVALLI, Roberta; GALLERI, Grazia; MIGHELI, Rossana; ANTUOFERMO, Elisabetta; RASSU, Giovanna; GAVINI, Elisabetta; GIUNCHEDI, Paolo. Transmucosal Solid Lipid Nanoparticles to Improve Genistein Absorption via Intestinal Lymphatic Transport. **Pharmaceutics**, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 267, 16 fev. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics13020267>

PALIWAL, Rishi.; VAIDYA, Bhuvaneshwar; GOYAL, Amit K.; MEHTA, Abhinav; RAI, Shivani; KHATRI, Kapil; MISHRA, Neeraj; VYAS, Suresh. Effect of lipid core material on characteristics of solid lipid nanoparticles designed for oral lymphatic delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, [s.l.], v. 5, n. 2, p.184-191, jun. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2008.08.003>.

PANAHI, Yunes; PARVIN, Shahram; ALISHIRI, Gholam H.; SAHEBKAR, Amirhossein. Mitigation of Systemic Oxidative Stress by Curcuminoids in Osteoarthritis: Results of a Randomized Controlled Trial. **Journal of Dietary Supplements**, [s.l.], v. 13, n. 2, p.209-220, 17 fev. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/19390211.2015.1008611>.

PARDEIKE, Jana; HOMMOSS, Aiman; MÜLLER, Rainer H.. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 366, n. 1-2, p.170-184, jan. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.10.003>.

PARHI, Priyambada; MOHANTY, Chandana; SAHOO, Sanjeeb Kumar. Nanotechnology-based combinational drug delivery: an emerging approach for cancer therapy. **Drug Discovery Today**, [s.l.], v. 17, n. 17-18, p.1044-1052, set. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2012.05.010>.

PARK, Nathaniel H.; CHENG, Wei; LAI, Fritz; YANG Chuan; SESSIONS, Paola F.; PERIASWAMY, Balamurugan; CHU, Collins W.; BIANCO, Simone; LIU, Shaoqiong; VENKATARAMAN, Shrinivas; CHEN, Qingfeng; YANG, Yi Y; HEDRICK, James L. Addressing Drug Resistance in Cancer with Macromolecular Chemotherapeutic Agents. **Journal of The American Chemical Society**, [s.l.], v. 140, n. 12, p.4244-4252, 5 mar. 2018. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jacs.7b11468>.

PATHAK, Lokesh; KANWAL, Abhinav; AGRAWAL, Yadvendra. Curcumin loaded self assembled lipid-biopolymer nanoparticles for functional food applications. **Journal Of Food Science And Technology**, [S.L.], v. 52, n. 10, p. 6143-6156, 17 fev. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-015-1742-2>.

PASTORELLI, Davide; GIOVANIS, Petros; FABRICIO, Aline S. C.; D'LPPOLITO, Simona. Phytosome complex of curcumin as complementary therapy of advanced pancreatic cancer improves safety and efficacy of gemcitabine: Results of a prospective phase II trial. **Pharmacological Research**, [s.l.], v. 132, p.72-79, jun. 2018. Elsevier BV.

PATIL, Akshay; MISHRA, Vijay; THAKUR, Sourav; RIYAZ, Bushra; KAUR, Amanjot; KHURSHEED, Rubiya; PATIL, Kiran; SHATE, Bhushankumar. Nanotechnology Derived Nanotools in Biomedical Perspectives: An Update. **Current Nanoscience**, [s.l.], v. 15, n. 2, p.137-146, 14 dez. 2018. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1573413714666180426112851>.

PAVIA, Donald. L.; LAMPMAN, Gary M.; KRIZ, Goerge S. Introduction to Spectroscopy, 4th Edition, Belmont, CA: **Cengage Learning**, p.16- 104, 2009.

PENG, Shengfeng; LI, Ziling; ZOU, Liqiang; LIU, Wei; LIU, Chengme; MCCLEMENTS, David J. Enhancement of Curcumin Bioavailability by Encapsulation in Sophorolipid-Coated Nanoparticles: An in Vitro and in Vivo Study. **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 66, n. 6, p.1488-1497, 5 fev. 2018. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05478>.

PENG, Kuo-ti; CHIANG, Yao-C.; HUANG, Tsung Y.; CHEN, Pei-C.; CHANG, Pey-J.; LEE, Chiang-W. Curcumin nanoparticles are a promising anti-bacterial and anti-inflammatory agent for treating periprosthetic joint infections. **International Journal of Nanomedicine**, [s.l.], v. 14, p.469-481, jan. 2019. Dove Medical Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2147/ijn.s191504>

PERTEGHELLA, Sara; MANDRACCHIA, Delia; TORRE, Maria Luisa; TAMMA, Roberto; RIBATTI, Domenico; TRAPANI, Adriana; TRIPODO, Giuseppe. Anti-angiogenic activity of uncoated- and N,O-carboxymethyl-chitosan surface modified-Gelucire® 50/13 based solid lipid nanoparticles for oral delivery of curcumin. **Journal Of Drug Delivery Science And Technology**, [s.l.], v. 56, p.101494-101529, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101494>.

PINK, Demi L.; LORUTHAI, Orathai; ZIOLEK, Robert M.; WASUTRASAWAT, Prawarisa; TERRY, Ann E.; LAWRENCE, M. Jayne; LORENZ, Christian D. On the Structure of Solid Lipid Nanoparticles. **Small**, [S.L.], v. 15, n. 45, p. 1903156, 18 set. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/smll.201903156>.

PRABHU, Sunil; THAKKAR, Arvind; CHENREDDY, Sushma; THIO, Astrid; KHAMAS, Wael; WANG, Jeffrey. Preclinical systemic toxicity evaluation of chitosan-solid-lipid nanoparticle-encapsulated aspirin and curcumin in combination with free sulforaphane in BALB/c mice. **International Journal of Nanomedicine**, [s.l.], v. 11, p.3265-3276, jul. 2016. Dove Medical Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2147/ijn.s106736>.

PRIYADARSINI, K. Indira. Chemical and Structural Features Influencing the Biological Activity of Curcumin. **Current Pharmaceutical Design**, [s.l.], v. 19, n. 11, p.2093-2100, 1 abr. 2013. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/138161213805289228>.

PORTER, C. Intestinal lymphatic drug transport: an update. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 50, n. 1-2, p.61-80, 23 ago. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x\(01\)00151-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x(01)00151-x).

PUNFA, Wanisa; PITCHAKARN, Pornsiri; YODKEEREE, Supachai; AMPASAVATE, Chadarat. Enhancement of cellular uptake and cytotoxicity of curcumin-loaded PLGA nanoparticles by conjugation with anti-P-glycoprotein in drug resistance cancer cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, [s.l.], v. 33, n. 6, p.823-831, 14 maio 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/aps.2012.34>.

PURPURA, Martin; LOWERY, Ryan P.; WILSON, Jacob M.; MANNAN, Haider; MUNCH, Gerald; NAUMOVSKI, Valentina R. Analysis of different innovative formulations of curcumin for

improved relative oral bioavailability in human subjects. **European Journal of Nutrition**, [s.l.], v. 57, n. 3, p.929-938, 16 fev. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00394-016-1376-9>.

PRASAD, Sahdeo; GUPTA, Subash C.; TYAGI, Amit K.; AGGARWAL, Bharat B. Curcumin, a component of golden spice: From bedside to bench and back. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 32, n. 6, p.1053-1064, nov. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.04.004>.

PRIWITANINGRUM, Dwi L.; BLONDÉ, Jean-Baptiste G M.; SRIDHAR, Adithya; BAARLEN, Joop V.; HENNINK, Win E.; STORM, Gerrit; GAC, Severine L; Prakash, Jai. Tumor stroma-containing 3D spheroid arrays: A tool to study nanoparticle penetration. **Journal of Controlled Release**, [s.l.], v. 244, p.257-268, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.09.004>.

QIU, Hui; MIN, Yuanzeng; RODGERS, Zach, Longzhen; WANG, Andrew. Nanomedicine approaches to improve cancer immunotherapy. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, [s.l.], v. 9, n. 5, p.1-15, 10 mar. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/wnan.1456>.

RAJENDRAN, Radhai; KOTRESH, T. M.; CSISZAR E. Development of antimicrobial cotton fabrics using herb loaded nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 91, n. 2, p.613-617, jan. 2013. Elsevier BV.

RAMALINGAM, Prakash; YOO, Sang Woo; KO, Young Tag. Nanodelivery systems based on mucoadhesive polymer coated solid lipid nanoparticles to improve the oral intake of food curcumin. **Food Research International**, [s.l.], v. 84, p.113-119, jun. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.03.031>.

RAPALLI, Vamshi Krishna; KAUL, Vedhant; WAGHULE, Tejashree; GORANTLA, Srividya; SHARMA, Swati; ROY, Aniruddha; DUBEY, Sunil Kumar; SINGHVI, Gautam. Curcumin loaded nanostructured lipid carriers for enhanced skin retained topical delivery: optimization, scale-up, in-vitro characterization and assessment of ex-vivo skin deposition. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 152, p. 105438-105445, set. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105438>.

RAVIKUMAR, Soumya; HSIEH, Carl; RAJASHEKHARAI AH, Vani. Prospects of curcumin as an additive in storage solutions: a study on erythrocytes. **Turkish Journal of Medical Sciences**, [s.l.], v. 46, p.825-833, 2016. The Scientific and Technological Research Council of Turkey. <http://dx.doi.org/10.3906/sag-1501-93>.

RAUF, Abdur; MUHAMMAD, Imran; ORHAN, Ilkay E.; BAWAZEER, Saud. Health perspectives of a bioactive compound curcumin: A review. **Trends In Food Science & Technology**, [s.l.], v. 74, p.33-45, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2018.01.016>.

REIS, Catarina Pinto; NEUFELD, Ronald J.; RIBEIRO, Antonio J.; VEIGA, Francisco. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.8-21, mar. 2006. Elsevier BV

RIGHESCHI, Chiara; BERGONZI, Maria C.; ISACCHI, Benedetta; BAZZICALUPI, Carla; GRATERRI, Paola; BILIA, Anna R. Enhanced curcumin permeability by SLN formulation: The PAMPA approach. **Lwt - Food Science And Technology**, [s.l.], v. 66, p.475-483, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.008>.

RODERO, Camila F.; CALIXTO, Giovana M. F.; SANTOS, Karen C.; SATO, Mariana R.; RAMOS, Matheus A. S.; MIRÓ, Maria S.; RODRIGUEZ, Emilse.; VIGEZZI, Cecilia; BAUAB, Tais M.; SOTOMAYOR, Claudia E.; CHORILLI, Marlus. Curcumin-Loaded Liquid Crystalline Systems for Controlled Drug Release and Improved Treatment of Vulvovaginal Candidiasis. **Molecular Pharmaceutics**, [s.l.], v. 15, n. 10, p.4491-4504, 5 set. 2018. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00507>.

RODRIGUES, Vanessa L.; OLIVEIRA, Ana.; SILVA, Marta C.; PINTO, Madalena; LIMA, Raquel T.; SOUSA, Emilia; VASCONCELOS, Helena M. A novel curcumin derivative which inhibits P-glycoprotein, arrests cell cycle and induces apoptosis in multidrug resistance cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 25, n. 2, p.581-596, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2016.11.023>.

ROMPICHARLA, Sri V. K.; BHATT, Himanshu; SHAH, Aasham; KOMANDURI, Neeraja; VIJAYASARATHY, Dhanya; GHOSH, Balaram; BISWAS, Swati. Formulation optimization, characterization, and evaluation of in vitro cytotoxic potential of curcumin loaded solid lipid nanoparticles for improved anticancer activity. **Chemistry And Physics of Lipids**, [s.l.], v. 208, p.10-18, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.08.009>.

RYAN, Julie L.; HECKLER, Charles E.; LING, Marilyn; KATZ, Alan.; WILLIAMS, Jacqueline P.; PENTLAND, Alice P.; MORROW, Gary R. Curcumin for Radiation Dermatitis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial of Thirty Breast Cancer Patients. **Radiation Research**, [s.l.], v. 180, n. 1, p.34-43, jul. 2013. Radiation Research Society. <http://dx.doi.org/10.1667/rr3255.1>.

SAEED, Rami M. et al. Preparation and thermal performance of methyl palmitate and lauric acid eutectic mixture as phase change material (PCM). **Journal Of Energy Storage**, [s.l.], v. 13, p.418-424, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.est.2017.08.005>.

SANGO, D. M.; ABELA, D.; MCELHATTON, A.; VALDRAMIDIS, V.P. Assisted ultrasound applications for the production of safe foods. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 116, n. 5, p.1067-1083, 11 mar. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12468>.

SANTOS, Valeria da Silva; RIBEIRO, Ana Paula Badan; SANTANA, Maria Helena Andrade. Solid lipid nanoparticles as carriers for lipophilic compounds for applications in foods. **Food Research International**, [S.L.], v. 122, p. 610-626, ago. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.032>.

SARKAR, Swapna; KAPHALIA, Bhupendra; KHAN, Frioze M. Methyl palmitate inhibits lipopolysaccharide-stimulated phagocytic activity of rat peritoneal macrophages. **Journal of Biochemical And Molecular Toxicology**, [s.l.], v. 20, n. 6, p.302-308, 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jbt.20150>

SCHWERTHEIM, Suzan; LENNARTZ, Klaus; WEIN, Frederik; WORN, Karl. Curcumin induces G2/M arrest, apoptosis, NF- κ B inhibition, and expression of differentiation genes in thyroid

carcinoma cells. **Journal of Cancer Research And Clinical Oncology**, [s.l.], v. 143, n. 7, p.1143-1154, 6 mar. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00432-017-2380-z>.

SEVERINO, Patrícia; SANTANA, Maria Helena A.; SOUTO, Eliana B.. Optimizing SLN and NLC by 22 full factorial design: Effect of homogenization technique. **Materials Science And Engineering: C**, [s.l.], v. 32, n. 6, p.1375-1379, ago. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2012.04.017>.

SHAHZAD, Muhammad; SHERRY, Leighann; RAJENDRAN, Ranjith; EDWARDS, Christine A.; COMBET, Emilie; RAMAGE, Gordon. Utilising polyphenols for the clinical management of *Candida albicans* biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s.l.], v. 44, n. 3, p.269-273, set. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.05.017>.

SHARAWY, Maha H.; EL-AGAMY, Dina S.; SHALABY, Assem A.; AMMAR, EL-Sayed M. Protective effects of methyl palmitate against silica-induced pulmonary fibrosis in rats. **International Immunopharmacology**, [s.l.], v. 16, n. 2, p.191-198, jun. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2013.04.007>.

SHARMA, Jai B.; BHATT, Shailendra; SAINI, Vipin; KUMAR, Manish. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Curcumin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles in the Management of Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus: Application of Central Composite Design. **Assay and Drug Development Technologies**. Mai. 2021. <https://doi.org/10.1089/adt.2021.017>

SHARMA, Manu; SHARMA, Shipra; WADHWA, Jyoti. Improved uptake and therapeutic intervention of curcumin via designing binary lipid nanoparticulate formulation for oral delivery in inflammatory bowel disorder. **Artificial Cells, Nanomedicine, And Biotechnology**, [s.l.], v. 47, n. 1, p.45-55, 19 jan. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/21691401.2018.1543191>.

SHARMA, Monika; MANOHARLAL, Raman; PURI, Nidhi; PRASAD, Rajendra. Antifungal curcumin induces reactive oxygen species and triggers an early apoptosis but prevents hyphae development by targeting the global repressor TUP1 in *Candida albicans*. **Bioscience Reports**, [s.l.], v. 30, n. 6, p.391-404, 24 set. 2010. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bsr20090151>.

SHARMA, Ricky A.; STEWARD, William P.; GESCHER, Andreas J.. PHARMACOKINETICS AND PHARMACODYNAMICS OF CURCUMIN. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, [s.l.], p. 453-470, 2007. Springer US. http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-46401-5_20.

SHARMA, Ricky.a.; GESCHER, Andreas. J.; STEWARD, William P.. Curcumin: The story so far. **European Journal of Cancer**, [s.l.], v. 41, n. 13, p.1955-1968, set. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2005.05.009>.

SHASTRI, Divyesh H. Effective Delivery Routes and Strategies for Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC). **Current Pharmaceutical Design**, [s.l.], v. 23, n. 43, p.6592-6601, 15 fev. 2018. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/138161282366617112211132>.

SHEGOKAR, Ranjita. Immunomodulatory effects of curcumin in infectious and non-infectious diseases. **Emerging Nanotechnologies In Immunology**, [s.l.], p.203-231, 2018. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-323-40016-9.00008-7>.

SHRIVASH, Manoj K; MISHRA, Sonali; PANWAR, Sneh L.; SIRCAIK, Shabnam; PANDEY, Jyoti; MISRA, Krishna. Attenuation of Pathogenicity in *Candida albicans* by Application of Polyphenols. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, [s.l.], v. 10, n. 2, p.1-13, 2018. OMICS Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.4172/1948-5948.1000392>.

SHIRODKAR, Rupesh K.; KUMAR, Lalit; MUTALIK, Srinivas; LEWIS, Shaila. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: emerging lipid based drug delivery systems. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, [S.L.], v. 53, n. 5, p. 440-453, ago. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11094-019-02017-9>.

SHROTRIYA, Shilpa; RANPISE, Nisharani; SATPUTE, Pournima; VIDHATE, Bhagvat. Skin targeting of curcumin solid lipid nanoparticles-engrossed topical gel for the treatment of pigmentation and irritant contact dermatitis. **Artificial Cells, Nanomedicine, And Biotechnology**, [S.L.], v. 46, n. 7, p. 1471-1482, 8 set. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/21691401.2017.1373659>.

STOHS, Sidney. J.; Ji, J.; BUCCI, L. R.; PREUSS, H. G. A Comparative pharmacokinetic assessment of a novel highly bioavailable curcumin formulation with 95% curcumin: A randomized, double-blind, crossover study. **J Am Coll Nutr**, 2018, 37, 51-59.

STOHS, Sidney J.; CHEN, Oliver; RAY, Sidhartha D.; JI, Jin; BUCCI, Luke R.; PREUSS, Harry G. Highly Bioavailable Forms of Curcumin and Promising Avenues for Curcumin-Based Research and Application: a review. **Molecules**, [S.L.], v. 25, n. 6, p. 1397, 19 mar. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25061397>.

SLIKA, Loyal; PATRA, Digambara. A short review on chemical properties, stability and nano-technological advances for curcumin delivery, **Expert Opinion on Drug Delivery**, 17:1, p.61-75, 2020. <http://dx.doi.org/10.1080/17425247.2020.1702644>.

SILVA-BUZANELLO, Rosana A.; ESPERANÇA, Eduardo S.; SOUZA, MATEUS F.; LEIMANN, Fernanda V.; GONÇALVES, Odinei H. Influence of operational conditions on obtaining polystyrene nanoparticles. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.33-39, 29 maio 2012. Federal University of Technology - Parana. <http://dx.doi.org/10.14685/rebrapa.v2i1.53>.

SINHA VR, Srivastava S, Goel H, Jindal V. Solid lipid nanoparticles (SLN'S) – trends and implications in drug targeting. **Int J Adv Pharma Sci**, v. 1, p. 212–238, 2010.

SIDDIQUI, Imtiaz A; ADHAMI, Vaqar M.; BHARALI, Dhruva J.; HAFEEZ, Bilal B.; ASIM, Mohammad; KHWAJA, Sabih I.; AHMAD, Nihal; CUI, Huadong; MOUSA, Shaker A.; MUKHTAR, Hasan. Introducing Nanochemoprevention as a Novel Approach for Cancer Control: Proof of Principle with Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-Gallate. **Cancer Research**, [s.l.], v. 69, n. 5, p.1712-1716, 10 fev. 2009. American Association for Cancer Research (AACR).

SOFI, Balsam et al. Therapeutic potential of curcumin nanoparticles against human colon cancer cells (HCT116). **Paripex-indian Journal of Research**, v. 6, n. 11, 2018.

SOMANATHAN, Thara; RAVINDRAN, Hiran K.; RANGANATHAN, Kannan; KATAKAM, Sudhakar B.; PARASHURAM, Shivashankar; JAYAPRAKASH, Vijayavel; PILLAI,

Radhakrishna. A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Phase IIB Trial of Curcumin in Oral Leukoplakia. *Cancer Prevention Research*, [s.l.], v. 9, n. 8, p.683-691, 7 jun. 2016. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1940-6207.capr-15-0390>.

SOUTO, E. B.; MEHNERT, W.; MÜLLER, R. H.. Polymorphic behaviour of Compritol®888 ATO as bulk lipid and as SLN and NLC. *Journal of Microencapsulation*, [s.l.], v. 23, n. 4, p.417-433, jan. 2006. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/02652040600612439>.

SOUTO, Eliana B.; SEVERINO, Patrícia; SANTANA, Maria H.; PINHO, Samantha C. Nanopartículas de lipídios sólidos: métodos clássicos de produção laboratorial. *Química Nova*, [s.l.], p.1375-1379, 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422011001000009>.

SOUTO, E.B.; Muller, R.H. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers-Lipid Nanoparticles for Medicals and Pharmaceuticals. In *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, 2nd ed.; Nalwa, H.S., Ed.; American Scientific Publishers: Valencia, CA, USA, v. 23, pp. 313–328. 2011.

SUDBERY, Peter; GOW, Neil; BERMAN, Judith. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends In Microbiology*, [s.l.], v. 12, n. 7, p.317-324, jul. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2004.05.008>.

SUETH-SANTIAGO, Vitor; MENDES-SILVA, Gustavo P.; DECOTÉ-RICARDO, Debora; LIMA, Marco E. F. CURCUMIN, THE GOLDEN POWDER FROM TURMERIC: INSIGHTS INTO CHEMICAL AND BIOLOGICAL ACTIVITIES. *Química Nova*, [s.l.], p.1-15, 2015. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20150035>

SUN, Huimin; YANG, Rui; WANG, Jue; YANG, Xia; TU, Jiasheng; XIE; Langui; LI, Chunqi; LAO, Qiaocong; SUN, Chunmeng. Component-based biocompatibility and safety evaluation of polysorbate 80. *Rsc Advances*, [s.l.], v. 7, n. 25, p.15127-15138, 2017. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c6ra27242h>.

SURESH, Kuthuru; NANGIA, Ashwini. Curcumin: pharmaceutical solids as a platform to improve solubility and bioavailability. *Crystengcomm*, [s.l.], v. 20, n. 24, p.3277-3296, 2018. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c8ce00469b>.

TALEGAONKAR, Sushama; BHATTACHARYYA, Arundhati. Potential of Lipid Nanoparticles (SLN's and NLC's) in Enhancing Oral Bioavailability of Drugs with Poor Intestinal Permeability. *Aaps Pharmscitech*, [s.l.], v. 20, n. 3, p.11-15, 25 fev. 2019. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1208/s12249-019-1337-8>.

TAMJIDI, Fardin; SHAHEDI, Mohammad; VARSHOSAZ, Jaleh; NASIRPOUR, Ali. Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, [s.l.], v. 19, p.29-43, jul. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2013.03.002>.

TANG, Jingling; JI, Hongyu; REN, Jinmei; LI, Mengting; ZHENG, Nannan; WU, Linhua. Solid lipid nanoparticles with TPGS and Brij 78: a co-delivery vehicle of curcumin and piperine for reversing p-glycoprotein-mediated multidrug resistance in vitro. *Oncology Letters*, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 389-395, 23 nov. 2016. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/ol.2016.5421>

TEERANACHAIDEEKUL, V; MULLER, R; JUNYAPRASERT, V. Encapsulation of ascorbyl palmitate in nanostructured lipid carriers (NLC)—Effects of formulation parameters on physicochemical stability. **International Journal of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 340, n. 1-2, p.198-206, 1 ago. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.03.022>

TEMIZ, Can; KALEMCI, SERDAR; MICILI, Serap C.; TEKMEK, Isil; YILDIZ, Gulserap; ACAR, Tolgahan; AYIK, Sibel; AKSUN, Saliha; YILMAZ, Osman; AKKOCLU. The effect of methyl palmitate on treatment of experimental asthma. **The Journal of the Pakistan Medical Association**. v. 65, n.06, p.632-636. 2015.

THAKRE, Archana D.; MULANGE, Shradha V.; KODGIRE, Santosh S.; ZORE, Gajanan B.; KARUPPAYIL, Mohan S. Effects of Cinnamaldehyde, Ocimene, Camphene, Curcumin and Farnesene on *Candida albicans*. **Advances In Microbiology**, [s.l.], v. 06, n. 09, p.627-643, 2016. Scientific Research Publishing, Inc., <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2016.69062>.

THORNTHWAITE, Jerry T.; SHAH, Hare R.; ENGLAND, Spencer R.; ROLAND, Lee H.; THIBADO, Seth P. Anticancer Effects of Curcumin, Artemisinin, Genistein, and Resveratrol, and Vitamin C: Free Versus Liposomal Forms. **Advances In Biological Chemistry**, [s.l.], v. 07, n. 01, p.27-41, 2017. Scientific Research Publishing, Inc., <http://dx.doi.org/10.4236/abc.2017.71002>

TIAN, Cihui; ASGHAR Sajid; WU Yifan; CHEN, Zhipeng; JIN, Xin; YIN, Lining; HUANG, Lin; HUANG Lin; PING, Qineng; XIAO, Yanyu. Improving intestinal absorption and oral bioavailability of curcumin via taurocholic acid-modified nanostructured lipid carriers. **International Journal of Nanomedicine**, [s.l.], v. 12, p.7897-7911, out. 2017. Dove Medical Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2147/ijn.s145988>.

TÓTH, Renáta et al. Investigation of *Candida parapsilosis* virulence regulatory factors during host-pathogen interaction. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1-14, 22 jan. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-19453-4>.

TÓTH, Renáta et al. *Candida parapsilosis*: from Genes to the Bedside. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 32, n. 2, p.1-38, 27 fev. 2019. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00111-18>.

UNER, M. Preparation, characterization and physico-chemical properties of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC): Their benefits as colloidal drug carrier systems. **Pharmazie**, 61(5), 375–386, (2006).

VARSHOSAZ, Jaleh; JANDAGHIAN, Setareh; MIRIAN, Mina; SAJJADI, S. Ebrahim. Co-delivery of rituximab targeted curcumin and imatinib nanostructured lipid carriers in non-Hodgkin lymphoma cells. **Journal Of Liposome Research**, [s.l.], p.1-15, 6 mar. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/08982104.2020.1720718>.

XUE, Jingyi; WANG, Taoran; HU, Qiaobin; ZHOU, Mingyong; LUO, Yangchao. A novel and organic solvent-free preparation of solid lipid nanoparticles using natural biopolymers as emulsifier and stabilizer. **International Journal of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 531, n. 1, p.59-66, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.066>.

XUE, Jingyi; WANG, TAORAN; HU, Qiaobin; ZHOU Mingyong; LUO, Yangchao. Insight into natural biopolymer-emulsified solid lipid nanoparticles for encapsulation of curcumin: Effect of loading methods **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v. 79, p.110-116, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.12.018>.

XU, Su; ZOU, Liming; LING, Xinlong; WEI, Yizhe; ZHANG, Shengkai. Preparation and thermal reliability of methyl palmitate/methyl stearate mixture as a novel composite phase change material. **Energy And Buildings**, [s.l.], v. 68, p.372-375, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enbuild.2013.09.038>.

XU, Ying-Qi; CHEN, Wen-Rong; TSOSIE, Jonathan K.; XIE, XI; LI, Peng; WAN, Jian-Bo; HE, Cheng-Wei; CHEN, Mei-Wan. Niosome Encapsulation of Curcumin: characterization and cytotoxic effect on ovarian cancer cells. **Journal Of Nanomaterials**, [S.L.], v. 2016, p. 1-9, 2016. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/6365295>.

ZABIHI, Narges Amel; MATTEO, Pirro; THOMAS, Johnston P.; AMIRHOSSEIN, Sahebkar. Is There a Role for Curcumin Supplementation in the Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease? The Data Suggest Yes. **Current Pharmaceutical Design**, [s.l.], v. 23, n. 7, p.969-982, 12 abr. 2017. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1381612822666161010115235>.

ZHANG, Wenlong; WANG, Andrew; GU, Frank. Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, [s.l.], v. 83, n. 5, p.761-769, 24 out. 2007. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.clpt.6100400>.

ZHANG, Tongtong; CHEN, Yanming; GE, Yuanyuan; HU, Yuzhen; LI Miao; JIN, Yiguang. Inhalation treatment of primary lung cancer using liposomal curcumin dry powder inhalers. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, [s.l.], v. 8, n. 3, p.440-448, maio 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2018.03.004>.

ZHANG, Kun; CHEN, Min; Du, Zhi-Yun; ZHENG, Xi; LI, Dong-Li; ZHOU, Ren-Ping. Use of curcumin in diagnosis, prevention, and treatment of Alzheimer's disease. **Neural Regeneration Research**, [s.l.], v. 13, n. 4, p.742-752, 2018. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/1673-5374.230303>.

ZHANG, Ya-Ru; LIN Run; LI Hong-Jun; HE, Wei-Ling; DU, Jin-Zhi; WANG, Jun. Strategies to improve tumor penetration of nanomedicines through nanoparticle design. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.1-12, 16 abr. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/wnan.1519>

ZHAO, Xiaojing; CHEN, Qi; LI, Yusang; TANG, Hebin; LIU, Wei; YANG Xiangliang. Doxorubicin and curcumin co-delivery by lipid nanoparticles for enhanced treatment of diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in mice. **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, [s.l.], v. 93, p.27-36, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.03.003>.

ZHENG, Dantong; HUANG, Chongxing; HUANG, Haohe; ZHAO, Yuan; KHAN, Muhammad Rafi Ullah; ZHAO, Hui; HUANG, Lijie. Antibacterial Mechanism of Curcumin: A Review. **Chemistry & Biodiversity**. 13 jun 2020. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000171>

YANG, Rui; GAO, Renchao; LI, Fang; HE, Haibing; TANG, Xing. The influence of lipid characteristics on the formation, in vitro release, and in vivo absorption of protein-loaded SLN

prepared by the double emulsion process. **Drug Development And Industrial Pharmacy**, [S.L.], v. 37, n. 2, p. 139-148, 25 jun. 2010. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/03639045.2010.497151>.

YANG, Kuo-yi; LIN, Lei-chwen; TSENG, Ting-yu; WANG, Shau-chun; TSAI, Tung-hu. Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC–MS/MS. **Journal Of Chromatography**, [s.l.], v. 853, n. 1-2, p. 183-189, jun. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.03.010>.

YAN, Yi-dong; KIM, Jung Ae; KWAK, Mi K; YOO, Bong K.; YONG, Chul Soon; CHOI, Han-Gon. Enhanced Oral Bioavailability of Curcumin via a Solid Lipid-Based Self-Emulsifying Drug Delivery System Using a Spray-Drying Technique. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, [s.l.], v. 34, n. 8, p.1179-1186, 2011. Pharmaceutical Society of Japan. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.34.1179>.

YAO, Mingfei; XIAO, Hang; MCCLEMENTS, David Julian. Delivery of Lipophilic Bioactives: Assembly, Disassembly, and Reassembly of Lipid Nanoparticles. **Annual Review of Food Science And Technology**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.53-81, 28 fev. 2014. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-food-072913-100350>.

YOON, Goo; PARK, Jin Woo; YOON, In-soo. Solid lipid nanoparticles (SLN's) and nanostructured lipid carriers (NLC's): recent advances in drug delivery. **Journal Of Pharmaceutical Investigation**, [s.l.], v. 43, n. 5, p.353-362, 11 ago. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s40005-013-0087-y>.

WANG, Fengling; CHEN, Jin; DAI, Wenting; HE, Zhengmin; ZHAI, Dandan; CHEN, Weidong. Pharmacokinetic studies and anticancer activity of curcumin-loaded nanostructured lipid carriers. **Acta Pharmaceutica**, [s.l.], v. 67, n. 3, p.357-371, 1 set. 2017. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/acph-2017-0021>.

WANG, Fengling; YE, Xi; ZHAI, Dandan; DAI, Wenting; WU, Yifan; CHEN, Jin; CHEN, Weidong. Curcumin-loaded nanostructured lipid carrier induced apoptosis in human HepG2 cells through activation of the DR5/caspase-mediated extrinsic apoptosis pathway. **Acta Pharmaceutica**, [s.l.], v. 70, n. 2, p.227-237, 1 jun. 2020a. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.2478/acph-2020-0003>.

WANG, Ji; KANG, Yu-Xia; PAN, Wen; LEI, Wan; FENG, Bin; WANG, Xiao-Juan. Enhancement of Anti-Inflammatory Activity of Curcumin Using Phosphatidylserine-Containing Nanoparticles in Cultured Macrophages. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 17, n. 6, p.969-988, 20 jun. 2016b. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms17060969>.

WANG, Jinqiang; MAO, Weiwei; LOCK, Lye L.; TANG, Jianbin; SUI, Meihua; SUN, Weilin; CUI, Honggang; XU, Dong; SHEN, Youqing. The Role of Micelle Size in Tumor Accumulation, Penetration, and Treatment. **ACS Nano**, [s.l.], v. 9, n. 7, p.7195-7206, 15 jul. 2015. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acsnano.5b02017>.

WANG, Lulu; MA, Yingying; GU, Yu; LIU, Yangyang; ZHAO, Juan; YAN, Beibei; WANG, Yancai. Cryoprotectant choice and analyses of freeze-drying drug suspension of nanoparticles with functional stabilisers. **Journal of Microencapsulation**, [s.l.], v. 35, n. 3, p.241-248, 3 abr. 2018b. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/02652048.2018.1462416>

WANG, L.; Li, W.; Cheng, D.; Guo, Y.; Wu, R.; Yin, R.; Li, S.; Kuo, H. C.; Hudlikar, R.; Yang, H.; Buckley, B.; Kong, A. N. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of three oral formulations of curcumin in rats. **J Pharmacokinetics and Pharmacodynamics**, 2020b, 47, 131-144.

WANG, Ping; ZHANG, Libin; PENG, Hao; LI, Yongwu; XIONG, Jian; XU, Zheyuan. The formulation and delivery of curcumin with solid lipid nanoparticles for the treatment of on non-small cell lung cancer both in vitro and in vivo. **Materials Science And Engineering: C**, [s.l.], v. 33, n. 8, p.4802-4808, dez. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2013.07.047>

WANG, Taoran; LEI, Yu; MA, Xiaoyu; LUO, Yangchao. Solid lipid nanoparticles coated with cross-linked polymeric double layer for oral delivery of curcumin. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 148, p.1-11, dez. 2016a. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.08.047>.

WANG, Wenrui; CHEN, Tiantian; XU, Henan; REN, Baihui; CHENG, Xiaodan, QI, Rongrong, LIU, Haibo; WANG, Yueyue; YAN, Lei; CHEN, Sulian; YANG, Qingling; CHEN, Changjie. Curcumin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles Enhanced Anticancer Efficiency in Breast Cancer. **Molecules**, [s.l.], v. 23, n. 7, p.1-13, 29 jun. 2018a. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23071578>.

WANG, Wenrui; ZHU; XIE. Enhanced bioavailability and efficiency of curcumin for the treatment of asthma by its formulation in solid lipid nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, [s.l.], p.3667-3678, jul. 2012. Dove Medical Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2147/ijn.s30428>.

WANG, Y. N.; WANG, H. X.; JIN, Y. S.; BU, C.Y.; CHENG, Bu J.; ZHAO, Cheng L.L.; SHI, G. L. Assessment of the Contact Toxicity of Methyl Palmitate on *Tetranychus viennensis* (Acari: Tetranychidae). **Journal of Economic Entomology**, [s.l.], v. 103, n. 4, p.1372-1377, 1 ago. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1603/ec09128>

WANG, Yutong; WANG, Changyuan; ZHAO, Jing; DING, Yanfang; LI, Lei. A cost-effective method to prepare curcumin nanosuspensions with enhanced oral bioavailability. **Journal of Colloid And Interface Science**, [s.l.], v. 485, p.91-98, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2016.09.003>

WEBER, S.; ZIMMER, A.; PARDEIKE, J.. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for pulmonary application: A review of the state of the art. **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, [s.l.], v. 86, n. 1, p.7-22, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.08.013>.

WEISS, Jochen; DECKER, Eric A.; McCLEMENTS, Julian; KRISTBERGSSON, Kristberg; HELGASON, Thrandur; AWAD, Tarek. Solid Lipid Nanoparticles as Delivery Systems for Bioactive Food Components. **Food Biophysics**, [s.l.], v. 3, n. 2, p.146-154, 1 mar. 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11483-008-9065-8>.

WICHITNITHAD, Wisut; JONGAROONNGAMSANG, Nutthapon; PUMMANGURA, Sunibhond; ROJSITTHISAK, Pornchai. A simple isocratic HPLC method for the simultaneous determination of curcuminoids in commercial turmeric extracts. **Phytochemical Analysis**, [s.l.], v. 20, n. 4, p.314-319, jul. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/pca.1129>.

WICKI, Andreas; WITZIGMANN, Dominik; BALASUBRAMANIAN, Vimalkumar; HUWYLER, Jörg. Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. **Journal Of Controlled Release**, [s.l.], v. 200, p.138-157, fev. 2015

WINDBERGS, Maïke; STRACHAN, Clare J.; KLEINEBUDDE, Peter. Investigating the Principles of Recrystallization from Glyceride Melts. **Aaps Pharmscitech**, [s.l.], v. 10, n. 4, p.1224-1234, 28 out. 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1208/s12249-009-9311-5>.

WISSING, S.a.; MÜLLER, R.h.. Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration. **Journal of Controlled Release**, [s.l.], v. 81, n. 3, p.225-233, jun. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-3659\(02\)00056-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-3659(02)00056-1).

10 ANEXOS

ANEXO I

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação Biológica de ar-turmerone

Pesquisador: Najeh Maissar Khalil

Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

Versão: 2 CAAE: 08020818.3.0000.0106

Instituição Proponente: Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER **Número do Parecer: 3.231.864**

Data da Relatoria: 29/03/2019

Apresentação do Projeto: Estudo experimental para avaliar atividade biológica de ar-turmerone frente cepas de *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans* e para avaliar sua atividade citotóxica contra células tumorais associando-o com tamoxifeno e seu potencial citotóxico em hemácias e leucócitos. O estudo será realizado por meio da coleta de sangue de três indivíduos sadios voluntários. Trata-se, ainda, de um projeto realizado em nível de mestrado em Ciências Farmacêuticas, no âmbito de programa de pós-graduação da Universidade Estadual do Centro Oeste (UNICENTRO) e da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

Objetivo da Pesquisa: O objetivo é avaliar a atividade biológica de ar-turmerose frente cepas de *Candida* spp e *Cryptococcus neoformans* e para avaliar sua atividade citotóxica contra células tumorais associando-o com tamoxifeno e seu potencial citotóxico em hemácias e leucócitos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Como riscos, o pesquisador informa que pode ocorrer hematoma no momento da coleta de sangue. Os benefícios são descritos em linhas gerais, e estão restritos à análise da ação positiva da

ar-tumerose no favorecimento da ação de tamoxifeno no tratamento antitumoral e antifúngico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Do ponto de vista técnico, o projeto é claro, conciso e objetivo, apresentando uma pesquisa importante no que tange à análise do papel de fungos como a *Candida spp* no aparecimento de doenças, mas principalmente o desenvolvimento de um novo fármaco a partir do uso da cúrcuma, que tem alta concentração de ar-tumerose, agente que pode ser utilizado para o combate a câncer e a infecções fúngicas. O estudo implica coleta de sangue, e uso de diversos reagentes e análises clínicas, que serão feitas no Laboratório de Nanotecnologia farmacêutica da UNICENTRO.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: o pesquisador atendeu as solicitações do colegiado, no que se refere a pendência do TCLE.

Recomendações: não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: não há

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: APROVADO.

ANEXO II

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS CEUA/UNICENTRO

Ofício nº 008 2020 CEUA/UNICENTRO Guarapuava, 08 05 2020

Senhor Pesquisador

1. Comunicamos que seu projeto de pesquisa intitulado: Desenvolvimento e avaliação de nanopartículas lipídicas contendo curcumina. protocolo número 004 2020, com início em 05 2020 e término em 07 2020, utilizando-se de "16 Ratos Wistar foi analisado e considerado APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais de nossa Instituição, em Reunião Ordinária do dia 08 05 2020.

2. Deverá ser encaminhado à CEUA o relatório final da pesquisa e a publicação de seus resultados, para acompanhamento do mesmo.

3. Observamos ainda que se mantenha a devida atenção aos Relatórios Parciais e Finais na seguinte ordem: Os Relatórios Parciais deverão ser encaminhados à CEUA assim que tenha transcorrido um ano da pesquisa. Os Relatórios Finais deverão ser encaminhados à CEUA em até 30 dias após a conclusão da pesquisa. Qualquer alteração na pesquisa que foi aprovada, como por exemplo, números de sujeitos, local, período, etc. deverá ser necessariamente enviada uma carta justificativa para a análise da CEUA.

Pesquisador: Najeh Maissar Khalil

Atenciosamente, Ivo Ilvan Kerppers

Presidente da Ceua/Unicentro

Por t. nº 411 GR/Unicentro 2019

Ao Senhor, Najeh Maissar Khalil

UNICENTRO – CEDETEG