



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – IB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E
NANOBIOTECNOLOGIA

FERNANDA ALTINO SILVESTRE

**NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CONTENDO CURCUMINA:
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL EM CÉLULAS DE CÂNCER
DE MAMA E DA HEPATOCOMPATIBILIDADE EM CAMUNDONGOS**

Brasília-DF
2024

FERNANDA ALTINO SILVESTRE

**NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CONTENDO CURCUMINA:
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL EM CÉLULAS DE CÂNCER
DE MAMA E DA HEPATOCOMPATIBILIDADE EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para a obtenção de título de Doutora em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Marcella Lemos Brettas Carneiro

Brasília-DF
2024

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ae Altino Silvestre, Fernanda
ESTUDO DE BIOCOMPATIBILIDADE E BIODISTRIBUIÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CONTENDO CURCUMINA EM
ADENOCARCINOMA MAMÁRIO / Fernanda Altino Silvestre;
orientador Marcella Lemos Brettas Carneiro. -- Brasília,
2024.
64 p.

Tese(Doutorado em Nanociência e Nanobiotecnologia) --
Universidade de Brasília, 2024.

1. Nanopartículas. 2. Curcumina. 3. Biocompatibilidade.
4. ; Biodisponibilidade. 5. Câncer de mama. I. Lemos
Brettas Carneiro, Marcella, orient. II. Título. |

Folha da aprovação

A Comissão Examinadora, abaixo identificada, avaliará o Trabalho de Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação Stricto Sensu da Universidade de Brasília.

Prof^a. Dr^a. Marcella Lemos Brettas Carneiro
Universidade de Brasília (UnB)
Orientadora e Presidente da banca

Prof. Dra. Laíse Rodrigues de Andrade
Universidade de Brasília (UnB)
Examinador e Membro interno

Prof. Dra. Suélia Rodrigues Siqueira Fleury Rosa
Universidade de Cornell/EUA
Examinador e Membro externo à UnB

Dra. Mariana Campos da Paz Lopes
Universidade Federal de São João del Rei
Examinador e Membro externo à UnB

Prof. Dra. Glécia Virgolino da Silva Luz
Universidade de Brasília (UnB)
Suplente e membro externo ao PPGNANO

(...) Pois a loucura de Deus é mais sábia do que os homens, e a fraqueza de Deus é mais forte do que os homens (1Coríntios 1:25).

"É preciso abandonar o futuro nas mãos do Bom Deus...Nada acontece que Deus não tenha previsto desde toda a eternidade" (Sta. Teresinha do menino Jesus).

Agradecimentos

Agradeço imensamente pelas bênçãos derramadas por Deus e pela intercessão de Nossa Senhora, que sempre esteve presente em minha vida, rogando por mim e pelos anseios do meu coração. Ela levou todas as minhas intenções ao Sagrado Coração de Jesus, e, com o coração repleto de louvor e gratidão, hoje posso contemplar cada um dos Seus feitos. Em cada circunstância, por meio do Seu Espírito Santo, e sendo eu tão pequena, Ele me concedeu as forças necessárias para superar os desafios ao longo de minha vida e em toda a minha trajetória acadêmica.

Sou profundamente grata à minha família, que sempre me apoiou e acreditou no meu potencial. Mesmo diante das adversidades, minha família sempre me mostrou um horizonte cheio de esperança, incentivando-me a vencer cada obstáculo que surgisse. Agradeço, de maneira especial, aos meus pais, Sueli e Silvestre, os meus maiores amores nesta terra, que, com imenso sacrifício, dedicaram-se incansavelmente a me ensinar os valores essenciais da honra e da verdade. O amor incondicional, a dedicação e os ensinamentos que recebi de ambos foram fundamentais para minha formação como pessoa e para a trajetória que hoje celebro. Sou eternamente grata por tudo o que fizeram por mim, sempre me guiando com sabedoria, firmeza e generosidade. Através do exemplo que me deram, pude compreender o verdadeiro significado de princípios que orientam uma vida íntegra e repleta de valores.

Em especial, agradeço à minha sobrinha-filha, que, com sua presença iluminada, me ensina a cada dia que a vida é uma constante escola de amor. Seu amor, alegria e sabedoria espontânea têm sido uma fonte constante de inspiração e aprendizado, ensinando-me a valorizar o que é verdadeiramente importante e a vivenciar o amor de maneira plena e incondicional. Sou imensamente grata por tê-la em minha vida.

Expresso minha sincera gratidão à professora Marcella Lemos Brettas, que, com sua constante disponibilidade e abordagem pedagógica, contribuiu de maneira significativa para o êxito deste projeto, tanto no âmbito científico quanto pessoal. Sua orientação foi fundamental para o meu crescimento acadêmico, proporcionando-me um aprendizado profundo, enriquecedor e perspicaz, que certamente terá um impacto duradouro em minha trajetória.

Às minhas amigas de infância, as “amigonas”, e em especial à Dayane e à Camila, agradeço a amizade constante ao longo de toda a minha vida. Embora a distância possa nos separar fisicamente, nossa amizade continua sólida, e cada uma de nós torce pela outra, independentemente da distância.

Agradeço também à parceria e amizade de Alícia S. Ombredane, uma amizade que ficará marcada no meu período de doutorado. Sua presença foi um apoio essencial durante esse processo.

Ao Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada da Universidade de Brasília (NuPMIA) – Faculdade de Medicina, agradeço profundamente pelas valiosas contribuições e pela amizade do professor José Leite e dos técnicos Daniel, Glorinha e Wanessa, cujas colaborações foram essenciais para o andamento das minhas pesquisas.

Agradeço igualmente ao Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília, em especial aos alunos do programa e egressos, como Rayane, Alan, Willie, Joabe, Thyago

Pacheco, Victor Mello, Athaide, Daniele Galdino e Walber, que me ajudaram direta e indiretamente com sua amizade e com as demandas exigidas pelos experimentos científicos.

À técnica, em especial à Karen, sou grata pela dedicação na execução dos trabalhos técnicos laboratoriais, sempre com competência e comprometimento.

A professora Heloísa e sua equipe do Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Medicina também merecem minha profunda gratidão pelo conhecimento acadêmico e científico que me orientaram em diversas situações.

Aos professores do Departamento de Genética e Morfologia, do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, expresso minha sincera gratidão, em especial aos professores Sasha Brawn Chaves, Mônica Garcia, Ricardo Bentes, Laíse Andrade e Graziella Joanitti, por todo o ensinamento e profissionalismo que sempre demonstraram.

Ao grupo e aos membros do Laboratório de Compostos Bioativos e Nanobiotecnologia (LCBNano), sinto-me honrada em fazer parte dessa equipe da Universidade de Brasília. Em especial, agradeço à Carolina Ramos e à Thamis, que se tornaram grandes amigas e me incentivaram a continuar no doutorado. Também agradeço à equipe da Sociedade Internacional de Engenheiros Biomédicos (EMBS) pela compreensão e apoio neste período desafiador.

Sou igualmente grata ao Programa de Nanociência e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília, pelo apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), que tornaram este percurso acadêmico possível.

Aos irmãos da Comunidade Católica Shalom, agradeço de coração pelo apoio espiritual e pelas orações. Sua presença, de forma direta ou indireta, foi um sustento importante para a minha caminhada. Em especial, agradeço às autoridades da missão Brasília, minhas formadoras espirituais, Vivian Freire e Elineusa Amorim, que sempre me orientaram de forma humana e espiritual, e à Dra. Patrícia Oliveira, pela sua dedicação e pronto atendimento em sempre ajudar de forma profissional ou espiritual, com suas orações.

Por fim, gostaria de expressar minha gratidão à empresa Renapsi Demà Jovem, em especial à Diretora Educacional Rayane e à Keyla, Especialista em Educação, pelo suporte e contribuição. Agradeço também ao polo educacional de Brasília e aos tutores da plataforma, com os quais tenho o privilégio de colaborar, e aos quais sou imensamente grato.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para o meu crescimento pessoal, acadêmico e profissional, meu mais sincero agradecimento.

RESUMO

A baixa solubilidade da curcumina em sistemas aquosos resultam em sua rápida metabolização e degradação no organismo, o que limita sua eficácia terapêutica. Para superar isso, a nanotecnologia surge como uma solução promissora, melhorando sua solubilidade, estabilidade, biodisponibilidade e direcionamento específico à células-alvo. Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) são carreadores lipídicos nanoestruturados promissores para o encapsulamento de bioativos como a curcumina, visto que podem prevenir sua degradação química, favorecendo sua biodisponibilidade e sua liberação sustentada. Neste estudo, avaliou-se a biocompatibilidade de curcumina livre (CURC) ou associada a nanopartículas lipídicas sólidas (NLMC) em modelos de cultura de células de carcinoma mamário e sua hepatocompatibilidade em camundongos. NLMC foram formuladas a partir da manteiga de murumuru, uma castanha nativa da Amazônia. O uso de nanopartículas lipídicas sólidas contendo curcumina, aliado à exploração da manteiga de murumuru (*Astrocaryum murumuru*), consiste em uma abordagem estratégica e inovadora para aplicação em câncer de mama. O uso inovador de recursos naturais promove avanços tecnológicos que integram bioeconomia e sustentabilidade, atendendo à demanda por soluções que valorizam a biodiversidade brasileira e geram benefícios econômicos e sociais. Nos ensaios *in vitro* de citotoxicidade, observou-se que os tratamentos com curcumina livre (CURC) e encapsulada em nanopartículas lipídicas sólidas (NLMC) alteraram a viabilidade celular em linhagens de células tumorais (MCF-7 e 4T1) e saudáveis (NIH3-3T3), especialmente após 48 horas de tratamento. Observou-se que NLMC foi menos citotóxica para células saudáveis em comparação com células tumorais, embora o perfil de citotoxicidade entre as duas linhagens de células tumorais tenha sido semelhante. Em relação aos ensaios *in vivo* notou-se que os tratamentos com CURC e NLMC não resultaram em alterações significativas no peso corpóreo e nos órgãos (rins, fígado, baço, coração, pulmão e intestino) de camundongos Balb/c saudáveis ou portadores de carcinoma mamário. Além disso, não se observou outras alterações clínicas. Também não foram observadas alterações histopatológicas nos órgãos analisados. Assim, os tratamentos com CURC ou NLMC resultaram em boa biocompatibilidade. Ademais, realizou-se análises cromatográficas e espectrofotométricas para quantificação de curcumina no fígado dos camundongos. Observou-se um aumento na concentração de curcumina após 30 minutos de tratamento, ao passo que este efeito ocorreu apenas após 6 e 12 horas de tratamento com NLMC. Isso indica que quando a curcumina foi nanoestruturada observou-se uma liberação prolongada do bioativo. Portanto, concluiu-se que NLMC aumentaram a biodisponibilidade da curcumina no fígado e apresentaram excelente biocompatibilidade, destacando seu potencial como uma abordagem promissora para o tratamento do câncer de mama.

PALAVRAS-CHAVE: Carreadores Lipídicos; *Curcuma longa*; Manteiga de murumuru; Biocompatibilidade; Biodistribuição. Métodos analíticos.

ABSTRACT

The low solubility of curcumin in aqueous systems leads to its rapid metabolism and degradation in the body, limiting its therapeutic efficacy. To overcome this, nanotechnology emerges as a promising solution, improving its solubility, stability, bioavailability, and specific targeting to target cells. Solid Lipid Nanoparticles (SLNs) are promising nanostructured lipid carriers for the encapsulation of bioactives such as curcumin, as they can prevent its chemical degradation, enhancing its bioavailability and sustained release. This study assessed the biocompatibility of free curcumin (CURC) or curcumin associated with solid lipid nanoparticles (SLNC) in breast cancer cell culture models and its hepatocompatibility in mice. SLNCs were formulated from murumuru butter, a native Amazonian nut. The use of solid lipid nanoparticles containing curcumin, coupled with the exploration of murumuru butter (*Astrocaryum murumuru*), represents a strategic and innovative approach for breast cancer application. The innovative use of natural resources promotes technological advancements that integrate bioeconomy and sustainability, meeting the demand for solutions that value Brazilian biodiversity and generate economic and social benefits. In the *in vitro* cytotoxicity assays, it was observed that treatments with free curcumin (CURC) and curcumin encapsulated in solid lipid nanoparticles (SLNC) altered cell viability in tumor cell lines (MCF-7 and 4T1) and healthy cells (NIH3T3), especially after 48 hours of treatment. It was observed that SLNC was less cytotoxic to healthy cells compared to tumor cells, although the cytotoxicity profile between the two tumor cell lines was similar. Regarding the *in vivo* assays, it was noted that treatments with CURC and SLNC did not result in significant changes in body weight or in organs (kidneys, liver, spleen, heart, lungs, and intestine) of healthy or breast cancer-bearing Balb/c mice. Furthermore, no other clinical changes were observed. Histopathological changes in the analyzed organs were also not observed. Thus, treatments with CURC or SLNC showed good biocompatibility. Additionally, chromatographic and spectrophotometric analyses were conducted to quantify curcumin in the liver of the mice. An increase in curcumin concentration was observed after 30 minutes of treatment, while this effect occurred only after 6 and 12 hours of treatment with SLNC. This indicates that when curcumin was nano-structured, a prolonged release of the bioactive was observed. Therefore, it was concluded that SLNCs increased the bioavailability of curcumin in the liver and showed excellent biocompatibility, highlighting their potential as a promising approach for breast cancer treatment.

KEYWORDS: Nanocarrier; *Curcuma longa*; Murumuru butter; Biocompatibility; Biodistribution; Hepatocompatibility; Mammary Adenocarcinoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mecanismo anticancerígeno da curcumina biodisponível contra vários tipos de câncer.....	15
Figura 2 Desenho experimental do estudo.	23
Figura 3: Esquema Experimental dos Grupos de Tratamento e Tempos de Análise em Modelos Animais de Adenocarcinoma Mamário.....	24
Figura 4 - Resumo gráfico dos métodos utilizados nos estudos in vivo.	25
Figura 5: Análise de viabilidade celular pelo método MTT em células da linhagem NIH-3T3.	39
Figura 6: Análise de Viabilidade Celular pelo método de MTT em células da linhagem 4T1.41	
Figura 7: Análise da Viabilidade Celular pelo método de MTT em células da linhagem MCF-7.....	42
Figura 8 - Fotomicrografia dos órgãos sem indução tumoral.....	47
Figura 9 - Fotomicrografia dos órgãos de camundongos que receberam indução tumoral.....	48
Figura 10 - Fotomicrografias da pele do flanco e dos tumores (carcinoma mamário) excisados de camundongos Balb/C tratados com salina PBS.....	50
Figura 11 - Fotomicrografias de carcinoma mamário do flanco de camundongos Balb/c tratados com curcumina (CURC).....	51
Figura 12 - Fotomicrografias de carcinoma mamário do flanco de camundongos Balb/c tratados com formulação contendo nanopartícula lipídica com curcumina (NLMC).....	52
Figura 13 - Curva padrão e Curva Matriz da curcumina.....	54
Figura 14- Curva padrão e Curva Matriz da curcumina com fluorescência.....	55
Figura 15 - Curva padrão da curcumina.	56
Figura 16 - Avaliação da concentração de curcumina no fígado de animais sem e com tumor.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros das análises cromatográficas.	33
Tabela 4 - Peso (g) corpóreo e dos órgãos de animais, sem indução tumoral, referentes aos grupos tratados com CURC ou NLMC, nos tempos de (30 min, 1h e 6h ,12 e 24h).....	44
Tabela 5 – Peso (g) corpóreo e dos órgãos de animais, com indução tumoral, referentes aos grupos tratados com CURC ou NLMC, nos tempos de (30 min, 1h e 6h ,12 e 24h).....	45
Tabela 6 – Dados da concentração de curcumina em amostras de fígado de camundongos Balb/c.....	55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.2	OBJETIVO GERAL	22
2	MATERIAL E MÉTODOS	23
2.1	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	23
2.2	ESTUDO <i>IN VITRO</i>	26
2.2.1	Origem e características das nanopartículas	26
2.2.2	Cultivo e manutenção das células	26
2.2.3	Tratamento das células	27
2.2.4	Estudo de viabilidade celular	28
2.2.5	Análise estatística	28
2.3	ESTUDO <i>IN VIVO</i>	29
2.3.1	Alojamento, manejo e experimentação animal	29
2.3.2	Inoculação de células tumorais em camundongos Balb/c	30
2.3.3	Tratamento e eutanásia dos animais	30
2.3.4	Análises clínicas	31
2.3.6	Análise histopatológica	32
2.3.7	Análise de hepatocompatibilidade da curcumina no fígado	32
2.3.7.1	Validação do método cromatográfico	32
2.3.7.2	Linearidade do método CLAE	33
2.3.7.3	Precisão	34
2.3.7.4	Exatidão	34
2.3.7.5	Limite de Detecção	35
2.3.7.6	Limite de Quantificação	35
2.3.8	Preparo das amostras	35
2.3.9	Análise espectrofotométrica	36
2.4	Análise estatística	37
3.	RESULTADOS	38
3.1	ESTUDO DE VIABILIDADE CELULAR	38
3.2	ESTUDO <i>IN VIVO</i>	43
3.2.1	Análise clínica e peso corpóreo	43
3.2.2	Análise histopatológica	46
3.3	ESTUDO DE BIODISTRIBUIÇÃO E BIODISPONIBILIDADE	53
3.3.1	Linearidade do método (CLAE)	53

3.3.2	Linearidade do método por espectrofotometria.....	55
4	DISCUSSÃO	59
4	CONCLUSÕES.....	67
5	PRODUÇÃO CIENTÍFICA E ATIVIDADES ACADÊMICAS.....	68
6	REFERÊNCIA.....	69
	APÊNDICES	80
	ANEXOS	82

1 INTRODUÇÃO

A curcumina, ou diferuloilmetano, é um fitoquímico do tipo polifenol isolado do rizoma da planta *Curcuma longa*, nativa da Índia e do sudeste da Ásia. Este fitoquímico foi descoberto há aproximadamente dois séculos quando Vogel e Pelletier relataram o isolamento de uma “matéria de cor amarela” dos rizomas do açafrão. Assim, eles a denominaram curcumina e depois ela foi identificada por Rougghley e Whitting em 1973 (BERTONCINI-SILVA et al., 2024a; JIANG et al., 2017; VAUGHN; BRANUM; SIVAMANI, 2016). Existem análogos da curcumina com concentrações fracionadas tais como dimetoxicurcumina (curcumina II), bisdemetoxicurcumina (curcumina III) e ciclocurcumina (RAVINDRAN; PRASAD; AGGARWAL, 2009; TEIXÉ-ROIG et al., 2023; YEO et al., 2022).

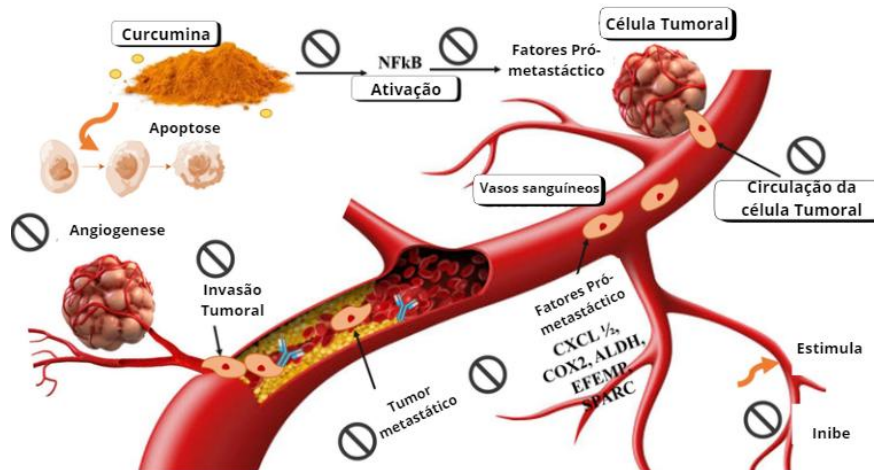
Diversos estudos apontaram que esse tipo de polifenol modula várias vias de sinalização celular relacionadas a proliferação, inflamação, imunomodulação e morte celular. Desta forma, a curcumina possui ampla atividade farmacológica descrita na literatura tendo nas três últimas décadas mais de 9.000 artigos científicos indexados e 100 ensaios clínicos realizados que relatam o uso desse fitoquímico para diversas aplicações (KUNNUMAKKARA et al., 2017; EL-SAADONY et al., 2023).

Na medicina tradicional indiana sua utilização terapêutica é amplamente descrita para diversas patologias, desempenhando um papel importante na prevenção e no tratamento de várias doenças pró-inflamatórias neurodegenerativas, cardiovasculares, pulmonares, metabólicas, autoimunes e neoplásicas (KUNNUMAKKARA et al., 2017; MINAFRA et al., 2019; PATIL et al., 2015; BERTONCINI-SILVA et al., 2024).

O potencial terapêutico da curcumina para essas aplicações está relacionado ao fato de este fitoquímico intervir na modulação de enzimas, fatores de crescimento e seus receptores, além de várias proteínas quinases responsáveis pela proliferação celular e pela progressão do ciclo celular. Especificamente, sua aplicação como agente antitumoral têm sido associado ao fato de ela pode interferir em importantes alvos moleculares como NF-kB, STAT3, β -catenina e AP-1 (fatores de transcrição), EGF, PDGF e VEGF (fatores de crescimento), COX-2, iNOS e MMPs, ciclina D1, CDKs, Akt, PKC e AMPK (quinases), citocinas inflamatórias como TNF, MCP, IL - 1 e IL - 6, em alvos relacionados à regulação positiva de pró-apoptóticos (Bax, Bad e Bak) e regulação negativa das proteínas antiapoptóticas (Bcl-2 e Bcl-xL) (GERA et al., 2017; ANAS TOMEH; HADIANAMREI; ZHAO, 2019; KHAN et al., 2019; SHEHZAD; LEE; LEE, 2013 SILVESTRE et al., 2023). Estes estudos demonstram o potencial da curcumina em

modular a redução da inflamação e a proliferação celular, por meio da ativação da cascata apoptótica, em células tumorais, como evidenciado na Figura 1.

Figura 1- Mecanismo anticancerígeno da curcumina biodisponível contra vários tipos de câncer.



Fonte: Adaptado de EL-SAADONY et al., 2023

Legenda: A figura ilustra como a curcumina, um composto bioativo, atua em diferentes vias moleculares para inibir o crescimento tumoral, promover a apoptose e modular a resposta imunológica, destacando seu potencial terapêutico no combate ao câncer.

A molécula de curcumina é composta por dois anéis metoxifenóis ligados pela fração β -dicetona, o que permite à curcumina exibir um tautomerismo ceto-enólico, resultando em duas formas distintas de ação: a cetônica e a enólica. Esse tautomerismo, aliado à presença do anel aromático metoxifenol, confere à molécula uma característica de hidrofobicidade e, conseqüentemente, baixa solubilidade em sistemas aquosos como o sangue (BERTONCINI-SILVA et al., 2024; OLIVEIRA et al., 2011; SILVESTRE et al., 2023).

Assim, o grande desafio de se utilizar a curcumina consiste em superar a sua baixa solubilidade em meio aquoso, dado que isso implica em rápidas taxas de metabolização e degradação e conseqüentes limitações de sua eficácia terapêutica. Devido à sua baixa biodisponibilidade, resultante da limitada solubilidade em meios aquosos, como o sangue, a curcumina sofre degradação rápida e eliminação sistêmica acelerada em condições alcalinas (CACCIOLA et al., 2023; SILVESTRE et al., 2023b).

Dessa forma, é essencial o desenvolvimento de estratégias para sua entrega sustentada, a fim de otimizar sua eficácia terapêutica. Nesse contexto, a nanotecnologia emerge como estratégia promissora para superar limitações associadas ao uso de fármacos hidrofóbicos, como a curcumina, por proporcionar recursos que melhoram a solubilidade, estabilidade,

biodisponibilidade e direcionamento específico de fármacos (DIMER et al., 2013; BERTONCINI-SILVA et al., 2024; BOURANG et al., 2024).

A propósito, vários estudos têm indicado que, quando associada a nanopartículas, a curcumina apresenta um aumento considerável em sua biodisponibilidade, quando administrada por via oral. Esse efeito foi observado tanto após a administração de uma dose única quanto em tratamentos contínuos de 14 dias, em diferentes concentrações (variando de 1,25 a 2,5 mg para análise farmacocinética e 20 mg/kg na avaliação antitumoral). Por exemplo, a aplicação de nanopartícula de curcumina exossômica, ExoCUR (2,5 mg/g), levou ao aumento na sua biodisponibilidade, elevando os níveis de curcumina em seis vezes em comparação à forma livre do composto (SILVESTRE et al., 2023).

Existem vários tipos de nanopartículas utilizadas com a finalidade de melhorar a solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade de fármacos. Dentre esses destacam-se lipossomas, micelas, nanoemulsões, dendrímeros, nanopartículas metálicas, nanopartículas poliméricas, nanotubos de carbono, nanopartículas de polímeros naturais e sintéticos, além de conjugados de polímero-fármaco. A escolha do material adequado é crucial, pois influencia diretamente a eficácia da entrega do fármaco, a estabilidade da formulação e a resposta terapêutica, permitindo que as nanopartículas sejam otimizadas para maximizar os benefícios de sua utilização. Esses sistemas têm sido investigados por sua capacidade de melhorar a entrega e a eficácia de medicamentos, reduzindo efeitos adversos e promovendo uma liberação sustentada de fármacos (MOGHIMI et al., 2023; ZUNUNI VAHED et al., 2017).

Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) são consideradas carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN). Esses sistemas, introduzidos em 1991 como um sistema de transporte coloidal alternativo, consistem em nanoemulsões, lipossomas, micropartículas e nanopartículas poliméricas. Algumas vantagens de seu uso consistem em encapsulamento eficaz contra a degradação química e maior flexibilidade na modulação de liberação do bioativo associado, o que favorece maior eficácia terapêutica (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; SUETH-SANTIAGO et al., 2015; BAHARI; HAMISHEHKAR, 2016; SILVESTRE et al., 2023; BOURANG et al., 2024; CHELIMELA; ALAVALA; SATLA, 2024).

NLS emergem como uma estratégia promissora na entrega de fármacos, apresentando-se como uma solução versátil para formulações cosméticas e farmacêuticas. Sua aplicabilidade abrange diversas vias de administração, incluindo oral, parenteral e tópica (PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009; YEO et al., 2022). Essa flexibilidade não apenas melhora a biodisponibilidade dos princípios ativos, mas também permite uma liberação controlada e direcionada, potencializando a eficácia terapêutica e minimizando efeitos adversos. Com isso,

destaca-se a importância de se continuar explorando e desenvolvendo tecnologias na prática clínica e industrial que utilizem CLN (MELLO et al., 2022; PIRES et al., 2024; WU et al., 2021).

Segundo Pardeike, Hommoss e Müller (2009) e Akbari et al. (2022), NLS podem ser categorizados em três tipos de acordo com a quantidade de óleo utilizada. O primeiro tipo consiste em NLS imperfeita, caracterizada por uma baixa proporção de óleo, o que resulta em uma estrutura cristalina irregular e cria espaço para a inserção de substâncias ativas. O segundo tipo é a NLS múltipla, que possui maior quantidade de óleo. Durante o resfriamento, as diferenças nos lipídios provocam a formação de pequenas gotículas de óleo, gerando uma estrutura composta por óleo, lipídio e água. O terceiro tipo é a NLS amorfa, em que os lipídios são misturados de maneira que não formam cristais, gerando uma matriz sólida não cristalina. Essas diferentes estruturas impactam a liberação e a estabilidade das substâncias ativas, sendo importantes na formulação de sistemas de liberação controlada (PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009; AKBARI et al., 2022).

A cristalização de NLS ocorre devido ao polimorfismo do lipídio sólido, que é influenciado por fatores como a proporção e os parâmetros de cristalização, além da temperatura durante a produção dos carreadores (PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009a). No processo de preparo das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), o lipídio cristaliza de maneira instável, formando uma matriz polimórfica e imperfeita (BUNJES; WESTESEN; KOCH, 1996). A formação do compritol, um composto da matriz lipídica sólida com propriedades hidrofóbicas, resulta em um aumento no tamanho das partículas devido à agregação. Esse processo também está relacionado à liberação dos fármacos incorporados na matriz amorfa (ABURAHMA; BADR-ELDIN, 2014).

Ao combinar triacilglicerídeos com radicais acila de cadeia longa, como o Compritol® e de cadeia média, como a manteiga de murumuru oriunda de *Astrocaryum murumuru*, é possível otimizar o encapsulamento de lipídios e substâncias hidrofóbicas, como a curcumina, no núcleo das NLS. Esse método permite a produção de NLS de forma simplificada, sem a necessidade de processos de homogeneização de alta energia ou solventes orgânicos. Vale ressaltar que há formação de regiões amorfas dentro da matriz lipídica, com maior capacidade de acomodar a curcumina (COELHO et al., 2020; GANASSIN et al., 2022).

A fase polimórfica do compritol, lipídio sólido, depende de fatores como a taxa de cristalização e a temperatura durante a produção dos carreadores. Quando a cristalização ocorre lentamente, induzida pelo resfriamento, resulta em uma matriz mais complexa com diferentes fases lamelares. Por outro lado, uma cristalização mais rápida pode gerar uma única fase lamelar

(ELISABETTINI et al., 1998). Para sistemas de liberação modificada de fármacos, matrizes mais amorfas apresentam vantagens, já que a transição polimórfica pode favorecer uma liberação mais eficiente dos fármacos (JANNIN; CUPPOK, 2013)

Assim, carreadores lipídicos (CLN) como nanopartículas lipídicas (NLS) carregadas com fitoterápicos têm mostrado grande potencial em termos de aplicabilidade e biodisponibilidade. Nesse contexto, a combinação da curcumina com esse tipo de nanocarreador pode resultar em um tratamento mais eficaz, com liberação controlada e direcionada do fitoquímico, redução dos efeitos adversos e potencialização da ação antitumoral (EL-HELW; FAHMY, 2015; GUPTA et al., 2020; BOURANG et al., 2024).

A absorção celular de medicamentos e o seu perfil de liberação sustentada são propriedades essenciais dos sistemas de administração de NLS, capazes de minimizar efeitos adversos. Assim, o uso de as NLS se destaca como sistemas de liberação promissores para a entrega de uma variedade de substâncias ativas farmacológicas, que vão desde pequenas moléculas até proteínas e, potencialmente, material genético (GOMES et al., 2019; AKBARI et al., 2022; CACCIOLA et al., 2023; GANASSIN et al., 2022; PIRES et al., 2024).

Neste estudo, optou-se pela escolha de NLS a qual foi baseada em estudos preliminares do nosso grupo, conduzidos por Ganassin (2020) e por Mello e colaboradores (2022) e fundamentada no fato de que esse sistema apresentou alta biocompatibilidade, estabilidade coloidal duradoura e capacidade de encapsular eficazmente a curcumina (MELLO et al., 2022). Considerando-se que essas características tornam as NLS uma plataforma promissora para a entrega de compostos terapêuticos, como a curcumina, este estudo trata-se de uma investigação exploratória da biocompatibilidade de NLS em um modelo de camundongo portador de carcinoma mamário, visando aprofundar o estudo desse nanosistema para futura aplicação clínica no câncer de mama (MELLO et al., 2022).

Atualmente o câncer é um grande problema de saúde humana. Estima-se 30 milhões de óbitos, por ano, decorrentes do câncer até o ano de 2030. No Brasil, a previsão para o período de 2023-2024 é de aproximadamente 73.610 novos casos de câncer de mama, tornando-se o tipo de câncer de maior prevalência, com exceção dos tumores de pele não melanoma. Esse câncer é mais comum entre as mulheres das regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste, particularmente na faixa etária de 40 a 49 anos (CHAKRABORTY, WANG et al., 2020; BOURANG et al., 2024a; INCA, 2024; OMS, 2024). Este cenário reforça a relevância de se explorar novas tecnologias terapêuticas no combate ao câncer de mama (BOURANG et al., 2024b; LEENA PANIGRAHI et al., 2024).

A realização de estudos de biodistribuição de um fármaco é um passo essencial para o desenvolvimento de novas terapias anticâncer, visto que esse fator afeta diretamente a eficácia do tratamento. A biodistribuição refere-se à forma como um fármaco se distribui pelos diferentes tecidos e órgãos após sua administração. Para que um tratamento seja eficaz, o fármaco deve alcançar a concentração adequada no local-alvo. Se a distribuição for inadequada, o fármaco pode não atingir os tecidos necessários em quantidade suficiente, comprometendo sua eficácia. Assim, a compreensão sobre a biodistribuição de fármacos permite otimizar sua eficácia e segurança, garantindo que eles atinjam os alvos terapêuticos de maneira eficiente e minimizando possíveis efeitos adversos (OGA et al., 2018).

Nesse contexto, ao se considerar o desenvolvimento de novas tecnologias terapêuticas para o câncer, um passo crucial é a realização de estudos de biodistribuição, com foco inicial no fígado, em virtude do papel central deste órgão no metabolismo e na detoxificação de compostos bioativos. Tal abordagem é particularmente relevante para fármacos administrados por via oral, uma vez que o fígado é o primeiro órgão a metabolizar esses compostos antes de sua entrada na circulação sistêmica (LIMA FILHO, 2005; BAKLAUSHEV et al., 2017; BOUFLEUR et al., 2019; KHAN et al., 2019).

A administração oral é amplamente preferida para a aplicação de medicamentos devido à sua alta aceitação pelos pacientes, à ausência de dor associada e à facilidade de aplicação. Nesse sentido, o desenvolvimento de formas farmacêuticas que otimizem a biodistribuição e a estabilidade dos fármacos, como a curcumina, que apresenta alta afinidade por proteínas plasmáticas, é fundamental. A alta afinidade da curcumina por essas proteínas limita sua farmacocinética e estabilidade, especialmente quando administrada por via endovenosa. (RIBEIRO et al., 2018; COELHO et al., 2020; CACCIOLA et al., 2023). Portanto, a administração oral de curcumina emerge como uma estratégia terapêutica promissora, e estudos relacionados à sua metabolização tornam-se cruciais.

Nesse sentido, a circulação da digestão, que se inicia no fígado, desempenha um papel fundamental no processamento de nutrientes e compostos bioativos. O fígado, ao receber todo o sangue oriundo da digestão, é essencial para o metabolismo e a distribuição desses compostos para a circulação sistêmica. Este processo influencia diretamente a biodisponibilidade de fármacos administrados por via oral, determinando a fração do fármaco que alcança a circulação sistêmica e está disponível para exercer seus efeitos terapêuticos (PADULLÉS-ZAMORA; LEIVA-BADOSA; JODAR-MASANES, 2013; TOEHWÉ et al., 2021; YU et al., 2023).

Ainda, destaca-se que estudos sobre a hepatocompatibilidade e bioacúmulo de bioativos no fígado são essenciais para prever a biodisponibilidade dos compostos. A avaliação do

bioacúmulo de bioativos no fígado permite identificar a extensão do metabolismo hepático e prever a quantidade de fármaco que estará disponível sistemicamente. Isso é fundamental para determinar a eficácia e a segurança do fármaco. Fármacos que são extensivamente metabolizados no fígado podem ter uma biodisponibilidade reduzida, necessitando de ajustes na formulação ou na dosagem para alcançar os níveis terapêuticos desejados (LI; HUANG, 2008; SOMOGYI; EICHELBAUM; GUGLER, 1982).

Além disso, a hepatocompatibilidade, ou a capacidade do fígado de metabolizar um fármaco sem sofrer danos, é um aspecto crítico a ser considerado. Fármacos que causam toxicidade hepática podem levar a sérios efeitos adversos, comprometendo a segurança do tratamento (SOMOGYI; EICHELBAUM, 1982; LI; HUANG, 2008; RWU et al., 2021; ALMEIDA et al., 2011; EL-KATTAN et al., 2012; TEIXÉ-ROIG et al., 2023).

. Portanto, estudos de bioacúmulo no fígado não só ajudam a prever a biodisponibilidade, mas também a avaliar a segurança hepática dos novos fármacos.

Em resumo, a relação entre a circulação da digestão, a biodisponibilidade e a hepatocompatibilidade é intrínseca e complexa. O fígado não só processa e distribui compostos bioativos, mas também deve ser capaz de metabolizá-los de maneira segura. A compreensão desses processos é essencial para o desenvolvimento de terapias eficazes e seguras, garantindo que os fármacos administrados por via oral sejam não apenas biodisponíveis, mas também compatíveis com a saúde hepática (LIMA FILHO, 2005).

Consequentemente, a realização de estudos de bioacúmulo de bioativos no fígado é uma etapa fundamental no desenvolvimento de novas terapias anticâncer. Esses estudos fornecem informações cruciais sobre a biodisponibilidade e a segurança hepática dos fármacos, garantindo que eles sejam eficazes e seguros para uso clínico. Fármacos que são bem tolerados pelo fígado e que não causam danos hepáticos são mais propensos a serem eficazes e seguros para uso clínico. Estudos sobre a hepatocompatibilidade ajudam a identificar possíveis riscos e a otimizar a formulação dos medicamentos para minimizar efeitos adversos, além de servir como referência para a observação de possíveis efeitos sistêmicos (SOMOGYI; EICHELBAUM, 1982; LI; HUANG, 2008; RWU et al., 2021; ALMEIDA et al., 2011; EL-KATTAN et al., 2012; TEIXÉ-ROIG et al., 2023).

Neste estudo avaliou-se a biocompatibilidade em cultura de células tumorais de câncer de mama e saudáveis e a hepatocompatibilidade de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), oriundas da manteiga de murumuru (*Astrocaryum murumuru*) associadas à curcumina, em culturas de células tumorais de câncer de mama, bem como sua hepatocompatibilidade em camundongos saudáveis e portadores de carcinoma mamário. Destaca-se a originalidade deste

CLN contendo curcumina, sendo este o primeiro estudo a investigar especificamente seu potencial para o tratamento do câncer de mama, o que confere um caráter inovador e único à pesquisa. (GANASSIN, 2020; MELLO et al. 2022).

Nesse contexto, gorduras vegetais ganham destaque devido à sua composição natural, rica em triglicerídeos. A manteiga de murumuru, extraída de uma palmeira amazônica (*Astrocaryum murumuru*), representa uma alternativa promissora para a produção de NLS, visto que é rica em triglicerídeos de cadeia média, especialmente o ácido láurico, o que a torna uma excelente opção para a formulação desse tipo de nanopartículas (GOMES et al. 2019; GANASSIN, 2020; MELLO et al. 2022).

Ainda, a extração sustentável da manteiga de murumuru tem potencial para gerar o fortalecimento da bioeconomia, incentivando a valorização de recursos naturais da Amazônia. Ao integrar práticas sustentáveis, esse processo contribui para a preservação da biodiversidade e o bem-estar das comunidades que dependem desses recursos. Nesse sentido, a utilização da manteiga de murumuru se configura como uma ponte entre a inovação científica e a sustentabilidade econômica, criando valor de maneira responsável e ecologicamente consciente. A Amazônia, com sua vasta riqueza biológica, representa uma das maiores potencialidades bioeconômicas do Brasil. Ao promover a utilização sustentável desses recursos, o uso deste nanossistema impacta na valorização e preservação da biodiversidade, ao mesmo tempo em que potencialmente impulsiona a economia local e nacional (COSTA, 2021; VIDAL; SIMÃO; ALMEIDA, 2021).

Portanto, o estudo das nanopartículas lipídicas sólidas contendo curcumina, aliado à exploração da manteiga de murumuru, insere-se em uma abordagem estratégica que não só contribui para avanços no desenvolvimento de novas tecnologias, mas também fomenta o desenvolvimento de soluções sustentáveis. Ao integrar bioeconomia e biodiversidade, esse estudo não só propõe o uso inovador de recursos naturais, como também responde à crescente demanda por soluções que agregam valor à biodiversidade brasileira e promovem benefícios econômicos e sociais.

1.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a biocompatibilidade de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), oriundas da manteiga de murumuru (*Astrocaryum murumuru*), associadas à curcumina, em culturas de células tumorais de câncer de mama e a hepatocompatibilidade em camundongos saudáveis e portadores de carcinoma mamário.

1.2.1 Objetivos específicos

- 1) Avaliar a biocompatibilidade de (i) nanopartículas lipídicas sem curcumina (NLM); (ii) nanopartículas lipídicas contendo curcumina (NLMC) e (iii) curcumina livre (CURC), por meio de ensaio de citotoxicidade por MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difenil-tetrazólio), em linhagens de carcinoma mamário e de fibroblastos.
- 2) Validar o método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para quantificação de curcumina.
- 3) Avaliar a biodisponibilidade de NLMC e CURC no fígado de camundongos Balb-c saudáveis e portadores de carcinoma mamário por meio de quantificação da curcumina, por meio das técnicas de espectrofotometria e cromatografia.
- 4) Avaliar a biocompatibilidade de CURC e NLMC *in vivo*, por meio de análises clínicas e histopatológica dos rins, fígado, intestino delgado e tumor em camundongos Balb/c.

2 MATERIAL E MÉTODOS

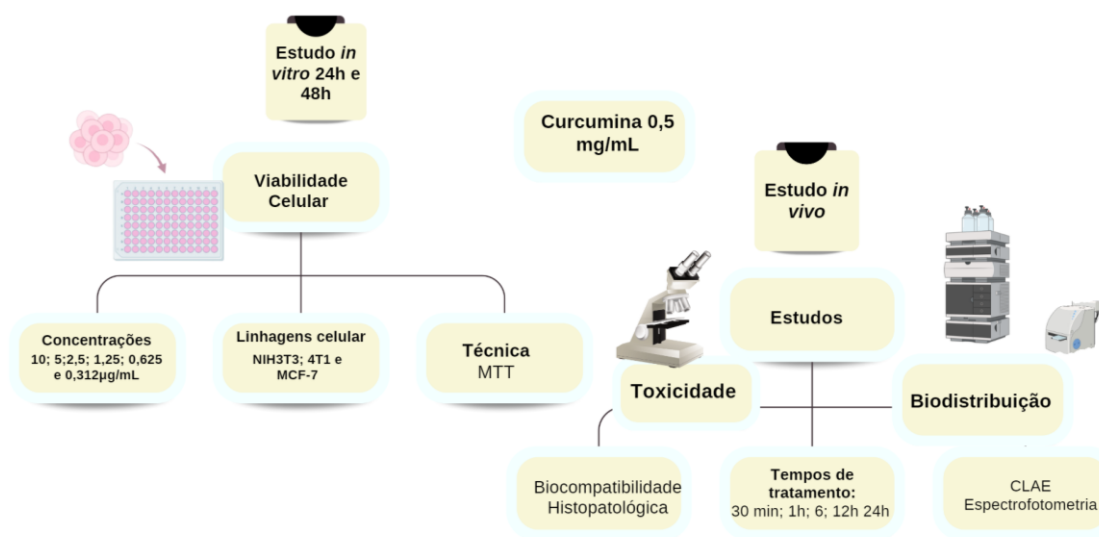
2.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

A seguir, será apresentado de forma geral o planejamento experimental do estudo, com os detalhes de cada processo metodológico descritos nos itens subsequentes. Um desenho esquemático do planejamento experimental está ilustrado na Figura 2.

As formulações de curcumina em suspensão (CURC) e de nanopartículas lipídicas sólidas contendo curcumina (NLMC) foram preparadas previamente à realização dos ensaios biológicos. A solução estoque de CURC foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) para alcançar uma concentração de 2,6 mg/mL, enquanto a formulação de NLMC apresentou uma concentração de curcumina de 0,5 mg/mL.

Neste estudo, foram realizados ensaios em cultura de células e em camundongos Balb/c. No estudo *in vitro*, avaliou-se o efeito citotóxico de nanopartícula lipídica sem curcumina (NLM), com curcumina (NLMC) e de curcumina livre (CURC), em várias concentrações, utilizando linhagens celulares de carcinoma mamário (MCF-7 e 4T1) e fibroblasto (NIH-3T3), nas doses de 10 a 0,312 µg/mL. A citotoxicidade foi medida pelo método colorimétrico de MTT.

Figura 2 - Desenho experimental do estudo.



Fonte: Autoria própria (criada no canva.com)

Legenda: Esse trabalho foi desenvolvido em duas etapas: (1) estudo *in vitro* e a (2) estudo *in vivo*. No estudo *in vitro*, avaliou-se a viabilidade celular das linhagens NIH-3T3, 4T1 e MCF-7. Foram testadas as formulações CURC (curcumina), NLMC (nanopartícula lipídica com curcumina) ou NLM (nanopartícula lipídica) em seis concentrações de CURC, sendo 10; 5; 2,5; 1,25; 0,6-5 e 0.312 µg/mL. Na segunda etapa, analisou-se a toxicidade

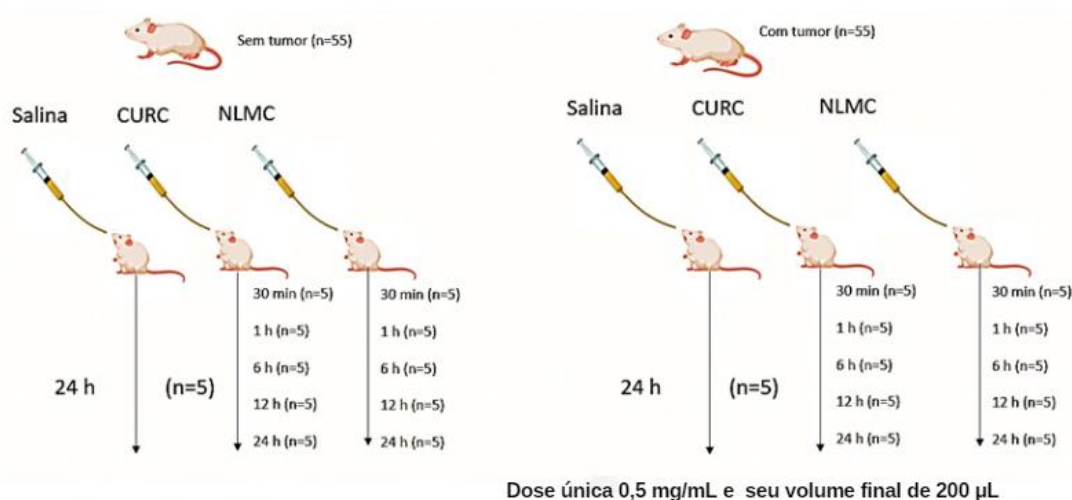
e hepatocompatibilidade de CURC e NLMC em camundongos Balb/c, portadores de carcinoma mamário e saudáveis nos tempos de 30 min, 1h, 6h, 12h e 24 h após administração terapêutica.

Para os testes *in vivo* utilizou-se camundongos Balb/c fêmeas (n=140) e foi avaliada a biocompatibilidade de CURC e NLMC, administradas em dose única de 0,5 mg/mL de CURC, via gavagem intragástrica (volume de até 200 µL). Soluções de PBS e NLM foram usados como controles negativos e adotou-se o mesmo volume de injeção dos tratamentos.

Utilizou-se animais saudáveis (grupo sem tumor – GST) e animais portadores de tumor (grupo com tumor – GT). O modelo experimental *in vivo* foi o de adenocarcinoma mamário (inóculo de células da linhagem 4T1). Células em suspensão foram inoculadas no flanco dos animais.

Um esquema das intervenções terapêuticas e tipos de análises é ilustrado na Figura 3.

Figura 3: Esquema Experimental dos Grupos de Tratamento e Tempos de Análise em Modelos Animais de Adenocarcinoma Mamário.



Fonte: Autoria, (criada em biorender.com).

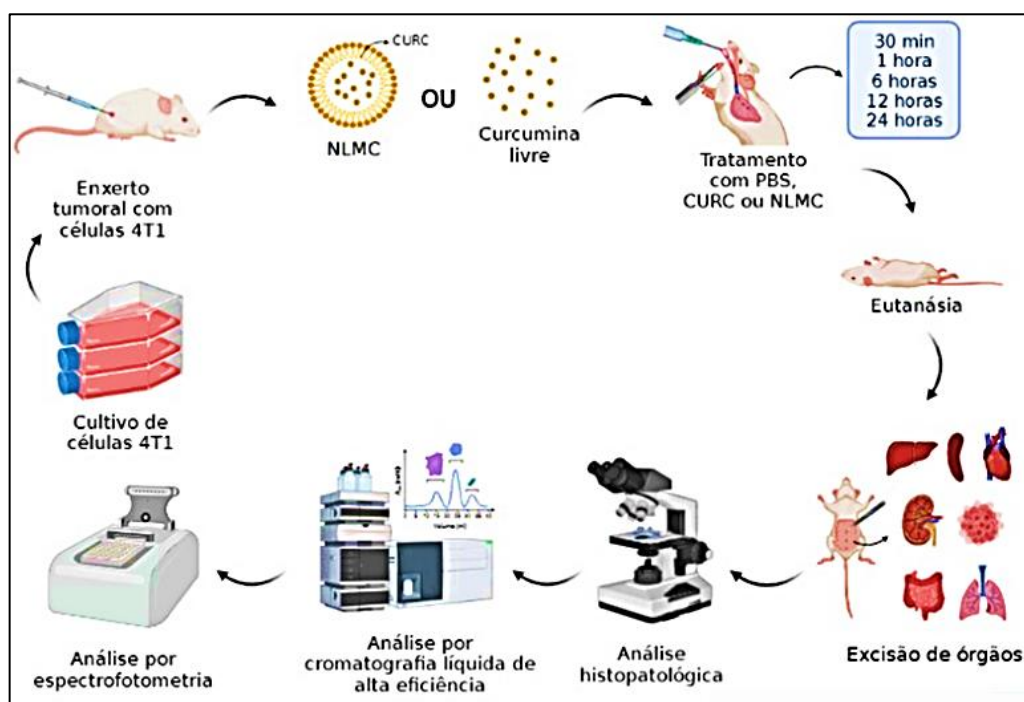
Neste estudo utilizou-se animais sem tumor (GST) e com tumor (GT). Os animais receberam tratamento com CURC (curcumina), NLMC (nanopartícula lipídica com curcumina) ou salina (PBS, solução salina de fosfato tamponada). Para cada grupo experimental formou-se cinco subgrupos referentes aos tempos de análises sendo de 30 min, 1 h, 6 h, 12 h e 24 h. Para os animais que receberam PBS foi formado um único subgrupo e adotou-se o tempo de 24 h.

Os animais, com e sem tumor, receberam tratamento com CURC, NLMC ou PBS (solução salina de fosfato tamponada). A administração de PBS foi realizada a fim de se manter os estímulos usados com CURC e NLMC, porém, como solução inerte, servindo, portanto, como grupo controle (PBS). Para cada grupo experimental formou-se cinco subgrupos referentes aos tempos de análises sendo de 30 min, 1 h, 6 h, 12 h e 24 h. Para os animais que receberam PBS foi formado um único subgrupo e adotou-se o tempo de 24 h (Figura 3).

Após os períodos de 30 min, 1 h, 6 h, 12 h e 24 h, foi feita a eutanásia dos animais e procedeu-se com a coleta de materiais biológicos (rins, fígado, baço, pulmões e coração e tumor) e registros fotográficos. Foi coletado sangue, mas os materiais sofreram hemólise e, portanto, o material não foi analisado. Logo, os materiais biológicos foram processados para realização de análises histopatológicas e cromatográficas, a fim de se avaliar a toxicidade e biodistribuição da curcumina após os tratamentos com CURC e NLMC (Figura 4).

Primeiramente, realizou-se um estudo piloto de biodistribuição da curcumina utilizando-se o fígado como referência inicial e a análise foi feita por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrofotometria. Os detalhes experimentais serão descritos a seguir. O planejamento experimental do estudo *in vivo* está representado na figura 4.

Figura 4 - Resumo gráfico dos métodos utilizados nos estudos *in vivo*.



Fonte: Autora (criada em biorender.com).

Legenda: O experimento iniciou-se com a inoculação de células de carcinoma mamário murino da linhagem 4T1 em camundongos Balb/c fêmeas. Após a identificação da infiltração tumoral realizou-se o tratamento com curcumina livre (CURC) ou nanoencapsulada (NLMC). Após 30 minutos, 1 hora, 6 horas, 12 horas e 24 horas, os animais foram eutanasiados e os órgãos (fígado, rins, baço, pulmões, coração e intestino delgado) e tumor foram coletados para realização de análise histopatológica, cromatográfica e espectrofotométrica, além da realização de registros fotográficos dos órgãos e do tumor.

2.2 ESTUDO *IN VITRO*

2.2.1 Origem e características das nanopartículas

As amostras de nanopartículas lipídicas com curcumina (NLMC), utilizadas neste estudo, foram sintetizadas e caracterizadas por (GANASSIN, 2020) e foram cedidas, gentilmente, pelo colaborador Prof. Dr. Luís Alexandre Muehlmann. A seguir destaca-se um breve relato sobre a composição e caracterização das amostras de NLMC.

As nanopartículas são constituídas por dois tipos de lipídios sendo uma de matriz sólida de murumuru (*Astrocaryum murumuru*) e a outra de Compritol®. A manteiga de murumuru é uma gordura *in natura* retirada de castanha com o mesmo nome, típica da região da Amazônia (GANASSIN et al., 2022b). A curcumina foi obtida da Sigma-Aldrich® (Catálogo1386/-10G; Lot.MKCF75775837-7) e apresentava 65% grau de pureza (CLAE).

Na formulação de NLMC as nanopartículas apresentaram um diâmetro hidrodinâmico (DH) variando entre 50 e 60 nm, índice de polidispersividade (IPD) de 0,11 a 0,22 e morfologia cúbica. Foi comprovada uma eficiência de encapsulação de curcumina (0,5 mg/mL) de 100% na amostra de NLMC. Além disso, as nanopartículas mostraram-se estáveis por até 300 dias quando armazenadas a 4 °C (GANASSIN et al., 2022).

2.2.2 Cultivo e manutenção das células

Foram utilizadas as linhagens celulares 4T1, MCF-7 e NIH-3T3. A linhagem 4T1 consiste em células de carcinoma mamário murino (BCRJ® Code 0022TM/ATCC CRL-2539) e representa uma linhagem celular análoga ao estágio IV do câncer de mama em humanos. A linhagem MCF-7 representa células de carcinoma mamário humano (BCRJ® 0162TM/ATCC HTB-22D) que mantêm várias características diferenciadas do epitélio mamário humano, enquanto a linhagem NIH-3T3 representa células de fibroblasto murino (BCRJ® Code 0191TM/ATCC CRL-1658). Todas as linhagens foram adquiridas no banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ).

As linhagens MCF-7, 4T1 e NIH-3T3 foram cultivadas em frascos de cultivo 25 cm² contendo meio de cultivo DMEM (Eagle Modificado por Dulbecco) estéril tamponado e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (100 UI/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina) sob pH a 7,2. As células foram mantidas em incubadora a 37 °C e atmosfera a 5% CO₂ e 80% de umidade. Após obtenção de confluência de aproximadamente

80%, as células foram incubadas com 4 mL do reagente Tripsina-EDTA a 0,25% por três minutos a 37°C. Logo após o desprendimento das células do frasco, foram adicionados 4 mL de meio de cultura para neutralização da tripsina e, em seguida, o conteúdo do frasco da cultura foi transferido para um tubo de centrifugação de 15 mL e centrifugado a 750 g por três minutos.

Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de meio de cultura. Para determinação do volume de células viáveis utilizou-se o fator de diluição de 10 X, que equivalia a uma solução contendo 10 µL da suspensão de células e 90 µL de azul de tripan (0,4% de solução salina de fosfato tamponada/PBS). Logo após, 10 µL dessa solução foi colocado em câmara de Neubauer e, em seguida, realizou-se a contagem das células em microscópio de luz invertido (Leica DM1 1, Alemanha). A concentração de células foi determinada por meio da quantidade de células dos quadrantes laterais da câmara e o número total de células viáveis foi calculado conforme (CARNEIRO, 2011).

2.2.3 Tratamento das células

Foi realizado o plaqueamento das linhagens celulares na terceira passagem (4T1 e MCF-7) e da quarta passagem (NIH-3T3), pós descongelamento, período que se obtinha 80% de confluência do frasco. As células foram semeadas a uma densidade de 1×10^4 células/poço em microplacas de 96 poços. As células foram mantidas em incubadora a 37 °C em atmosfera úmida e a 5% de CO₂ por 24 horas para a total aderência das células viáveis. Em seguida, as células foram expostas aos diferentes tratamentos com CURC, NLM e NLMC e mantidas em incubadora por 24 ou 48 h.

Além disso, foi utilizada uma formulação de nanopartícula sem curcumina (NLM), nos estudos *in vitro*, visto que não se apresentaram tóxicas. Esta formulação foi caracterizada da mesma forma que a NLMC, exceto pelo fato de não conter o encapsulamento de curcumina. Células do grupo controle negativo receberam apenas o meio de cultura.

As células foram expostas aos tratamentos com NLM e CURC. Nos tratamentos com CURC e NLMC foram realizados nas doses de 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312 µg/mL de curcumina e foram preparadas por meio de diluição seriada a partir de solução estoque com seu respectivo meio de cultivo. Logo após os tratamentos, a viabilidade celular foi avaliada após 24 e 48 horas, conforme descrito a seguir.

2.2.4 Estudo de viabilidade celular

A viabilidade celular foi realizada por meio do ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di-fenil brometo de tetrazolina), que é um teste colorimétrico. O MTT é um composto amarelo que, quando incubado com células vivas, é reduzido por enzimas mitocondriais e transformado em formazan, um composto roxo, que pode ser quantificado por meio de espectrofotometria. A quantidade de formazan formado está diretamente relacionada ao número de células metabolicamente ativas. Assim, pode-se estimar a viabilidade celular por meio da mensuração da quantidade de formazan (CARNEIRO, 2011a). O processo metodológico será descrito a seguir.

Após o tempo de tratamento das células, descartou-se o sobrenadante dos poços e colocou-se 0,5 mg/mL de MTT em meio de cultivo. Logo, as células foram mantidas por 2 horas a 37°C em atmosfera úmida e a 5% de CO₂. Após o período de metabolização do MTT, foi adicionada uma solução de DMSO, seguida de homogeneização. O conteúdo foi então transferido para poços não utilizados anteriormente.

A quantificação de cristais de formazan foi feita em espectrofotômetro (modelo SpectraMax M2, Molecular Devices), sob o comprimento de onda a 595 nm. A absorbância medida foi correlacionada ao número de células viáveis ao final do experimento e expressa em termos percentuais. Os valores obtidos foram normalizados em relação ao controle (células sem tratamento). Ou seja, a viabilidade celular relativa (%) foi calculada comparando a absorbância do tratamento com a do controle. Para assegurar a precisão da análise, foi incluído um controle de DMSO (branco), com três poços sem células, para descartar possível interferência do reagente nos resultados.

Os resultados foram expressos como porcentagem em relação ao grupo controle, que foi definido como tendo 100% de viabilidade celular, conforme o trabalho de Ganassin (2020).

2.2.5 Análise estatística

Todos os dados obtidos ao longo do estudo foram expressos como média \pm erro padrão da média e a análise estatística foi realizada considerando um nível de significância de $p < 0,05$, assegurando que as diferenças observadas fossem estatisticamente relevantes. Para essa análise, foi utilizado o software GraphPad Prism® 8.0.

No estudo de viabilidade celular, os resultados foram calculados como média \pm erro padrão, refletindo a variação entre os valores observados e proporcionando uma visão detalhada da

consistência dos dados em cada uma das concentrações testadas. Este método permitiu avaliar a viabilidade das células das linhagens NHI-3T3, 4T1 e MCF-7 em resposta às concentrações do composto, identificando diferenças de viabilidade celular quando comparadas a um grupo de controle sem exposição ao composto.

Para aprofundar a análise, foi realizada uma comparação estatística entre os grupos com diferentes concentrações e entre grupos que receberam a mesma concentração, permitindo a avaliação de possíveis variações intra e intergrupos. A análise foi conduzida com a aplicação do teste *Two-way* ANOVA, seguido pelo teste de comparações múltiplas de *Tukey*, o que viabilizou identificar com precisão quais grupos apresentavam diferenças significativas entre si.

2.3 ESTUDO *IN VIVO*

2.3.1 Alojamento, manejo e experimentação animal

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (protocolo SEI nº 023106.154749/2019-10, Anexo A).

Camundongos Balb/c fêmeas foram obtidos do biotério central da Universidade Católica de Brasília (UCB, Laboratório de bioensaios). Os animais tinham 3 a 5 semanas de vida e apresentavam o peso corpóreo médio de 19 g e foram alojados no Biotério do Departamento de Genética e Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Os camundongos foram mantidos em gaiolas de plástico posicionadas em racks ventilados individualmente (Ventilife) sob temperatura controlada (~24°C) e ciclo circadiano automatizado (12/12 horas claro/escuro) e com fornecimento de água e ração *ad libidum*. Todos os procedimentos adotados na manutenção, manejo e experimentação foram realizados de acordo com a “Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica – DBCA” (Resolução Normativa nº 30/2016). A seguir serão descritas as condições experimentais adotadas nesta pesquisa.

Antes de iniciar os experimentos, os animais foram mantidos em quarentena por cerca de 7 dias e, logo após, foram pesados e alocados, aleatoriamente, em diferentes gaiolas de acordo com os respectivos grupos de tratamento (DUTTA; SENGUPTA, 2016). Em cada gaiola foram colocados cinco animais e utilizou-se tubo de policloreto de vinila PVC de 1 ¼ de

diâmetro e até 10 cm de comprimento, na cor branca para promoção de bem-estar psicológico e de um ambiente para promover enriquecimento ambiental (BURKHOLDER et al., 2012;).

A fim de se evitar sofrimento dos animais adotou-se alguns cuidados para identificar a necessidade de intervenção e/ou afastamento dos animais ao longo do experimento. Por exemplo, caso algum animal apresentasse alguma alteração em seu aspecto clínico e físico como perda rápida e progressiva de peso, diarreia debilitante, excessiva ou prolongada hiper ou hipotermia, lacrimação, excessiva, perda de responsividade, inabilidade de comer ou beber, seria acionado o veterinário independente da intercorrência para tomar medidas cabíveis. Ainda, os animais com inoculação tumoral poderiam ser afastados do estudo caso estivessem com tumor maior que 20 mm, ulcerado, necrosado ou infectado e tumor que acometesse a mobilidade do animal.

2.3.2 Inoculação de células tumorais em camundongos Balb/c

Foi realizado o cultivo e a manutenção da linhagem 4T1 com antecedência de duas semanas do experimento, a fim de se estabelecer a cultura celular e obter número suficiente de células para realização do experimento. Para inoculação das células tumorais foi preparada uma suspensão de células em meio de cultura não suplementado a fim de se obter 2×10^5 células em 100 μ L (volume utilizado para o inóculo das células) (GANASSIN, 2020; GANASSIN, 2022).

Primeiramente, os animais foram anestesiados, via intraperitoneal, com solução de cloridrato de cetamina (10 mg/kg) e cloridrato de xilazina a 2% (80 mL/kg). Em seguida, realizou-se a inoculação, via subcutânea, de 100 μ L de suspensão contendo 2×10^5 células, no lado direito do flanco utilizando-se agulha de calibre 8 x 0,30 mm, sob ângulo de 90°. Para isso, utilizou-se uma seringa de 1 mL. Durante todo o experimento, os animais foram monitorados diariamente quanto ao desenvolvimento tumoral e modificações de comportamento. A detecção macroscópica (palpável) do tumor ocorreu próximo entre o 7° e 15° dias depois da inoculação do tumor (DUTTA; SENGUPTA, 2016).

2.3.3 Tratamento e eutanásia dos animais

Após a confirmação da presença de tumor (palpável) os animais receberam diferentes intervenções, conforme Figura 4. O tratamento foi realizado em dose única, via intragástrica. Esta via foi escolhida dado que este estudo se trata de um estudo pioneiro na avaliação de administração de NLMC para avaliação de biodistribuição. Considerando que a via oral é uma

via de administração de fármacos clássica, iniciou-se a avaliação utilizando a via oral. Sabe-se que após a ingestão, nanopartículas atravessam o trato digestivo e isso pode alterar seu tamanho, carga superficial e liberação de fármaco encapsulado, como no caso, a curcumina. Portanto, é avaliar a via oral como primeira rota é fundamental (BAN et al., 2020; TEIXÉ-ROIG et al., 2023).

Utilizou-se agulha de gavagem de aço inox (BD-10), com diâmetro de 1,0 mm com esfera de 1,7 mm, raio de 40 mm e comprimento de 31 mm, acoplada a uma seringa de 1 mL. Animais sem tumor (GST) e com tumor (GT) receberam tratamento com CURC (100 µl, 0,5 mg/kg), NLMC (200 µl, dose equimolar de CURC - 0,5 mg/kg) ou PBS (100 µl). Para a administração de CURC utilizou-se óleo de girassol comercial (Liza, BR) e a solução foi homogeneizada utilizando-se vórtex por 5 minutos (WU et al., 2021). As condições experimentais adotadas foram baseadas em estudos prévios do grupo e literatura científica (GANASSIN, 2020).

Um esquema da representação dos grupos experimentais pode ser visualizado na Figura 3. Para cada grupo experimental formou-se cinco subgrupos referentes aos tempos de análises sendo de 30 min, 1 h, 6 h, 12 h e 24 h. Para os animais que receberam PBS foi formado um único subgrupo e adotou-se o tempo de 24 h (Figura 3). Após cada tempo de tratamento (30 min, 1 h, 6 h, 12 h e 24 h) os animais receberam uma dose letal de anestésico quetamina (70 mg/kg) e xilazina (50 mg/kg), via intraperitoneal. Logo após a confirmação da eutanásia, realizou-se a coleta de órgãos para realização das análises descritas a seguir.

2.3.4 Análises clínicas

A análise clínica dos animais foi monitorada através da avaliação do peso, comportamento e taxa de sobrevivência. Além disso, alterações clínicas e comportamentais foram registradas ao longo do período experimental de 23 dias nos diferentes grupos analisados, conforme trabalho de (CARNEIRO, 2011a).

O peso dos animais foi medido utilizando uma balança digital (OHAUS A560) para avaliar as variações no peso médio durante a progressão tumoral e o tratamento. As medições foram realizadas no dia do implante das células tumorais, antes do início dos tratamentos e antes da eutanásia dos animais.

2.3.6 Análise histopatológica

O processamento histológico foi realizado de acordo com protocolos, previamente estabelecidos, do Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada (NUPMIA) da UnB. Brevemente, os tecidos foram cortados em duas partes, sendo uma secção para o estudo de histopatologia e outra para o estudo de hepatocompatibilidade.

Após a coleta para análise histológica, os tecidos foram lavados em solução salina fosfato a 0,4% e depois fixados em solução tamponada de Formalina a 10%. Após 24 h, os tecidos foram acondicionados em cassetes devidamente identificados e então, desidratados em um processador automático de tecido (histotécnico modelo 808) em uma série graduada de etanol (70%, 80%, 90% e três vezes 100%) por 1 hora cada banho. Com o intuito de facilitar a entrada da parafina no tecido desidratado, os tecidos sofreram diafanização utilizando-se xilol 100% (3 banhos de 40 minutos) e, posteriormente, foram incluídos em parafina e emblocados em barras de Leuckart.

Os cortes foram realizados em micrótomo Leica (RM2125RT, Alemanha) na espessura de 5 μ m. As secções foram distendidas, previamente, em banho-maria à 40 °C, e repassadas para as lâminas de vidro. Em seguida, mantiveram-se, *overnight*, em estufa a 37°C. Para a coloração, os cortes histológicos foram desparafinizados durante 5 minutos em xilol 100% e reidratados em concentrações decrescentes de etanol durante 3 minutos em cada banho. Em seguida, foram corados com eosina e hematoxilina por 60 e 120 segundos, respectivamente e as lâminas foram recobertas por lamínulas, utilizando-se Entellan® para montagem e conservação. Todas as lâminas foram analisadas e fotografadas em 40x e 60x em microscópio de luz óptico (EVOS Cell Imaging Systems, ThermoFisher).

2.3.7 Análise de hepatocompatibilidade da curcumina no fígado

2.3.7.1 Validação do método cromatográfico

O aparelho de CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência) foi Shimadzu-Prominence, composto por desgaseificador (Modelo DGU 20A5), módulo de distribuição de solvente (modelo LC-20AT), injetor automático (modelo SIL-20AHT), forno de coluna (Modelo CTO-20A), detector de fluorescência (modelo RF-10AXL) e controlador do sistema 85 CBM-20A.

Os parâmetros utilizados na análise estão apresentados na Tabela 1 e foram definidos com base em uma revisão da literatura, considerando diversos artigos científicos. Os métodos foram aplicados e avaliados conforme os critérios específicos de cada estudo (OLIVEIRA et al., 2011; FONSECA-SANTOS; GREMIÃO; CHORILLI, 2017; ANTUNES et al., 2020; SETYANINGSIH et al., 2021).

Tabela 1- Parâmetros das análises cromatográficas.

Parâmetro	Condição
Coluna	C18 (Eclipsed XDB de 5 µm, 4,6 mm a 150 mms)
Vazão	1 mL/min
Fase móvel	Acetonitrila (0,1% trifluoroacético), 50% Água mili-Q (0,1% trifluoroacético), 50%
Detecção	Excitação: 420 nm Emissão: 550 nm
Volume de injeção	10 µL
Temperatura da coluna	25 °C
Tempo de corrida	12,5 e 30 min
Modo	Isocrático

Todos os reagentes foram de grau de pureza adequado para CLAE. A obtenção e o processamento dos dados foram realizados através do software LCsolution (Shimadzu, Tóquio, Japão).

2.3.7.2 Linearidade do método CLAE

A linearidade do método foi realizada primeiramente em CLAE sem fluorescência e posteriormente com fluorescência nas concentrações de curcumina de 0,5, 01, 002, 0,004 e 0,0008 mg/mL. A linearidade do método da molécula curcumina, foi determinada a partir da solução estoque de 0,5 mg/mL e foi analisada a linearidade do método utilizando-se a absorbância ou fluorescência da curcumina.

Foi realizada uma diluição analítica de 100 x do volume de curcumina em metanol, seguida por 10 min de agitação em vórtex e, a partir da solução estoque, foi determinada as concentrações teóricas (0,1, 0.005, 0.025, 0.0125, 0,00625, 003125, 0,00156, 0,007 e 0,0003 mg/mL) para realização da curva de calibração (diluente). Ressalta-se que além da curcumina,

dois outros curcuminóides podem ser detectados em menor quantidade, demetoxicurcumina (20-27%) e bisdemetoxicurcumina (10-15%).

Em paralelo, a linearidade também foi avaliada usando a matriz biológica, que é o fígado. O efeito matriz é primordial para determinar possível interferência dos componentes dos órgãos na detecção da curcumina. Dessa forma, 10 animais controles que receberam 200 µL de solução salina de fosfato tamponada (PBS) em dose única foram utilizados para este fim. O fígado desses animais foi coletado, lavado com solução PBS 4% e pesado. Em seguida, o processo de fortificação foi realizado. Esse procedimento consiste em adicionar concentração conhecida de curcumina (0,5 mg/mL) e proceder à sua extração como detalhado no item 2.3.8.

O cálculo de regressão linear foi feito pelo método dos mínimos quadrados e, posteriormente, foi feita a avaliação da associação linear entre as concentrações por meio do coeficiente de correlação (r) e de determinação (r²), de acordo com a RDC N° 658/2022 (Anvisa, 2022).

2.3.7.3 Precisão

A precisão do método foi determinada em termos de repetibilidade. As precisões intra e intercorridas foram avaliadas através de três determinações independentes com três concentrações referente ao nível da linearidade (0,0008, 0,0032 e 0,006 mg/mL). As soluções de curcumina foram preparadas conforme exposto no item 2.4.4.4 da otimização do método. Em cada um dos ensaios foram determinados a recuperação em porcentagem e o desvio padrão relativo (DPR) para as injeções.

Os resultados foram expressos através do coeficiente de variação (CV%), calculado de acordo com a equação:

Equação 1

$$CV\% = (DP/C \text{ média}) \times 100$$

Onde: DP = estimativa do desvio padrão da média; C média = médias das medidas em triplicata para cada amostra analisada.

2.3.7.4 Exatidão

A exatidão demonstra o grau de concordância entre os resultados encontrados na análise e um valor de referência ou teórico aceito como verdadeiro. A análise foi feita com as mesmas

concentrações utilizadas para o cálculo da precisão do método e os resultados foram expressos em função da porcentagem de recuperação (E%), segundo a equação:

Equação 2

$$E\% = (C_{obt}/C) \times 100$$

Onde: C_{obt} = concentração obtida após a análise; C = concentração teórica

2.3.7.5 Limite de Detecção

Refere-se à menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser detectada nas condições experimentais estabelecidas, embora não necessariamente quantificada com precisão e exatidão adequadas. O limite de detecção (LD) foi calculado pela seguinte fórmula:

Equação 3

$$LD = 3,3\sigma/S$$

Onde: σ é o desvio padrão da curva analítica e S é o coeficiente angular da mesma curva.

2.3.7.6 Limite de Quantificação

O Limite de Quantificação (LQ) representa a menor quantidade de analito que pode ser determinada com precisão e exatidão adequadas, de acordo com as condições experimentais estabelecidas.

Equação 4

O LQ teórico foi calculado pela fórmula: $LQ = 10\sigma/S$ (Equação 4), onde: σ é o desvio padrão da curva analítica e S é o coeficiente angular da curva.

2.3.8 Preparo das amostras

Após os tempos de tratamentos, os animais foram eutanasiados e o fígado de cada camundongo foi coletado. Inicialmente, lavou-se o órgão em uma solução tampão fosfato 4%

e rapidamente resfriado em nitrogênio líquido para preservar a estrutura e a composição molecular. Posteriormente, as amostras foram armazenadas a -80°C até o momento da análise no cromatógrafo (CLAE).

No dia da análise, o fígado descongelado foi triturado em 200 μL de solução contendo 0,9% de cloreto de sódio (soro fisiológico) utilizando-se placa de petri e bisturi. A amostra foi transferida em microtubos com a solução extratora – metanol absoluto, e homogeneizada por 10 minutos em agitador tipo Vortex (Kasvi K-452810). Ao término do tempo transcorrido a solução foi levada para banho ultrassônico por 1 h a 37°C . Logo após, as amostras foram centrifugadas a 2.575g por 10 min a 4°C . Em seguida, foi retirado o sobrenadante e este transferido para microtubos, filtrados em filtro de 0,45 μm em criotubos (tipo *vials*) para análise.

2.3.9 Análise espectrofotométrica

A análise por espectrofotometria é uma técnica amplamente utilizada na quantificação de compostos bioativos, como a curcumina, devido à sua sensibilidade e praticidade. A análise espectrofotométrica foi realizada como metodologia complementar. Essa metodologia baseia-se na absorção de luz em comprimentos de onda específicos, permitindo a determinação da concentração do composto em solução (ESPINOZA-TORRES et al., 2023).

A análise foi realizada utilizando espectrofotômetro da marca *Thermo Fisher Scientific Varioskan LUX*, utilizando absorbância e fluorescência. Para isso, a linearidade foi avaliada de acordo com o preparo citada no item 2.4.1.1 e a preparação das amostras foi feita de acordo com o item 2.4.1.4. Como solvente foi utilizado o metanol, pois ele não interfere nas medições e permite uma boa dissolução do composto.

A análise foi conduzida em um comprimento de excitação e emissão de 700 nm e 420 nm em temperatura ambiente, respectivamente, o que é ideal para a curcumina, dada sua estrutura química e propriedades ópticas. Foi realizada análise da curcumina dissolvida em metanol (controle) e da curcumina presente no órgão, utilizando como branco o metanol. As amostras foram mantidas cobertas com papel alumínio para evitar fotodegradação (MARTELO-VIDAL; VÁZQUEZ, 2014; KUMAR et al., 2016; KADAM et al., 2018; ESPINOZA-TORRES et al., 2023).

2.4 Análise estatística

Para avaliar os resultados do estudo *in vivo*, o peso corpóreo dos animais, assim como o peso médio dos órgãos foi mensurado e calculado para cada grupo experimental. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão, o que possibilita uma representação precisa da variação de peso entre os indivíduos dentro de cada grupo. Essa medida estatística forneceu uma visão mais clara sobre o impacto do tratamento com curcumina – seja na forma livre ou nanoencapsulada – sobre o organismo dos animais, uma vez que alterações no peso corpóreo ou nos órgãos poderiam indicar efeitos tóxicos ou reações adversas ao tratamento.

Para as análises comparativas, os dados de cada grupo de tratamento foram contrastados tanto entre si quanto em relação ao grupo controle, que não recebeu o tratamento com curcumina. Essa comparação permitiu observar diferenças significativas nos efeitos entre as formulações de curcumina e confirmar a eficácia e segurança da nanoencapsulação em relação à curcumina livre. As análises foram conduzidas usando o teste estatístico Two-way ANOVA, que é particularmente útil para analisar dados de experimentos com múltiplos fatores e níveis, como foi o caso em que se usou diferentes dosagens e formulações de curcumina, garantindo que as variações observadas não eram decorrentes de variabilidade aleatória.

Adicionalmente, o teste de comparações múltiplas de Tukey foi aplicado para identificar exatamente quais grupos apresentavam diferenças significativas. Essa técnica é especialmente eficaz para destacar quais dosagens ou tipos de curcumina influenciaram de forma relevante o peso dos órgãos e do tumor em comparação com o grupo controle. A utilização desses métodos estatísticos robustos assegura que as conclusões do estudo sejam embasadas em dados confiáveis.

Para análise quantitativa da quantificação de curcumina no fígado foi utilizado o *software* Microsoft Excel 2023 para tabular os dados e o *software* Prisma para análise da variância por ANOVA seguida de teste de Tukey para verificar a diferença mínima significativa. Qualquer valor de ($p < 0,05$) foi considerado significativo.

3. RESULTADOS

3.1 ESTUDO DE VIABILIDADE CELULAR

Nesta seção, serão abordados os resultados obtidos no ensaio *in vitro*, que teve como principal objetivo comparar a biocompatibilidade da curcumina livre (CURC) e associada a nanopartícula (NLMC) em cultura de células de carcinoma mamário (4T1 e MCF-7) e fibroblastos (NIH-3T3).

Em relação aos resultados relativos à viabilidade celular será feita a comparação entre os grupos de tratamento com nanopartículas lipídicas carregadas com curcumina (NLMC), nanopartículas lipídicas não modificadas (NLM) e curcumina livre (CURC) em relação ao controle.

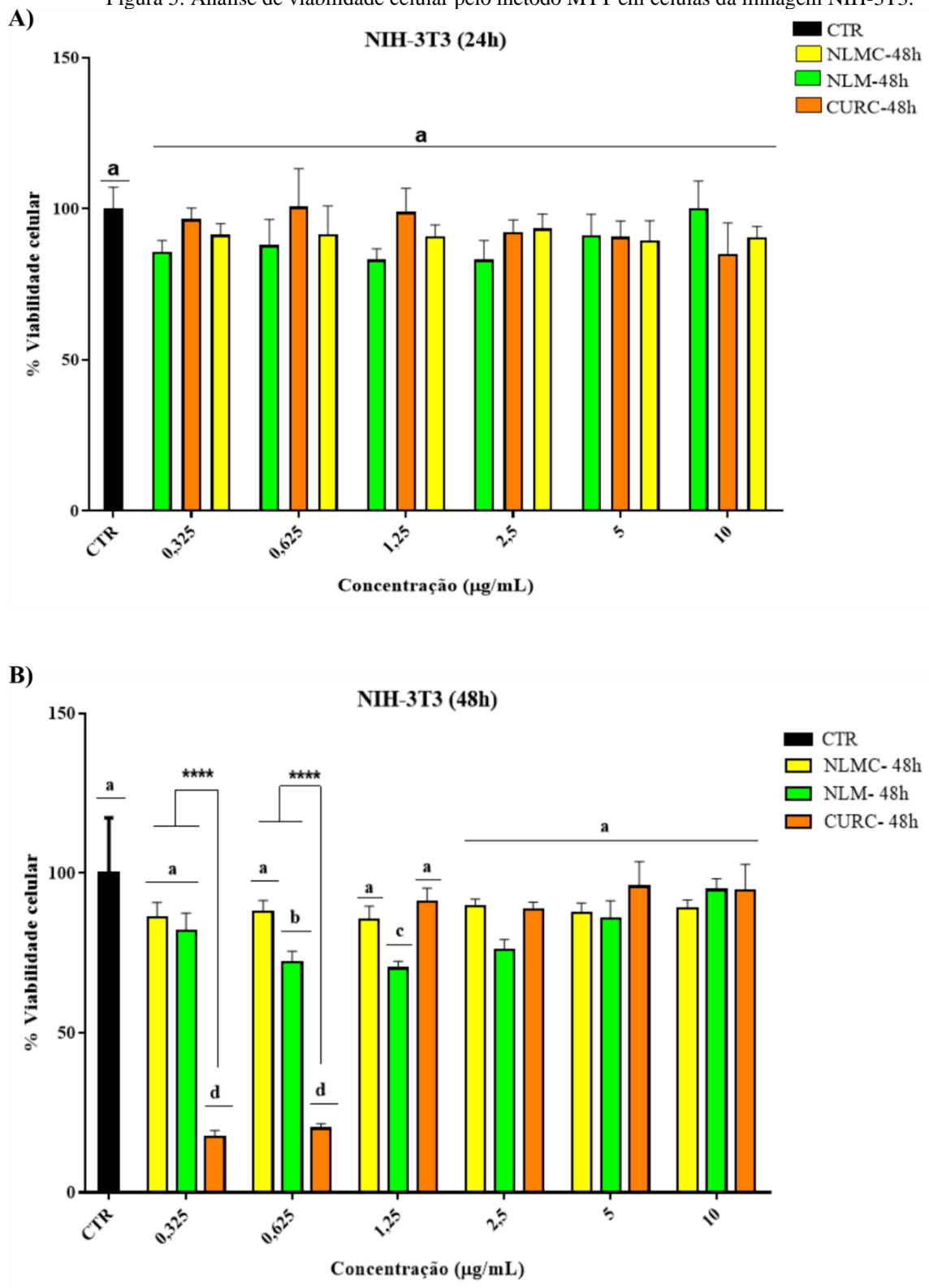
De maneira geral, foi possível inferir que houve diferenças significativas na resposta aos tratamentos com curcumina livre (CURC), nanopartículas lipídicas não modificadas (NLM) e nanopartículas lipídicas carregadas com curcumina (NLMC) em cultura de células NIH-3T3, 4T1 e MCF-7 (Figuras 5, 6 e 7). A seguir serão destacados os resultados para cada linhagem celular e tempo avaliados neste estudo.

Na Figura 5 estão apresentados os resultados do estudo de viabilidade celular em células NIH-3T3 (linhagem de fibroblastos murino), após 24 horas (A) e 48 horas (B) de exposição aos tratamentos.

Na linhagem NIH-3T3, após 24 horas de tratamento, não houve redução da viabilidade celular em nenhuma das doses testadas, sendo o menor percentual médio de viabilidade de 83% no tratamento com NLM na dose de 1,25 µg/mL.

No entanto, após 48 horas, observou-se uma redução significativa da viabilidade celular com CURC nas doses de 0,325 µg/mL e 0,625 µg/mL, resultando em cerca de 20% de viabilidade ($p < 0,05$). Após o tratamento com NLM houve redução de cerca de 30% da viabilidade celular nas doses de 0,625 e 1,25 µg/mL. Entretanto, o tratamento NLMC não induziu redução significativa na viabilidade celular (Figura 5B).

Figura 5: Análise de viabilidade celular pelo método MTT em células da linhagem NIH-3T3.



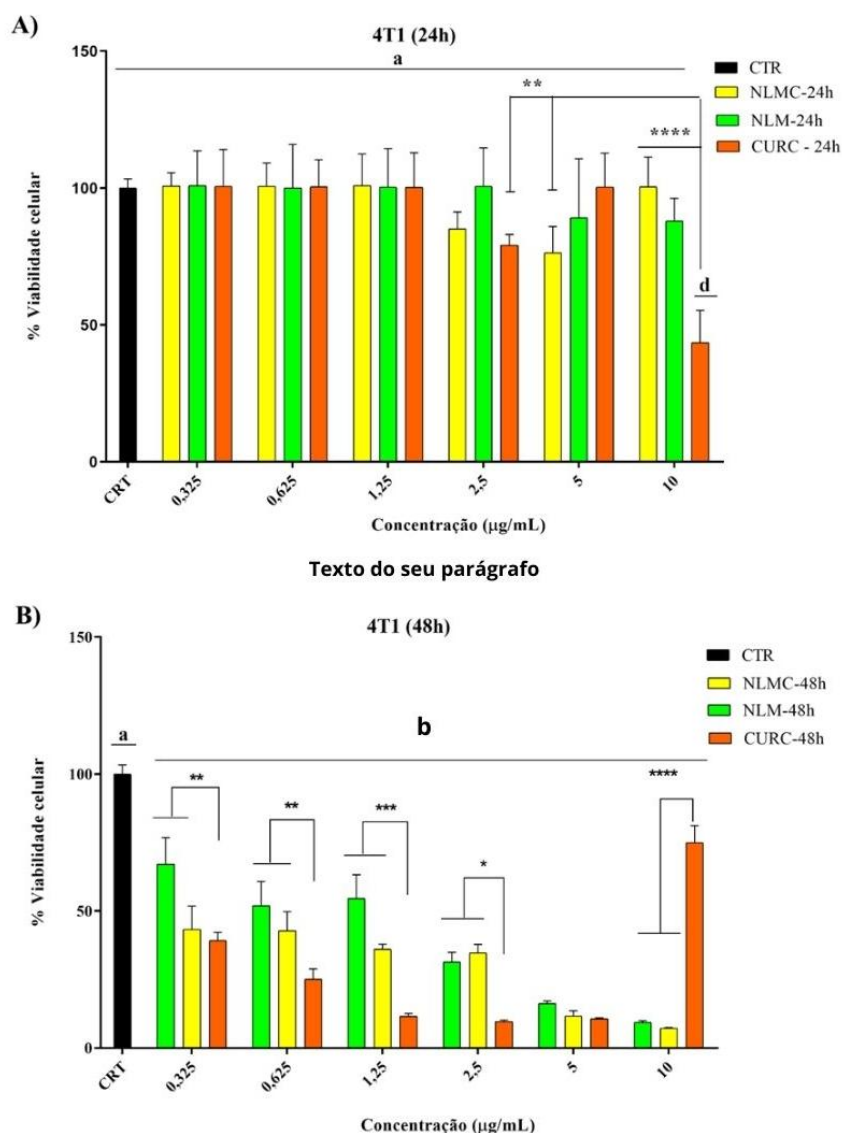
Legenda: Análise de viabilidade celular pelo método MTT em NIH-3T3 após (A) 24 h e (B) 48 h de exposição aos tratamentos com curcumina livre (CURC), nanopartículas lipídicas carregadas com curcumina (NLMC), nanopartículas lipídicas não modificadas (NLM). O grupo controle (CTR) não recebeu intervenção terapêutica. Na abscissa são representados os valores de concentrações de curcumina. Letras acima das barras indicam diferenças estatísticas em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Asteriscos acima das barras (*) indicam diferenças estatísticas entre os grupos tratados com NLMC, NLM e CURC as diferentes amostras na mesma concentração, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

Os resultados da análise de viabilidade em células da linhagem 4T1, apresentados na Figura 6, mostram os efeitos dos tratamentos com NLMC e CURC após 24 horas (A) e 48 horas (B).

Após 24 horas, não houve redução significativa na viabilidade celular nas concentrações de 0,325; 0,625 e 1,25 $\mu\text{g/mL}$, em todos os grupos experimentais. No entanto, nas concentrações mais elevadas (2,5 e 5,0 $\mu\text{g/mL}$), o tratamento com NLMC reduziu a viabilidade celular em 85%, enquanto o CURC provocou uma redução de 79%. Em ambos os casos se notaram diferença estatística significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

Após 48 horas, o tratamento com CURC na concentração de 0,325 $\mu\text{g/mL}$ causou uma redução de 43% na viabilidade celular, enquanto o NLMC na concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ reduziu a viabilidade em 56%, ambas as reduções apresentando diferença estatística significativa em comparação ao controle.

Figura 6: Análise de Viabilidade Celular pelo método de MTT em células da linhagem 4T1.



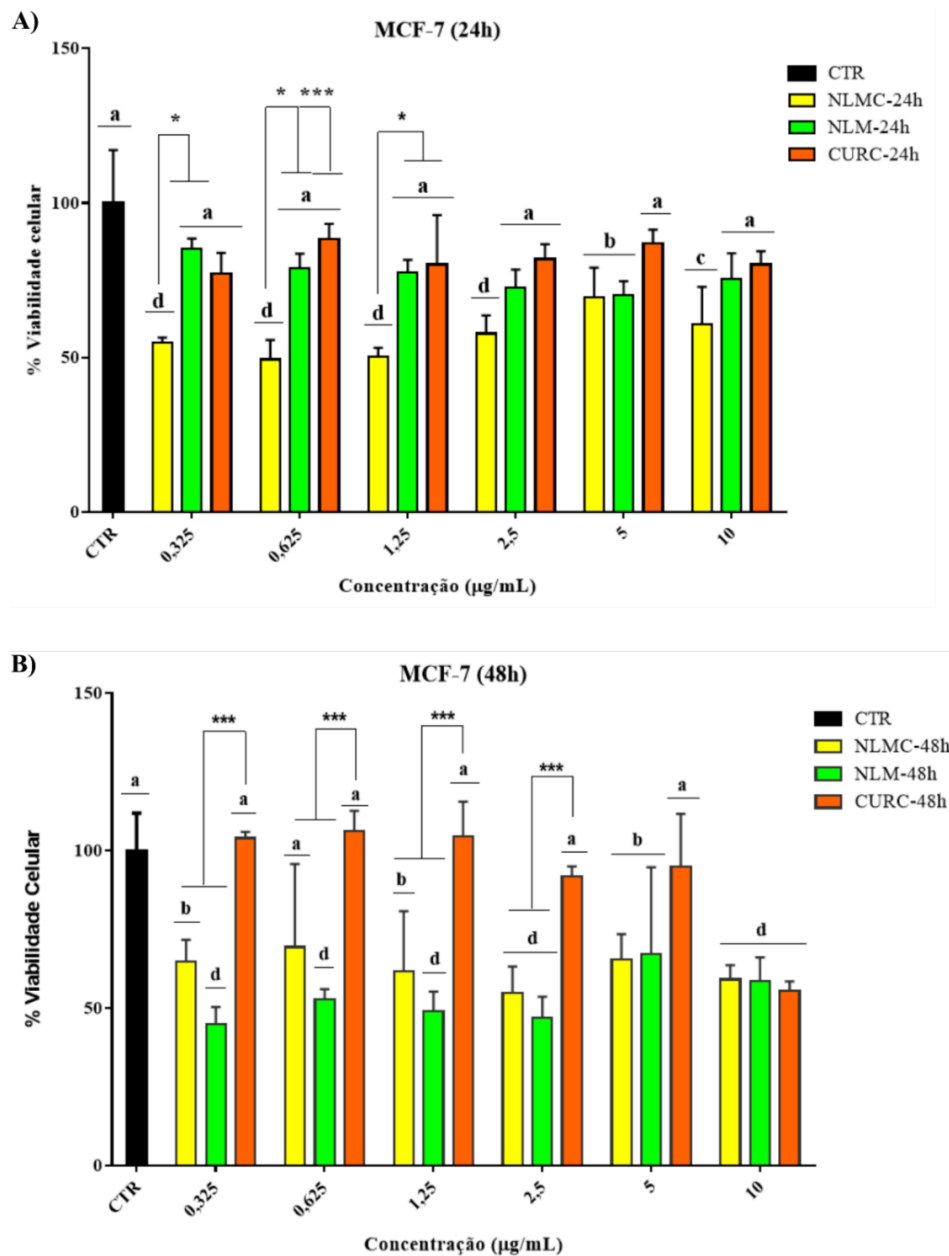
Legenda: Análise de viabilidade celular pelo método MTT em 4T1 após (A) 24 h e (B) 48 h de exposição aos tratamentos com curcumina livre (CURC), nanopartículas lipídicas carregadas com curcumina (NLMC), nanopartículas lipídicas não modificadas (NLM). O grupo controle (CTR) não recebeu intervenção terapêutica. Na abscissa são representados os valores de concentrações de curcumina. Letras acima das barras indicam diferenças estatísticas em reação ao grupo controle ($p < 0,05$). Asteriscos acima das barras (*) indicam diferenças estatísticas entre os grupos tratados com NLCM, NLM e CURC as diferentes amostras na mesma concentração, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

Na Figura 7 estão apresentados os resultados de viabilidade celular na linhagem de células MCF-7 após 24 horas (A) e 48 horas (B) de exposição dos tratamentos com CURC, NLM e NLMC.

Na linhagem MCF-7, observou-se que após 24 horas, houve uma redução da viabilidade de 55% na concentração de 2,5 µg/mL e 50% na concentração de 1,25 µg/mL após tratamento com NLMC. Após 48 horas, no tratamento NLMC e na concentração de 2,5 µg/mL observou-se redução de 55% na viabilidade celular, enquanto nas concentrações de 5,0 e 10 µg/mL não

houve diferença entre os grupos de tratamentos, observando-se redução significativa da viabilidade apenas em relação ao controle. Assim, os resultados sugerem que, após 48 horas de tratamento, as nanopartículas lipídicas carregadas com curcumina (NLMC) demonstraram uma redução significativa na viabilidade celular em comparação ao controle, indicando um efeito citotóxico potencial.

Figura 7: Análise da Viabilidade Celular pelo método de MTT em células da linhagem MCF-7.



Legenda: Análise de viabilidade celular pelo método MTT em MCF-7 após (A) 24 h e (B) 48 h de exposição aos tratamentos com curcumina livre (CURC), nanopartículas lipídicas carregadas com curcumina (NLMC), nanopartículas lipídicas não modificadas (NLM). O grupo controle (CTR) não recebeu intervenção terapêutica. Na abscissa são representados os valores de concentrações de curcumina. Letras acima das barras indicam diferenças estatísticas em reação ao grupo controle ($p < 0,05$). Asteriscos acima das barras (*) indicam diferenças

estatísticas entre os grupos tratados com NLCM, NLM e CURC as diferentes amostras na mesma concentração, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

3.2 ESTUDO *IN VIVO*

3.2.1 Análises clínicas

O estudo foi conduzido em um grupo de animais sem tumor (GST) e outro grupo de animais portadores de tumor 4T1 (GT). Os dados referentes ao peso corpóreo dos animais e o peso dos órgãos do grupo de animais sem tumor (GST) estão apresentados na Tabela 4. Na Tabela 5 são apresentados dados do peso corporal do grupo de camundongos com tumor (GT). A sigla GST representa o grupo de animais sem tumor e GT representa animais com tumor. As numerações são relativas ao grupo experimental, a saber - GST1 e GT1 representam os grupos controles (grupo 1 tratado com PBS); GST2 e GT2 representam os grupos de animais tratados com CURC enquanto os grupos GST3 e GT3 representam os grupos de animais tratados com NLMC.

De maneira geral, não se observou diferenças significativas no peso corpóreo e/ou peso dos órgãos dos animais, quando comparados os grupos tratados com CURC (GST2 e GT2) ou com NLMC (GST3 e GT3) nos tempos pré-definidos de 30 minutos, 1 hora, 6 horas, 12 horas e 24 horas. Da mesma forma, ao serem comparados com o grupo controle (salina), não se observou diferenças estatísticas entre os demais grupos (Tabelas 4 e 5). As fotomicrografias dos órgãos são apresentadas nos Apêndices A e B.

Portanto, os tratamentos com CURC e NLMC não resultaram em alterações significativas no peso corporal ou no peso dos órgãos, como rins, fígado, baço, coração, pulmão e intestino nas condições testadas neste estudo.

Tabela 2 - Peso (g) corpóreo e dos órgãos de animais, sem indução tumoral, referentes aos grupos tratados com CURC ou NLMC, nos tempos de (30 min, 1h e 6h ,12 e 24h).

		<i>Peso corporal</i>	<i>Rins</i>	<i>Fígado</i>	<i>Baço</i>	<i>Coração</i>	<i>Pulmão</i>	<i>Intestino</i>
GST2 (CURC) sem indução tumoral	<i>30'</i>	18,24± 1,09	0,27± 0,02	1,01±0,12	0,14±0,02	0,12±0,01	0,16±0,02	0,12±0,02
	<i>1h</i>	17,88± 1,83	0,26±0,03	1,00±0,12	0,14±0,03	0,12±0,01	0,19±0,02	0,14±0,05
	<i>6h</i>	16,16± 3,46	0,25± 0,04	0,85±0,14	0,13±0,02	0,10±0,02	0,31±0,27	0,13±0,03
	<i>12h</i>	15,90±4,26	0,24±0,03	0,98±0,18	0,13±0,01	0,11±0,01	0,19±0,02	0,14±0,01
	<i>24h</i>	19,20±1,37	0,28±0,02	1,04±0,06	0,13±0,02	0,12±0,01	0,19±0,04	0,12±0,01
	<i>GST1 24h</i>	17,22±0,52	0,29± 0,04	0,93±0,13	0,14±0,03	0,12±0,02	0,21±0,06	0,14± 0,01
GST3 (NLMC) sem indução tumoral	<i>30'</i>	18,38± 1,09	0,28± 0,03	1,08±0,10	0,13±0,02	0,12±0,01	0,18±0,02	0,15±0,02
	<i>1h</i>	16,10±2,54	0,23±0,04	0,88±0,11	0,11±0,01	0,11±0,01	0,16±0,02	0,12±0,04
	<i>6h</i>	17,44±2,48	0,25± 0,04	0,87±0,13	0,13±0,03	0,10±0,03	0,19±0,02	0,14±0,03
	<i>12h</i>	18,86±□2,86	0,31±0,04	1,00±0,10	0,12±0,02	0,14±0,01	0,23±0,04	0,29±0,26
	<i>24h</i>	13,78±1,78	0,21±0,02	0,80±0,07	0,11±0,01	0,10±0,01	0,15±0,02	0,13±0,01
	<i>GST1 24h</i>	17,22±0,52	0,29±0,04	0,93±0,13	0,14±0,03	0,12±0,02	0,21±0,06	0,14± 0,01

Legenda: Peso (g) corpóreo e dos órgãos em camundongos do grupo sem indução tumoral, avaliados em diferentes intervalos de tempo (30 min, 1h, 6h, 12h e 24h). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Esta tabela fornece uma visão geral da variação dos pesos corpóreos indicando estabilidade em resposta ao tratamento.

Nota: **GST1:** Grupo controle (Salina PBS); **GST2 (CUR):** Grupo sem tumor que recebeu tratamento com curcumina; **GST3 (NLMC):** Grupo sem tumor que recebeu curcumina encapsulada em nanopartícula lipídica sólida.

Tabela 3 – Peso (g) corpóreo e dos órgãos de animais, com indução tumoral, referentes aos grupos tratados com CURC ou NLMC, nos tempos de (30 min, 1h e 6h ,12 e 24h).

		<i>Peso corporal</i>	<i>Rins</i>	<i>Fígado</i>	<i>Baço</i>	<i>Coração</i>	<i>Pulmão</i>	<i>Intestino</i>
GT2 (CURC) com indução	<i>30'</i>	18,24± 1,09	0,27± 0,02	1,01±0,12	0,14±0,02	0,12±0,01	0,16±0,02	0,12±0,02
	<i>1h</i>	17,88± 1,83	0,26±0,03	1,00±0,12	0,14±0,03	0,12±0,01	0,19±0,02	0,14±0,05
	<i>6h</i>	16,16± 3,46	0,25± 0,04	0,85±0,14	0,13±0,02	0,10±0,02	0,31±0,27	0,13±0,03
	<i>12h</i>	15,90±4,26	0,24±0,03	0,98±0,18	0,13±0,01	0,11±0,01	0,19±0,02	0,14±0,01
	<i>24h</i>	19,20±1,37	0,28±0,02	1,04±0,06	0,13±0,02	0,12±0,01	0,19±0,04	0,12±0,01
	<i>GT1 24h</i>	19,02± 3,30	0,36± 0,04	1,15±0,14	0,23±0,05	0,16±0,05	0,27±0,04	0,58±0,60
GT3 (NLMC) com indução	<i>30'</i>	19,42± 0,95	0,30± 0,01	1,11±0,02	0,19±0,07	0,12±0,01	0,20±0,04	0,18±0,02
	<i>1h</i>	17,52± 3,76	0,28±0,08	0,91±0,17	0,15±0,06	0,14±0,08	0,26±0,09	0,15±0,04
	<i>6h</i>	19,82± 1,60	0,33± 0,07	1,07±0,18	0,17±0,05	0,19±0,06	0,22±0,03	0,15±0,04
	<i>12h</i>	19,06±2,98	0,31±0,05	1,09±0,21	0,18±0,09	0,14±0,01	0,23±0,04	0,15±0,03
	<i>24h</i>	16,74±4,11	0,27±0,05	1,01±0,22	0,16±0,04	0,11±0,01	0,20±0,07	0,30±0,26
	<i>GT1 24h</i>	19,02± 3,30	0,36± 0,04	1,15±0,14	0,23±0,05	0,16±0,05	0,27±0,04	0,58±0,60

Legenda: Peso (g) corpóreo e dos órgãos em camundongos com indução tumoral, avaliados em diferentes intervalos de tempo (30 min, 1h, 6h, 12h e 24h). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Esta tabela fornece informações sobre a resposta dos animais ao tratamento com curcumina e nanopartículas lipídicas, permitindo a análise da biocompatibilidade e possíveis efeitos adversos associados à indução tumoral.

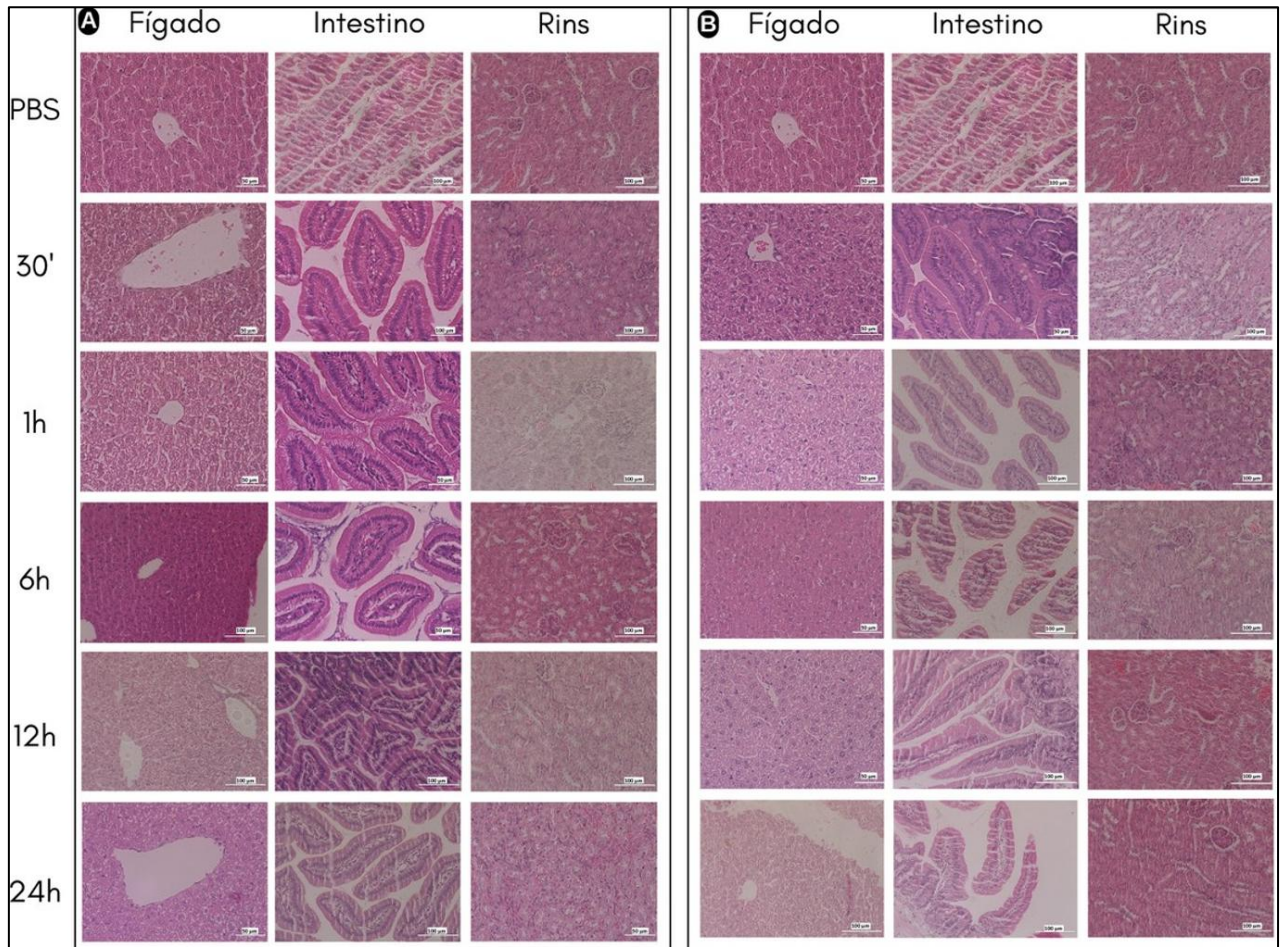
Nota: **GT1:** Grupo com tumor; **GT2 (CUR):** Grupo com tumor que recebeu tratamento com curcumina; **GT3 (NLMC):** Grupo com tumor que recebeu curcumina encapsulada em nanopartícula lipídica sólida.

3.2.2 Análise histopatológica

A seguir são ilustradas análises histológicas dos órgãos de camundongos Balb/c sem e com indução tumoral e sob tratamento com curcumina livre (CURC) e nanopartículas lipídicas carregadas com curcumina (NLMC). A seguir os dados serão descritos a fim de destacar as diferenças morfológicas e a integridade tecidual resultantes de cada abordagem terapêutica. As imagens são organizadas em colunas, onde na primeira coluna são apresentados os órgãos de animais tratados com CURC e na segunda coluna são mostrados os órgãos tratados com NLMC. Todas as informações a seguir, bem como as imagens representadas nas figuras, são representativas da análise de três lâminas. Na Figura 8 são apresentadas fotomicrografias de animais que não receberam indução tumoral ao passo que a Figura 9 representa imagens de tecidos de animais que receberam indução tumoral. Nas Figura 8 A e 9 A são representadas fotomicrografias dos órgãos fígado, intestino e de rins de animais tratados com PBS (grupo controle) ou CURC nos tempos de 30 min, 1 h, 6 h, 12 h e 24 h. Para o tratamento com PBS foi avaliado o tempo de 24 h. Já na Figura 8 B e 9 B são representadas fotomicrografias dos mesmos órgãos de animais tratados com PBS (grupo controle) ou NLMC nos tempos de 30 min, 1 h, 6 h, 12 h e 24 h.

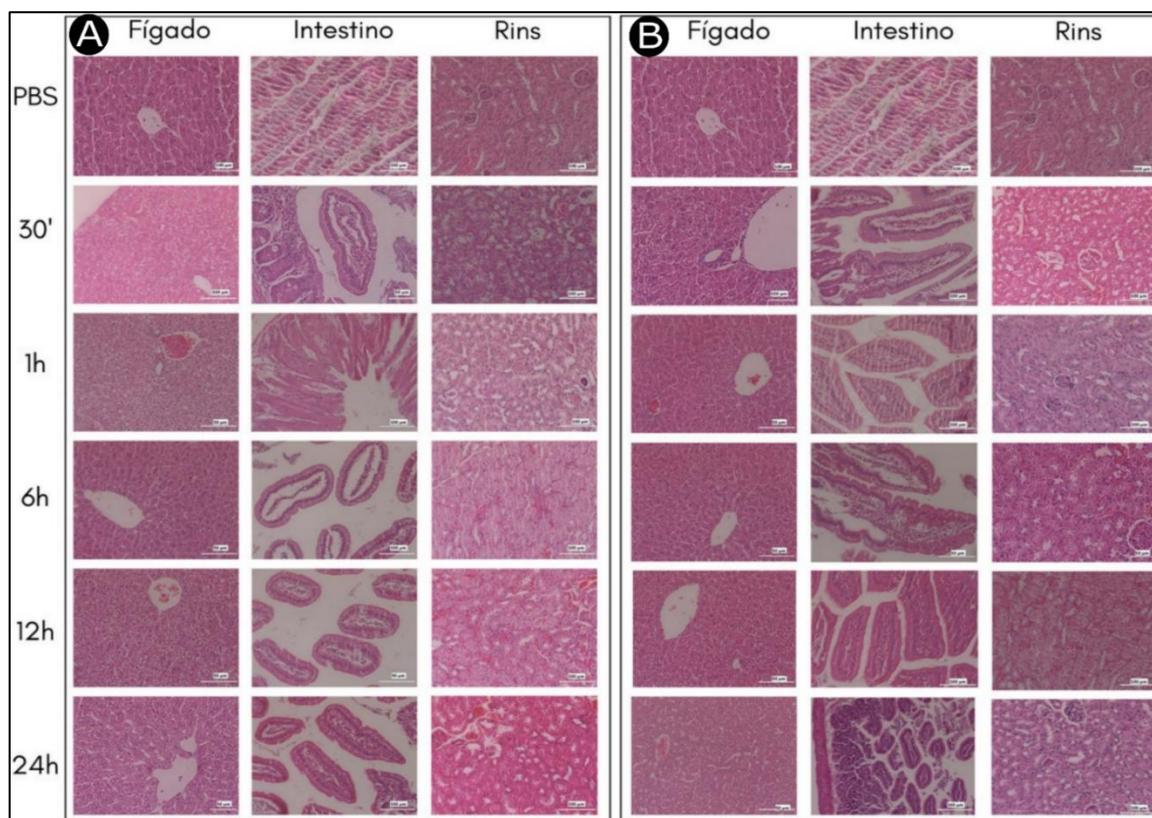
De maneira geral, notou-se que tais tecidos apresentaram características histológicas sem alterações significativas. Conforme pode ser verificado nas Figuras 8 e 9, o parênquima hepático se apresentou bem estruturado, com lóbulos no formato hexagonal. Ainda, os hepatócitos apareciam dispostos radialmente nesses lóbulos e separados por capilares sinusoidais, revestidos de células endoteliais e com células de Kupffer em seu meio. No intestino, na seção do duodeno, apresentou vilosidades na mucosa e enterócitos visíveis. O tecido renal apresentou morfologia característica semelhante ao controle salina, com zona cortical e medular intactas (Figuras 8 e 9).

Figura 8 - Fotomicrografia dos órgãos sem indução tumoral.



Legenda: **Fotomicrografia dos órgãos de animais que não receberam enxerto tumoral.** Foi usado PBS (tampão fosfato salina) como controle negativo. (A) Tratamento com CURC nos tempos de 30 minutos; 1 h; 6 h, 12 h e 24 h. (B) Tratamento com NLMC no tempo de 30 minutos; 1 h; 6 h, 12 h e 24 h. As imagens foram fotografadas em microscópio óptico no aumento de 40 X e 60 X. Coloração HE.

Figura 9 - Fotomicrografia dos órgãos de camundongos que receberam indução tumoral.



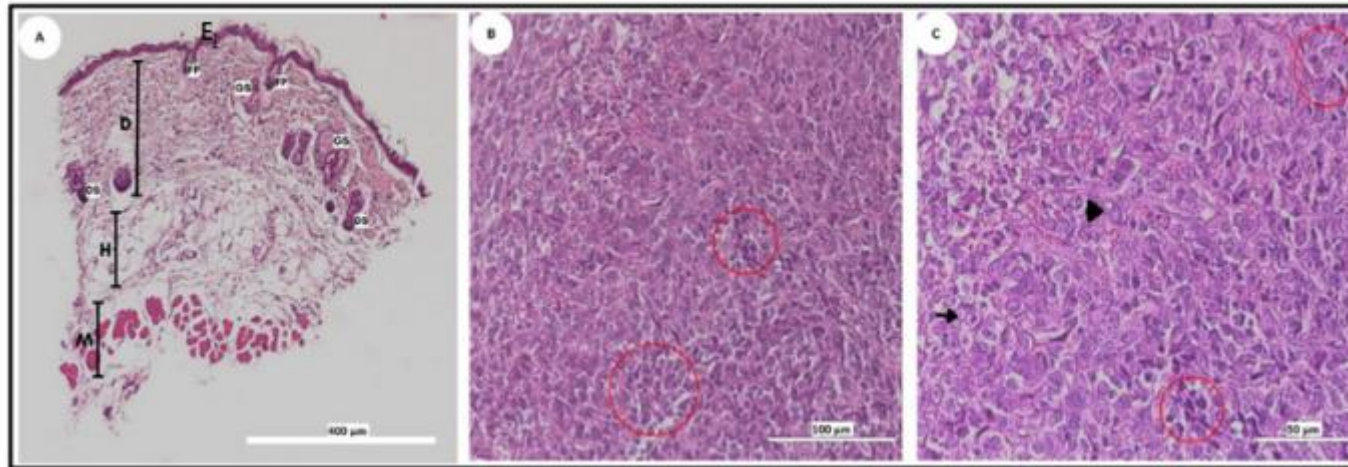
Legenda: **Fotomicrografia dos órgãos dos animais que receberam enxerto tumoral.** (A) Tratamento com CURC no tempo de 30 minutos; 1 h; 6 h, 12 h e 24 h, comparados com o controle. (B) Tratamento com NLMC no tempo de 30 minutos; 1 h; 6 h, 12 h e 24 h. As imagens foram fotografadas em microscópio óptico no aumento de 40 X e 60 X. Coloração HE.

Foram analisados os tecidos de tumores excisados do flanco direito dos animais (Figura 11). Nas figuras 10 a 12 há indicações características de tecido epitelial tais como epiderme, derme, hipoderme, região muscular, folículo piloso, glândula sebácea e ductos sudoríparos, conforme legenda (Figura 10A). Em relação à análise histológica do tecido tumoral observou-se características convencionais de um tecido tumoral maligno, ou seja, desorganização celular, células em mitose, células pouco diferenciadas e intensa atividade inflamatória (Figuras 10, 11 e 12).

Ademais, foram observadas células com alterações nucleares como hiperchromia, quando o núcleo ocupa mais de 50% do citoplasma; pleomorfismo, cariorrexe e cariólise, evento em que há dissolução da cromatina, diminuindo a pigmentação do núcleo. Por meio da análise histopatológica do tumor notou-se células em processos mitóticos e inflamação (Figuras 10, 11 e 12). Nas figuras 11 e 12 são apresentadas fotomicrografias de tecidos tumorais excisados de camundongos Balb/C tratados com CURC ou NLMC, respectivamente.

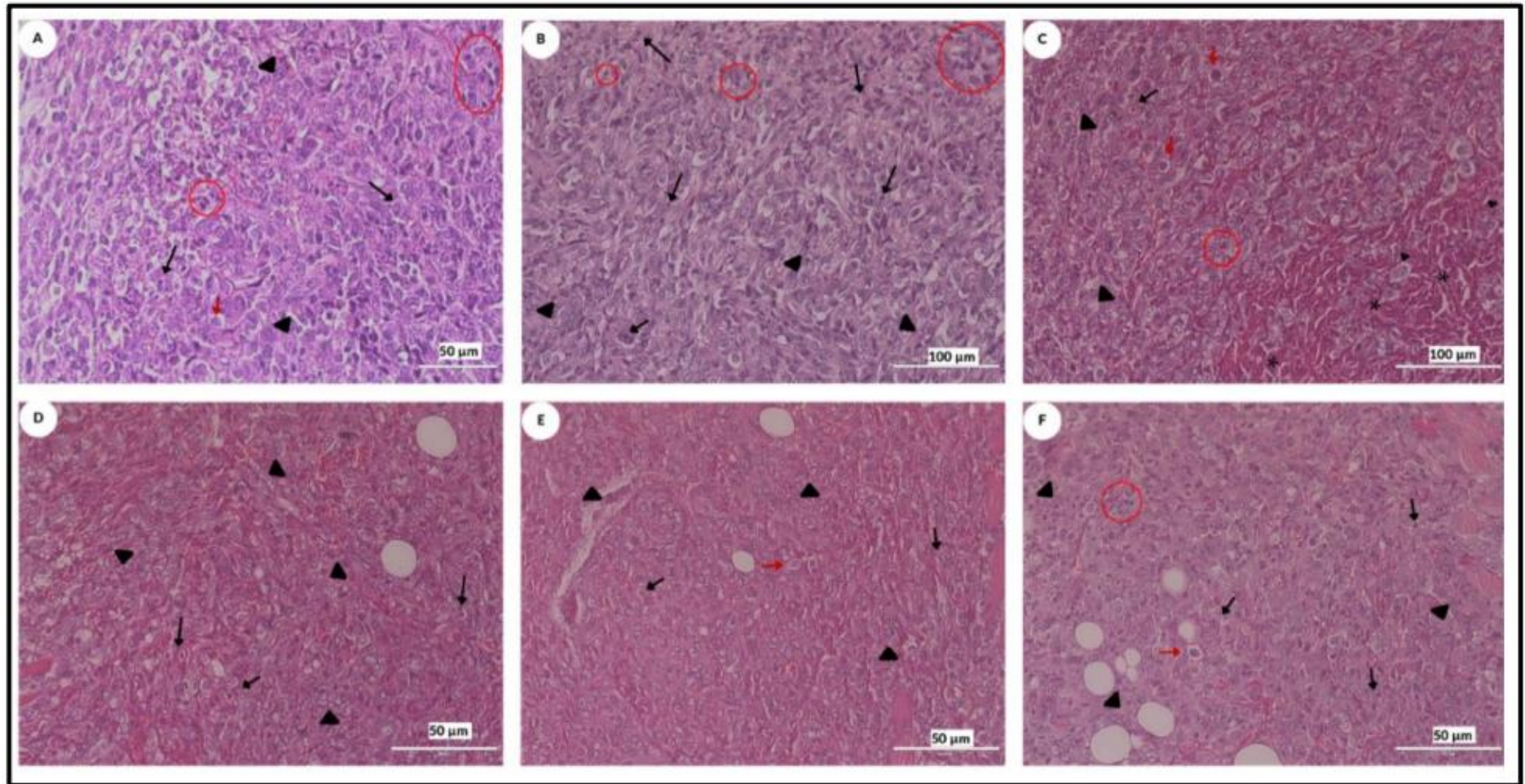
As Figuras 11A e 12A representam a histologia do tumor do grupo salina, ou seja, representam o controle negativo. Nas Figuras 11B a E são representadas fotomicrografias de tumor de animais dos grupos submetidos aos tratamentos com CURC nos tempos de 30 min; 1; 6; 12 e 24 h, respectivamente. Já nas Figuras 12B a E são representadas fotomicrografias de tumor de animais dos grupos submetidos aos tratamentos com NLMC nos tempos de 30 min; 1; 6; 12 e 24 h, respectivamente. Não se observou alterações histológicas resultantes de processos relacionados a efeitos adversos aos tratamentos.

Figura 10 - Fotomicrografias da pele do flanco e dos tumores (carcinoma mamário) excisados de camundongos Balb/C tratados com salina PBS.



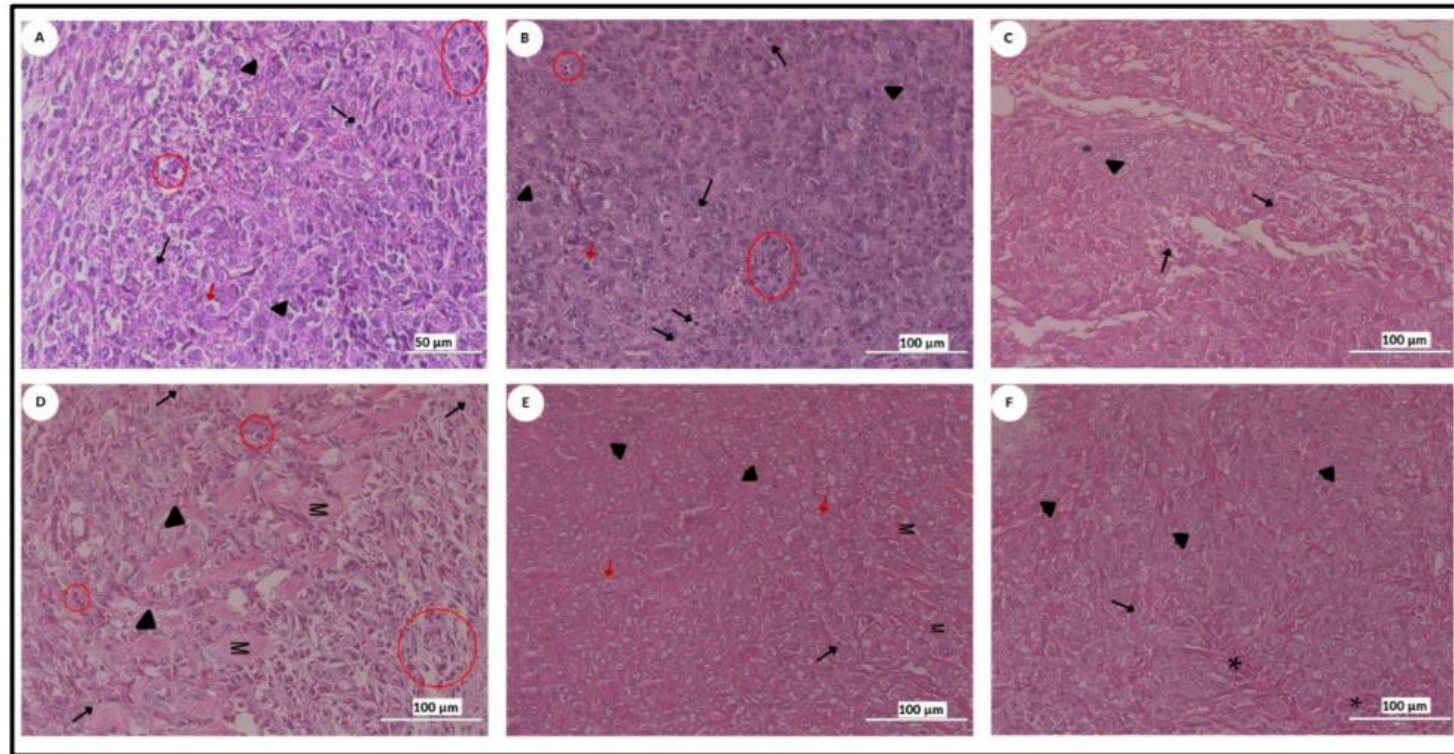
Legenda: A) Histologia do tecido da pele do flanco de camundongo Balb/c (A) E submetido ao enxerto tumoral e ao tratamento com PBS (solução salina fosfato, B), representando o grupo controle. B e C) cariorexe (ponta de seta), núcleos picnóticos (setas pretas) e Linfócitos (círculo vermelho). Representação histológica da massa tumoral sob aumento de 40x e 60x, respectivamente. Nota: Epiderme (E), Derme (D), Hipoderme (H), Região muscular (M), Folículo piloso (FP), Glândula Sebácea (GS) e Ductos Sudoríparos (DS). As imagens foram fotografadas em microscópio óptico no aumento de 40 X e 60 X. Coloração HE.

Figura 11 - Fotomicrografias de carcinoma mamário do flanco de camundongos Balb/c tratados com curcumina (CURC).



Legenda: A) Representação histológica do tumor de camundongo Balb/c submetido a tratamento com salina (controle negativo). B - F Tratamento com curcumina no tempo de 30 minutos; 1 h; 6 h, 12 h e 24 h. Nota: Linfócitos (círculo vermelho), núcleos picnóticos (setas pretas), cariorrexe (ponta de seta), cariólise (seta vermelha) e pontos de hemorragia (asterisco). As imagens foram fotografadas em microscópio óptico no aumento de 40 X e 60 X. Coloração HE.

Figura 12 - Fotomicrografias de carcinoma mamário do flanco de camundongos Balb/c tratados com formulação contendo nanopartícula lipídica com curcumina (NLMC).



Legenda: A) Representação histológica do tumor de camundongo Balb/c submetido a tratamento com salina (controle negativo). B) Tratamento com NLMC no tempo de 30 minutos; 1 h; 6 h, 12 h e 24 h, respectivamente. Nota: Linfócitos (círculo vermelho), núcleos picnóticos (setas pretas), cariorrexe (ponta de seta), cariólise (seta vermelha), pontos de hemorragia (asterisco) e fibras musculares (M). As imagens foram fotografadas em microscópio óptico no aumento de 40 X e 60 X. Coloração HE.

3.3 ESTUDO DE BIODISTRIBUIÇÃO E BIODISPONIBILIDADE

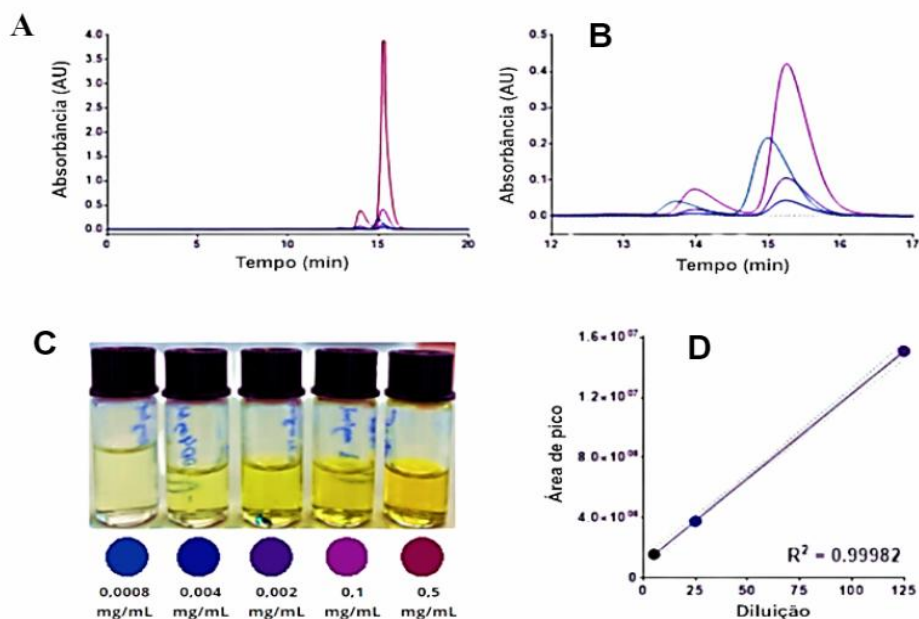
Nesta seção, são apresentados os dados referentes ao processo de calibração e validação do método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e espectrofotometria.

3.3.1 Linearidade do método (CLAE)

A análise quantitativa da curcumina em solvente foi feita através de CLAE. Inicialmente, foi construída a curva matriz para quantificação das moléculas de curcumina e seus análogos, de acordo com a preparação das amostras descrita no item 2.3.8. A partir dessa, obteve-se a padronização da curva analítica da curcumina, composta pelo padrão com o diluente e a substância avaliada (curcumina), ambas nas mesmas concentrações (0,1, 0.005, 0.025, 0.0125, 0,00625, 003125, 0,00156, 0,007 e 0,0003 mg/mL). Os dados apresentados até aqui são relativos à absorvância sem fluorescência (Figura 13).

A curva padrão realizada com a curcumina e metanol foi adequada, visto que se obteve uma linearidade de 0,999 (Figura 13 C). Já a curva construída com a matriz (fígado) e a curcumina apresentou um coeficiente de 0,998; demonstrando uma boa linearidade também. O tempo de retenção da curcumina foi entre 15 e 16 minutos. Ao comparar as duas curvas padrões (Figura 13 A e B), observou-se uma queda de 49% na recuperação da curcumina (dados não mostrados), a qual demonstra uma baixa porcentagem de curcumina no fígado, de acordo com a exatidão do método.

Figura 13 - Curva padrão e Curva Matriz da curcumina.



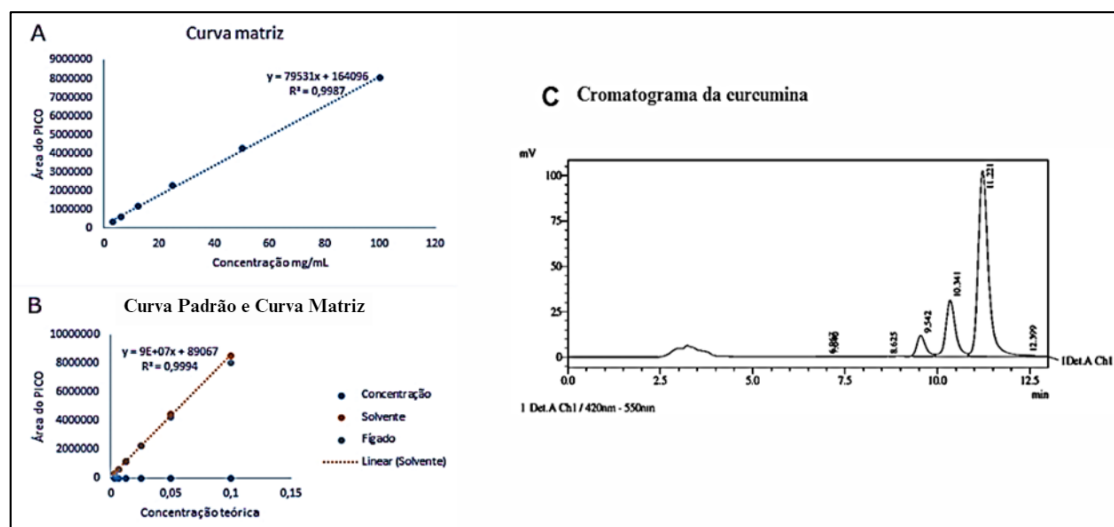
Legenda: Representação gráfica da curva de calibração utilizada para validar o método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para quantificação da curcumina por meio da avaliação de absorbância (A e B, sendo a diferença a escala de representação). As curvas ilustram a relação entre a concentração da substância analisada e a resposta do detector, permitindo a determinação precisa da concentração de curcumina nas amostras. (C) Cada cor representa uma concentração, de curcumina. Os pontos de dados representam as médias de múltiplas medições e a linha de melhor ajuste demonstra a linearidade do método (D). Tempo de retenção foi de 15 a 16 minutos.

A curva matriz realizada com a curcumina no fígado, foi validada, demonstrando linearidade de 0,9987 (Figura 14A) e a curva padrão apresentou linearidade de 0,9994 (Figura 14B). Observou-se que o maior pico correspondeu à curcumina, enquanto os menores pontos da curva sugerem a presença de seus análogos (desmetoxicurcumina e bisdesmetóxicurcumina) (Figura 14 C).

Comparando as duas curvas padrões com suas respectivas concentrações, pôde se observar uma recuperação superior a 90% na concentração de 0,0032 mg/mL da curcumina, sugerindo que, nessas condições, a matriz biológica não interferiu na análise da quantidade de curcumina absorvida. A recuperação da curcumina atingiu seu valor máximo (106,27%) na concentração de 0,1 mg/mL, indicando uma maior eficiência na recuperação à medida que a concentração se eleva (Tabela 6).

Entretanto, por meio desse método, não se detectou curcumina no fígado de animais tratados com curcumina, visto que a concentração de curcumina no órgão foi indetectável (dados não mostrados).

Figura 14- Curva padrão e Curva Matriz da curcumina com fluorescência.



Legenda: Representação gráfica da (A) curva matriz, na quantificação da curcumina em amostras de fígado de camundongos Balb/c; (B) Curva padrão comparada à curva matriz. As equações apresentadas (A: $y = 79531x + 164096$, $R^2 = 0,9987$; B: $y = 9E+07x + 89067$, $R^2 = 0,9994$) demonstram a relação linear entre a concentração de curcumina (0,000625, 0,0125, 0,025, 0,05 e 0,1 mg/mL) e a fluorescência medida; (C) Cromatograma (CLAE) do perfil da curcumina (0,5 mg/mL) com diluente (metanol) e seus análogos. O tempo de retenção da curcumina foi em torno de 11 minutos.

Tabela 4 – Dados da concentração de curcumina em amostras de fígado de camundongos *Balb/c*.

Concentração teórica	Fígado	Recuperação da curcumina
0,0032 mg/mL	311, 570	92,922
0,00625 mg/mL	582, 551	98,934
0,0125 mg/mL	1,179	98,148
0,025 mg/mL	2,3	100,2
0,05 mg/mL	4,266	104,47
0,1 mg/mL	8,3	106,265

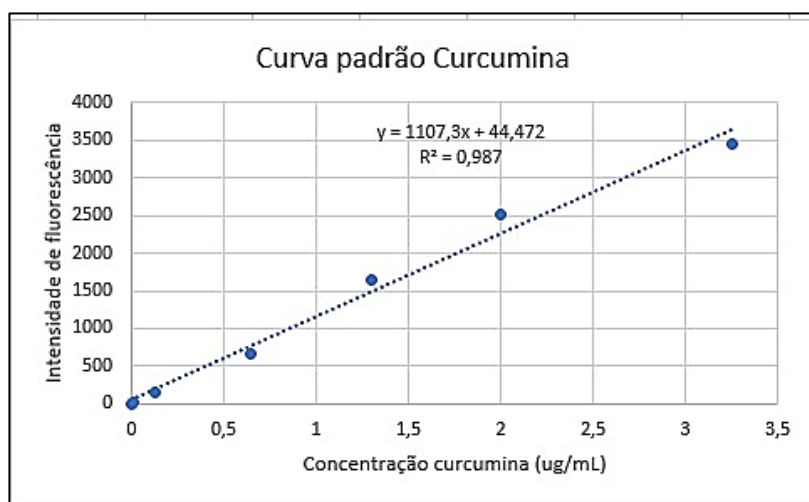
Legenda: A tabela apresenta os valores de concentração teórica da curcumina e do solvente, quantidade de curcumina presente no fígado e a taxa de recuperação para as concentrações indicadas. A recuperação da curcumina no solvente atingiu seu valor máximo (106,27%) na concentração de 0,1 mg/mL, indicando uma maior eficiência na recuperação à medida que a concentração se eleva.

A fim de prosseguir com o estudo de biodistribuição da curcumina no fígado, realizou-se análise também por espectrofotometria, a qual será descrita a seguir.

3.3.2 Linearidade do método por espectrofotometria

A curva padrão, realizada com a curcumina e metanol demonstrou uma linearidade de R^2 0,987 (equação $y = 1107,3x + 44,472$, Figura 15). Ademais, a concentração da curcumina, detectada no fígado, foi calculada a partir da equação da curva padrão em solvente e serviu como padrão para as análises subsequentes, visto que não foi detectada interferência da matriz (fígado) na curva (dados não mostrados).

Figura 15 - Curva padrão da curcumina.



Legenda: Curva padrão da curcumina com solvente. A equação apresentada ($y = 1107,3x + 44,472$) demonstra que o valor de R^2 foi de 0,9987. As concentrações testadas foram 0,0001 $\mu\text{g/mL}$, 0,0002 $\mu\text{g/mL}$, 0,0003 $\mu\text{g/mL}$ e 0,0004 $\mu\text{g/mL}$ de curcumina.

3.3.3 Análise de hepatocompatibilidade

Os resultados do estudo de biodisponibilidade da curcumina no fígado revelaram informações significativas sobre a absorção e a biodistribuição do composto no fígado, conforme descrito a seguir.

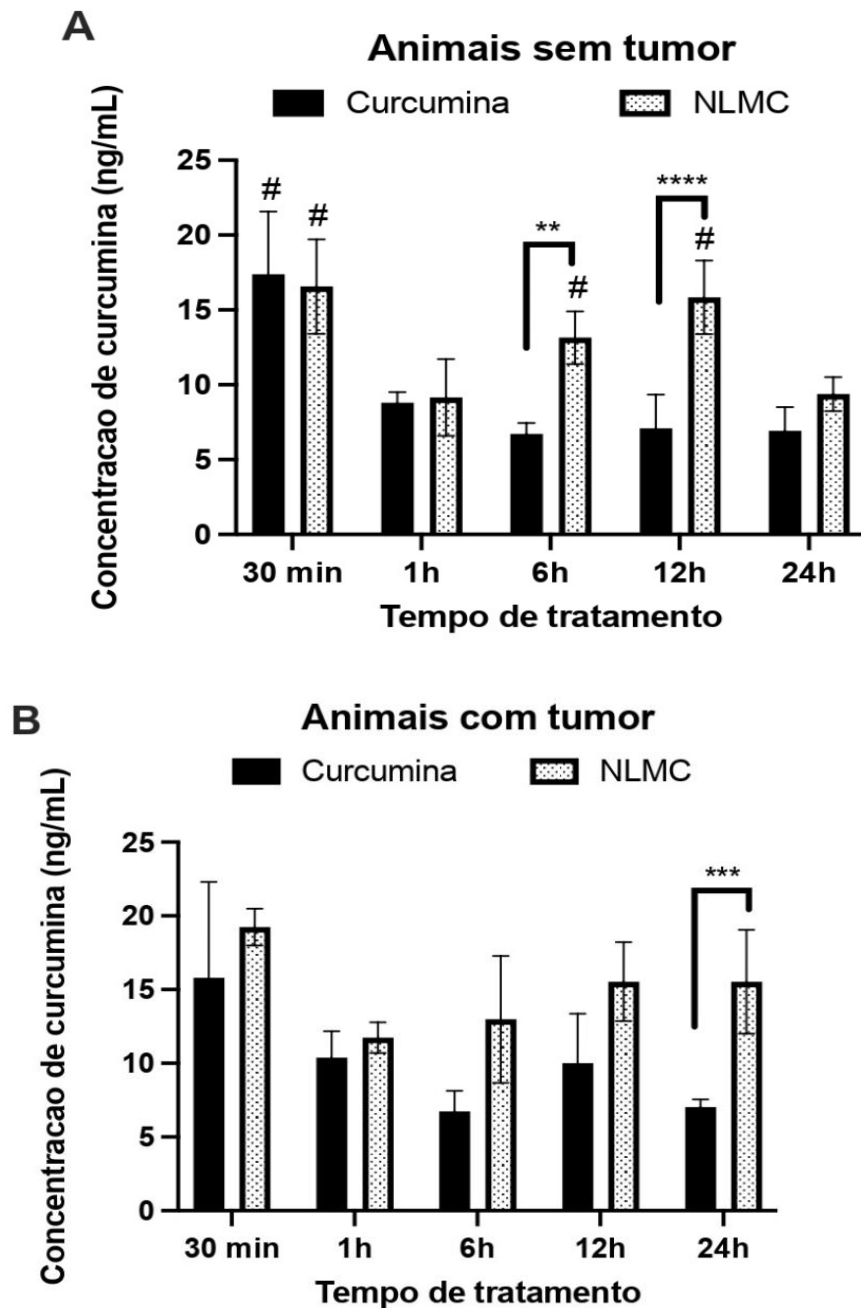
Na figura 16 estão representados os dados da fluorescência, obtidos em espectrofotômetro, os quais representam a concentração de curcumina no fígado em diferentes tempos (30 min, 1h, 6 h, 12h e 24h) e tratamentos (CURC ou NLMC). Não foi detectada fluorescência, equivalente ao comprimento de onda da curcumina no fígado (dados não mostrados).

A análise foi comparativa com animais sem e com tumor. Na figura 16 A representado os dados de animais sem tumor enquanto na figura 16 B representa os dados de animais com tumor. Na Figura 16 A pôde-se observar uma tendência de aumento da concentração da curcumina no fígado no tempo de 30 min, quando se comparado ao mesmo tempo, mas em diferentes tratamentos (CURC e NLMC). Ademais, houve diferença tanto em animais sem tumor e como com tumor (Figura 16A e 16B). Ainda, no tratamento com NLMC pôde-se observar um aumento significativo da concentração da curcumina no fígado em 6 h e 12 h (Figura 16 A).

Ao se avaliar animais com tumor e tratados com curcumina não se observou alterações significativas em relação a concentração da curcumina no fígado e quando comparado ao

NLMC (Figura 16B). Porém, em animais tratados com NLMC notou-se um aumento significativo da concentração da curcumina no fígado em todos os tempos de tratamento no tempo de 24 h (Figura 16 B). Assim, percebeu-se que o tratamento com NLMC resultou em maior acúmulo de curcumina no fígado em relação a CURC, correspondendo a mais de 10 ng/mL, quando comparado aos animais com tumor e sem tumor.

Figura 16 - Avaliação da concentração de curcumina no fígado de animais sem e com tumor.



Legenda: Avaliação da concentração de curcumina em fígados de animais sem tumor (A) e com tumor (B) após 30 minutos, 1, 6, 12 e 24 horas de tratamento com curcumina livre (CURC) e curcumina associada a nanopartículas lipídicas sólidas (NLMC). Observou-se diferença entre os tratamentos nos tempos de 6 e 12 h. Também se observou-se diferença significativa entre os tratamentos com CURC e NLMC no tempo de 24 h entre os tratamentos $p < 0,001$. # representa diferença significativa entre os tempos do mesmo tratamento. A avaliação foi realizada utilizando-se técnica de espectrofotometria.

4 DISCUSSÃO

A busca por terapias mais eficazes e menos invasivas no tratamento do câncer é de extrema importância, considerando-se a alta mortalidade e morbidade associadas a essa doença. Nesse contexto, as plantas medicinais têm se destacado como alternativas promissoras aos tratamentos convencionais, oferecendo uma abordagem terapêutica complementar e menos invasiva. Entre esses compostos naturais, a curcumina, extraída do *Curcuma longa*, tem sido amplamente estudada por suas propriedades anticancerígenas. No entanto, devido à sua baixa solubilidade em sistemas aquosos, sua biodisponibilidade é limitada (LIN et al., 2012; ABDEL-HAFEZ; HATHOUT; SAMMOUR, 2018; CHENG et al., 2020; ELBIALY et al., 2020).

Nos últimos anos, inovações significativas e multidisciplinares, têm resultado no desenvolvimento de novos produtos, serviços e soluções. Entre essas inovações, destaca-se a área da nanobiotecnologia, um campo emergente que visa a manipulação de materiais nanométricos, em escalas atômicas e moleculares, com foco na aplicação em sistemas biológicos. Essa tecnologia tende a levar ao desenvolvimento de terapias mais eficazes e menos invasivas, por melhorar a estabilidade e solubilidade de compostos associados (LI et al., 2020; SHIM et al., 2017; YADAV et al., 2020).

Neste contexto, o uso de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) torna-se uma estratégia vantajosa para melhorar a solubilidade de curcumina por favorecer o aumento da meia vida desse composto, proporcionando melhor biodisponibilidade às células alvo. Além disso, esses sistemas de NLS podem favorecer uma liberação controlada e sustentada da curcumina, o que conseqüentemente, pode promover níveis terapêuticos constantes ao longo do tempo e reduzir a necessidade de doses frequentes. Outro benefício relevante é a entrega direcionada deste tipo de nanopartículas aos tecidos tumorais, o que potencializa a concentração de curcumina na área desejada e minimiza os efeitos adversos sobre os tecidos saudáveis (EL-HELW; FAHMY, 2015b; GUPTA et al., 2020b; PATRA; DEY; CHAKRABORTY, 2023; BOURANG et al., 2024).

Nesta pesquisa, utilizou-se nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com manteiga de murumuru, extraída de uma palmeira amazônica - *Astrocaryum murumuru*, com curcumina. A manteiga de murumuru representa uma alternativa promissora para a produção de NLS. Tecnologias que envolvem extração sustentável da manteiga de murumuru geram fortalecimento da bioeconomia, incentivando a valorização de recursos naturais da Amazônia. Ao integrar práticas sustentáveis, esse processo contribui para a preservação da biodiversidade e o bem-estar das comunidades que dependem desses recursos. Nesse sentido, a utilização da

manteiga de murumuru se configura como uma ponte entre a inovação científica e a sustentabilidade econômica, agregando valor à biodiversidade (GOMES et al. 2019; GANASSIN, 2020; MELLO et al. 2022).

Neste estudo, observou-se que tanto os tratamentos com curcumina livre (CURC) quanto com a curcumina encapsulada em nanopartículas lipídicas sólidas (NLMC) reduziram significativamente a viabilidade celular, sendo notado maior efetividade após 48 horas de tratamento em células tumorais. Entretanto, após os tratamentos com nanopartículas lipídicas sólidas (NLMC e NLM) não foram observadas o mesmo efeito, mesmo nas doses mais baixas em células saudáveis. Estes achados estão de acordo com estudos da literatura que demonstram efeito citotóxico diferenciado entre compostos bioativos livres e associados a nanopartículas (PATRA; DEY; CHAKRABORTY, 2023; GANASSIN, 2020; MELLO et al. 2022).

No entanto, é importante notar que, apesar de a NLMC apresentar menor toxicidade para células saudáveis em comparação à curcumina livre, o efeito citotóxico sobre as células tumorais foi pronunciado, especialmente após 48 h de tratamento. Isso sugere que a forma encapsulada pode ser mais eficaz no controle de células tumorais, o que oferece uma margem de segurança maior para células não tumorais (PATRA; DEY; CHAKRABORTY, 2023).

Pesquisas semelhantes envolvendo a curcumina livre e sua versão encapsulada em nanopartículas lipídicas corroboram os resultados obtidos, pois demonstram uma redução mais significativa na viabilidade de células tumorais, especialmente após 48 horas de tratamento, após o tratamento com nanopartículas associadas à curcumina (GANASSIN, 2020). Ainda, foi relatado que a curcumina encapsulada em nanopartículas lipídicas pode ter uma menor capacidade de perturbar a homeostase do Ca^{2+} intracelular, uma vez que inibe a Ca^{2+} -ATPase do retículo endoplasmático, resultando em um aumento na concentração de Ca^{2+} no citosol. O cálcio é essencial para a regulação de diversos processos fisiológicos, incluindo a regulação da proliferação celular e a apoptose (GANASSIN et al., 2022).

Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) são tipos de nanomateriais promissores para entrega de fármacos, apresentando-se como uma solução versátil para formulações cosméticas e farmacêuticas. Sua aplicabilidade abrange diversas vias de administração, incluindo oral, parenteral e tópica. Essa flexibilidade não apenas melhora a biodisponibilidade dos princípios ativos, mas também permite uma liberação controlada e direcionada, potencializando a eficácia terapêutica e minimizando efeitos adversos (PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009a; YEO et al., 2022).

É importante destacar que o emprego de nanocarreadores lipídicos em produtos farmacêuticos e cosméticos pode, portanto, representar um avanço significativo na otimização

de tratamentos e cuidados com a saúde. Com isso, destaca-se a importância de continuar a explorar e desenvolver essas tecnologias na prática clínica e industrial que utilizem CLN (MELLO et al., 2022; PIRES et al., 2024; WU et al., 2021).

Ainda, estudos de biocompatibilidade são essenciais para prever a toxicidade de nanomateriais, pois avaliam a segurança e a compatibilidade desses materiais com os tecidos biológicos, ajudando a identificar potenciais riscos toxicológicos. Neste estudo, avaliou-se a biocompatibilidade e hepatocompatibilidade de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), oriundas da manteiga de murumuru (*Astrocaryum murumuru*), associadas à curcumina, um composto bioativo com propriedades anticancerígenas em camundongos saudáveis e portadores de carcinoma mamário (COSTA, 2021; GOMES et al., 2019; PADULLÉS-ZAMORA; LEIVA-BADOSA; JODAR-MASANES, 2013).

De maneira geral, não foram observadas diferenças significativas em relação ao peso corpóreo e peso dos órgãos de animais dos grupos controle e tratados com NLMC e CURC, o que mostra uma tendência de biocompatibilidade dos tratamentos com curcumina e com nanopartículas lipídicas contendo curcumina, nas condições testadas neste estudo. Estes achados estão de acordo com estudos prévios que utilizaram este mesmo sistema de NLS (GANASSIN et al., 2022).

Inclusive, no estudo de Ganassin e colaboradores (2022) a formulação de nanopartículas lipídicas sólidas contendo curcumina (NLMC) demonstrou ser estável, biocompatível e apresentou atividade citotóxica em células cancerígenas de cólon retal. A encapsulação de curcumina em NLS apresentou-se como estratégia promissora para melhorar a sua solubilidade e estabilidade. Isto é particularmente relevante em contextos clínicos, onde a estabilidade e a biodisponibilidade dos agentes terapêuticos são fatores críticos para o sucesso do tratamento. Estudos prévios, realizados pelo nosso grupo de pesquisa, demonstraram que as NLMC apresentaram estabilidade desejável para este tipo de formulação (GANASSIN et al., 2022a; MELLO et al., 2022).

Análises histopatológicas são análises complementares em estudos de biocompatibilidade, pois podem indicar tendências de toxicidade. Com isso, é possível avaliar se um dado tratamento induz alterações microscópicas nos tecidos tais como inflamação, necrose ou outras lesões celulares, que indicam a toxicidade do candidato à fármaco. Esses estudos ajudam a determinar a dose segura e a identificar possíveis efeitos adversos antes que o fármaco seja avaliado em ensaio clínico (XIE et al., 2011; CHEN et al., 2019).

Neste estudo, não foram observadas alterações histopatológicas sugestivas de toxicidade em nenhum dos grupos ou tempos avaliados. Isto evidencia que as intervenções

terapêuticas com NLMC e com CURC não induziram toxicidade aguda, nas condições analisadas. Outros estudos também têm demonstrado que a curcumina livre e/ou nanoencapsulada não induziu toxicidade aguda (HEWLINGS; KALMAN, 2017; LAO et al., 2006).

Um sinal clássico de toxicidade se refere à inflamação, caracterizado por sinais como edema, degeneração celular e necrose. Lesões nos rins de natureza tóxica poderiam causar acúmulo de água dentro das células ou resultar em diferenças macroscopicamente evidentes ou em alterações estatísticas no peso dos órgãos. No entanto, nenhuma dessas características foi observada nos órgãos analisados, o que indica que o tratamento com NLMC não provocou efeitos tóxicos, nas condições testadas. Esses resultados corroboram estudos anteriores, demonstrando que nanopartículas lipídicas sólidas possuem baixa toxicidade devido à biocompatibilidade e biodegradabilidade da matriz lipídica e do emulsificante (SILVA et al., 2011; XIE et al., 2011; BHANDARI et al., 2021).

Em relação ao tecido tumoral, todos os grupos de tratamento apresentaram características típicas do desenvolvimento tumoral, com células indiferenciadas e desorganizadas, além de células mitóticas e polimórficas (ALBERTS et al., 2002; HU et al., 2020). Esses achados são compatíveis com o modelo experimental utilizado. A presença de células em mitose e a desorganização celular observadas nas análises histológicas são indicativas de um tumor ativo e em crescimento, características esperadas em um modelo de adenocarcinoma mamário. Tais características do tecido tumoral estão alinhadas com a literatura (CARNEIRO, 2011; CHEN et al., 2019). Apesar das particularidades observadas, neste estudo, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos tratados com CURC ou NLMC, nem entre os diferentes tempos de tratamento (30 min a 24 h).

Um passo crucial no desenvolvimento de novas tecnologias terapêuticas para o câncer, além da biocompatibilidade, consiste na realização de estudos de biodisponibilidade e biodistribuição. A biodisponibilidade refere-se à fração e à velocidade com que a dose administrada de um fármaco atinge a circulação sistêmica e está disponível no local de ação, sendo influenciada por fatores como a absorção do fármaco no trato gastrointestinal, metabolismo de primeira passagem no fígado e a liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica (CHEN et al., 2019; GUO et al., 2019; YU et al., 2023).

A biodistribuição influencia a biodisponibilidade, especialmente para fármacos administrados por via oral, que precisa ser absorvido pelo trato gastrointestinal e metabolizados pelo fígado antes de alcançar a circulação sistêmica. Neste contexto, o fígado desempenha um papel central no metabolismo dos fármacos. O metabolismo de primeira passagem no fígado

pode reduzir a biodisponibilidade de um fármaco administrado por via oral. Isso, por sua vez, afeta a quantidade de fármaco que chega à circulação sistêmica e, conseqüentemente, sua biodistribuição (CHEN et al., 2019; GUO et al., 2019; YU et al., 2023).

Alguns estudos têm demonstrado a biodistribuição de curcumina em concentrações variando de 1,5 mg/kg a 50 mg/kg, nos intervalos de tempo de 0,025 minutos a 24 horas ou até 7 dias. Ainda, diferentes vias de administração já foram testadas. Tem sido relatado que, quando a curcumina foi associada a nanopartículas, observou-se um tempo prolongado de sua eliminação. Isso sugere que as formulações de nanopartículas, como sistemas de liberação, podem aumentar o tempo de circulação sistêmica e melhorar a biodisponibilidade da curcumina (GUO et al., 2019; CHEN et al., 2019; WANG et al., 2021; SILVESTRE et al., 2023).

Técnicas como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrofotometria podem fornecer dados valiosos sobre a absorção e biodistribuição de um dado fármaco. Esses métodos permitem uma análise da intensidade de fluorescência da curcumina, o que pode ser utilizado na compreensão de como a formulação influencia a biodistribuição e o acúmulo do composto em diferentes órgãos (SUN et al., 2019; SANDHIUTAM et al., 2021).

Neste estudo, utilizou-se a via oral para administração de CURC e NLMC. Estudos de biodistribuição devem ser realizados em vários órgãos a fim de se avaliar a farmacocinética da curcumina. O fígado é um órgão importante para se avaliar inicialmente a biodistribuição de curcumina, visto que este órgão desempenha um papel central no metabolismo e na detoxificação de compostos bioativos. Isto é particularmente relevante para fármacos administrados por via oral, pois o fígado é o primeiro órgão a metabolizar esses compostos antes que eles entrem na circulação sistêmica (SOMOGYI; EICHELBAUM, 1982; LI; HUANG, 2008; RWU et al., 2021; ALMEIDA et al., 2011; EL-KATTAN et al., 2012; TEIXÉ-ROIG et al., 2023).

Destaca-se que estudos sobre a hepatocompatibilidade e bioacúmulo de bioativos no fígado são essenciais para prever a biodisponibilidade dos compostos. A avaliação do bioacúmulo de bioativos no fígado permite identificar a extensão do metabolismo hepático e prever a quantidade de fármaco que estará disponível sistemicamente. Isso é fundamental para determinar a eficácia e a segurança do fármaco. (YANG et al., 2020) Fármacos que são extensivamente metabolizados no fígado podem ter uma biodisponibilidade reduzida, necessitando de ajustes na formulação ou na dosagem para alcançar os níveis terapêuticos desejados (SOMOGYI; EICHELBAUM, 1982; LI; HUANG, 2008; RWU et al., 2021; ALMEIDA et al., 2011; EL-KATTAN et al., 2012; TEIXÉ-ROIG et al., 2023).

Além disso, a hepatocompatibilidade, ou a capacidade do fígado de metabolizar um fármaco sem sofrer danos, é um aspecto crítico a ser considerado. Fármacos que causam toxicidade hepática podem levar a sérios efeitos adversos, comprometendo a segurança do tratamento. Portanto, estudos de bioacúmulo no fígado não só ajudam a prever a biodisponibilidade, mas também a avaliar a segurança hepática dos novos fármacos.

Em resumo, a realização de estudos de bioacúmulo de bioativos no fígado é uma etapa fundamental no desenvolvimento de novas terapias anticâncer. Esses estudos fornecem informações cruciais sobre a biodisponibilidade e a segurança hepática dos fármacos, garantindo que eles sejam eficazes e seguros para uso clínico. Fármacos que são bem tolerados pelo fígado e que não causam danos hepáticos são mais propensos a serem eficazes e seguros para uso clínico. Estudos sobre a hepatocompatibilidade ajudam a identificar possíveis riscos e a otimizar a formulação dos medicamentos para minimizar efeitos adversos (SOMOGYI; EICHELBAUM, 1982; LI; HUANG, 2008; RWU et al., 2021; ALMEIDA et al., 2011; EL-KATTAN et al., 2012; TEIXÉ-ROIG et al., 2023).

A escolha de estudar a biodistribuição desse nanossistema (NLMC) no fígado se justifica pela importância desse órgão no metabolismo e absorção de bioativos, sendo um alvo importante na avaliação da eficácia terapêutica de nanopartículas, uma vez que o bioacúmulo no fígado pode impactar diretamente a resposta a um tratamento (BAKLAUSHEV et al., 2017; KHAN et al., 2019).

A utilização de sistemas de entrega, como nanopartículas, tem sido estudada por sua capacidade de otimizar a distribuição e a estabilidade de compostos bioativos, o que pode melhorar a resposta ao tratamento. Contudo, deve-se considerar também os riscos de um acúmulo excessivo no fígado, podendo ocorrer efeitos tóxicos, caso a curcumina ou os componentes das nanopartículas provoquem danos hepáticos (YU et al., 2023; CHEN et al., 2019; GUO et al., 2019).

Considerando a limitação terapêutica do uso da curcumina em decorrência do seu metabolismo rápido, torna-se imprescindível a compreensão da farmacocinética da curcumina, especialmente nos órgãos onde pode ocorrer sua maior absorção como o fígado (GUPTA et al., 2020; SILVESTRE et al., 2023; BERTONCINI-SILVA et al., 2024). A metabolização da curcumina no fígado pode impactar sua farmacocinética, limitando sua ação terapêutica. O uso de nanopartículas para a entrega de curcumina pode melhorar sua estabilidade e otimizar sua farmacocinética, resultando em uma maior concentração nos tecidos-alvo e, portanto, efeito terapêutico. Portanto, a principal vantagem das nanopartículas reside na sua capacidade de

melhorar a biodisponibilidade e a entrega direcionada da curcumina, potencializando sua eficácia ao longo do tempo.

Neste estudo, avaliou-se a biodisponibilidade da curcumina no fígado. Observou-se um aumento na concentração de curcumina neste órgão após 30 minutos de tratamento. Por outro lado, o tratamento com NLMC levou a um aumento significativo na concentração de curcumina no fígado apenas nos tempos de 6 e 12 horas. Isso evidencia que houve maior acúmulo de curcumina no tratamento com NLMC do que com CURC livre em um tempo mais longo.

Alguns estudos têm revelado níveis mais baixos de curcumina livre do que associada a nanoestruturas. Isso foi observado no soro, em tecidos, no fígado e no intestino e por diferentes vias de administração. Estes resultados têm sido associados às rápidas taxas de degradação da curcumina, as quais limitam a biodisponibilidade da curcumina em tecidos alvo (KUNNUMAKKARA et al., 2017; SILVESTRE et al., 2023; EL-SAADONY et al., 2023). Em nosso estudo, percebeu-se que houve maior concentração da curcumina no tempo de 30 minutos e depois houve uma queda ao passo que quando a curcumina estava associada a NLS aconteceu o oposto, ou seja, notou-se maior concentração posteriormente (6 e 12 h). Isso mostra que houve um prolongamento da liberação de curcumina quando esta foi associada a nanopartículas, o que está de acordo com os achados da literatura.

Sueth-Santiago e colaboradores (2015) exploram as diferentes vias de administração da curcumina em ensaio clínico e como elas afetam a formação de metabólitos, ressaltando a importância de elucidar o metabolismo da curcumina para otimizar sua eficácia terapêutica. Outros autores discutem a biodisponibilidade da curcumina e os desafios associados à sua absorção, além de apresentar dados sobre a metabolização da curcumina em diferentes órgãos, incluindo fígado e rins, o que é relevante para a compreensão de sua farmacocinética (PRASAD; TYAGI; AGGARWAL, 2014).

Pesquisas realizadas em ensaios não clínicos confirmam que nanopartículas lipídicas melhoraram significativamente a biodistribuição da curcumina nos tecidos tumorais em comparação à curcumina livre. Esses achados estão em consonância com a literatura que sugere que o uso de nanopartículas pode facilitar a entrega direcionada de medicamentos, elevando a concentração do agente terapêutico na área alvo desejado (BERTONCINI-SILVA et al., 2024; SHEHZAD; LEE; LEE, 2013; SILVESTRE et al., 2023). Dessa forma, torna-se evidente a importância da compreensão da farmacocinética da curcumina como promissor candidato quimioterápico.

Neste estudo, foi demonstrado que NLS não apenas aumentaram a biodisponibilidade da curcumina no fígado, mas também demonstraram uma excelente biocompatibilidade. Essa

combinação é fundamental, pois o uso de sistemas de liberação que não induzam toxicidade é essencial para a criação de terapias tanto seguras quanto eficientes. A literatura reforça esse conceito, ressaltando que a biocompatibilidade desempenha um papel crucial na aplicação clínica de novas abordagens terapêuticas (GANASSIN et al., 2022). A junção desses aspectos evidencia o potencial de NLMC lipídicas como uma abordagem inovadora e promissora para futura aplicação clínica no câncer de mama.

4 CONCLUSÕES

Considerando os principais resultados, obtidos nesta tese, pôde-se concluir que:

1. Os tratamentos com curcumina livre (CURC) e encapsulada em nanopartículas lipídicas sólidas (NLMC), em células tumorais (linhagens MCF-7 e 4T1) e saudáveis (linhagem NIH3-3T3), alterou a viabilidade celular, especialmente após 48 horas de tratamento.
2. NLMC demonstrou ser menos citotóxica para células saudáveis em comparação com células tumorais. Porém, o perfil de citotoxicidade dos tratamentos com NLMC foi semelhante entre as duas linhagens de células tumorais.
3. Os tratamentos com CURC e NLMC não resultaram em alterações significativas no peso corpóreo e no peso dos órgãos (rins, fígado, baço, coração, pulmão e intestino), bem como outras alterações clínicas, sendo isso um indicativo de baixa ou nula toxicidade sistêmica.
4. Os tratamentos com CURC e NLMC não induziram alterações histopatológicas nos órgãos analisados, demonstrando ter uma boa biocompatibilidade.
5. O tratamento com CURC levou a um aumento na concentração de curcumina no fígado no tempo de 30 minutos.
6. O tratamento com NLMC levou a um aumento significativo na concentração de curcumina no fígado nos tempos de 6 e 12 horas, o que indica maior acúmulo de curcumina encapsulada do que de curcumina livre e por um tempo mais longo.

5 PRODUÇÃO CIENTÍFICA E ATIVIDADES ACADÊMICAS

A produção científica da autora se destaca pela sua contribuição na interface entre farmacocinética, nanotecnologia e terapias anticâncer, com ênfase no potencial da curcumina como agente terapêutico. Em seu artigo [*Pharmacokinetics of Curcumin Delivered by Nanoparticles and the Relationship with Antitumor Efficacy: A Systematic Review*](#), a autora, como primeira autora, apresenta uma análise abrangente sobre a farmacocinética da curcumina administrada por meio de nanopartículas. A revisão sistemática discute como essa abordagem pode melhorar a biodisponibilidade da curcumina e sua eficácia antitumoral, além de abordar os desafios e as perspectivas futuras para o uso de nanopartículas no tratamento do câncer. Os resultados deste artigo foram fundamentais para o desenvolvimento deste projeto, servindo como alicerce para todo o planejamento experimental. A pesquisa reflete o compromisso da autora em explorar novas formas de entrega de fármacos e em desenvolver estratégias terapêuticas inovadoras com o objetivo de aprimorar os tratamentos oncológicos, fornecendo uma contribuição significativa para o avanço da ciência aplicada ao câncer.

Além de suas publicações, a autora tem se destacado como palestrante e educadora em eventos científicos e acadêmicos. Atuou como palestrante no Encontro Nacional de Pesquisa em Oncologia da Universidade de Brasília (UNB), compartilhando seu conhecimento sobre a aplicação de nanotecnologia no tratamento do câncer. Foi também convidada a palestrar no Simpósio Nanotecnologia de Moléculas Bioativas: Síntese, Avaliação e Aplicação, promovido pela UNB, onde discutiu as implicações do uso de nanomateriais para a entrega otimizada de compostos bioativos em terapias anticâncer.

Sua contribuição à formação de novos profissionais e à disseminação do conhecimento também é notável, com destaque para os cursos de Gestão de Biotério ministrados pela Fiocruz e sua atuação como palestrante na Semana de Risco e Prevenção, organizada pela - Secretaria de Saúde do Distrito Federal, onde capacitou profissionais da saúde em práticas preventivas.

No contexto acadêmico, a autora tem se dedicado ao ensino, atuando como monitora nas disciplinas de Metodologia Científica e Biologia Estrutural de Tecidos, orientando estudantes na elaboração de projetos de pesquisa. Sua atuação como tutora de iniciação científica também tem sido de grande impacto, com uma de suas orientadas recebendo menção honrosa pelo melhor trabalho de graduação na Universidade de Brasília. Esses compromissos demonstram não apenas sua dedicação à pesquisa científica, mas também seu papel crucial na formação de novos cientistas e profissionais da saúde, consolidando sua posição como educadora e tutora interdisciplinar no cenário acadêmico nacional.

6 REFERÊNCIA

ABDEL-HAFEZ, S. M.; HATHOUT, R. M.; SAMMOUR, O. A. Curcumin-loaded ultradeformable nanovesicles as a potential delivery system for breast cancer therapy. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 167, p. 63–72, jul. 2018.

ABURAHMA, M. H.; BADR-ELDIN, S. M. Compritol 888 ATO: a multifunctional lipid excipient in drug delivery systems and nanopharmaceuticals. **Expert opinion on drug delivery**, v. 11, n. 12, p. 1865–1883, 1 dez. 2014.

AKBARI, J. et al. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: a review of the methods of manufacture and routes of administration. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 27, n. 5, p. 525–544, 2022.

ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. 4. ed. New York: Garland Science, 2002.

ANAS TOMEH, M.; HADIANAMREI, R.; ZHAO, X. Molecular Sciences A Review of Curcumin and Its Derivatives as Anticancer Agents. 2019.

ANTUNES, A. H. et al. Bioanalytical method by HPLC-FLD for curcumin analysis in supplemented athletes. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 28, n. 5, p. 599–606, 2020.

BAHARI, L. A. S.; HAMISHEHKAR, H. The Impact of Variables on Particle Size of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers; A Comparative Literature Review. **Advanced pharmaceutical bulletin**, v. 6, n. 2, p. 143–151, 2016.

BAKLAUSHEV, V. P. et al. Luciferase Expression Allows Bioluminescence Imaging But Imposes Limitations on the Orthotopic Mouse (4T1) Model of Breast Cancer. **Scientific Reports 2017 7:1**, v. 7, n. 1, p. 1–17, 10 ago. 2017.

BAN, C. et al. Enhancing the oral bioavailability of curcumin using solid lipid nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 302, p. 125328, 1 jan. 2020.

BERTONCINI-SILVA, C. et al. Enhancing the Bioavailability and Bioactivity of Curcumin for Disease Prevention and Treatment. **Antioxidants**, v. 13, n. 3, 1 mar. 2024.

BHANDARI, R. et al. Toxicity studies of highly bioavailable isoniazid loaded solid lipid nanoparticles as per Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) guidelines. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 160, p. 82–91, 1 mar. 2021.

BOUFLEUR, P. et al. Biodistribution and Pharmacokinetics of Amblyomin-X, a Novel Antitumour Protein Drug in Healthy Mice. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 44, n. 1, p. 111–120, 2019.

BOURANG, S. et al. Application of nanoparticles in breast cancer treatment: a systematic review. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 397, n. 9, 1 set. 2024.

BUNJES, H.; WESTESEN, K.; KOCH, M. H. J. Crystallization tendency and polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 129, n. 1–2, p. 159–173, 8 mar. 1996.

BURKHOLDER, T. et al. Health Evaluation of Experimental Laboratory Mice. **Current protocols in mouse biology**, v. 2, n. 2, p. 145, jun. 2012.

CACCIOLA, N. A. et al. An Overview of the Enhanced Effects of Curcumin and Chemotherapeutic Agents in Combined Cancer Treatments. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 16, p. 12587, 1 ago. 2023.

CARNEIRO, M. L. B. **Efeitos biológicos de citrato de ródio II livre e de sua associação a nanopartículas magnéticas e a magnetolipossomas em células de carcinoma mamário: estudos.** [s.l.] Universidade de Brasília, 2011a.

CARNEIRO, M. L. B. **Efeitos biológicos de citrato de ródio II livre e de sua associação a nanopartículas magnéticas e a magnetolipossomas em células de carcinoma mamário: estudos.** [s.l.] Universidade de Brasília, 2011b.

CHEN, X.-P. et al. Formulation, characterization and evaluation of curcumin-loaded PLGA-TPGS nanoparticles for liver cancer treatment. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 13, p. 3569–3578, 2019.

CHENG, T. et al. Topically applied curcumin/gelatin-blended nanofibrous mat inhibits pancreatic adenocarcinoma by increasing ROS production and endoplasmic reticulum stress mediated apoptosis. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 18, n. 1, 2020.

COELHO, A. G. et al. Plant-Derived Butters as Lipid Nanocarriers: A Systematic and Prospective Review. **Recent Patents on Nanotechnology**, v. 14, n. 4, p. 262–275, 22 maio 2020.

COSTA, N. R. DA S. Desenvolvimento de nanopartícula lipídica sólida à base de manteiga de murumuru (*Astrocaryum murumuru*) para carregamento de cloreto de alumínio-ftalocianina em terapia fotodinâmica anticâncer. 8 abr. 2021.

DIMER, F. A. et al. Impact of nanotechnology on public health: Production of medicines. **Quimica Nova**, v. 36, n. 10, p. 1520–1526, 2013.

DUTTA, S.; SENGUPTA, P. Men and mice: Relating their ages. **Life sciences**, v. 152, p. 244–248, 1 maio 2016.

Efeitos da hepatopatia no metabolismo de fármacos - Distúrbios hepáticos e biliares - Manuais MSD edição para profissionais. Disponível em: <<https://www.msmanuals.com/pt/profissional/dist%C3%BArbios-hep%C3%A1ticos-e-biliares/f%C3%A1rmacos-e-o-f%C3%ADgado/efeitos-da-hepatopatia-no-metabolismo-de-f%C3%A1rmacos>>. Acesso em: 15 dez. 2024.

ELBIALY, N. S. et al. Multifunctional curcumin-loaded mesoporous silica nanoparticles for cancer chemoprevention and therapy. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 291, p. 109540, 2020.

EL-HELW, A. R. M.; FAHMY, U. A. Improvement of fluvastatin bioavailability by loading on nanostructured lipid carriers. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 5797, 16 set. 2015a.

ELISABETTINI, R. et al. Synthesis and physicochemical characterization of mixed diacid triglycerides that contain elaidic acid. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 2, p. 285–291, 1 fev. 1998.

EL-SAADONY, M. T. et al. Impacts of turmeric and its principal bioactive curcumin on human health: Pharmaceutical, medicinal, and food applications: A comprehensive review. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, p. 1040259, 10 jan. 2023.

ESPINOZA-TORRES, S. et al. Synthesis, Characterization, and Evaluation of a Novel Molecularly Imprinted Polymer (MIP) for Selective Quantification of Curcumin in Real Food Sample by UV-Vis Spectrophotometry. **Polymers**, v. 15, n. 16, p. 3332, 1 ago. 2023.

FONSECA-SANTOS, B.; GREMIÃO, M. P. D.; CHORILLI, M. A simple reversed phase high-performance liquid chromatography (HPLC) method for determination of in situ gelling curcumin-loaded liquid crystals in in vitro performance tests. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, n. 7, p. 1029–1037, 2017.

GANASSIN, R. Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas para carregamento de curcumina e análise de sua atividade contra células de câncer colorretal murino CT26. 23 mar. 2020.

GANASSIN, R. et al. Solid lipid nanoparticles loaded with curcumin: Development and in vitro toxicity against CT26 cells. **Nanomedicine**, v. 17, n. 3, p. 167–179, 2022a.

GANASSIN, R. et al. Curcumin induces immunogenic cell death in murine colorectal carcinoma CT26 cells. **Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine**, v. 2, p. 100046, mar. 2022b.

GANASSIN, R. et al. Curcumin induces immunogenic cell death in murine colorectal carcinoma CT26 cells. **Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine**, v. 2, p. 100046, mar. 2022c.

GERA, M. et al. Nanoformulations of curcumin: An emerging paradigm for improved remedial application. **Oncotarget**, v. 8, n. 39, p. 66680–66698, 2017.

GOMES, G. V. L. et al. β -carotene and α -tocopherol coencapsulated in nanostructured lipid carriers of murumuru (*Astrocaryum murumuru*) butter produced by phase inversion temperature method: characterisation, dynamic in vitro digestion and cell viability study. **Journal of Microencapsulation**, v. 36, n. 1, p. 43–52, 2019.

GUO, F. et al. Dual functional matrix metalloproteinase-responsive curcumin-loaded nanoparticles for tumor-targeted treatment. **Drug Delivery**, v. 26, n. 1, p. 1027–1038, 1 jan. 2019.

GUPTA, T. et al. Enhancing Bioavailability and Stability of Curcumin Using Solid Lipid Nanoparticles (CLEN): A Covenant for Its Effectiveness. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 8, 15 out. 2020a.

GUPTA, T. et al. Enhancing Bioavailability and Stability of Curcumin Using Solid Lipid Nanoparticles (CLEN): A Covenant for Its Effectiveness. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 8, 15 out. 2020b.

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

HU, Y. et al. Tumor targeted curcumin delivery by folate-modified MPEG-PCL self-assembly micelles for colorectal cancer therapy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p. 1239–1252, 2020.

JANNIN, V.; CUPPOK, Y. Hot-melt coating with lipid excipients. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 457, n. 2, p. 480–487, 5 dez. 2013.

JIANG, S. et al. Curcumin as a potential protective compound against cardiac diseases. **Pharmacological research**, v. 119, p. 373–383, 1 maio 2017.

KHAN, T. et al. Anticancer Plants: A Review of the Active Phytochemicals, Applications in Animal Models, and Regulatory Aspects. **Biomolecules**, v. 10, n. 1, 1 jan. 2019a.

KHAN, T. et al. Anticancer Plants: A Review of the Active Phytochemicals, Applications in Animal Models, and Regulatory Aspects. **Biomolecules**, v. 10, n. 1, 1 jan. 2019b.

KUMAR, A. et al. Curcumin-loaded lipid nanocarrier for improving bioavailability, stability and cytotoxicity against malignant glioma cells. **Drug Delivery**, v. 23, n. 1, p. 214–229, 2016.

KUNNUMAKKARA, A. B. et al. Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. **British journal of pharmacology**, v. 174, n. 11, p. 1325–1348, 2017a.

KUNNUMAKKARA, A. B. et al. Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. **British journal of pharmacology**, v. 174, n. 11, p. 1325–1348, 2017b.

LAO, C. D. et al. Dose escalation of a curcuminoid formulation. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, p. 4–7, 2006.

LEENA PANIGRAHI, L. et al. Nanoparticle-mediated diagnosis, treatment, and prevention of breast cancer. **Nanoscale Advances**, v. 6, n. 15, p. 3699–3713, 23 jul. 2024.

LI, S. et al. Nanocarrier-mediated antioxidant delivery for liver diseases. **Theranostics**, v. 10, n. 3, p. 1262–1280, 2020.

LI, S. D.; HUANG, L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 4, p. 496–504, jul. 2008.

LIMA FILHO, P. **Estudos de biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos com alimentação: fundamentos e critérios de execução.** [s.l: s.n.].

LIN, Y.-L. et al. 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.

MADE DWI SANDHIUTAM, N. et al. Determine curcumin concentration in organ rats and in ovaries at ovarian cancer model rats using ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry (MS)/MS. **Pharmaceutical Sciences Asia**, v. 48, n. 1, p. 37–45, 2021.

MARTELO-VIDAL, M. J.; VÁZQUEZ, M. Evaluation of Ultraviolet, Visible, and Near Infrared Spectroscopy for the Analysis of Wine Compounds. **Czech J. Food Sci**, v. 32, n. 1, p. 37–47, 2014.

MELLO, V. C. et al. Development of New Natural Lipid-Based Nanoparticles Loaded with Aluminum-Phthalocyanine for Photodynamic Therapy against Melanoma. **Nanomaterials**, v. 12, n. 20, 2022.

MINAFRA, L. et al. Radiosensitizing effect of curcumin-loaded lipid nanoparticles in breast cancer cells. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

MOGHIMI, M. et al. Nanotheranostics: Platforms, Current Applications, and Mechanisms of Targeting in Breast and Prostate Cancers. **Journal of Nanotheranostics 2023, Vol. 4, Pages 346–383**, v. 4, n. 3, p. 346–383, 10 ago. 2023.

MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 161–177, 3 jul. 2000.

OGA, S. et al. Distribuição, biotransformação e excreção de fármacos. Em: **Farmacologia Aplicada PP - Rio de Janeiro**. [s.l.] Atheneu, 2018.

OLIVEIRA, L. T. et al. HPLC-FLD methods to quantify chloroaluminum phthalocyanine in nanoparticles, plasma and tissue: application in pharmacokinetic and biodistribution studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, n. 1, p. 70–77, 25 ago. 2011.

PADULLÉS-ZAMORA, N.; LEIVA-BADOSA, E.; JODAR-MASANES, R. Dosificación de fármacos en insuficiencia hepática crónica. **Revista Española de Enfermedades Digestivas**, v. 105, n. 5, p. 305–306, 2013.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International journal of pharmaceutics**, v. 366, n. 1–2, p. 170–184, 21 jan. 2009a.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International journal of pharmaceutics**, v. 366, n. 1–2, p. 170–184, 21 jan. 2009b.

PATIL, S. et al. Enhanced oral bioavailability and anticancer activity of novel curcumin loaded mixed micelles in human lung cancer cells. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 22, n. 12, p. 1103–1111, 15 nov. 2015.

PATRA, S.; DEY, J.; CHAKRABORTY, A. Physicochemical Characterization, Stability, and In Vitro Evaluation of Curcumin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles Prepared Using Biocompatible Synthetic Lipids. **ACS Applied Bio Materials**, v. 6, n. 7, p. 2785–2794, 17 jul. 2023.

PIRES, H. M. et al. Antimicrobial Activity of Essential-Oil-Based Nanostructured Lipid Carriers against *Campylobacter* Spp. Isolated from Chicken Carcasses. **Pharmaceutics**, v. 16, n. 7, 2024.

PRASAD, S.; TYAGI, A. K.; AGGARWAL, B. B. **Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: The golden pigment from golden spice.** **Cancer Research and Treatment**, 2014. Disponível em: <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3918523/>>. Acesso em: 2 nov. 2024

RAVINDRAN, J.; PRASAD, S.; AGGARWAL, B. B. Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively? **The AAPS journal**, v. 11, n. 3, p. 495–510, set. 2009.

RAYANE GANASSIN. Infusão de morte celular imunogência em células cancerosas murinas CT26 por curcumina. v. 2507, n. February, p. 1–9, 2020.

RIBEIRO, L. N. D. M. et al. Use of nanoparticle concentration as a tool to understand the structural properties of colloids. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2018.

SETYANINGSIH, D. et al. Isocratic high-performance liquid chromatography (HPLC) for simultaneous quantification of curcumin and piperine in a microparticle formulation containing *Curcuma longa* and *Piper nigrum*. **Heliyon**, v. 7, n. 3, p. e06541, 1 mar. 2021.

SHEHZAD, A.; LEE, J.; LEE, Y. S. Curcumin in various cancers. **BioFactors (Oxford, England)**, v. 39, n. 1, p. 56–68, jan. 2013.

SHIM, G. et al. Nanoformulation-based sequential combination cancer therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 115, p. 57–81, 2017.

SILVA, A. C. et al. Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): high pressure homogenization versus ultrasound. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 86, n. 1, p. 158–165, 1 ago. 2011.

SILVESTRE, F. et al. Pharmacokinetics of Curcumin Delivered by Nanoparticles and the Relationship with Antitumor Efficacy: A Systematic Review. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 7, p. 943, 1 jul. 2023a.

SILVESTRE, F. et al. Pharmacokinetics of Curcumin Delivered by Nanoparticles and the Relationship with Antitumor Efficacy: A Systematic Review. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 7, p. 943, 1 jul. 2023b.

SOMOGYI, A.; EICHELBAUM, M.; GUGLER, R. Prediction of bioavailability for drugs with a high first-pass effect using oral clearance data. **European journal of clinical pharmacology**, v. 22, n. 1, p. 85–90, jan. 1982.

SUN, J. L. et al. Determination and pharmacokinetic study of isothiuronium-modified pyrimidine-substituted curcumin analog (1G), a novel antitumor agent, in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **ARTIFICIAL CELLS NANOMEDICINE AND BIOTECHNOLOGY**, v. 47, n. 1, p. 1505–1512, 2019.

TEIXÉ-ROIG, J. et al. Enhanced in vivo absorption and biodistribution of curcumin loaded into emulsions with high medium-chain triglyceride content. **Food Research International**, v. 174, p. 113595, 1 dez. 2023.

TOEHWÉ, L. H. et al. Comparación de los resultados de biodisponibilidad in vitro, in vivo e in silico de diferentes formulaciones de comprimidos de prednisona para evaluar la viabilidad de una posible bioexención. **Ars Pharmaceutica (Internet)**, v. 62, n. 4, p. 358–370, 20 set. 2021.

VAUGHN, A. R.; BRANUM, A.; SIVAMANI, R. K. Effects of Turmeric (*Curcuma longa*) on Skin Health: A Systematic Review of the Clinical Evidence. **Phytotherapy research : PTR**, v. 30, n. 8, p. 1243–1264, 1 ago. 2016.

VIDAL, T. DO C. S.; SIMÃO, M. O. DE A. R.; ALMEIDA, V. F. DE. The sustainability of vegetable oils and butters production in na amazonian community – RESEX Médio Juruá. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, p. e32710313478–e32710313478, 17 mar. 2021.

WANG, Y. et al. Curcumin-loaded liposomes with the hepatic and lysosomal dual-targeted effects for therapy of hepatocellular carcinoma. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 602, 2021.

WU, K. W. et al. Primaquine loaded solid lipid nanoparticles (SLN), nanostructured lipid carriers (NLC), and nanoemulsion (NE): effect of lipid matrix and surfactant on drug entrapment, in vitro release, and ex vivo hemolysis. **AAPS PharmSciTech**, v. 22, n. 7, p. 240, 1 out. 2021.

XIE, S. et al. Acute toxicity study of tilmicosin-loaded hydrogenated castor oil-solid lipid nanoparticles. **Particle and fibre toxicology**, v. 8, 20 nov. 2011.

YADAV, K. et al. Standardization and quantification of curcumin from *Curcuma longa* extract using UV visible spectroscopy and HPLC. ~ **1913** ~ **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 5, p. 1913–1918, 2018.

YADAV, V. et al. Nanocarriers(S) based approaches in cancer therapeutics. **Current Nanomedicine**, v. 10, n. 2, p. 130–148, 2020.

YANG, B. et al. Nanoformulations to enhance the bioavailability and physiological functions of polyphenols. **Molecules**, v. 25, n. 20, 2020.

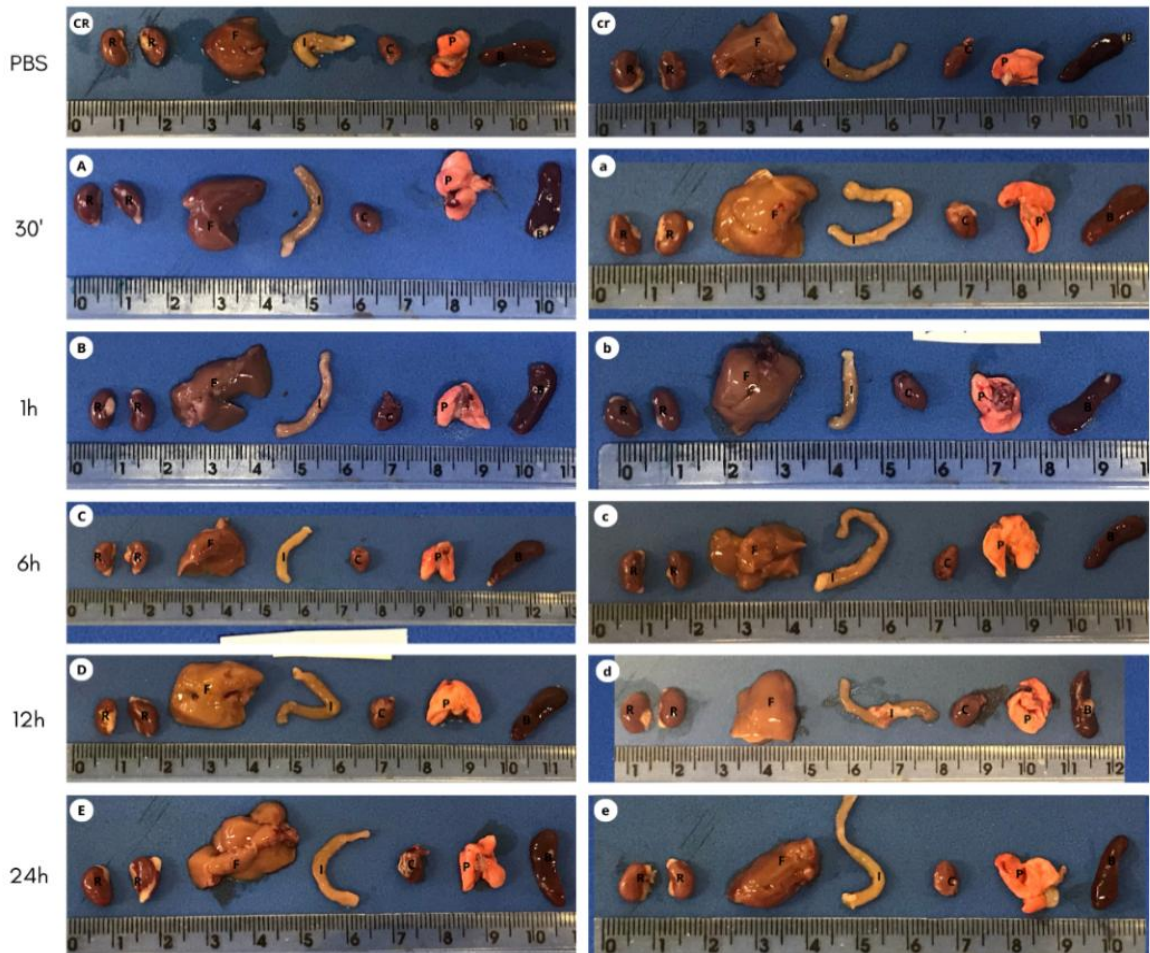
YEO, S. et al. Solid Lipid Nanoparticles of Curcumin Designed for Enhanced Bioavailability and Anticancer Efficiency. **ACS Omega**, v. 7, n. 40, p. 35875–35884, 2022.

YU, Y. et al. Physicochemical and In Vitro Digestion Properties of Curcumin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles with Different Solid Lipids and Emulsifiers. **Foods**, v. 12, n. 10, 2023.

ZUNUNI VAHED, S. et al. Liposome-based drug co-delivery systems in cancer cells. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 71, p. 1327–1341, 1 fev. 2017.

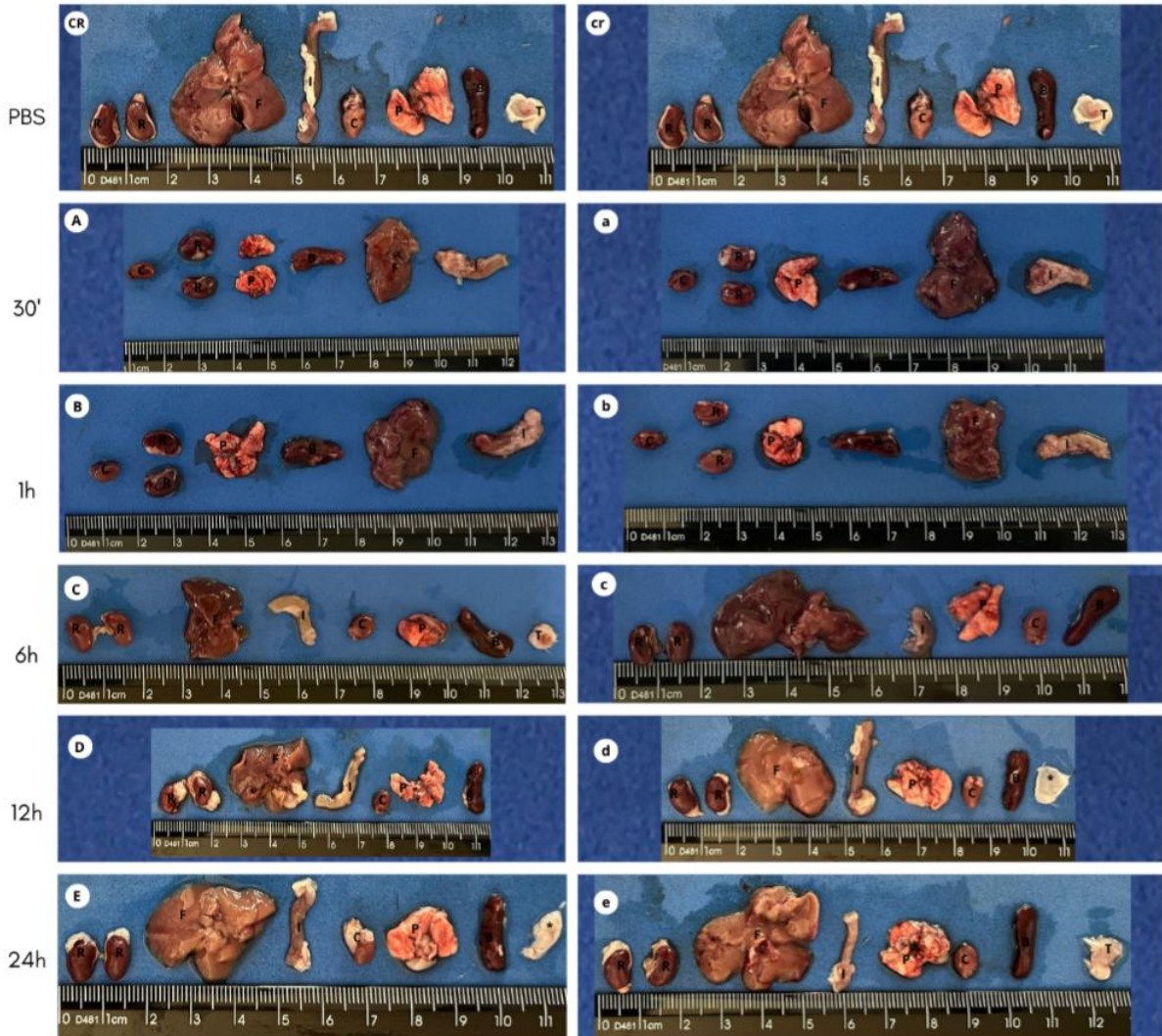
APÊNDICES

APÊNDICE A – FOTOGRAFIA ANATÔMICA DOS ÓRGÃOS APÓS A INCISÃO CIRÚRGICA DOS CAMUNDONGOS SEM INDUÇÃO TUMORAL



Fotografia anatômica dos órgãos dos órgãos após a incisão cirúrgica dos camundongos sem indução tumoral: Primeira coluna controle (CR), tratamento com CURC; segunda coluna, tratamento com NLMC. Legenda: Cada órgão identificado com a primeira letra do nome do órgão Rins (R), Fígado (F) Intestino (I), Coração (C), Pulmão (P) e Baço (B).

APÊNDICE B – FOTOGRAFIA ANATÔMICA DOS ÓRGÃOS APÓS A INCISÃO CIRÚRGICA DOS CAMUNDONGOS COM INDUÇÃO TUMORAL



Fotografia anatômica dos órgãos após a incisão cirúrgica dos camundongos com indução tumoral. Primeira coluna controle (CR), tratamento com CURC; segunda coluna, tratamento com NLMC. Legenda: Cada órgão identificado a primeira letra do nome do órgão Rins (R), Fígado (F) Intestino (I), Coração (C), Pulmão (P) e Baço (B).

ANEXOS

ANEXO A – CERTIFICADO DE AUTORIZAÇÃO DE COMISSÃO DE ÉTICA NO
USO ANIMAL DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA.

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 06 de março de 2020.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “BIODISPONIBILIDADE E BIODISTRIBUIÇÃO DA CURCUMINA CARREADA EM NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS”, Protocolo n.º 003/2020, sob responsabilidade do Professora Dra. Mônica Pereira Garcia foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de *Mus musculus* (110 fêmeas). A presente aprovação é válida pelo período de: 06/03/2020 a 01/01/2022.

Dr. José Luiz Jivago de Paula Rôlo
Coordenador da CEUA – UnB

*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.