

LORIANGELA MARCELI DALPOSSO

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE
NANOPARTÍCULAS DE POLI (ÁCIDO LÁCTICO) CONTENDO TAMOXIFENO E
CURCUMINA**

GUARAPUAVA

2015

LORIANGELA MARCELI DALPOSSO

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE
NANOPARTÍCULAS DE POLI (ÁCIDO LÁCTICO) CONTENDO TAMOXIFENO E
CURCUMINA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, da Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação ampla com a Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil

GUARAPUAVA

2015

Catálogo na Publicação
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

D149o Dalposso, Loriangela Marceli
Obtenção, caracterização e avaliação da citotoxicidade de nanopartículas de poli (ácido láctico) contendo tamoxifeno e curcumina / Loriangela Marceli Dalposso. -- Guarapuava, 2015
xiii, 97 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia, 2015

Orientador: Najeh Maissar Kalil

Banca examinadora: Marcos Luciano Bruschi, Taiana Gabriela Moretti Bonadio

Bibliografia

1. Ciências Farmacêuticas. 2. Nanopartículas. 3. Tamoxifeno. 4. Curcumina. 5. Citotoxicidade. 6. Poli (ácido láctico). I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

CDD 615

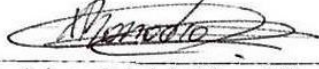
TERMO DE APROVAÇÃO


LORIANGELA MARCELI DALPOSSO

Obtenção, caracterização e avaliação da citotoxicidade de nanopartículas de poli (ácido láctico) contendo tamoxifeno e curcumina

Dissertação aprovada em 29/04/2015 como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas, associação ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO e Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia, pela seguinte Banca Examinadora:


Prof. Dr. Najeh Missar Khalil, UNICENTRO
Presidente


Prof.ª. Dra. Tatiana Gabriela Moretti Bonadio, UEM
Membro


Prof. Dr. Marcos Luciano Bruschi, UEM
Membro

Guarapuava- PR
2015

AGRADECIMENTOS

Em especial ao meu pai Lourenço e minha mãe Angela pela dedicação, incentivo e apoio incondicional.

Ao meu namorado Diogo pelo apoio e por compreender meus momentos de ausência.

Aos demais familiares e amigos por todo incentivo e preocupação.

Ao meu orientador professor Najeh Maissar Khalil e a professora Rubiana Mara Mainardes por todos esses anos de aprendizado e pela oportunidade.

À Aline, Diani, Daniele, Fernanda, Leiziani, Luciana Dalmolin, Andreza e Dayane pelos anos de amizade e pelo companheirismo no laboratório.

À Thaysa por todos esses anos de amizade, por estar sempre ao meu lado dividindo as alegrias e tristezas, obrigada pelo apoio e ajuda tanto na minha vida pessoal como profissional.

Ao Daniel e Luciana Camargo, sou muito grata pela amizade, por serem pessoas tão especiais sempre dispostas a ajudar.

À Clescila, Lígia, Débora, Juliana e Jociani por toda ajuda e amizade.

À todos os amigos e colegas do Laboratório de Nanotecnologia que de alguma forma contribuíram para esse trabalho.

À professora Tânia Tominaga e a Jociani Ascari pelas contribuições na banca de qualificação.

À Isis e a Thaysa pela ajuda com os experimentos em células.

Ao professor Marco Aurélio Romano por disponibilizar o uso do seu laboratório.

Ao professor Celso Vataru Nakamura por disponibilizar a microscopia de transmissão eletrônica, assim como à Mychelle Vianna e a Thaysa pelo auxílio na realização das análises.

Ao professor Carlos Alberto Policiano Almeida, bem como ao Matheus Felipe Viante e a Joslaine Jacumazo pelo auxílio nas análises do potencial zeta.

À Jociani pela ajuda nas análises por espectroscopia na região do Infravermelho.

Ao professor Ricardo Yoshimitsu Miyahara por permitir a utilização do equipamento para realização das análises térmicas, e ao seu aluno Paulo Henrique Gonsalves pelo auxílio nas análises.

RESUMO

O tamoxifeno e a curcumina são compostos amplamente estudados para o tratamento do câncer, sendo que o tamoxifeno já é utilizado no câncer de mama, mas apresenta diversos efeitos colaterais. Vários estudos relatam a atividade da curcumina nesse tipo de câncer, porém ela apresenta uma baixa biodisponibilidade. Dessa forma, a associação desses compostos e a encapsulação em nanopartículas são estratégias promissoras para o tratamento do câncer, resultando em um potencial aumento da atividade antitumoral, diminuição dos efeitos indesejáveis do tamoxifeno e aumento da biodisponibilidade da curcumina, além de proporcionar uma liberação controlada. Neste trabalho foram obtidas nanopartículas de poli (ácido láctico) contendo curcumina, citrato de tamoxifeno (CTAM) e curcumina-CTAM pelo método de emulsificação-evaporação do solvente (O/A). Para calcular a eficiência de encapsulação dos sistemas obtidos, foi desenvolvida uma metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação de curcumina e CTAM simultaneamente, esse método foi validado e apresentou linearidade, especificidade, precisão, exatidão e robustez. A eficiência de encapsulação foi de aproximadamente 57% para o CTAM e 92% para curcumina. As nanopartículas apresentaram morfologia esférica, com tamanho próximo a 190 nm, o potencial zeta para as nanopartículas de CTAM foi de -16 mV, para as nanopartículas de curcumina -26 mV e para as nanopartículas de curcumina-CTAM -17 mV. O tamanho, índice de polidispersão e o potencial zeta ficaram estáveis durante 90 dias. As nanopartículas obtidas também foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho, calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria. Na liberação *in vitro* em 120 horas a liberação foi de 57% para a curcumina e 49% para o tamoxifeno na nanopartícula de curcumina-CTAM e de 45% para nanopartícula de CTAM e 61% para a nanopartículas de curcumina. Avaliando a atividade citotóxica sobre hemácias, foi possível observar uma diminuição da hemólise do CTAM quando associado com a curcumina, em nanopartículas ambos os compostos apresentaram uma baixa hemólise mesmo no tempo de 96 horas, enquanto as drogas na forma livre apresentaram valores próximos a 100% de hemólise em 24 horas. Na citotoxicidade sobre células de melanoma da linhagem B16-F10, as nanopartículas contendo curcumina-CTAM mostraram um efeito aditivo em relação às nanopartículas contendo os compostos isolados.

Palavras-chave: Nanopartículas. Tamoxifeno. Curcumina. Citotoxicidade. Poli (ácido láctico).

ABSTRACT

Tamoxifen and curcumin are compounds widely studied for the treatment of cancer, tamoxifen is already used in breast cancer, but it has several side effects. Many studies report the activity of curcumin in cancer, but it has low bioavailability. Therefore, the combination of these compounds and encapsulation in nanoparticles are promising strategy for the treatment of cancer, which can increase the antitumor activity, reduce side effects of tamoxifen and increase the bioavailability of curcumin, as well as providing a controlled release. In this study poly (lactic acid) nanoparticles containing curcumin, tamoxifen citrate (CTAM) and the combination of these compounds were obtained by the method of emulsification-solvent evaporation (O/W). To calculate the encapsulation efficiency an analytical method by high performance liquid chromatography to quantify curcumin and CTAM at the same time was developed, this method was validated and showed linearity, specificity, precision, accuracy and robustness. The encapsulation efficiency was similar for curcumin and CTAM when encapsulated together or alone, with approximately 57% for CTAM and 92% for curcumin. The nanoparticles had spherical morphology, with a size next to 190 nm, the zeta potential was -16 mV to CTAM nanoparticles, -26 mV to curcumin nanoparticles and -17 mV for curcumin-CTAM nanoparticles. The size, zeta potential and polydispersity index were stable for 90 days. The nanoparticles obtained were also analyzed by infrared spectroscopy, differential scanning calorimetry and thermogravimetry. The *in vitro* release in 120 hours was 57% for curcumin and 49% for CTAM in curcumin-CTAM nanoparticle, 45% for CTAM nanoparticle and 61% for curcumin nanoparticles. Evaluating the cytotoxic activity against red blood cells, it was observed a decrease in hemolysis of CTAM when associated with curcumin, when encapsulated both compounds showed low hemolysis in 96 hours, while the drug in free form showed 100% hemolysis in 24 hours. In the cytotoxicity against melanoma cells (B16-F10) nanoparticles containing curcumin-CTAM showed an additive effect compared to the nanoparticles of the isolated compounds.

Keywords: Nanoparticles. Tamoxifen. Curcumin. Cytotoxicity. Poly (lactic acid).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química do tamoxifeno na forma <i>trans</i> e <i>cis</i>	18
Figura 2 - Metabolismo do tamoxifeno formando N-desmetiltamoxifeno, 4-hidroxitamoxifeno e endoxifeno, metabólitos com alta atividade nos receptores de estrogênio.....	20
Quadro 1 - Taxa de incidência estimada pela (NSABP P-1) de alguns dos efeitos colaterais ocasionados pelo uso de citrato de tamoxifeno comparado com o placebo.....	21
Figura 3 - Estrutura química dos curcuminóides da <i>Curcuma longa</i> L.	22
Figura 4 - Estrutura química do PLA.	28
Quadro 2 - Equações matemáticas utilizadas para obter o perfil e o mecanismo de liberação <i>in vitro</i> das nanopartículas de CTAM, curcumina e curcumina-CTAM.....	38
Figura 5 - Cromatograma de uma solução padrão contendo 20 µg/mL de CTAM e 20 µg/mL de curcumina no comprimento de onda utilizado para detecção do CTAM (240 nm). Fase móvel: metanol, etanol e ácido acético 0,5% (70:15:15).	42
Figura 6 - Cromatograma de uma solução padrão de 20 µg/mL de CTAM e 20 µg/mL de curcumina no comprimento de onda utilizado para detecção da curcumina (417 nm). Fase móvel: metanol, etanol e ácido acético 0,5% (70:15:15).	43
Figura 7 - Cromatograma mostrando a especificidade do método em relação ao sobrenadante das nanopartículas vazias. A: Sobreposição do cromatograma das nanopartículas vazias e de um padrão de CTAM e curcumina 20 µg/mL. λ: 417 nm. B: Sobreposição do cromatograma das nanopartículas vazias e de um padrão de CTAM e curcumina 20 µg/mL. λ: 240 nm.	44
Figura 8 - Curva analítica obtida por CLAE para quantificação de CTAM nas concentrações de 1-50 µg/mL. Fase móvel metanol, etanol e ácido acético 0,5% (70:15:15), λ: 240 nm. Equação da reta: $y = 145295x + 10727$ ($r = 0,999$).....	45
Figura 9 - Curva analítica obtida por CLAE para quantificação de curcumina nas concentrações de 1-50 µg/mL. Fase móvel metanol, etanol e ácido acético 0,5% (70:15:15), λ: 417 nm. Equação da reta: $y = 669840x - 38495$ ($r = 0,999$).....	46
Figura 10 - Curva analítica para obtenção do limite de quantificação e de detecção da curcumina, fase móvel metanol, etanol e ácido acético 0,5% (70:15:15), concentrações de 0,1-1,0 µg/mL. λ: 417 nm. Equação da reta: $y = 679914x + 11550$ ($r = 0,999$).....	50
Figura 11 - Curva analítica para obtenção do limite de quantificação e de detecção do CTAM, fase móvel metanol, etanol e ácido acético 0,5% (70:15:15), concentrações de 0,1-1,0 µg/mL. λ: 240 nm. Equação da reta: $y = 175115x - 3813$ ($r = 0,999$).....	50

Figura 12 - Perfil de distribuição de tamanho, (A) nanopartículas de curcumina-CTAM, (B) nanopartículas de CTAM, (C) nanopartículas de curcumina.	53
Figura 13 - Imagens das nanopartículas obtidas por microscopia eletrônica de transmissão, (A) nanopartículas de curcumina, (B) nanopartículas de CTAM, (C) e (D) nanopartículas de curcumina-CTAM.	54
Figura 14 – Variação de tamanho das nanopartículas em função da temperatura de armazenamento e do tempo para as nanopartículas de curcumina-CTAM (A), nanopartículas de CTAM (B) e nanopartículas de curcumina (C). Resultados expressos em média e desvio padrão n = 3.	58
Figura 15 – Variação do índice de polidispersão das nanopartículas em função da temperatura de armazenamento e do tempo para as nanopartículas de curcumina-CTAM (A), nanopartículas de CTAM (B) e nanopartículas de curcumina (C). Resultados expressos em média e desvio padrão n = 3.	59
Figura 16 - Variação do potencial zeta das nanopartículas em função da temperatura de armazenamento e do tempo para as nanopartículas de curcumina-CTAM (A), nanopartículas de CTAM (B) e nanopartículas de curcumina (C). Resultados expressos por média e desvio padrão n = 3.	60
Figura 17 - Espectros na região do infravermelho da curcumina e CTAM.	61
Figura 18 - Espectros na região do infravermelho das nanopartículas de curcumina, nanopartículas de curcumina-CTAM, nanopartículas de CTAM e nanopartículas vazias.	62
Figura 19 - Curvas de DSC (fluxo de aquecimento x temperatura) e DTG (massa x temperatura) obtidas para o CTAM livre (A) e curcumina livre (B).	64
Figura 20 – Curvas de DSC (fluxo de aquecimento x temperatura) e DTG (massa x temperatura) obtidas para as nanopartículas vazias (A), nanopartículas de curcumina-CTAM (B), nanopartículas de CTAM (C) e nanopartículas de curcumina (D).	65
Figura 21 - Perfil de liberação <i>in vitro</i> das nanopartículas de PLA contendo CTAM, curcumina e curcumina-CTAM, por um período de 8 horas. Os dados estão expressos através de média e desvio padrão com n = 3.	66
Figura 22 - Perfil de liberação <i>in vitro</i> das nanopartículas de PLA contendo CTAM, curcumina e curcumina-CTAM, por um período de 120 horas. Os dados estão expressos através de média e desvio padrão com n = 3.	67
Figura 23 - Percentual de hemólise das nanopartículas e das drogas livres, nas concentrações de 200 µg/mL para a curcumina e 100 µg/mL para o CTAM, em diferentes tempos. A hemólise foi determinada por meio da medida da absorbância em 540 nm.	70

Figura 24 - Sobrenadante do ensaio de hemólise no tempo de 1 hora, das nanopartículas e das drogas livres, nas concentrações de 200 µg/mL para a curcumina e 100 µg/mL para o CTAM.	70
Figura 25 - Sobrenadante do ensaio de hemólise no tempo de 48 horas, das nanopartículas e das drogas livres, nas concentrações de 200 µg/mL para a curcumina e 100 µg/mL para o CTAM.....	71
Figura 26 – Efeito das nanopartículas de curcumina, curcumina-CTAM e CTAM, além da curcumina, CTAM e curcumina-CTAM livres na viabilidade de células B16-F10. A incubação no tempo de 24 horas está representada em (A) para as nanopartículas e (B) para os compostos livre e em 72 horas em (C) para as nanopartículas e (D) para os compostos livre. As concentração 1, 2 e 3 representam: 1 (40 e 24 µg/mL), 2 (10 e 6 µg/mL) e 3 (3 e 2 µg/mL) de curcumina e CTAM, respectivamente.	73
Figura 27 – Fotos do ensaio sobre células B16-F10 incubadas por 72 horas. (A) nanopartículas de curcumina (3 µg/mL), (B) nanopartículas de curcumina-CTAM (3 e 2 µg/mL) , (C) nanopartículas de CTAM (2 µg/mL), (D) controle positivo de células.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros cromatográficos utilizados para a quantificação de curcumina e citrato de tamoxifeno por CLAE.	42
Tabela 2 - DPR e porcentagem de recuperação obtidos pelo teste de exatidão para o CTAM, (n=4).	46
Tabela 3 - DPR e porcentagem de recuperação obtidos pelo teste de exatidão para a curcumina, (n=4).	47
Tabela 4 - Média, desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR) encontrados para a curcumina e para o CTAM no teste de repetibilidade (n=4).	47
Tabela 5 - Média, desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR) encontrados para a curcumina e para o CTAM no teste de precisão intermediária (n=4).	48
Tabela 6 - Porcentagem de recuperação e DPR obtidos no teste de robustez para o CTAM (n=4).	48
Tabela 7 - Porcentagem de recuperação e DPR obtidos no teste de robustez para a curcumina (n=4).	49
Tabela 8 - Diâmetro médio e índice de polidispersão, obtidos por espectroscopia de correlação de fótons, para as nanopartículas de CTAM, curcumina e curcumina-CTAM (n=5).	52
Tabela 9 - Eficiência de encapsulação para as nanopartículas de curcumina, CTAM e curcumina-CTAM, resultados expressos em média \pm DP (n=5).	55
Tabela 10 - Análise do potencial zeta das nanopartículas de CTAM, curcumina e curcumina-CTAM, além das nanopartículas vazias e das drogas na forma livre, expressos em média \pm DP (n=3).	56
Tabela 11 - Avaliação cinética da liberação da curcumina e do CTAM a partir das nanopartículas de PLA contendo curcumina, CTAM e curcumina-CTAM.	68
Tabela 12 - Resultados da avaliação do mecanismo de liberação utilizando o modelo de Korsmeyer-Peppas das nanopartículas de PLA contendo curcumina, CTAM e curcumina-CTAM. Expressos em média \pm DP (n=3).	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/O/A	Água em óleo em água
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CSM	Critério de seleção do modelo
CTAM	Citrato de tamoxifeno
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTG	Derivada da termogravimetria
E.E%	Eficiência de encapsulação
EPR	Efeito de permeabilidade e retenção aumentada
FDA	<i>Food and drug administration</i>
HER2	Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
O/A	Óleo em água
PBS	Tampão fosfato de sódio
PDA	Detector de arranjo de fotodiodo
PEG	Polietilenoglicol
PLA	Poli (ácido láctico)
PLGA	Poli (ácido láctico- <i>co</i> -glicólico)
PVA	Álcool polivinílico
RE	Receptores de estrogênio
RP	Receptores de progesterona
TG	Termogravimetria

SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1.1 Câncer.....	14
1.1.1 Câncer de mama	15
1.2 Tamoxifeno.....	18
1.3 Curcumina	22
1.4 Associação de curcumina e tamoxifeno	24
1.5 Nanotecnologia.....	26
1.5.1 Nanopartículas poliméricas	27
1.5.2 Direcionamento das nanopartículas.....	29
2 OBJETIVOS	30
2.1 Objetivos gerais	30
2.2 Objetivos específicos.....	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Reagentes.....	31
3.2 Equipamentos	32
3.3 Métodos	33
3.3.1 Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE para quantificação de curcumina e CTAM simultaneamente.....	33
3.3.2 Obtenção de nanopartículas de PLA contendo CTAM, curcumina e curcumina-CTAM.....	34
3.3.3 Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersão por espectroscopia de correlação de fótons.....	35
3.3.4 Análise por microscopia eletrônica de transmissão.....	35
3.3.5 Determinação da eficiência de encapsulação	36
3.3.6 Potencial zeta.....	36
3.3.7 Estabilidade	36
3.3.8 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier	37
3.3.9 Calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria	37
3.3.10 Perfil de liberação <i>in vitro</i>	37
3.3.11 Análise da citotoxicidade das nanopartículas e das drogas na forma livre sobre hemácias	38
3.3.12 Análise da citotoxicidade sobre células tumorais.....	39

3.3.12.1 Cultivo das células.....	39
3.3.12.2 Ensaio de citotoxicidade.....	39
3.3.13 Análise estatística	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE para quantificação de curcumina e CTAM simultaneamente.....	41
4.1.1 Parâmetros cromatográficos	41
4.1.2 Validação do método.....	43
4.1.2.1 Especificidade.....	43
4.1.2.2 Linearidade	45
4.1.2.3 Exatidão.....	46
4.1.2.4 Precisão.....	47
4.1.2.5 Robustez	48
4.1.2.6 Limite de quantificação e limite de detecção	49
4.2 Obtenção de nanopartículas de PLA contendo CTAM, curcumina e curcumina-CTAM..	51
4.3 Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersão por espectroscopia de correlação de fótons.....	51
4.4 Análise por microscopia eletrônica de transmissão.....	53
4.5 Eficiência de encapsulação	55
4.6 Potencial zeta.....	55
4.7 Estabilidade	57
4.8 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier	61
4.9 Calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria	63
4.10 Perfil de liberação <i>in vitro</i>	66
4.11 Análise da citotoxicidade das nanopartículas e das drogas na forma livre sobre hemácias	69
4.12 Análise da citotoxicidade sobre células tumorais.....	72
4.13 Considerações finais	76
5 CONCLUSÕES.....	78
REFERÊNCIAS	79
ANEXO A - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos.....	95

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Câncer

O câncer pode ser definido como um conjunto de doenças que possuem características semelhantes, entre elas o crescimento descontrolado de células que podem invadir outros órgãos e tecidos, gerando assim as metástases (INCA, 2014a). A classificação do câncer pode ser feita em quatro tipos principais (carcinoma, sarcoma, leucemia e linfoma). O carcinoma é o mais comum com cerca de 90% dos casos, sendo este proveniente do tecido epitelial. O sarcoma corresponde a aproximadamente 2% e surge a partir de músculos, ossos, cartilagens e tecido fibroso. Os outros dois tipos são a leucemia e o linfoma, que são originados de células do sangue e células do sistema imune, respectivamente, e juntos correspondem a cerca de 8% dos casos (RAVINDRAN; PRASAD; AGGARWAL, 2009).

Uma célula normal passa a ser cancerosa devido a alguns estímulos, por exemplo, por meio de substâncias cancerígenas, inflamação crônica, estresse oxidativo, radiação UV e estímulo hormonal anormal (STRIMPAKOS; SHARMA, 2008). O desenvolvimento do câncer é um processo complexo de muitas etapas e ocorre por meio de mutações no DNA da célula. Geralmente várias alterações genéticas ocorrem nessas células, dentre essas alterações estão a ativação de proto-oncogenes para oncogenes. Os proto-oncogenes estão relacionados ao controle da divisão, apoptose e diferenciação celular, quando se transformam em oncogenes induzem mudanças malignas. Também pode ocorrer a inativação de genes de supressão tumoral, esses são responsáveis pela inibição das células que sofrem mutações, com a inativação essas células crescem de forma descontrolada (RANG et al., 2007). Devido à alta proliferação das células tumorais o tecido necessita de uma maior demanda de oxigênio e nutrientes. Para suprir essas necessidades ocorre a formação de novos vasos sanguíneos, processo conhecido como angiogênese (VASSILAKOPOULOU; PSYRRI; ARGIRIS, 2015). As metástases ocorrem quando as células tumorais penetram em vasos de parede fina, mais comumente vasos linfáticos. Grande parte dessas células são destruídas na circulação e as que sobrevivem ficam aderidas na parede de vasos capilares de órgãos distantes do de origem, o próximo passo então é o extravasamento e proliferação nesse órgão (FIDLER, 2003).

Para o tratamento do câncer pode-se utilizar radioterapia, quimioterapia, transplante de medula óssea e cirurgia (INCA, 2015). Muitas vezes essas terapias são utilizadas de forma combinada, a escolha da terapia ideal vai depender de muitos fatores como o estado de cada paciente, além do tipo e estágio do câncer (GILMAN, 2005). Os quimioterápicos comumente

utilizados podem ser divididos de forma geral em hormônios e fármacos citotóxicos. No caso dos hormônios os mais utilizados são os glicocorticóides, estrógenos e andrógenos, além de antagonistas hormonais e agentes que suprimem a secreção de hormônios (RANG et al., 2007). Os fármacos citotóxicos podem ser divididos nas seguintes classes (GILMAN, 2005; RANG et al., 2007):

- Agentes alquilantes: Esses fármacos ligam-se ao DNA impedindo dessa forma a replicação.
- Antimetabólitos: atuam nas vias metabólicas que estão relacionadas à síntese do DNA.
- Antibióticos citotóxicos: substâncias originadas de microrganismos que evitam a divisão celular de mamíferos.

Uma limitação de uso dos quimioterápicos é que muitas vezes eles não são seletivos, também causando danos em células normais, isso ocasiona os efeitos colaterais que diminuem a adesão ao tratamento pelos pacientes (KEARNEY et al., 2008). Dessa forma, existe uma constante busca por terapias mais seletivas às células tumorais, que causem menos efeitos colaterais.

1.1.1 Câncer de mama

O câncer de mama é o segundo câncer mais frequente no mundo (INCA, 2014c). No Brasil sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama é o mais frequente em mulheres em todas as regiões, com exceção da região norte onde fica em segundo lugar atrás do câncer de colo do útero, em 2014 eram esperados 57.120 novos casos no Brasil (INCA, 2014b). As taxas de morte devido a esse câncer continuam elevadas no Brasil e em países subdesenvolvidos, sendo consequência provável de um diagnóstico tardio, sendo de grande importância a realização de exames periódicos para sua detecção precoce (INCA, 2014c).

Os fatores de risco para o câncer diferem para cada tipo e podem ser tanto inatos como relacionados ao ambiente ou hábitos (INCA, 2014d; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014). No caso do câncer de mama é possível observar que grande parte dos fatores de risco estão relacionados ao estrogênio, por essa doença ser estrogênio dependente, dentre os fatores de risco inatos para esse câncer estão (MCPHERSON; STEEL; DIXON, 2000; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014):

- Gênero: Apesar do câncer de mama também ser encontrado em homens ele é muito mais comum em mulheres, sendo o gênero feminino um dos maiores fatores para o desenvolvimento desse câncer;
- Idade: A incidência do câncer de mama aumenta com a idade até a menopausa, após a menopausa esse aumento diminui;
- Idade da menopausa e menarca: Mulheres que começam a menstruar cedo ou tem uma menopausa tardia possuem um maior risco de desenvolver câncer de mama;
- Histórico familiar ou pessoal de câncer de mama;
- Mutações em determinados genes;
- Doença benigna da mama.

Dentre os fatores de risco relacionados ao meio ambiente e estilo de vida estão (MCPHERSON; STEEL; DIXON, 2000; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014):

- Obesidade;
- Contraceptivos orais e terapia de reposição hormonal;
- Mulheres que não tem filhos ou tem o primeiro filho após 30 anos;
- Radiação.

O tratamento do câncer de mama pode ser feito por meio de terapia local ou sistêmica, na primeira ocorre o tratamento local do tumor sem afetar o resto do corpo, que pode ser feito por meio de cirurgia e radioterapia. No caso da terapia sistêmica estão inclusas a quimioterapia, terapia hormonal e terapia-alvo, como a terapia específica para receptores 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2). As terapias hormonais surgiram devido à importância do estrogênio na proliferação das células cancerosas da mama e hoje já são padrão em casos de câncer de mama hormônio dependente (ARORA; POTTER, 2004; PONZONE et al., 2006). Os estrogênios são hormônios femininos produzidos pelos ovários até a menopausa, posteriormente sendo produzidos pelas adrenais e tecido adiposo. Tecidos como a mama, útero, cérebro, ossos, fígado e coração possuem receptores de estrogênio (RE), a ligação do estrogênio ao receptor ativa a transcrição de genes que estão relacionados ao crescimento e divisão celular de células normais e cancerosas (KUDCHADKAR; O'REGAN, 2005; JOHANSEN, 2005). Os cânceres de mama podem ser receptores de progesterona (RP) e RE positivos (+) ou negativo (-), aproximadamente 65% dos cânceres de mama são RE+/RP+, 13% RE+/RP- e 2% RE-/RP+, o restante são RE-/RP- ou desconhecidos

(BREASTCANCER.ORG, 2014). Nos estágios iniciais do câncer de mama o tamanho do tumor e o estado nodal são fatores importantes para sobrevida. Outros fatores a serem considerados incluem o grau histológico, a quantificação dos receptores de estrogênio, receptores de progesterona e receptores HER2, além da presença de invasão linfática (KELLY; HORTOBAGYI, 2010; SCHWARTZ et al., 2012). Câncer de mama RE- está relacionado com um pior prognóstico, enquanto que a presença de RE pode ser associada com o aumento da sobrevida (FISHER et al., 1988; SOTIRIOU et al., 2003). O melhor prognóstico em tumores positivo para receptores hormonais é devido ao tratamento com terapia hormonal adjuvante e/ou regimes de quimioterapia (SMITH; GOOD, 2003; GOLDBIRSCHE et al., 2003).

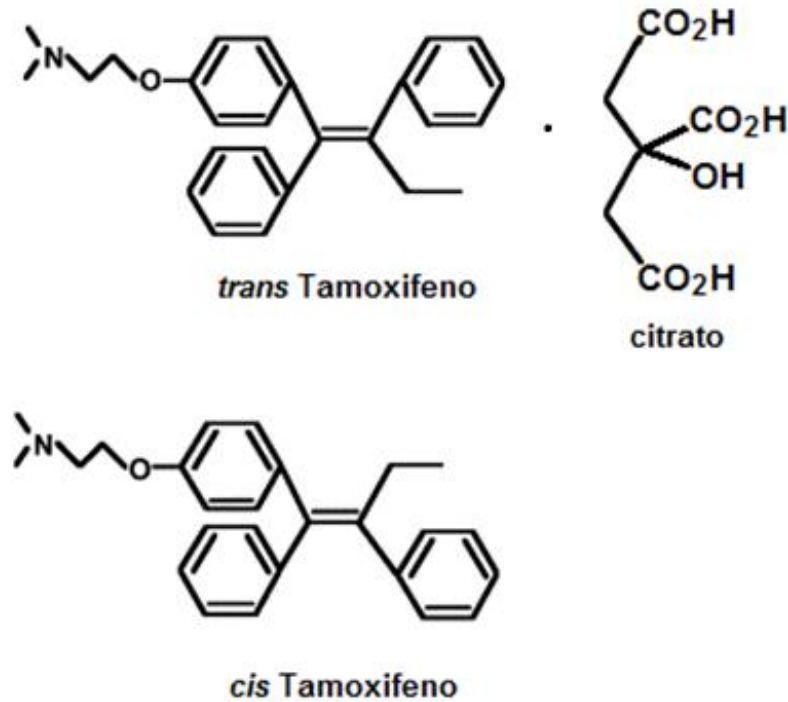
Existem duas estratégias que podem ser adotadas na terapia hormonal do câncer de mama, uma delas é diminuindo a concentração de estrogênio, nesse caso tendo em destaque os inibidores da aromatase e a supressão ovariana. Outra estratégia é por meio do bloqueio da ação dos estrogênios nas células do câncer de mama. Nessa categoria se encontram os moduladores seletivos dos receptores de estrogênio (BREASTCANCER.ORG, 2014). Dentro dos inibidores da aromatase estão o anastrozol, letrozol e exemestano. No caso dos moduladores seletivos dos receptores de estrogênio pode ser citado o toremifeno, fulvestranto e com maior destaque o tamoxifeno (RANG et al., 2007). O tratamento com terapia hormonal não apresenta resultados imediatos, tendo uma ação lenta cerca de 8-12 semanas de terapia são necessárias para que se possa saber sobre a eficácia do tratamento (GILMAN, 2005).

A escolha do tratamento hormonal adequado está relacionado ao estado da menopausa do paciente. Nos pacientes após a menopausa estudos demonstram que o tratamento com um inibidor da aromatase por 5 anos ou com tamoxifeno por 2-3 anos seguido por um inibidor de aromatase por 3-2 anos mostrou-se superior ao tamoxifeno 5 anos sozinho (WINER et al., 2005). Já nos casos de mulheres antes da menopausa o tamoxifeno combinado ou não a supressão ovariana é a alternativa mais adequada. Nessas mulheres o tratamento com inibidores da aromatase não é recomendado, porque eles bloqueiam a enzima aromatase responsável pela conversão dos andrógenos em estrógenos. Em mulheres que não estão na menopausa os baixos níveis de estrógeno vão estimular a produção de FHS na hipófise estimulando a produção de aromatase folicular e subsequentemente estradiol, processo que não ocorre em mulher que já passaram pela menopausa (EBCTCG, 2005; BURSTEIN et al., 2010; DE VOS et al., 2012).

1.2 Tamoxifeno

O tamoxifeno (1-[4-(2-dimetil-aminoetoxi)fenil]-1,2-difenil-1-buteno) é um agente sintético não-esteroidal, ele existe na configuração *cis* e *trans*, mas somente a forma *trans* é farmacologicamente ativa (Figura 1) (LAZARUS et al., 2009).

Figura 1- Estrutura química do tamoxifeno na forma *trans* e *cis*.



(Adaptado de NISHIYAMA et al., 2002; GAMBERINI et al., 2007)

O tamoxifeno foi aprovado em 1977 pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento do câncer de mama, posteriormente em 1998 foi aprovado seu uso para a prevenção desse câncer (FDA, 2014a,b). Ele tem sua ação por ser um modulador seletivo dos receptores de estrogênio, prevenindo a proliferação celular por ser antagonista dos RE da mama. A ligação do tamoxifeno ao receptor faz com que ocorra alteração na sua forma tridimensional, inibindo a ligação do receptor com o elemento responsivo ao estrogênio no DNA (GILMAN, 2005). Apesar de ter efeito antagonista na mama, o tamoxifeno possui efeito agonista nos RE dos ossos, do sistema cardiovascular e do endométrio (BUCHANAN et al. 2007).

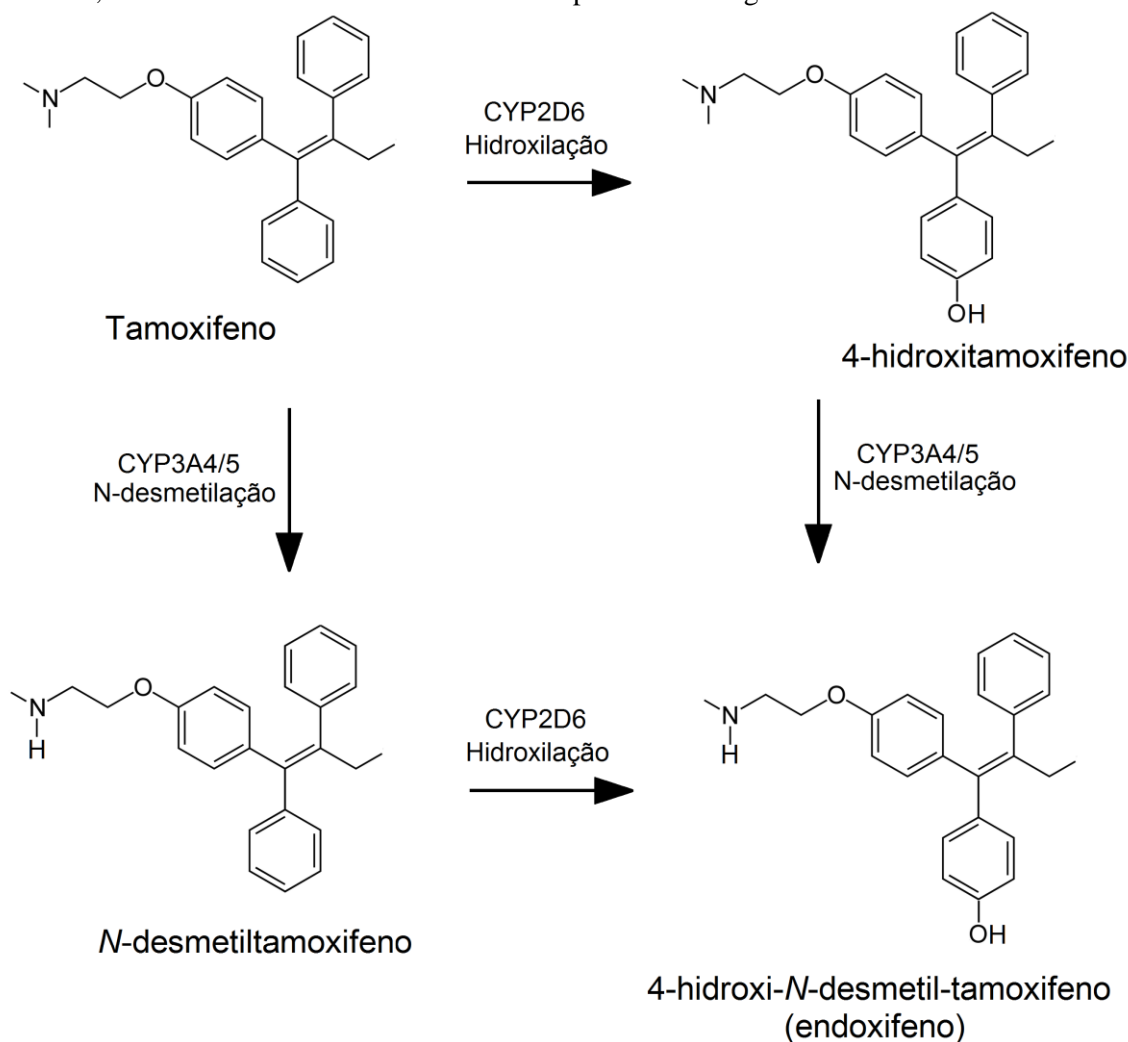
As doses usuais de tamoxifeno são 20 ou 40 mg por dia. Ele é comercializado na forma de citrato de tamoxifeno (CTAM) e nessa forma sua solubilidade em soluções aquosas

é aumentada. Sua forma de apresentação é em comprimidos de 10 e 20 mg correspondente, respectivamente, a 15,2 mg e 30,4 mg de citrato de tamoxifeno (FDA, 2015). O tratamento por 5 anos com tamoxifeno pode reduzir o risco de recorrência do câncer de mama com RE positivo em aproximadamente 50% e o risco de mortalidade em 28%, esses valores diminuem no caso de 1 ou 2 anos, com uma redução da recorrência de 21% e 28% e do risco de mortalidade 14% e 18%, respectivamente (EBCTCG, 1998). Outros estudos também encontraram resultados semelhantes (EBCTCG, 2005, 2011).

O tamoxifeno após administrado oralmente apresenta doses máximas entre 3 a 7 horas, com tempo de meia-vida de 7 dias (GILMAN, 2005). As concentrações de equilíbrio do tamoxifeno são atingidas em 4 semanas e em 8 semanas para seu metabólito *N*-desmetiltamoxifeno, que possui tempo de meia-vida próximo a 14 dias (FDA, 2015). Ele sofre metabolismo hepático de fase I e II, metabolizado principalmente pelas enzimas do citocromo P450 (CYP2D6), (CYP3A4) e (CYP3A5) (DESTA et al., 2004; BORGES et al., 2006; BRAUCH et al., 2009). Sua biotransformação ocorre por *N*-oxidação, *N*-desmetilação e hidroxilação, primeiramente formando o 4-hidroxitamoxifeno e *N*-desmetiltamoxifeno, posteriormente formando diversos metabólitos, entre eles o 4-hidroxi-*N*-desmetil-tamoxifeno também conhecido como endoxifeno, após o metabolismo hepático sua excreção ocorre pela biliar (Figura 2) (STEARNS et al., 2003; JORDAN, 2007; BRAUCH et al., 2009).

O tamoxifeno é considerado um pró-fármaco, seus metabólitos muitas vezes possuem mais atividade do que ele, com mais afinidade pelos RE, como no caso do 4-hidroxitamoxifeno e do endoxifeno, sendo o endoxifeno o principal metabólito por ter níveis plasmáticos mais elevados (FABIAN; TILZER; STERNSON, 1981; STEARNS et al., 2003; LIM et al., 2005). Por ter esses metabólitos com alta atividade, uma atenção especial deve ser dada aos pacientes que fazem uso de medicamentos que podem comprometer o metabolismo pela CYP2D6, como os inibidores seletivos da recaptção da serotonina. A utilização desses medicamentos resulta em uma diminuição plasmática do endoxifeno, dessa forma essas associações devem ser evitadas (STEARNS et al., 2003). Situação semelhante ocorre em pessoas que possuem polimorfismo genético, com variações de enzimas CYP2D6, resultando em diversos graus de atividade enzimática, com diferentes metabolismos (LIM et al., 2007; BEVERAGE et al., 2007).

Figura 2 - Metabolismo do tamoxifeno formando N-desmetiltamoxifeno, 4-hidroxitamoxifeno e endoxifeno, metabólitos com alta atividade nos receptores de estrogênio.



(Adaptado de JORDAN, 2007; RIBEIRO; SANTOS; CUSTÓDIO, 2014)

O tratamento com tamoxifeno causa uma série de efeitos secundários, alguns podem ser benéficos, como aumento da mineração óssea e diminuição dos níveis de colesterol, importantes principalmente em idosos, que muitas vezes possuem uma baixa densidade óssea e altos níveis de colesterol (MCDONALD et al., 1995; KALDER et al., 2014). Os efeitos adversos do tamoxifeno já estão bem estabelecidos na literatura, dentre eles estão inclusos irregularidade menstrual, fadiga, depressão, formação de pólipos no endométrio, adenocarcinoma do endométrio, cistos ovarianos, tromboembolismo, hepatotoxicidade e retinopatia (FISHER, et al., 1998; BERGMAN et al., 2000; MOCANU; HARRISON, 2004; MUNSHI; SINGH, 2008; HUANG et al., 2009; EL-BESHBISHY et al., 2010). Grande parte dos pacientes relatam algum desses efeitos colaterais e em muitos casos acabam interrompendo o uso do medicamento (DEMISSIE; SILLIMAN; LASHN, 2001). A taxa de

incidência de alguns desses efeitos colaterais comparado com o grupo placebo foi estimada pela *National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project, Prevention-1* (NSABP P-1), e estão no Quadro 1 (FDA, 2015).

Quadro 1 - Taxa de incidência estimada pela (NSABP P-1) de alguns dos efeitos colaterais ocasionados pelo uso de citrato de tamoxifeno comparado com o placebo.

Taxa de incidência em 1000 mulheres por ano		
	Tratado com citrato de tamoxifeno	Placebo
Adenocarcinoma do endométrio	2,20	0,71
Acidente vascular cerebral	1,43	1,00
Embolia pulmonar	0,75	0,25

(Adaptado de FDA, 2015)

Além dos efeitos colaterais o tratamento com tamoxifeno também pode ser afetado pela resistência ao tamoxifeno que ocorre em muitos pacientes. A resistência pode ser intrínseca ou adquirida. Na intrínseca o paciente mesmo sendo RE+ não responde ao tratamento, na adquirida apresenta resistência após um período de tratamento, mesmo apresentando bons resultados no tratamento inicial (WONG; CHEN, 2012; ZHANG et al., 2013). Dessa forma, pode ser observada a importância de estudos que buscam estratégias que diminuam os efeitos adversos do tamoxifeno.

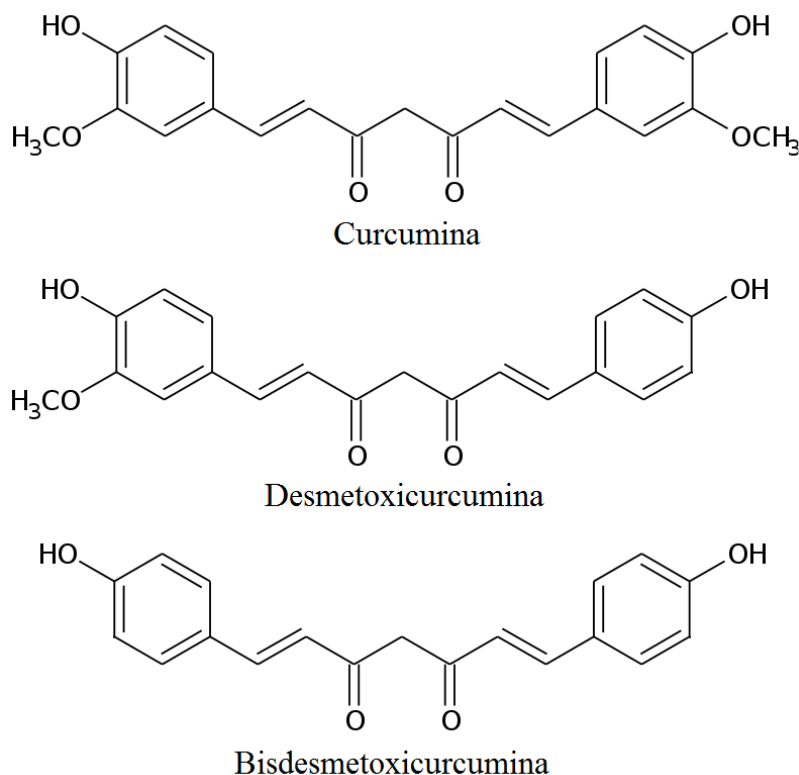
A nanotecnologia pode ser utilizada para minimizar os efeitos colaterais de fármacos. No caso do tamoxifeno ela pode ser utilizada com essa finalidade, promovendo uma liberação sítio específica e controlada, minimizando os efeitos adversos do tamoxifeno, também podendo aumentar a sua concentração no tumor. Vários estudos utilizaram a nanotecnologia como forma de melhorar as propriedades do tamoxifeno (BRIGGER et al., 2001; CHAWLA; AMIJI, 2002; SHENOY; AMIJI, 2005; JAIN et al., 2011; KAPSE et al., 2012; KHUROO et al., 2014; PANDEY et al., 2015). Em um deles o tamoxifeno em nanopartículas de poli (ácido láctico) (PLA) diminuiu o tamanho do tumor de mama em ratos, sendo essa redução maior com as nanopartículas do que com tamoxifeno livre. Além disso, essas nanopartículas demonstraram uma redução da toxicidade hepática e renal quando comparadas ao tamoxifeno livre (PANDEY et al., 2015). Em nanopartículas de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) o tamoxifeno reduziu o tumor e diminuiu a hepatotoxicidade quando comparado com o

tamoxifeno livre (JAIN et al., 2011). O CTAM foi associado com o quimioterápico topotecano em nanopartículas de PLGA para investigar a ação sinérgica desses compostos (KHUROO et al., 2014).

1.3 Curcumina

A curcumina [1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona] foi primeiramente isolada por Vogel e Pelletier em 1815 (VOGEL; PELLETIER, 1815). Ela faz parte do rizoma da *Curcuma longa* L., popularmente conhecida como açafrão da Índia, gengibre dourado e cúrcuma. No extrato da raiz do açafrão estão presentes os curcuminóides que são uma mistura de três compostos principais: curcumina (curcumina I, 77%), desmetoxicurcumina (curcumina II, 17%) e bisdesmetoxicurcumina (curcumina III, 3%), representados na Figura 3 (GOEL et al., 2008).

Figura 3 - Estrutura química dos curcuminóides da *Curcuma longa* L.



(Adaptado de NAKSURIYA et al., 2014)

Quimicamente a curcumina é um bis- α,β -insaturada β -dicetona, que exibe tautomerismo ceto-enol, predominando a forma ceto em meio ácido ou neutro e a forma enol

em meio alcalino, tendo um pKa de 8,54 (ANAND et al., 2008; PRASAD et al., 2014). Ela tem um peso molecular de 368,38 g/mol, um ponto de fusão de 179-183 °C e fórmula química $C_{21}H_{20}O_6$. É um composto fotossensível à radiação UV/visível e para evitar sua degradação as amostras contendo curcumina devem ser protegidas da luz (TØNNESEN; KARLSEN; VAN HENEGOUWEN, 1986; STRIMPAKOS; SHARMA, 2008).

A curcumina possui uma ampla gama de atividades como anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana e antitumoral, sendo estudada para aplicação nas mais variadas doenças como: dengue (PADILLA et al., 2014), Alzheimer (GARCIA-ALLOZA et al., 2007; VILLAFLORESA et al., 2012), Parkinson (YANG et al., 2014), doenças cardiovasculares (LI et al., 2008), diabetes (WEISBERG; LEIBEL; TORTORIELLO, 2008), depressão (LOPRESTI et al., 2014), epilepsia (KAUR; BAL; SANDHIR, 2014), asma (SUBHASHINI et al., 2013), entre outras. Uma das atividades da curcumina que vem sendo amplamente estudada é a antitumoral, tendo potencial para prevenção e tratamento de diversos cânceres como de mama, gastrointestinais, de cérebro, ginecológicos, hematológicos, geniturinários, melanoma, entre outros (ANAND et al., 2008). Além disso, a curcumina tem sido associada a outros agentes quimioterápicos, com a intenção de diminuir a toxicidade e aumentar o efeito terapêutico desses agentes. Como com a cisplatina apresentando sinergismo, com a doxorrubicina atividade aditiva, lipossomas contendo curcumina e paclitaxel, curcumina e 5-fluorouracil em nanopartículas de quitosana e micelas polimérica contendo paclitaxel e curcumina (NOTARBARTOLO et al., 2005; SARISOZEN; ABOUZEID; TORCHILIN, 2014; ANITHA et al., 2014; RUTTALA; KO, 2015).

As diversas atividades da curcumina estão relacionadas à sua atuação em vários alvos moleculares como: expressão de genes (oncogenes e genes supressores de tumores), fatores de transcrição, fatores de crescimento e seus receptores, fatores nuclear, receptores hormonais, atuando também na angiogênese (STRIMPAKOS; SHARMA, 2008). Dentre as vantagens da utilização da curcumina está o fato de que ela causa mínimos efeitos colaterais. Por ser usada desde muito tempo como alimento é um produto seguro para consumo. Em um estudo clínico em humanos foi demonstrado que concentrações de 8 g/dia de curcumina por 3 meses não causou efeitos tóxicos, sendo que outros estudos também confirmam esse resultado com mínimos efeitos tóxicos (CHENG et al., 2001; SHARMA et al., 2004; LAO et al., 2006).

No caso de suas limitações de uso, estas estão relacionadas aos seus reduzidos níveis séricos e baixa biodisponibilidade, ocasionados devido à sua baixa solubilidade em soluções aquosas e a um rápido metabolismo e eliminação sistêmica (AGGARWAL; SUNG, 2009). Vários estudos em humanos demonstraram sua baixa biodisponibilidade, onde 2 g/kg por via

oral resultou em $0,006 \pm 0,005$ $\mu\text{g/mL}$ no sangue; 4–8 g/dia resultou em 0,5–1,77 μM ; 10 g resultou em 50 ng/mL; 3,6 g/dia resultou em $11,1 \pm 0,6$ nmol/mL e com 3,6 g/dia os níveis plasmáticos foram abaixo do limite de quantificação de 3 nmol/L (SHOBA et al., 1998; CHENG et al., 2001; SHARMA et al., 2004; GARCEA et al., 2005; LAO et al., 2006). Mesmo com a baixa toxicidade, a alta dosagem necessária para um efeito terapêutico pode ser um inconveniente pelo número de doses administradas para o paciente. Esse fato foi demonstrado em dois estudos, em que um utilizou 16 e o outro 8 cápsulas por dia, cada uma contendo 450 mg de curcumina (SHARMA et al., 2004; BAYET-ROBERT et al., 2010). No primeiro alguns pacientes não finalizaram o tratamento alegando que o número de cápsulas que deveriam ingerir eram inaceitáveis (BAYET-ROBERT et al., 2010). Além desses fatores a curcumina também degrada em pH neutro e básico, 90% da curcumina é degradada em pH 7,4, entre seus produtos de degradação identificados, estão o ácido ferúlico e a vanilina (WANG et al., 1997).

A ampla gama de atividades da curcumina e o fato de possuir uma baixa biodisponibilidade fazem da nanotecnologia uma boa estratégia para melhorar a sua eficácia terapêutica. Vários estudos já desenvolveram formulações nanotecnológicas contendo curcumina, como lipossomas, nanopartículas poliméricas, ciclodextrinas e nanopartículas lipídicas sólidas (KAREWICZ et al., 2011; SILVA-BUZANELLO et al., 2015; YADAV et al., 2010; KAKKAR et al., 2013). Kakkar et al. (2013) demonstraram um aumento da biodisponibilidade da curcumina em nanopartículas lipídicas sólidas no cérebro de ratos, outro estudo mostrou o aumento da biodisponibilidade da curcumina em nanopartículas de PLGA e PLGA-poli(etileno)glicol em 15,6 e 55,4 vezes, respectivamente (KHALIL et al., 2012). Estudos em humanos mostrando o aumento da biodisponibilidade também já foram realizados, onde uma dose de 650 mg de nanopartículas lipídicas sólidas contendo curcumina resultaram em 22 ng/mL no plasma, enquanto a mesma dose de curcumina livre não foi identificável (GOTA et al., 2010). Outro estudo utilizou 150 e 210 mg de curcumina em nanopartículas, resultando em respectivamente 189 e 275 ng/mL de curcumina no plasma (KANAI et al., 2012).

1.4 Associação de curcumina e tamoxifeno

O tamoxifeno é empregado no tratamento e prevenção do câncer de mama, mas possui diversos efeitos colaterais. A curcumina possui baixa toxicidade e apresenta atividade antitumoral *in vitro* sobre uma ampla gama de tumores, incluindo tumores de mama tanto de

células RE-positivas como RE-negativas (LIU et al., 2009; CHEN et al., 2014), também inibindo o câncer de mama em modelos *in vivo* (BACHMEIER et al., 2007; ZHOU et al., 2011; LIU et al., 2013).

A associação de curcumina e tamoxifeno pode ser benéfica pela diminuição da toxicidade do tamoxifeno, e por um possível efeito aditivo ou sinérgico sobre o câncer. A associação desses compostos na forma livre já foi relatada em alguns estudos. Pedroso et al. (2013) mostraram que associado com a curcumina o efeito do tamoxifeno sobre células tumorais foi potencializado e o seu efeito tóxico em células normais, incluindo hemácias e leucócitos polimorfonucleares, foi diminuído. Outro estudo mostra que a associação de curcumina e tamoxifeno atua de forma sinérgica causando a morte de células de melanoma humano (CHATTERJEE; PANDEY, 2011). Jiang et al. (2013) estudaram o efeito da curcumina e do tamoxifeno sobre células de linhagens de câncer de mama MCF-7/LCC2 e MCF-7/LCC9 resistentes ao tamoxifeno, mostrando que além de causar a morte dessas células a curcumina pode reverter a resistência e aumentar a sensibilidade ao tamoxifeno em células não resistentes. A curcumina também apresentou efeito sinérgico com o tamoxifeno em células de câncer de mama da linhagem MCF-7/myrAKT também relacionadas à resistência ao tamoxifeno (GASPERI; CAVAZOS; GRAFFENRIED, 2009). A associação da curcumina com outros medicamentos para o tratamento do câncer de mama também já foi estudada, como no caso de um estudo de fase I em pacientes com câncer de mama utilizando o quimioterápico docetaxel e curcumina (BAYET-ROBERT et al., 2010). Além disso, a curcumina apresentou proteção na lesão hepática induzida pelo tamoxifeno em ratos (EL-BESHBISHY et al., 2010).

A influência da curcumina na farmacocinética e biodisponibilidade do tamoxifeno foi estudada em ratos. O tamoxifeno (9 mg/kg) foi combinado com a curcumina (0,5 ; 2,5 e 10 mg/kg) por via oral, os resultados mais significantes foram obtidos com a concentração de 10 mg/kg. Quando associado com a curcumina a área sob a curva da concentração ao longo do tempo, a concentração plasmática máxima e a biodisponibilidade do tamoxifeno aumentaram (CHO; LEE; CHOI, 2012).

Esses estudos mostraram que a associação de curcumina e tamoxifeno é promissora, mas nenhum relata a associação desses compostos em nanopartículas. Essa estratégia seria interessante, pois a curcumina na forma livre apresenta uma biodisponibilidade muito baixa. As nanopartículas também possuem potencial para diminuir a toxicidade do tamoxifeno, além de proporcionarem uma liberação sítio-específica e controlada.

1.5 Nanotecnologia

O conceito de nanotecnologia surgiu em 1959 com o físico Richard Feynman. Ele falava na possibilidade de manipular átomos e moléculas individualmente. Porém, demorou um pouco mais de uma década para o termo nanotecnologia surgir por meio do professor Norio Taniguchi. O maior desenvolvimento da nanotecnologia ocorreu a partir dos anos 80 com o desenvolvimento do microscópio de tunelamento (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007; NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE, 2014).

Na definição geral de nanotecnologia o tamanho é delimitado em 1 a 100 nm, mas como a nanotecnologia é empregada nas mais diversas áreas com aplicações muito distintas, essa definição muitas vezes não é adequada. Como no setor farmacêutico, onde as propriedades desejadas de uma nanopartícula, por exemplo, aumento da solubilidade, diminuição da toxicidade e aumento da biodisponibilidade de fármacos são alcançadas mesmo quando o tamanho é superior a 100 nm, nesta situação considera-se como tamanho adequado até 1000 nm (BAWA et al., 2008; SINGH; LILLARD, 2009).

Em vista da dificuldade de padronização de um tamanho para a definição de nanotecnologia, definições que não são limitadas por tamanho estão surgindo, como a do ISO/TC 229 em que a nanotecnologia deve possuir um desses aspectos (ISO, 2014):

- 1) Compreensão e controle da matéria e processos na escala nanométrica, tipicamente, mas não exclusivamente abaixo de 100 nm em uma ou mais dimensões, em que o aparecimento de fenômenos que dependem do tamanho normalmente possibilite novas aplicações;
- 2) Utilização da propriedade da matéria em nanoescala que diferem das propriedades dos átomos individuais, moléculas e da matéria a granel, para criar materiais, dispositivos e sistemas melhorados que exploram essas novas propriedades (ISO, 2014, tradução nossa).

A nanotecnologia tem sido bastante estudada, as propriedades dos materiais na sua forma convencional seguem as leis da ciência clássica, enquanto os objetos na escala nanométrica seguem as leis da mecânica quântica. Assim, novas ferramentas e funcionalidades estão sendo descobertas a partir das diferentes propriedades encontradas nos materiais em escala nanométrica (ADAMS; BARBANTE, 2013).

A partir de seu surgimento a nanotecnologia revolucionou os produtos médicos, principalmente os relacionados ao diagnóstico, prevenção, detecção e tratamento da doença (GAO et al., 2014). Nessa área, a nanotecnologia vem sendo usada na entrega de drogas sítio

específica, visando a liberação do fármaco no sítio fisiológico determinado (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010). Outra aplicação é o encapsulamento de substâncias a fim de aprimorar suas propriedades biofarmacêuticas, como promover o aumento da biodisponibilidade por meio de alterações na solubilidade, degradação, metabolismo e permeabilidade dessa substância.

No caso de drogas utilizadas na oncologia a nanotecnologia oferece muitas vantagens como: evitar os efeitos colaterais, melhorar a solubilidade, proteger o fármaco da degradação, modificar a farmacocinética e distribuição assim aumentando a concentração da droga no tumor, reduzir a toxicidade em células normais e aumentar a absorção na célula cancerosa (GAO et al., 2014).

1.5.1 Nanopartículas poliméricas

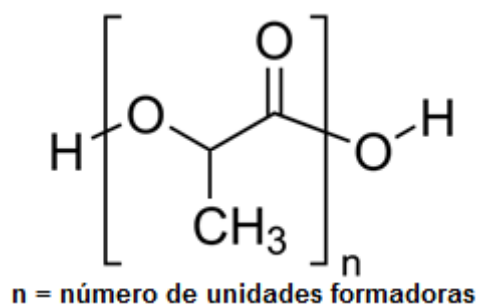
Existe uma ampla variedade de sistemas nanoestruturados estudados para desenvolvimento de fármacos, podendo ser citadas as nanopartículas inorgânicas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas, lipossomas, nanocristais, nanotubos de carbono e dendrímeros (FARAJI; WIPF, 2009).

Os diferentes tipos de nanopartículas em relação à morfologia podem ser divididos em nanoesferas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanocápsulas poliméricas ou lipídicas (ANTON; BENOI; SAULNIER, 2008). As nanoesferas se caracterizam por uma matriz sólida, onde as moléculas podem estar adsorvidas na superfície da esfera ou encapsuladas dentro da partícula. As nanocápsulas são sistemas vesiculares, as substâncias ficam retidas na cavidade líquida oleosa ou aquosa, revestido por um invólucro sólido (RAO; GECKELER, 2011).

As nanopartículas poliméricas são formadas a partir de polímeros que podem ser naturais ou sintéticos. Os polímeros sintéticos são vantajosos devido aos seguintes fatores: (1) apesar da maioria dos polímeros naturais apresentarem uma boa biocompatibilidade, alguns podem desencadear uma resposta imunológica, (2) muitas vezes as modificações químicas em polímeros naturais são mais difíceis de serem feitas, é mais fácil modificar quimicamente e fazer a funcionalização de polímeros sintéticos (TIAN et al. 2012). Dentre os polímeros mais comumente usados estão o PLA, PLGA, poli (ϵ -caprolactona) (PCL), quitosana e gelatina (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010). O PLA é um poliéster sintético alifático linear (Figura 4), a via mais comum para a produção de PLA de alto peso molecular é por meio da polimerização do monômero formado a partir do ácido láctico, produzido pela fermentação de

açúcar, milho, batatas, cana, beterraba, entre outros (AURAS; HARTE; SELKE, 2004). Por possuir um carbono assimétrico o PLA possui as formas D e L, sendo os enantiômeros o poli (D-ácido láctido) e o poli (L-ácido láctido) (MAKADIA; SIEGEL, 2011). O PLA é altamente empregado no desenvolvimento de nanopartículas por ser biocompatível e biodegradável. Em meio fisiológico ocorre sua cisão formando os monômeros de ácido láctico, esses são incorporados no ciclo de Krebs (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

Figura 4 - Estrutura química do PLA.



(Adaptado de MAKADIA; SIEGEL, 2011)

As nanopartículas poliméricas podem ser produzidas a partir dos monômeros ou pelo processamento de polímeros previamente formados. As técnicas mais utilizadas para formação das nanopartículas a partir de polímeros previamente formados são: evaporação do solvente, salting-out, nanoprecipitação, diálise e fluido supercrítico (RAO; GECKELER, 2011). A emulsificação-evaporação do solvente foi um dos primeiros métodos desenvolvido para formação de nanopartículas a partir de polímeros previamente formados e continua como uma das técnicas mais usadas no desenvolvimento de nanopartículas poliméricas (VANDERHOFF; EL-AASSER; UGELSTAD, 1979; RAO; GECKELER, 2011).

Nas nanopartículas formadas pela emulsificação-evaporação do solvente, a principal característica que faz com que as nanoemulsões sejam usadas é sua grande estabilidade. Que as torna um sistema de liberação de ativos vantajoso em relação a outros sistemas como, por exemplo, lipossomas e microemulsões. Porque possuem estabilidade cinética que dura por meses, mesmo quando diluídas ou com variações de temperatura, ao contrário das microemulsões que são termicamente instáveis (ANTON; BENOI; SAULNIER, 2008).

Existem duas estratégias para a formação da emulsão, uma delas é a simples emulsão como óleo em água (O/A) ou uma dupla emulsão como água em óleo em água (A/O/A), usando homogeneização em alta velocidade ou sonicação. A emulsão simples é mais utilizada para fármacos hidrofóbicos, enquanto a emulsão dupla para fármacos hidrofílicos (RAO; GECKELER, 2011; MAKADIA; SIEGEL, 2011). Métodos que utilizam a sonicação no

preparo das nanoemulsões são muito empregados no desenvolvimento de nanopartículas poliméricas, uma vez que os parâmetros da formulação são diretamente controlados, ao contrário de outros métodos onde a formação das partículas está relacionada diretamente às propriedades físico-químicas dos agentes tensoativos e excipientes que compõem a formulação (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008). Após a formação da emulsão, ela é levada para evaporação, evaporando o solvente do polímero, as nanopartículas solidificadas podem então ser ultracentrifugadas e lavadas com água destilada para retirada dos surfactantes (RAO; GECKELER, 2011).

1.5.2 Direcionamento das nanopartículas

O direcionamento de drogas é dependente de suas propriedades físico-químicas, nas nanopartículas depende de alguns fatores como tamanho da partícula, carga superficial, modificações da superfície, hidrofobicidade, entre outros (OHKOUCHI et al., 1990; FENG, 2004). O tamanho e o índice de polidispersão são importantes para determinar a interação das nanopartículas com as membranas e a sua penetração através das barreiras fisiológicas (FENG, 2004). No caso de tumores é possível o direcionamento das nanopartículas de forma passiva, utilizando o efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR). Esse efeito acontece devido às alterações encontradas nos vasos sanguíneos tumorais. Esses vasos possuem uma forma irregular, são dilatados, as células do endotélio são desorganizadas e com grandes fenestrações. A membrana basal ou a camada de músculo liso são ausentes ou anormais, além disso, o tecido tumoral possui uma fraca drenagem linfática (SKINNER; TUTTON; O'BRIEN, 1990; NOGUCHI et al., 1998; IYER et al., 2006). Devido aos poros dos vasos sanguíneos tumorais serem maiores do que dos vasos normais, as nanopartículas são absorvidas com maior seletividade no tumor do que no tecido saudável, a deficiência na drenagem linfática também contribui para o acúmulo dessas nanopartículas no tecido tumoral (IYER et al., 2006; PODDUTURI et al., 2013). Dessa forma, os benefícios do efeito EPR para a nanotecnologia são o aumento da biodistribuição no tecido tumoral e alterações na farmacocinética, que podem aumentar a atividade antitumoral e diminuir a toxicidade ao tecido saudável.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Obter e caracterizar nanopartículas de PLA contendo curcumina, CTAM e curcumina-CTAM, bem como avaliar a citotoxicidade dessas nanopartículas sobre hemácias e células tumorais da linhagem B16-F10.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação de curcumina e CTAM simultaneamente;
- Obter nanopartículas de PLA contendo curcumina, CTAM e curcumina-CTAM pelo método de emulsificação-evaporação do solvente;
- Realizar a caracterização físico-química e determinar a eficiência de encapsulação dos sistemas nanoestruturados obtidos;
- Avaliar a estabilidade, pelo monitoramento do potencial zeta, índice de polidispersão e do tamanho das nanopartículas armazenadas em diferentes temperaturas, por um período de 90 dias;
- Determinar o perfil de liberação *in vitro* das nanopartículas;
- Avaliar a citotoxicidade das nanopartículas e das drogas na forma não encapsulada frente a hemácias;
- Avaliar a citotoxicidade das nanopartículas sobre células de melanoma da linhagem B16-F10.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

- Acetato de etila (Biotec®);
- Ácido acético (Química Moderna®);
- Água Ultrapura (sistema Milli-Q Gradiente Millipore®, resistividade de 18.2 MΩ cm);
- Álcool isopropílico (Fmaia®)
- Álcool polivinílico (Sigma ChemicalCo®, USA);
- Azul de Tripán 0,4% (Sigma-Aldrich®);
- Brometo de potássio grau espectroscópico (Sigma-Aldrich®);
- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (Sigma-Aldrich®);
- Citrato de tamoxifeno (Sigma ChemicalCo®, USA);
- Cloreto de sódio (Biotec®);
- Curcumina (Sigma-Aldrich®);
- Diclorometano (Fmaia®);
- Dimetilsulfóxido (Química Moderna®);
- D (+) Sacarose P.A. (Vetec® Química Fina);
- Estreptomicina (Sigma-Aldrich®);
- Etanol grau HPLC (J.T. Baker®);
- Etanol 99,5% (Fmaia®);
- Fosfato de sódio monobásico anidro P.A. (Vetec®);
- Fosfato de potássio dibásico P.A. (Biotec®);
- Glicose;
- Heparina sódica (Hipolabor®);
- Meio de cultura Dulbecco modificado por Iscove's (Sigma-Aldrich®);
- Membranas filtrantes de acetato de celulose 0,22 μm e politetrafluoretileno 0,45 μm (Millipore®);
- Metanol grau HPLC (J.T. Baker®);
- Penicilina (Sigma-Aldrich®);
- Poli (L, ácido -lático) (Sigma ChemicalCo®, USA);
- Polissorbato-80 (Sigma ChemicalCo®, USA);

- Soro fetal bovino (Gibco®);
- Tripsina (Gibco®).

3.2 Equipamentos

- Agitador orbital;
- Aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Waters Alliance®) equipado com detector de Arranjo de Fotodiodo;
- Autoclave vertical AV Plus (Phoenix®);
- Balança analítica (Tecnal®);
- Bomba a vácuo (Tecnal® – Mod. TE 058).
- Banho ultrassônico (Unique®);
- Capela de fluxo laminar vertical (Veco®);
- Coluna analítica de fase reversa C18 (25 cm X 4 mm) tamanho de partícula 5 µm (Xterra Waters®);
- Desruptor de células ultrassônico - Unique®;
- Equipamento para análise do potencial zeta – ZetananoSizer (ZS - Malvern®);
- Equipamento para medida do espalhamento dinâmico da luz (Brookhaven® 90 Plus);
- Espectrofotômetro UV – Spectra MAX 190 – Molecular Devices®;
- Espectrômetro de infravermelho com transformação de Fourier (Termoelectron Nicolet IR200 FT-IR – Thermo Scientific®);
- Evaporador rotatório (Tecnal® – Mod. TE 120);
- Liofilizador (Terroni® – Mod. LD1500);
- Microscópio CX21 (Olympus®);
- Microscópio eletrônico de transmissão;
- Pipetas monocal (Labmate®);
- Seringas e agulhas estéreis e descartáveis;
- Sistema de ultrapurificação de água – MilliQ Gradiente Millipore®;
- Sistema para análise de calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria (T.A Instruments®, modelo SDT Q600);
- Ultracentrífuga refrigerada – Hermle Labortechnik® Z36HK;

3.3 Métodos

3.3.1 Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE para quantificação de curcumina e CTAM simultaneamente

A solução padrão de curcumina, de CTAM e as amostras foram preparados em metanol e água na proporção de 85:15. Antes de serem analisadas as amostras foram filtradas com filtro de politetrafluoretileno 0,45 µm. A fase móvel também foi filtrada, utilizando membrada adequada para cada solvente e desgaseificada por 30 minutos.

O mesmo método foi utilizado para a quantificação da curcumina e do CTAM alterando apenas o comprimento de onda de detecção. A validação desse método seguiu as exigências do ICH (*International Conference on Harmonization*) e da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) que solicitam as seguintes análises: precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), especificidade e robustez (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

a) Especificidade: A especificidade foi analisada em relação à solução utilizada no ensaio de liberação *in vitro* e em relação ao sobrenadante de uma nanopartícula sem curcumina e CTAM, como um controle para descartar a presença de qualquer pico interferente que não estivesse relacionado aos compostos em análise. Além disso, foi realizada a leitura de uma solução padrão de curcumina e CTAM separadamente, comparando os cromatogramas para verificar se existiam picos no mesmo tempo de retenção.

b) Linearidade: A linearidade foi calculada pela construção de uma curva analítica com padrões de curcumina e CTAM a partir de sete concentrações (1, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL), em quadruplicata. A área dos picos foi correlacionada com as concentrações, para verificar a existência de uma relação linear, a linearidade foi avaliada analisando o coeficiente de correlação (r).

c) Exatidão: Para essa análise foram preparadas três concentrações de curcumina e CTAM (5 µg/mL, 20 µg/mL e 50 µg/mL) em quadruplicata. Os resultados foram avaliados pela porcentagem de recuperação calculada conforme a equação 1.

$$\text{Porcentagem de recuperação} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

d) Precisão: A precisão foi avaliada pela precisão intra-corrida (repetibilidade) e precisão inter-corridas (precisão intermediária). Na repetibilidade as análises ocorreram no mesmo dia em um curto espaço de tempo, na precisão intermediária foram feitas análises em dias diferentes. Em ambos os casos foram utilizadas 3 concentrações de curcumina e CTAM, dentro do intervalo da curva analítica, sendo uma baixa 5µg/mL, uma média 20µg/mL e uma alta 50 µg/mL, em quadruplicata. Os resultados foram expressos utilizando média, desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR) conforme a equação 2.

$$\text{Desvio padrão relativo} = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Concentração média experimental}} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

e) Robustez: A robustez foi avaliada alterando os seguintes parâmetros: 1) fluxo de 0,8 para 0,75 e 0,85 mL/min, 2) proporção de fase móvel de metanol, etanol e ácido acético 70:15:15 para 75:10:15, 3) temperatura da coluna de 25 °C para 30 °C e 20 °C. Os resultados foram calculados por meio da porcentagem de recuperação e DPR (Equação 1 e 2).

f) Limites de detecção e quantificação: O limite de detecção e quantificação do método foram calculados utilizando uma curva com baixas concentrações das drogas, as concentrações utilizadas foram: 1 µg/mL, 0,8 µg/mL, 0,6 µg/mL, 0,4 µg/mL, 0,2 µg/mL e 0,1 µg/mL, em triplicata. Após a construção da curva, com os valores do desvio padrão médio do intercepto com o eixo y e da inclinação da curva, foram encontrados os limites de detecção e quantificação utilizando as equações 3 e 4, respectivamente.

$$\text{Limite de detecção} = \frac{\text{Desvio padrão médio do intercepto } y \times 3}{\text{Inclinação da curva analítica}} \quad (\text{Equação 3})$$

$$\text{Limite de quantificação} = \frac{\text{Desvio padrão médio do intercepto } y \times 10}{\text{Inclinação da curva analítica}} \quad (\text{Equação 4})$$

3.3.2 Obtenção de nanopartículas de PLA contendo CTAM, curcumina e curcumina-CTAM

As nanopartículas de PLA contendo CTAM, curcumina e curcumina-CTAM foram preparadas pelo método de emulsificação-evaporação do solvente, por meio de uma emulsão

simples (O/A) (RAO; GECKELER, 2011). Inicialmente, 2,5 mg de curcumina foram dissolvidas em de acetato de etila (900 μ L), 2,5 mg de CTAM em dimetilsulfóxido (100 μ L) e o PLA (50 mg) dissolvido em diclorometano (1000 μ L), formando assim a fase oleosa da formulação. A fase oleosa foi vertida na fase aquosa composta de 10 mL de álcool polivinílico (PVA) 0,5%, esse processo ocorreu sob sonicação por 4 minutos a 60 Hz. Após sonicação, a emulsão formada foi levada para evaporação em evaporador rotatório sob pressão negativa (37 °C/30 minutos) para remoção dos solventes orgânicos.

As nanopartículas formadas foram separadas por centrifugação (14000 rpm/30 minutos), o precipitado de nanopartículas foi ressuspense em água para retirada da curcumina e/ou CTAM que não encapsularam e remoção do tensoativo, seguido de uma segunda centrifugação (14000 rpm/30 minutos). O sobrenadante resultante das duas centrifugações foi separado para análise da eficiência de encapsulação de modo indireto. O precipitado de nanopartículas foi ressuspense em sacarose 5% e posteriormente foi armazenado. As nanopartículas vazias foram preparadas nas mesmas condições citadas acima, mas sem a adição curcumina ou CTAM.

3.3.3 Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersão por espectroscopia de correlação de fótons

O diâmetro médio das partículas e o índice de polidispersão foram determinados pela espectroscopia de correlação de fótons (BIC 90 plus – Brookhaven Instruments Corp. EUA). Para as análises as nanopartículas foram suspensas em uma cubeta com água destilada, as análises ocorreram na temperatura de 25° C, em um ângulo de espalhamento de 90° e laser no comprimento de onda de 659 nm.

3.3.4 Análise por microscopia eletrônica de transmissão

O tamanho e a morfologia das nanopartículas de curcumina, CTAM e curcumina-CTAM foram analisados por microscopia eletrônica de transmissão (MET). As amostras em suspensão foram colocadas em um suporte de cobre e contrastadas negativamente com acetato de uranila a 2% (m/V) por 1 minuto. Em seguida as amostras foram analisadas por MET (Jeol JEM 1400) utilizando 80 kV.

3.3.5 Determinação da eficiência de encapsulação

O sobrenadante resultante das centrifugações das nanopartículas durante o seu preparo, foi diluído na proporção de 1:10 em solução de metanol e água, sendo posteriormente filtrado e analisado por CLAE. A fase móvel utilizada foi metanol, ácido acético 0,5% e etanol (70:15:15), com fluxo isocrático de 0,8 mL/min e volume de injeção de 60 µL. O detector PDA em um comprimento de onda de 417 nm para curcumina e 240 nm para o CTAM. A cromatografia foi realizada em fase reversa, utilizando coluna C18. Dessa forma, a eficiência de encapsulação (E.E%) foi determinada pelo método indireto, segundo a equação 5.

$$E.E\% = \frac{\text{Concentração inicial} - \text{Concentração do sobrenadante}}{\text{Concentração inicial}} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

3.3.6 Potencial zeta

A análise do potencial zeta foi realizada para as nanopartículas de curcumina, CTAM, curcumina-CTAM, nanopartículas vazias e para a curcumina e o CTAM na forma livre. Uma alíquota dessas amostras foi diluída em água purificada e acondicionadas em célula eletroforética, as análises foram realizadas em triplicata no equipamento ZetananoSizer (ZS - Malvern®).

3.3.7 Estabilidade

A estabilidade das nanopartículas foi realizada por um período total de 90 dias, analisando o tamanho e o índice de polidispersão (item 3.3.3), além do potencial zeta (item 3.3.6) das nanopartículas armazenadas em temperatura ambiente, 5 °C e -15 °C. As análises foram realizadas para as nanopartículas de CTAM, curcumina e curcumina-CTAM em triplicata e ocorreram no dia de preparo das nanopartículas e nos tempos de 7, 30, 60 e 90 dias, no caso das nanopartículas congeladas foram feitas varias alíquotas que foram descongeladas antes de cada análise.

3.3.8 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

As nanopartículas de curcumina, CTAM, curcumina-CTAM, vazias e as drogas na forma livre foram submetidas à análise por espectroscopia na região do infravermelho. As amostras foram preparadas com uma solução de brometo de potássio, sendo submetidas à compressão por prensa hidráulica formando assim pastilhas, as quais foram analisadas através de espectroscopia na região do infravermelho (Termoelectron Nicolet IR200 FT-IR - Thermo Scientific®) na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} .

3.3.9 Calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria

As amostras correspondentes as nanopartículas de curcumina, CTAM, curcumina-CTAM, nanopartículas vazias e as drogas na forma livre foram analisadas por termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) (TA Instruments®, Mod. SDT Q600). Para essas análises as amostras foram adicionadas e seladas em cadinhos de alumínio, posteriormente foram submetidas a aquecimento sob atmosfera de nitrogênio, com razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, variação de temperatura de 30 a 450 $^{\circ}\text{C}$ e vazão do gás de arraste de 100 mL/min . Antes dos ensaios foram realizadas calibrações na célula do DSC no eixo das temperaturas utilizadas, essas calibrações foram feitas com padrões de zinco, oxalato de cálcio e safira.

3.3.10 Perfil de liberação *in vitro*

Para obter o perfil de liberação *in vitro*, primeiramente as nanopartículas de curcumina, CTAM e curcumina-CTAM foram diluídas em polissorbato 80 1% pH 7,4 nas concentrações de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para a curcumina e de aproximadamente 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para o CTAM. Essa dispersão de nanopartículas foi incubada sob agitação orbital a 150 rpm na temperatura de 37 $^{\circ}\text{C}$. Nos tempos de 1, 3, 5, 8, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas as nanopartículas foram centrifugadas (15000 rpm/30 minutos) o sobrenadante foi retirado e analisado por CLAE para a quantificação da droga liberada. O precipitado contendo as nanopartículas foi ressuspensão em um novo meio (polissorbato 80 1% pH 7,4) e submetido a agitação. As análises foram realizadas em triplicata.

Para obter o perfil de liberação, os dados obtidos foram submetidos aos modelos matemáticos de ordem zero, primeira ordem, segunda ordem, Higuchi, além do modelo de

Korsmeyer-Peppas utilizando o software *MicroMath Scientist*®, segundo as equações do Quadro 2.

Quadro 2 – Equações matemáticas utilizadas para obter o perfil e o mecanismo de liberação *in vitro* das nanopartículas de CTAM, curcumina e curcumina-CTAM.

Modelo	Equação
Ordem zero	$C = kt$
Primeira ordem	$C = 100 (1 - e^{-kt})$
Segunda ordem	$C = 100 [1 - (Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t})]$
Higuchi	$C = k \sqrt{t}$
Korsmeyer-Peppas	$C = at^n$

Onde: C representa o percentual do fármaco dissolvido no tempo t; k, α e β , constantes cinéticas de dissolução; A e B, concentrações iniciais do fármaco que contribuem para os dois momentos de dissolução do fármaco; a, constante que mostra as características estruturais e geométricas da forma farmacêutica; n, expoente de liberação que indica o mecanismo da liberação.

3.3.11 Análise da citotoxicidade das nanopartículas e das drogas na forma livre sobre hemácias

O experimento de citotoxicidade frente a hemácias humanas foi avaliado e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Estadual do Centro-Oeste, tendo como registro o nº 840.169/2014 (Anexo A). Inicialmente foram coletados 5 mL de sangue humano e colocados em frasco contendo heparina, em seguida foi realizada a centrifugação (4 °C, 2500 rpm por 5 minutos) para retirada do plasma. O sangue então foi lavado com tampão fosfato de sódio (PBS) 10 mM (pH 7,4) e centrifugado. Esse processo foi repetido 3 vezes. Após lavagem, o volume globular foi ajustado para 2 % com tampão PBS 10 mM (pH 7,4) contendo glicose (1,08 mg/mL), penicilina (0,3 mg/mL) e estreptomicina (0,5 mg/mL).

Após ajuste do volume globular, as hemácias foram incubadas em diferentes tempos (20 minutos, 1, 3, 24, 48 e 72 horas) a 37 °C com as nanopartículas de curcumina, nanopartículas de CTAM, nanopartículas de curcumina-CTAM e as drogas na forma livre, nas concentrações de 200 µg/mL para a curcumina e 100 µg/mL para o CTAM, sob agitação constante. O controle de 100% de hemólise foi realizado incubando as hemácias com água destilada, o controle negativo pela incubação com tampão PBS 10 mM (pH 7,4). Também foi realizado o controle de etanol, utilizado para dissolver a curcumina e o CTAM na forma livre e o controle com as nanopartículas vazias.

Nos tempos determinados, a suspensão de hemácias foi centrifugada (4 °C, 2500 rpm /5 minutos), a hemoglobina liberada pela ruptura das hemácias foi determinada no sobrenadante medindo a absorvância em 540 nm. A porcentagem de hemólise foi calculada utilizando a equação 6.

$$\% \text{ Hemólise} = \frac{\text{Absorbância}_a}{\text{Absorbância}_c} \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

Onde:

Absorbância _a representa a absorvância da amostra.

Absorbância _c a absorvância do controle de 100% de hemólise.

3.3.12 Análise da citotoxicidade sobre células tumorais

3.3.12.1 Cultivo das células

As células da linhagem B16-F10 (ATCC CRL-6475) de melanoma murino, foram mantidas em meio de cultura Dulbecco modificado por Iscove's, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina e 10 µg/mL estreptomicina. As células foram repicadas duas vezes por semana em ambiente estéril utilizando fluxo laminar, sendo armazenadas em uma concentração de 2×10^5 células/mL em estufa à temperatura de 37 °C e atmosfera umidificada com nível de CO₂ a 5%. O crescimento das células foi acompanhado por microscópio invertido, a viabilidade celular foi calculada utilizando azul de tripan 0,4 % com contagem em câmara de Neubauer.

3.3.12.2 Ensaio de citotoxicidade

Para o ensaio de citotoxicidade 1×10^4 células/mL foram distribuídas em placa com 96 poços e incubadas por 24 horas em estufa (37 °C e 5% de CO₂). Após esse período o meio foi retirado, adicionando a curcumina e o CTAM livre, nanopartículas de curcumina-CTAM, nanopartículas de curcumina e nanopartículas de CTAM, completando o volume final para 200 µL com meio de cultura. Antes de serem adicionadas à placa as nanopartículas foram diluídas em tampão PBS e as drogas livres em etanol, para assim obter as seguintes concentrações 40, 10 e 3 µg/mL para a curcumina e 24, 6, e 2 µg/mL para o CTAM e na associação de curcumina-CTAM foram testadas nas seguintes concentrações 40 e 24, 10 e 6,

3 e 2 µg/mL para a curcumina e CTAM, respectivamente. As células foram incubadas junto com as nanopartículas nas concentrações citadas por períodos de 24 e 72 horas a 37 °C, com 5 % de CO₂. Os controles foram realizados utilizando etanol, nanopartículas vazias e apenas meio de cultura para o controle positivo.

A leitura do teste foi feita por meio do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), esse composto é solúvel em água e forma um formazan insolúvel de cor roxa apenas em células vivas, o formazan formado pode ser solubilizado utilizando etanol e mensurado através de espectrofotômetro. Assim, para a quantificação das células vivas após cada tempo o meio foi retirado, adicionando em seguida 50 µL de MTT incubando por 3 horas, posteriormente o MTT foi retirado e adicionou-se 50 µL de etanol e 150 µL de uma solução contendo tampão PBS e álcool isopropílico (1:1). A leitura do teste foi feita em 570 nm e 630 nm, a leitura em 630 nm foi realizada para minimizar o efeito da turvação ocasionada pelas células viáveis e a leitura em 570 nm está relacionada ao formazan. O valor final foi encontrado subtraindo o valor obtido em 630 nm dos valores em 570 nm, a viabilidade celular foi calculado através da equação 7. Os experimentos foram realizados em quadruplicata e os resultados analisados por meio de média e desvio padrão.

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\text{Absorbância}_a}{\text{Absorbância}_c} \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

Onde: Absorbância_a representa a absorbância da amostra. Absorbância_c a absorbância do controle positivo de células.

3.3.13 Análise estatística

As análises estatísticas dos resultados obtidos na eficiência de encapsulação e liberação *in vitro* foram realizadas utilizando teste t para variáveis independentes e a estabilidade teste t para variáveis dependentes. Os dados obtidos na determinação do tamanho, índice de polidispersão, na avaliação da citotoxicidade em hemácias e em células da linhagem B16-F10, foram avaliados utilizando ANOVA de uma via, com 95% de confiança e pós-teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes com $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE para quantificação de curcumina e CTAM simultaneamente

Apesar de existirem métodos por CLAE para quantificação de curcumina e CTAM, nenhum método que quantificasse esses dois compostos ao mesmo tempo foi encontrado (KOJIMA et al., 2007; KAPSE et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2012; MOORTHY et al., 2013; SYED et al., 2015). Dessa forma, para a análise da eficiência de encapsulação das nanopartículas, foi necessário desenvolver e validar uma metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência equipada com detector de Arranjo de Fotodiodo (PDA), para a quantificação de curcumina e CTAM simultaneamente. A quantificação dessas drogas por um mesmo método é vantajosa, utilizando o mesmo método pode-se economizar tempo, pois a leitura das amostras ocorre simultaneamente. Além disso, a estabilização da pressão do sistema frente à fase móvel, a limpeza da coluna e o preparo das amostras para a leitura é feito apenas uma vez, fazendo com que ocorra economia de solventes, tempo e materiais.

4.1.1 Parâmetros cromatográficos

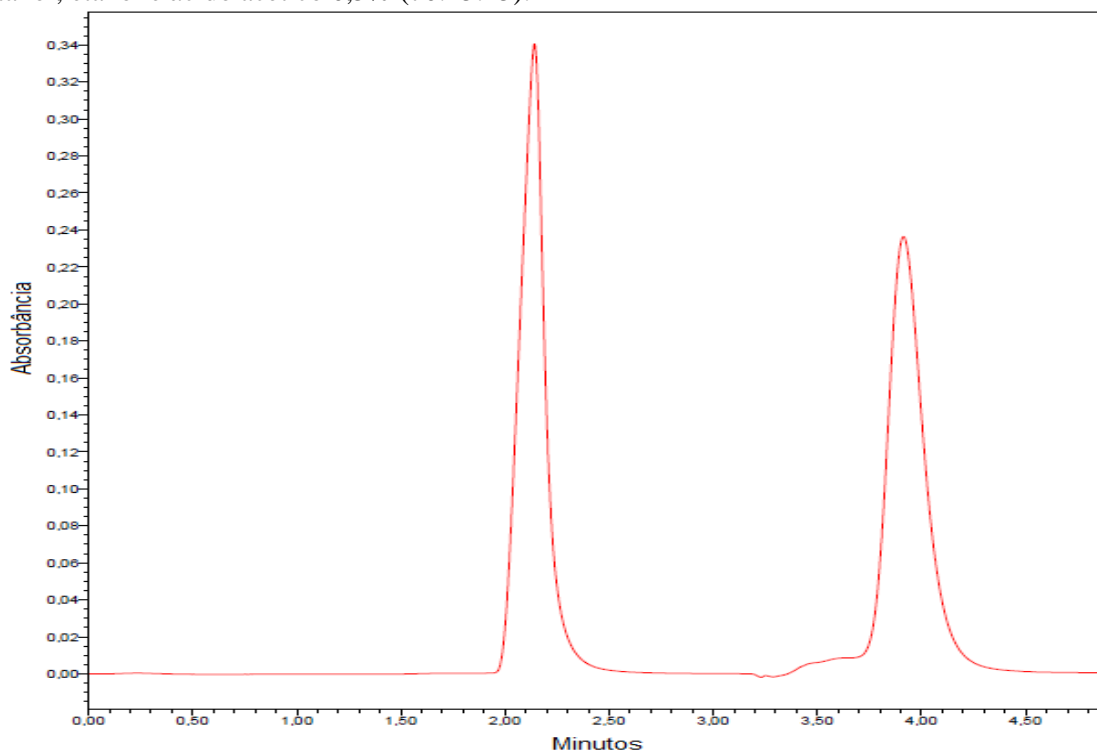
As condições cromatográficas foram definidas por meio de testes, buscando os parâmetros que apresentassem os melhores cromatogramas com picos finos e simétricos para a curcumina e para o CTAM. Além disso, o pico deveria ser específico para cada droga, para que a curcumina e o CTAM não interferissem na análise um do outro. Os parâmetros cromatográficos encontrados que atenderam esses critérios estão descritos na Tabela 1. Para as análises foi padronizado que as amostras seriam diluídas em uma solução de metanol e água na proporção de 85:15.

O comprimento de onda para detecção por PDA da curcumina e CTAM foi encontrado fazendo uma varredura. Com isso foi possível encontrar o melhor comprimento de onda para a análise do CTAM, que foi em 240 nm. O cromatograma obtido nesse comprimento de onda nas condições cromatográficas citadas na Tabela 1 está representado na Figura 5. Nele podemos observar um pico em 2,1 min relacionado ao CTAM (20 mg/mL) e em 3,9 min relacionado a curcumina (20 mg/mL), porém esse comprimento de onda foi utilizado apenas para a quantificação do CTAM.

Tabela 1 - Parâmetros cromatográficos utilizados para a quantificação de curcumina e citrato de tamoxifeno por CLAE.

Parâmetros cromatográficos	
Coluna	C18 (25 cm X 4 mm) 5 μ m
Deteção curcumina	$\lambda = 417$ nm
Deteção tamoxifeno	$\lambda = 240$ nm
Fluxo	0,8 mL/min
Fase móvel	Metanol:etanol:ácido acético 0,5% (70:15:15)
Volume de injeção	60 μ L
Temperatura da coluna	25 °C
Temperatura da amostra	20 °C

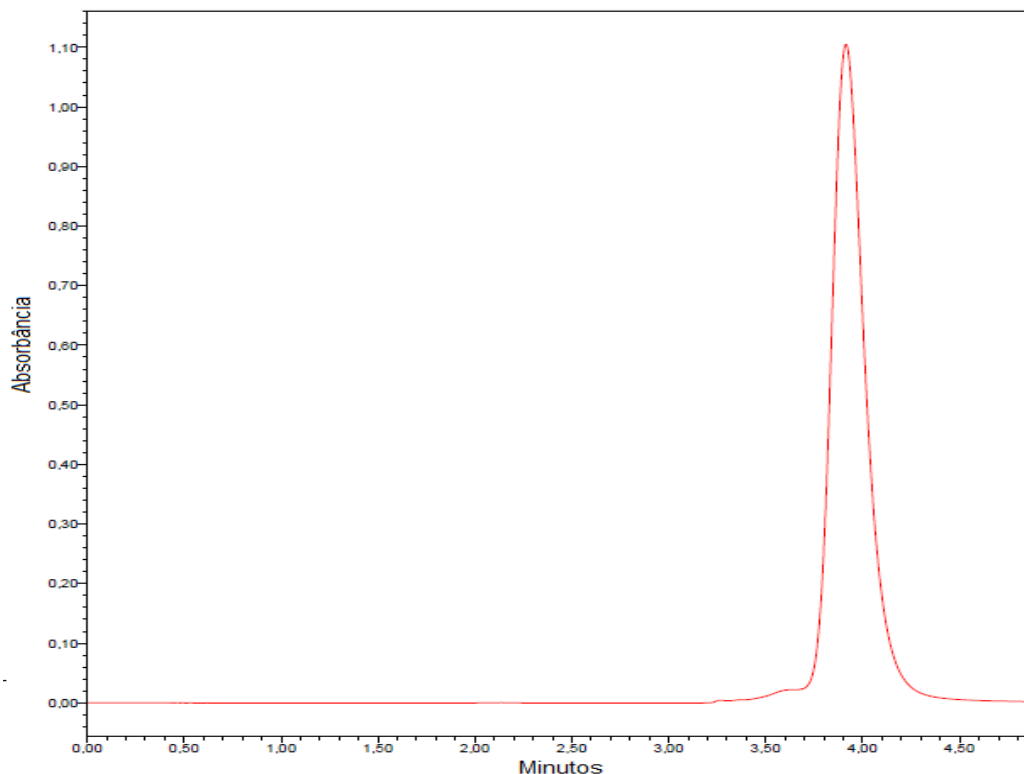
Figura 5 - Cromatograma de uma solução padrão contendo 20 μ g/mL de CTAM e 20 μ g/mL de curcumina no comprimento de onda utilizado para detecção do CTAM (240 nm). Fase móvel: metanol, etanol e ácido acético 0,5% (70:15:15).



A varredura por PDA também foi realizada para encontrar o melhor comprimento de onda para detecção da curcumina, que foi em 417 nm (Figura 6). Nesse comprimento de onda a curcumina apresentou um pico mais simétrico e com maior absorbância em relação ao pico encontrado em 240 nm. Por isso as análises da curcumina foram realizadas em 417 nm. O tempo

de retenção da curcumina foi de 3,9 min com um tempo total de corrida de 4,9 min. Nenhum pico relacionado ao tamoxifeno foi encontrado nesse comprimento de onda.

Figura 6 – Cromatograma de uma solução padrão de 20 µg/mL de CTAM e 20 µg/mL de curcumina no comprimento de onda utilizado para detecção da curcumina (417 nm). Fase móvel: metanol, etanol e ácido acético 0,5% (70:15:15).



4.1.2 Validação do método

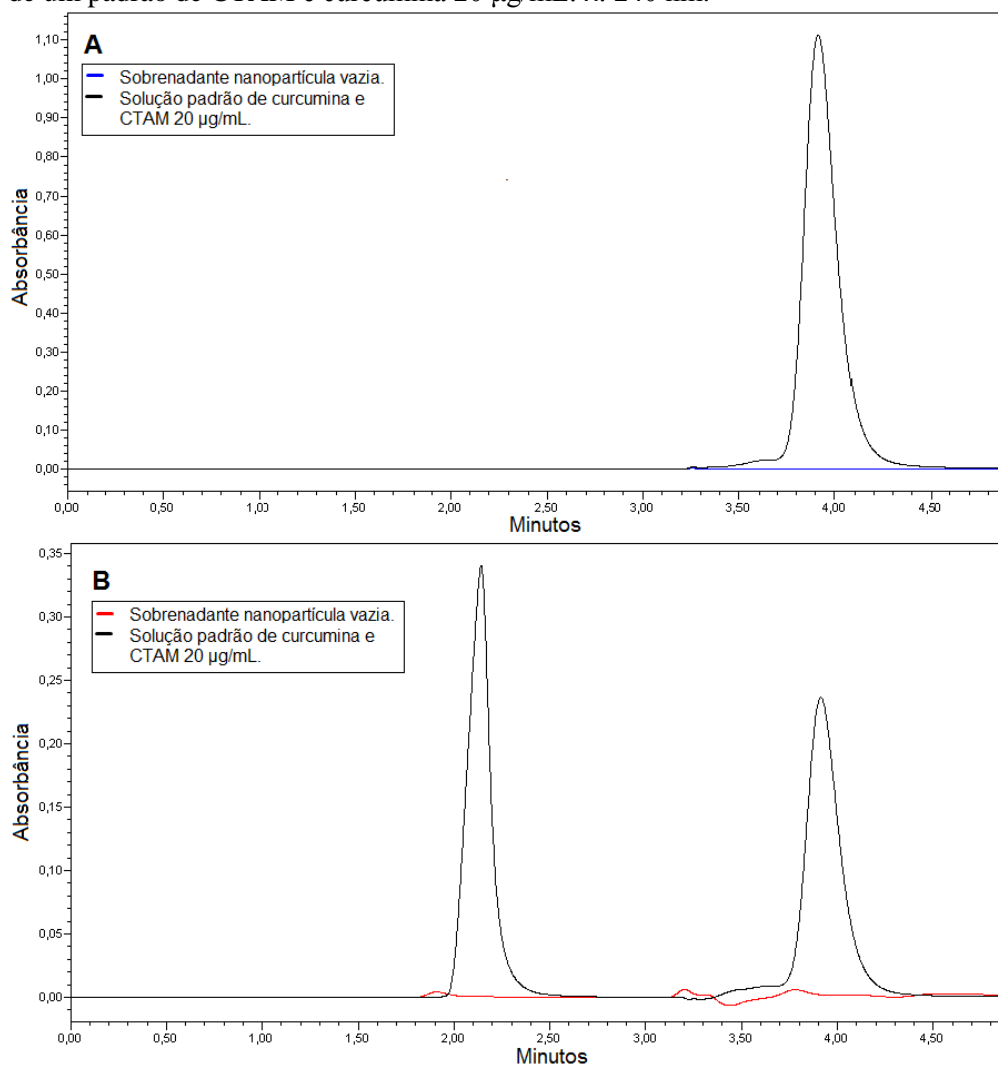
O mesmo método foi utilizado para a detecção do CTAM e da curcumina, mas as análises ocorreram em dois comprimentos de onda diferentes, relacionados a cada composto. A partir dos parâmetros cromatográficos encontrados foi possível dar início a validação da metodologia, para assim verificar se o método atendia as especificações da ANVISA e do ICH (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

4.1.2.1 Especificidade

A especificidade está relacionada à capacidade do método de quantificar o composto em análise mesmo na presença de outros componentes. Os compostos presentes no sobrenadante das nanopartículas ou no meio utilizado para o ensaio de liberação, poderiam

apresentar picos no mesmo tempo de retenção da curcumina ou CTAM, assim podendo comprometer as análises. Para confirmar a especificidade do método, primeiramente foi realizada a leitura do sobrenadante das nanopartículas vazias e de um padrão de CTAM e curcumina (20 µg/mL) em 240 e 417 nm. O cromatograma obtido para a solução padrão foi sobreposto ao cromatograma do sobrenadante das nanopartículas vazias em 417 nm, e estão representados na Figura 7 A. Nessa figura é possível observar que o sobrenadante das nanopartículas vazias não possuía nenhum pico que pudesse prejudicar a análise da curcumina. Da mesma forma na sobreposição com a solução padrão no comprimento de onda de 240 nm (Figura 7 B) não foi encontrado nenhum pico interferente para a análise do CTAM. A solução utilizada no perfil de liberação *in vitro* também foi analisada e não apresentou nenhum pico interferente tanto em 240 quanto em 417 nm.

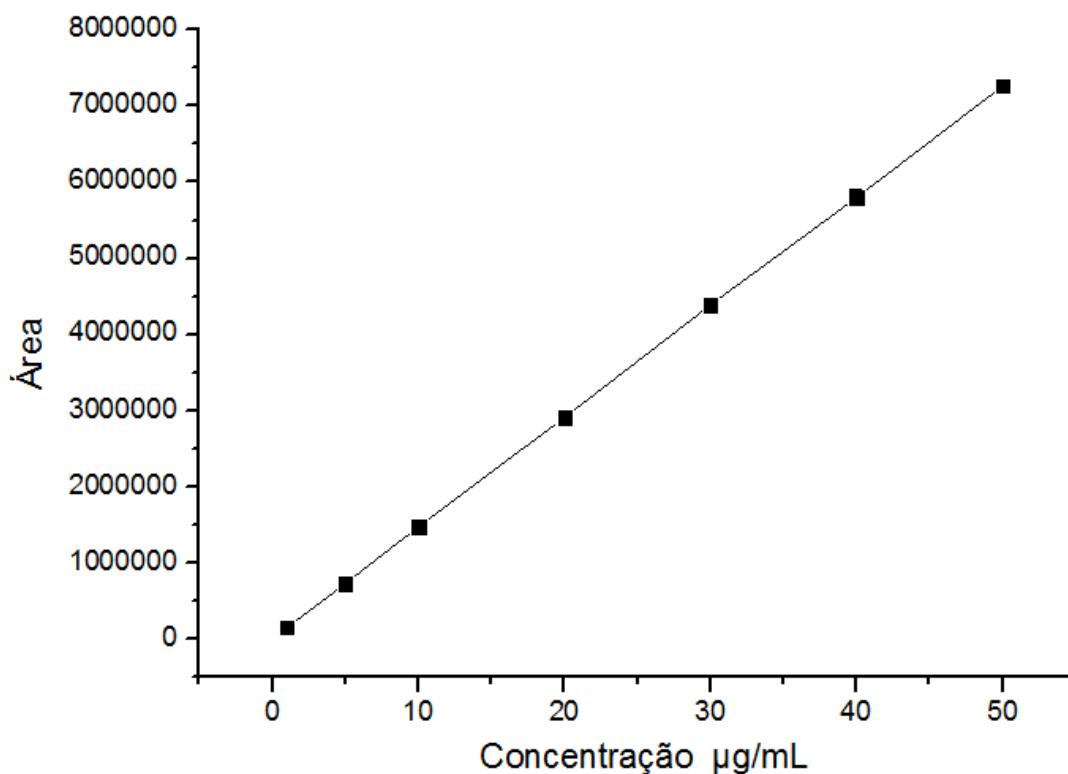
Figura 7 - Cromatograma mostrando a especificidade do método em relação ao sobrenadante das nanopartículas vazias. A: Sobreposição do cromatograma das nanopartículas vazias e de um padrão de CTAM e curcumina 20 µg/mL. λ : 417 nm. B: Sobreposição do cromatograma das nanopartículas vazias e de um padrão de CTAM e curcumina 20 µg/mL. λ : 240 nm.



4.1.2.2 Linearidade

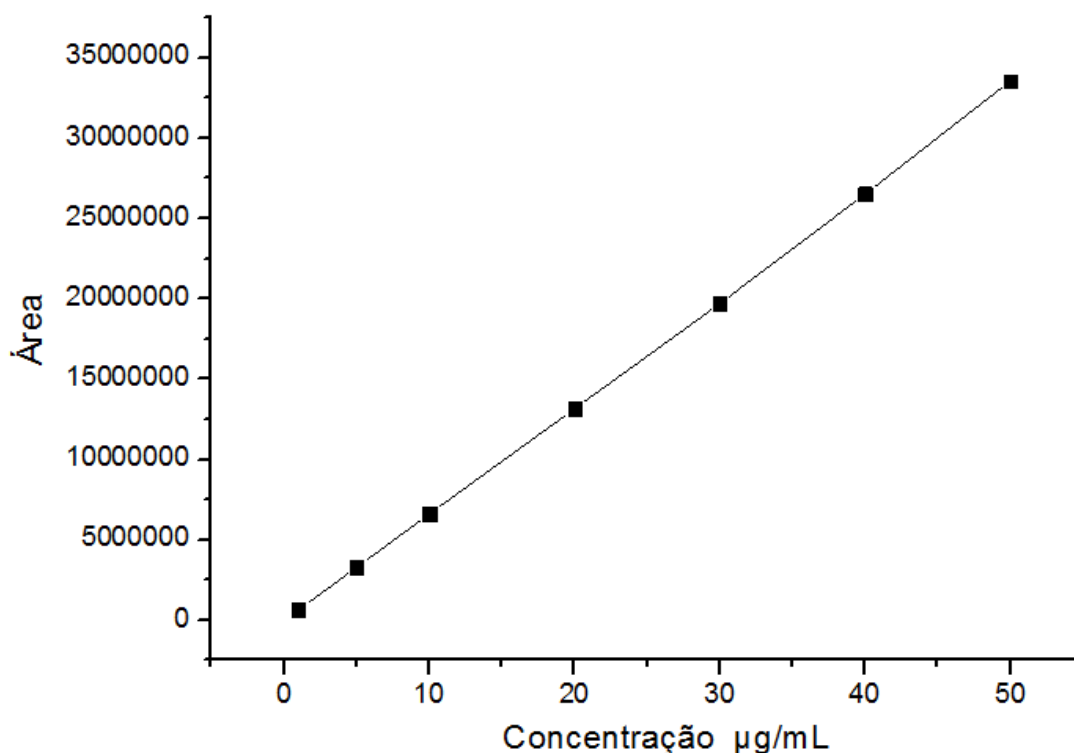
Para avaliar a linearidade do método em relação à curcumina e ao CTAM foram construídas curvas para ambas as drogas, nas seguintes concentrações 1, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 $\mu\text{g/mL}$, em quadruplicata. Para ser considerado linear, segundo a ANVISA, o método deve ter um coeficiente de correlação (r) igual ou superior a 0,99. Na Figura 8 está representada a curva analítica obtida para o CTAM, os resultados obtidos mostram que o método é linear com $r = 0,999$ e equação da reta $y = 145295x + 10727$.

Figura 8 - Curva analítica obtida por CLAE para quantificação de CTAM nas concentrações de 1-50 $\mu\text{g/mL}$. Fase móvel metanol, etanol e ácido acético 0,5% (70:15:15), λ : 240 nm. Equação da reta: $y = 145295x + 10727$ ($r = 0,999$).



A curva analítica obtida para a curcumina (Figura 9) também foi considerada linear com $r = 0,999$, equação da reta $y = 669840x - 38495$.

Figura 9 - Curva analítica obtida por CLAE para quantificação de curcumina nas concentrações de 1-50 µg/mL. Fase móvel metanol, etanol e ácido acético 0,5% (70:15:15), λ: 417 nm. Equação da reta: $y = 669840x - 38495$ ($r = 0,999$).



4.1.2.3 Exatidão

A exatidão relaciona a proximidade do valor obtido com o valor real. A exatidão foi avaliada por meio da porcentagem de recuperação e DPR de três concentrações de curcumina e CTAM. Os resultados estão descritos na Tabela 2 para o CTAM e na Tabela 3 para a curcumina e mostram que o método é exato, pois os dados obtidos apresentam concordância com o valor teórico. A recuperação média das três concentrações de CTAM foi de 99,5% e de 101% para a curcumina, valores muito próximos aos reais. Além disso, o DPR ficou abaixo de 5% que é o preconizado pela ANVISA.

Tabela 2 - DPR e porcentagem de recuperação obtidos pelo teste de exatidão para o CTAM, (n=4).

Padrão de CTAM	Recuperação (%)	DPR (%)
5 µg/mL	98,4	0,445
20 µg/mL	98,7	0,749
50 µg/mL	101	0,264

Tabela 3 - DPR e porcentagem de recuperação obtidos pelo teste de exatidão para a curcumina, (n=4).

Padrão de Curcumina	Recuperação (%)	DPR (%)
5 µg/mL	101	2,82
20 µg/mL	99,9	0,946
50 µg/mL	103	2,01

4.1.2.4 Precisão

A precisão foi avaliada por meio da repetibilidade e da precisão intermediária que estão relacionadas, respectivamente, aos dados obtidos em um curto período de tempo e aos resultados obtidos em dias diferentes. Para avaliar esses parâmetros foram utilizadas três concentrações de curcumina e CTAM em quadruplicata. Os dados obtidos para a repetibilidade estão na Tabela 4 e para precisão intermediária na Tabela 5. O preconizado pela ANVISA para que o método tenha precisão é um desvio padrão relativo menor que 5%, avaliando os resultados foi possível concluir que o método é preciso em relação à repetibilidade e precisão intermediária. Tanto para a curcumina como para o CTAM, nas três concentrações testadas, o desvio padrão relativo foi menor que 5%, sendo que o maior DPR encontrado para a curcumina foi de 2,83% e para o CTAM de 3,62%.

Tabela 4 - Média, desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR) encontrados para a curcumina e para o CTAM no teste de repetibilidade (n=4).

Solução padrão	Curcumina		CTAM	
	Concentração ± DP	DPR (%)	Concentração ± DP	DPR (%)
(µg/mL)	(µg/mL)		(µg/mL)	
Dia 1				
(repetibilidade)				
5	4,80 ± 0,02	0,336	4,92 ± 0,02	0,445
20	19,4 ± 0,2	0,994	19,7 ± 0,1	0,749
50	51,5 ± 0,4	0,761	50,7 ± 0,1	0,264

Tabela 5 - Média, desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR) encontrados para a curcumina e para o CTAM no teste de precisão intermediária (n=4).

Solução padrão ($\mu\text{g/mL}$)	Curcumina		CTAM	
	Concentração \pm DP ($\mu\text{g/mL}$)	DPR (%)	Concentração \pm DP ($\mu\text{g/mL}$)	DPR (%)
Dia 2				
(precisão intermediária)				
5	5,06 \pm 0,14	2,82	4,87 \pm 0,18	3,62
20	20,0 \pm 0,2	0,946	19,5 \pm 0,5	2,65
50	51,6 \pm 1,0	2,01	48,8 \pm 0,3	0,554
Dia 3				
(precisão intermediária)				
5	4,791 \pm 0,072	1,49	4,97 \pm 0,03	0,621
20	19,522 \pm 0,553	2,83	19,4 \pm 0,2	1,14
50	48,1 \pm 0,2	0,516	49,3 \pm 0,2	0,342

4.1.2.5 Robustez

A robustez é a capacidade do método em resistir a pequenas variações, permanecendo constante. Para a análise da robustez o método foi avaliado frente a variações, como alterações no fluxo de 0,8 mL/min para 0,75 mL/min e 0,85 mL/min, na proporção de fase móvel de metanol, etanol e ácido acético 70:15:15 para 75:10:15 e temperatura da coluna de 25 °C para 30 °C e 20 °C. Os resultados foram expressos em porcentagem de recuperação e DPR, sendo descritos na Tabela 6 para o CTAM e Tabela 7 para curcumina.

Tabela 6 - Porcentagem de recuperação e DPR obtidos no teste de robustez para o CTAM (n=4).

Variações do método	Porcentagem de Recuperação \pm DPR		
	5 $\mu\text{g/mL}$	20 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$
Fluxo 0,75 mL/min	102 \pm 0,2	103 \pm 1	104 \pm 1
Fluxo 0,85 mL/min	95,1 \pm 2,6	95,7 \pm 1,2	95,4 \pm 1,5
Fase móvel	100 \pm 3	101 \pm 1	100 \pm 1
Temperatura 20 °C	97,5 \pm 3,7	97,9 \pm 2,4	98,2 \pm 0,6
Temperatura 30 °C	100 \pm 3	101 \pm 1	101 \pm 1

Tabela 7 - Porcentagem de recuperação e DPR obtidos no teste de robustez para a curcumina (n=4).

Variações do método	Porcentagem de Recuperação ± DPR		
	5 µg/mL	20 µg/mL	50 µg/mL
Fluxo 0,75 mL/min	102 ± 0,3	101 ± 1	104 ± 2
Fluxo 0,85 mL/min	96,5 ± 0,6	95,2 ± 2,0	95,7 ± 1,5
Fase móvel	97,3 ± 3,1	98,2 ± 1,4	99,0 ± 1,1
Temperatura 20 °C	102 ± 2	101 ± 1,4	103 ± 1
Temperatura 30 °C	99,3 ± 2,3	98,8 ± 1,1	102 ± 2

Os resultados obtidos mostram que o método foi robusto frente a todas as modificações realizadas, apresentado uma porcentagem de recuperação próxima a 100%, mostrando a conformidade entre os valores teóricos e os obtidos. Também foi encontrado um desvio padrão relativo menor que 5% mostrando que os resultados continuaram precisos mesmo com as variações.

4.1.2.6 Limite de quantificação e limite de detecção

O limite de quantificação está relacionado com a menor quantidade de um composto que pode ser quantificada com precisão e exatidão pelo método desenvolvido. O limite de detecção é a menor quantidade que pode ser detectada, mas que pode apresentar uma quantificação errada (ANVISA, 2003).

Utilizando a curva de calibração com baixas concentrações de curcumina e CTAM (1; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 e 0,1 µg/mL), em triplicata, foi estabelecido o limite de quantificação e o limite de detecção do método. A curva obtida para a curcumina foi linear com valor de $r = 0,999$ e equação da reta $y = 679914x + 11550$ esse resultado pode ser observado na Figura 10. Utilizando a equação 4 foi encontrado o LQ para a curcumina de 0,033 µg/mL e utilizando a equação 3 o LD que foi 0,010 µg/mL.

A curva obtida para o CTAM também foi linear com $r = 0,999$ e equação da reta $y = 175115x - 3813$, esses resultados estão apresentados na Figura 11. O valor do limite de quantificação e de detecção foram calculados, com um LQ de 0,037 µg/mL e LD de 0,011 µg/mL para o CTAM.

Figura 10 - Curva analítica para obtenção do limite de quantificação e de detecção da curcumina, fase móvel metanol, etanol e ácido acético 0,5% (70:15:15), concentrações de 0,1-1,0 µg/mL. λ : 417 nm. Equação da reta: $y = 679914x + 11550$ ($r = 0,999$).

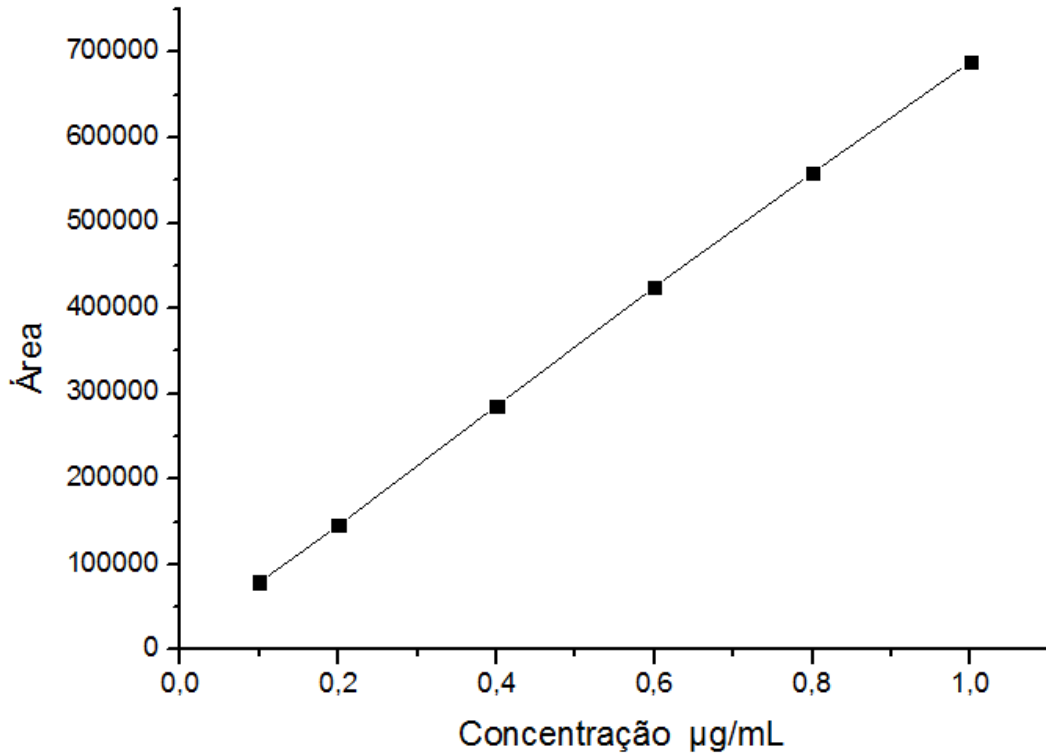
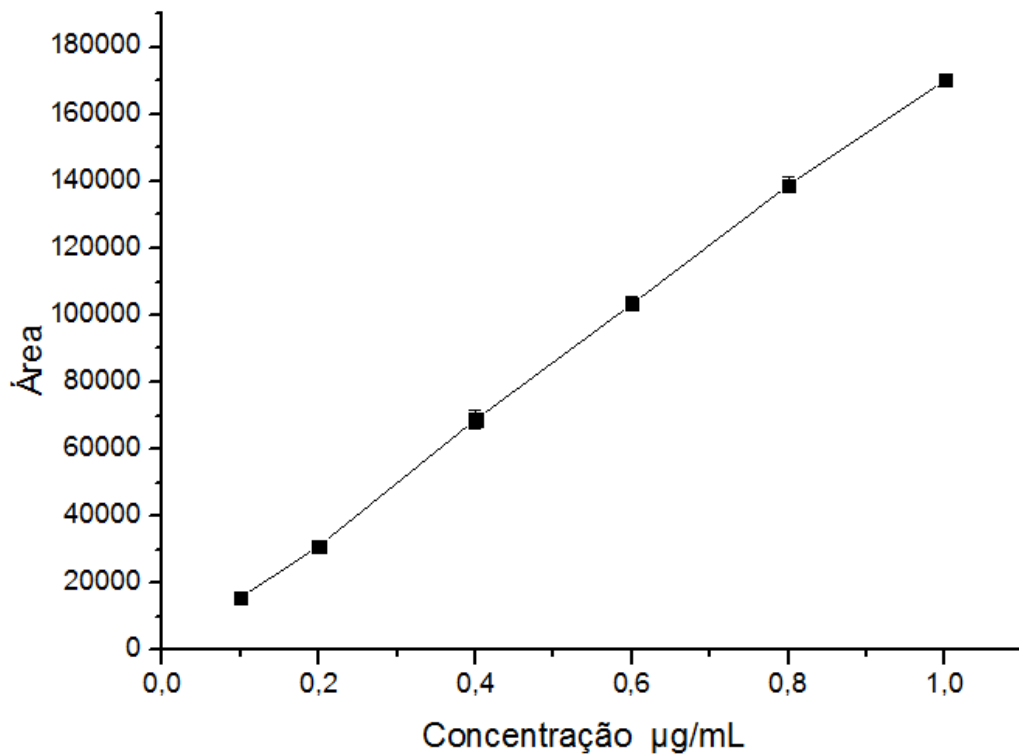


Figura 11 - Curva analítica para obtenção do limite de quantificação e de detecção do CTAM, fase móvel metanol, etanol e ácido acético 0,5% (70:15:15), concentrações de 0,1-1,0 µg/mL. λ : 240 nm. Equação da reta: $y = 175115x - 3813$ ($r = 0,999$).



4.2 Obtenção de nanopartículas de PLA contendo CTAM, curcumina e curcumina-CTAM

Os parâmetros para a obtenção de nanopartículas de PLA contendo CTAM e curcumina foram encontrados tendo como base outros estudos que desenvolveram nanopartículas semelhantes. Como o trabalho de Jain et al. (2011) que produziram nanopartículas de PLA contendo tamoxifeno pelo método de emulsão-difusão evaporação do solvente (O/A) e encontraram menor tamanho e polidispersão para as nanopartículas obtidas por sonicação, em comparação com as obtidas por homogeneização (10000 rpm e 15000 rpm). Altmeyer et al. (2014) desenvolveram nanopartículas de PLA contendo CTAM testando os tensoativos PVA, polissorbato 80 e poloxamer 188. As melhores características físico-químicas das nanopartículas foram encontradas utilizando o PVA como tensoativo. O PVA também resultou em melhores características físico-químicas quando comparado com o brometo de didodecildimetilamônio e Pluronic F-68 em nanopartículas de PLA contendo tamoxifeno (JAIN et al., 2011). Além disso, Khalil et al. (2012) demonstraram uma eficiência de encapsulação de 81% e tamanho de 162 nm para nanopartículas de PLGA contendo curcumina, obtidas pelo método de emulsificação-*evaporação do solvente (O/A)* utilizando o PVA.

Com base nesses estudos foram escolhidos os parâmetros da formulação que apresentaram os melhores resultados. Neste trabalho as nanopartículas de PLA contendo CTAM, curcumina e curcumina-CTAM foram obtidas com sucesso pelo método de emulsificação-*evaporação do solvente (O/A)*, por meio da sonicação e utilizando o PVA 0,5% como tensoativo.

4.3 Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersão por espectroscopia de correlação de fótons

O tamanho e o índice de polidispersão podem influenciar a capacidade das nanopartículas de interagir com a membrana celular e sua penetração através das barreiras biológicas. Quanto mais alto for o índice de polidispersão maior será a diferença de tamanho das nanopartículas, podendo tornar os parâmetros farmacocinéticos irregulares, afetando a eficiência terapêutica da formulação (MÜLLER, 1991; BRANNON-PEPPAS; BLANCHETTE, 2004). Partículas em torno de 150 nm são distribuídas de maneira mais eficiente em tumores do que as maiores e são menos fagocitadas pelos macrófagos. O sistema

imunológico tem maior dificuldade para reconhecer essas partículas. Enquanto que em células não fagocitárias partículas menores são mais absorvidas do que as maiores, o tamanho também afeta a estabilidade física e a liberação (FENG, 2004; He et al., 2010).

Todas as nanopartículas obtidas nesse estudo foram analisadas em relação ao diâmetro médio utilizando a espectroscopia de correlação de fótons. Essa técnica é baseada na dispersão da luz causada pelos movimentos brownianos das partículas (GAUMET et al., 2008). Os resultados ficaram próximos a 190 nm e podem ser observados na Tabela 8. Não ocorreram diferenças estatísticas significantes em relação ao tamanho das nanopartículas de curcumina, CTAM ou curcumina-CTAM. Outros estudos encontraram resultados semelhantes, com tamanho de 224 nm para nanopartículas de PLA contendo tamoxifeno, obtidas pelo método de nanoprecipitação. Tamanho próximo a 200 nm para nanopartículas de PLA contendo Fe₃O₄ e tamoxifeno e 200 nm para nanopartículas de PLA contendo curcumina obtidas pelo método de emulsificação-evaporação do solvente por sonicação (HU; NEOH; KANG, 2006; PANDEY et al., 2015; SILVA-BUZANELLO et al., 2015).

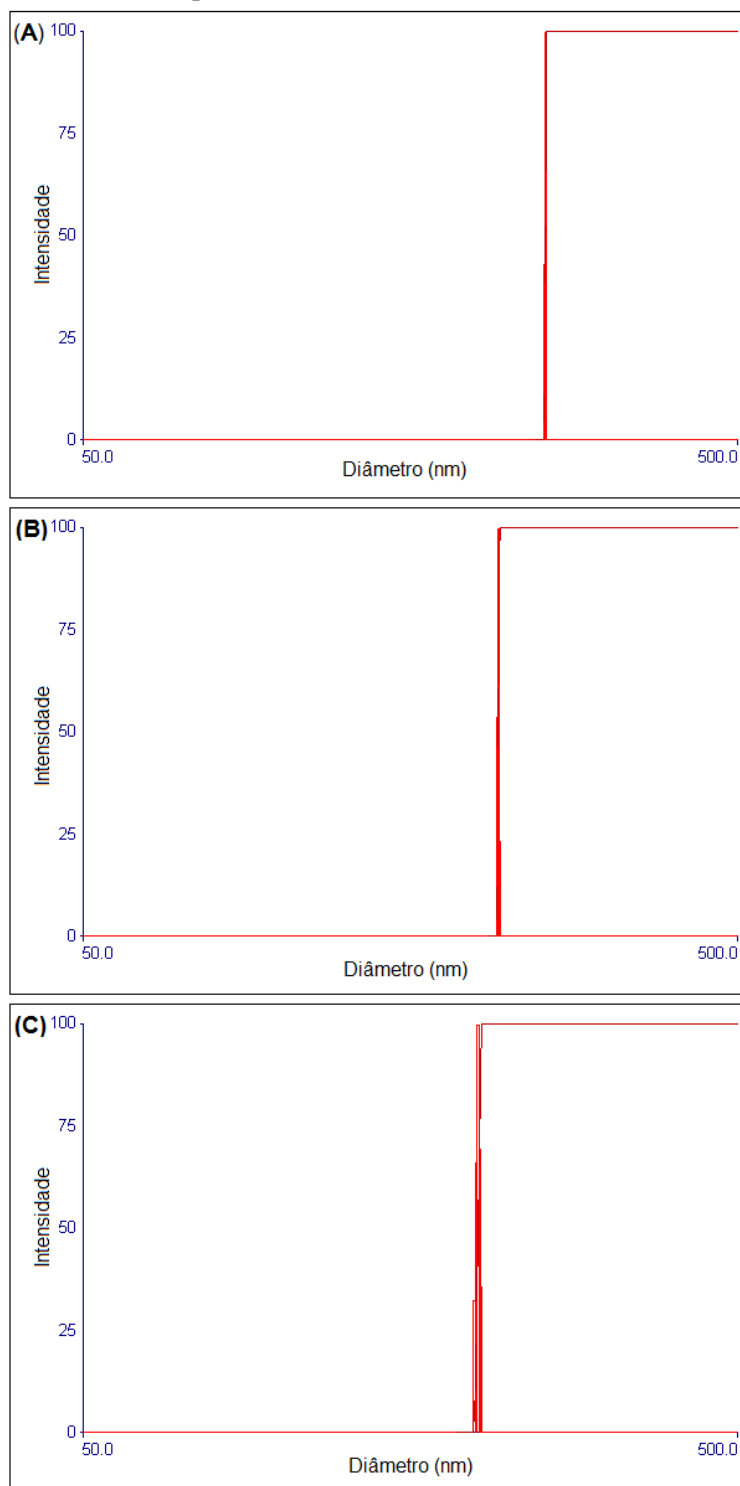
Tabela 8 – Diâmetro médio e índice de polidispersão, obtidos por espectroscopia de correlação de fótons, para as nanopartículas de CTAM, curcumina e curcumina-CTAM (n=5).

	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão
	Média ± desvio padrão	Média ± desvio padrão
Nanopartículas de CTAM	189 ± 9 ^a	0,091 ± 0,018 ^b
Nanopartícula de curcumina	189 ± 3 ^a	0,097 ± 0,028 ^b
Nanopartículas de CTAM e curcumina	187 ± 4 ^a	0,104 ± 0,014 ^b

Letras diferentes na mesma coluna significam diferença estatística ($p < 0,05$).

Outro parâmetro analisado foi o índice de polidispersão, em uma escala de 0 a 1, um índice de polidispersão menor que 0,1 pode ser associado a uma grande homogeneidade das nanopartículas, enquanto um valor elevado está associado com uma ampla distribuição de tamanho (GAUMET et al., 2008). Os resultados encontrados para as nanopartículas de CTAM, curcumina e curcumina-CTAM mostram a homogeneidade de tamanho dessas nanopartículas, com um índice de polidispersão próximo a 0,100 (Tabela 8). Além disso, as nanopartículas apresentaram um perfil de distribuição monomodal (Figura 12), ou seja, com uma distribuição simétrica centrada perto de 190 nm, esse perfil de distribuição também está relacionado à homogeneidade de tamanho das nanopartículas.

Figura 12 - Perfil de distribuição de tamanho, (A) nanopartículas de curcumina-CTAM, (B) nanopartículas de CTAM, (C) nanopartículas de curcumina.

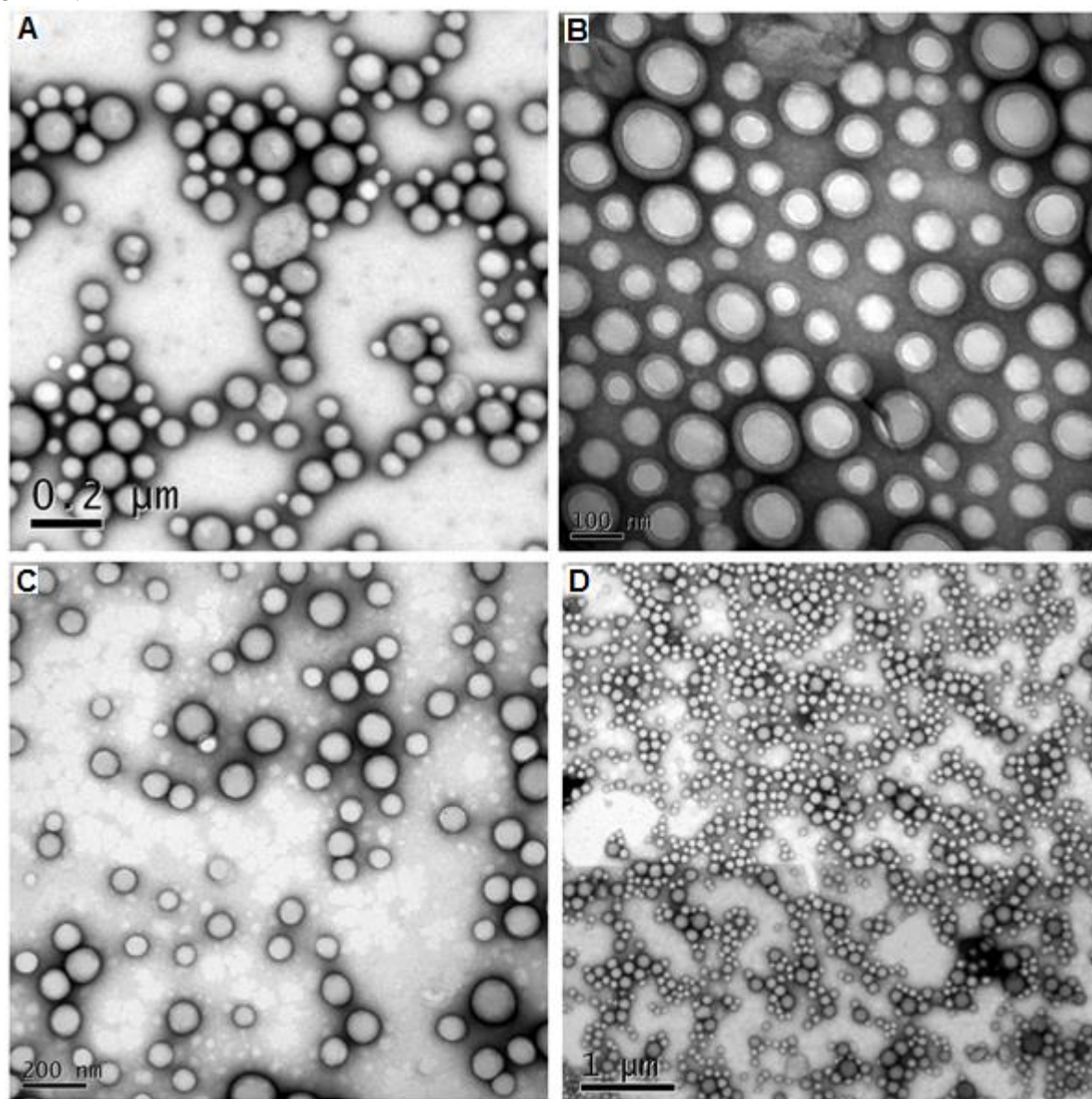


4.4 Análise por microscopia eletrônica de transmissão

As nanopartículas foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão. Essa técnica é complementar à espectroscopia de correlação de fótons e também mostra o tamanho

das partículas, além de fornecer informações relacionadas à morfologia das nanopartículas. Os resultados obtidos com essa técnica estão apresentados na Figura 13 que mostra as imagens obtidas para as nanopartículas de CTAM, curcumina e curcumina-CTAM. Nessas imagens foi possível observar que todas as nanopartículas analisadas apresentaram formato esférico, com tamanho próximo a 100 nm. O tamanho encontrado pela microscopia foi semelhante ao obtido pela espectroscopia de correlação de fótons, levando em consideração que essas técnicas possuem princípios diferentes.

Figura 13 - Imagens das nanopartículas obtidas por microscopia eletrônica de transmissão, (A) nanopartículas de curcumina, (B) nanopartículas de CTAM, (C) e (D) nanopartículas de curcumina-CTAM.



4.5 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação foi medida pelo método indireto conforme descrito anteriormente no item 3.3.5. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 9 e foram de aproximadamente 57% para o CTAM e 92% para a curcumina. Com essa análise é possível observar uma alta eficiência de encapsulação para a curcumina e uma eficiência menor para o CTAM. Além disso, não ocorreram diferenças na eficiência de encapsulação do CTAM e da curcumina quando encapsulados sozinhos ou juntos em uma mesma nanopartícula. Como o método utilizado é mais adequado para substâncias hidrofóbicas, a menor eficiência de encapsulação encontrada para o CTAM pode ter ocorrido por ele ser mais hidrofílico quando comparado a curcumina.

Tabela 9- Eficiência de encapsulação para as nanopartículas de curcumina, CTAM e curcumina-CTAM, resultados expressos em média \pm DP (n=5).

Tipo de nanopartícula	Eficiência de encapsulação (%)	
	Curcumina	CTAM
Nanopartículas de curcumina	93,0 \pm 2,7 ^a	–
Nanopartículas de CTAM	–	55,4 \pm 4,8 ^b
Nanopartículas de curcumina-CTAM	91,4 \pm 2,0 ^a	58,2 \pm 5,3 ^b

Letras diferentes na mesma coluna significam diferença estatística ($p < 0,05$).

4.6 Potencial zeta

O potencial zeta está relacionado à carga superficial das partículas, resultante da dissociação de grupos funcionais da superfície da partícula ou da adsorção de íons presentes no meio dispersante. Esse é um parâmetro importante que pode influenciar a atividade biológica, a interação com as membranas celulares e a estabilidade dos sistemas nanoestruturados (YALLAPU et al., 2010; VIEIRA; REDIGUIERI; REDIGUIERI, 2013). De modo geral, valores de potencial zeta próximos de -25 mV, ou mais afastados de zero, permitem prever uma boa estabilidade para as nanopartículas, evitando a agregação devido à repulsão eletrostática, enquanto valores mais próximos de zero estão relacionados a uma maior instabilidade (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Neste trabalho, foi analisado o potencial zeta das nanopartículas e dos compostos na forma livre, os dados obtidos estão expressos na Tabela 10. As nanopartículas vazias

apresentaram um potencial zeta de -15 mV, esse resultado negativo está possivelmente relacionado aos grupos carboxílicos presentes nas extremidades da cadeia do PLA (HU; NEOH; KANG, 2006; DAYYOUB et al., 2013). As nanopartículas contendo curcumina apresentaram um potencial zeta de -26 mV. Esse potencial mais negativo em relação às nanopartículas vazias pode estar associado à curcumina adsorvida na superfície das nanopartículas, pelo fato de que a curcumina na forma livre apresentou um potencial zeta de -30 mV. No caso das nanopartículas de curcumina-CTAM e de CTAM, elas apresentaram potencial zeta de -17 mV e -16 mV, respectivamente. Esse valor mais próximo de zero quando comparado com as nanopartículas de curcumina pode ser explicado pela interferência do potencial positivo do CTAM (26 mV) que provavelmente ficou adsorvido na superfície da nanopartícula.

Tabela 10 - Análise do potencial zeta das nanopartículas de CTAM, curcumina e curcumina-CTAM, além das nanopartículas vazias e das drogas na forma livre, expressos em média \pm DP (n=3).

Formulação	Potencial Zeta (mV)
Nanopartículas de CTAM	-16 ± 1^a
Nanopartículas de curcumina	-26 ± 1^b
Nanopartículas de CTAM e curcumina	-17 ± 3^a
Nanopartículas vazias	$-15 \pm 0,6^a$
Curcumina livre	-30 ± 2^b
CTAM livre	$26 \pm 0,7^c$

Letras diferentes na mesma coluna significam diferença estatística ($p < 0,05$).

Hu, Neoh e Kang (2006) encontraram um potencial zeta semelhante aos desse estudo de -13 mV para nanopartículas de PLA contendo Fe_3O_4 e tamoxifeno. Outros estudos também relataram a mudança de potencial zeta da nanopartícula vazia, ocasionada pela encapsulação de curcumina ou tamoxifeno. Nanopartículas vazias de PLGA apresentaram um potencial de -18 mV, esse potencial diminuiu para -23 mV nas nanopartículas de PLGA contendo curcumina (CHEREDDY et al., 2013). O potencial zeta das nanopartículas de tamoxifeno foi maior em relação às nanopartículas vazias, esse resultado também foi associado ao tamoxifeno presente na superfície da nanopartícula (CHAWLA; AMIJI, 2002; SHENOY; AMIJI, 2005; HU; NEOH; KANG, 2006).

4.7 Estabilidade

A estabilidade foi observada analisando o tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas de curcumina, CTAM e curcumina-CTAM armazenadas em temperatura ambiente, 5 e -15 °C durante 90 dias. Na análise do tamanho as nanopartículas de curcumina-CTAM apresentaram inicialmente um tamanho médio de 186 nm que em 90 dias passou para 190, 185 e 200, para as nanopartículas armazenadas em temperatura ambiente, 5 e -15 °C, respectivamente (Figura 14 A). As nanopartículas de CTAM apresentaram um tamanho inicial de 193 nm e em 90 dias 192, 189 e 182 nm em temperatura ambiente, 5 e -15 °C, respectivamente (Figura 14 B). No caso das nanopartículas de curcumina o tamanho inicial de 194 foi para 198, 189 e 230 em temperatura ambiente, 5 e -15 °C, respectivamente, após 90 dias (Figura 14 C). Com a análise estatística desses resultados foi possível constatar que não ocorreram alterações de tamanho em relação ao inicial, para as nanopartículas de CTAM, curcumina e curcumina-CTAM.

Os resultados das análises do índice de polidispersão estão na Figura 15 com índice de polidispersão inicial de 0,120 para as nanopartículas de curcumina-CTAM, 0,092 para as nanopartículas de tamoxifeno e 0,094 para as nanopartículas de curcumina. A análise estatística dos resultados obtidos após 90 dias mostrou que as nanopartículas de curcumina, CTAM e curcumina-CTAM, armazenadas em temperatura ambiente, -15 °C e 5 °C não apresentaram diferenças estatística significativas em relação ao índice de polidispersão obtido inicialmente.

O potencial zeta também foi analisado e os resultados estão na Figura 16, inicialmente o potencial zeta foi de -17, -16 e -26 mV para as nanopartículas de curcumina-CTAM, CTAM e curcumina, respectivamente. Com a análise estatística foi possível constatar que não ocorreram diferenças estatísticas significantes após 90 dias, tanto para as nanopartículas de curcumina-CTAM como para as nanopartículas de CTAM e curcumina nas diferentes formas de armazenamento.

A partir desses dados foi possível observar que todas as nanopartículas analisadas mantiveram-se estáveis em relação ao tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta, após o período de 90 dias, quando armazenadas em temperatura ambiente -15 °C e 5 °C. Dessa forma, essas nanopartículas podem ser armazenadas em qualquer uma dessas condições por 90 dias sem que ocorram alterações desses parâmetros analisados.

Figura 14 – Variação de tamanho das nanopartículas em função da temperatura de armazenamento e do tempo para as nanopartículas de curcumina-CTAM (A), nanopartículas de CTAM (B) e nanopartículas de curcumina (C). Resultados expressos em média e desvio padrão n = 3.

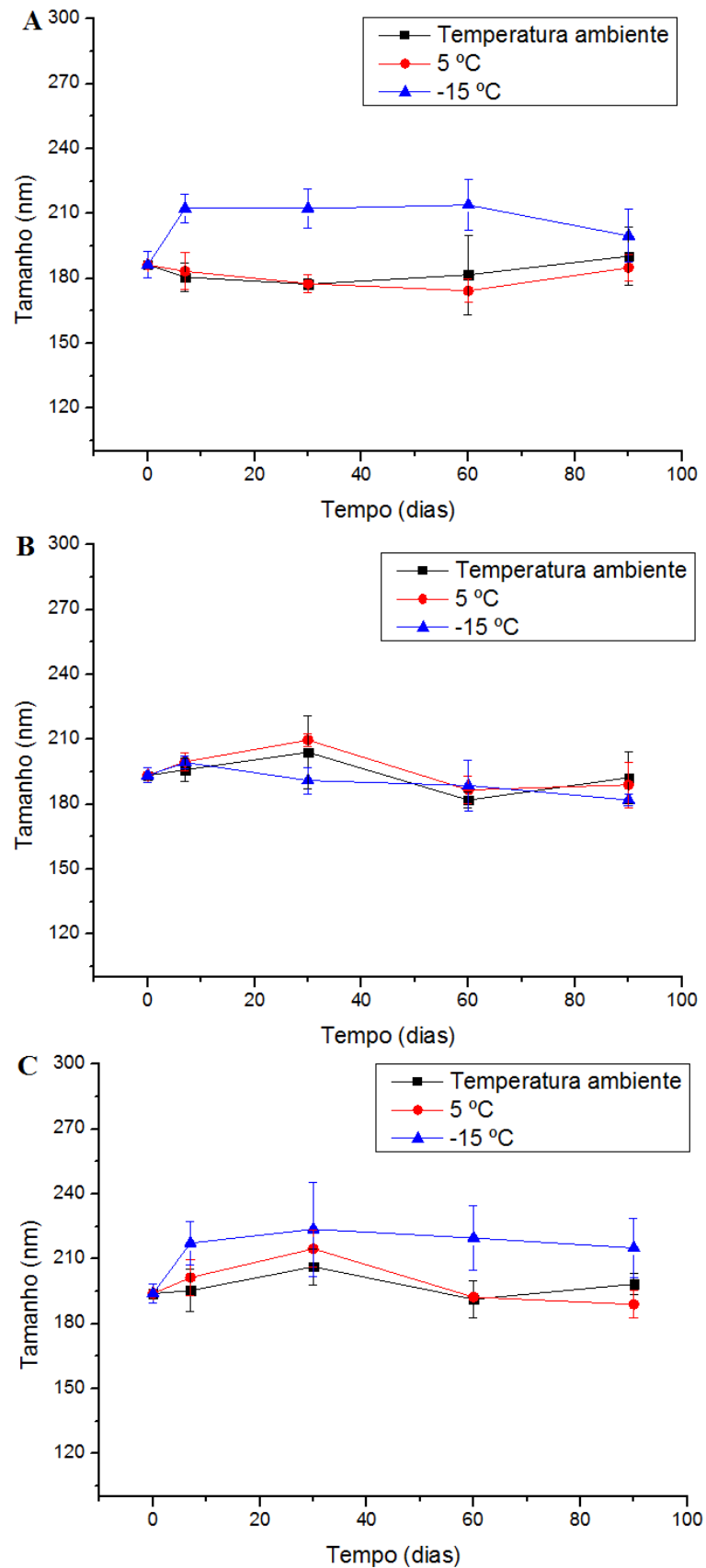


Figura 15 – Variação do índice de polidispersão das nanopartículas em função da temperatura de armazenamento e do tempo para as nanopartículas de curcumina-CTAM (A), nanopartículas de CTAM (B) e nanopartículas de curcumina (C). Resultados expressos em média e desvio padrão n = 3.

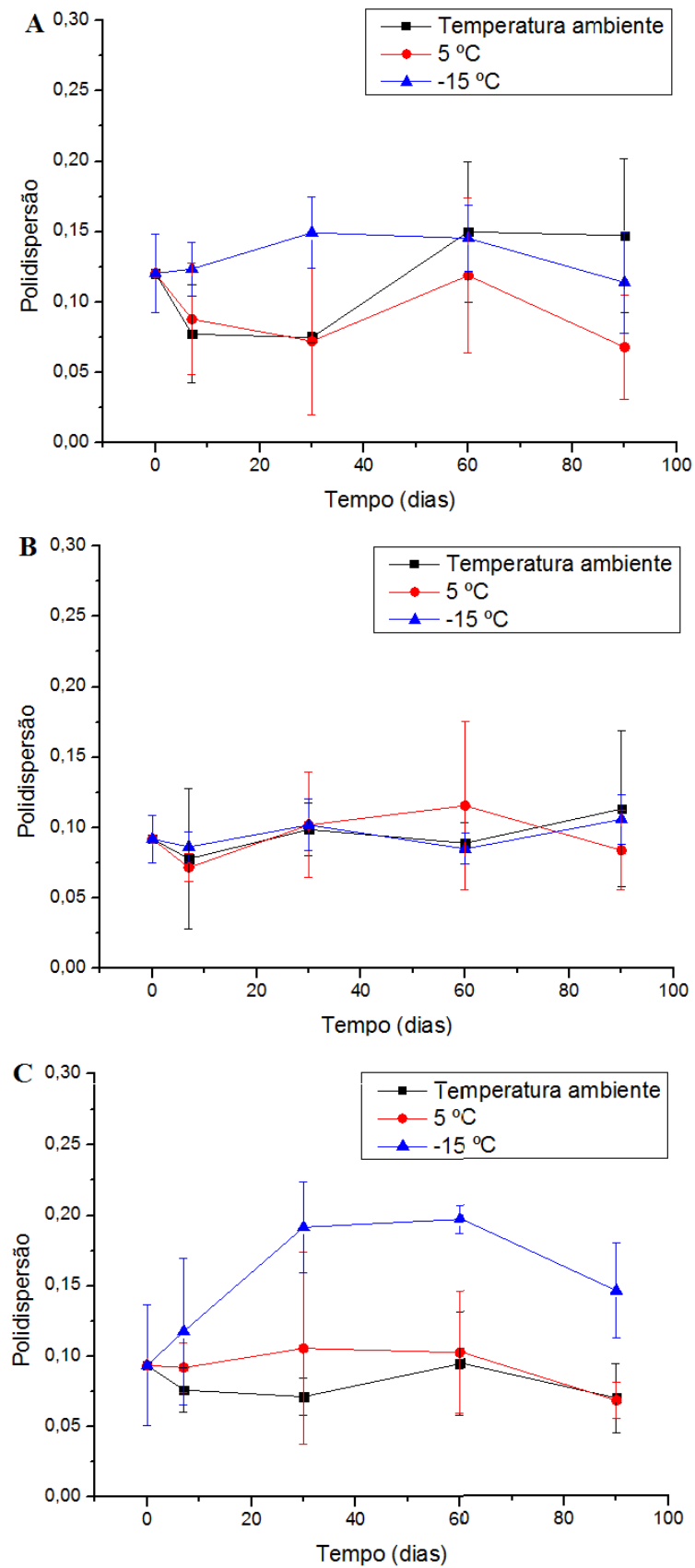
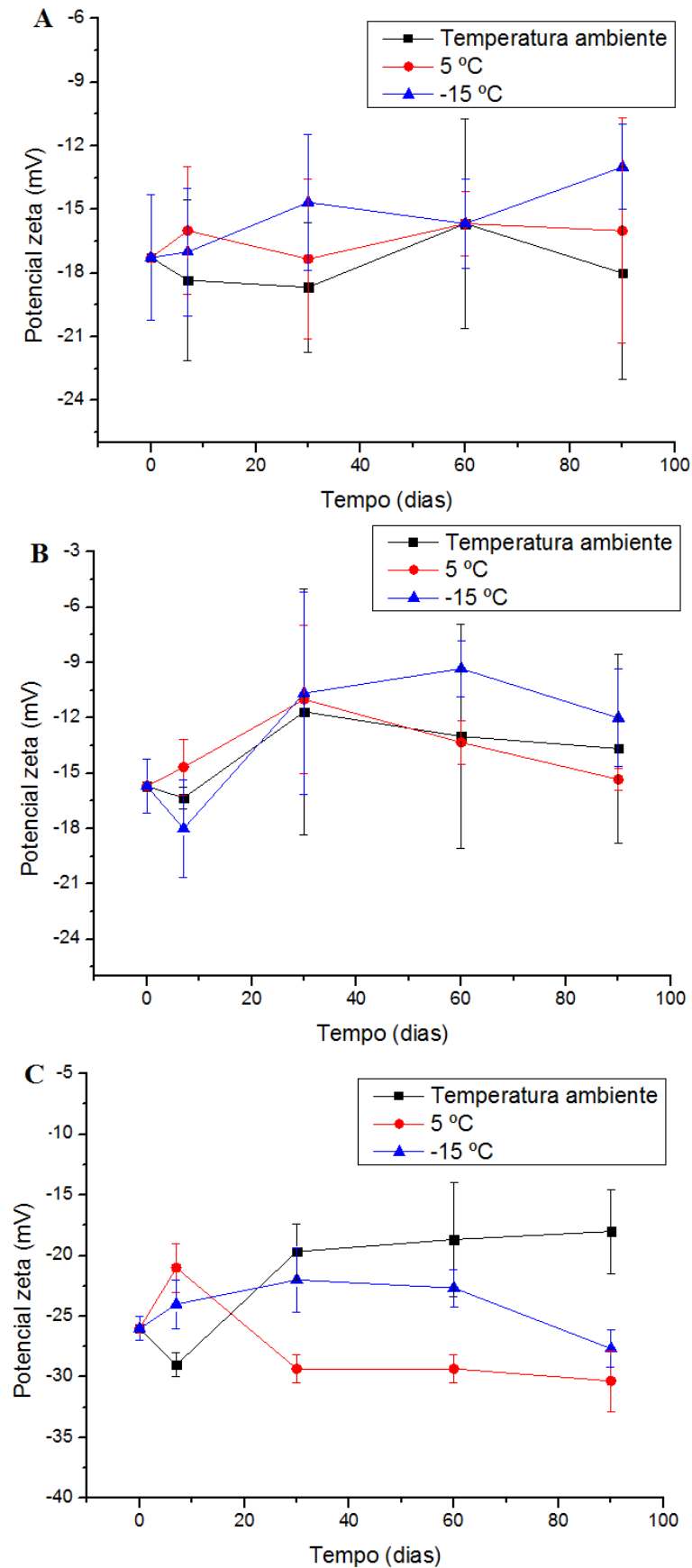


Figura 16 - Variação do potencial zeta das nanopartículas em função da temperatura de armazenamento e do tempo para as nanopartículas de curcumina-CTAM (A), nanopartículas de CTAM (B) e nanopartículas de curcumina (C). Resultados expressos por média e desvio padrão $n = 3$.

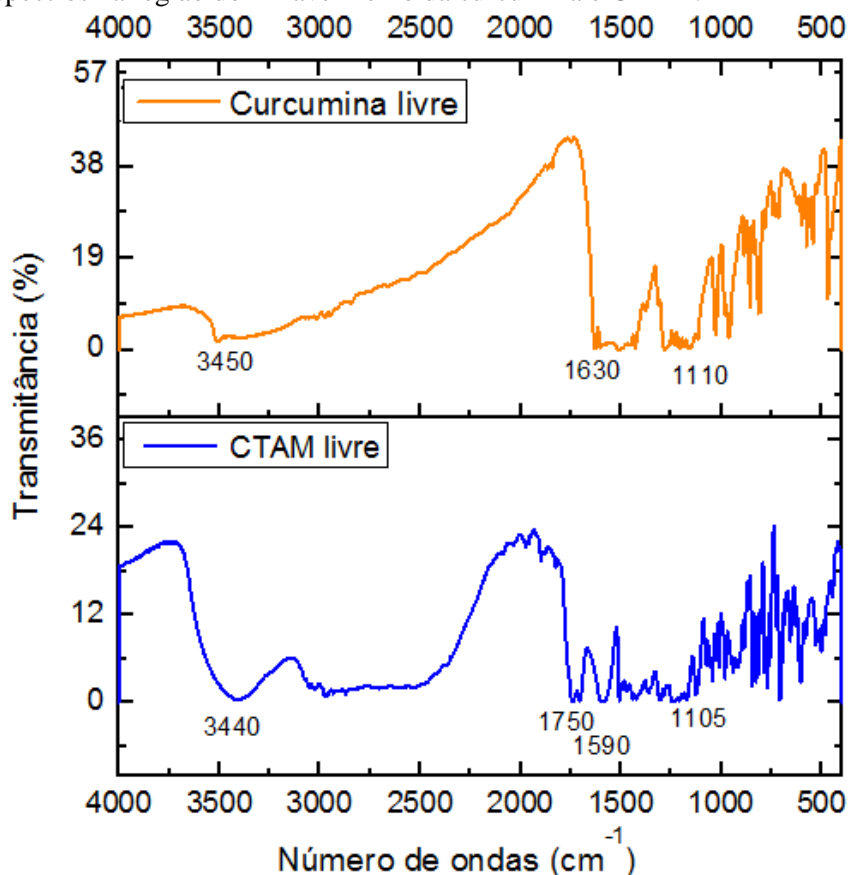


4.8 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

Por meio da espectroscopia de absorção na região do infravermelho é possível identificar os principais grupos funcionais das substâncias. Analisando o CTAM e a curcumina na forma isolada e em nanopartículas, foi possível verificar a presença ou não de interações entre as drogas e o polímero que alterassem suas estruturas. As bandas de absorção obtidas foram identificadas com base em Silverstein, Webster e Kiemle (2006).

A Figura 17 apresenta os espectros do infravermelho encontrados para a curcumina e CTAM na forma livre. No espectro da curcumina pode-se observar a presença de bandas de absorção características dessa substância, como a banda em 3450 cm^{-1} referente à deformação axial de O-H e em 1630 cm^{-1} deformação axial C=O da cetona. A banda que aparece em 1110 cm^{-1} está relacionada à deformação axial assimétrica de C-O-C.

Figura 17 - Espectros na região do infravermelho da curcumina e CTAM.

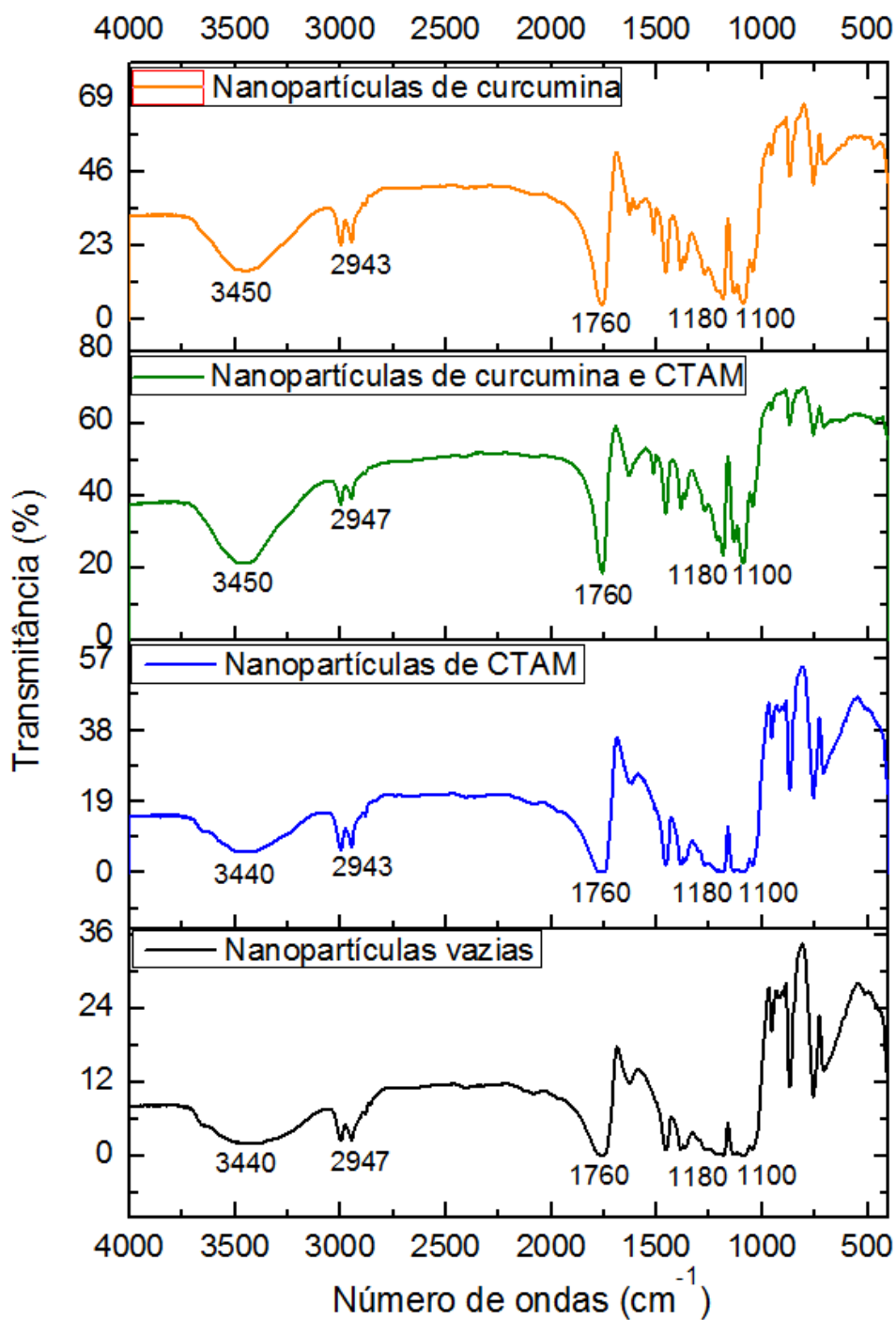


O espectro do CTAM na forma livre (Figura 17) apresentou uma banda em 3440 cm^{-1} e outra em 1750 cm^{-1} referentes, respectivamente, a deformação axial de O-H e a deformação axial de C=O do ácido carboxílico, os dois presentes no citrato. A banda encontrada para o

CTAM em 1590 cm^{-1} está relacionada à deformação axial de C=C do anel aromático. A banda em 1105 cm^{-1} corresponde à deformação axial assimétrica C-O-C e da ligação C-N da amina.

Na Figura 18 estão representados os espectros obtidos para as nanopartículas de curcumina, curcumina-CTAM, CTAM e vazias.

Figura 18- Espectros na região do infravermelho das nanopartículas de curcumina, nanopartículas de curcumina-CTAM, nanopartículas de CTAM e nanopartículas vazias.



Na análise das nanopartículas vazias foi possível observar as principais bandas características do PLA, a banda em 3440 cm^{-1} está relacionada à deformação axial de O-H, em 2947 cm^{-1} à deformação axial de C-H, em 1760 cm^{-1} é referente ao C=O do éster e em 1180 cm^{-1} referente ao C-O.

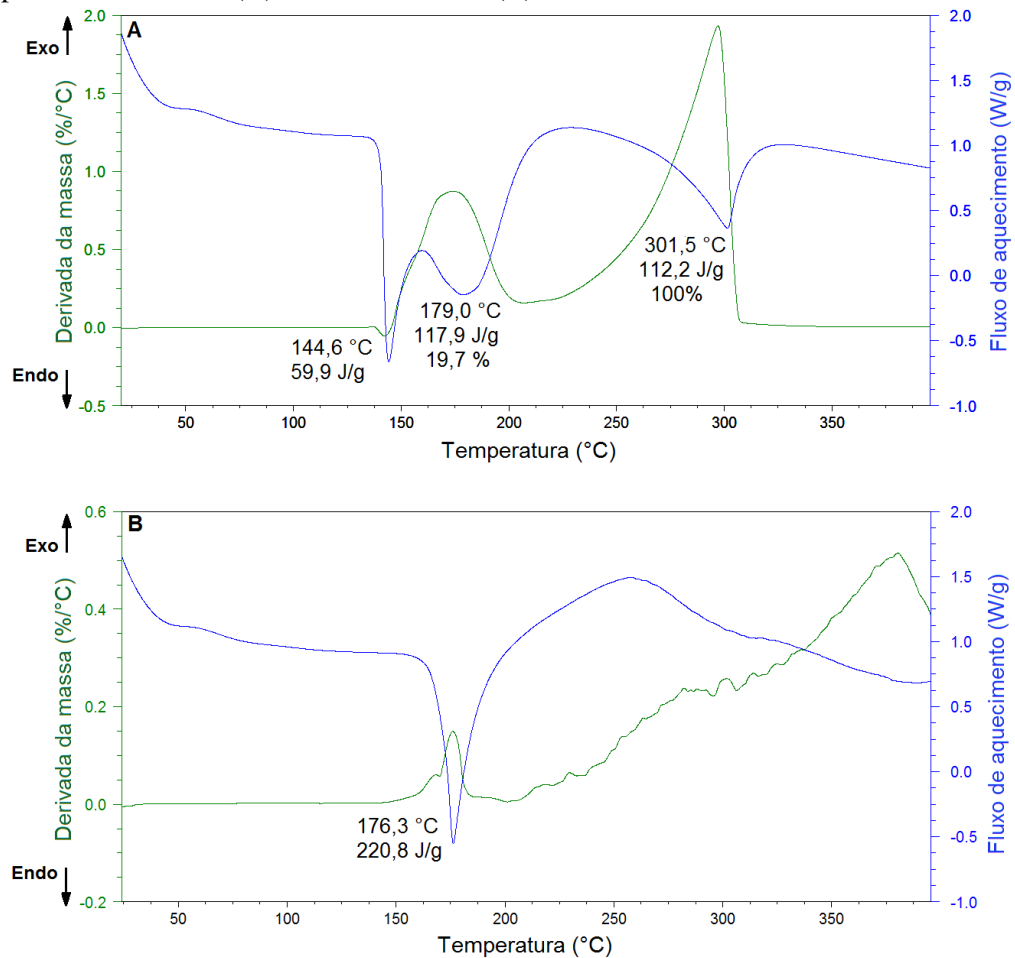
Nos espectros das nanopartículas contendo curcumina, CTAM e curcumina-CTAM, pode-se observar a sobreposição das principais bandas. A banda próxima a 3445 cm^{-1} é comum a todos os compostos, relacionada tanto ao O-H do PLA, como ao O-H presente na curcumina e no CTAM. Nas nanopartículas contendo curcumina também é possível observar a banda em 1100 cm^{-1} que está relacionada ao C-O-C. Nas nanopartículas contendo CTAM também está presente a banda em 1100 cm^{-1} correspondente ao C-O-C e ao C-N da amina, a banda 1760 cm^{-1} ao C=O do ácido carboxílico do citrato do tamoxifeno e C=O do éster do PLA. Dessa forma, foi possível observar que as principais bandas encontradas para curcumina e CTAM livre também foram encontradas nas nanopartículas contendo esses compostos.

4.9 Calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria

As análises térmicas por calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria foram realizadas para as nanopartículas obtidas e para as drogas na forma livre. As curvas da análise térmica do CTAM na forma livre estão representadas na Figura 19 A, onde pode ser observado na DSC um pico endotérmico em $144,6\text{ °C}$ relacionado à fusão do CTAM, sendo esse valor próximo ao de referência. Resultados semelhantes também foram encontrados em outros estudos como $146,68\text{ °C}$ (KHUROO et al., 2014) e $149,5\text{ °C}$ (KAPSE et al. 2012). Os picos em $179,0\text{ °C}$ e $301,5\text{ °C}$ estão relacionados à decomposição do CTAM, essa decomposição pode ser observada na DTG que mostra a perda de massa de 19,7% em $179,0\text{ °C}$ que chega a 100% em $301,5\text{ °C}$.

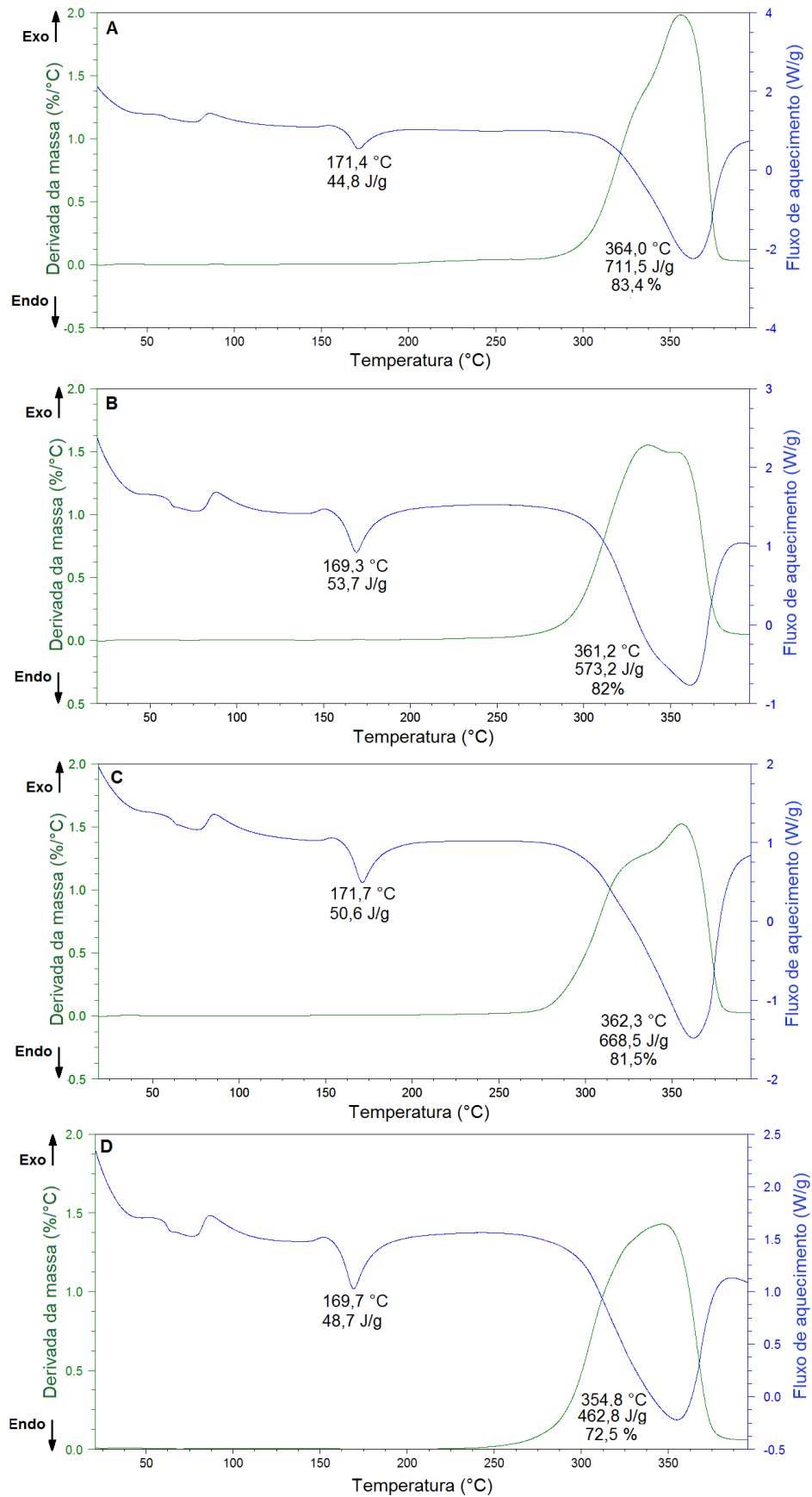
Na curva de DSC obtida para a curcumina livre (Figura 19 B), é possível observar um único pico endotérmico em $176,3\text{ °C}$ correspondendo à fusão da curcumina, que apresenta um ponto de fusão entre 179 e 183 °C (STRIMPAKOS; SHARMA, 2008). Kumar et al. (2014) encontraram resultado semelhante com um pico relacionado à fusão da curcumina em 180 °C . A análise da curva derivada da TG (DTG) da curcumina livre mostra que a curcumina não perdeu sua massa em uma temperatura específica, mas sim que ocorreu uma perda de massa constante que aumentou conforme o aumento de temperatura.

Figura 19 - Curvas de DSC (fluxo de aquecimento x temperatura) e DTG (massa x temperatura) obtidas para o CTAM livre (A) e curcumina livre (B).



A nanopartícula vazia (Figura 20 A) apresentou na análise de DSC um pico endotérmico em 170 °C e 360 °C. O primeiro está relacionado à fusão do PLA e o segundo associado à degradação desse polímero, com uma perda de massa 83% que pode ser observada na curva da DTG. As análises térmicas das nanopartículas de curcumina-CTAM, nanopartículas de CTAM e nanopartículas de curcumina estão representadas, respectivamente, na Figura 20 B, C e D. É possível observar um perfil semelhante ao encontrado para as nanopartículas vazias, com picos endotérmicos próximos a 170 °C e 360 °C, relacionados respectivamente a fusão do polímero e a degradação. A ausência dos picos de fusão relacionados ao CTAM e a curcumina é um indicativo de que essas drogas quando encapsuladas ficaram na forma amorfa.

Figura 20 – Curvas de DSC (fluxo de aquecimento x temperatura) e DTG (massa x temperatura) obtidas para as nanopartículas vazias (A), nanopartículas de curcumina-CTAM (B), nanopartículas de CTAM (C) e nanopartículas de curcumina (D).

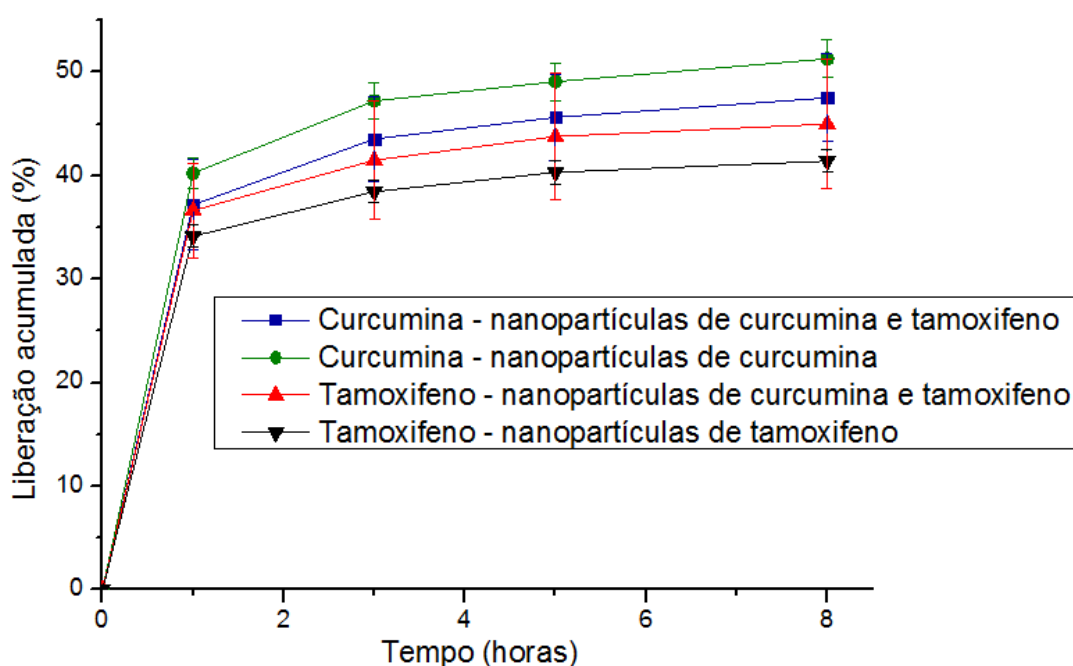


4.10 Perfil de liberação *in vitro*

Foi avaliado o perfil de liberação *in vitro* das nanopartículas de CTAM, curcumina e curcumina-CTAM. Os dados dessas análises podem ser observados na Figura 21, com os resultados obtidos nas primeiras 8 horas de liberação e na Figura 22 contendo o resultado final com a liberação até 120 horas.

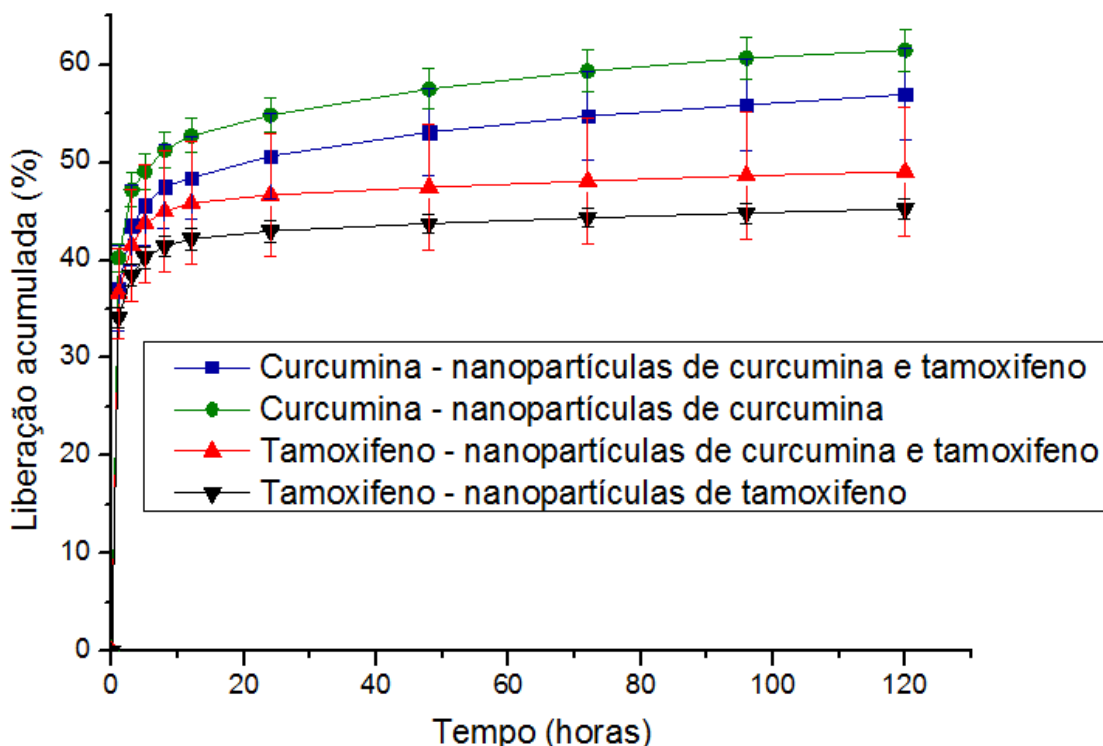
Em todas as nanopartículas testadas ocorreu uma rápida liberação inicial nas primeiras horas, denominado de efeito *burst*, que pode ser observado melhor na Figura 21, seguida de uma liberação lenta. A rápida liberação inicial pode ser ocasionada pelo CTAM e pela curcumina que estão adsorvidos na superfície da nanopartícula.

Figura 21 - Perfil de liberação *in vitro* das nanopartículas de PLA contendo CTAM, curcumina e curcumina-CTAM, por um período de 8 horas. Os dados estão expressos através de média e desvio padrão com $n = 3$.



Após 120 horas (Figura 22) foi encontrada uma liberação acumulada para a curcumina de 57% e 61% relacionadas, respectivamente, as nanopartículas de curcumina-CTAM e as nanopartículas de curcumina, sem diferença estatística significativa entre esses resultados. A liberação final encontrada para o CTAM foi de 49% nas nanopartículas de curcumina-CTAM e 45% nas nanopartículas contendo apenas CTAM, também não ocorreram diferenças estatísticas entre esses resultados.

Figura 22 - Perfil de liberação *in vitro* das nanopartículas de PLA contendo CTAM, curcumina e curcumina-CTAM, por um período de 120 horas. Os dados estão expressos através de média e desvio padrão com $n = 3$.



De maneira geral a liberação de uma droga depende da solubilidade, difusão e degradação da matriz polimérica. Também é dependente da eficiência de encapsulação e do tamanho da nanopartícula. Partículas menores, devido a sua maior área superficial, tem um efeito *burst* inicial maior que partículas maiores (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010). Os sistemas de liberação controlada de fármaco visam manter a concentração da droga no tecido-alvo ou sangue a nível eficaz. Para isso, geralmente parte da dose é liberada inicialmente, alcançando rapidamente a concentração terapêutica efetiva, seguida por uma liberação prolongada para manutenção dessa dose (DASH et al., 2010; LEE; YEO, 2015).

Para definir o modelo matemático que melhor se adequasse ao perfil de liberação, os resultados obtidos foram comparados o modelo de ordem zero, Higuchi, primeira e segunda ordem, verificando o modelo que apresentasse o coeficiente de correlação (r) mais próximo de 1 e com maior valor do critério de seleção do modelo (CSM). Os dados obtidos para esses quatro modelos estão apresentados na Tabela 11, onde podemos perceber que para as nanopartículas de curcumina, CTAM e curcumina-CTAM o modelo de equação que melhor representa o perfil de liberação é o de segunda ordem, nesse modelo foi encontrado um r mais próximo de 1 e o maior valor no CSM. O modelo de segunda ordem possui duas constantes de

liberação α e β , relacionadas a fase rápida e a fase lenta de liberação, os valores obtidos para essas constantes também estão descritos na Tabela 11.

Tabela 11 - Avaliação cinética da liberação da curcumina e do CTAM a partir das nanopartículas de PLA contendo curcumina, CTAM e curcumina-CTAM.

Tipo de nanopartícula e modelo	r	CSM	K (h⁻¹)
Curcumina - NP de curcumina e CTAM			
Ordem zero	0,855	-3,619	0,666
Primeira ordem	0,911	-3,376	0,015
Higuchi	0,855	-3,619	0,404
Segunda ordem	0,996	4,069	$\alpha 1,61 \cdot 10^{-3}$ $\beta 0,317$
Curcumina - NP de curcumina			
Ordem zero	0,854	-3,612	0,721
Primeira ordem	0,929	-3,305	0,023
Higuchi	0,854	-3,612	0,437
Segunda ordem	0,996	3,981	$\alpha 1,88 \cdot 10^{-3}$ $\beta 0,293$
CTAM - NP de curcumina e CTAM			
Ordem zero	0,738	-4,490	0,586
Primeira ordem	0,791	-4,321	0,011
Higuchi	0,738	-4,490	0,355
Segunda ordem	0,999	5,382	$\alpha 5,38 \cdot 10^{-4}$ $\beta 0,345$
CTAM- NP de CTAM			
Ordem zero	0,752	-4,564	0,540
Primeira ordem	0,798	-4,419	0,009
Higuchi	0,752	-4,564	0,328
Segunda ordem	0,999	5,052	$\alpha 4,78 \cdot 10^{-4}$ $\beta 0,340$

NP = Nanopartículas r = coeficiente de correlação, CSM = critério de seleção de modelo, k= constante de liberação.

Para avaliar o mecanismo de liberação do CTAM e da curcumina a partir das nanopartículas foi utilizado o modelo de Korsmeyer-Peppas. Esse modelo fornece o expoente de liberação (n) que está relacionado ao tipo de liberação. Valores de $n \leq 0,43$ estão relacionados ao um mecanismo de difusão (transporte Fickiniano) e $n \geq 0,85$ erosão do polímero (transporte não-Fickniano), valores de n na faixa de 0,43 e 0,85, indicam transporte

anômalo onde é associado o mecanismo de difusão e erosão (SIEPMANN, PEPPAS, 2001). Os resultados obtidos estão na Tabela 12 e é possível observar que tanto para o CTAM como para a curcumina os resultados foram abaixo de 0,43 indicando uma liberação por difusão Fickiniana.

Tabela 12 – Resultados da avaliação do mecanismo de liberação utilizando o modelo de Korsmeyer-Peppas das nanopartículas de PLA contendo curcumina, CTAM e curcumina-CTAM. Expressos em média \pm DP (n=3)

Tipo de nanopartícula	<i>n</i>
Curcumina - NP de curcumina e CTAM	0,0782 \pm 0,0047
Curcumina - NP de curcumina	0,0783 \pm 0,0013
CTAM - NP de curcumina e CTAM	0,0495 \pm 0,0007
CTAM - NP de CTAM	0,0482 \pm 0,0020

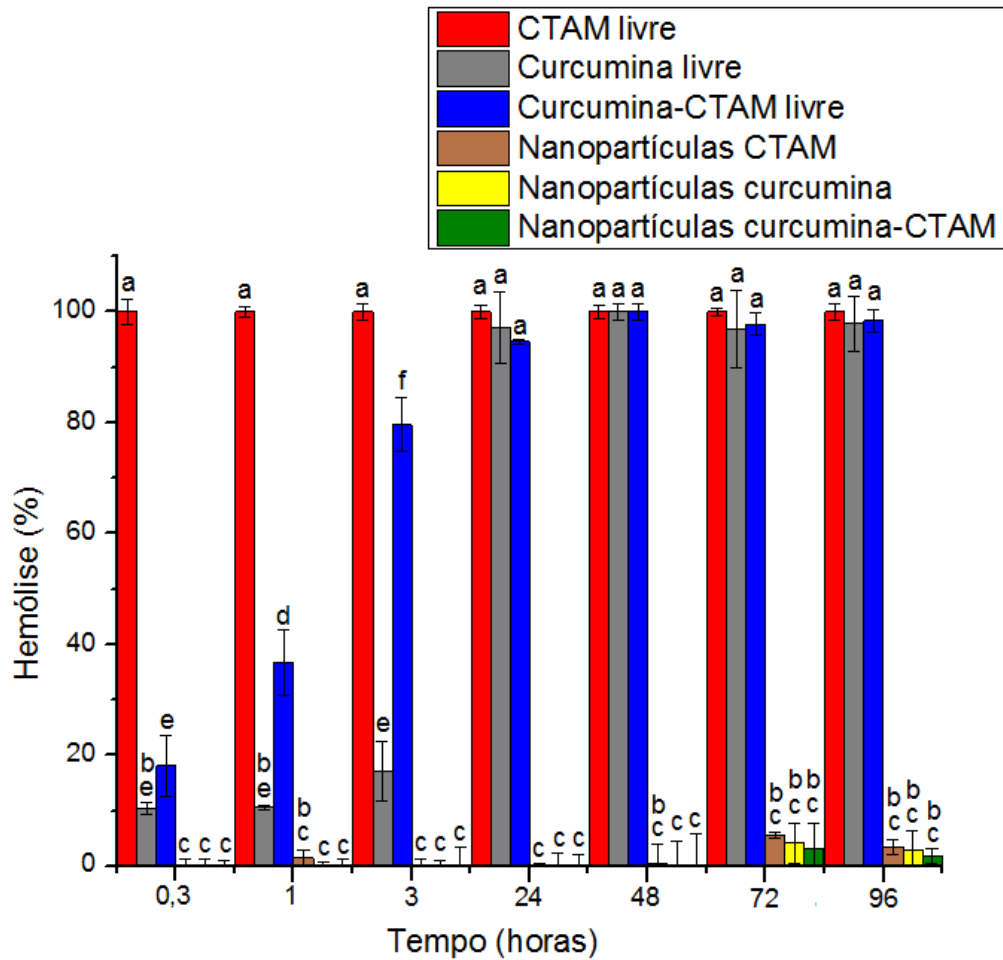
NP = nanopartículas, *n* = expoente de liberação.

4.11 Análise da citotoxicidade das nanopartículas e das drogas na forma livre sobre hemácias

Para o ensaio de citotoxicidade nanopartículas de CTAM, curcumina-CTAM e curcumina, bem como as drogas livres foram testadas sobre hemácias. As concentrações utilizadas foram de 200 μ g/mL para curcumina e 100 μ g/mL para o CTAM, nos tempos de 0,3, 1, 3, 24, 48, 72 e 96 horas.

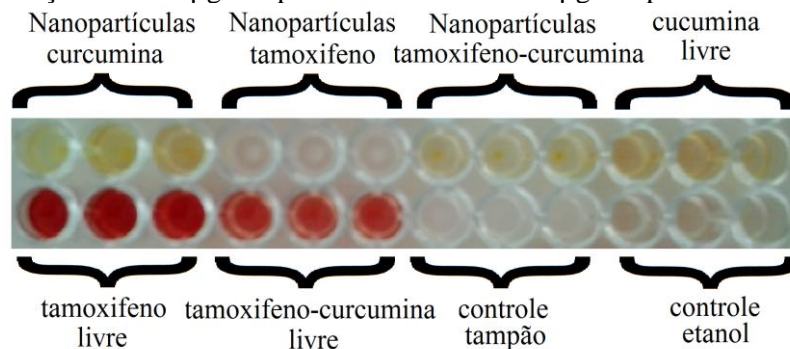
Analisando os resultados obtidos na Figura 23 é possível observar que a curcumina livre apresentou uma pequena hemólise em 0,3 e em 3 horas de incubação, que chegou a perto de 100% em 24 horas. O CTAM livre apresentou 100% de hemólise em 0,3 horas de incubação mantendo esse valor até 96 horas. Na associação de curcumina e CTAM na forma livre, a hemólise do CTAM diminui de 100% para 18% em 0,3 horas de incubação e de 100% para 79% em 3 horas. Com esse resultado pode-se perceber uma grande diminuição do potencial hemolítico do CTAM livre quando associado com a curcumina. Esses resultados também podem ser observados na Figura 24 que mostra a diferença da intensidade da cor vermelha, indicativa de hemólise, entre o CTAM sozinho e a associação curcumina-CTAM após 1 hora de incubação. Outro estudo também encontrou resultados semelhantes, mostrando uma diminuição da hemólise causada pelo CTAM quando associado com a curcumina (PEDROSO et al, 2013).

Figura 23 - Percentual de hemólise das nanopartículas e das drogas livres, nas concentrações de 200 µg/mL para a curcumina e 100 µg/mL para o CTAM, em diferentes tempos. A hemólise foi determinada por meio da medida da absorbância em 540 nm.



a, b, c, d, e, f letras diferentes representam desigualdades estatísticas com $p < 0,05$ e letras iguais indicam igualdade estatística.

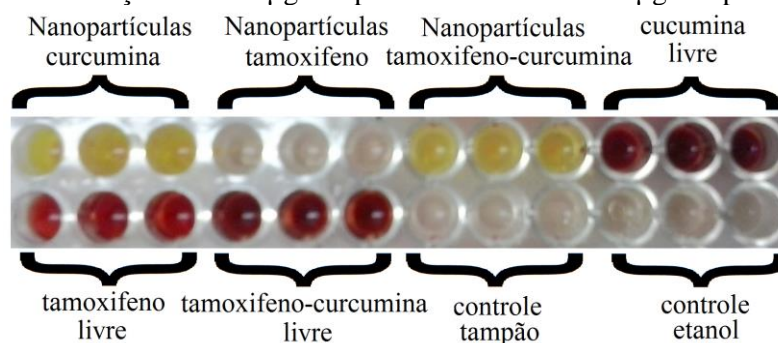
Figura 24 - Sobrenadante do ensaio de hemólise no tempo de 1 hora, das nanopartículas e das drogas livres, nas concentrações de 200 µg/mL para a curcumina e 100 µg/mL para o CTAM.



Todas as nanopartículas testadas não apresentaram atividade hemolítica nos tempos de 0,3, 1, 3, 24 e 48 horas de incubação, apresentando apenas um baixo percentual de hemólise após 72 e 96 horas. Esse resultado mostra uma grande diferença em relação aos compostos na

forma livre, que apresentaram 100% de hemólise em 24 horas, sendo que o CTAM já apresentou 100% em 0,3 horas (Figura 23). Assim, é possível observar a grande redução do potencial hemolítico de ambos os compostos quando associados em nanopartículas. A Figura 25 reforça esse resultado, mostrando a intensa cor vermelha indicativa de hemólise dos compostos na forma livre e a ausência de coloração vermelha das nanopartículas, no tempo de 48 horas. Para as nanopartículas contendo curcumina é possível observar uma coloração amarela característica da curcumina. O controle com etanol apresentou o mesmo resultado do controle negativo contendo apenas tampão, mostrando que o etanol utilizado para diluir as drogas na forma livre não interferiu nas análises. Altmeyer et al., 2014 também demonstraram a diminuição da hemólise causada pelo CTAM quando encapsulado em nanopartículas de PLA.

Figura 25 - Sobrenadante do ensaio de hemólise no tempo de 48 horas, das nanopartículas e das drogas livres, nas concentrações de 200 µg/mL para a curcumina e 100 µg/mL para o CTAM.



O tamoxifeno tem sido associado à anemia hemolítica (CHING; SMITH; LONG, 1992; MONTES et al., 1993; THANGARAJU; EZHILARASI; SACHDANANDAM, 1995). Outros estudos demonstram a atividade hemolítica *in vitro* causada pelo CTAM (PEDROSO et al, 2013, ALTMAYER et al, 2014). Utilizando microscopia eletrônica um estudo mostrou a mudança da forma discoide normal das hemácias para estomatócitos, quando incubados com tamoxifeno. Ainda concluíram que o tamoxifeno interage com uma proteína localizada na porção citoplasmática da membrana da hemácia (SUWALSKY et al., 1998). Silva et al. (2000) estudaram o mecanismo para a atividade hemolítica do tamoxifeno, e concluíram que a hemólise não está relacionada com dano oxidativo na membrana da hemácia. Tendo como um possível mecanismo uma perturbação da integridade estrutural da membrana da hemácia, podendo resultar em modificações nas proteínas da membrana e alterações na estrutura das proteínas do citoesqueleto e/ou da membrana plasmática. Diante dos resultados obtidos foi possível observar que associação da curcumina e CTAM é benéfica para a redução da

hemólise do CTAM, sendo que a encapsulação desses compostos também ocasiona uma grande redução da hemólise do CTAM e da curcumina.

4.12 Análise da citotoxicidade sobre células tumorais

Para o ensaio de citotoxicidade sobre células tumorais as nanopartículas e os compostos na forma livre foram incubados com células B16-F10 de melanoma murino por 24 e 72 horas. As concentrações utilizadas foram denominadas concentrações 1, 2 e 3 que representam: 1 (40 e 24 $\mu\text{g/mL}$), 2 (10 e 6 $\mu\text{g/mL}$) e 3 (3 e 2 $\mu\text{g/mL}$) de curcumina e CTAM, respectivamente. A curcumina e o CTAM livres foram testados nas mesmas concentrações das nanopartículas. Os resultados foram apresentados através da porcentagem da viabilidade celular, definida pelo número de células vivas após receberem o tratamento comparado com o controle positivo de células.

Na Figura 26 A estão os resultados obtidos para as nanopartículas em 24 horas, onde é possível observar na concentração 1 uma grande porcentagem de morte celular, com cerca de 10% de células vivas, para nanopartículas de curcumina e de curcumina-CTAM e uma viabilidade celular de 38% para as nanopartículas de CTAM. Na concentração 2 as nanopartículas de curcumina e de CTAM apresentaram uma viabilidade celular de 35% e 68%, respectivamente, com 27% para as nanopartículas de curcumina-CTAM. Na concentração 3 pode-se observar um efeito citotóxico aditivo das nanopartículas de curcumina-CTAM com 41% de viabilidade, apresentando melhores resultados que as nanopartículas contendo somente CTAM com 84% de viabilidade e que as nanopartículas de curcumina com 62%.

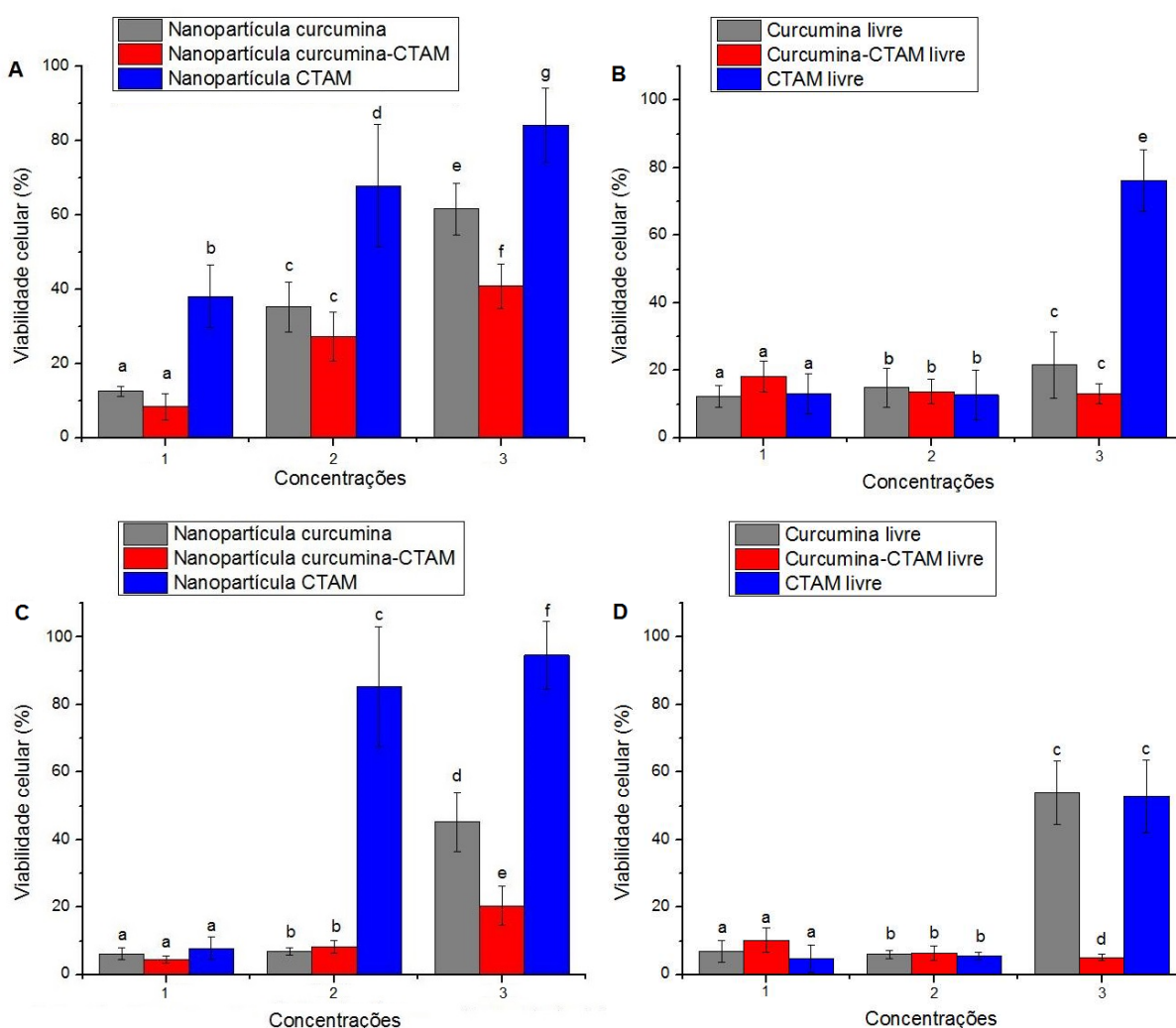
Os resultados obtidos para as drogas livres em 24 horas (Figura 26 B) mostraram que tanto a curcumina, o CTAM e curcumina-CTAM nas concentrações 1 e 2 apresentaram uma viabilidade celular de aproximadamente 14%. Na concentração 3 a curcumina e curcumina-CTAM apresentaram uma viabilidade de 22 e 13%, respectivamente, enquanto o CTAM apresentou 76% de viabilidade.

No tempo de 72 horas na concentração 1 as nanopartículas de curcumina, CTAM e curcumina-CTAM apresentaram viabilidade celular de aproximadamente 6%. Na concentração 2 as nanopartículas de curcumina e curcumina-CTAM apresentaram aproximadamente 7% de viabilidade enquanto as nanopartículas de CTAM apresentaram 85%. A concentração 3 apresentou um efeito aditivo, com viabilidade celular nas nanopartículas de curcumina-CTAM de 20%, sendo esse valor estatisticamente diferente das

nanopartículas de curcumina com viabilidade de 45% e das nanopartículas CTAM com 95%. Esse resultado também pode ser observado Figura 27 que mostra a grande quantidade de células no controle de células (D) e a diminuição dessas células nas nanopartículas (Figura 27 A, B e C) com maior intensidade para as nanopartículas de curcumina-CTAM (Figura 27 B).

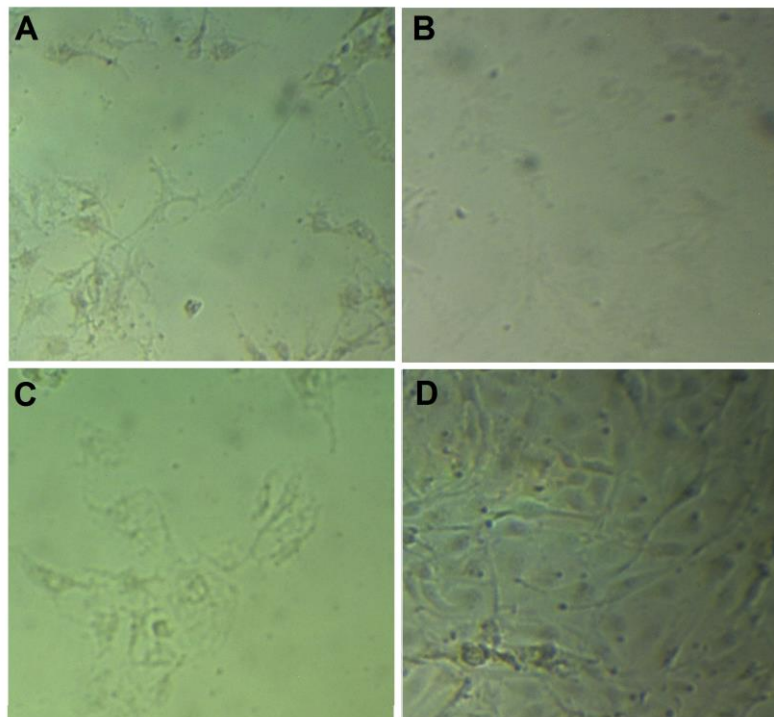
Em 72 horas a curcumina, o CTAM e a curcumina-CTAM na forma livre (Figura 26 D) na concentração 1 e 2 apresentaram aproximadamente 7% de viabilidade. Na concentração 3 a curcumina e o CTAM na forma livre apresentaram aproximadamente 53% de viabilidade e a associação de curcumina-CTAM apresentou um efeito aditivo com 5% de viabilidade.

Figura 26 – Efeito das nanopartículas de curcumina, curcumina-CTAM e CTAM, além da curcumina, CTAM e curcumina-CTAM livres na viabilidade de células B16-F10. A incubação no tempo de 24 horas está representada em (A) para as nanopartículas e (B) para os compostos livre e em 72 horas em (C) para as nanopartículas e (D) para os compostos livre. As concentrações 1, 2 e 3 representam: 1 (40 e 24 µg/mL), 2 (10 e 6 µg/mL) e 3 (3 e 2 µg/mL) de curcumina e CTAM, respectivamente.



Letras diferentes dentro de um mesmo grupo de concentrações (1, 2 ou 3) representam diferença estatística e letras iguais igualdade estatística.

Figura 27 – Fotos do ensaio sobre células B16-F10 incubadas por 72 horas. (A) nanopartículas de curcumina (3 $\mu\text{g/mL}$), (B) nanopartículas de curcumina-CTAM (3 e 2 $\mu\text{g/mL}$), (C) nanopartículas de CTAM (2 $\mu\text{g/mL}$), (D) controle positivo de células.



Nanopartículas vazias e o etanol foram testados como controle e não apresentaram atividade citotóxica sobre essas células. Com os resultados obtidos é possível observar uma ação aditiva da associação de curcumina e CTAM em nanopartículas na concentração 3, tanto em 24 como em 72 horas. No caso da associação desses compostos na forma livre ocorreu um efeito aditivo na concentração 3 em 72 horas. Em algumas concentrações é possível observar uma maior citotoxicidade dos compostos na forma livre em relação às nanopartículas, isso pode ter ocorrido devido a liberação lenta da curcumina e do CTAM das nanopartículas. No ensaio de liberação *in vitro* mesmo em 120 horas a liberação foi próxima a 50% para a CTAM e a 60% para a curcumina. Além disso, as principais vantagens dos sistemas nanoparticulados são mais perceptíveis em ensaios *in vivo*, como por exemplo, o aumento da biodisponibilidade, diminuição da toxicidade ao tecido saudável e a liberação sítio específica.

A atividade citotóxica da curcumina sobre diferentes linhagens tumorais vem sendo amplamente estudada, apresentando efeitos citotóxicos em linhagens de células tumorais como, por exemplo, de ovário (Ho-8910), pulmão (A549), leucemia, mama (MCF-7), HeLa, laringe e de ovário resistente a cisplatina (A2780CP) (CHOUDHURI et al., 2002; DUVOIX et al., 2003; SHI et al., 2006; LIN et al., 2009; SINGH; SINGH, 2009; YALLAPU et al., 2010; PRASANNA et al., 2011). Ensaio de citotoxicidade sobre células normais de rim e

mama mostraram que a curcumina não teve efeito citotóxico sobre essas células (PRASANNA et al., 2011).

A curcumina também apresenta atividade citotóxica sobre células de melanoma de diversas linhagens, incluindo a B16-F10 que foi estudada no presente trabalho (BUSH; CHEUNG; LI, 2001; ODOT et al., 2004; WEN et al., 2010; MAZZARINO et al., 2011; LIN et al., 2012). Metástases de células B16-F10 em pulmão de camundongos foram inibidas em 80% e 89% na presença de curcumina, também aumentando a sobrevida (MENON; KUTTAN; KUTTAN, 1995; MENON; KUTTAN; KUTTAN, 1999). Sistemas nanoparticulados como lipossomas e lipossoma-PEG-PEI contendo curcumina apresentaram bons resultados sobre células B16-F10, apresentando uma CI_{50} de 7,8 e 1,1 μ M, respectivamente (LIN et al., 2012). Lipossomas contendo curcumina e paclitaxel em albumina apresentaram um efeito citotóxico sobre células B16-F10 e MCF-7 (câncer de mama humano), nas células B16-F10 a CI_{50} foi de 1 μ g/mL para o paclitaxel e 5 μ g/mL para a curcumina, sendo que o efeito citotóxico foi maior para a associação de curcumina paclitaxel em comparação com os compostos isolados (RUTTALA; KO, 2015). Em outro estudo nanocápsulas lipídicas e poliméricas contendo curcumina foram testadas em células B16-F10 em camundongos e *in vitro* (MAZZARINO et al., 2011).

O Tamoxifeno é utilizado no câncer de mama por ser antagonista dos RE da mama, mas estudos mostram a atividade do tamoxifeno mesmo em tumores de mama RE negativos (CHARLIER et al., 1995; GELMANN, 1996; SALAMI; KARAMI-TEHRANI, 2003). Sendo também efetivo em outros tipos de tumores como das vias biliares, astrocitoma, pancreático e melanoma, sugerindo a possibilidade de outros mecanismos independentes dos RE para a atividade antitumoral do tamoxifeno (SHARIF; SHARIF, 1998; TOMAO et al., 2002; HAN et al., 2009; RIBEIRO et al., 2014). Estudos mostraram a atividade do tamoxifeno em células de melanoma diminuindo a proliferação e migração dessas células, alguns propuseram mecanismos para essa atividade, como pela inibição do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) e pela supressão da proteína quinase C (PKC/MEK/ERK e PKC/PI3K/Akt) (KANTER-LEWENSOHN et al., 2000; MATSUOKA et al., 2009; RIBEIRO et al., 2013; RIBEIRO et al., 2014).

Geralmente a atividade do tamoxifeno no melanoma é testada em associação com outros quimioterápicos. Ribeiro et al. (2013) combinaram ácido retinóico com tamoxifeno ou seu principal metabólito ativo o endoxifeno, avaliando a atividade sobre células de melanoma. Todos os compostos testados apresentaram atividade citotóxica sobre essas células, mas a associação com o endoxifeno apresentou melhores resultados. O tamoxifeno também já foi

combinado com cisplatina em um estudo de fase I, farmacocinética e fase II em pacientes com melanoma metastático e foi associado com cisplatina mais dacarbazina em pacientes com melanoma metastático em um estudo de fase II (FLAHERTY et al., 1996; MCCLAY et al., 1997; MCCLAY et al., 2001). Outros estudos de fase II e III do tamoxifeno associado com outros quimioterápicos no melanoma foram realizados, mas os resultados ainda são inconclusivos, quando comparado efeitos colaterais e benefícios dessa terapia (BEGUERIE, XINGZHONG; VALDEZ, 2010). Dessa forma, são necessários mais estudos da atividade do tamoxifeno em associação com outros quimioterápicos para o tratamento do melanoma. A curcumina e o tamoxifeno na forma livre foram testados frente a células de melanoma da linhagem A375 e apresentaram uma atividade sinérgica sobre essas células. Essa combinação foi testada em células não tumorais e não apresentou toxicidade (CHATTERJEE; PANDEY, 2011).

4.13 Considerações finais

A nanotecnologia está sendo muito estudada por seu potencial para aplicação no diagnóstico e na terapêutica de doenças. Em substâncias que possuem alta toxicidade ao tecido saudável e baixa biodisponibilidade, entre outras limitações, a nanotecnologia apresenta diversas vantagens em relação ao composto na forma livre. O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo curcumina e CTAM. Essa associação foi estudada porque não foram encontrados relatos científicos relacionando curcumina e CTAM em nanopartículas. Além disso, esses dois compostos apresentam atividade no câncer e suas propriedades podem ser aperfeiçoadas por meio da encapsulação em nanopartículas.

Pelo conjunto de análises foi possível constatar a viabilidade da preparação das nanopartículas de PLA contendo curcumina-CTAM. Nas análises físico-químicas foram encontrados resultados desejáveis para sistemas nanoestruturados, como tamanho próximo a 190 nm, morfologia esférica e potencial zeta negativo menor que -16 mV. Outros estudos que desenvolveram nanopartículas contendo curcumina ou tamoxifeno encontraram resultados semelhantes com tamanho próximos 200 nm (HU; NEOH; KANG, 2006; PANDEY et al., 2015; SILVA-BUZANELLO et al., 2015). Além disso, os sistemas obtidos foram estáveis por 90 dias em relação ao tamanho e ao potencial zeta e apresentaram uma liberação controlada *in vitro*. Essas nanopartículas foram testadas em células normais e tumorais, mostrando resultados promissores, com uma diminuição do potencial citotóxico da curcumina e do

CTAM em hemácias e um efeito aditivo das nanopartículas de curcumina-CTAM frente a células B16-F10 de melanoma. Vários estudos mostram os benefícios da curcumina em nanopartículas tanto *in vitro* como *in vivo* (GOTA et al., 2010; YADAV et al., 2010; KAREWICZ et al., 2011; KANAI et al., 2012; KHALIL et al., 2012; KAKKAR et al., 2013; ANITHA et al., 2014; SILVA-BUZANELLO et al., 2015; RUTTALA; KO, 2015). O mesmo acontece com o tamoxifeno em nanopartículas (BRIGGER et al., 2001; CHAWLA; AMIJI, 2002; SHENOY; AMIJI, 2005; JAIN et al., 2011; KAPSE et al., 2012; KHUROO et al., 2014; PANDEY et al., 2015). Outros trabalhos mostram os benefícios da associação desses compostos na forma livre (GASPERI; CAVAZOS; GRAFFENRIED, 2009; CHATTERJEE; PANDEY, 2011; EL-BESHBISHY et al., 2010; JIANG et al., 2013; PEDROSO et al., 2013).

Assim, a associação de curcumina e CTAM em nanopartículas é favorável tendo em vista as possíveis aplicações terapêuticas desse sistema, com a diminuição dos efeitos adversos, potencial para minimizar a resistência ao tamoxifeno no tumor de mama, aumento da biodisponibilidade e da atividade farmacológica desses compostos (GASPERI; CAVAZOS; GRAFFENRIED, 2009; EL-BESHBISHY et al., 2010; CHATTERJEE; PANDEY, 2011; CHO; LEE; CHOI, 2012; KHALIL et al., 2012; JIANG et al., 2013; PEDROSO et al., 2013).

5 CONCLUSÕES

- Foi desenvolvido um método analítico por CLAE para quantificação de curcumina e CTAM simultaneamente. Esse método foi validado atendendo os critérios de linearidade, especificidade, precisão, exatidão e robustez;
- As nanopartículas de curcumina, CTAM e das duas drogas juntas foram obtidas com sucesso pelo método da emulsificação-evaporação do solvente (O/A). Tendo uma eficiência de encapsulação de aproximadamente 57% para o CTAM e 92% para a curcumina;
- As nanopartículas apresentaram tamanho próximo a 190 nm com um baixo índice polidispersão, além de morfologia esférica e característica amorfa;
- O potencial zeta foi negativo próximo a -17 mV para as nanopartículas de curcumina-CTAM, -16 mV para as nanopartículas de CTAM e -26 mV para as nanopartículas de curcumina;
- A liberação *in vitro* das nanopartículas resultou em uma liberação acumulada em 120 horas de 57% e 61% para a curcumina relacionadas, respectivamente, as nanopartículas de curcumina-CTAM e as nanopartículas de curcumina. Para o CTAM a liberação foi de 49% e 45% para as nanopartículas de curcumina-CTAM e nanopartículas CTAM, respectivamente. Na análise matemática dos resultados foi encontrado um perfil de liberação de segunda ordem, com um mecanismo de liberação guiado por transporte por difusão Fickiniana;
- As nanopartículas armazenadas em temperatura ambiente, 5 e -15 °C, por 90 dias não apresentaram alterações no tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta;
- Foi avaliada a atividade hemolítica das nanopartículas e dos compostos na forma livre, demonstrando uma diminuição da hemólise do CTAM quando ele foi associado com a curcumina e quando foi encapsulado em nanopartículas;
- Na atividade citotóxica frente a células B16-F10 as nanopartículas de curcumina-CTAM na concentração de 3 e 2 µg/mL, respectivamente, apresentaram um efeito aditivo quando comparado com as nanopartículas desses compostos isolados;
- As nanopartículas desenvolvidas possuem um grande potencial para diminuição da toxicidade do tamoxifeno *in vivo*, além da possibilidade de um efeito aditivo ou sinérgico sobre tumores. Estudos sobre a toxicidade, farmacocinética e sobre a atividade antitumoral *in vivo* seriam importantes para a continuidade desse trabalho.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, F. C.; BARBANTE, C. Nanoscience, nanotechnology and spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**. v. 86, p. 3-13, 2013.
- AGGARWAL, B. B.; SUNG, B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 30, n. 2, p. 85-94, 2009.
- ALTMeyer, C. Obtenção de nanopartículas de poli (ácido láctico) contendo tamoxifeno e avaliação da citotoxicidade sobre hemácias e células tumorais. 2014. **Dissertação (mestrado)**. UNICENTRO, Guarapuava, Paraná, 2014.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Breast Cancer. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-risk-factors>>. Acesso em set. de 2014.
- ANAND, P.; SUNDARAM, C.; JHURANI, S.; KUNNUMAKKARA, A. B.; AGGARWAL, B. B. Curcumin and cancer: An “old-age” disease with an “age-old” solution. **Cancer Letters**. v. 267, n. 1, p. 133-164, 2008.
- ANITHA, A.; SREERANGANATHAN, M.; CHENNAZHI, K. P.; LAKSHMANAN, V. K.; JAYAKUMAR, R. *In vitro* combinatorial anticancer effects of 5-fluorouracil and curcumin loaded *N,O*-carboxymethyl chitosan nanoparticles toward colon cancer and *in vivo* pharmacokinetic studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 88, n. 1, p. 238-251, 2014.
- ANTON, N.; BENOI, J. P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-A review. **Journal of Controlled Release**. v. 128, n. 3, p 185-199, 2008.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para a validação de métodos analíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília: 02 de julho de 2003.
- ARORA, A.; POTTER, J.F. Aromatase inhibitors: current indications and future prospects for treatment of postmenopausal breast cancer. **Journal of the American Geriatrics Society**. v. 52, n. 4, p. 611-616, 2004.
- AURAS, R.; HARTE, B.; SELKE, S. An overview of polylactides as packaging materials. **Macromolecular Bioscience**. v. 4, n. 9, p. 835-864, 2004.
- BACHMEIER, B.; NERLICH, A.G.; IANCU, C.M.; CILLI, M.; SCHLEICHER, E.; VENÉ, R. DELL'EVA, R.; JOCHUM, M.; ALBINI, A.; PFEFFER, U. The chemopreventive polyphenol Curcumin prevents hematogenous breast cancer metastases in immunodeficient mice. **Cellular Physiology and Biochemistry**. v. 19, p. 137-15, 2007.
- BAWA, R.; MELETHIL S.; SIMMONS, W. J.; HARRIS, D. Nanopharmaceuticals: Patenting Issues and FDA Regulatory Challenges. **The SciTech Lawyer**, v. 5, n. 2, 2008.

BAYET-ROBERT, M.; KWIATKOWSKI, F.; LEHEURTEUR, M.; GACHON, F.; PLANCHAT, E.; ABRIAL, C.; MOURET-REYNIER, M-A.; DURANDO, X.; BARTHOMEUF, C.; CHOLLET, P. Phase I dose escalation trial of docetaxel plus curcumin in patients with advanced and metastatic breast cancer. **Cancer Biology & Therapy**. v. 9, n. 1, p. 8-14; 2010.

BEGUERIE, J.R.; XINGZHONG, J.; VALDEZ, R.P. Tamoxifen vs. non-tamoxifen treatment for advanced melanoma: a meta-analysis. **International Journal of Dermatology**. v. 49, n. 10, p. 1194-1202, 2010.

BERGMAN, L.; BEELEN, M.L.; GALLEE, M.P.; HOLLEMA, H.; BENRAADT, J.; VAN LEEUWEN, F.E. Risk and prognosis of endometrial cancer after tamoxifen for breast cancer. Comprehensive Cancer Centres' ALERT Group. Assessment of Liver and Endometrial cancer Risk following Tamoxifen. **Lancet**, v.7, p. 356-881, 2000.

BEVERAGE, J.N.; SISSUNG, T.M.; SION, A.M.; DANESI, R.; FIGG, W.D. CYP2D6 polymorphisms and the impact on tamoxifen therapy. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 96, n. 9, p. 2224–2231, 2007.

BORGES, S.; DESTA, Z.; LI, L.; SKAAR, T.C.; WARD, B.A.; NGUYEN, A.; JIN, Y.; STORNILO, A.M.; NIKOLOFF, D.M.; WU, L.; HILLMAN, G.; HAYES, D.F.; STEARNS, V.; FLOCKHART, D.A. Quantitative effect of CYP2D6 genotype and inhibitors on tamoxifen metabolism: Implication for optimization of breast cancer treatment. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**. v. 80, n. 1, p. 61-74, 2006.

BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J.O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**. n. 56, v.11, p. 1649–1659, 2004.

BRAUCH, H.; MÜRDTER, T. E.; EICHELBAUM, M. SCHWAB, M. Pharmacogenomics of tamoxifen therapy. **Clinical Chemistry**. v. 55, n. 10, p. 1770–1782, 2009.

BREASTCANCER.ORG. Disponível em: <http://www.breastcancer.org/treatment/hormonal/what_is>. Acesso em out. de 2014.

BRIGGER, I.; CHAMINADE, P.; MARSAUD, V.; APPEL, M.; BESNARD, M.; GURNY, R.; RENOIR, M.; COUVREUR, P. Tamoxifen encapsulation within polyethylene glycol-coated nanospheres. A new antiestrogen formulation. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 214, p. 37–42, 2001.

BUCHANAN, C.M.; BUCHANAN, N.L.; EDGAR, K.J.; LITTLE, J.L.; MALCOLM, M.O.; RUBLE, K.M.; WACHER, V.J.; WEMPE, M.F. Pharmacokinetics of tamoxifen after intravenous and oral dosing of tamoxifen-hydroxybutenyl-beta-cyclodextrin formulations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 96, n. 3, p. 644-660, 2007.

BURSTEIN, H.J.; PRESTRUD, A.A.; SEIDENFELD, J.; ANDERSON, H.; BUCHHOLZ, T.A.; DAVIDSON, N.E.; GELMON, K.E.; GIORDANO, S.H.; HUDIS, C.A.; MALIN, J.; MAMOUNAS, E.P.; ROWDEN, D.; SOLKY, A.J.; SOWERS, M.R.; STEARNS, V.; WINER, E.P.; SOMERFIELD, M.R.; GRIGGS, J.J. American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline: update on adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**. v. 28, n. 23, p. 3784-3796, 2010.

BUSH, J.A.; CHEUNG, K.J. JR.; LI, G. Curcumin Induces Apoptosis in Human Melanoma Cells through a Fas Receptor/Caspase-8 Pathway Independent of p53 **Experimental Cell Research**. v. 271, n. 2, p. 305–314, 2001.

CHATTERJEE, S.J.; PANDEY, S. Chemo-resistant melanoma sensitized by tamoxifen to low dose curcumin treatment through induction of apoptosis and autophagy. **Cancer Biology & Therapy**. v. 11, n. 2, p. 216-28, 2011.

CHARLIER, C.; CHARIOT, A.; ANTOINE, N.; MERVILLE, M-P.; GIELEN, J.; CASTRONOVO, V. Tamoxifen and its active metabolite inhibit growth of estrogen receptor-negative MDA-MB-435 cells. **Biochemical Pharmacology**. v. 49, n. 3, p. 351–358, 1995.

CHAWLA, J.S.; AMJI, M.M. Biodegradable poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 249, p. 127–138, 2002.

CHEN, B.; ZHANG Y.; WANG Y.; RAO J.; JIANG X.; XU Z. Curcumin inhibits proliferation of breast cancer cells through Nrf2-mediated down-regulation of Fen1 expression. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. v. 143, p. 11–18, 2014,

CHENG, A. L.; HSU, C.H.; LIN, J. K.; HSU, M. M.; HO, Y. F.; SHEN, T. S.; KO, J. Y.; LIN, J. T.; LIN, B. R.; MING-SHIANG, W.; YU, H. S.; JEE, S. H.; CHEN, G. S.; CHEN, T. M.; CHEN, C. A.; LAI, M. K.; PU, Y. S.; PAN, M. H.; WANG, Y. J.; TSAI, C. C.; HSIEH, C. Y. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. **Anticancer Research**. v. 21, n. 4B, p. 2895-900, 2001.

CHEREDDY, K. K.; COCO, R.; MEMVANGA, P. B.; UCAKAR, B.; RIEUX, A.; VANDERMEULEN, G.; PRÉAT, V. Combined effect of PLGA and curcumin on wound healing activity. **Journal of Controlled Release**. v. 171, n. 2, p. 208–215, 2013.

CHING, C.K.; SMITH, P.G.; LONG, R.G. Tamoxifen-associated hepatocellular damage and agranulocytosis. **Lancet**. v. 339, n. 8798, p. 940, 1992.

CHO, Y. A.; LEE, W.; CHOI, J. S. Effects of curcumin on the pharmacokinetics of tamoxifen and its active metabolite, 4-hydroxytamoxifen, in rats: possible role of CYP3A4 and P-glycoprotein inhibition by curcumin. **Pharmazie**. v. 67, n. 2, p. 124–130, 2012.

CHOUDHURI, T.; PAL, S.; AGWARWAL, M. L.; DAS, T.; SA, G. Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent bax induction. **FEBS Letters**. v. 512, n. 1-3, p. 334–340, 2002.

DASH, S.; MURTHY, P.N.; NATH, L.; CHOWDHURY, P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. **Acta Poloniae Pharmaceutica**. v. 67, n. 3, p. 217–223, 2010.

DAYYOUB, E.; HOBLER, C.; NONNWEILER, P.; KEUSGEN, M.; BAKOWSKY, U. Nanostructured medical device coatings based on self-assembled poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles. **Materials Science and Engineering: C**. v. 33, n. 5, p. 3018–3024, 2013.

DEMISSIE, S.; SILLIMAN, R.A.; LASH, T.L. Adjuvant tamoxifen: predictors of use, side effects, and discontinuation in older women. **Journal of Clinical Oncology**. v. 19, p. 322–328, 2001.

DESTA, Z.; WARD, B. A.; SOUKHOVA, N.V.; FLOCKHART, D.A. Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 310, p. 1062–1075, 2004.

DE VOS, F.Y.F.L.; VAN LAARHOVEN, H.W.M.; LAVEN, J.S.E; THEMME, A.P.N.; BEEEX, L.V.A.M.; SWEEP, C.G.J.; SEYNAEVE, C.; JAGER, A. Menopausal status and adjuvant hormonal therapy for breast cancer patients: A practical guideline. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. v. 84, n. 2, p. 252–260, 2012.

DUVOIX, A.; MORCEAU, F.; SCHNEKENBURGER, M.; DELHALLE, S.; GALTEAU, M. M.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Curcumin-induced cell death in two leukemia cells lines: K562 and Jurkat. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 1010, p. 389–392, 2003.

EBCTCG - Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. **Lancet**. v. 351, n. 9114, p. 1451–1467 1998.

EBCTCG - Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. **Lancet**. v. 365, n. 9472, p. 1687–1717, 2005.

EBCTCG - Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. **Lancet**. v. 378, n. 9793, p. 771–784, 2011.

EL-BESHBISHY, H. A.; MOHAMADIN, A. M.; NAGY, A. A.; ABDEL-NAIM, A. B. Amelioration of tamoxifen-induced liver injury in rats by grape seed extract, black seed extract and curcumin. **Indian Journal of Experimental Biology**. v. 48, p. 280-288, 2010.

FABIAN, C.; TILZER, L.; STERNSON, L. Comparative binding affinities of tamoxifen, 4-hydroxytamoxifen, and desmethyltamoxifen for estrogen receptors isolated from human breast carcinoma: correlation with blood levels in patients with metastatic breast cancer. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**. v. 2, p. 381–390, 1981.

FARAJI, A.H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 17, n. 8, p. 2950–2962, 2009.

FDA – Food and Drug Administration. Disponível em: <<http://www.fda.gov/NewsEvents/Testimony/ucm115118.htm>> . Acesso em jun. de 2014.^a

FDA – Food and Drug Administration. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/applletter/1998/17970s39.pdf>. Acesso em out. de 2014.^b

FDA – Food and Drug Administration. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2006/017970s054lbl.pdf>. Acesso em jan. de 2015.

FENG, S. S. Nanoparticles of biodegradable polymers for new-concept Chemotherapy. **Expert Review of Medical Devices**. v. 1, n. 1, p. 115–125, 2004.

FIDLER, I.J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. **Nature Reviews Cancer**. v. 3, n. 6, p. 453-458, 2003.

FISHER, B.; COSTANTINO, J.P.; WICKERHAM, D.L.; REDMOND, C.K.; KAVANAH, M.; CRONIN, W.M.; VOGEL, V.; ROBIDOUX, A.; DIMITROV, N.; ATKINS, J.; DALY, M.; WIEAND, S.; TAN-CHIU, E.; FORD, L.; WOLMARK, N. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 90, n. 18, p. 1371–88, 1998.

FISHER, B.; REDMOND, C.; FISHER, E.R.; CAPLAN, R. Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. **Journal of Clinical Oncology**. v. 6, n. 7, p. 1076–1087, 1988.

FLAHERTY, L.E.; LIU, P.Y.; MITCHELL, M.S.; FLETCHER, W.S.; WALKER, M.J.; GOODWIN, J.W.; STEPHENS, R.L.; SONDAK, V.K. The Addition of Tamoxifen to Dacarbazine and Cisplatin in Metastatic Malignant Melanoma: A Phase II Trial of the Southwest Oncology Group (SWOG-8921). **American Journal of Clinical Oncology: Cancer Clinical Trials**. v. 19, n. 2, p. 108-113, 1996.

GAMBERINI, M.C.; BARALDI, C.; TINTI, A.; PALAZZOLI, F.; FERIOLI, V. Vibrational study of tamoxifen citrate polymorphism. **Journal of Molecular Structure**. v. 840, n. 1-3, p. 29-37, 2007.

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.

GARCEA, G.; BERRY, D. P.; JONES, D. J.; SINGH, R.; DENNISON, A. R.; FARMER, P. B.; SHARMA, R. A.; STEWARD, W. P.; GESCHER, A. J. Consumption of the putative chemopreventive agent curcumin by cancer patients: assessment of curcumin levels in the colorectum and their pharmacodynamic consequences. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. v. 14, n. 1, p. 120-125, 2005.

GARCIA-ALLOZA, M.; BORRELLI, L.A.; ROZKALNE, A.; HYMAN, B.T.; BACSKAI, B.J. Curcumin labels amyloid pathology in vivo, disrupts existing plaques, and partially restores distorted neurites in an Alzheimer mouse model. **Journal of Neurochemistry**. v. 102, n. 4, p. 1095–1104, 2007.

GASPERI, M. D.; CAVAZOS, D.; GRAFFENRIED, L. D. Curcumin Modulates Tamoxifen Response in Resistant Breast Cancer Cells. *Cancer research*. v. 69, p. 3098, 2009.

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE F. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 69, n. 1, p. 1-9, 2008.

GELMANN, E. P. Tamoxifen induction of apoptosis in estrogen receptor-negative cancers: new tricks for an old dog? **Journal of the National Cancer Institute**. v. 88, n. 5, p. 224-226, 1996.

GILMAN, A. G. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10. ed., Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005.

GOEL, A.; KUNNUMAKKARA, A.B.; AGGARWAL, B.B. Curcumin as “Curecumin”: from kitchen to clinic. **Biochemical Pharmacology**. v. 75, p. 787–809, 2008.

GOLDHIRSCH, A.; WOOD, W.C.; GELBER, R.D.; COATES, A.S.; THURLIMANN, B.; SENN, H.J. Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**. v. 21, p. 3357–3365, 2003.

GOTA, V.S.; MARU, G.B.; SONI, T.G.; GANDHI, T.R.; KOCHAR, N.; AGARWAL, M.G. Safety and pharmacokinetics of a solid lipid curcumin particle formulation in osteosarcoma patients and healthy volunteers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 58, n. 4, p. 2095-2099, 2010.

HAN, P.; KANG, J-H.; LI, H-L.; HU, S-X.; LIAN, H-H.; QIU, P-P.; ZHANG, J.; LI, W-G.; CHEN, Q-X. Antiproliferation and apoptosis induced by tamoxifen in human bile duct carcinoma QBC939 cells via upregulated p53 expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 385, n. 2, p. 251–256, 2009.

HE, C.; HU, Y.; YIN, L.; TANG, C.; YIN, C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. **Biomaterials**. v. 31, n. 13, p. 3657–3666, 2010.

HU, F.X.; NEOH, K.G.; KANG, E.T. Synthesis and in vitro anti-cancer evaluation of tamoxifen-loaded magnetite/PLLA composite nanoparticles. **Biomaterials**. v. 27, n. 33, p. 5725–5733, 2006.

HUANG, C.C.; CHENG, H.H.; LIN, K.L.; CHENG, J.S.; TSAI, J.Y.; LIAO, W.C.; FANG, Y.C.; JAN, C.R. Tamoxifen-induced $[Ca^{2+}]_i$ rise and apoptosis in corneal epithelial cells. **Toxicology**. v. 255, p. 58-64, 2009.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use: Q2B – validation of Analytical procedures: methodology, 2005.

INCA - Instituto Nacional de Câncer. O que é o câncer?. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>>. Acesso em jun. de 2014a.

INCA - Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2014 - incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp>>. Acesso em out. de 2014b.

INCA - Instituto Nacional de Câncer. Tipos de câncer: mama. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home+/mama/cancer_mama>. Acesso em out. de 2014c.

INCA - Instituto Nacional de Câncer. Prevenção e Fatores de Risco. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=13>. Acesso em set. de 2014^d.

INCA - Instituto Nacional de Câncer. Tratamento do câncer. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/tratamento>>. Acesso em fev. de 2015.

ISO - The International Organization for Standardization. ISO/TC 229 Nanotechnologies. Disponível em: <http://www.iso.org/iso/iso_technical_committee?commid=381983>. Acesso em dez. de 2014.

IYER, A. K.; KHALED, G.; FANG, J.; MAEDA, H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. **Drug Discovery Today**. v. 11, n. 17–18, p. 812–818, 2006.

JAIN, A. K.; SWARNAKAR, N. K.; GODUGU, C.; SINGH, R. P.; JAIN, S. The effect of the oral administration of polymeric nanoparticles on the efficacy and toxicity of tamoxifen. **Biomaterials**. v. 32, n. 2, p. 503–515, 2011.

JIANG, M.; HUANG, O.; ZHANG, X.; XIE, Z.; SHEN, A.; LIU, H.; GENG, M.; SHEN, K. Curcumin induces cell death and restores tamoxifen sensitivity in the antiestrogen-resistant breast cancer cell lines MCF-7/LCC2 and MCF-7/LCC9. **Molecules**. v. 18, n. 1, p. 701–720, 2013.

JOHANSEN, A.M. Breast cancer chemoprevention: a review of selective estrogen receptor modulators. **Clinical Journal of Oncology Nursing**. v. 9, p. 317–320, 2005.

JORDAN, V.C. New insights into the metabolism of tamoxifen and its role in the treatment and prevention of breast cancer. **Steroids**. v. 72, p. 829–842, 2007.

KAKKAR, V.; MUPPU, S.K.; CHOPRA, K.; KAUR, I.P. Curcumin loaded solid lipid nanoparticles: an efficient formulation approach for cerebral ischemic reperfusion injury in rats. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. n. 85, p. 339–345, 2013.

KALDER, M.; HANS, D.; KYVERNITAKIS, I.; LAMY, O.; BAUER, M.; HADJI, P. Effects of Exemestane and Tamoxifen treatment on bone texture analysis assessed by TBS in comparison with bone mineral density assessed by DXA in women with breast cancer. **Journal of Clinical Densitometry**. v. 17, n. 1, p. 66–71, 2014.

KANAI, M.; IMAIZUMI, A.; OTSUKA, Y.; SASAKI, H.; HASHIGUCHI, M.; TSUJIKO, K.; MATSUMOTO, S.; ISHIGURO, H.; CHIBA, T. Dose-escalation and pharmacokinetic study of nanoparticle curcumin, a potential anticancer agent with improved bioavailability, in healthy human volunteers. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**. v. 69, n. 1, p. 65–70, 2012.

KANTER-LEWENSOHN, L.; GIRNITA, L.; GIRNITA, A.; DRICU, A.; OLSSON, G.; LEECH, L.; NILSSON, G.; HILDING, A.; WEJDE, J.; BRISMAR, K.; LARSSON, O.

Tamoxifen-induced cell death in malignant melanoma cells: possible involvement of the insulin-like growth factor-1 (IGF-1) pathway. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 165, n. 1-2, p. 131-137, 2000.

KAPSE, S.V.; GAIKWAD, R.V.; SAMAD, A.; DEVARAJAN, P.V. Self nanoprecipitating preconcentrate of tamoxifen citrate for enhanced bioavailability. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 429, n. 1-2, p. 104-112, 2012.

KAREWICZ, A.; BIELSKA, D.; GZYL-MALCHER, B. KEPCZYNSKI, M.; LACH, R.; NOWAKOWSKA, M. Interaction of curcumin with lipid monolayers and liposomal bilayers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 88, n. 1, p. 231-239, 2011.

KAUR, H.; BAL, A.; SANDHIR, R. Curcumin supplementation improves mitochondrial and behavioral deficits in experimental model of chronic epilepsy. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 125, p. 55–64, 2014.

KEARNEY, N. ; MILLER, M.; MAGUIRE, R.; DOLAN, S.; MACDONALD, R.; MCLEOD, J.; MAHER, L.; SINCLAIR, L.; NORRIE, J.; WENGSTRÖM, Y. WISECARE +: Results of a European study of a nursing intervention for the management of chemotherapy-related symptoms. **European Journal of Oncology Nursing**. v. 12, n. 5, p. 443–448, 2008.

KELLY, C.M.; HORTOBAGYI, G.N. Adjuvant chemotherapy in early-stage breast cancer: What, When, and for Whom?. **Surgical Oncology Clinics of North America**. v. 19, n. 3, p. 649-668, 2010.

KHALIL, N.M.; NASCIMENTO, T.C.; CASA, D.M.; DALMOLIN, L.F.; MATTOS, A.C.; HOSS, I.; ROMANO, M.A.; MAINARDES, R.M. Pharmacokinetics of curcumin-loaded PLGA and PLGA-PEG blend nanoparticles after oral administration in rats. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 101, p. 353-360, 2012.

KHUROO, T.; VERMA, D.; TALEGAONKAR, S.; PADHI, S.; PANDA, A.K.; IQBAL, Z. Topotecan–tamoxifen duple PLGA polymeric nanoparticles: Investigation of in vitro, in vivo and cellular uptake potential. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 473, n. 1–2, p. 384–394, 2014.

KOJIMA, T.; ONOUE, S.; KATOH, F.; TERAOKA, R.; MATSUDA, Y.; KITAGAWA, S.; TSUHAKO, M. Effect of spectroscopic properties on photostability of tamoxifen citrate polymorphs. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 336, n. 2, p. 346–351, 2007.

KUDCHADKAR, R.; O'REGA, R.M. Aromatase inhibitors as adjuvant therapy for postmenopausal patients with early stage breast cancer. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. v. 55, p. 145-163, 2005.

KUMAR, S. S. D.; SURIANARAYANAN, M.; VIJAYARAGHAVAN, R.; MANDAL, A. B.; MACFARLANE, D. R. Curcumin loaded poly(2-hydroxyethyl methacrylate) nanoparticles from gelled ionic liquid – In vitro cytotoxicity and anti-cancer activity in SKOV-3 cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 51, p. 34–44, 2014.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 75, n. 1, p. 1–18, 2010.

LAO, C. D.; RUFFIN, M. T.; NORMOLLE, D.; HEATH, D. D.; MURRAY, S. I.; BAILEY, J. M.; BOGGS, M. E.; CROWELL, J.; ROCK, C. L.; BRENNER, D. E. Dose escalation of a curcuminoid formulation. **BMC complementary and alternative medicine** . v. 6, n. 1, p. 10-14, 2006.

LAZARUS, P.; BLEVINS-PRIMEAU, A. S.; ZHENG, Y.; SUN, D. Potential Role of UGT Pharmacogenetics in Cancer Treatment and Prevention: Focus on Tamoxifen. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 1155, p. 99-111, 2009.

LEE, J.H.; YEO, Y. Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. **Chemical Engineering Science**. v. 125, p. 75–84, 2015.

LI, H.L.; LIU, C.; DE COUTO, G.; OUZOUNIAN, M.; SUN, M.; WANG, A.B.; HUANG, Y.; HE, C.W.; SHI, Y.; CHEN, X.; NGHIEM, M.P.; LIU, Y.; CHEN, M.; DAWOOD, F.; FUKUOKA, M.; MAEKAWA, Y.; ZHANG, L.; LEASK, A.; GHOSH, A.K.; KIRSHENBAUM, L.A.; LIU, P.P. Curcumin prevents and reverses murine cardiac hypertrophy. **The Journal of clinical investigation**. v. 118, n. 3, p. 879–893, 2008.

LIM, Y.C.; DESTA, Z.; FLOCKHART, D.A.; SKAAR, T.C. Endoxifen (4-hydroxy-N-desmethyl-tamoxifen) has anti-estrogenic effects in breast cancer cells with potency similar to 4-hydroxy-tamoxifen. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**. v. 55, p. 471–478, 2005.

LIM, H.S.; LEE, H.J.; LEE, K.S.; LEE, E.S.; JANG, I.J.; RO, J. Clinical implications of CYP2D6 genotypes predictive of tamoxifen pharmacokinetics in metastatic breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**. v. 25, p. 3837–3845, 2007.

LIN, S. S.; LAI, K. C.; HSU, S. C.; YANG, J. S.; KUO, C. L.; LIN, J. P.; MA, Y. S.; WU, C. C.; CHUNG, J. G. Curcumin inhibits the migration and invasion of human A549 lung cancer cells through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). **Cancer Letters**. v. 285, n. 2, p. 127–133, 2009.

LIN, Y.L.; LIU, Y.K.; TSAI, N.M.; HSIEH, J.H.; CHEN, C.H.; LIN, C.M.; LIAO, K.W. A Lipo-PEG-PEI complex for encapsulating curcumin that enhances its antitumor effects on curcumin-sensitive and curcumin-resistance cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**. v. 8, n. 3, p. 318–327, 2012.

LIU, L. SUN, L. WU, Q; GUO, W.; LI, L.; CHEN, Y.; LI, Y.; GONG, C.; QIAN, Z.; WEI, Y. Curcumin loaded polymeric micelles inhibit breast tumor growth and spontaneous pulmonary metastasis. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 443, p. 175–182, 2013.

LIU, Q.; LOO W. T.Y.; SZE S.C.W.; TONG, Y. Curcumin inhibits cell proliferation of MDA-MB-231 and BT-483 breast cancer cells mediated by down-regulation of NFκB, cyclinD and MMP-1 transcription. **Phytomedicine**. v. 16, n. 10, p. 916–922, 2009.

LOPRESTI, A. L.; MAES, M.; MAKER, G. L.; HOOD, S. D.; DRUMMOND, P. D. Curcumin for the treatment of major depression: A randomised, double-blind, placebo controlled study. **Journal of Affective Disorders**. v. 167, p. 368–375, 2014.

MAKADIA, H.K.; SIEGEL S.J. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. **Polymers**, v. 3, p. 1377–1397, 2011.

MATSUOKA, H.; TSUBAKI, M.; YAMAZOE, Y.; OGAKI, M.; SATOU, T.; ITOH, T.; KUSUNOKI, T.; NISHIDA, S. Tamoxifen inhibits tumor cell invasion and metastasis in mouse melanoma through suppression of PKC/MEK/ERK and PKC/PI3K/Akt pathways. **Experimental Cell Research**. v. 315, n. 12, p. 2022–2032, 2009.

MAZZARINO, L.; SILVA, L.F.; CURTA, J.C.; LICÍNIO, M.A.; COSTA, A.; PACHECO, L.K.; SIQUEIRA, J.M.; MONTANARI, J.; ROMERO, E.; ASSREUY, J.; SANTOS-SILVA, M.C.; LEMOS-SENNA, E. Curcumin-loaded lipid and polymeric nanocapsules stabilized by nonionic surfactants: an in vitro and In vivo antitumor activity on B16-F10 melanoma and macrophage uptake comparative study. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. v. 7, n. 3, 2011.

MCCLAY, E.F.; MCCLAY, M.-E.T.; JONES, J.A.; WINSKI, P.J.; CHRISTEN, R.D.; HOWELL, S.B.; HALL, P.D. A phase I and pharmacokinetic study of high dose tamoxifen and weekly cisplatin in patients with metastatic melanoma. **Cancer**. v. 79, n. 5, p. 1037-1043, 1997.

MCCLAY, E.F.; MCCLAY, M.T.; MONROE, L.; JONES, J.A.; WINSKI, P.J. A phase II study of high dose tamoxifen and weekly cisplatin in patients with metastatic melanoma. **Melanoma Research**. v. 11, n. 3, p. 309-313, 2001.

MCDONALD, C.C.; ALEXANDER, F.E.; WHYTE, B.W.; FORREST, A.P.; STEWART, H.J. Cardiac and vascular morbidity in women receiving adjuvant tamoxifen for breast cancer in a randomised trial. **British Medical Journal**. v.7011, n. 311, p. 977–980, 1995.

MCPHERSON, K.; STEEL, C.M; . DIXON; J.M. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. **British Medical Journal**. v.7261, n.321, p. 624-628, 2000.

MENON, L.G.; KUTTAN, R.; KUTTAN, G. Inhibition of lung metastasis in mice induced by B16F10 melanoma cells by polyphenolic compounds. **Cancer Letters**. v. 95, n. 1-2, p. 221-225, 1995.

MENON, L.G.; KUTTAN, R.; KUTTAN, G. Anti-metastatic activity of curcumin and catechin. **Cancer Letters**. v. 141, n. 1-2 , p. 159-165, 1999.

MOCANU, E.V.; HARRISON R.F. Tamoxifen in gynaecology. **Gynaecological Practice**. v.4; p. 37-45; 2004.

MONTES, A.; OWLES, T.J.; O'BRIEN, M.E.; ASHLEY, S.E.; LUCKIT, J.; TRELEAVEN, J. A toxic interaction between mitomycin C and tamoxifen causing the haemolytic uraemic syndrome. **European Journal of Cancer**. v. 29A, n. 13, p. 1854-1857, 1993.

MORA-HUERTAS, C.E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery . **International Journal of Pharmaceutics**. v. 385, n. 1–2, p.113–142, 2010.

MOORTHI, C.; KUMAR, C. S.; MOHAN, S.; KRISHNAN, K.; KATHIRESAN, K. Application of validated RP–HPLC–PDA method for the simultaneous estimation of curcumin and piperine in Eudragit E 100 nanoparticles. **Journal of Pharmacy Research**. v. 7, n. 3, p. 224–229, 2013.

MÜLLER, R.H. **Colloidal Carriers for Controlled Drug Delivery and Targeting: Modification, Characterization and In Vivo Distribution**. 1. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 1991.

MUNSHI, A.; SINGH, P. Tamoxifen in breast cancer: not so easy to write off. **The Breast**. v. 17; p. 121-124; 2008.

NAKSURIYA, O.; OKONOJI, S.; SCHIFFELERS, R. M.; HENNINK, W.E. Curcumin nanoformulations: A review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment. **Biomaterials**. v. 35, n. 10, p. 3365–3383, 2014.

NASCIMENTO, T.C.; CASA, D.M.; DALMOLIN, L.F.; MATTOS, A.C.; KHALIL, N.M.; MAINARDES, R.M. Development and Validation of an HPLC Method Using Fluorescence Detection for the Quantitative Determination of Curcumin in PLGA and PLGA-PEG Nanoparticles. **Current Pharmaceutical Analysis**. v. 8, n. 4, p. 324-333, 2012.

NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE. What is nanotechnology?. Disponível em: <<http://www.nano.gov/nanotech-101/what/definition>>. Acesso em dez. de 2014.

NISHIYAMA, T.; OGURA, K.; NAKANO, H.; OHNUMA, T.; KAKU, T.; HIRATSUKA, A.; MURO, K.; WATABE, T. Reverse geometrical selectivity in glucuronidation and sulfation of cis- and trans-4-hydroxytamoxifens by human liver UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases. **Biochemical Pharmacology**. v. 63, n. 10, p. 1817-1830, 2002.

NOGUCHI, Y.; WU, J.; DUNCAN, R.; STROHALM, J.; ULBRICH, K.; AKAIKE, T.; MAEDA, H. Early phase tumor accumulation of macromolecules: a great difference in clearance rate between tumor and normal tissues. **Japanese Journal of Cancer Research**. v. 89, p. 307–314, 1998.

NOTARBARTOLO, M.; POMA, P.; PERRI, D.; DUSONCHET, L.; CERVELLO, M.; D'ALESSANDRO, N. Antitumor effects of curcumin, alone or in combination with cisplatin or doxorubicin, on human hepatic cancer cells. Analysis of their possible relationship to changes in NF- κ B activation levels and in IAP gene expression. **Cancer Letters**. v. 224, n. 1, p. 53–65, 2005.

ODOT, J.; ALBERT, P.; CARLIER, A.; TARPIN, M.; DEVY, J.; MADOULET, C. In vitro and in vivo anti-tumoral effect of curcumin against melanoma cells. **Internacional Jornal of Cancer**. v. 111, n. 3, p. 381-387, 2004

OHKOUCHI, K.; IMOTO, H.; TAKAKURA, Y.; HASHIDA, M.; SEZAKI, H. Disposition of anticancer drugs after bolus arterial administration in a tissue-isolated tumor perfusion system. **Cancer Research**. v. 50, p. 1640–1644, 1990.

PADILLA, S.L.; RODRIGUEZ, A.; GONZALES, M.M.; GALLEGOS, G.J.; CASTANO, O.J. Inhibitory effects of curcumin on dengue virus type 2-infected cells in vitro. **Archives Virology**. v. 159, n. 3, p. 573–579, 2014.

PANDEY, S. K.; GHOSH, S.; MAITI, P.; HALDAR, C. Therapeutic efficacy and toxicity of tamoxifen loaded PLA nanoparticles for breast cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 72, p. 309–319, 2015.

PEDROSO, L.S.; FÁVERO, G.M.; DE CAMARGO, L.E.; MAINARDES, R.M.; KHALIL, N.M. Effect of the o-methyl catechols apocynin, curcumin and vanillin on the cytotoxicity activity of tamoxifen. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**. v. 28, n. 4, p. 734-40, 2013.

PODDUTURI, V. P.; MAGAÑA, I. B.; O'NEA, D. P.; DEROSA, P. A. Simulation of transport and extravasation of nanoparticles in tumors which exhibit enhanced permeability and retention effect. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**. v. 112, n. 1, p. 58–68, 2013.

PONZONE, R.; BIGLIA, N.; JACOMUZZI, M.E.; MARIANI, L.; DOMINGUEZ, A.; SISMONDI, P. Antihormones in prevention and treatment of breast cancer. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 1089, p. 143–158, 2006.

PRASAD, S.; GUPTA, S. C.; TYAGI, A. K.; AGGARWAL, B. B. Curcumin, a component of golden spice: From bedside to bench and back. **Biotechnology Advances**. v. 32, n. 6, p. 1053–1064, 2014.

PRASANNA, R.; CHANDRAMOORTHY, H. C.; RAMAIYAPILLAI, P.; SAKTHISEKARAN, D. In vitro evaluation of anticancer effect of *Cassia auriculata* leaf extract and curcumin through induction of apoptosis in human breast and larynx cancer cell lines. **Biomedicine & Preventive Nutrition**. v. 1, n. 2, p. 153-160, 2011.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RAO, J.P.; GECKELER, K.E. Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**. v. 36, n. 7, p. 887–913, 2011.

RAVINDRAN, J.; PRASAD, S.; AGGARWAL, B. B. Curcumin and Cancer Cells: How Many Ways Can Curry Kill Tumor Cells Selectively. **American Association of Pharmaceutical Scientists**. v. 11, n. 3, p. 495-510, 2009.

RIBEIRO, M. P. C.; SANTOS, A. E.; CUSTÓDIO, J. B. A. Mitochondria: The gateway for tamoxifen-induced liver injury. **Toxicology**. v. 323, n. 2, p. 10-18, 2014.

RIBEIRO, M.P.C.; NUNES-CORREIA, I.; SANTOS A.E.; CUSTÓDIO J.B.A. The combination of glutamate receptor antagonist MK-801 with tamoxifen and its active metabolites potentiates their antiproliferative activity in mouse melanoma K1735-M2 cells. **Experimental Cell Research**. v. 321, n. 2, p. 288–296, 2014.

RIBEIRO, M.P.C.; SILVA, F.S.G.; PAIXÃO, J.; SANTOS A.E.; CUSTÓDIO J.B.A. The combination of the antiestrogen endoxifen with all-trans-retinoic acid has anti-proliferative and anti-migration effects on melanoma cells without inducing significant toxicity in non-neoplastic cells. **European Journal of Pharmacology**. v. 715, n. 1–3, p. 354–362, 2013.

RUTTALA, H. B.; KO, Y. T. Liposomal co-delivery of curcumin and albumin/paclitaxel nanoparticle for enhanced synergistic antitumor efficacy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v.128, p. 419–426, 2015.

SAHOO, S.K.; PARVEEN, S.; PANDA, J.J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**. v. 3, n. 1, p. 20-31, 2007.

SALAMI, S.; KARAMI-TEHRANI, F. Biochemical studies of apoptosis induced by tamoxifen in estrogen receptor positive and negative breast cancer cell lines. **Clinical Biochemistry**. v. 36, n. 4, p. 247–253, 2003.

SARISOZEN, C.; ABOUZEID, A. H.; TORCHILIN, V. P. The effect of co-delivery of paclitaxel and curcumin by transferrin-targeted PEG-PE-based mixed micelles on resistant ovarian cancer in 3-D spheroids and in vivo tumors. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 88, n. 2, p. 539–550, 2014.

SCHWARTZ, G.F.; BARTELINK, H.; BURSTEIN, H.J.; CADY, B.; CATALIOTTI, L.; FENTIMAN, I.S.; HOLLAND, R.; HUGHES, K.S.; MASOOD, S.; MCCORMICK, B.; PALAZZO, J.A.; PRESSMAN, P.I.; REIS-FILHO, J.; PUSZTAI, L.; RUTGERS, E.J.; SEIDMAN, A.D.; SOLIN, L.J.; SPARANO, J.A. Adjuvant therapy in stage I carcinoma of the breast: the influence of multigene analyses and molecular phenotyping. **Breast Journal**. v. 18, n. 4, p. 303–311, 2012.

SHARIF, T.R.; SHARIF, M. A novel approach for examining the anti-proliferative effect of protein kinase C inhibitors against human astrocytoma cells. **International Journal of Oncology**. v. 13, n. 4, p. 685-692, 1998.

SHARMA, R. A.; EUDEN, S. A.; PLATTON, S. L.; COOKE, D. N.; SHAFAYAT, A.; HEWITT, H. R.; MARCZYLO, T. H.; MORGAN, B.; HEMINGWAY, D.; PLUMMER, S. M.; PIRMOHAMED, M; GESCHER, A. J.; STEWARD, W. P. Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. **Clinical Cancer Research**. v. 10, n. 20, p. 6847–6854, 2004.

SHENOY, D. B.; AMIJI, M. M. Poly(ethylene oxide)-modified poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 293, n. 1–2, p. 261–270, 2005.

SHI, M.; CAI, Q.; YAO, L.; MAO, Y.; MING, Y.; OUYANG, G. Antiproliferation and apoptosis induced by curcumin in human ovarian cancer cells. **Cell Biology International**. v.30, n.3, p.221-226, 2006.

SHOBA, G.; JOY, D.; JOSEPH, T.; MAJEED, M.; RAJENDRAN, R.; SRINIVAS, P. S. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. **Planta Medica**. v. 64, n. 4, p. 353–356, 1998.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 48, p. 139-157, 2001.

SILVA-BUZANELLO, R. A.; FERRO, A. C. ; BONA, E.; CARDOZO-FILHO, L.; ARAÚJO, P, H. H.; LEIMAN, F. V. ; GONÇALVES, O. H. Validation of an Ultraviolet-visible (UV-Vis) technique for the quantitative determination of curcumin in poly(l-lactic acid) nanoparticles. **Food Chemistry**. v. 172, p. 99–104, 2015.

SILVA, M. M. C., MADEIRA, V. M. C., ALMEIDA, L. M., CUSTÓDIO, J. B. A. Hemolysis of human erythrocytes induced by tamoxifen is related to disruption of membrane structure. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1464, p. 49-61, 2000.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006.

SINGH, M.; SINGH, N. Molecular mechanism of curcumin induced cytotoxicity in human cervical carcinoma cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 325, n. 1–2, p. 107–119, 2009.

SINGH, R.; LILLARD, JR. J. W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Experimental and Molecular Pathology**. v. 86, n. 3, p.215–23, 2009.

SKINNER, S.A.; TUTTON, P.J.; O'BRIEN, P.E. Microvascular architecture of experimental colon tumors in the rat. **Cancer Research**. v. 50, p. 2411–2417, 1990.

SMITH, R.E.; GOOD, B.C. Chemoprevention of breast cancer and the trials of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project and others. **Endocrine Related Cancer**. v. 10, p. 347–357, 2003.

SOTIRIOU, C.; NEO, S.Y.; MCSHANE, L.M. KORN, E.L.; LONG, P.M.; JAZAERI, A.; MARTIAT, P.; FOX, S.B.; HARRIS, A.L.; LIU, E.T. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 100, n. 18, p. 10393–10398, 2003.

STEARNS, V.; JOHNSON, M.D.; RAE, J.M.; MOROCHO, A.; NOVIELLI, A. BHARGAVA, P.; HAYES, D.F.; DESTA, Z.; FLOCKHART, D.A. Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 95, p. 1758–1764, 2003.

STRIMPAKOS, A.S.; SHARMA, R.A. Curcumin: preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials. **Antioxidants & Redox Signaling**. v. 10, n. 3, p. 511–545, 2008.

SUBHASHINI, CHAUHAN, P.S.; KUMARI, S.; KUMAR, J.P.; CHAWLA, R.; DASH, D.; SINGH, M.; SINGH, R. Intranasal curcumin and its evaluation in murine model of asthma. **International Immunopharmacology**. v. 17, n. 3, p. 733–743, 2013.

SUWALSKY, M.; HERNANDEZ, P.; VILLENA, F.; AGUILAR, F.; SOTOMAYOR, C.P. Interaction of the anticancer drug tamoxifen with the human erythrocyte membrane and molecular models. **Zeitschrift für Naturforschung C**. v. 53, n. 3-4, p. 182–190, 1998.

SYED, H. K.; LIEW, K. B.; LOH, G.O.K.; PEH, K.K. Stability indicating HPLC–UV method for detection of curcumin in *Curcuma longa* extract and emulsion formulation. **Food Chemistry**. v. 170, p. 321–326, 2015.

THANGARAJU, M.; EZHILARASI, R.; SACHDANANDAM, P. Effect of tamoxifen on erythrocyte membrane lipids, lipid peroxides, and antioxidant enzymes in breast cancer women. **Cancer Biochemistry and Biophysics**, v. 14, n. 4, p. 297–302, 1995.

TIAN, H.; TANG, Z.; ZHUANG, XIULI.; CHEN, XUESI.; JING, X. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. **Progress in Polymer Science**. v. 37, p. 237–280, 2012.

TOMAO, S.; ROMITI, A.; MASSIDDA, B.; TIONTA, M.; FARRIS, A.; ZULLO, A.; BRESCIA, A.; SANTUARI, L.; FRATI, L. A phase II study of gemcitabine and tamoxifen in advanced pancreatic cancer. **Anticancer Research**. v. 22, n. 4, p. 2361–2364, 2002.

TØNNESEN, H.H.; KARLSEN, J.; VAN HENEGOUWEN, G.B. Studies on curcumin and curcuminoids. VIII. Photochemical stability of curcumin. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**. v. 183, n. 2, p. 116–122, 1986.

VANDERHOFF, J.W.; EL-AASSER, M.S.; UGELSTAD, J. Polymer emulsification process. US Patent 4,177,177, 1979.

VASSILAKOPOULOU, M.; PSYRRI, A.; ARGIRIS, A. Targeting angiogenesis in head and neck cancer. **Oral Oncology**. 2015.

VIEIRA, F. P.; REDIGUIERI, C. F.; REDIGUIERI, C. F. A Regulação de Medicamentos no Brasil. Porto Alegre: Artmed, 2013.

VILLAFLORESA, O. B.; CHEN, Y.J.; CHEN, C. P.; YEH, J. M.; WU, T. Y. Effects of curcumin and demethoxycurcumin on amyloid- β precursor and tau proteins through the internal ribosome entry sites: A potential therapeutic for Alzheimer's disease. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 51, n. 4, p. 554–564, 2012.

VOGEL, H.A.; PELLETIER, J. Curcumin-biological and medicinal properties **Journal of Pharmacology**. v. 2, p. 50. 1815.

WANG, Y. J.; PAN, M. H.; CHENG, A. L.; LIN, L. I. ; HO, Y. S.; HSIEH, C. Y.; LIN, J. K. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** . v. 15, n. 12, p. 1867–1876, 1997.

WEISBERG, S.P.; LEIBEL, R.; TORTORIELLO, D.V. Dietary curcumin significantly improves obesity-associated inflammation and diabetes in mouse models of diabetes. **Endocrinology**. v. 149, n. 7, p. 3549–3558, 2008.

WEN, Y-D.; HO, Y-L.; SHIAU, R-J.; YEH, J-K.; WU, J-Y.; WANG, W-L.; CHIOU, S-J. Synergistic antitumor effect of curcumin and dinitrosyl iron complexes for against melanoma cells. **Journal of Organometallic Chemistry**. v. 695, n. 3, p. 352–3591, 2010.

WINER, E.P.; HUDIS, C.; BURSTEIN, H.J.; WOLFF, A.C.; PRITCHARD, K.I.; INGLE, J.N.; CHLEBOWSKI, R.T.; GELBER, R.; EDGE, S.B.; GRALOW, J.; COBLEIGH, M.A.; MAMOUNAS, E.P.; GOLDSTEIN, L.J.; WHELAN, T.J.; POWLES, T.J.; BRYANT, J.; PERKINS, C.; PEROTTI, J.; BRAUN, S.; LANGER, A.S.; BROWMAN, G.P.; SOMERFIELD, M.R. American Society of Clinical Oncology technology assessment on the use of aromatase inhibitors as adjuvant therapy for postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer: status report 2004. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 3, p. 619–629, 2005.

WONG, C.; CHEN, S. The development, application and limitations of breast cancer cell lines to study tamoxifen and aromatase inhibitor resistance. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. v. 131, n. 3–5, p. 83–89, 2012.

YADAV, V.R.; PRASAD, S.; KANNAPPAN, R.; RAVINDRAN, J.; CHATURVEDI, M.M.; VAAHTERA, L.; PARKKINEN, J.; AGGARWAL, B.B. Cyclodextrin-complexed curcumin exhibits anti-inflammatory and antiproliferative activities superior to those of curcumin through higher cellular uptake. **Biochem Pharmacol**. n. 80, p. 1021–1032, 2010.

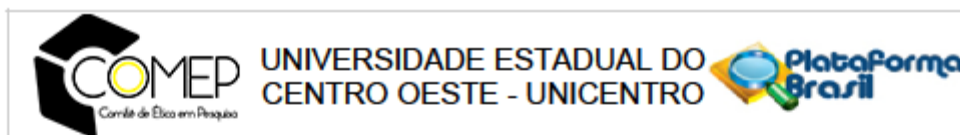
YALLAPU, M.M.; GUPTA, B.K.; JAGGI, M.; CHAUHAN, S.C. Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 351, n. 1, p. 19–29, 2010,

YANG, J.; SONG, S.; LI, J.; LIANG, T. Neuroprotective effect of curcumin on hippocampal injury in 6-OHDA-induced Parkinson's disease rat. **Pathology - Research and Practice**. v. 210, n. 6, p. 357–362, 2014.

ZHANG, L.; REN, X.; CHENG, YAN.; HUBER-KEENER, K.; LIU, X.; ZHANG, YI.; YUAN, Y.-S.; YANG, J.W.; LIU, C.-G.; YANG, JIN-M. Identification of Sirtuin 3, a mitochondrial protein deacetylase, as a new contributor to tamoxifen resistance in breast cancer cells. **Biochemical Pharmacology**. v. 86, n. 6, p. 726–733, 2013.

ZHOU, Q.-M.; WANG, X.-F.; LIU, X.-J.; ZHANG, H.; LU, Y.-Y.; SU, S.-B. Curcumin enhanced antiproliferative effect of mitomycin C in human breast cancer MCF-7 cells in vitro and in vivo. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 32 p. 1402–1410, 2011.

ANEXO A - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da citotoxicidade de nanopartículas de álcool perílico, tamoxifeno e de curcumina.

Pesquisador: Loriangela Marcell Dalposso

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 36390714.0.0000.0106

Instituição Proponente: Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 840.169

Data da Relatoria: 20/10/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se da apreciação do projeto de pesquisa intitulado Avaliação da citotoxicidade de nanopartículas de álcool perílico, tamoxifeno e de curcumina., de interesse e responsabilidade do(a) proponente Loriangela Marcell Dalposso.

Entre os compostos amplamente estudados para o tratamento do câncer, podemos citar o tamoxifeno e a curcumina. Porém essas substâncias possuem limitações como efeitos colaterais e baixa biodisponibilidade, respectivamente. Pedroso et al., (2013), demonstraram uma diminuição da toxicidade sobre células normais e uma potencialização do efeito do tamoxifeno sobre células tumorais quando associado com a curcumina.

Assim a associação desses compostos seria uma estratégia promissora para o tratamento do câncer. O álcool perílico um constituinte do óleo essencial do d-limoneno, também está sendo estudado sobre linhagens tumorais, apresentando bons resultados. A nanotecnologia pode ser utilizada para melhorar as características desses compostos tendo um grande potencial para diminuir a toxicidade do tamoxifeno e melhorar a biodisponibilidade da curcumina, além de proporcionar uma liberação controlada em um menor número de doses.

O sangue total será coletado, de três indivíduos voluntários sadios recrutados no laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica, em tubo com 10 ml de heparina, o qual será centrifugado a 4°C.

Endereço: Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 03 - Campus CEDETEG - (ao lado do Departamento de Nutrição)
Bairro: Vila Carlí **CEP:** 85.040-080
UF: PR **Município:** GUARAPUAVA
Telefone: (42)3629-8177 **Fax:** (42)3629-8100 **E-mail:** comep_unicentro@yahoo.com.br



Continuação do Parecer: 840.169

(1200g por 5 min), retirando-se o plasma. Em seguida serão realizadas às análises de atividade citotóxica.

Objetivo da Pesquisa:

Associar a curcumina e o CTAM em nanopartículas com finalidade de reduzir a toxicidade sobre hemácias e leucócitos polimorfonucleares (LPMN). Avaliar a toxicidade de nanopartículas contendo POH sobre hemácias.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Utilizando de maneira correta as técnicas de biossegurança, as chances de contaminação são mínimas. O voluntário sentirá apenas um pequeno desconforto pela introdução da agulha. No caso da formação de hematoma ou abscesso cutâneo, o pesquisador tomará todas as providências para minimizar os efeitos da picada. Não envolve riscos para a saúde física ou psicológica. Será coletado aproximadamente 5 mL de sangue de cada participante.

Benefícios: O desenvolvimento de nanopartículas de CTAM e curcumina é benéfico, pois pode ser capaz de reduzir os efeitos tóxicos do CTAM sobre células normais e ampliar a atividade antitumoral da curcumina e do CTAM em células tumorais. As nanopartículas podem também aumentar os efeitos benéficos do POH, sem efeitos prejudiciais as células normais.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresenta tema relevante, os objetivos são bem definidos e condizentes ao título e a metodologia está bem descrita. Participarão da coleta de sangue 3 indivíduos saudáveis. A pesquisa apresenta orçamento de R\$73,00 que será financiado pela própria pesquisadora. A coleta de dados está prevista para 21/11/2014 à 22/11/2014.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- (1) Folha de rosto: Apresenta assinatura da pesquisadora responsável, e do vice-chefe do departamento de farmácia da UNICENTRO.
- (2) Carta de anuência: Apresenta autorização para utilização do laboratório de nanotecnologia farmacêutica da UNICENTRO, com assinatura do coordenador.
- (3) TCLE: Se apresenta em forma de convite.
- (4) Cronograma: Adequado.
- (5) Orçamento: Completo e com financiamento próprio.
- (6) Projeto completo: Adequado.

Endereço: Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 03 - Campus CEDETEG - (ao lado do Departamento de Nutrição)
 Bairro: Vila Carlí CEP: 85.040-080
 UF: PR Município: GUARAPUAVA
 Telefone: (42)3629-8177 Fax: (42)3629-8100 E-mail: comep_unicentro@yahoo.com.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO
CENTRO OESTE - UNICENTRO



Continuação do Parecer: 840.169

(7) Instrumento para coleta dos dados: Não se aplica.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

PARECER APROVADO: a presente pesquisa está em conformidade com a Resolução 466/2012.

A vigência da pesquisa é de: 21/11/2014 à 12/12/2014.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

PROJETO APROVADO

Em atendimento à Resolução CNS/MS- 466/2012, deverá ser encaminhado ao CEP o relatório parcial assim que tenha transcorrido um ano da pesquisa e relatório final em até trinta dias após o término da pesquisa.

Qualquer alteração no projeto deverá ser encaminhada para análise deste comitê.

GUARAPUAVA, 21 de Outubro de 2014

Assinado por:
Tatiane Baratieri
(Coordenador)

Endereço: Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 03 - Campus CEDETEG - (ao lado do Departamento de Nutrição)
Bairro: Vila Carlí **CEP:** 85.040-080
UF: PR **Município:** GUARAPUAVA
Telefone: (42)3629-8177 **Fax:** (42)3629-8100 **E-mail:** comep_unicentro@yahoo.com.br