



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE  
CARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO CONTENDO CURCUMINA

BRASÍLIA

2019

VICTOR HUGO SOUSA ARAUJO

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE  
CARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO CONTENDO CURCUMINA

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

Orientador: Prof. Dr. Luis Alexandre Muehlmann

BRASÍLIA

2019

VICTOR HUGO SOUSA ARAUJO

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE  
CARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO CONTENDO CURCUMINA

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Luis Alexandre Muehlmann  
(Orientador)

Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso  
(Membro titular)

Prof. Dr. Marcílio Cunha Filho  
(Membro titular)

Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa  
(Suplente)

BRASÍLIA

2019

## **Agradecimentos**

À minha família, pelo suporte fornecido durante todo o processo de aprendizado e por demonstrarem que, para o significado de família, não deve existir um padrão. Agradecimento especial as minhas mães, Sônia, Simone e Marineusa, das quais tenho imenso orgulho de ser filho e por darem um significado especial a frase “*God is a woman*”. Ao meu avô, por despertar minha afeição pela leitura, pelo apoio nos estudos e por ser um pai-avô maravilhoso. Agradeço também a Alcione e Fátima por todo o carinho e suporte durante esse processo.

Às manas do laboratório, Gabriel, Marina, Márcia e Victor, por tornar o processo mais leve e por toda a militância que estava faltando. Agradecimento também ao membro mais recente das manas, Jaqueline Vaz, a maranhense mais sensacional e inteligente que esse Brasil já viu, obrigado pelos conselhos e suporte. À Marcelinha, por todo o carinho, frases positivas e militância compartilhada. Ao trio de doutorandas, Rayane, Luiza e Raquel, pela amizade, carinho, risadas e lanches. À Jaqueline Sol, aquariana maravilhosa, por todos os conselhos, *brain storms* e chás da tarde compartilhados.

À Isis, por todo o empenho e paciência para obter espectros contidos neste trabalho. À Márcia, pelas micrografias maravilhosas. À Karen, por auxiliar no manejo do equipamento de CLAE. À toda a equipe de técnicos e de serviços gerais que ajudam a manter em ordem o laboratório.

Agradecimento especial à Graziella Anselmo, por ter inserido no mundo da ciência àquele menino esquisito que perguntava demais. À Patricia Bento, por ter sido uma peça fundamental para o desenrolar deste trabalho, pela sua amizade e coração doce. Ao meu orientador Luís, por me guiar durante o processo de desenvolvimento deste trabalho.

Também agradeço à CAPES pela bolsa de mestrado e às instituições CNPq e FAP/DF pelo fomento.

## **Resumo**

Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) são a segunda geração de partículas lipídicas sólidas, a substituição parcial do lipídeo sólido por um lipídeo líquido em temperatura ambiente possibilita maior incorporação de fármacos e estabilidade físico-química, o que o torna um veículo terapêutico interessante. A curcumina é vastamente utilizada pela medicina e pela culinária tradicionais de países asiáticos. Estudos identificaram as propriedades antioxidante, anti-mutagênica, pró-apoptótica e anti-angiogênica desta molécula. Contudo, a curcumina possui baixa biodisponibilidade e rápida metabolização. Até o presente momento, diversos estudos envolvendo transporte de curcumina por nanoestruturas são encontrados. Porém, os nanossistemas desenvolvidos possuem características físico-químicas indesejadas e com alto valor de produção. Desta forma, o presente trabalho objetivou desenvolver carreador lipídico nanoestruturado (CLN) contendo curcumina por método de baixo custo e obter parâmetros similares ou superiores àqueles obtidos por métodos de alto custo, e posteriormente caracteriza-lo físico-quimicamente. Para as composições testadas o método de temperatura de inversão de fase com adição súbita de água e homogeneização a quente por cisalhamento com Turrax foi método que obteve maior sucesso na obtenção de CLN com menor diâmetro hidrodinâmico (DH) e índice de polidispersão (IPD). Diferentes parâmetros de homogeneização e composição foram testados e técnicas espectroscópicas, calorimétricas e microscopias foram utilizadas para caracterização. Os resultados obtidos sugerem que foi possível desenvolver CLN com baixo custo de produção, com IPD e DH menores em relação a CLN já presentes na literatura contendo curcumina; e com características físico-químicas compatíveis com diversas vias de administração.

Palavras-chave: Curcumina, nanobiotecnologia, carreador lipídico nanoestruturado, nanocarreador lipídico sólido

## **Abstract**

Nanostructured lipid carriers (CLN) are the second generation of solid lipid nanoparticles, the partial substitution of solid lipid by a liquid lipid at room temperature allows greater incorporation of drugs and physical-chemical stability, which makes it an interesting therapeutic vehicle. Curcumin is widely used by traditional culinary and medicine from Asian countries. Studies have identified the antioxidant, anti-mutagenic, pro-apoptotic and anti-angiogenic properties of this molecule. However, curcumin has low bioavailability and rapid metabolism. To date, several studies involving curcumin transport by nanostructures have been found. However, the developed nanosystems have undesired physicochemical characteristics and high production value. Thus, the present work aimed to develop a nanostructured lipid carrier (CLN) containing curcumin by low-cost method and to obtain parameters similar to or higher than those obtained by high cost methods, and later characterize it physicochemically. For the compositions tested the method of temperature inversion of phase with sudden addition of water and hot homogenization by shearing with Turrax was the method that obtained greater success in obtaining CLN with lower hydrodynamic diameter (DH) and polydispersity index (IPD). Different parameters of homogenization and composition were tested and spectroscopic, calorimetric and microscopy techniques were used for characterization. The results suggest that it was possible to develop CLN with low production costs, with lower IPD and DH in relation to CLN already present in the literature containing curcumin; and with physico-chemical characteristics compatible with several routes of administration.

**Keywords:** Curcumin, nanobiotechnology, nanostructured lipid carrier, solid lipid nanocarrier

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espécies químicas encontradas no extrato de <i>Curcuma longa</i> L. sendo, (I) Diferu-loylmetano/ Curcumina (II) Demetoxicurcumina e (III) Bis-demetoxicurcumina .....	1
Fonte: NOORAFSHAN; ASHKANI-ESFAHANI, 2013. ....	1
Figura 2. Alvos moleculares da curcumina. ....	2
Figura 3. Transição polimórfica NLS de conformação de alta energia ( $\alpha$ ) e conformação mais organizada e de baixa energia ( $\beta_i$ e $\beta$ ), com subsequente expulsão do fármaco. ....	7
Figura 4. Classificação das CLN quanto a apresentação da matriz lipídica, Tipo I (tipo imperfeito); Tipo II (tipo amorfo) e Tipo III (tipo múltiplo). ....	9
Figura 5. Classificação de CLN pela distribuição do fármaco. ....	9
Figura 6. Métodos de desenvolvimento de CLN testados. P.I.T. (Temperatura de Inversão de Fase), PITS (temperatura de inversão de fase com adição súbita de água) e PITT (temperatura de inversão de fase com adição súbita de água e homogeneização a quente por cisalhamento com Turrax). ....	13
Figura 7. Esquema de padronização para eficiência de encapsulação e carregamento de curcumina. ....	17
Figura 8. Fluxograma de métodos utilizados no estudo. ....	20
Figura 9. Características macroscópicas dos CLN com curcumina, CLN A (Compritol ATO 888 e MCT) CLN B (Compritol ATO 888 e Óleo de rícino).....	31
Figura 10. Espectro vibracional na região do infravermelho da curcumina.....	42
Figura 11. Espectro vibracional na região do infravermelho do compritol, Tween 20, MCT, curcumina, CLNBranca A, mistura física A e CLN A. ....	43

Figura 12. Espectro vibracional na região do infravermelho do compritol, óleo de óleo de rícino, Tween 20, Tween 80, curcumina, CLNBranca B, mistura física B e CLN B.....	46
Figura 13. Espectro de Raman da curcumina .....	47
Figura 14. Espectros de Raman da CLNBranca A e CLN A.....	48
Figura 15. Espectros de Raman da CLNBranca B e CLN B. ....	48
Figura 16. Termogramas obtidos da Mistura Física A (MFA), CLNBranco A e do CLN A. .....	51
Figura 17. Termogramas obtidos da Mistura Física B (MFB), CLN <sub>Branco</sub> B e do CLN B .	52
Figura 18. Micrografia do CLN A, magnificação de A) 15k, e B) 5k, assim como a C) distribuição calculada baseando nas imagens.....	53
.....	53
Figura 19. Micrografia do CLN B, magnificação de A) 15k, e B) 5k, assim como a C) distribuição calculada baseando nas imagens.....	53
Figura 20. Representação das nanoestruturas formadas (CLN A e CLN B), resultados de diâmetro hidrodinâmico (DH), diâmetro obtido por MET, componentes utilizados e suas respectivas disposições nas estruturas.....	55



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de material utilizado no trabalho e respectivo fabricante .....	11
Tabela 2. Variações de composição e rotação testados com o método PITT, considerando a composição lipídica, SOR, tipos e relação de tensoativo e rotação. ....	14
Tabela 3. Resultados observados de DH e IPD para os CLN com os diferentes métodos de preparo.....	21
Tabela 4. Óleos usados no estudo e respectiva solubilidade em água. ....	24
Tabela 5. Proporções de Poloxamer 407 testadas em relação ao Tween 20, respectivos SOR e HLB formados .....	28
Tabela 6. Resultados da associação de Tween 80 com Tween 20, respectivos SOR e HLB total formados com a associação. ....	29
Tabela 7. CLN selecionadas para incorporação de curcumina, composição, DH e IPD obtidos com as mesmas .....	30
Tabela 8. Relação das amostras de diferentes composições e com respectivos DH e IPD formados após a incorporação de curcumina .....	30
Tabela 9. Resultados obtidos com a porcentagem de encapsulação (PE%) das amostras CLN A e B, com as respectivas porcentagens de carregamento de curcumina (CC%).....	38
Tabela 10. Concentração em % de curcumina recuperada, em relação ao presente nas soluções, em diferentes meios dialisadores pelos tempos elencados.....	40
Tabela 11. Frequências vibracionais no IV (cm-1) referente ao Compritol ATO 888, Tween 20, MCT, curcumina, CLNBranca A, mistura física A e CLN A e suas respectivas atribuições. ....	44

Tabela 12. Frequências vibracionais no IV (cm-1) referente ao Compritol ATO 888, Tween 20, Tween 80, óleo de rícino, curcumina, CLNBranca A, mistura física A e CLN A e suas respectivas atribuições.....	45
Tabela 13. Atribuições dos modos vibracionais de espectros de Raman da curcumina, da CLN A e CLN B. ....	49
Tabela 14. Relação de amostra e seus respectivos pontos de fusão e variações de entalpia $\Delta H$ . *Curvas de degradação .....	50

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- % CC – Carregamento de Curcumina
- % PE – Porcentagem de Encapsulação
- CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CLN – Carreador Lipídico Nanoestruturado
- CLN A – Carreador Lipídico Nanoestruturado A com curcumina
- CLN B – Carreador Lipídico Nanoestruturado B com curcumina
- CLN<sub>Branco</sub> A – Carreador Lipídico Nanoestruturado A sem curcumina
- CLN<sub>Branco</sub> B – Carreador Lipídico Nanoestruturado B sem curcumina
- CMC – Concentração Micelar Crítica
- DH – Diâmetro Hidrodinâmico
- DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
- DSC – Calorimetria Diferencial Exploratória
- FTIR – Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
- IPD – Índice de Polidispersão
- MCT – *Medium Chain Triglycerides*
- MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão
- MF A – Mistura Física A
- MF B – Mistura Física B
- NE – Nanoemulsão
- NLS – Nanopartícula de Lipídeo Sólido
- pH – Potencial Hidrogeniônico
- PIT – *Phase Inversion Temperature*
- PITS – Temperatura de inversão de fase com adição súbita de água
- PITT – Temperatura de inversão de fase com adição súbita de água e homogeneização a quente por cisalhamento com Turrax
- PZ – Potencial Zeta
- RPMI – *Roswell Park Memorial Institute (Medium)*
- SOR – Razão Surfactante Óleo
- T.A. – Temperatura Ambiente

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.	Curcumina .....	1
1.2.	Nanotecnologia.....	3
1.3.	Nanoestruturas e Carreamento de Fármacos.....	4
1.3.1.	Lipossomas.....	5
1.3.2.	Nanoemulsões .....	6
1.3.3.	Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) .....	6
1.3.4.	Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN).....	7
2.	OBJETIVOS .....	10
2.1.	Objetivo Geral .....	10
2.1.	Objetivos Específicos .....	10
3.	MATERIAL E MÉTODOS .....	11
3.1.	Material .....	11
3.2.	Métodos.....	12
3.2.1.	Desenvolvimento dos CLN .....	12
3.2.2.	Mensuração de diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta.....	15
3.2.3.	Estabilidade de armazenamento .....	15
3.2.4.	Estabilidade em meio de cultivo e à diferentes pH .....	15
3.2.5.	Condições de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de curcumina .....	16

3.2.6.	Porcentagem de encapsulação e carregamento de curcumina.....	17
3.2.7.	Teste de liberação <i>in vitro</i> .....	18
3.2.8.	Espectroscopia de infravermelho transformada de fourier (FTIR-ATR) ...	18
3.2.9.	Espectroscopia Raman normal (rn) .....	18
3.2.10.	Calorimetria Diferencial de varredura (DSC) .....	19
3.2.11.	Microscopia eletrônica de transmissão .....	19
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	21
4.1.	Desenvolvimento dos CLN.....	21
4.1.	Estabilidade SOB armazenamento .....	32
4.1.1.	Estabilidade em meio de cultivo e a diferentes pH.....	34
4.4.	Quantificação de curcumina por CLAE.....	37
4.5.	Porcentagem de encapsulação (PE%) e carregamento (CC%) de curcumina.....	37
4.6.	LIBERAÇÃO de curcumina <i>IN VITRO</i> .....	39
4.7.	Espectroscopia de infravermelho transformada de fourier (FTIR-ATR) .....	41
4.8.	Espectroscopia Raman normal (RN) .....	47
4.4.	Calorimetria Diferencial de varredura (DSC) .....	49
4.5.	Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	52
5.	CONCLUSÃO .....	55
6.	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	58



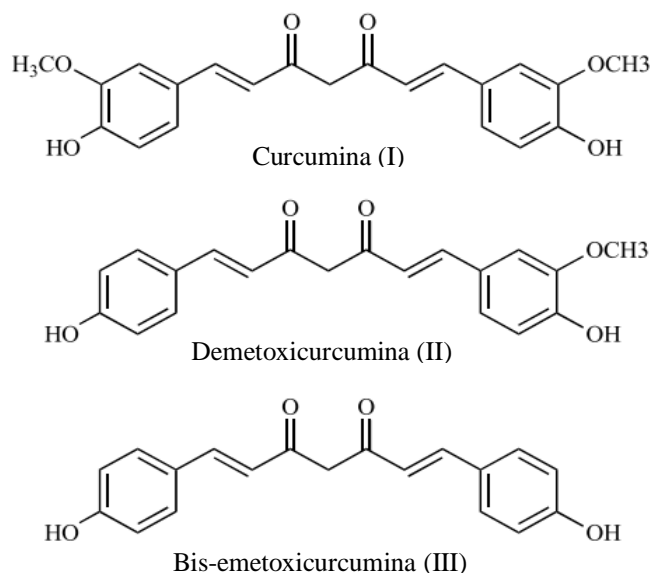
# 1. TRODUÇÃO

## 1.1. CURCUMINA

A curcumina (1E,6E)-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona), como é encontrada em alta concentração nos rizomas do açafrão-da-terra (*Curcuma longa* L.), planta abundante na Ásia e vastamente utilizada pela medicina e pela culinária tradicionais de países como China, a Índia e o Irã. O conhecimento comum indica o uso classicamente para tratamentos de desordens como diabetes, doenças hepáticas, doenças reumáticas, aterosclerose, infecções, distúrbios gastrointestinais como indigestão, dispepsia, e úlceras gástricas e duodenais. A curcumina foi primeiramente isolada por Vogel em 1842 e sua estrutura caracterizada em 1910 por Milobeska (MAHESHWARI et al., 2006; NOORAFSHAN; ASHKANI-ESFAHANI, 2013).

Estudos fitoquímicos realizados com o extrato de *Curcuma longa* L. apontaram a presença de três espécies químicas curcuminoides, como o apresentado pela Figura 4. Entre as espécies químicas citadas, a mais abundante em extratos é a curcumina (I), (RAMSEWAK; DEWITT; NAIR, 2000; SREEJAYAN; RAO, 1994). O composto é apresentado em forma de pó cristalino laranja-amarelo, com ponto de fusão entre 179 °C e 182 °C e insolúvel em água – 10mg/mL em etanol e > 11mg/mL em DMSO, segundo Sigma-Aldrich Corporation.

Figura 1. Espécies químicas encontradas no extrato de *Curcuma longa* L. sendo, (I) Diferu-loylmetano/ Curcumina (II) Demetoxicurcumina e (III) Bis-demetoxicurcumina



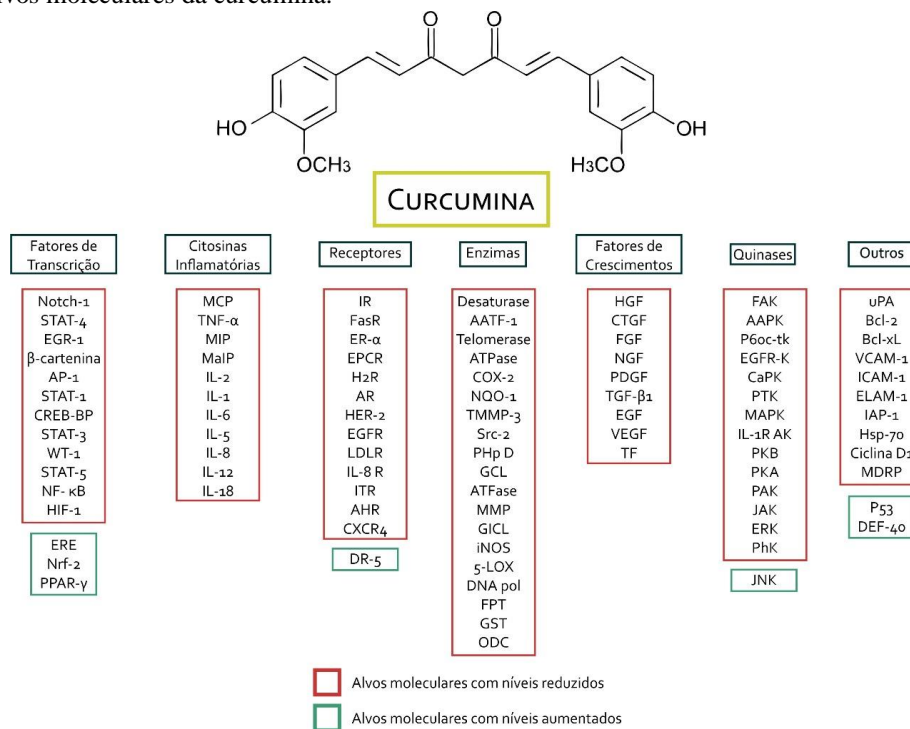
Fonte: NOORAFSHAN; ASHKANI-ESFAHANI, 2013.

A curcumina é em geral bem tolerada em humanos, apresentando efeitos adversos somente após dois anos de uso na maior dose testada de 2600 mg/kg/dia (NO, [s.d.]). A *Food and Drug Administration* (FDA), agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, declarou a curcumina como “geralmente segura”. Desta forma, devido às diversas sugestões populares de uso medicinal, à alta biocompatibilidade e ao uso clássico de preparações ricas nesta molécula, diversos estudos foram realizados para a verificação da potencial bioatividade da curcumina (MAHESHWARI et al., 2006; NOORAFSHAN; ASHKANI-ESFAHANI, 2013).

Como resultado, pôde-se notar que a curcumina apresenta atividades anti-inflamatória, anti-oxidante, anti-mutagênica, pró-apoptótica e anti-angiogênica. Os trabalhos que revelaram estas atividades fomentaram o estudo do uso da curcumina como um potencial fármaco para o tratamento de numerosas enfermidades variadas, como pode ser na revisão de NOORAFSHAN; ASHKANI-ESFAHANI, 2013.

O mecanismo de ação da curcumina no âmbito biomolecular também foi amplamente investigado e foi observado que para cada atividade esta espécie química atua de forma diversa, uma representação resumida e esquemática dos mecanismos moleculares de ação se encontra na figura 4 (MAHESHWARI et al., 2006; NOORAFSHAN; ASHKANI-ESFAHANI, 2013).

Figura 2. Alvos moleculares da curcumina.



Fonte: NOORAFSHAN; ASHKANI-ESFAHANI, 2013 , com modificações.



Contudo, no processo de avaliação das propriedades biológicas da curcumina, diversos estudos relataram a baixa biodisponibilidade por via oral e rápida depuração (WAHLSTROM; BLENNOW, 1978; HOLDER et al., 1978). Diversos grupos de pesquisa objetivaram o aumento da biodisponibilidade da curcumina, aumento do seu tempo de circulação – melhora da sua internalização por células e conferir resistência à depuração. As abordagens desenvolvidas incluem a utilização de piperina que inibe o metabolismo de primeira passagem da curcumina, modificações na estrutura da curcumina e uso de nanocarreadores contendo curcumina (NOORAFSHAN; ASHKANI-ESFAHANI, 2013).

## 1.2. NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia foi idealizada por Richard Feynman em 1959, em uma palestra denominada como “*There’s Plenty of Room at the Bottom*”, na qual Feynman discursou sobre a futura capacidade dos cientistas de manipular moléculas e átomos individuais. Contudo, somente em 1974 o professor da Universidade de Tóquio, Norio Taniguchi, atribuiu ao termo “nanotecnologia” como o processamento, separação, consolidação e deformação de materiais por um átomo ou por uma molécula. O advento inicial da nanotecnologia deve muito às descobertas das microscopias de tunelamento (BINNING; ROHRER, 1982) e de força atômica, permitindo a visualização de estruturas em escala nanométrica (BINNING et al., 1986).

O conceito de nanotecnologia ainda encontra-se em construção e diferentes significados vêm sido atribuídos ao termo (SATALKAR; ELGER; SHAW, 2016). Para fins de definição, o presente trabalho irá utilizar o conceito disposto pela *National Nanotechnology Initiative* (NNI), iniciativa de pesquisa e desenvolvimento (P&D) do governo dos EUA, a qual estabelece a nanotecnologia como ciência e tecnologia que trabalha em nanoescala ( $10^{-9}$  m), compreendida entre 1 a 100 nanômetros. Já o termo nanociência será definida tendo como base a ISO TC 229, sendo a ciência que estuda as novas características físico-químicas e biológicas que materiais em nanoescala desenvolvem em comparação aos átomos individuais ou do material macroscópico (GÓRSKI, 2015; DURÁN; MARCATO, 2013).

As novas propriedades observadas em nanomateriais decorrem de alterações em efeitos tais como eletrostática, combustão, forças de Van der Waals e movimento browniano, assim como a alta relação superfície/volume apresentada por eles, possibilitando interações moleculares mais intensas (RIET, 2003; NICOLAU et al., 2000; FARIA-TISCHER; TISCHER, 2012). Desta forma, para aplicações de nanoestruturas devem ser consideradas

parâmetros como tamanho, composição e morfologia, visto que estas definem as propriedades dos nanomateriais (ASHBY et al., 2009; CAO; WANG, 2011; FARIA-TISCHER; TISCHER, 2012).

A nanociência é uma área multidisciplinar da ciência que integra diferentes áreas do conhecimento como biologia, química, física e engenharia, e que busca testar uma variedade de estruturas submicrométricas (KOOPMANS; AGGELI, 2010; FARIA-TISCHER; TISCHER, 2012). Segundo RATNER; RATNER, 2002, a eficiência da nanotecnologia depende da comunhão de conhecimento das áreas citadas (FARIA-TISCHER; TISCHER, 2012). Desta forma, diferentes sub-áreas da nanociência surgiram em consequência da união e objetivo de aplicação da nanotecnologia, dentre elas a nanobiotecnologia.

A nanobiotecnologia refere-se à maneira de como a nanotecnologia é utilizada para desenvolver instrumentos para estudar sistemas biológicos, conhecimentos decorrentes da associação da nanociência, biologia e engenharia. A nanobiotecnologia é multifacetada e utiliza as novas propriedades das nanoestruturas para diversas aplicações biológicas, tais como desenvolvimento de sistemas para diagnóstico, prevenção e tratamento de patologias (KHAN et al., 2015; EHUD, 2007). Um dos principais objetos de estudos da nanobiotecnologia é a utilização de nanoestruturas como veículo para o carregamento de fármacos e moléculas bioativas e vetorização de fármacos e dessas biomoléculas.

### 1.3. NANOESTRUTURAS E CARREAMENTO DE FÁRMACOS

A utilização de nanopartículas para encapsular, dispersar, adsorver ou conjugar fármacos desenvolve novas alternativas de tratamento àqueles fármacos já comercializados (RESORT; HP, [s.d.]). Nanoestruturas possibilitam melhor dispersão de fármacos hidrofóbicos em meios aquosos, a vetorização de fármacos para locais específicos, entrega intracelular de macromoléculas, passagem por barreiras biológicas como biomembranas, maior estabilidade físico-química para o fármaco e liberação sustentada dele, proporcionando manutenção contínua da concentração plasmática dentro janela terapêutica. Desta forma otimiza-se a terapia, reduz-se a possibilidade de gerar efeitos adversos e torna-se possível a diminuição do número de doses (BAMRUNGSAP et al., 2012). Estudos recentes demonstraram a capacidade dos nanossistemas de carregar múltiplos fármacos em terapia combinatória, assim como sistemas com múltiplas funcionalidades, que é o caso dos sistemas teragnósticos, os quais desservem ao diagnóstico e à terapia concomitantemente (FAROKHZAD, 2008; BAMRUNGSAP et al., 2012).

Contudo, as características físico-químicas de nanoestruturas influenciam diretamente na sua funcionalidade como veículos de fármacos e biomoléculas. Segundo FAROKHZAD, 2008, o desenvolvimento de nanoestruturas para uso clínico requer um estudo refinado, no qual diversos parâmetros devem ser considerados no processo, dentre os quais pode-se citar: as características da molécula a ser carregada, o alvo terapêutico, a composição da nanoestrutura, carga superficial, forma e tamanho da partícula, hidrofiliicidade superficial, e viscosidade do sistema. Desta forma, o estudo da composição e dos tipos de nanoestruturas projetadas para veicular fármacos é importante para o sucesso terapêutico da formulação nanoestruturada desenvolvida.

Atualmente, uma diversidade de sistemas pode ser encontrada para *drug delivery*, os quais podem ser categorizados de acordo com sua composição em três grandes grupos: 1) inorgânicos, compostos de metais nobres, óxidos e semicondutores; 2) orgânicos, compostos principalmente de carbono e 3) mistos, nos quais há combinação dos dois primeiros (GÓRSKI, 2015). Na prática farmacêutica, porém, os nanocarreadores orgânicos exibem melhor desempenho para carregamento de fármacos, visto que são mais biocompatíveis e biodegradáveis em comparação aos inorgânicos, tendo menor probabilidade de gerar um efeito adverso ao sistema (DOKTOROVOVA; SOUTO; SILVA, 2014).

### 1.3.1. LIPOSSOMAS

Sistemas lipossomais foram os primeiros a serem desenvolvidos com o objetivo de carregar fármacos. Os lipossomas foram inicialmente descritos na década de 1960 e, consistem de estruturas lamelares com dupla camada fosfolipídica e núcleo aquoso e com grau de complexidade variável. Este tipo de sistema foi objeto de estudo de diversos grupos, os quais aprimoraram gradualmente o processo de obtenção e as propriedades desta estrutura, acrescentando, por exemplo, polímeros para aumentar a estabilidade coloidal, evadir o sistema imunológico, aumentar o tempo de circulação, e também para obter estruturas multilamellares (MLV). Como resultado dos diversos estudos, já é possível encontrar na prática clínica apresentações lipossomais de fármacos, tais como a anfotericina B lipossomal (AmBisome<sup>®</sup>) e a doxorubicina em lipossomas (Doxil<sup>®</sup>), os quais demonstraram maior eficácia terapêutica e redução dos efeitos adversos atribuídos ao fármaco livre.

Contudo, o lipossoma possui baixa capacidade de adsorver e incorporar moléculas de grande lipofiliicidade, às quais se atribuem maior número de efeitos adversos devido a sua livre circulação por membranas biológicas. Os lipossomas possuem baixa estabilidade física,

predem eventualmente grande parte de sua carga de fármacos, além da sua produção ser pouco escalonável, conferindo a estes sistemas um preço de mercado de muitas vezes inacessível à maior parte da população ou aos serviços públicos de saúde. Por consequência, outros sistemas foram estudados para superar as desvantagens atribuídas aos lipossomas.

### 1.3.2. NANOEMULSÕES

As nanoemulsões (NE) são dispersões coloidais, cineticamente estáveis e com alta capacidade de compartimentalizar fármacos lipofílicos ou hidrofóbicos a depender da natureza do sistema. As nanoemulsões possuem diferentes apresentações, como nanoemulsões água em óleo (A/O), óleo em água (O/A), e as com mais fases dispersas e menos frequentemente descritas na literatura, como óleo em água em óleo (O/A/O) e água em óleo em água (A/O/A) (SARKER, 2005).

A versatilidade apresentada pelas nanoemulsões, assim como a facilidade de obtenção e a capacidade de otimizar aspectos sensoriais, atraíram a atenção da comunidade acadêmica, no entanto também foram observadas limitações. As nanogotículas dispersas são algumas vezes frágeis e instáveis com o decorrer do tempo pela maturação de Ostwald e são muitas vezes significativamente sensíveis a parâmetros como temperatura e pH. Além disso, para o desenvolvimento de nanoemulsões são muitas vezes utilizadas concentrações de agentes tensoativos que podem ser um fator limitante para sua aplicação por via parenteral (SHAH; IMRAN; ULLAH, 2017). Por este motivo, se fez necessária a procura por novas estruturas que supram as limitações deste tipo de sistema.

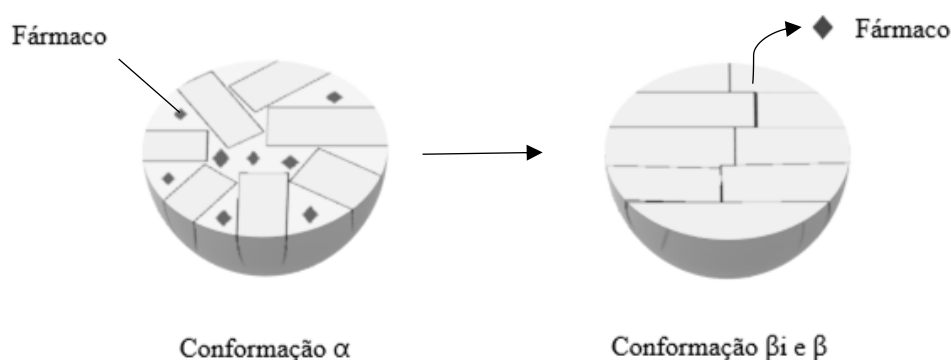
### 1.3.3. NANOPARTÍCULAS LIPÍDICA SÓLIDA (NLS)

As nanopartículas lipídica sólida (NLS) foram desenvolvidas na década 1990 como um sistema alternativo para a lipossomas, emulsões e nanopartículas poliméricas. As NLS são partículas coloidais em escala nanométrica, constituídas por lipídeos sólidos em temperatura ambiente, biocompatíveis e biodegradáveis, estabilizados por agentes tensoativos. Desta forma, a NLS pode ser considerada uma nova geração de NE onde há substituição do lipídeo líquido (óleo) da NE por um lipídeo sólido (SOPPIMATH, 2001). Esta substituição confere, em geral, estabilidade superior às NLS em comparação às NE, além de possibilitar modular os perfis de liberação e estabilidade em condições ambientais adversas. A NLS pode ser administrada por todas as vias, sua produção geralmente dispensa solventes orgânicos e é

facilmente escalonável (HARDE; DAS; JAIN, 2011; JORES et al., 2003; OCHEKPE; OLORUNFEMI; NGWULUKA, 2009).

Porém, este tipo de sistema apresenta desvantagens para o carreamento. As NLS são susceptíveis ao fenômeno de gelificação irreversível, que ocorre em dispersões de baixa viscosidade, baixa incorporação de fármaco devido à estrutura cristalina altamente organizada e expulsão do fármaco que pode se seguir a uma eventual transição polimórfica (Figura 1). Logo após a sua formação os lipídeos auto-organizam-se em uma estrutura de alta energia com diversas imperfeições (conformação  $\alpha$ ) hexagonal, instável e com menor ponto de fusão; durante o período de armazenamento a estrutura tende a entrar em uma conformação de menor energia e mais organizada (conformação  $\beta$ ) ortorrômbica e metaestável – fenômeno que pode levar à expulsão do fármaco do núcleo da nanoestrutura – e posteriormente para a sua conformação mais estável e organizada (conformação  $\beta$ ) tricíclica, com maior ponto de fusão e calor latente (BUNJES, 2011; JAISWAL; GIDWANI; VYAS, 2016; JENNING; GOHLA, 2000). Tendo em vista o potencial das NLS para o carregamento de fármacos e suas limitações de instabilidade e baixa eficiência de encapsulamento, pesquisas têm sido continuamente realizadas com o intuito de desenvolver formulações farmacêuticas baseadas nestas nanoestruturas.

Figura 3. Transição polimórfica NLS de conformação de alta energia ( $\alpha$ ) e conformação mais organizada e de baixa energia ( $\beta$  e  $\beta$ ), com subsequente expulsão do fármaco.



Fonte: Figura baseada em (SELVAMUTHUKUMAR; VELMURUGAN, 2012).

#### 1.3.4. CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS (CLN)

Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) são conhecidos como a segunda geração de partículas lipídicas sólidas. Este sistema surgiu como aprimoramento das NLS, devido à substituição parcial do lipídeo sólido por um lipídeo líquido em temperatura ambiente

(JAISWAL; GIDWANI; VYAS, 2016). Esta substituição promove maior desarranjo na estrutura interna, resultando em espaços para acomodação e encapsulamento do fármaco, aumentando assim a sua capacidade de carga em comparação as NLS (IQBAL et al., 2012), (Figura 2). Desta forma, os CLN conseguem aumentar a estabilidade físico-química por imobilizar o fármaco devido ao lipídeo sólido, assim como a NLS, mas a presença do óleo líquido permite o aumento da capacidade de carga e impede a expulsão do fármaco, como ocorre pelas NLS. (Iqbal et al., 2012; SELVAMUTHUKUMAR; VELMURUGAN, 2012).

Ainda, segundo a revisão de DOKTOROVOVA; SOUTO; SILVA,(2014) em que foram avaliados aspectos da nanotoxicologia acerca de NLS e CLN, ambos os sistemas são mais do biocompatíveis que os sistemas anteriormente citados tendo em vista que os componentes usados para seu desenvolvimento são mais biocompatíveis. Ao comparar a nanotoxicologia, o mesmo estudo aponta que não há diferença entre NLS e CLN, o que torna CLN além de mais estáveis do que as NLS, tão biocompatível quanto estas.

Os CLN podem ser classificados de acordo com a apresentação da matriz lipídica. O tipo I ou tipo imperfeito apresenta matriz lipídica com lacunas entre os triacilgliceróis cristalizados, aumentando o carregamento de fármacos. A formação deste tipo ocorre pela baixa concentração adicionada de óleo. No tipo II ou amorfo, não há formação de cristais o que impede a expulsão do fármaco durante o arrefecimento do sistema. O tipo III ou múltiplo, se assemelha com emulsões A/O/A. Geralmente alguns fármacos são mais solúveis no lipídeo líquido do que no sólido, nestes casos ocorre a formação de nanopartículas do tipo óleo / lipídeo sólido / água permitindo a formação de nanocompartimentos na matriz de lipídeo sólido, apresentados por este tipo, (Figura 2) (SHAH; IMRAN; ULLAH, 2017; NASERI; VALIZADEH; ZAKERI-MILANI, 2015).

Ainda em termos de classificação há cinco modelos de CLN que diferem entre si quanto ao modo como o fármaco está disperso na estrutura, como o representado pela Figura 3: (a) Matriz homogênea; (b) modelo de concentração em invólucro (*drug-enriched shell*); (c) modelo de concentração em núcleo (*drug-enriched core*); (d) monocamada adsorvida de fármaco na superfície e (e) em aglomeração (DRAGICEVIC; MAIBACH, 2016) .

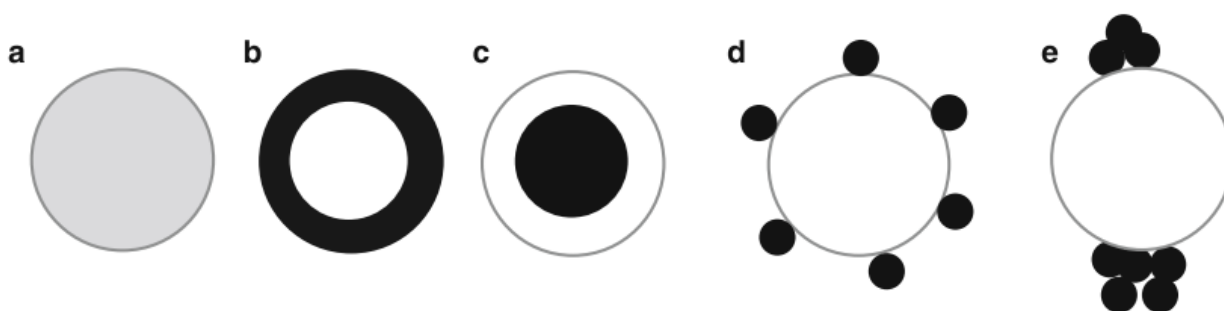
Figura 4. Classificação das CLN quanto a apresentação da matriz lipídica, Tipo I (tipo imperfeito); Tipo II (tipo amorfo) e Tipo III (tipo múltiplo).



Fonte: Baseado em (SELVAMUTHUKUMAR; VELMURUGAN, 2012; NASERI; VALIZADEH; ZAKERI-MILANI, 2015).

No modelo de matriz homogênea o fármaco está completamente disperso e é liberado por difusão. Em casos de modelo de concentração em invólucro, o fármaco é concentrado na camada mais externa da estrutura – neste modelo a liberação do fármaco ocorre de forma abrupta. No modelo de concentração em núcleo, o fármaco acumula-se no centro da estrutura e sua liberação é sustentada por um período prolongado devido à solubilidade do fármaco no lipídeo. Em casos de fármacos hidrofílicos, pode ocorrer a adsorção deles na superfície da estrutura, podendo gerar uma monocamada ou focos de aglomeração na superfície (SHAH; IMRAN; ULLAH, 2017; DAS; CHAUDHURY, 2011; DRAGICEVIC; MAIBACH, 2016).

Figura 5. Classificação de CLN pela distribuição do fármaco.



Fonte: (DRAGICEVIC; MAIBACH, 2016).

Desta forma se faz importante o estudo de composição para desenvolvimento de CLN seguido por uma caracterização físico-química adequada do sistema, visto que tais características determinam seu comportamento terapêutico futuro.

Até o presente momento, diversos estudos envolvendo carreamento de curcumina por nanoestruturas são encontrados. Dentre as estruturas podem ser citados lipossomas, NE, NLS e até mesmo CLN. Contudo, deve-se considerar as limitações dos sistemas lipossomais, NE, NLS mencionadas anteriormente neste trabalho. Além disso, os CLN atualmente disponíveis são produzidos por métodos muitas vezes custosos, pois requerem alta energia e/ou solventes orgânicos que possam gerar resíduos tóxicos (GONÇALEZ et al., 2017; HAJJ ALI et al., 2016; MADANE; MAHAJAN, 2016; TIYABOONCHAI; TUNGPRADIT; PLIANBANGCHANG, 2007; NAKSURIYA et al., 2014; IQBAL et al., 2012; CHEN et al., 2016b; CHEN et al., 2016a; SANGSEN et al., 2014; SANGSEN et al., 2014; CHANBUREE; TIYABOONCHAI, 2017).

Desta forma, se faz necessário o estudo do desenvolvimento de CLN, considerando suas vantagens em comparação aos outros carreadores, por método de baixo custo, obtendo parâmetros similares aos obtidos por métodos de alta energia e realizar a caracterização físico-química, permitindo avaliar seu futuro comportamento terapêutico.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Desenvolver carreador lipídico nanoestruturado (CLN) contendo curcumina por método de baixo custo obtendo parâmetros similares aos obtidos por métodos de alta energia e realizar a caracterização físico-química.

### **2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ❖ Avaliar o melhor método de desenvolvimento de Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN);
- ❖ Otimizar parâmetros coloidais como Diâmetro Hidrodinâmico e IPD, por meio de variações de composição e parâmetros de agitação;
- ❖ Incorporar a Curcumina nos CLN e avaliar DH, IPD e ZP;
- ❖ Avaliar a estabilidade dos CLN durante o armazenamento em diferentes condições. Assim como em diferentes pH e meios de cultivo;
- ❖ Quantificar a eficiência de encapsulação dos carreadores;



- ❖ Analisar o perfil de liberação da curcumina incorporada no CLN em comparação a curcumina livre;
- ❖ Realizar análises espectroscópicas para avaliar possíveis interações formadas;
- ❖ Avaliar o comportamento térmico das estruturas por meio de Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC);
- ❖ Analisar morfologia dos CLN por meio de microscopia eletrônica;
- ❖ Determinar o tipo de carreador desenvolvido.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAL

O material utilizado no presente estudo encontra-se listado na Tabela 1, por meio do seu nome comercial e fabricante.

Tabela 1. Lista de material utilizado no trabalho e respectivo fabricante

<b>Materiais</b>	<b>Fabricante</b>
Compritol ATO 888 ATO 888	Gattefossé, FR
Óleo de rícino	Sigma, EUA
Curcumina $\geq 65\%$ (HPLC)	Sigma, EUA
Tween 20	Sigma, EUA
Tween 80	Sigma, EUA
Pluronic F-127	Sigma, EUA
Poloxamer 407	Sigma, EUA
Polymol® ADB® ADB	Aquia, BR
MCT ( <i>Medium Chain Tryglicerides</i> )	Aquia, BR
Meio do Instituto Memorial Park Roswell (RPMI)	Gibco, EUA
Meio Eagle Modificado por Dulbeco (DMEM)	Gibco, EUA
Penicilina	Gibco, EUA
Etanol (99,96% - grau HPLC)	Sigma, EUA
Acetonitrila (99,96% - grau HPLC)	Sigma, EUA
Ácido Cítrico Monohidratado	J.T.Baker, BR

## 3.2. MÉTODOS

Os métodos realizados no presente estudo estão representados na Figura 8 e seus detalhes elencados nos subitens a seguir.

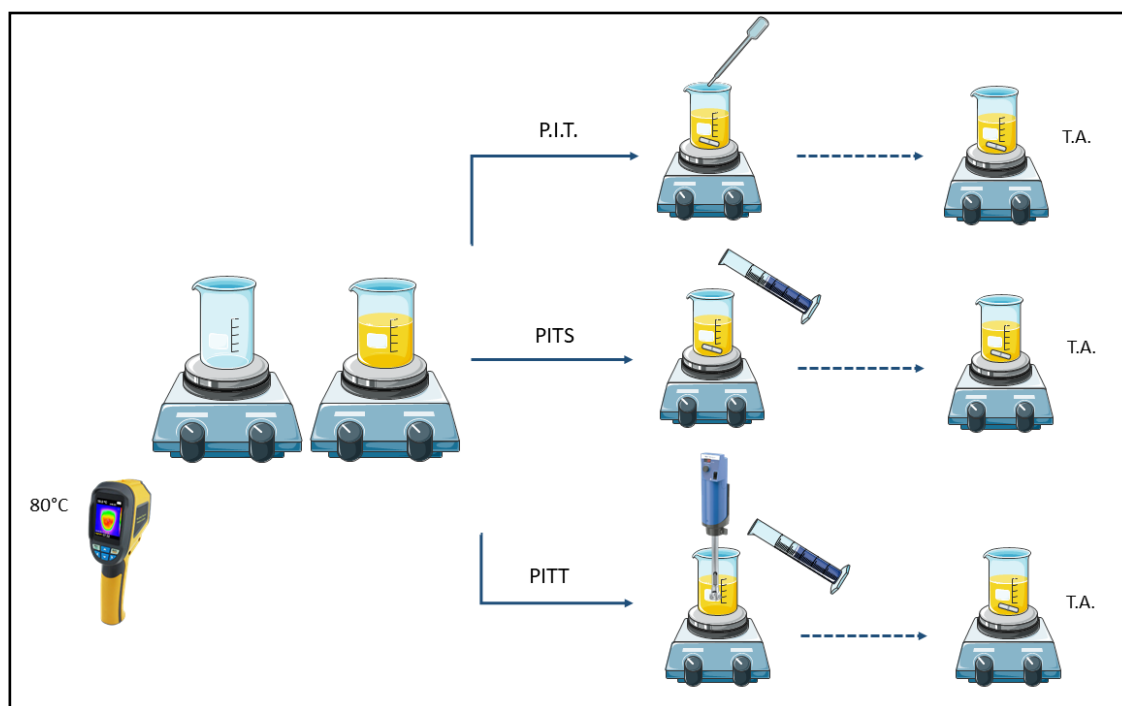
### 3.2.1. DESENVOLVIMENTO DOS CLN

Considerando os critérios de biocompatibilidade e estudos disponíveis, os componentes utilizados no presente estudo foram: Compritol ATO 888 (behenato de glicerilo), Polymol<sup>®</sup> ADB (adipato de di(n-butila), MCT (triglicérides de cadeia média), Tween 80 (polisorbato 80), Tween 20 (polisorbato 20) e Polaxamer 407 (2-metiloxirano).

Com o intuito de determinar o melhor método de desenvolvimento sem a utilização de solvente orgânico e com baixo custo de produção, três métodos foram considerados no início do estudo. O primeiro foi o de temperatura de inversão de fase (PIT) que consistiu no aquecimento da fase orgânica (mistura de lipídeos e tensoativo) e aquosa separadamente à 80 °C. A fase aquosa foi então adicionada lentamente na sobre a fase oleosa. A mistura foi mantida sob agitação magnética por 5 minutos à 80 °C e, na sequência, o aquecimento foi cessado e a agitação foi mantida até o resfriamento da mistura à temperatura ambiente.

Para os outros dois métodos de preparo foi utilizada as técnicas de homogeneização a quente, por PIT, baseadas nos estudos de SAFWAT et al., 2017 e CONTROLLED, 1993 com modificações; nos quais variou-se o tipo de homogeneização e adição de água. O primeiro método de homogeneização testado consistiu, no aquecimento prévio da fase orgânica (lipídeos e tensoativo) e água destilada à 80°C, em seguida verteu-se a fase aquosa sob a orgânica de forma súbita, a suspensão foi submetida a agitação magnética por 5 minutos, em seguida a agitação foi continuada até atingir a temperatura ambiente. O segundo método de homogeneização a quente por cisalhamento em homogeneizador do tipo Ultra-Turrax IKA<sup>®</sup> à rotação de 10,000 rpm por 3 minutos – também foi avaliada rotação de 15,000 rpm ao decorrer do estudo. A temperatura foi controlada pelo termômetro FLIR System 2008 Flir infracam SD. As proporções de componentes testadas foram baseadas nos estudos realizados por BAEK; CHO, 2017 e DRAGICEVIC; MAIBACH, 2016, consistindo em: 6:4 m/m (Compritol ATO 888 e MCT) e 1:2 m/m (fase lipídica e tensoativo Tween 20) e dispersão de 1:10 (m/v) em fase aquosa. As metodologias utilizadas para formação de CLN estão esquematizados na Figura 6.

Figura 1. Métodos de desenvolvimento de CLN testados. P.I.T. (Temperatura de Inversão de Fase), PITS (temperatura de inversão de fase com adição súbita de água) e PITT (temperatura de inversão de fase com adição súbita de água e homogeneização a quente por cisalhamento com Turrax).



Tendo em vista os resultados obtidos, o segundo método de temperatura de inversão de fase com adição súbita de água e homogeneização por cisalhamento por Turrax (PITT) foi selecionado para os testes seguintes de padronização. Diferentes parâmetros foram testados, como: velocidade de rotação (10,000 rpm e 15000 rpm), composição lipídica de óleo de rícino, MCT e Polymol<sup>®</sup> ADB em conjunto com o Compritol ATO 888 e suas proporções, e diferentes tensoativos como Tween 20, Tween 80 e Polaxamer 407. Todas as variações testadas estão descritas na Tabela 2. Em casos de mistura de tensoativos, a fórmula a seguir foi considerada para o cálculo de HLB total, tendo como base o estudo BOUCHEMAL, 2004. Onde HLB1 (valor de HLB do tensoativo 1), X (porcentagem do tensoativo 1 na mistura de tensoativos), HLB2 (valor de HLB do tensoativo 2) e Y (porcentagem do tensoativo 2 na mistura de tensoativos)

$$\text{HLB total} = \frac{\text{HLB1} \cdot \text{X} + \text{HLB2} \cdot \text{Y}}{100}$$

Tabela 2. Variações de composição e rotação testados com o método PITT, considerando a composição lipídica, SOR, tipos e relação de tensoativo e rotação.

<b>Composição Lipídica</b>	<b>Relação da fase lipídica (m/m)</b>	<b>SOR</b>	<b>Tensoativo (m/m)</b>	<b>Relação de tensoativo (m/m)</b>	<b>Rotação</b>
Compritol ATO 888 e MCT	8:2	1	Tween 20	-	10 krpm
	7:2				
	6:4				
	5,5:4,5				
Compritol ATO 888 e óleo de rícino	8:2	1	Tween 20	-	10 krpm
	7:2				
	6:4				
	5,5:4,5				
Compritol ATO 888 e Polymol <sup>®</sup> ADB	8:2	1	Tween 20	-	10 krpm
	7:2				
	6:4				
	5,5:4,5				
Compritol ATO 888 e MCT	6:4	0,4	Tween 20	-	10 krpm
		0,6			
		0,8			
		1			
		1,5			
		1,8			
		2			
		3			
		Compritol ATO 888 e óleo de rícino			
0,6					
0,8					
1					
1,5					
1,8					
2					
3					
Compritol ATO 888 e MCT	6:4		0,8	Tween 20	-
		1			
Compritol ATO 888 e óleo de rícino	5,5:4,5	0,8	Tween 20	-	15 krpm
		1			
Compritol ATO 888 e MCT	6:4	0,8	Tween 20	-	15 krpm
		0,85	Tween 20 e	8:0,5	15 krpm
		0,9	Poloxamer 407	8:1	
		1		8:2	
Compritol ATO 888 e óleo de rícino	5,5:4,5	0,85	Tween 20 e	8:0,5	15 krpm
		0,9	Poloxamer 407	8:1	
		1		8:2	

### 3.2.2. MENSURAÇÃO DE DIÂMETRO HIDRODINÂMICO, ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO E POTENCIAL ZETA

O diâmetro hidrodinâmico (DH) e o índice de polidispersão (IPD) foram determinados pelo método de dispersão dinâmica de luz. O potencial zeta (PZ) foi determinado pelo método de mobilidade eletroforética. As amostras foram diluídas a uma proporção de 1:10 (m/v) em água destilada e todos os parâmetros foram analisados com o auxílio do equipamento Zetasizer (DLS, Malvern, EUA). Tendo em vista que o IPD refere-se a uma predição de estabilidade a longo prazo e que valores baixos de IPD estão relacionados a uma boa estabilidade de armazenamento, valores de  $IPD \leq 0,2$  indicam sistemas monodispersos, enquanto valores de  $\geq 0,4$  indicam uma distribuição polidispersa (SCHWARZ et al., 1994; SOUZA; SILVA, 2017). Desta forma, os valores considerados ideais para a parte inicial do projeto (sem adição de curcumina) foram  $\leq 0,2$ . Considerando que o DH das partículas determina o modo de ação do fármaco e a interação destas no sistema biológico (GERA et al., 2017) onde a taxa de excreção de partículas grandes é alta; e o sistema desenvolvido poderá ter diversas aplicações e vias de administração, o DH estabelecido como ideal (sem adição de curcumina) foi de  $\leq 250$  nm, visto que após a incorporação do fármaco pode alterar o padrão de cristalização e gerar partículas maiores (BUNJES, 2011).

### 3.2.3. ESTABILIDADE DE ARMAZENAMENTO

A estabilidade de armazenamento das formulações escolhidas foi realizada por 120 dias em três condições diferentes, a  $37 \pm 0,5$  °C, a temperatura ambiente (T.A.) e a  $4 \pm 1$  °C. Os parâmetros considerados para averiguar a estabilidade foram os de DH, IPD e PZ, as amostras foram preparadas para análise conforme o item anterior.

### 3.2.4. ESTABILIDADE EM MEIO DE CULTIVO E À DIFERENTES PH

Foi determinada a estabilidade das formulações em diferentes meios de cultivo, DMEM e RPMI suplementados (5% soro fetal bovino e 1% de antibiótico), nos quais as dispersões dos CLN foram diluídas a uma proporção de 1:10 (v/v). Elas foram armazenadas a 37 °C e os parâmetros de DH, IPD e PZ foram analisados após os períodos 120, 60, 30, 15 e 5 minutos.

Os sistemas foram submetidos a variação de pH com auxílio de tampão fosfato dissódico (0,2 M) e ácido cítrico (0,1 M). Os pH's de 2,2; 4,0; 7,4 e 8,0 foram utilizados, correspondendo a pHs estomacais, pH sanguíneo e ao pH intestinal (FREIRE et al., 2006; MARÍA et al., 2012) e os parâmetros de DH, IPD e PZ foram avaliados para determinar a estabilidade dos CLN.

### 3.2.5. CONDIÇÕES DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA QUANTIFICAÇÃO DE CURCUMINA

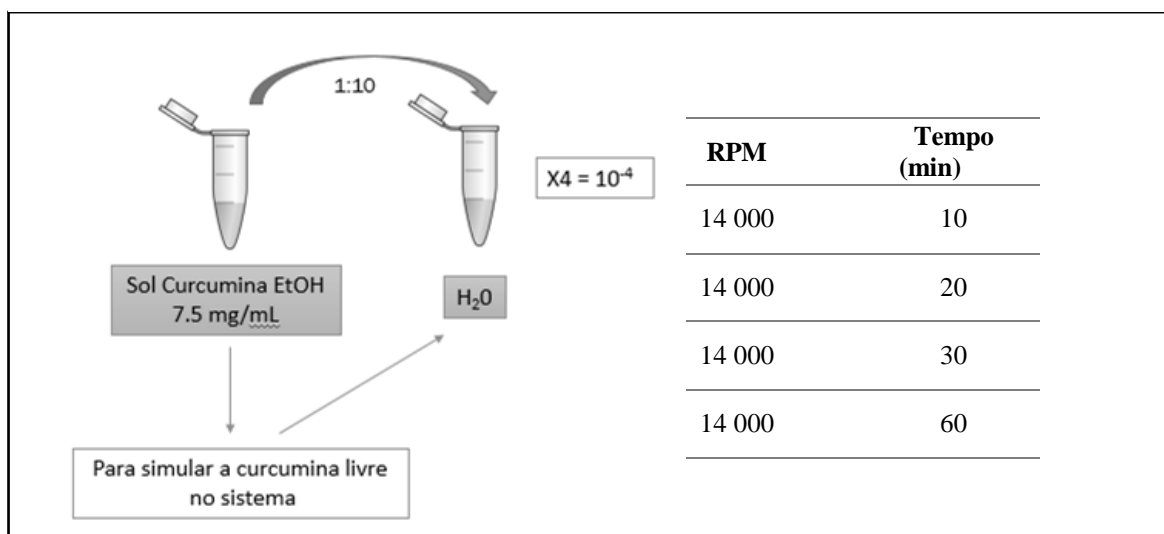
A quantificação de curcumina foi realizada pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) usando o cromatógrafo Shimadzu-Prominence, composto por desgaseificador (Modelo DGU 20A5), módulo de distribuição de solvente (modelo LC-20AT), injetor automático (modelo SIL-20AHT), forno de coluna (Modelo CTO-20A), detector de fluorescência (modelo RF-10AXL) e controlador do sistema 85 CBM-20A. A coluna C18 (Eclipsed XDB de 5  $\mu$ m, 4,6 mm a 150 mm, Agilent Technologies). Medições fluorimétricas foram realizadas em célula de fluxo de 12  $\mu$ L com comprimentos de onda de 600 e 675 de excitação e emissão, respectivamente. O volume de injeção foi de 5  $\mu$ L e vazão durante os ensaios foi de 1 mL / min a uma pressão de trabalho de 120 kgf/cm<sup>2</sup>. O processamento de dados foi realizado pelo software LCsolution (Shimadzu, Tóquio, Japão). A fase móvel utilizada foi baseada nos estudos de MADANE; MAHAJAN, 2016 composta por uma solução de ACN-ácido cítrico 1% (pH 3,0) proporção 55:45 (v/v).

A linearidade do método foi determinada com intuito de verificar se os resultados obtidos e a concentração do analito eram proporcionais. Para tal, dez concentrações distintas foram utilizadas em triplicata para a construção da curva analítica. Uma solução de curcumina foi preparada em etanol 99,6% na concentração 1 mg/mL, em seguida foi realizada a diluição para o último ponto da curva (15  $\mu$ g/mL) em fase móvel e posteriormente realizou-se a diluição, com fator 2, até o primeiro ponto da curva (0,025  $\mu$ g/mL). O cálculo de regressão linear foi aplicado pelo método dos mínimos quadrados e feita posteriormente a avaliação da associação linear entre as concentrações por meio do coeficiente de correlação (r) e de determinação (r<sup>2</sup>), de acordo com a RDC N° 166, 24/07/2017 (ANVISA,2017).

### 3.2.6. PORCENTAGEM DE ENCAPSULAÇÃO E CARREGAMENTO DE CURCUMINA

A eficiência de encapsulação e carregamento de curcumina foram baseados em processo de centrifugação, para o qual foi realizada padronização do tempo e da rotação com solução de curcumina contendo diferentes concentrações à 14000 rpm, como o representado pela Figura 7.

Figura 2. Esquema de padronização para eficiência de encapsulação e carregamento de curcumina.



Considerando os resultados obtidos com a padronização, para determinar o encapsulado, a formulação foi submetida a centrifugação de 14000 rpm por 30 minutos e em seguida o sobrenadante coletado, feita diluição de 1:10 (v/v) em DMSO e submetido ao banho de ultrassom por 3 minutos, para promover separar a biomolécula dos outros componentes lipídicos. A suspensão formada foi diluída (1:100 v/v) em fase móvel (ACN-ácido cítrico), submetida à uma centrifugação branda de 2500 rpm a 5 minutos, para promover sedimentação de lipídeos residuais, em seguida feita análise por meio de CLAE nas condições citadas no item anterior.

O cálculo de eficiência de encapsulação (% EE) e carregamento de curcumina (% CC) foi realizado utilizando as equações I e II, respectivamente e como o representado a seguir:

$$\% EE = \frac{\text{Concentração obtida}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (\text{II})$$

$$\% CC = \frac{\text{Concentração teórica}}{\text{Concentração teórica} + \text{Concentração de excipientes}} \times 100 \quad (\text{III})$$

### 3.2.7. TESTE DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Com o intuito de avaliar a liberação da curcumina pela nanoestrutura em dispersão aquosa, foi realizado o método de diálise, com membrana de diálise Spectra/Pro<sup>®</sup> com poros permeáveis por espécies de até 14kDa e com 3 meios extratores diferentes: Tampão fosfato pH 2, Solução de Tween 80 (1% m:v em água) e solução hidro alcoólica (50% v:v), pelos tempos de 10 min, 20 min, 30 min, 2 horas e 4 horas. Neste primeiro teste uma solução de curcumina 1 mg/mL foi preparado em etanol (99,96% - grau HPLC) e em seguida foi realizada a sua diluição para 0,250 mg/mL em água deionizada para simular a condição encontrada nos CLN. Com os resultados obtidos, o teste de liberação foi realizado com meio extrator de solução hidro alcoólica (50%) pelos tempos de 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 24 horas e 48 horas.

### 3.2.8. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR-ATR)

Nesse estudo, utilizou-se a espectroscopia na região do infravermelho para determinar a interação no nível de grupos funcionais do material ativo (curcumina) e o sistema carreador. A técnica foi desempenhada com o equipamento Vertex 70 da marca Bruker com refletância total atenuada (ATR), com resolução espectral de 4 cm<sup>-1</sup>, 48 scans no intervalo de 375-4000 cm<sup>-1</sup>. Os componentes isolados, a mistura física (M<sub>F</sub>), formulações sem curcumina (CLN<sub>Branco</sub>) e as nanoformulações com curcumina (CLN A e B) foram avaliados.

### 3.2.9. ESPECTROSCOPIA RAMAN NORMAL (RN)

Complementar a espectroscopia de infravermelho realizou-se a espectroscopia Raman com o intuito de avaliar as possíveis ligações formadas. A análise foi realizada em resolução de 0,7 cm<sup>-1</sup>, no intervalo de 150-3200 cm<sup>-1</sup> pelo equipamento LabRam HR Evolution da marca Horiba com as amostras elencadas no item anterior. Para análise de alguns componentes a foram medidos em diferentes comprimentos de onda, para o Compritol ATO 888 ATO 888, Matriz A (Compritol ATO 888 e MCT 6:4 m/m) e B (Compritol ATO 888 e óleo de óleo de rícino 5,5:4,5 m/m) e CLN<sub>Branco</sub> A (Carreador Lipídico Nanoestruturado A sem curcumina) e CLN<sub>Branco</sub> B (Carreador Lipídico Nanoestruturado B sem curcumina) foram medidas na linha



verde, 532nm; a amostra de curcumina foi medida na linha vermelha, 633 nm e as demais – componentes isolados e CLN – foram medidas no infravermelho, 785 nm.

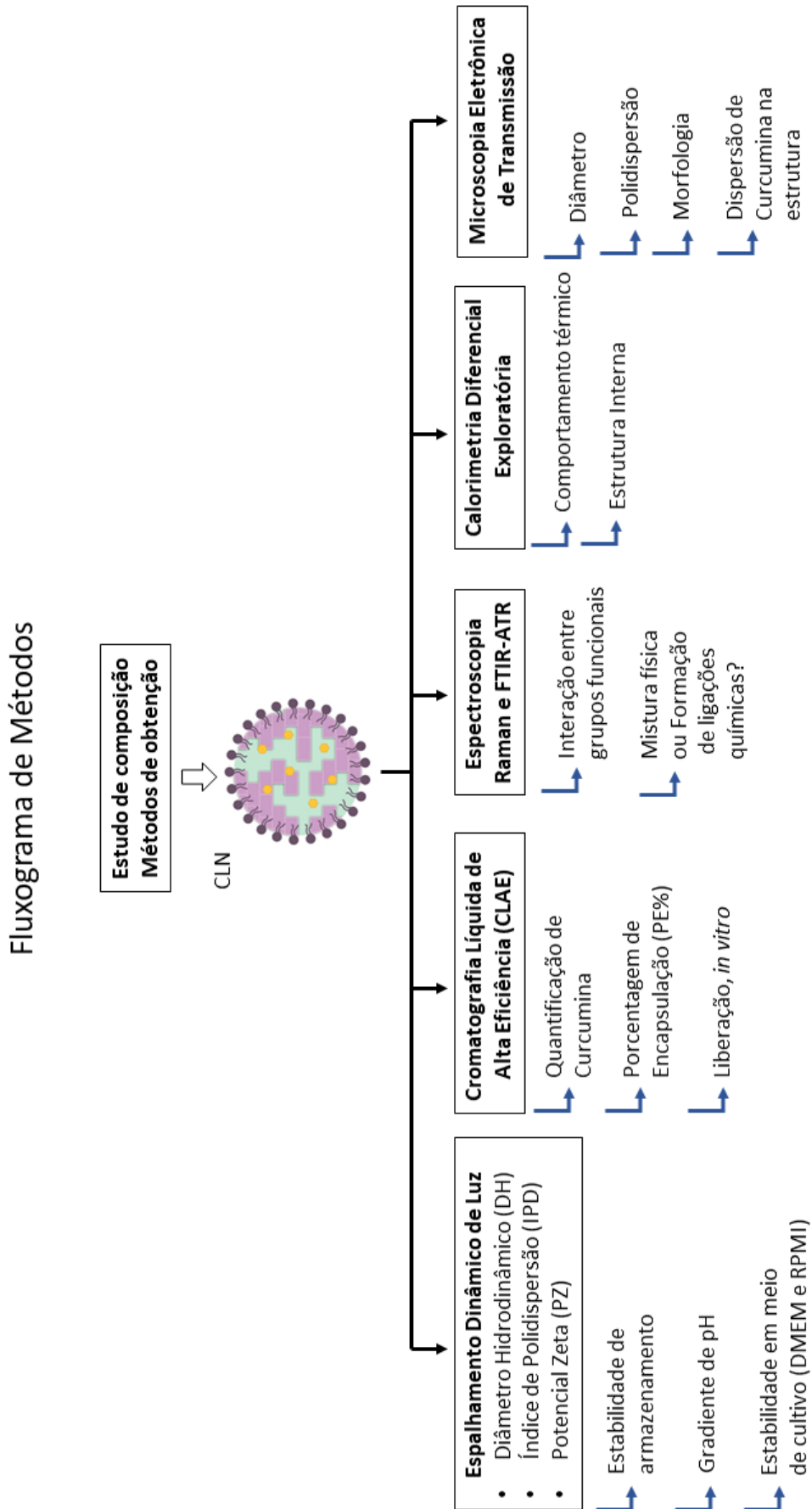
### 3.2.10. CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

Os termogramas foram obtidos por um calorímetro diferencial de varredura DSC-60 (Shimatzu) em um porta-amostra padrão de alumínio e selado. As medidas foram realizadas em ambiente de nitrogênio a uma vazão de 50 mL.min<sup>-1</sup>, utilizando a faixa de análise de 25°C a 400°C, com taxa de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup>. Considerando que o arranjo cristalino da estrutura lipídica interfere nas propriedades de textura, espalhabilidade, eficiência de encapsulação e perfil de liberação, o termograma das misturas físicas, dos CLN<sub>Branco</sub>, CLN, além dos componentes separados foram analisados (JENNING; LIPPACHER; GOHLA, 2002; SCHUBERT; MÜLLER-GOYMANN, 2005; BARBOSA, 2013). A análise da morfologia, tamanho modal e polidispersão dos CLN foi realizado por meio do software Image J.

### 3.2.11. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi utilizada para obter informação de tamanho médio e morfologia das nanopartículas. Para isso, uma alíquota de cada amostra foi diluída em água destilada (1:100 v/v), e postas em banho ultrassom por 5 minutos para promover a melhor visualização das estruturas. Posteriormente, 5 uL da formulação foram colocadas no suporte de cobre (grid) de 400 mesh, revestido com Formvar 0,4% (m:v em clorofórmio). Após secar completamente as amostras receberam vapor de tetróxido de ósmio por 5 minutos. As micrografias foram obtidas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1011, operando a 100 kV, do Laboratório de Microscopia Eletrônica de Transmissão do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (IB-UnB).

Figura 8. Fluxograma de métodos utilizados no estudo.



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. DESENVOLVIMENTO DOS CLN

O estudo de biocompatibilidade de componentes, foi o primeiro passo para o desenvolvimento dos CLN. Na revisão de DOKTOROVOVA; SOUTO; SILVA, 2014 foram elencados componentes de NLS e CLN e a toxicologia *in vitro* relacionado a estes, e foi notado que partículas contendo Compritol ATO 888 como componente lipídico não apresentou efeito citotóxico até 1 mg/mL enquanto NLS com ácido esteárico apresentou redução drástica da viabilidade celular na mesma concentração. Polisorbatos e poloxamers como estabilizantes, apresentaram alto IC<sub>50</sub> demonstrando a sua alta biocompatibilidade. Desta forma, os componentes selecionados para a composição dos CLN foram, Compritol ATO 888 (behenato de glicerilo), Polymol<sup>®</sup> ADB (adipato de di(n-butila), MCT (triglicérides de cadeia média), Tween 80 (polisorbato 80), Tween 20 (polisorbato 20) e Polaxamer 407 (2-metiloxirano).

Os resultados iniciais obtidos com os diferentes métodos de desenvolvimento de CLN estão expressos na Tabela 3, onde PITS é a temperatura de inversão de fase com adição súbita de água e PITT é a temperatura de inversão de fase com adição súbita de água e homogeneização a quente por cisalhamento com Turrax a 10000 rpm por 3 minutos, (CARBONE et al., 2012).

Tabela 3. Resultados observados de DH e IPD para os CLN com os diferentes métodos de preparo

Metodologia	DH (nm)	IPD
PIT	1296	0,801
PITS	833,33	0,239
PITT	247,90	0,164

PIT (temperatura de inversão de fase com adição lenta de água e agitação magnética), PITS (temperatura de inversão de fase com adição súbita de água e agitação magnética) e PITT (temperatura de inversão de fase com adição súbita de água e homogeneização a quente por cisalhamento com Turrax).

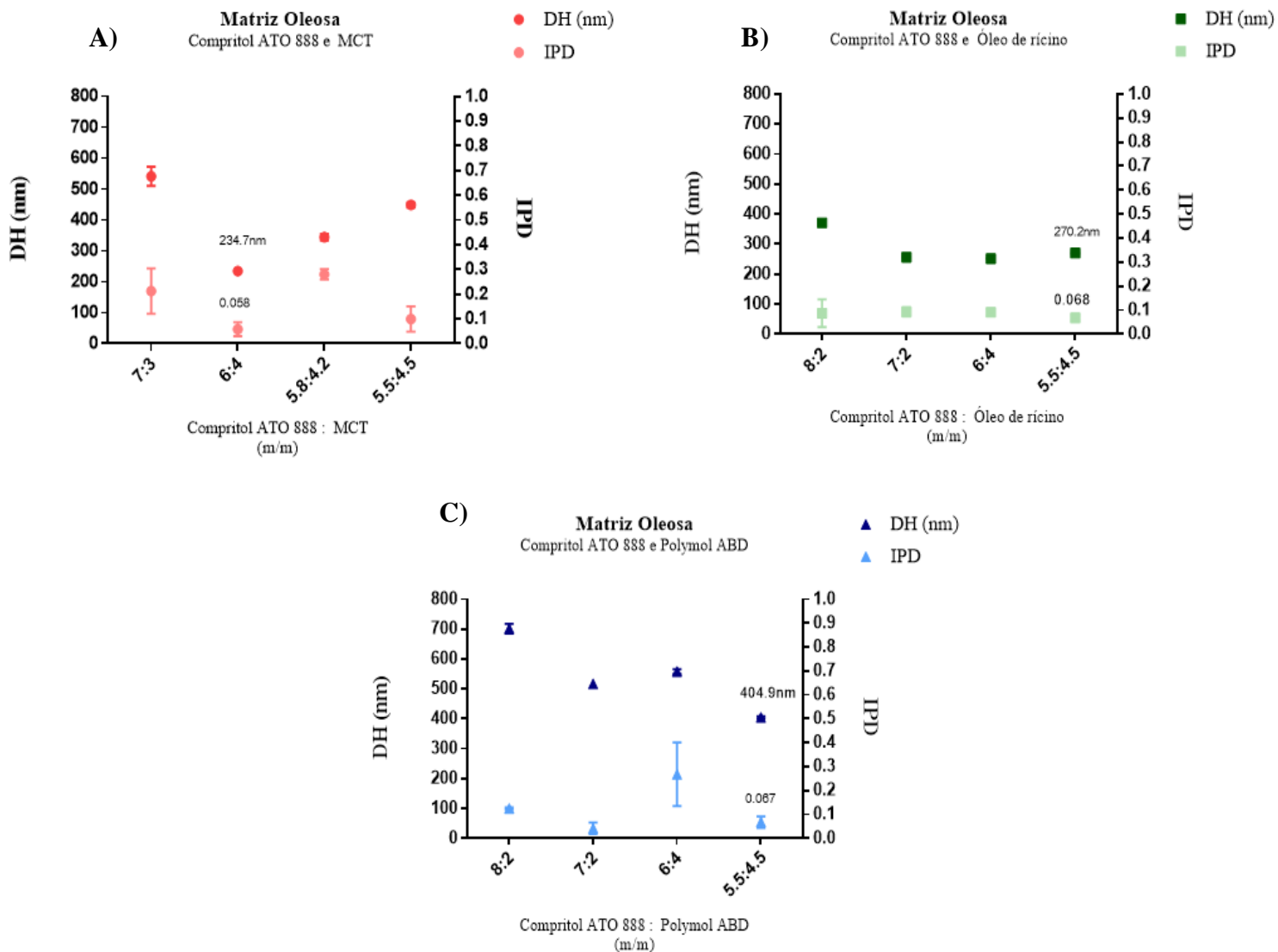
Como pode ser observado na tabela 3 o método PITT demonstrou os menores valores de DH e IPD. Tal resultado deve-se ao fato de que este método é o que fornece maior energia ao sistema, aumentando a entropia e possibilitando maior dispersão dos componentes presentes na amostra. Desta forma o método PITT foi utilizado para o desenvolvimento de todos os CLN subsequentes neste estudo.

Considerando que a fase lipídica tem grande influência nas características físico-químicas finais da partícula, decidiu-se avaliar diferentes óleos (MCT, Polymol<sup>®</sup> ADB e óleo de rícino) em associação com Compritol ATO 888, como lipídeo estrutural. Proporções distintas foram testadas levando em consideração a lipídeos : Tween20 (1:1 m/m) buscando reduzir o uso de tensoativo e conseqüentemente o potencial de toxicidade do sistema formado. Os resultados obtidos com a variação de óleo da matriz lipídica estão representados nos gráficos presentes no gráfico 1.

No Gráfico 1, pode-se observar que quanto maior a concentração de Compritol ATO 888 em relação ao óleo nos CLN com MCT e Polymol<sup>®</sup> ADB, maior o DH, enquanto na matriz composta por óleo de rícino demonstrou variação de DH somente na maior concentração do lipídeo estrutural. Tal comportamento pode ser um indicativo de que o óleo de rícino forma uma estrutura interna mais amorfa após cristalização do que MCT e Polymol<sup>®</sup> ADB, tendo em vista que a composição com maior concentração de lipídeo sólido promove mais eventos de cristalização em comparação a misturas com maior concentração de óleo (HUANG et al., 2008). Resultado similar foi encontrado nos estudos de ADITYA et al., 2014, o qual relata que partículas de lipídeo sólido apresentaram DH maior do que CLN, demonstrando que a presença de óleo pode reduzir o DH em comparação ao lipídeo sólido por si só devido ao desarranjo estrutural que o lipídeo líquido promove.

Cabe ressaltar que as partículas desenvolvidas apresentaram-se monodispersas, com  $IPD \leq 0,2$ . Porém, todas as partículas geradas apresentaram  $DH > 200$  nm, sendo as maiores da composição Compritol ATO 888 e Polymol<sup>®</sup> ADB. Considerando que a estabilização de CLN ocorre por interações de polaridade, estima-se que tal resultado pode ser explicado tendo em vista que o Polymol<sup>®</sup> ADB (adipato de di(n-butila) é o composto com menor lipofilicidade entre os óleos (tabela 4), reduzindo a interação com o lipídeo estrutural e conseqüentemente formando estruturas cristalinas maiores. Alguns estudos também apontam que a quantidade requerida de tensoativo para manter a estabilidade durante o processo de cristalização variam de acordo com a composição lipídica (WESTESEN, 1993; HELLGASON, 2008). Desta forma a matriz Compritol ATO 888 e Polymol<sup>®</sup> ADB pode gerar cristais maiores em comparação às outras matrizes, na concentração de Tween 20 testada.

**Gráfico 1.** Gráficos agrupados com resultados obtidos de DH e IPD após variação de proporção do óleo em relação a Compritol ATO 888. A) Matriz lipídica de Compritol ATO 888 e MCT; B) Compritol ATO 888 e óleo de rícino e C) Compritol ATO 888 e Polymol ADB



No estudo de SAEDI et al., 2018 foi observado também que a viscosidade do lipídeo líquido interfere no DH final, em que o óleo testado com maior viscosidade (óleo de semente preta) produziu partículas de DH menor em relação ao com menor viscosidade (óleo de coco). Tal resultado corrobora com os DH apresentados Polymol<sup>®</sup> ADB > Óleo de rícino > MCT.

Tabela 4. Óleos usados no estudo e respectiva solubilidade em água.

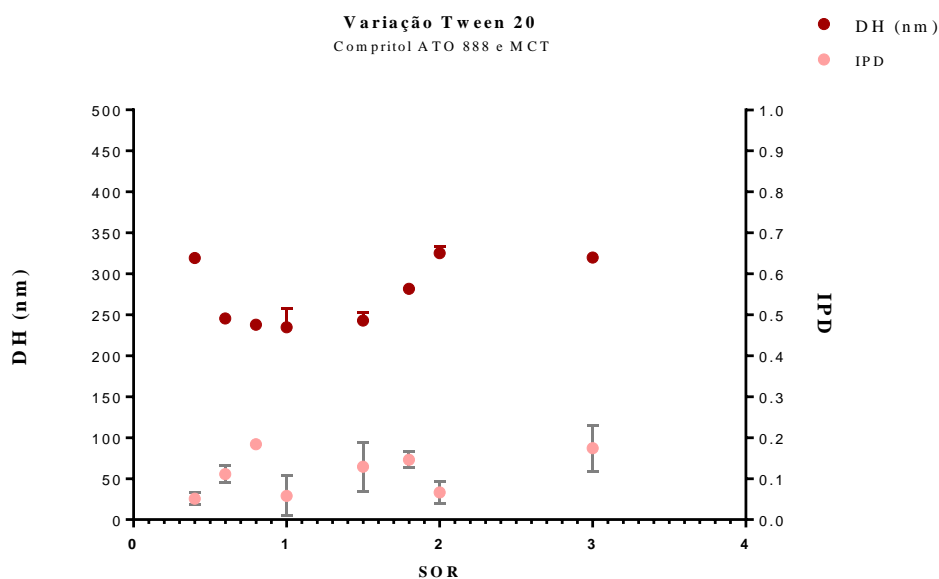
Óleo	Solubilidade em água (mg/mL)	Viscosidade <i>P</i> (MPa)
Polymol ® ADB	10	1,14
MCT	0,6	25-33
Óleo de rícino	< 1	6-8

Fonte: MARTEN; PFEUFFER; SCHREZENMEIR, 2006; DIOGO et al., 2015 e < pubchem.ncbi.nlm.nih.gov >.

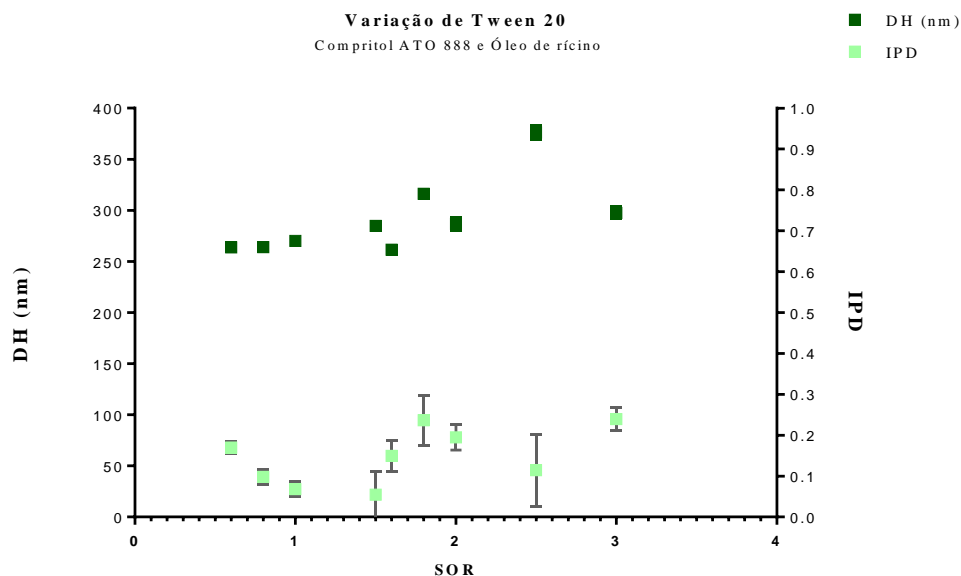
Tendo em vista os critérios de exclusão, os CLN que apresentaram os menores DH e IPD foram continuados para realizar os próximos testes. Desta forma, foram selecionadas as proporções: 0,6: 0,4 m/m (Compritol ATO 888 : MCT ) e 0,55 : 0,45 m/m ( Compritol ATO 888 : Óleo de rícino).

Considerando que no estudo de HELGASON et al., 2009 foi observado comportamentos diferenciados no DH de NLS frente a variação na concentração de Tween 20 e quanto maior a concentração de tensoativo menor a tensão superficial entre os componentes polares e apolares; e ainda levando em consideração os resultados anteriores de DH obtidos com os testes anteriores, a concentração de tensoativo foi a variante dos próximos testes por meio da razão tensoativo-óleo (SOR), fixando as proporções de fase lipídica e condições de agitação de 10000 rpm por 3 minutos. Os resultados obtidos com este teste estão elucidados nos gráficos 2 e 3.

**Gráfico 2.** Resultados de DH e IPD, obtidos com a variação de SOR, com Tween 20, com a matriz de Compritol ATO 888 e MCT



**Gráfico 3.** Resultados de DH e IPD, obtidos com a variação de SOR, com Tween 20, com a matriz de Compritol ATO 888 e óleo de rícino



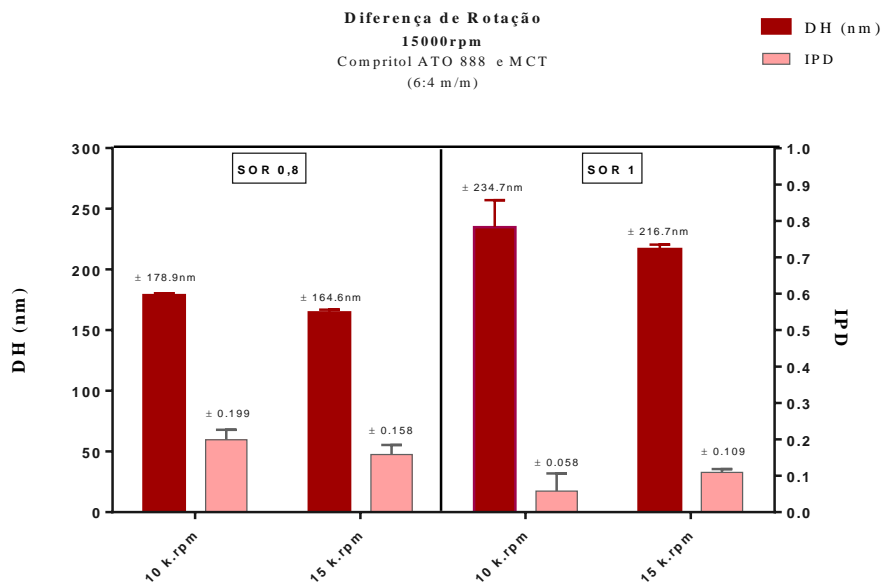
Após variar a razão de tensoativo-lipídeos, pode-se observar inicialmente que há uma tendência de aumento do DH em relação ao aumento de SOR a partir da relação 1,5. Para melhor avaliar a relação, foi realizado o cálculo de Correlação de Pearson considerando o SOR e os respectivos DH e IPD, para a matriz Compritol ATO 888 e MCT e matriz Compritol ATO 888 e óleo de rícino. A primeira apresentou uma correlação positiva, porém a relação entre as variáveis SOR e DH é fraca ( $R = 0,483$ ). Resultado similar foi observado ao comparar SOR e IPD ( $R = 0,403$ ). Quanto à matriz de Compritol ATO 888 e óleo de rícino, ela apresentou correlação positiva e moderada, demonstrando que há uma tendência do aumento de SOR promover aumento de DH ( $R = 0,654$ ), e baixa correlação positiva ao comparar SOR e IPD ( $R = 0,291$ ).

A correlação positiva e moderada entre SOR e IPD representa o fato já bem estabelecido pela literatura de que há concentração de tensoativo ideal para formar estruturas. Concentrações abaixo deste promovem formação poucas estruturas e/ou gera estruturas de baixa estabilidade e em altas concentrações pode atingir a Concentração Micelar Crítica (CMC) e formar micelas de tensoativos, e conseqüentemente diferentes populações no sistema (DOKTOROVOVA; SOUTO; SILVA, 2014).

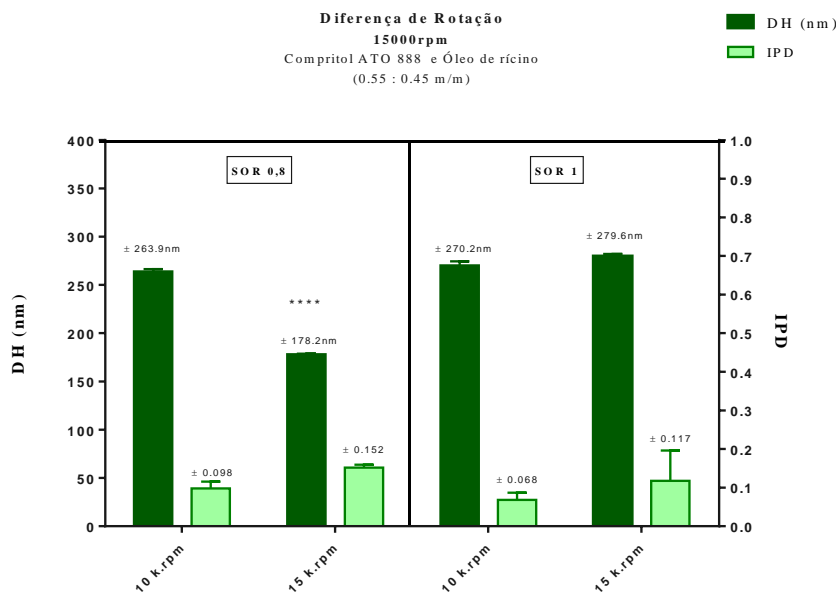
Referente ao aumento de DH, a CMC do Tween 20 é relativamente baixa (0,06 mM) e, desta forma, em altas concentrações os monômeros de Tween 20 que adsorvem na superfície da estrutura, estão pouco disponíveis devido a formação de micelas e, conseqüentemente, as estruturas formadas apresentam regiões que possibilitam interações hidrofóbicas com conseqüente formação de agregados e aumento do DH após arrefecimento (SCHICK, 1987;

HELGASON et al., 2009). A correlação positiva entre SOR e DH também foi observado pelo estudo de HELGASON et al., 2009, em que altas concentrações de Tween 20 levaram à formação de partículas com tripalmitina de alto DH. Desta forma, considerando a baixa CMC do Tween 20 e dos resultados obtidos anteriormente, aumentou-se a rotação do Turrax para 15000 rpm, fixando o tempo de 3 minutos.

**Gráfico 4.** Resultados de DH e IPD após o aumento de rotação (10 krpm para 15 krpm) em SOR 0,8 (primeiro quadrante) e 1 (segundo quadrante), com matriz lipídica composta por Compritol ATO 888 e MCT.



**Gráfico 5.** Resultados de DH e IPD após o aumento de rotação (10 krpm para 15 krpm) em SOR 0,8 (primeiro quadrante) e 1 (segundo quadrante), com matriz lipídica composta por Compritol ATO 888 e óleo de rícino.



Considerando os resultados, pode-se observar que o aumento da rotação proporcionou queda no DH significativa ( $p < 0,05$ ) na formulação com SOR 0,8 de matriz Compritol ATO

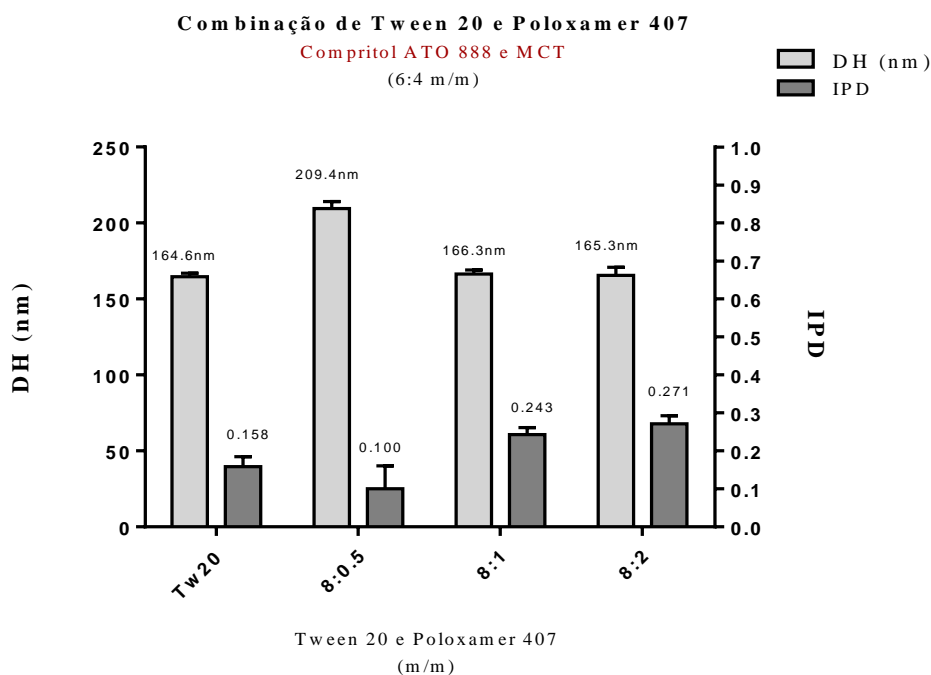


888 e óleo de rícino. Desta forma, a proporção ideal com o Tween 20 será SOR 0,8 para ambas as fases lipídicas e a rotação 15000 rpm por 3 minutos.

Ainda, em busca da redução de DH e tendo em vista a dispersão da biomolécula poderá afetar o perfil de cristalização da partícula aumentando o DH, foi considerando mistura de tensoativos. Poloxamer 407 foi adicionado à composição em diferentes proporções junto ao Tween 20, respeitando o SOR 1 como limite da mistura de Tween 20 e Poloxamer 407.

A utilização do Poloxamer 407 deve-se ao seu alto HLB e diversas publicações relacionadas à sua utilização para o desenvolvimento de nanopartículas lipídicas, assim como a possibilidade de funcionalização que este oferece devido à sua estrutura (DUMORTIER et al., 2006). Para este estudo fixou-se em SOR 0,8 de Tween 20 e rotação de 15000 rpm por 3 minutos, com as proporções 6:4 m/m (Compritol ATO 888 e MCT) e 0.55:0.45 m/m (Compritol ATO 888 e óleo de rícino) de matriz lipídica. Os resultados obtidos estão representados pelos gráficos 5 e 6.

**Gráfico 6.** Efeito da mistura de Tween 20 e Poloxamer 407 nos parâmetros de DH e IPD em função da relação m/m destes, em CLN composta por Compritol ATO 888 e MCT; comparativo com CNL estabilizado apenas com Tween 20 (TW20).



**Gráfico 7.** Efeito da mistura de Tween 20 e Poloxamer 407 nos parâmetros de DH e IPD em função da relação m/m destes, em CLN composta por Compritol ATO 888 e óleo de rícino; comparativo com CNL estabilizado apenas com Tween 20 (TW20).

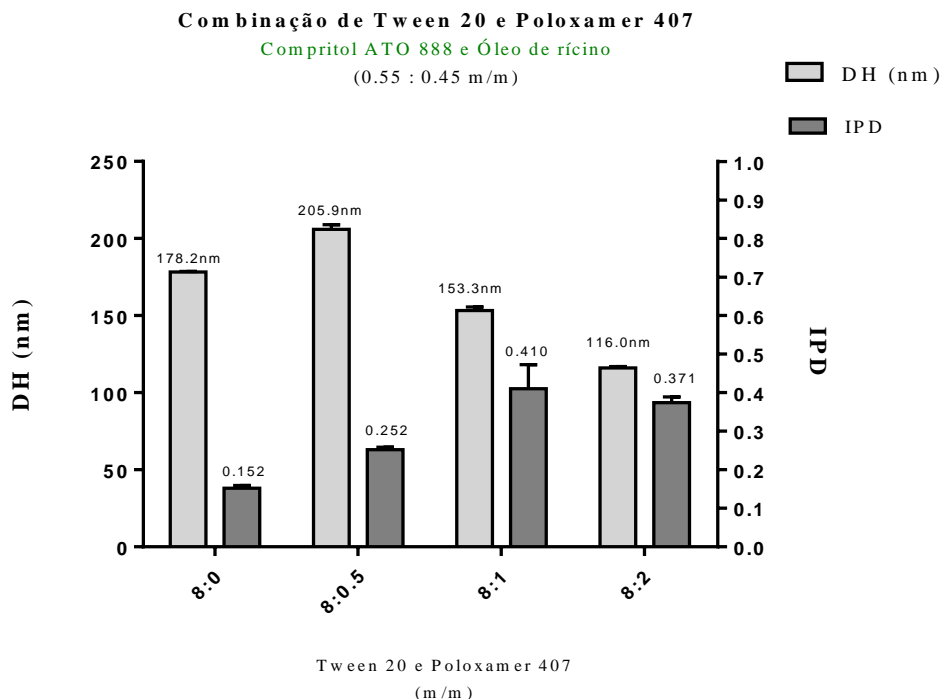


Tabela 5. Proporções de Poloxamer 407 testadas em relação ao Tween 20, respectivos SOR e HLB formados

Tween 20 :				
Poloxamer 407 (m/m)	Tween 20 puro	8 : 0,5	8 : 1	8 : 2
<b>SOR</b>	0,8	0,85	0,9	1
<b>HLB</b>	16,7	17	17,28	17,76

Como pode ser observado, apesar da adição de Poloxamer 407 gerar diversos CLN, não foi possível promover a redução significativa no DH da matriz Compritol ATO 888 e MCT, observou-se redução apenas nas proporções 8:1 e 8:2 (Tween20-Poloxamer 407) na matriz Compritol ATO 888 e Óleo de rícino, mas um aumento no IDP podendo ser um indicativo de excesso de tensoativos no sistema, que promove a formação de micelas menores entre moléculas do próprio tensoativo. Desta forma, para a continuidade do estudo e incorporação da curcumina, as amostras obtidas pelo teste anterior não foram utilizadas.

Ainda em busca de reduzir o DH da matriz lipídica Compritol ATO 888 e óleo de rícino, outra combinação de tensoativos foi testada. Diversos estudos utilizaram mistura de componentes tensoativos com diferentes HLB, consistindo em um alto HLB e outro de baixo valor (cotensoativo), com intuito de aumentar a estabilidade do sistema e/ou reduzir DH

(WANG et al., 2009; ADITYA et al., 2014; ANTONOW et al., 2017; GOMES et al., 2017; KOCKISCH et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2013, 2017; SZNITOWSKA et al., 2017; WEBER; ZIMMER; PARDEIKE, 2014). Alguns estudos, também utilizam misturas de agentes tensoativos de alto HLB para estabilizar partículas e reduzir o DH.

No estudo de SHAH et al., 2007 foi utilizada a mistura de Tween 20 e 80 para estabilizar NLS contendo tretinoína. Enquanto YUSUF et al., 2013 desenvolveram NLS contendo piperina e estabilizadas por mistura Tween 80 e Tween20 (1:1 v/v) para obter partículas com diâmetro hidrodinâmico médio de  $258,0 \pm 5,5$  nm. Desta forma, como alternativa, o presente estudo adotou a utilização de tensoativos de alto HLB, Tween 20 (HLB 16,7) e Tween 80 (HLB 15), para reduzir o DH. Tendo em vista ainda que a diferença entre a porção hidrofóbica poderia alterar o padrão de cristalização da estrutura e conseqüentemente reduzir o DH. Para o teste, foi fixado SOR 1 de Tween 20 e feita a variação em Tween 80 em concentrações menores, 9,09% e 16% da mistura de tensoativo. A condição de rotação permaneceu fixa, 15000 rpm por 3 minutos. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados da associação de Tween 80 com Tween 20, respectivos SOR e HLB total formados com a associação.

<b>Tween 20</b>	<b>Tween 80</b>	<b>SOR</b>	<b>HLB total</b>	<b>DH (nm)</b>	<b>IPD</b>
100%	0	1	16,70	$279,6 \pm 2,4$	$0,078 \pm 0,07$
90,90 %	9,09%	1,1	16,54	$185,5 \pm 5,6$	$0,086 \pm 0,03$
83,33%	16%	1,2	16,31	$256,9 \pm 1,4$	$0,088 \pm 0,03$

Como pode ser observado, a adição de Tween 80 promoveu redução significativa ( $p < 0,05$ ) de DH em 9,09% da mistura de tensoativo. Tanto na menor como na maior concentração de Tween 80 adicionada não houve alteração significativa entre o IPD, indicando que a mistura não promoveu formação de um sistema heterogêneo conseqüente dos excessos de tensoativos até na maior concentração testada (16%), como anteriormente abordado. Tal comportamento observado evidencia que a mistura de tensoativos de alto HLB e composição similar podem promover redução de DH.

Cabe ressaltar ainda que o tipo de tensoativo e a mistura exercem papel fundamental na transição polimórfica durante a cristalização dos lipídeos após o arrefecimento. Os tensoativos

além de influenciarem no estado coloidal (DH e IPD) também exercem papel fundamental na formação das estruturas internas das partículas (UNER, 2006; BUNJES; KOCH; WESTESEN, 2003).

Tendo em vista os resultados obtidos, para a incorporação de curcumina, foram selecionadas os CLN listados na tabela 7. O requisito de agitação estabelecido foi de 15000 rpm por 3 minutos à 80°C, seguida agitação magnética até atingir a temperatura ambiente.

Tabela 7. CLN selecionadas para incorporação de curcumina, composição, DH e IPD obtidos com as mesmas

Amostra	Matriz Lipídica	Tw 20	Tw 80	SOR	DH (nm)	IPD
CLN A	Compritol ATO 888 e MCT	100%	-	1	234,7 ± 2,2	0,058 ± 0,04
CLN B	Compritol ATO 888 + Óleo de rícino	90,90 %	9,09%	1,1	185,5 ± 5,6	0,086 ± 0,03
CLN C	Compritol ATO 888 + Óleo de rícino	100%	-	1	279,6 ± 1,4	0,019 ± 0,01

Cabe ressaltar que a escolha por  $SOR \geq 1$  deve-se à característica de alta lipofilicidade da curcumina e, ao adicioná-la, as partículas formadas com SOR 0,8 poderiam apresentar características como alto DH e IPD. Tendo em vista que as formulações desenvolvidas poderão ter aplicações biológicas variadas por vias distintas, a concentração 0,5 mg/mL de curcumina (65% m/m) foi determinada para a incorporação em CLN. A curcumina foi incorporada na fase orgânica durante o preparo dos CLN. Os resultados obtidos de DH e IPD, após a adição, podem ser observados na tabela 8.

Tabela 8. Relação das amostras de diferentes composições e com respectivos DH e IPD formados após a incorporação de curcumina

Amostra	DH (nm)	IPD
CLN A	192,6 ± 1,2	0,164 ± 0,02
CLN B	247,7 ± 10,64	0,161 ± 0,08
CLN C	379,3 ± 5,0	0,094 ± 0,05

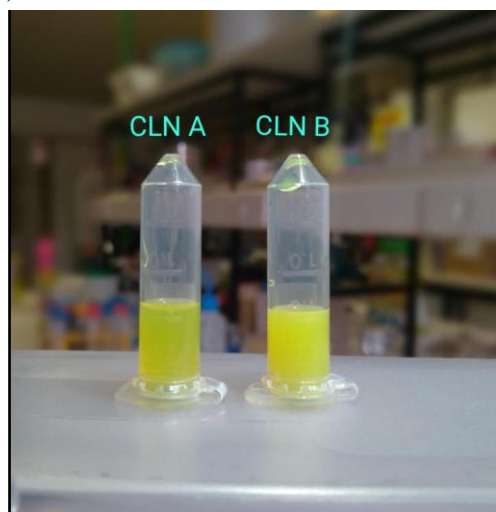
Com os resultados presentes na tabela 9, pode-se observar que todos os CLN, gerados após a incorporação, apresentaram IPD reduzidos. Tais resultados demonstram-se superiores ao estudo de ADITYA et al., 2014, no qual CLN desenvolvidos por método de homogeneização por alta pressão, apresentaram IPD de 0,3. O resultado apresentado pelo presente trabalho

também apresentou IPD menor do que CLN desenvolvidos por EL-SALAMOUNI et al., 2015 e FACHINETTI et al., 2018, os quais obtiveram  $IPD > 0,2$ . No estudo de MADANE; MAHAJAN, 2016 foi obtido CLN contendo curcumina por meio do método de homogeneização por alta pressão obtendo  $IPD > 0,180$ , superior ao encontrado no presente trabalho. Método similar foi utilizado por CHEN et al., 2016b, obtendo partículas menos monodispersas em relação ao observado com o estudo.

Quanto ao DH, houve uma redução de 42 nm da CLN A após a incorporação da curcumina. Tal fenômeno deve ter ocorrido em função da maior interação da curcumina com MCT, que proporcionou uma cristalização do Compritol ATO 888 de forma mais compacta após o arrefecimento ou formou uma matriz mais amorfa. Já nas CLN B e C houve aumento do DH de 62,2 nm e 109,1 nm, respectivamente. De acordo com o revisado por BUNJES, 2011, a incorporação do fármaco altera o padrão de cristalização da estrutura e ainda, pode suprimir a tendência de cristalização, eventos que geram alteração do DH.

Considerando que ambas as matrizes de B e C são constituídas de óleo de rícino, pode-se observar que este componente, devido ao seu grande volume, proporcionou formação de estrutura com maior DH em relação a CLN A; e ainda, observa-se que a presença de Tween 80 na formulação CLN B proporcionou a formação de uma estrutura mais compacta em comparação a CLN C, ausente deste composto. Após a incorporação da curcumina, a CLN C não foi continuada no estudo, tendo em vista o seu alto DH. Quanto as características macroscópicas dos CLN A e B, ambos apresentaram-se translúcidos, amarelados e CLN B apresentou-se mais opaco do que CLN A, em consequência do  $DHA < DHB$ , como o observado pela figura 9 após diluição de 1:10.

Figura 9. Características macroscópicas dos CLN com curcumina, CLN A (Compritol ATO 888 e MCT) CLN B (Compritol ATO 888 e Óleo de rícino)



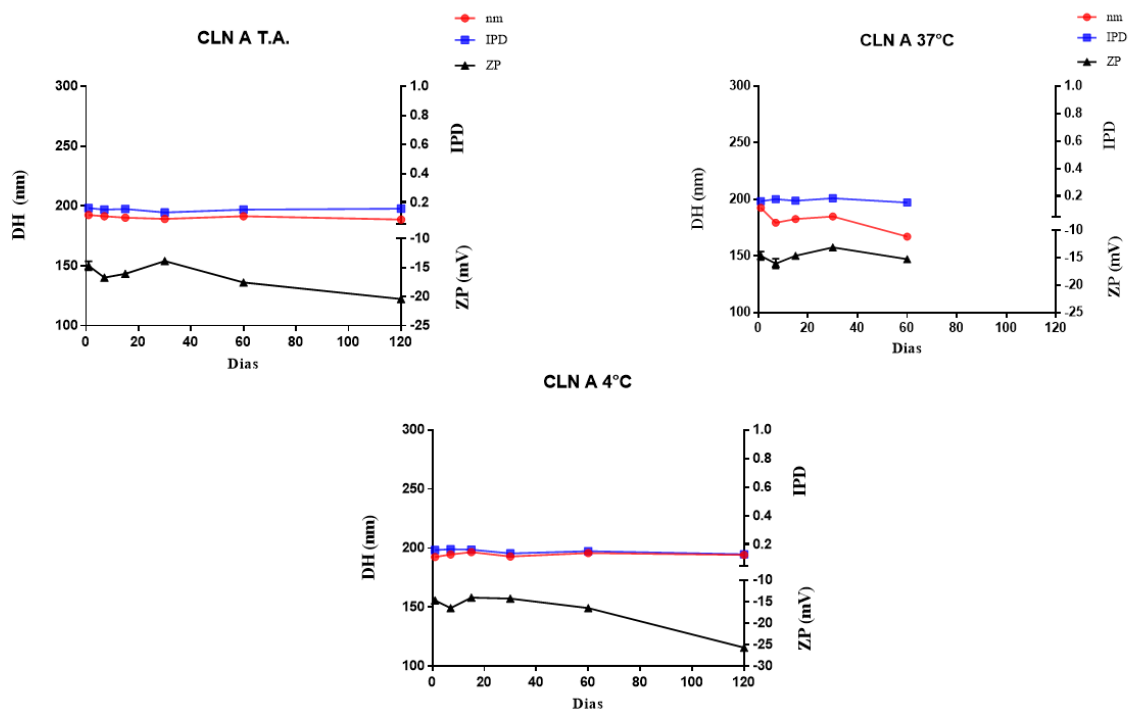
#### 4.1. ESTABILIDADE SOB ARMAZENAMENTO

Após o desenvolvimento, as partículas foram armazenadas a  $25 \pm 3$  °C (T.A.),  $4 \pm 1$  °C e  $37 \pm 0,5$  °C em abrigo de luz. Os parâmetros de DH, IPD e PZ foram avaliados nos dias 1, 7, 15, 30, 60 e 120 dias após o desenvolvimento das partículas. Os resultados obtidos com a avaliação de estabilidade de CLN A e B encontram-se expressos nos gráficos 8 e 9, respectivamente.

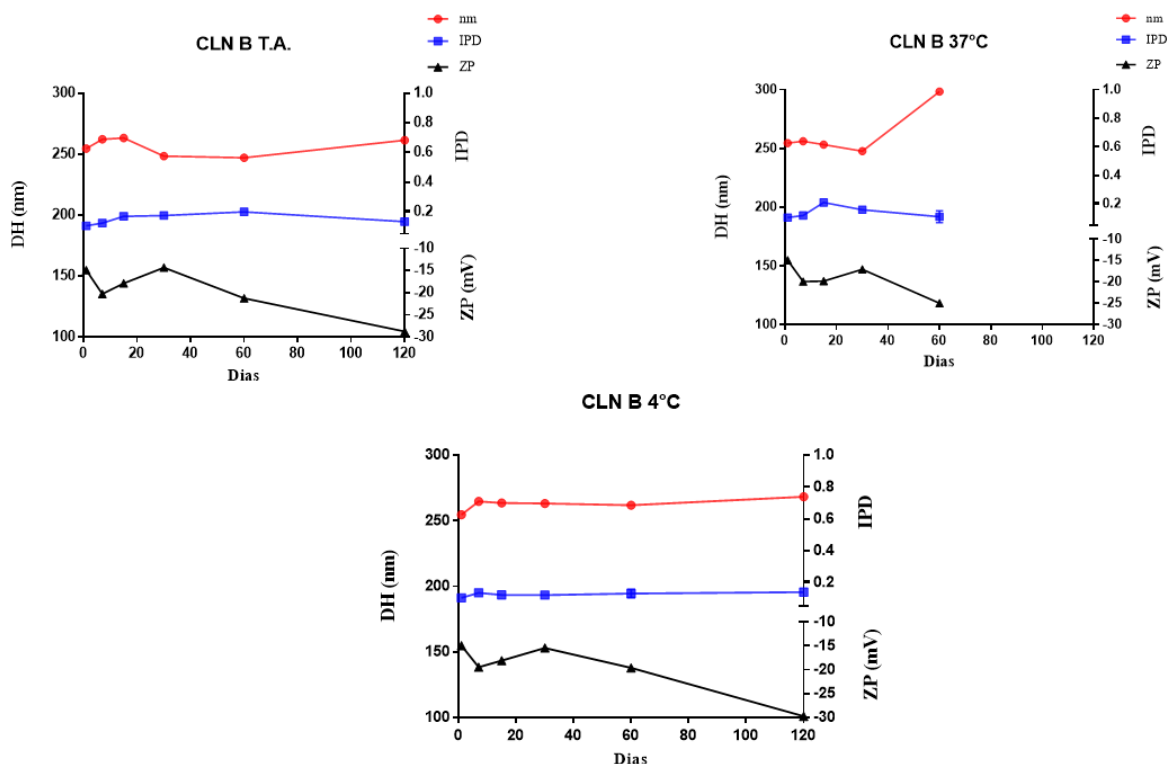
Como pode ser observado no gráfico 9, durante os 120 dias de armazenamento em T.A. e 4 °C a CLNA não apresentou alteração significativa ( $p < 0,05$ ) de DH, IDP e PZ, em 37 °C, a amostra apresentou redução significativa de DH (25 nm) em comparação ao primeiro dia analisado, porém o IPD e PZ apresentaram-se estáveis. Quanto ao CLN B pode-se observar que, assim como CLN A, manteve-se estável nas condições de 4 °C e T.A. Na mesma amostra, foi observado aumento de DH e redução de PZ no 60º dia, podendo ser indicativo de formação de agregados. Contudo, o IPD baixo permaneceu contínuo, permanecendo monodisperso. KOVACEVIC et al., 2011 avaliou a DH e IPD de NLS e CLN contendo componentes similares aos do presente estudo, armazenadas à T.A. por 90 dias, demonstrando resultados similares em comparação ao primeiro dia de análise, o que corrobora com os resultados obtidos em CLN A e B nesta mesma condição.

No trabalho de FREITAS; MÜLLER, 1998 foi avaliado DH de NLS constituídas de Compritol ATO 888 por 90 dias a 20 °C, e foram observadas alterações significativas após 30 dias, evidenciando que o sistema desenvolvido no presente trabalho desenvolveu estruturas lipídicas mais estáveis nesta condição. SAFWAT et al., 2017 avaliaram a estabilidade de CLN contendo sinvastatina em T.A. e 2-8 °C, após 30 dias foi observado aumento de DH e IPD. Tal resultado demonstra que o sistema formado no presente estudo se apresentou mais estável. HUANG et al., 2008 avaliaram a estabilidade de partículas lipídicas armazenadas à 37 °C por 28 dias, onde o CLN desenvolvido pelo estudo apresentou DH similar ao primeiro dia de análise porém houve redução do PZ, comportamento semelhante ao apresentado por CLN B na mesma condição. Não foi possível realizar a análise do 120º dia à 37 °C tanto do CLN A como do CLN B, devido a evaporação da água e formação de um filme ocasionado pelas forças capilares resultantes da desidratação, comportamento similar ao observado por NLS e revisado por MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002.

**Gráfico 8.** Grupo de gráficos representando a estabilidade de CLN A pelos parâmetros de DH, IPD e PZ, de 1 a 120 dias à T.A., 4°C e 37° C.



**Gráfico 9.** Grupo de gráficos representando a estabilidade de CLN B pelos parâmetros de DH, IPD e PZ, de 1 a 120 dias à T.A., 4°C e 37° C.



#### 4.1.1. ESTABILIDADE EM MEIO DE CULTIVO E A DIFERENTES PH

Tendo em vista que meios de cultivo, assim como em meios biológicos, são matrizes complexas nas quais o fenômeno de agregação pode ocorrer – processo irreversível de adesão inter-particular que leva a formação de aglomerados grandes e irregulares – ocasionando na instabilidade das partículas e alteração do comportamento em sistemas biológicos (MOORE et al., 2015). Os parâmetros de DH, IPD e ZP foram avaliados após incubação em meios de cultivo DMEM e RPMI.

Os meios de cultivo são soluções tamponadas compostas por proteínas, como a albumina sérica ou globulinas e biomoléculas, como aminoácidos e sais iônicos. Estes componentes influenciam o comportamento hidrodinâmico de nanopartículas, podendo torná-las instáveis através da adsorção destes resultando na formação de agregados, podendo influenciar no comportamento *in vitro* e interação biológica (MOORE et al., 2015). Desta forma, o presente estudo avaliou o DH, IPD e PZ dos carreadores em meios RPMI e DMEM nos tempos de 5, 15, 30, 60 e 120 minutos após sua diluição e armazenamento à 37 °C; com intuito de avaliar as características CLN em meios de cultivo suplementados. Os resultados de DH, IPD e PZ obtidos com a estabilidade dos CLN em meio DMEM e RPMI, encontram-se reunidos nos gráficos 10 e 11, respectivamente.

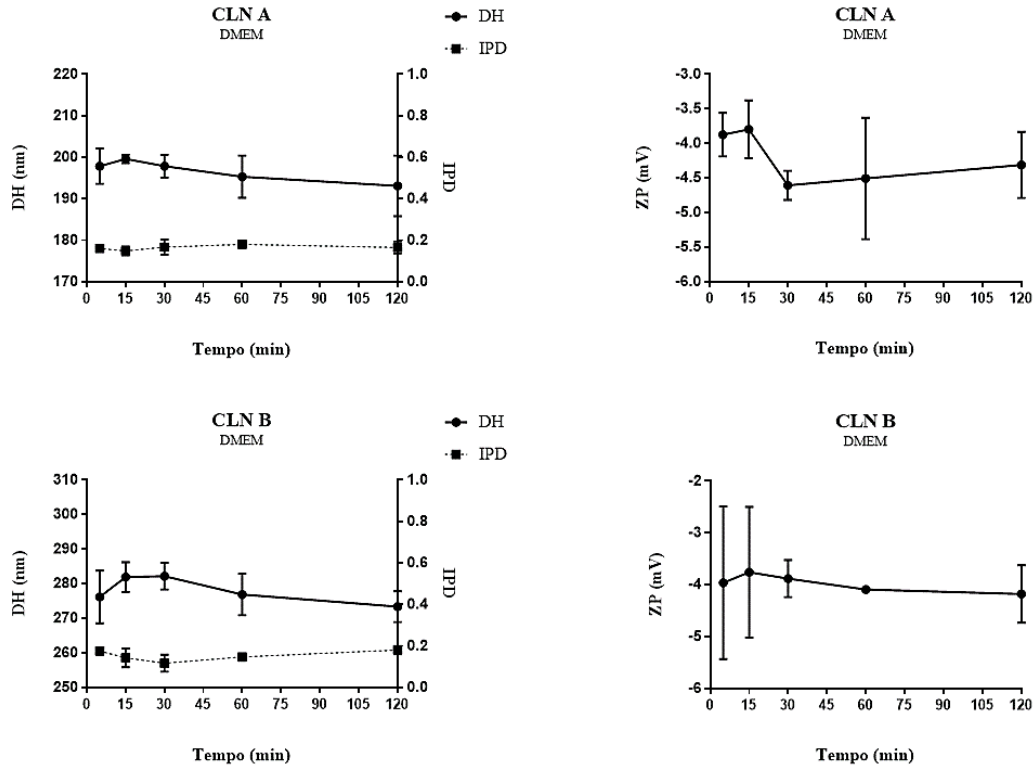
As amostras testadas tanto em meio DMEM como RPMI apresentaram aumento de DH, uma vez que nanopartículas em meio de cultivo adsorvem íons os quais refletem não apenas no PZ, mas também no DH pela formação de uma camada de solvatação maior (MOORE et al., 2015). Resultado similar ao apresentado pelo trabalho de OIL et al., 2013, onde CLN estabilizados com Tween 80 apresentaram aumento no DH após sua diluição em meio e armazenamento à 37 °C.

Como pode ser observado pelos gráficos 10 e 11, CLN A e B não demonstraram variação significativa de DH e IPD em ambos meios testados por todo o período estudado o indica que não houve formação de agregados. Este comportamento oferece aos sistemas desenvolvidos potencial aplicação parenteral, visto que a formação *in situ* de agregados conduz a depuração rápida no fígado e sistema retículo-endotelial (RES). Desta forma partículas que não apresentam agregação em meio biológicos podem possuir uma meia-vida de circulação prolongada (MOORE et al., 2015). Resultado similar foi observado por SILVA et al., 2012, onde NLS não foi observada agregação de seus nanocarreadores em DMEM, contudo neste

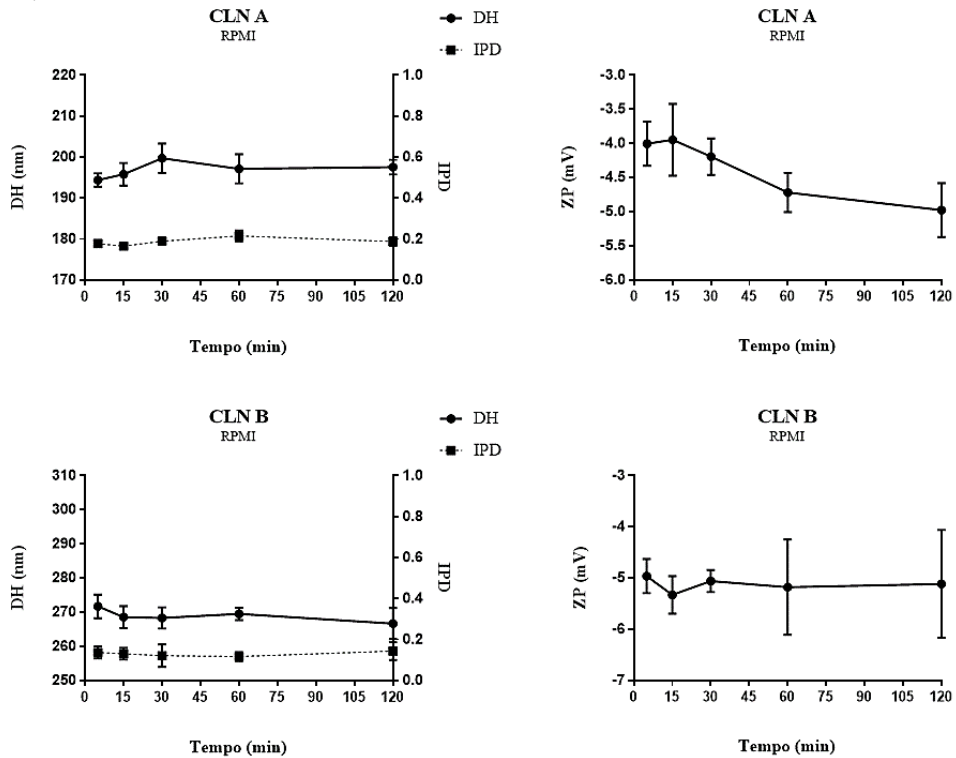


estudo as amostras foram mais diluídas do que no presente estudo, indicando que o sistema desenvolvido é estável em meio de cultivo até em altas concentrações.

**Gráfico 10.** Conjunto de gráficos correspondentes aos resultados de DH, IPD e PZ de CLN A e B em meio de cultivo DMEM.



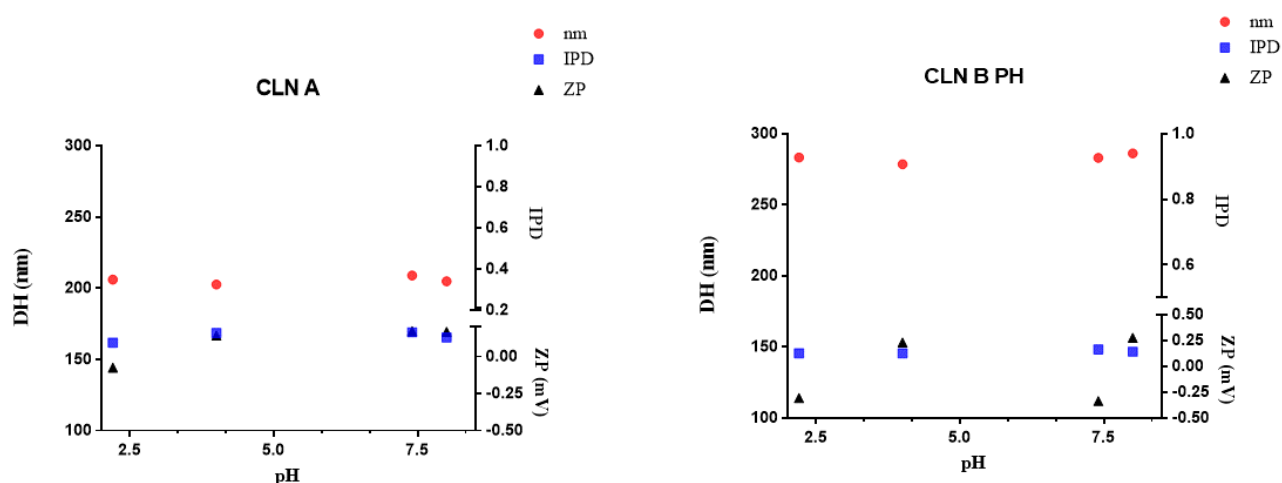
**Gráfico 11.** Conjunto de gráficos correspondentes aos resultados de DH, IPD e PZ de CLN A e B em meio de cultivo RPMI.



A variação significativa corresponde ao PZ, em que CLN A e B possuem  $\pm 15$  mV e quando submetidos ao meio de cultivo demonstraram PZ de  $\pm 4$  mV e  $\pm 5$  mV, respectivamente. Esta variação e o alto desvio padrão corresponde a adsorção de íons presentes no meio e de sua suplementação como revisado por BHATTACHARJEE, 2016. Cabe ressaltar que em ambos os meios e pelo período estudado, tanto CLN A como B permaneceram com PZ negativo sendo uma característica interessante, visto que partículas com carga negativa possuem maior tempo de circulação uma vez apresentam baixa taxa de adsorção de proteínas séricas (GERA et al., 2017).

Com intuito de avaliar o comportamento dos CLN formados em diferentes condições de pH fisiológicos, o DH, IPD e PZ foram observados. Os resultados obtidos com tal avaliação encontram-se no gráfico 11.

**Gráfico 11.** Estabilidade de CLN A e B frente a variação de pH



O gráfico 11 mostra que CLN A e CLN B demonstraram aumento de DH, de  $\pm 13,95$  nm e  $\pm 18,43$  nm, respectivamente em relação a amostra após um dia de preparada e armazenada a 4 °C. Este acréscimo de nanômetros deve-se à presença do sal na solução tampão preparada, o que acaba por sua vez aumentando a camada de solvatação que é considerada pelo método de espalhamento dinâmico de luz utilizado para determinar o DH. Contudo, não foi observada variação significativa de DH das amostras em diferentes pH (NELSON; COX, 2011).

A interferência da solução tampão também pode ser observado pelo PZ de ambas as amostras, visto que CNL A apresentou  $\pm 14,49$  mV e B  $\pm 19,15$  mV de diferença entre estas e suas semelhantes armazenadas a 4 °C, chegando próximo ao ponto isoelétrico. Tal comportamento deve-se a adsorção de íons presentes na solução, o que interfere diretamente

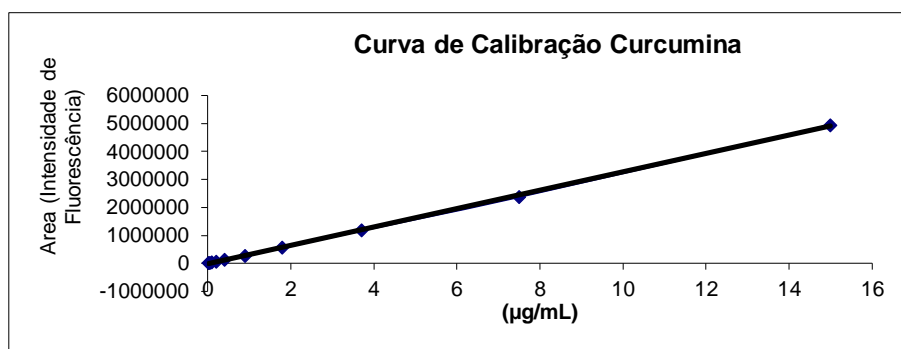
no processo de eletroforese realizado para determinar o PZ. Ao analisar o IPD, ambas as amostras não apresentaram variação significativa entre suas semelhantes armazenadas, o que reforça a ideia de que a variação de PZ e DH decorre dos motivos apontados anteriormente e, demonstra ainda, que as amostras permaneceram estáveis após as variações de pH, tornando-as candidatas interessantes para administração intravenosa e oral.

#### 4.4. QUANTIFICAÇÃO DE CURCUMINA POR CLAE

Para a quantificação de curcumina por CLAE, uma curva analítica foi feita e o cálculo de regressão linear foi aplicado pelo método dos mínimos quadrados e feita a avaliação da associação linear por meio do coeficiente de correlação e de determinação ( $r^2$ ).

A equação da reta obtida foi de  $y = 327396x - 8230,2$  e coeficiente de correlação obtido com a curva foi de 0,9996, como o apresentado pelo gráfico 12. Demonstrando uma ótima correlação entre os pontos testados, visto que o coeficiente de correlação deve estar acima de 0,990 segundo a RDC N° 166, 24/07/2017 (ANVISA, 2017).

**Gráfico 12.** Curva de calibração de curcumina obtido por CLAE.



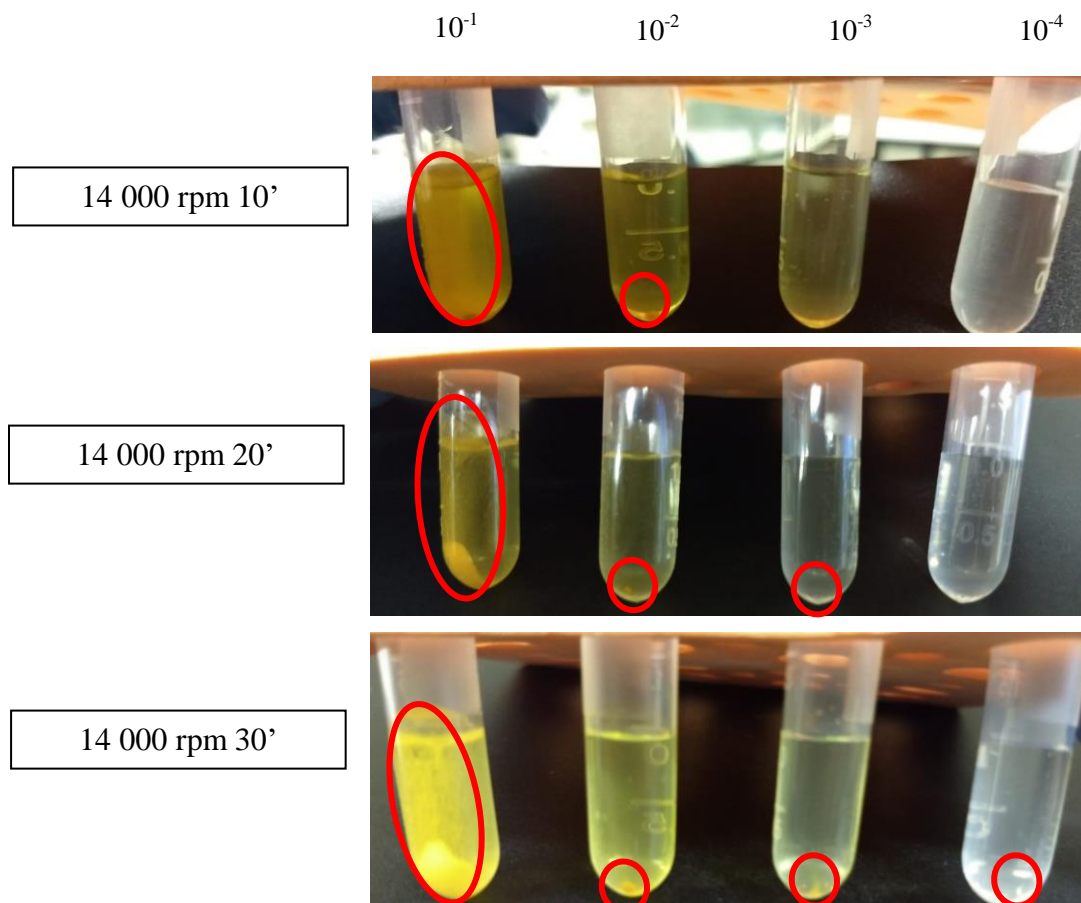
#### 4.5. PORCENTAGEM DE ENCAPSULAÇÃO (EE%) E CARREGAMENTO (CC%) DE CURCUMINA

A forma de liberação e a porcentagem de carregamento do fármaco é um fator importante, uma vez que o potencial terapêutico da nanoformulação de curcumina está diretamente ligado ao seu perfil de liberação em sua forma ativa no local de interesse (GERA et al., 2017).

Para realizar o teste de porcentagem de encapsulamento (% PE), inicialmente foi necessário realizar testes anteriores para avaliar a melhor condição de centrifugação para promover a sedimentação da curcumina livre, para qual foi utilizada a maior rotação da

centrífuga em tempos diferentes e em concentrações diferentes em solução hidroalcoólica (Figura 10).

Figura 10. Resultados macroscópicos após centrifugação de 14krpm em tempos diferentes e diluições diferentes da solução hidro alcoólica de curcumina.



Assim como o esperado, o maior tempo de centrifugação promoveu sedimentação mais eficaz da solução de curcumina em meio hidroalcoólico. Desta forma, a condição de 14 krpm por 30 minutos foi a condição estabelecida para promover a sedimentação da curcumina livre nas suspensões coloidais CLN A e B. Os resultados obtidos com a eficiência de encapsulação podem ser observados na tabela 9.

Tabela 9. Resultados obtidos com a porcentagem de encapsulação (PE%) das amostras CLN A e B, com as respectivas porcentagens de carregamento de curcumina (CC%).

<b>Amostra</b>	<b>EE %</b>	<b>CC %</b>
CLN A	88,39	1,55
CLN B	94,14	1,40

Como pode ser observado, a curcumina representa cerca de 1,55% da fase orgânica de CLN A e 1,40% de CLN B, devido à presença de Tween 80 em B. Quanto à encapsulação, ambas as formulações apresentaram alto grau de carreamento de curcumina. CLN B foi mais eficiente que A ao encapsular 94,14% em relação a 88,34%, este comportamento pode ser explicado tendo como base a diferença de composição entre as estruturas.

CLN B apresenta maior concentração de tensoativo (SOR 1,1) do que A (SOR 1) o que pode promover melhor eficiência de encapsulação, resultado similar foi observado nos estudos de CAMPOS; VARAS-GODOY; HAIDAR, 2017 onde NLS desenvolvidas com Compritol ATO 888 estabilizadas com polisorbato 80 exibiram aumento EE% proporcional ao aumento da concentração deste tensoativo. MADANE; MAHAJAN, 2016 também observaram que ao aumentar a concentração de Tween 80 em CLN, preparados com Precirol ATO5 e MCT, aumentou-se a EE% de curcumina. Cabe ressaltar também que o CLN A apresentou estrutura mais compacta após a incorporação de curcumina, o que pode ter induzido a expulsão de pequenas quantidades de curcumina durante o processo de cristalização após o arrefecimento do sistema. Na revisão de BUNJES, 2011, estudos apontam que a capacidade de incorporação depende das propriedades físico-químicas do fármaco, assim como da composição da matriz lipídica e do estado cristalino desta.

No mesmo estudo, MADANE; MAHAJAN, 2016 obtiveram eficiência de 90,86% de curcumina em uma CLN obtida por homogeneização a alta pressão a quente (HPH), eficiência menor do que o obtido com o presente estudo por CLN B desenvolvida por PITT. No trabalho de PUGLIA et al., 2012 também foi desenvolvido CLN contendo curcumina por método de ultrasonicação obtendo EE% de 87%, porcentagem inferior ao obtido com os dois sistemas desenvolvidos pelo presente trabalho.

#### 4.6. LIBERAÇÃO DE CURCUMINA *IN VITRO*

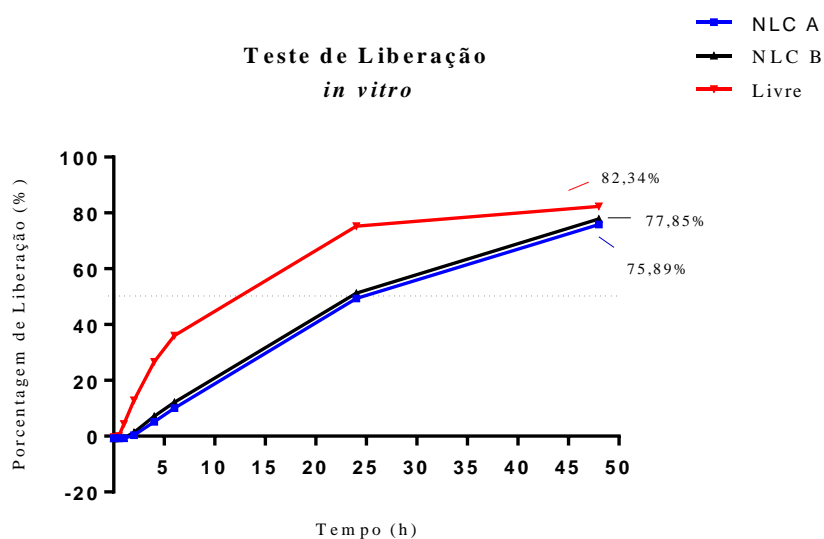
Para o teste de liberação, diferentes meios dialisadores foram testados, água deionizada (pH 2), solução aquosa de Tween 80 (1%) e solução hidro alcóolica (50%). Para este primeiro teste a quantificação da curcumina no meio extrator foi avaliado nos períodos de 10 min, 20 min, 30 min, 2h, 4h e 24h. Os resultados obtidos estão presentes na tabela 11.

Tabela 1. Concentração em % de curcumina recuperada, em relação ao presente nas soluções, em diferentes meios dialisadores pelos tempos elencados.

Tempo (min)	H <sub>2</sub> O (pH 2)	Tween 80 (1%)	EtOH (50%)
10 min	0	0	0
20 min	0	0	0
30 min	0	0	0,60 %
2 h	0	0	4,31 %
4 h	0	0	12,82 %
24 h	0	0	75,29 %

Durante o período de diálise, pode-se notar que visualmente os meios dialisadores H<sub>2</sub>O (pH 2) e Tween 80 (1%) não promoveram extração de curcumina, comprovado pela quantificação por CLAE; e ainda foi observada sedimentação de curcumina dentro do saco de diálise nestes meios. Já na solução EtOH (50%) houve mudança clara na coloração do meio dialisador, não apresentando sedimentação no saco de diálise e ainda foi quantificado curcumina no meio extrator. Desta forma, este meio foi escolhido para o teste seguinte, realizado com o intuito de demonstrar que os CLN conseguem reter a curcumina e liberá-la mais lentamente em comparação o composto livre em solução. Os resultados obtidos com a diálise de CLN A e B, assim como a curcumina livre estão presentes no gráfico 13.

**Gráfico 13.** Resultados obtidos com a diálise de curcumina livre, CLNA e B em solução de EtOH (50%) por até 48 horas.



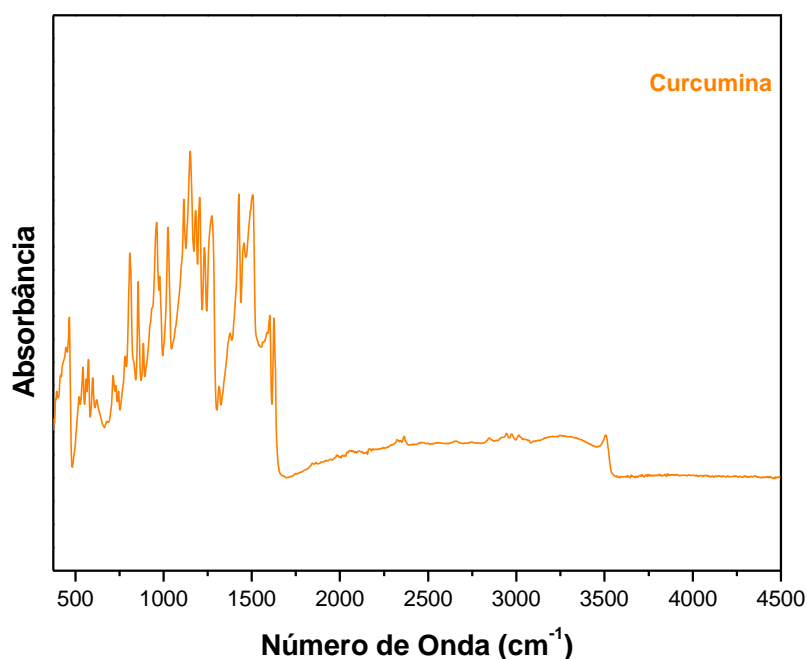
Com os resultados expressos no Gráfico 13 pode-se observar que após 48 horas de diálise foi obtida recuperação de 82,34% da curcumina em solução aquosa no meio extrator e 77,89% de CLN A e 77,85% de CLN B, demonstrando que o meio extrator foi eficiente. Contudo, era esperado recuperação total da curcumina livre como o apresentado nos estudos de MADANE; MAHAJAN, 2016 e CHANBUREE; TIYABOONCHAI, 2017, porém os testes realizados por tais estudos utilizaram solução aquosa de curcumina enquanto no presente trabalho foi utilizada solução hidroalcoólica a qual pode ter influenciado para a não recuperação total. Ainda, 50% de curcumina em solução foi recuperada no período inferior a 15 horas de diálise, enquanto os CLN liberaram 50% do seu conteúdo de curcumina somente após 24 horas, comprovando que os dois sistemas desenvolvidos foram capazes de reter e liberar lentamente a curcumina em comparação a solução hidro alcoólica da molécula livre.

MADANE; MAHAJAN, 2016 observaram liberação de 50% de curcumina logo após as 5 horas de estudo por CLN composto por precirol e MCT estabilizado por tween 80, enquanto PUGLIA et al., 2012 quantificaram 50% da curcumina após 12 horas por CLN composta por Precirol ATO 5 (palmito-estearato de glicerila) e Miglyol 812 (triglicérides caprílico / cáprico). CHANBUREE; TIYABOONCHAI, 2017 quantificaram metade da curcumina em CLN logo antes dos 20 minutos de análise, enquanto ADITYA et al., 2013 observaram quantificação similar após 5 horas de estudo do CLN desenvolvido. Desta forma, CLN A e B desenvolvidos neste estudo demonstraram maior capacidade de retenção de curcumina em comparação aos estudos citados.

#### 4.7. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR-ATR)

Com o objetivo de estimar qualquer possibilidade de interação química entre a curcumina e os carreadores (CLN<sub>branca</sub> A ou CLN<sub>branca</sub> B), espectros de FTIR dos constituintes: Compritol ATO 888, MCT, Tween 20, Tween 80, curcumina e das formulações: CLN<sub>branca</sub> A e CLN<sub>branca</sub> B e respectivos CLN, foram estudados. Um estudo detalhado do espectro vibracional da curcumina foi descrito por KOLEV et al., 2005. O espectro de FTIR da curcumina está apresentado na Figura 10, e a Figura 11 apresenta os espectros vibracionais no IV dos constituintes do CLN A, da curcumina livre, do CLN<sub>Branca</sub> A e da mistura física A, cujas frequências e atribuições estão contidas na Tabela 12.

Figura 3. Espectro vibracional na região do infravermelho da curcumina.



Um pico largo em  $3255\text{ cm}^{-1}$  e um agudo em  $3507\text{ cm}^{-1}$  indicam a presença de OH. O pico forte em  $1626\text{ cm}^{-1}$  tem um caráter predominantemente misto referente à  $\nu\text{C}=\text{C}$  e  $\nu\text{C}=\text{O}$  (KOLEV et al., 2005). Outra banda forte em  $1600\text{ cm}^{-1}$  é atribuída às vibrações de estiramento simétrico do anel aromático  $\nu\text{C}-\text{C}_{\text{anel}}$ . O pico de  $1504\text{ cm}^{-1}$  é atribuído ao  $\nu\text{C}=\text{O}$ , enquanto o pico atribuído ao enol (C-O) foi obtido em  $1273\text{ cm}^{-1}$ , pico de C-O-C em  $1026\text{ cm}^{-1}$ , vibração *trans*-CH do benzoato em  $960\text{ cm}^{-1}$  e vibração *cis*-CH do anel aromático em  $714\text{ cm}^{-1}$ .

Analisando a Figura 11 observa-se que os espectros referentes a  $\text{CLN}_{\text{Branca A}}$ , mistura física A e CLN A são muito semelhantes. O espectro da  $\text{CLN}_{\text{Branca A}}$  comparado aos outros dois (mistura física A e CLN A) se diferencia apenas na ausência das bandas atribuídas a curcumina, o que era esperado, uma vez que essa amostra não contém a molécula incorporada. A ausência de qualquer deslocamento no espectro do CLN A em comparação à amostra branca ( $\text{CLN}_{\text{Branca A}}$ ) indica que não houve interação entre a curcumina e os constituintes do sistema. Observa-se ainda que os espectros da mistura física A e do CLN A são idênticos, não sendo observado nenhum tipo de deslocamento considerável, ou o aparecimento de novos picos, o que permite inferir que houve apenas interações físicas entre a curcumina e os constituintes do carreador, e nenhuma interação química ocorreu entre eles. Resultados semelhantes foram observados por FATHI; VARSHOSAZ, 2013, que estudaram Hesperetina incorporada em CLNs, que foram recobertos com diferentes biopolímeros



(quitosana, alginato e pectina de baixo grau de metoxilação). A análise do FTIR mostrou que a Hesperetina foi incorporada no sistema apenas por interações físicas e não por uma reação química. Outro estudo que mostra apenas a interação física entre o ativo e os constituintes do CLN é o de PEZESHKI et al., 2014 que estudaram a incorporação do Palmitato da vitamina A em carreador lipídico nanoestruturado.

Figura 12 apresenta os espectros vibracionais no IV dos constituintes do CLNB, da curcumina livre, do CLN<sub>Branca</sub> B e da mistura física B, cujas frequências e atribuições estão contidas na Tabela 13.

Figura 4. Espectro vibracional na região do infravermelho do compritol, Tween 20, MCT, curcumina, CLN<sub>Branca</sub> A, mistura física A e CLN A.

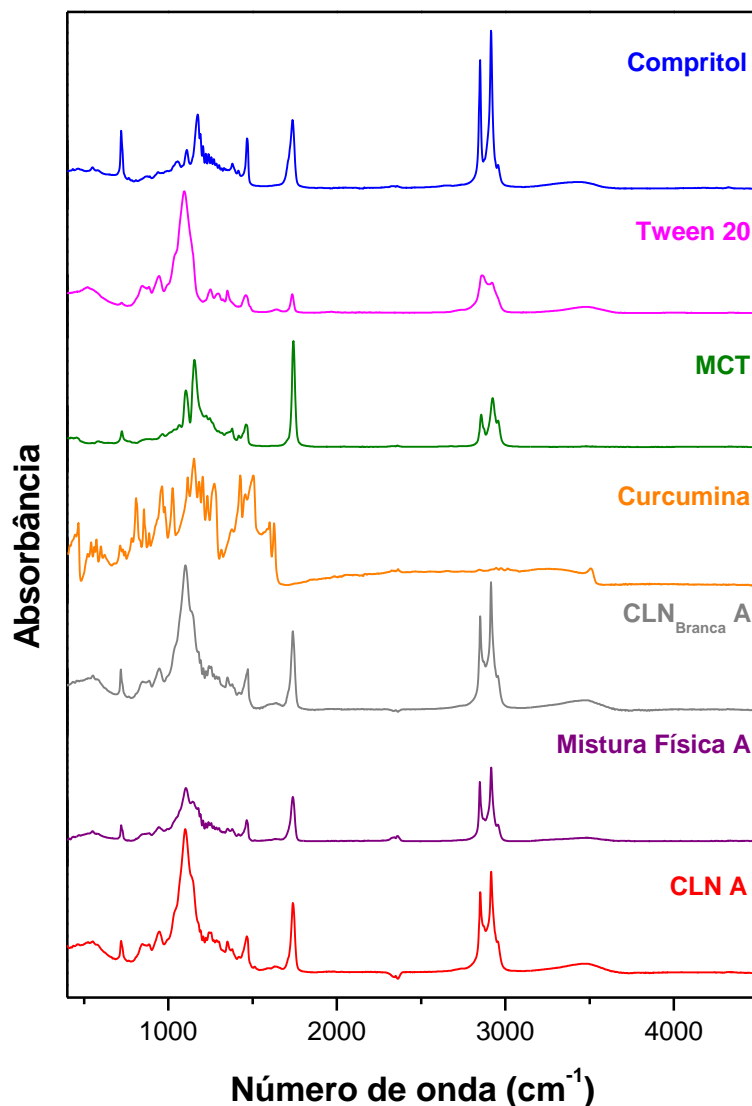


Tabela 11. Frequências vibracionais no IV (cm-1) referente ao Compritol ATO 888, Tween 20, MCT, curcumina, CLNBranca A, mistura física A e CLN A e suas respectivas atribuições.

Compritol ATO 888	Composto						Atribuição
	Tween 20	MCT	Curcumina	CLN <sup>Bran</sup> ca A	Mistura Física A	CLNA	
3441	3426	-	3507	3478	3544, 3491	3476	vOH
2914	2920	2955, 2924	2972, 2945	2953, 2914	2955, 2916	2954, 2916	v <sub>as</sub> CH
2849	2860	2855	2845	2848	2849	2849	v <sub>s</sub> CH
1736	1734	1742	-	1738	1734	1738	vC=O
-	1646	-	-	1642	-	-	vC=O
-	-	-	1626	-	1639	1637	vC=O + vC=C
-	-	-	1600	-	-	-	vC-C aromático
-	-	-	1504	-	1509	1512	vC=O + δCCC + δC=O no plano
1466	1458	1460	1456	1472	1464	1466	δCH (CH <sub>2</sub> alcano)
-	-	-	1273	-	1269	1269	vCO (aromático)
1172	-	1153	-	1178	1176	1170	vCO
-	1094	-	-	1101	1103	1100	vCOC
-	-	-	960	-	945	947	vC=O + δno plano CCH
719	721	723	-	718	-	-	Rocking CH <sub>2</sub>
-	-	-	714	-	719	719	δno plano do esqueleto CCH e aromático CCH + vC=C

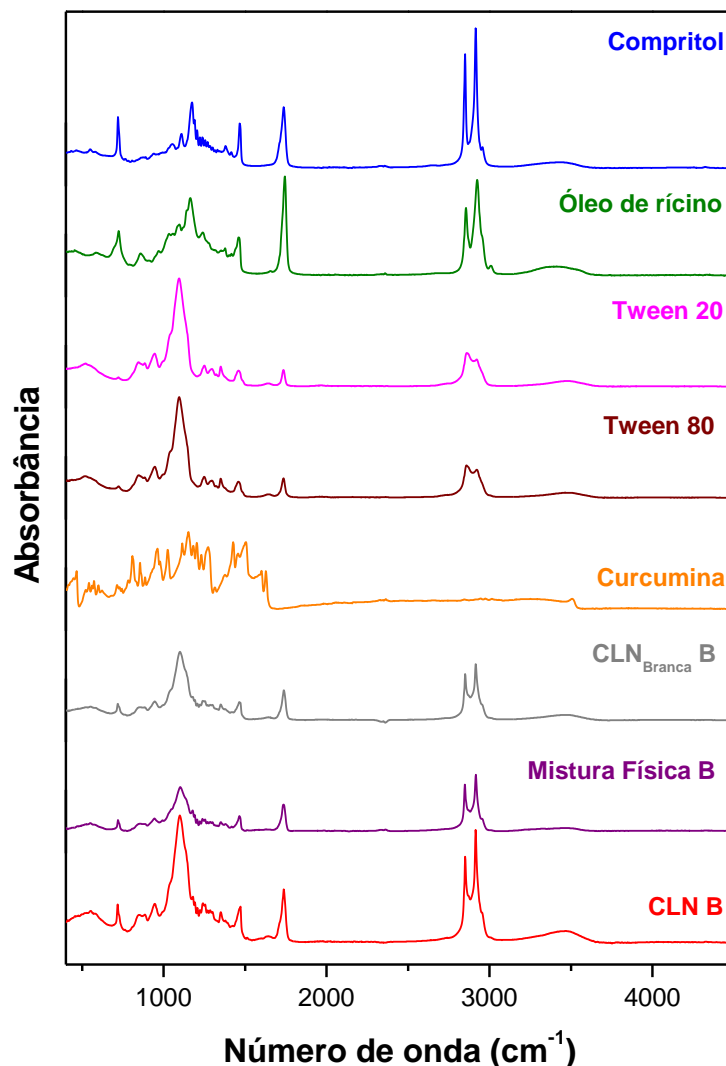
Fonte: Compritol ATO 888 (JAGDALE et al., 2011); Tween 20 (ORTIZ-TAFOYA; TECANTE, 2018); MCT (KIEFER et al., 2016); Curcumina (MOHAN et al., 2012a) Tabela 2. Frequências vibracionais no IV (cm-1) referente ao Compritol ATO 888, Tween 20, Tween 80, óleo de óleo de rícino, curcumina, CLNBranca B, mistura física B e CLN B e suas respectivas atribuições.

Tabela 12. Frequências vibracionais no IV (cm-1) referente ao Compritol ATO 888, Tween 20, Tween 80, óleo de rícino, curcumina, CLNBranca A, mistura física A e CLN A e suas respectivas atribuições.

Compritol ATO 888	Composto							Atribuição
	Tween 20	Tween 80	Óleo de rícino	Curcumina	CLN <sub>Branca</sub> B	Mistura Física B	CLNB	
3441	3426	3464	3410	3507	3472	3450, 3491	3466	vOH
2914	2920	2922	3009, 2924	2972, 2945	2914	2953, 2916	2953, 2914	v <sub>as</sub> CH
2849	2860	2857	2855	2845	2848	2849	2849	v <sub>s</sub> CH
1736	1734	1734	1744	-	1738	1736	1736	vC=O
-	1646	1641	1656	-	1641	1655	1657	vC=O
-	-	-	-	1626	-	1639	1641	vC=O + vC=C
-	-	-	-	1600	-	-	-	vC-C aromático
-	-	-	-	1504	-	1513	1514	vC=O + δCCC + δC=O no plano
1466	1458	1458	1460	1456	1464	1464	1472	δCH (CH <sub>2</sub> alcano)
-	-	-	-	1273	-	1254	1254	vCO (aromático)
1172	-	-	1163	-	-	1178	1178	vCO
-	1094	1096	-	-	1100	1101	1099	vCOC
-	-	-	-	960	-	943	947	vC=O + δno plano CCH
719	721	723	723	-	719	-	-	Rocking CH <sub>2</sub>
-	-	-	-	714	-	719	718	δno plano do esqueleto CCH e aromático CCH + vC=C

Fonte: Compritol ATO 888 (JAGDALE et al., 2011); Tween 20 (ORTIZ-TAFOYA; TECANTE, 2018); Óleo de rícino (LI; NIU; LU, 2017); Curcumina (MOHAN et al., 2012a)

Figura 5. Espectro vibracional na região do infravermelho do compritol, óleo de óleo de rícino, Tween 20, Tween 80, curcumina, CLN<sub>Branca B</sub>, mistura física B e CLN B.



A análise dos espectros no IV da curcumina livre, CLN<sub>Branca B</sub>, mistura física B e CLN B permitiu obter informações relevantes a respeito da interação entre a curcumina e os constituintes do sistema. Assim para o CLN<sub>Branco A</sub> observa-se que o espectro da CLN<sub>Branca B</sub> se diferencia da mistura física B e CLN B apenas na ausência das bandas atribuídas a curcumina. E ao comparar os espectros da mistura física B e CLN B, é possível inferir que se obteve uma mistura física e não interações químicas entre a curcumina e os constituintes do carreador, pois, não foi possível diagnosticar deslocamentos significativos nos picos e nem o aparecimento de novos picos. SAEDI et al., 2018 realizaram um estudo contendo curcumina também incorporada em um carreador lipídico nanoestruturado, no qual os espectros de FTIR não apresentaram deslocamentos que são indícios de reação química, mostrando apenas interações físicas, assim como no presente estudo.

#### 4.8. ESPECTROSCOPIA RAMAN NORMAL (RN)

O espectro de Raman da curcumina é apresentado na Figura 13 e as respectivas atribuições estão contidas na Tabela 13. Estudos sugeriram que a curcumina existe na forma enol em vez da forma dicetona (S, 2002). Isto é indicado pela ausência de (C=O) picos na região de 1650-1800  $\text{cm}^{-1}$  em nossos estudos. As bandas que correspondem a  $\nu(\text{C}=\text{C})$  e  $\nu(\text{C}=\text{O})$  parecem estar sobrepostas a 1626  $\text{cm}^{-1}$ , tendo sido reduzidas dos seus valores normais por conjugação. Esta banda com caráter misto  $\nu(\text{C}=\text{C})$  e  $\nu(\text{C}=\text{O})$  foi selecionada para análise no presente estudo. Outra banda forte, a 1601  $\text{cm}^{-1}$  devido às vibrações do anel aromático  $\nu(\text{C}\text{-Canel})$ , também foi selecionada para estudar a incorporação da curcumina nos sistemas lipídicos.

As Figuras 14 e 15 apresentam os espectros de Raman das formulações brancas ( $\text{CLN}_{\text{Branca A}}$  e  $\text{CLN}_{\text{Branca B}}$ ) comparadas as suas respectivas formulações contendo a curcumina ( $\text{CLN A}$  e  $\text{CLN B}$ ). Analisando ambas as figuras 14 e 15 é possível observar bandas em 1632 e 1630  $\text{cm}^{-1}$  nos espectros da  $\text{CLN A}$  e  $\text{CLN B}$ , respectivamente, que não são observadas nos espectros da  $\text{CLN}_{\text{Branca A}}$  e  $\text{CLN}_{\text{Branca B}}$ , e que são atribuídas aos modos vibracionais  $\nu(\text{C}=\text{C})$  e  $\nu(\text{C}=\text{O})$ . Observou-se ainda bandas em 1603 e 1602  $\text{cm}^{-1}$  nos espectros de Raman da  $\text{CLN A}$  e  $\text{CLN B}$ , respectivamente, sendo essas atribuídas ao modo vibracional do anel aromático  $\nu(\text{C}\text{-Canel})$ . A presença dessas bandas (região de 1630 e região de 1600  $\text{cm}^{-1}$ ) são características da forma enólica da curcumina, o que nos permite inferir que a molécula está presente em ambos os sistemas lipídicos ( $\text{CLN A}$  e  $\text{CLN B}$ ).

Figura 6. Espectro de Raman da curcumina

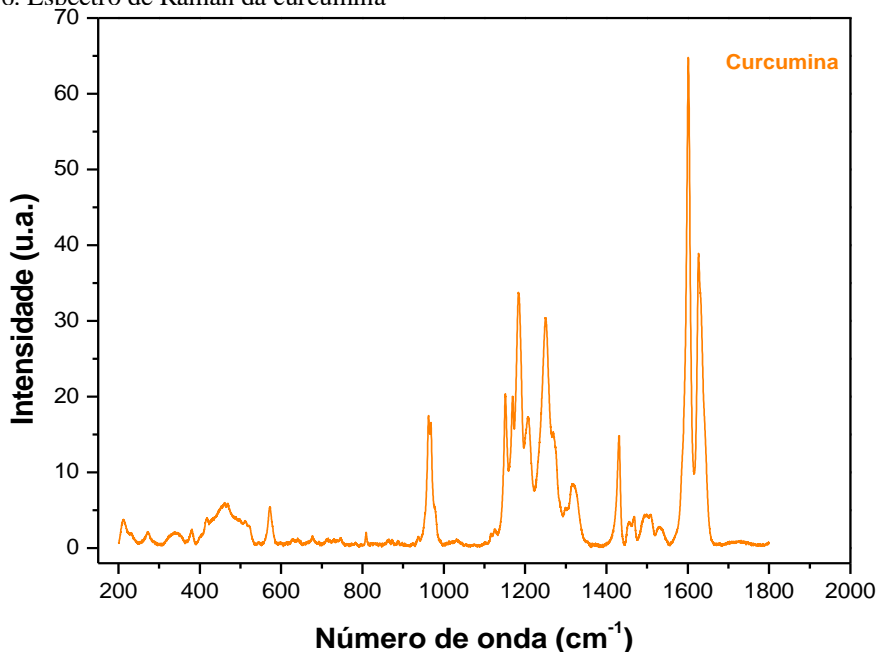


Figura 7. Espectros de Raman da CLNBranca A e CLN A.

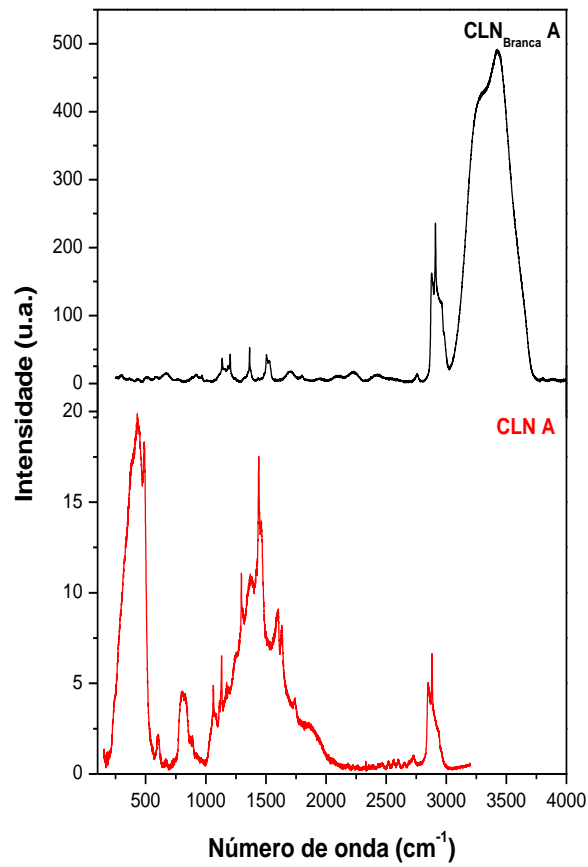


Figura 8. Espectros de Raman da CLNBranca B e CLN B.

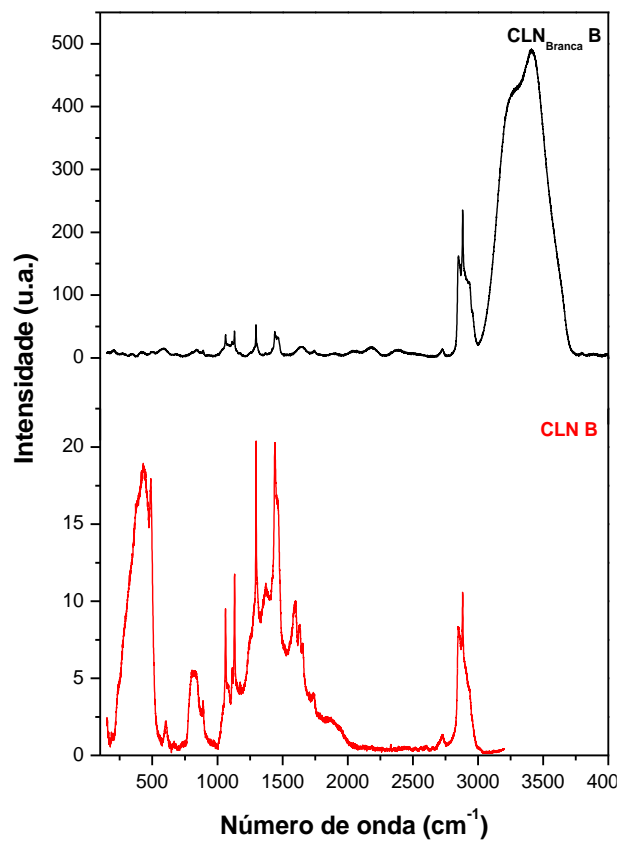


Tabela 33. Atribuições dos modos vibracionais de espectros de Raman da curcumina, da CLN A e CLN B.

Compostos			Atribuição
Curcumina	CLN A	CLN B	
1626	1632	1630	$\nu\text{C}=\text{C} + \nu\text{C}=\text{O}$
1601	1603	1602	$\nu\text{C}=\text{C}$ (aromático)
1430	1439	1435	$\delta(\text{CCC})$ , $\delta(\text{CCH})$ e $\delta(\text{C-OH})$ dos anéis aromáticos
1316	-	-	$\delta(\text{CCH})$
1249	1245	1242	$\delta\text{CH}$ dos anéis aromáticos + $\nu\text{CO}$ dos grupos éter ligado aos anéis
1151	-	-	$\delta(\text{CCH})$ dos anéis aromáticos e $\delta(\text{C-OH})$ do grupo enólico acoplado a $\delta(\text{C}=\text{CH})$ na cadeia inter-anéis

MOHAN et al., 2012b estudaram a caracterização de complexos de ciclodextrinas contendo curcumina e observaram as mesmas bandas referentes a curcumina nos espectros de Raman, entretanto, os autores observaram um deslocamento dessas bandas, o que permitiu os mesmos inferirem que a curcumina formou um complexo com a ciclodextrina.

#### 4.4. CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

Os termogramas obtidos com a análise de DSC fornecem informações quantitativas e qualitativas, ao analisar processos endotérmico e exotérmicos, acerca do comportamento térmico dos analitos. Desta forma, obtém-se variações de entalpia que, por meio destas, pode-

se avaliar o padrão estrutural de CLN (DE SOUZA et al., 2012; WENDLANDT, 1974). Os resultados obtidos representando a temperatura do evento endotérmico e da variação de entalpia ( $\Delta H$ ) dos componentes separados encontram-se na tabela 14.

Tabela 14. Relação de amostra e seus respectivos pontos de fusão e variações de entalpia  $\Delta H$ . \*Curvas de degradação

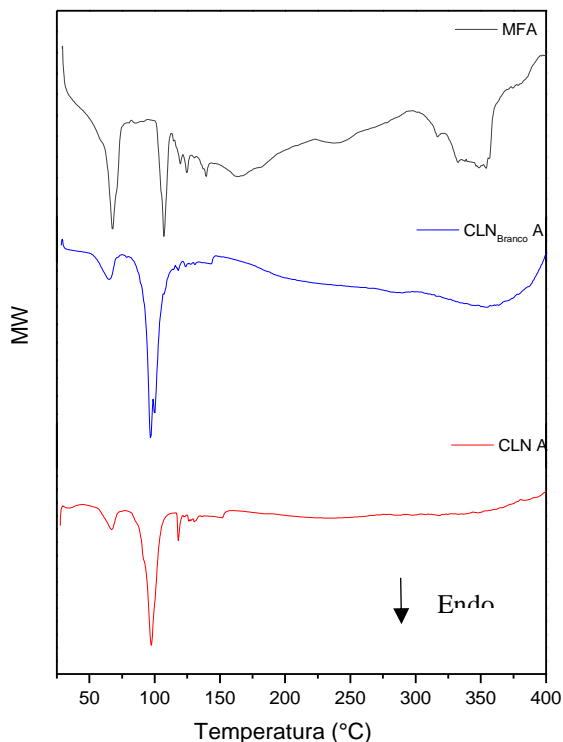
<b>Amostra</b>	<b>T<sub>pico</sub>/°C</b>	<b><math>\Delta H</math> (J/g)</b>
Compritol ATO 888	73,5	95,05
MCT	219; 229; 238; 252 *	7,49; 3,6; 3,18; 4,07
Óleo de rícino	390; 397 *	2,31; 7,70
Tween 20	80,67	49,51
Tween 80	129	34,60
Curcumina	173,18	103,88

O Compritol ATO 888 apresentou evento endotérmico a 73,5 °C, correspondente ao ponto de fusão do composto. Resultado similar pode ser observado RAHMAN; ZIDAN; KHAN, 2010, no qual o termograma apresentou evento endotérmico a 72,88 °C confirmando a forma  $\beta'$  estável do composto, perfil similar foi apresentado por PASSERINI et al., 2010, em que o evento endotérmico ocorreu a 71,2 °C. Esta pequena diferença pode ser devida ao rearranjo na estrutura cristalina resultando formas polimórficas mais estáveis, por isso o analito apresentou forma mais resistente do que o presente na literatura (DA SILVA; ESCOBEDO; GIOIELLI, 2008).

Referente à curcumina, foi observado um evento endotérmico a 173,18°C, resultado similar ao observado pelos estudos de MADANE; MAHAJAN, 2016 e SANGSEN et al., 2014, em que obtiveram eventos endotérmicos a 175 °C e 173 °C, respectivamente. Tween 20 e 80 apresentaram termogramas similares aos estudos de GIRDTHEP et al., 2011; SINGH et al., 2017. Os demais componentes apresentaram eventos endotérmicos de degradação referentes à temperatura informada pelo fornecedor, comprovando que todos os componentes utilizados para o desenvolvimento dos CLN apresentaram comportamento térmico similar ao descrito, o que comprova a qualidade destes. Concomitantemente, foi realizada a análise das misturas físicas, dos CLN<sub>Branco</sub> e dos CLN A e B, os resultados estão expressos nas Figuras 16 e 17, respectivamente contendo os termogramas.

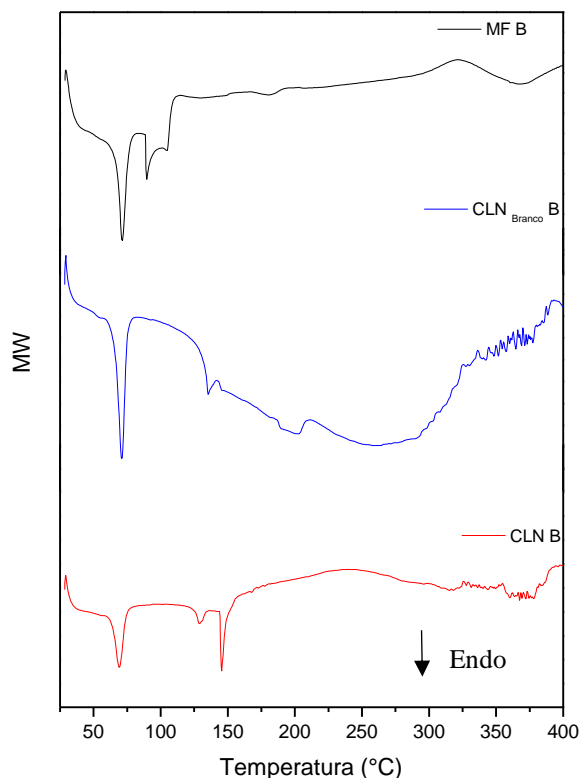


Figura 9. Termogramas obtidos da Mistura Física A (MFA), CLN Branco A e do CLN A.



Como pode ser observado pelos termogramas reunidos na figura 16, todos os componentes apresentaram mais de um evento endotérmico. Tal comportamento é citado por BOTTOM, 1999 como indício de desarranjo na estrutura. A característica amorfa é desejada tendo em vista que a mesma é relacionada a menor perda de fármaco durante o tempo de armazenamento, conferindo maior estabilidade a estrutura (IQBAL et al., 2012). Comparado MFA, os CLN<sub>Branco</sub> e CLN A apresentaram e apenas evento endotérmico pronunciado e similar de 96,7 °C e 97,21 °C, respectivamente, demonstrando que há uma distribuição homogênea da matriz lipídica (CHEN; REMONDETTO; SUBIRADE, 2006; DE SOUZA et al., 2012). Pode ser observado ainda a presença de um pico presente MFA e CLN A a 112 °C e 118 °C, respectivamente que correspondem a curcumina. O deslocamento do evento de 173°C para 112°C e 118°C, assim como o alargamento das curvas em CLN<sub>Branco</sub> e CLN A são indício de polimorfismo estrutural das nanopartículas e também refere-se ao aumento da superfície de contato presente em estruturas de tamanho nanométrico (BARBOSA, 2013; DOKTOROVOVA; SOUTO; SILVA, 2014; SIEKMANN; WESTESEN, 1994). Os resultados obtidos com a análise calorimétrica dos componentes MFB, CLN<sub>Branco</sub> B e CLNB estão representados na figura 17.

Figura 10. Termogramas obtidos da Mistura Física B (MFB), CLN<sub>Branco</sub> B e do CLN B



Ao observar a curva de MFB observa a presença clara da mistura lipídica com o evento endotérmico a 71,52 °C e do Tween 20 a 89 °C, demonstrando que a mistura não foi homogênea (BARBOSA, 2013; DE SOUZA et al., 2012). Contudo, este perfil não foi observado nas curvas de CLN<sub>Branco</sub> B e CLN B, os quais apresentaram mais de um evento endotérmico e alargamento da banda característica, assim como o citado anteriormente, de misturas homogêneas e amorfas. Separadamente, CLN<sub>Branco</sub> B apresenta uma curva a 70,8 °C respectivo a mistura da fase lipídica e um a 135 °C atribuído ao Tween 80 presente nesta formulação. Eventos similares foram observados em CLN B, com exceção do evento observado a 145 °C respectivo a curcumina e apresentando desvio a esquerda comparado a curva da mesma isolada (173 °C), representando que ela se encontra dispersa na estrutura (BARBOSA, 2013). Desta forma, observa-se por meio das curvas de DSC que os CLN desenvolvidos apresentaram estrutura amorfa com curcumina dispersa nos mesmos.

#### 4.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) representa um importante recurso para visualizar a morfologia e possíveis dispersões de fármaco em nanoestruturas, parâmetros que

determinam o perfil de interação biológica assim como abortado anteriormente. Desta forma, tal método foi utilizado para realizar micrografias com intuito de averiguar o diâmetro real das partículas – tendo em vista que o DH medido considera a camada de solvatação – assim como a morfologia, dispersão da curcumina e polidispersão. Os resultados de micrografia podem ser observados nas figuras 18 e 19 para o CLN A e CLN B, respectivamente.

Figura 11. Micrografia do CLN A, magnificação de A) 15k, e B) 5k, assim como a C) distribuição calculada baseando nas imagens.

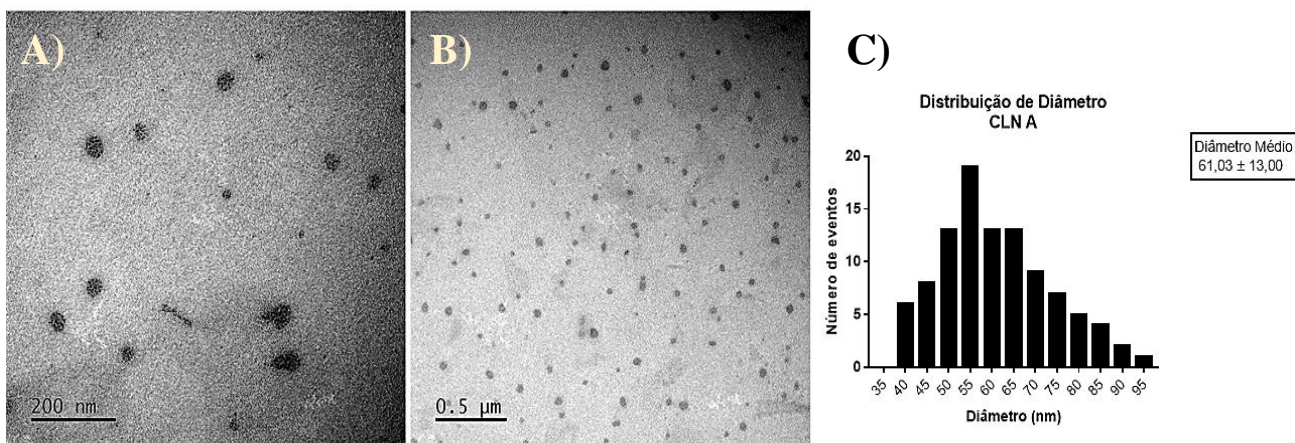
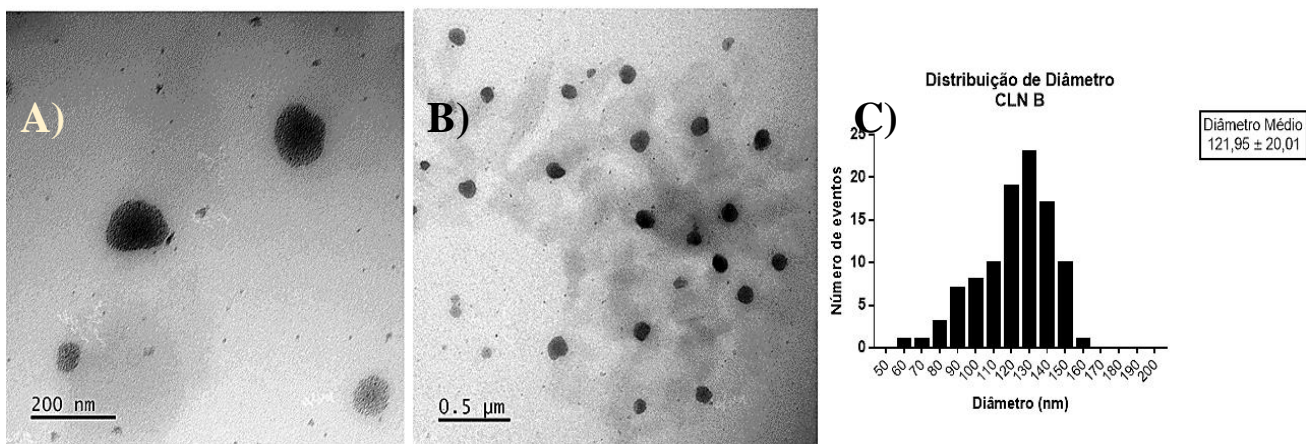


Figura 12. Micrografia do CLN B, magnificação de A) 15k, e B) 5k, assim como a C) distribuição calculada baseando nas imagens.



Com a micrografia de CLN A, figura 18, é observado presença de estruturas arredondadas, como pode ser observado na magnificação de 5 kx, o sistema apresenta-se monodisperso tendo em vista o gráfico de distribuição atribuído às imagens. Observa-se diâmetro médio de 61 nm ± 13, 131 nm a menos observado pelo DH, resultado similar pode

ser observado pelo estudo de HAN et al., 2008, em que CLN desenvolvido com Tween 80 apresentaram DH de 190 nm e diâmetro em MET entre 50 e 100 nm. Observa-se também que no centro da estrutura, foi apresentado pequenos pontos mais eletrodensos que o restante da estrutura em si, desta forma e considerando as informações de FTIR-ATR, RAMAN e DSC. Estima-se que tal estrutura é do tipo amorfo (tipo II) na qual não há formação de cristais e onde a curcumina está completamente dispersa.

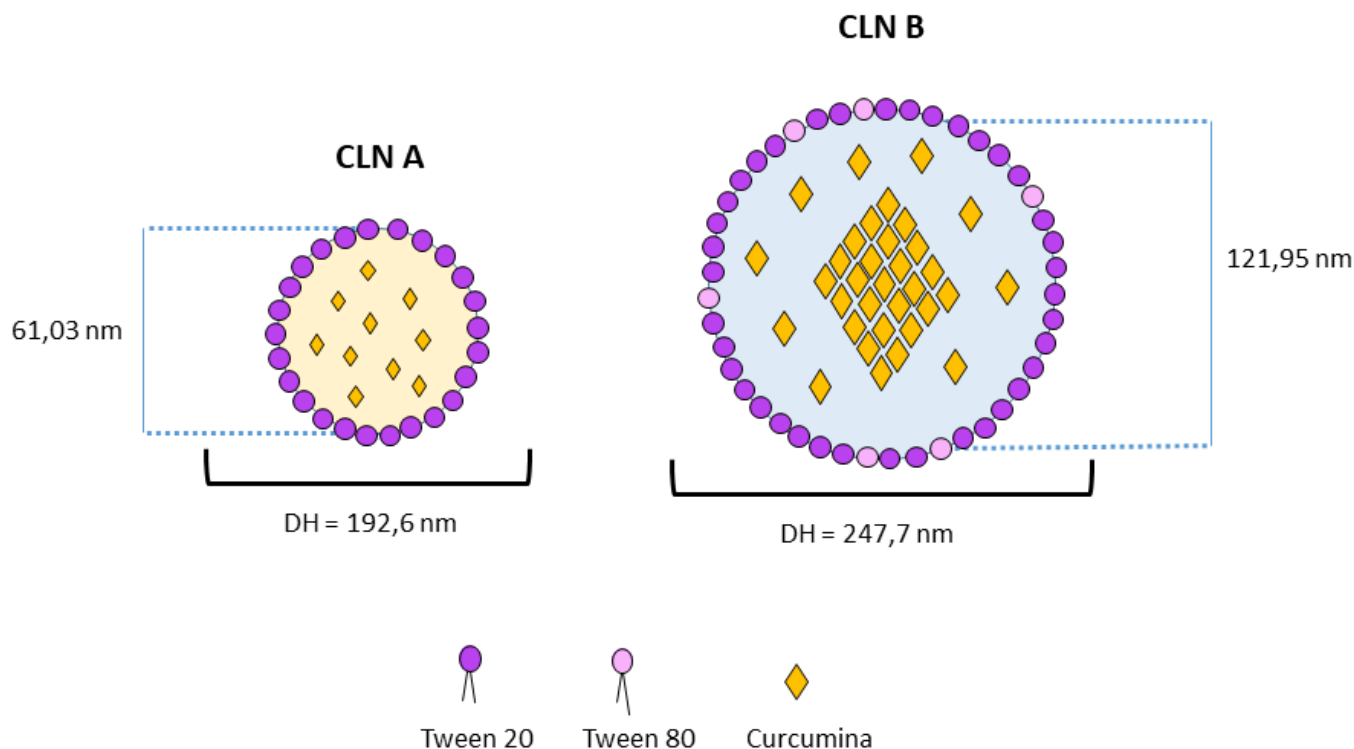
Quanto ao CLN B, observa-se uma estrutura maior em comparação com CLN A, possuindo diâmetro médio de  $121,6 \pm 20,01$  nm, 126 nm de diferença em relação ao DH. Em magnificação de 15k é observada a presença de um centro mais eletrodense em comparação ao restante da estrutura. Desta forma, levando em consideração o estudo espectroscópico e de entalpia, estima-se que a estrutura é amorfa com o modelo de concentração de fármaco em núcleo, em que o mesmo se acumula no centro da estrutura.

Tanto CLN A como B, não apresentaram em suas micrografias formas cúbicas ou em bastões, correspondentes a transição polimórfica  $\beta$ , assim como o esperado para CLN (BUNJES, 2011). Tais resultados corroboram também com o perfil de liberação obtido de CLN A e B, tendo em vista que os dois tipos de estruturas apresentados liberam gradativamente o fármaco (SHAH; IMRAN; ULLAH, 2017; DAS; CHAUDHURY, 2011; DRAGICEVIC; MAIBACH, 2016).

Considerando que a forma da partícula afeta a circulação sanguínea, a habilidade de transporte, afinidade e internalização por células, a forma do carreador é outra propriedade importante que interfere em processos biológicos relacionados a atividade terapêutica de nanocarreadores (GERA et al., 2017). De acordo com o revisado por GERA et al., 2017, partículas esferoidais favorecem a circulação no sangue devido à menor captação delas por macrófagos o que conseqüentemente aumenta o período de residência da partícula na circulação sanguínea. Desta forma, tanto CLN A como B apresentam características interessantes também para administração parenteral.

A representação esquemática das nanoestruturas formadas (CLN A e CLN B), assim como os componentes e suas disposições nas estruturas, encontram-se representados na Figura 20.

Figura 20. Representação das nanoestruturas formadas (CLN A e CLN B), resultados de diâmetro hidrodinâmico (DH), diâmetro obtido por MET, componentes utilizados e suas respectivas disposições nas estruturas.



## 5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com o presente trabalho permitiram concluir que:

- Para as composições testadas o método de temperatura de inversão de fase com adição súbita de água e homogeneização a quente por cisalhamento com Turrax foi método que obteve maior sucesso na obtenção de CLN com menor DH e IPD;
- Matrizes lipídicas com Compritol ATO 888 e MCT e Compritol ATO 888 e óleo de rícino permitiram obter CLN com DH menores em relação ao Compritol ATO 888 e Polymol<sup>®</sup> ADB;
- Aumento de SOR em matrizes lipídicas de Compritol ATO 888 e MCT e Compritol ATO 888 e óleo de rícino demonstraram correlação positiva com aumento do DH;
- O aumento da rotação com Turrax proporcionou formação de CLN com DH menor;

- A mistura de Poloxamer 407 e Tween 20 permitiram formação de CLN com baixo IPD, porém com DH relativamente alto;
- A adição de Tween 80 proporcionou a redução de DH da CLN composta por Compritol ATO 888 e óleo de rícino;
- A incorporação de curcumina favoreceu a formação de DH diferentes em relação aos seus equivalentes sem o fármaco;
- As amostras formadas apresentaram-se translúcidas e amareladas após a incorporação da curcumina, ausente de agregados ou sedimentos;
- Os DH e IPD apresentaram-se semelhantes ou superiores aos estudos de desenvolvimento de CLN por métodos de alta energia e/ou por homogeneização com alta pressão;
- CLN A e B apresentaram-se estáveis até 120 dias testados à 4°C e T.A., e até 30 dias a 37 °C;
- Não foi observada formação de agregados ou variações significativas de DH dos CLN formados no presente estudo após a incubação dos mesmos em meio de cultivo a 37°C e após a diluição em tampões com diferentes pH;
- A eficiência de encapsulação das amostras desenvolvidas apresentou-se superior a de outros estudos com curcumina incorporada em outros nanocarreadores e até mesmo outros CLN;
- CLN A e B apresentaram capacidade superior de retenção do fármaco, como pôde ser observado pelo estudo de liberação;
- Espectros de FTIR-ATR e Raman, sugeriram que não houve formação de ligações químicas ao incorporar a curcumina no CLN, a mesma permanece na estrutura por interações físicas;
- Os termogramas permitiram observar que os CLN formados apresentaram estruturas amorfas, o que é esperado por nanocarreadores deste tipo;
- As micrografias obtidas por microscopia de força atômica (MET) permitiram observar que os CLN desenvolvidos no estudo são estruturas arredondadas e monodispersas;

- As micrografias correlacionadas com espectros de Raman e FTIR-ATR, com os termogramas e o perfil de liberação permitiram aferir que CLN A é do tipo amorfo (tipo II) na qual não há formação de cristais e onde a curcumina está completamente dispersa. Enquanto CLN B, é do tipo amorfo com o modelo de concentração de fármaco em núcleo, onde o mesmo se acumula no centro da estrutura.

Os resultados obtidos sugerem que foi possível obter CLN com baixo custo de produção e com características físico-químicas similares ou superiores a CLN desenvolvidos por métodos de alta energia. Com características físico-químicas compatíveis com diversas vias de administração, podendo ser utilizados para veiculação de curcumina até mesmo por via parenteral.

## 6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ADITYA, N. P. et al. Curcumin and genistein coloaded nanostructured lipid carriers: In vitro digestion and antiprostata cancer activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 8, p. 1878–1883, 2013.

ADITYA, N. P. et al. Development and evaluation of lipid nanocarriers for quercetin delivery: A comparative study of solid lipid nanoparticles (SLN), nanostructured lipid carriers (NLC), and lipid nanoemulsions (LNE). **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 1, p. 115–121, 2014.

ANTONOW, M. B. et al. Liquid formulation containing doxorubicin-loaded lipid-core nanocapsules: Cytotoxicity in human breast cancer cell line and in vitro uptake mechanism. **Materials Science and Engineering C**, v. 76, p. 374–382, 2017.

BAEK, J.-S.; CHO, C.-W. A multifunctional lipid nanoparticle for co-delivery of paclitaxel and curcumin for targeted delivery and enhanced cytotoxicity in multidrug resistant breast cancer cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 18, p. 30369–30382, 2017.

BAMRUNGSAP, S. et al. Nanotechnology in therapeutics: A focus on nanoparticles as a drug delivery system. **Nanomedicine**, v. 7, n. 8, p. 1253–1271, 2012.

BARBOSA, R. Preparo e caracterização de nanopartículas lipídicas como carreadores do anestésico local dibucaína. p. 203, 2013.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, 2016.

BOTTOM, R. The role of modulated temperature differential scanning calorimetry in the characterisation of a drug molecule exhibiting polymorphic and glass forming tendencies. **International Journal of Pharmaceutics**, 1999.

BUNJES, H. Current Opinion in Colloid & Interface Science Structural properties of solid lipid based colloidal drug delivery systems. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 16, n. 5, p. 405–411, 2011.

BUNJES, H.; KOCH, M. H. J.; WESTESEN, K. <Influence of Emulsifiers on the Crystallization.pdf>. v. 92, n. 7, p. 1509–1520, 2003.

CAMPOS, J.; VARAS-GODOY, M.; HAIDAR, Z. S. Physicochemical characterization of chitosan-hyaluronan-coated solid lipid nanoparticles for the targeted delivery of paclitaxel:



A proof-of-concept study in breast cancer cells. **Nanomedicine**, v. 12, n. 5, p. 473–490, 2017.

CARBONE, C. et al. Preparation and optimization of PIT solid lipid nanoparticles via statistical factorial design. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 110–117, 2012.

CHANBUREE, S.; TIYABOONCHAI, W. Mucoadhesive nanostructured lipid carriers (NLCs) as potential carriers for improving oral delivery of curcumin. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 43, n. 3, p. 432–440, 2017.

CHEN, L.; REMONDETTO, G. E.; SUBIRADE, M. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, n. 5, p. 272–283, 2006.

CHEN, P. et al. Development of curcumin loaded nanostructured lipid carrier based thermosensitive in situ gel for dermal delivery. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 506, p. 356–362, 2016a.

CHEN, Y. et al. Nanostructured lipid carriers enhance the bioavailability and brain cancer inhibitory efficacy of curcumin both in vitro and in vivo. **Drug Delivery**, v. 23, n. 4, p. 1383–1392, 2016b.

CONTROLLED, L. F. O. R. United States Patent ( 19 ) 11 Patent Number : Attorney , Agent , or Firm-Kilpatrick. n. 19, 1993.

DA SILVA, R. C.; ESCOBEDO, J. P.; GIOIELLI, L. A. Crystallization behavior of structured lipids by chemical interesterification of lard and soybean oil. **Quimica Nova**, v. 31, n. 2, p. 330–335, 2008.

DAS, S.; CHAUDHURY, A. Recent Advances in Lipid Nanoparticle Formulations with Solid Matrix for Oral Drug Delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 1, p. 62–76, 2011.

DE SOUZA, A. L. R. et al. Loading of praziquantel in the crystal lattice of solid lipid nanoparticles: Studies by DSC and SAXS. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 108, n. 1, p. 353–360, 2012.

DIOGO, J. C. F. et al. Viscosity measurements of compressed liquid dipropyl and dibutyl adipates. **Fluid Phase Equilibria**, v. 395, p. 26–32, 2015.

DOKTOROVOVA, S.; SOUTO, E. B.; SILVA, A. M. Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers - A systematic review of in vitro data. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 87, n. 1, p. 1–18, 2014.

DRAGICEVIC, N.; MAIBACH, H. I. **Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement Modification of the Stratum Corneum**. [s.l: s.n.].

DUMORTIER, G. et al. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 12, p. 2709–2728, 2006.

DURÁN, N.; MARCATO, P. D. Nanobiotechnology perspectives. Role of nanotechnology in the food industry: A review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 6, p. 1127–1134, 2013.

EHUD, G. Bionanotechnology nanobiotechnology. **Imperial College Press**, p. 1–3, 2007.

EL-SALAMOUNI, N. S. et al. Effect of sterilization on the physical stability of brimonidine-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 496, n. 2, p. 976–983, 2015.

FACHINETTI, N. et al. Comparative Study of Glyceryl Behenate or Polyoxyethylene 40 Stearate-Based Lipid Carriers for Trans-Resveratrol Delivery: Development, Characterization and Evaluation of the In Vitro Tyrosinase Inhibition. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 3, p. 1401–1409, 2018.

FARIA-TISCHER, P. C. S.; TISCHER, C. A. Nanobiotecnologia: plataforma tecnológica para biomateriais e aplicação biológica de nanoestruturas. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 1, p. 32–53, 2012.

FAROKHZAD, O. C. Nanotechnology for drug delivery: the perfect partnership. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 5, n. 9, p. 927–929, 2008.

FATHI, M.; VARSHOSAZ, J. Novel hesperetin loaded nanocarriers for food fortification: Production and characterization. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 3, p. 1382–1391, 2013.

FREIRE, A. C. et al. Liberação específica de fármacos para administração no cólon por via oral. I - O cólon como local de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, p. 319–335, 2006.

FREITAS, C.; MULLER, R. H. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN) dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 168, n. 2, p. 221–229, 1998.

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

GIRDTHEP, S. et al. Effect of Tween 80 on the Mechanical and Thermal Properties of Solution-Cast Blends of Poly ( lactic acid ) and Cellulose Acetate Butyrate Films. **International Conference on Chemistry and Chemical Process**, v. 10, p. 95–100, 2011.

GOMES, G. V. L. et al. Physico-chemical stability and in vitro digestibility of beta-

carotene-loaded lipid nanoparticles of cupuacu butter (*Theobroma grandiflorum*) produced by the phase inversion temperature (PIT) method. **Journal of Food Engineering**, v. 192, p. 93–102, 2017.

GONÇALEZ, M. L. et al. Curcumin-loaded cationic solid lipid nanoparticles as a potential platform for the treatment of skin disorders. **Die Pharmazie**, v. 72, n. 12, p. 721–727, 2017.

GÓRSKI, K. Nanobiotechnology in reproduction – pros and cons . A review. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 24, p. 179–192, 2015.

HAJJ ALI, H. et al. Shea butter solid nanoparticles for curcumin encapsulation: Influence of nanoparticles size on drug loading. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 118, n. 8, p. 1168–1178, 2016.

HAN, F. et al. Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: Nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 315, n. 1–3, p. 210–216, 2008.

HARDE, H.; DAS, M.; JAIN, S. Solid lipid nanoparticles: an oral bioavailability enhancer vehicle. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 8, n. 11, p. 1407–1424, 2011.

HELGASON, T. et al. Effect of surfactant surface coverage on formation of solid lipid nanoparticles (SLN). **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 334, n. 1, p. 75–81, 2009.

HUANG, Z. R. et al. Development and evaluation of lipid nanoparticles for camptothecin delivery: A comparison of solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers, and lipid emulsion. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 29, n. 9, p. 1094–1102, 2008.

IQBAL, M. A. et al. Nanostructured lipid carriers system: Recent advances in drug delivery. **Journal of Drug Targeting**, v. 20, n. 10, p. 813–830, 2012.

JAGDALE, S. C. et al. Preparation and Characterization of Metformin Hydrochloride – Compritol 888 ATO Solid Dispersion. **Journal of Young Pharmacists**, v. 3, n. 3, p. 197–204, 2011.

JAISWAL, P.; GIDWANI, B.; VYAS, A. Nanostructured lipid carriers and their current application in targeted drug delivery. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 27–40, 2016.

JENNING, V.; GOHLA, S. Comparison of wax and glyceride solid lipid nanoparticles. v. 196, p. 219–222, 2000.

JENNING, V.; LIPPACHER, A.; GOHLA, S. H. Medium scale production of solid lipid nanoparticles ( SLN ) by high pressure homogenization. v. 19, n. 1, p. 1–10, 2002.

JORES, K. et al. From solid lipid nanoparticles (SLN) to nanospoons. Visions and reality of colloidal lipid dispersions. **30th International Symposium on Controlled Release of Bioactive material**, n. figure 1, p. 1–2, 2003.

KHAN, M. et al. Nanobiotechnology and its applications in drug delivery system: a review. **IET Nanobiotechnology**, v. 9, n. 6, p. 396–400, 2015.

KIEFER, J. et al. Infrared spectroscopy of bilberry extract water-in-oil emulsions: Sensing the Water-Oil Interface. **Biosensors**, v. 6, n. 2, p. 1–11, 2016.

KOCKISCH, S. et al. Polymeric microspheres for drug delivery to the oral cavity: An in vitro evaluation of mucoadhesive potential. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, n. 8, p. 1614–1623, 2003.

KOLEV, T. M. et al. DFT and experimental studies of the structure and vibrational spectra of curcumin. **International Journal of Quantum Chemistry**, v. 102, n. 6, p. 1069–1079, 2005.

KOVACEVIC, A. et al. Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): Effects on size, physical stability and particle matrix structure. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 406, n. 1–2, p. 163–172, 2011.

LI, H.; NIU, S.; LU, C. Pyrolysis Characteristics of Castor Oil through Thermogravimetric Coupled with Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **Procedia Engineering**, v. 205, p. 3705–3710, 2017.

MADANE, R. G.; MAHAJAN, H. S. Curcumin-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) for nasal administration: design, characterization, and in vivo study. **Drug Delivery**, v. 23, n. 4, p. 1326–1334, 2016.

MAHESHWARI, R. K. et al. Multiple biological activities of curcumin: A short review. **Life Sciences**, v. 78, n. 18, p. 2081–2087, 2006.

MARÍA, V. C. et al. Ph de la superficie luminal de la mucosa gastrointestinal de crías de alpacas durante las primeras semanas de edad. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru**, v. 23, n. 1, p. 20–26, 2012.

MARTEN, B.; PFEUFFER, M.; SCHREZENMEIR, J. Medium-chain triglycerides. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 11, p. 1374–1382, 2006.

MOHAN, P. R. K. et al. Water soluble complexes of curcumin with cyclodextrins: Characterization by FT-Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 62, p. 77–84, 2012a.

MOHAN, P. R. K. et al. Water soluble complexes of curcumin with cyclodextrins:

Characterization by FT-Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 62, p. 77–84, 2012b.

MOORE, T. L. et al. Chem Soc Rev media and impact on cellular interactions †. p. 6287–6305, 2015.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. SUPPL., p. 131–155, 2002.

NAKSURIYA, O. et al. Curcumin nanoformulations: A review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment. **Biomaterials**, v. 35, n. 10, p. 3365–3383, 2014.

NASERI, N.; VALIZADEH, H.; ZAKERI-MILANI, P. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Structure preparation and application. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 5, n. 3, p. 305–313, 2015.

NICOLAU, D. . et al. Nanotechnology at the crossroads: the hard or the soft way? **Microelectronics Journal**, v. 31, n. 7, p. 611–616, 2000.

NO, C. A. S. NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM TOXICOLOGY AND CARCINOGENESIS STUDIES OF TURMERIC OLEORESIN IN F344/N RATS AND B6C3F t MICE. n. 427, [s.d.].

NOORAFSHAN, A.; ASHKANI-ESFAHANI, S. A Review of Therapeutic Effects of Curcumin. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 11, p. 2032–2046, 2013.

OCHEKPE, N. A.; OLORUNFEMI, P. O.; NGWULUKA, N. C. Nanotechnology and drug delivery part 2: Nanostructures for drug delivery. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 3, p. 275–287, 2009.

OIL, H. P. et al. Characterization and Cytotoxicity of Nanostructured Lipid Carriers Formulated With Olive Oil ., v. 12, n. 2, p. 72–78, 2013.

OLIVEIRA, C. P. et al. An algorithm to determine the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulations. **Soft Matter**, v. 9, n. 4, p. 1141–1150, 2013.

OLIVEIRA, C. P. et al. Bromelain-Functionalized Multiple-Wall Lipid-Core Nanocapsules: Formulation, Chemical Structure and Antiproliferative Effect Against Human Breast Cancer Cells (MCF-7). **Pharmaceutical Research**, v. 34, n. 2, p. 438–452, 2017.

ORTIZ-TAFOYA, M. C.; TECANTE, A. Physicochemical characterization of sodium stearyl lactylate (SSL), polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20) and  $\kappa$ -carrageenan. **Data in Brief**, v. 19, p. 642–650, 2018.

PASSERINI, N. et al. Solid lipid microparticles produced by spray congealing: Influence of the atomizer on microparticle characteristics and mathematical modeling of the drug release. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2010.

PEZESHKI, A. et al. Encapsulation of vitamin A palmitate in nanostructured lipid carrier (NLC)-effect of surfactant concentration on the formulation properties. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 4, n. Suppl 2, p. 563–568, 2014.

PUGLIA, C. et al. Curcumin loaded NLC induces histone hypoacetylation in the CNS after intraperitoneal administration in mice. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, n. 2, p. 288–293, 2012.

RAHMAN, Z.; ZIDAN, A. S.; KHAN, M. A. Non-destructive methods of characterization of risperidone solid lipid nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, n. 1, p. 127–137, 2010.

RAMSEWAK, R. S.; DEWITT, D. L.; NAIR, M. G. Cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of curcumins I-III from *Curcuma longa*. **Phytomedicine**, v. 7, n. 4, p. 303–308, 2000.

RESORT, K.; HP, S. Impact of Nanotechnology on Drug Discovery & Development *Pharmanext*. v. 3, n. 1, p. 16–20, [s.d.].

S, W. J. Predicting the antioxidant activity of curcumin and curcuminoids. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 591, n. 1–3, p. 207–217, 2002.

SAEDI, A. et al. Preparation and Characterization of Nanostructured Lipid Carriers as Drug Delivery System: Influence of Liquid Lipid Types on Loading and Cytotoxicity. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 216, n. September, p. 65–72, 2018.

SAFWAT, S. et al. Nanostructured lipid carriers loaded with simvastatin: effect of PEG/glycerides on characterization, stability, cellular uptake efficiency and in vitro cytotoxicity. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 43, n. 7, p. 1112–1125, 2017.

SANGSEN, Y. et al. Effect of Solid Lipid and Liquid Oil Ratios on Properties of Nanostructured Lipid Carriers for Oral Curcumin Delivery. **Advanced Materials Research**, v. 1060, p. 62–65, 2014.

SARKER, D. K. Engineering of Nanoemulsions for Drug Delivery. p. 297–310, 2005.

SATALKAR, P.; ELGER, B. S.; SHAW, D. M. Defining Nano, Nanotechnology and Nanomedicine: Why Should It Matter? **Science and Engineering Ethics**, v. 22, n. 5, p. 1255–1276, 2016.

SCHUBERT, M. A.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Characterisation of surface-modified

solid lipid nanoparticles (SLN): Influence of lecithin and nonionic emulsifier. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 61, n. 1–2, p. 77–86, 2005.

SCHWARZ, C. et al. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. **Journal of Controlled Release**, v. 30, n. 1, p. 83–96, 1994.

SELVAMUTHUKUMAR, S.; VELMURUGAN, R. Nanostructured lipid carriers: a potential drug carrier for cancer chemotherapy. **Lipids Health Dis**, v. 11, p. 159, 2012.

SHAH, K. A. et al. Solid lipid nanoparticles (SLN) of tretinoin: Potential in topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 345, n. 1–2, p. 163–171, 2007.

SHAH, M. R.; IMRAN, M.; ULLAH, S. **Lipid-Based Nanocarriers for Drug Delivery and Diagnosis**. [s.l: s.n.].

SIEKMANN, B.; WESTESEN, K. Thermoanalysis of the recrystallization process of melt-homogenized glyceride nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 3, n. 3, p. 159–175, 1994.

SILVA, A. C. et al. Long-term stability , biocompatibility and oral delivery potential of risperidone-loaded solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, n. 1–2, p. 798–805, 2012.

SINGH, S. M. et al. Effect of Polysorbate 20 and Polysorbate 80 on the Higher-Order Structure of a Monoclonal Antibody and Its Fab and Fc Fragments Probed Using 2D Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, n. 12, p. 3486–3498, 2017.

SOPPIMATH, K. S. , Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices, **J. Control. Release**, v. 70, p. 1–2, 2001.

SOUZA, P. C. DE; SILVA, P. B. Nanostructured lipid carriers for incorporation of copper ( II ) complexes to be used against Mycobacterium tuberculosis. p. 909–921, 2017.

SREEJAYAN; RAO, M. N. A. Curcuminoids as Potent Inhibitors of Lipid Peroxidation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, n. 12, p. 1013–1016, 1994.

SZNITOWSKA, M. et al. The effect of a lipid composition and a surfactant on the characteristics of the solid lipid microspheres and nanospheres (SLM and SLN). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 110, p. 24–30, 2017.

TIYABOONCHAI, W.; TUNGPRADIT, W.; PLIANBANGCHANG, P. Formulation and characterization of curcuminoids loaded solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 337, n. 1–2, p. 299–306, 2007.

UNER, M. Preparation, characterization and physico-chemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): their benefits as colloidal drug carrier systems. **Die Pharmazie**, v. 61, n. 5, p. 375–386, 2006.

WANG, L. et al. Design and optimization of a new self-nanoemulsifying drug delivery system. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 330, n. 2, p. 443–448, 2009.

WEBER, S.; ZIMMER, A.; PARDEIKE, J. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for pulmonary application: A review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 1, p. 7–22, 2014.

YUSUF, M. et al. Preparation, characterization, in vivo and biochemical evaluation of brain targeted Piperine solid lipid nanoparticles in an experimentally induced Alzheimer's disease model. **Journal of Drug Targeting**, v. 21, n. 3, p. 300–311, 2013.