



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA DE UM  
SISTEMA AUTO NANOEMULSIONÁVEL COM CURCUMINA**

**LAYLA SCHLICHTING**

Florianópolis  
Agosto/2022

**Layla Schlichting**

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA DE UM SISTEMA  
AUTO NANOEMULSIONÁVEL COM CURCUMINA**

Relatório apresentado ao Departamento de Química  
da Universidade Federal de Santa Catarina,  
como requisito parcial da disciplina de  
Estágio II (QMC 5512)



Documento assinado digitalmente

Alexandre Luis Parize

Data: 04/08/2022 18:56:22-0300

CPF: 027.543.499-01

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

**Prof. Dr. Alexandre Luis Parize**

LETICIA  
MAZZARINO:00423529080

Assinado de forma digital por  
LETICIA MAZZARINO:00423529080  
Dados: 2022.08.04 08:43:51 -03'00'

**Dra. Letícia Mazzarino**



Documento assinado digitalmente

Layla Schlichting

Data: 04/08/2022 18:54:29-0300

CPF: 110.419.249-76

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Florianópolis  
Agosto/2022

Esta monografia é dedicada aos meus pais, Elayne de Jesus e Adriano da Silva, pilares da minha formação como ser humano, sem eles nada disso seria possível.

## **Agradecimentos**

A todos aqueles que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho. Aos meus pais, Elayne de Jesus e Adriano da Silva, que me incentivaram nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho. Agradeço a minhas duas melhores amigas, Francine Andrade e Amanda Moriguchi, e meu namorado, Gabriel Hoffman, por entenderem os momentos de ausência durante o período de TCC. Vocês nunca me negaram uma palavra de apoio, força e cumplicidade ao longo dessa etapa em minha vida. Ao professor Dr. Alexandre Luis Parize por ter sido meu orientador, por todo apoio e suporte e por ter desempenhado tal função com dedicação e amizade. A Dra Letícia Mazzarino por todo apoio dado ao projeto em parceria com a empresa e por ter sido minha coorientadora. Ao professor Dr. Ricardo Ferreira Affeldt por todo apoio e disponibilidade de seu laboratório, LACFI, que me auxiliou nas medidas de fluorescência. Aos meus colegas de curso, com quem convivi intensamente durante os últimos anos, pelo companheirismo e pela troca de experiências que me permitiram crescer não só como pessoa, mas também como formanda. Ao meu colega Fábio Jorge Amorim, por todo apoio e cumplicidade durante o curso e principalmente nesse período de TCC. A todos da empresa Nanoscopy, com destaque para Milena Conci e Cynthia Ziech por todo apoio e pelo fornecimento de dados e materiais que foram fundamentais para o desenvolvimento da pesquisa que possibilitou a realização deste trabalho. A todos os laboratórios que colaboraram para o desenvolvimento da pesquisa, com destaque para o Polimat, o LACFI, e o laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal. A todos do laboratório Polimat, que me receberam e me deram todo apoio e suporte necessário, com destaque para o João, a Mariele e o Rodrigo que me deram um auxílio no desenvolvimento da parte experimental do trabalho. À instituição de ensino UFSC, essencial no meu processo de formação profissional, pela dedicação, e por tudo o que aprendi ao longo dos anos do curso.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Introdução.....                                                                                                          | 9  |
| 2. Revisão da literatura .....                                                                                              | 11 |
| 2.1. Cúrcuma .....                                                                                                          | 11 |
| 2.2. Curcumina .....                                                                                                        | 11 |
| 2.3. Associação da curcumina à Nanocarreadores .....                                                                        | 16 |
| 3. Objetivos .....                                                                                                          | 19 |
| 3.1. Objetivo Geral .....                                                                                                   | 19 |
| 3.2. Objetivos específicos .....                                                                                            | 19 |
| 4. Material e métodos .....                                                                                                 | 20 |
| 4.1. Materiais .....                                                                                                        | 20 |
| 4.2. Métodos .....                                                                                                          | 20 |
| 4.2.1. Obtenção da formulação .....                                                                                         | 20 |
| 4.2.2. Determinação do tamanho de partícula e índice de polidispersão....                                                   | 20 |
| 4.2.3. Determinação do potencial Zeta .....                                                                                 | 21 |
| 4.2.4. Determinação do teor de ativo e eficiência de encapsulação das nanopartículas.....                                   | 21 |
| 4.2.5. Estudo de estabilidade do sistema coloidal em diferentes pH's .....                                                  | 22 |
| 4.2.6. Determinação da capacidade antioxidante do ativo .....                                                               | 22 |
| 4.2.7. Avaliação da estabilidade do ativo livre e nanoencapsulado em temperatura ambiente.....                              | 23 |
| 4.2.8. Segurança no laboratório e destino dos resíduos gerados .....                                                        | 24 |
| 5. Resultados e discussão.....                                                                                              | 25 |
| 5.1. Avaliação inicial e caracterização do sistema nanoestruturado com curcumina.....                                       | 25 |
| 5.2. Teor de ativo e eficiência de encapsulação .....                                                                       | 27 |
| 5.2.1. Construção da Curva de calibração .....                                                                              | 27 |
| 5.2.2. Determinação do teor de ativo e efeito da água .....                                                                 | 28 |
| 5.2.3. Determinação da eficiência de encapsulação .....                                                                     | 31 |
| 5.3. Estudo de estabilidade em diferentes pH's .....                                                                        | 32 |
| 5.3.1. Tamanho médio de partícula e potencial zeta .....                                                                    | 32 |
| 5.3.2. Ajuste de pH e aspecto das dispersões .....                                                                          | 34 |
| 5.4. Avaliação da atividade antioxidante .....                                                                              | 36 |
| 5.5. Comparação e Avaliação da estabilidade da curcumina pura e nanoemulsionada na luz/escuro em temperatura ambiente ..... | 38 |

|                                                                                                                         |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>6. Conclusão .....</b>                                                                                               | <b>41</b> |
| <b>7. Referências .....</b>                                                                                             | <b>43</b> |
| <b>Anexo I - Efeito de várias concentrações de água (ml) e poder de fluorescência do sistema curcumina-acetona.....</b> | <b>46</b> |
| <b>Apêndice I - tabela com dados utilizados para a curva de calibração .....</b>                                        | <b>47</b> |
| <b>Apêndice II – Tabela com resultados dos testes de estabilidade em diferentes pH.....</b>                             | <b>48</b> |
| <b>Apêndice III – Tabela com resultados do teste DPPH.....</b>                                                          | <b>48</b> |
| <b>Apêndice IV – Tabela com resultados do teste de estabilidade em temperatura ambiente luz/escuro .....</b>            | <b>49</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Representação estrutural da curcumina. ....                                                          | 12 |
| <b>Figura 2.</b> Equilíbrio ceto-enólico da curcumina. ....                                                           | 12 |
| <b>Figura 3.</b> Equilíbrios polipróticos da curcumina. ....                                                          | 14 |
| <b>Figura 4.</b> Possíveis mecanismos de estabilização do radical gerado na curcumina. ....                           | 15 |
| <b>Figura 5.</b> Principais atividades biológicas atribuídas a curcumina. ....                                        | 16 |
| <b>Figura 6.</b> Representação esquemática de uma micela. ....                                                        | 17 |
| <b>Figura 7.</b> Diagrama associado a nanocurcumina com o tratamento de diversas doenças via administração oral. .... | 18 |
| <b>Figura 8.</b> Aspecto inicial do sistema em estudo. ....                                                           | 26 |
| <b>Figura 9.</b> Curva de calibração para o extrato de cúrcuma longa (95% curcuminóides) ....                         | 28 |
| <b>Figura 10.</b> Influência da água na fluorescência da curcumina. ....                                              | 29 |
| <b>Figura 11.</b> Esquema do equilíbrio de dimerização da curcumina. ....                                             | 30 |
| <b>Figura 12.</b> Tamanho de partícula em função do pH e do tempo. ....                                               | 32 |
| <b>Figura 13.</b> Potencial zeta em função do pH e do tempo. ....                                                     | 33 |
| <b>Figura 14.</b> Aspecto das nanoemulsões em função do tempo e efeito do pH na absorção. ....                        | 35 |
| <b>Figura 15.</b> Resultado do teste DPPH para a NCUR, considerando a concentração de curcumina na formulação. ....   | 38 |
| <b>Figura 16.</b> Resultados do estudo de estabilidade em temperatura ambiente. ....                                  | 40 |
| <b>Figura 17.</b> Efeito da água na fluorescência da curcumina avaliado por Jasim e Ali (1992). ....                  | 46 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Dados utilizados para a curva de calibração de extrato de cúrcuma longa (95% curcuminóides).....                 | 47 |
| <b>Tabela 2.</b> Variação dos tamanhos de partícula da NCUR em função do pH e do tempo .....                                      | 48 |
| <b>Tabela 3.</b> Variação do potencial zeta da NCUR em função do pH e do tempo .....                                              | 48 |
| <b>Tabela 4.</b> Resultados obtidos no teste DPPH para a curcumina nanoencapsulada .                                              | 48 |
| <b>Tabela 5.</b> Variação da concentração de ativo livre e nanoencapsulado em temperatura ambiente exposto a luz e no escuro..... | 49 |

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

CUR – curcumina (ativo puro, extrato de cúrcuma longa 95% de curcuminóides)

NCUR – nanocurcumina (nanoformulação com curcumina dispersa em água)

DPPH – radical 1,1-difenil-2-picrilidrazil

DLS – Espalhamento de luz dinâmico

PDI – índice de polidispersão

SNEDDS – sistema de entrega de drogas auto-nanoemulsificante

## RESUMO

A curcumina é uma substância isolada da raiz da cúrcuma longa que possui diversas propriedades farmacológicas. Sua estrutura com extensa conjugação é alvo de estudos espectroscópicos e ensaios biológicos a décadas. Todavia a baixa solubilidade em água e a rápida degradação na luz dificultam a utilização deste ativo como um fármaco de tratamento alternativo. Dessa maneira, estratégias para aumentar a solubilidade e a biodisponibilidade da curcumina têm sido estudadas a muitos anos, e uma delas é o nanoencapsulamento. Neste trabalho foi estudada um sistema auto-nanoemulsificante com curcumina, cedida pela empresa Nanoscopy, que possui a capacidade de auto nanoemulsionar instantaneamente em contato com água. Foi obtida uma concentração de 4,76% para o doseamento de ativo na formulação, e uma eficiência de encapsulação de 99,1% da formulação dispersa em água. A caracterização do sistema foi feita a partir do espalhamento de luz dinâmico (DLS) da dispersão, onde foi obtido um tamanho igual a 16,8 nm e um índice de polidispersão igual a 0,159. O potencial zeta foi obtido foi -0,6 mV. No estudo de estabilidade em diferentes valores de pH, o zeta se mostrou dependente do pH, mostrando valores iguais a -3,1 e -4,2 mV para pH 7 e 8 respectivamente. Em pH acima de 8 foi possível ver o deslocamento do comprimento de onda máximo de absorção da curcumina, que passou para 459 nm. O teste DPPH mostrou uma melhora de disponibilidade do ativo, quando comparando NCUR e CUR em água, porém comparando com valores da literatura notou-se que a capacidade de sequestrar o radical da nanoformulação e do ativo puro é praticamente igual quando o ativo está solubilizado no meio. Esse aumento de disponibilidade também foi observado com o teste de estabilidade em temperatura ambiente, onde foram comparadas as concentrações e a degradação da NCUR e da CUR no período de 5 dias, a NCUR em presença de luz apresentou formação de precipitado no terceiro dia.

*Palavras-chave: curcumina, cúrcuma, nanoemulsão, solubilidade, antioxidante.*

## 1. Introdução

A *Curcuma longa* L. é um vegetal pertencente à família das *Zingiberaceae*, nativa da Índia e do sudeste da Ásia. Seu uso terapêutico já é relatado há séculos pela medicina Ayurveda, popular na Índia, sendo utilizada para tratar uma variedade de enfermidades, como doenças respiratórias, doenças hepáticas e alergias. A cúrcuma é rica em curcuminóides que dão o tom amarelado aos rizomas. A curcumina é a substância com teor majoritário nos rizomas da *Curcuma longa* L. e hoje é comercializada como uma mistura de três curcuminóides: curcumina (~77%), desmetoxicurcumina (~17%) e bisdesmetoxicurcumina (~3%).

A curcumina é uma substância bioativa que possui estrutura simétrica com conjugação por toda molécula e apresenta muitas propriedades biológicas interessantes, como potencial antioxidante e anti-inflamatório. Isso faz com que ela seja objeto de estudo de muitos trabalhos realizados para o desenvolvimento deste ativo como fármaco para as mais diversas doenças. Entretanto, a curcumina é muito pouco solúvel em água, sendo uma substância com baixa biodisponibilidade e com pouca absorção pelo organismo, além de degradar rapidamente em meio básico e na presença de luz.

Nesse contexto, a nanotecnologia surge para trazer soluções com sistemas nanoestruturados de entrega de ativos, como por exemplo as micelas ou nanoemulsões que além de potencializar o efeito terapêutico do fármaco, também protegem ele de degradações e ainda tornam ele mais biodisponível no organismo através da liberação prolongada e melhora de solubilidade. Os sistemas nanoestruturados com curcumina vem sendo cada vez mais estudados, pelo grande potencial farmacológico que possuem. Já existem inúmeros trabalhos onde é relatada as diversas atividades biológicas que a curcumina possui, como atividade antioxidante, antiviral, anti-inflamatória, antitumoral e outras. E já é cada vez mais pesquisado como a nanoencapsulação dela potencializa essas atividades, sendo estudo para tratamento de vários tipos de doenças, como câncer, HIV, doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares e muitas outras.

O presente trabalho busca caracterizar amostras de um sistema auto nanoemulsificante com curcumina, fazer estudos de estabilidade em diferentes

valores de pH, bem como comparar a estabilidade do ativo puro e nanoencapsulado frente exposição a luz e temperatura ambiente e testar a atividade antioxidante da formulação, visando futuramente se tratar de um produto para administração oral que será comercializado pela empresa Nanoscopying.

## **2. Revisão da literatura**

### **2.1. Cúrcuma**

A *Curcuma longa* L. é um vegetal pertencente à família das *Zingiberaceae*, nativa da Índia e do sudeste da Ásia.<sup>1,2</sup> Com seus primeiros registros sendo datados de 4000 a.C., a cúrcuma é uma planta com rizomas tuberosos, aromáticos e com sabor picante característico, também possui folhas basilares verdes e flores amarelas de cálice tubuloso tridentado.<sup>1</sup>

Os Rizomas da Cúrcuma são a parte mais utilizada, sendo muito comum seu emprego na indústria alimentícia como tempero ou corante.<sup>2</sup> O pó com coloração dourada vibrante é a forma mais usada da cúrcuma como especiaria, chamado também de Turmérico (produto da desidratação e moagem dos rizomas da planta).<sup>3</sup>

Além da vasta aplicação na indústria alimentícia, o uso terapêutico da cúrcuma já é relatado há séculos pela medicina Ayurveda, popular na Índia, sendo utilizada para tratar uma variedade de enfermidades, como: doenças respiratórias, doenças hepáticas, alergias etc. Também já é relatado na literatura as diversas ações do pó amarelo extraído da planta, principalmente atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória.<sup>2,3</sup>

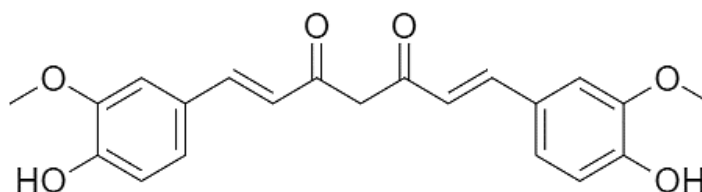
A cúrcuma é composta tanto por óleo essencial rico em sesquiterpenos oxigenados (Tumerona, dehidrotumerona), que apresentam o sabor picante característico, como também por curcuminoides que dão o tom amarelado aos rizomas, além de carbinol, resina, amido e outros constituintes.<sup>1,2,4</sup> A curcumina é a substância com teor majoritário nos rizomas da *curcuma longa* L., que corresponde aproximadamente a 2% do pó de turmérico, e hoje pode ser comprada como uma mistura de três curcuminóides: curcumina (~77%), desmetoxicurcumina (~17%) e bisdesmetoxicurcumina (~3%).<sup>3</sup>

### **2.2. Curcumina**

A curcumina é um metabólito secundário da classe dos diarilheptanóides isolado da raiz da cúrcuma longa. É também uma  $\beta$ -dicetona, com diversas propriedades farmacológicas. Seu nome IUPAC é (1*E*,6*E*)-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona, com fórmula molecular  $C_{21}H_{20}O_6$ , e massa molar 368,4 g.mol<sup>-1</sup>.<sup>5</sup> A curcumina é uma molécula simétrica, cuja estrutura é

constituída de dois sistemas de anéis aromáticos que contém um grupo hidroxila e um grupo metoxi em posição orto, ligados por uma porção  $\beta$ -dicetona  $\alpha,\beta$ -insaturada que possui 7 carbonos (Figura 1).<sup>6</sup>

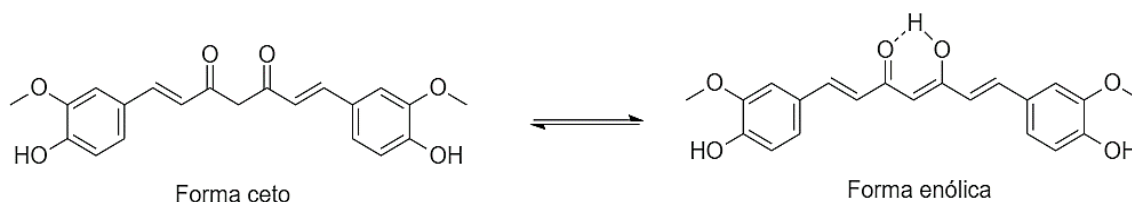
**Figura 1.** Representação estrutural da curcumina.



Fonte: Adaptada de National Center for Biotechnology Information<sup>5</sup>

A curcumina apresenta um equilíbrio tautomérico (Figura 2), sendo que na faixa de pH entre 3 e 7, o sentido do enol é favorecido. Em meio muito ácido, a curcumina permanece na sua forma ceto, e assim o carbono que se encontra entre as duas cetonas possui hibridização  $sp^3$ , trazendo então uma torção para a molécula nessa região e dessa forma a ressonância não ocorre por toda a molécula simultaneamente. Já em meio neutro até básico, a curcumina permanece na sua forma enólica, e isso ocorre porque a formação do enol torna a molécula planar, com uma melhor sobreposição dos orbitais pi, consequentemente, há uma ressonância mais efetiva por toda a estrutura, o que torna a forma enólica mais estável. Além disso a ligação de hidrogênio intramolecular que se forma entre as duas cetonas também traz uma maior estabilidade para a curcumina enólica.<sup>3</sup>

**Figura 2.** Equilíbrio ceto-enólico da curcumina.



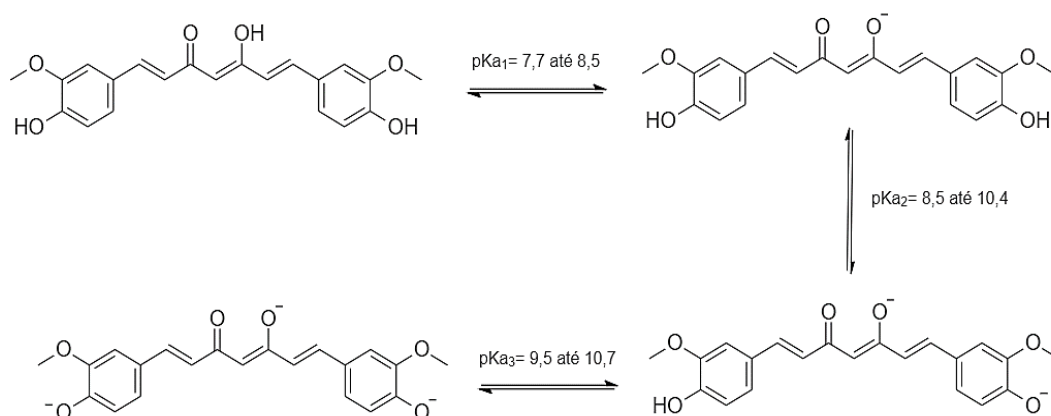
Fonte: Adaptada de Sueth-Santiago et. al (2015)<sup>3</sup>.

A curcumina expressa propriedades espectroscópicas na região do UV-vis devido ao seu perfil estrutural, com extensa conjugação por toda a molécula, dessa

forma várias pesquisas exploram essa característica para visualizar as bandas de absorção da curcumina em diferentes solventes. Conforme o trabalho de Priyadarsini<sup>6</sup> (2014), o espectro de absorção da curcumina possui duas bandas intensas, uma na região do visível com máximo entre 410 e 430 nm (região do azul) podendo ser atribuída à sua excitação  $\pi-\pi^*$ ,<sup>7</sup> o que explica sua cor característica alaranjada, e uma banda na região do UV com máximo em 265 nm. Com o coeficiente de absortividade molar da curcumina em metanol sendo  $55,000 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  em 425 nm.<sup>6</sup>

A curcumina é um ativo da classe II da classificação biofarmacêutica caracterizando-se por apresentar pouca solubilidade e alta permeabilidade em água com um log P (coeficiente de partição octanol-água) de aproximadamente 3,0, indicando ser um composto com caráter hidrofóbico, pois de acordo esse valor a curcumina na forma ceto possui muito mais afinidade pelo octanol do que pela água.<sup>8</sup> Entretanto é facilmente solúvel em solventes orgânicos polares como etanol, acetonitrila, metanol, acetato de etila, entre outros.<sup>6</sup> O trabalho de Jasim e Ali<sup>9</sup> (1992), avaliou o efeito solvatocrômico sofrido pela curcumina, mostrando que mudando a polaridade do solvente faz com que haja uma alteração no comprimento de absorção máxima ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) da curcumina, passando de vermelha em metanol para amarela em diclorometano.

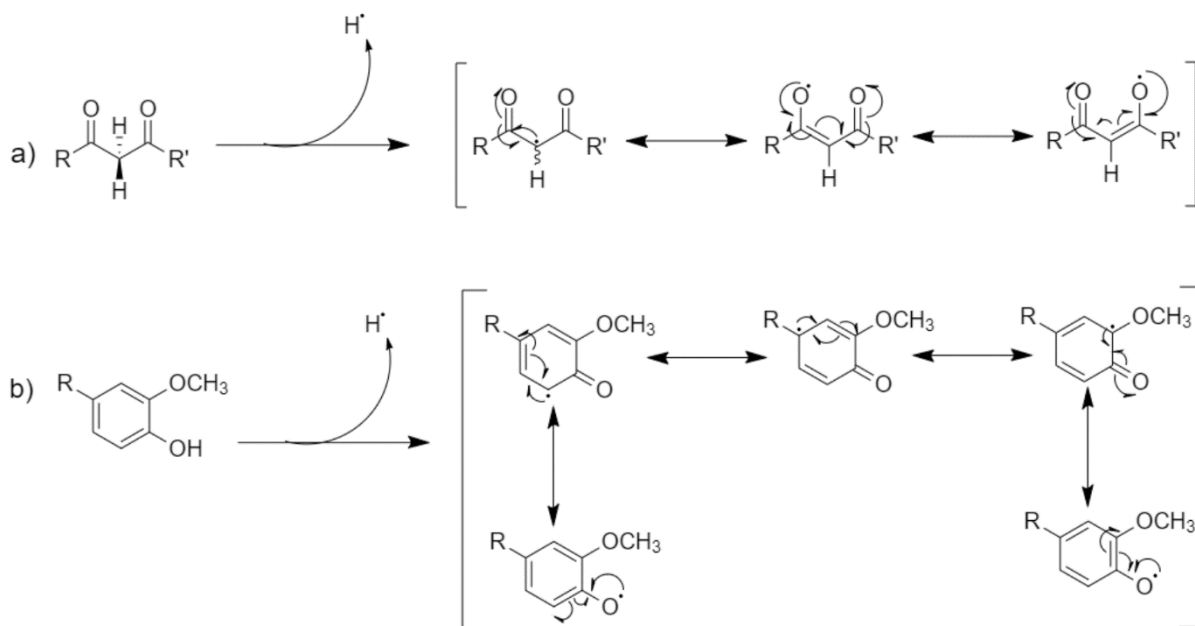
Com três hidrogênios ionizáveis, a curcumina também pode ser afetada pelo pH. Considerada como um ácido fraco de Brönsted, ela possui três equilíbrios polipróticos (Figura 3).<sup>6</sup> Os hidrogênios do carbono metileno (carbono que se encontra entre as duas cetonas) são os mais ácidos, com um pka igual a 8,38. Em meio básico, a curcumina é solúvel em água, onde há mudança da cor amarelo para vermelho, e isso ocorre pelo efeito batocrômico decorrente da desprotonação (que aumenta a densidade eletrônica da curcumina).<sup>3</sup> Apesar de ser solúvel em meio básico, a curcumina sofre degradação com aumento de pH, possivelmente porque ocorre a hidrólise da dicetona. Além disso, a curcumina degrada mais rapidamente quando exposta a luz solar, onde envolve formação de estados excitados da mesma.<sup>6</sup>

**Figura 3.** Equilíbrios polipróticos da curcumina.

Fonte: Adaptada de Priyadarsini (2014)<sup>6</sup>.

Ao avaliar a estrutura da curcumina, com sua extensa conjugação e características fenólicas, muitos pesquisadores exploraram sua atividade antioxidante.<sup>3,10,11</sup> A molécula apresenta duas subunidades estruturais ativas que poderiam realizar essa ação antioxidante: o metileno  $\alpha$  da porção dicetona<sup>10</sup>, e os grupos fenóis<sup>11</sup> (Figura 4). A curcumina doa um hidrogênio radicalar, que pode vir tanto do metileno quanto do fenol, e ele interage com espécies reativas de oxigênio (EROs), gerando radicais mais estáveis (estabilizados por ressonância), diminuindo os efeitos do estresse oxidativo e assim evitando danos relacionados às células.<sup>3</sup> Portanto existem dois mecanismos de atividade antioxidante previstos para a molécula de curcumina. No mecanismo proposto por Jovanovic et al.<sup>10</sup> (Figura 4a), o radical é gerado no metileno (carbono entre as duas cetonas) através da abstração de um hidrogênio radicalar ligado no mesmo, sendo estabilizado pela ressonância da dicetona. Já no mecanismo proposto por Sun et al.<sup>11</sup> (Figura 4b), o hidrogênio radicalar é abstraído do fenol e o radical gerado é estabilizado pela ressonância do anel aromático.<sup>3</sup>

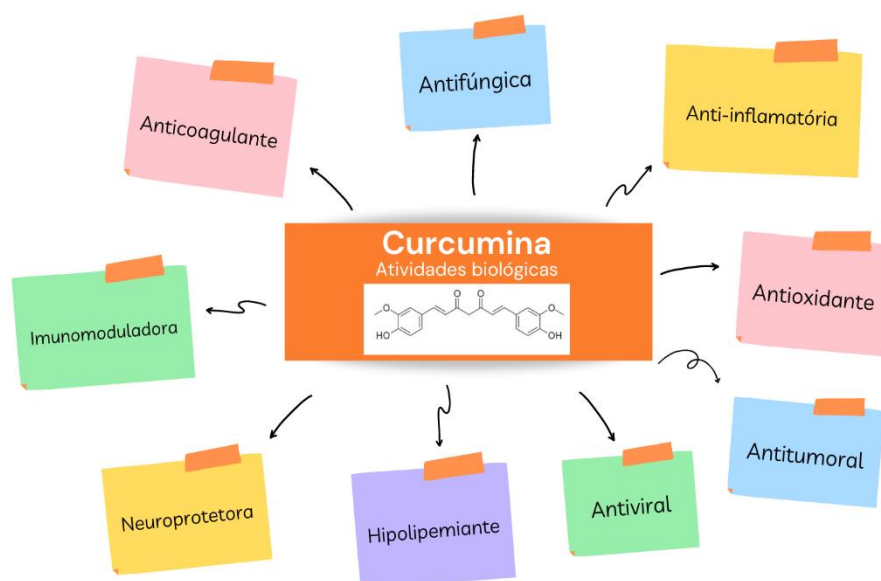
**Figura 4.** Possíveis mecanismos de estabilização do radical gerado na curcumina.



**a)** Mecanismo proposto por Jovanovic et al.<sup>10</sup>. **b)** Mecanismo proposto por Sun et al.<sup>11</sup>. Fonte: Adaptada de Sueth-Santiago et. al (2015)<sup>3</sup>.

A curcumina também pode formar complexos estáveis com muitos metais. Seu grupo  $\beta$ -dicetona  $\alpha,\beta$ -insaturado possui propriedades quelantes devido à proximidade suficiente entre os dois átomos de oxigênio. Então a molécula pode ser descrita como um ligante bidentado monobásico, e de maneira geral, forma estruturas estáveis com estequiometria de 2:1 (ligante:metal). Essa característica complexante associada a muitas outras atividades biológicas como: atividade antioxidante e anti-inflamatória, mostra o grande potencial fármaco que a curcumina possui, por exemplo, em tratamentos alternativos para a doença de Alzheimer.<sup>3,6</sup> Além disso, a curcumina possui uma ampla gama de propriedades biológicas (Figura 5), que foram atribuídas em muitos estudos feitos ao longo dos anos, com testes in vivo e in vitro.<sup>3</sup>

**Figura 5.** Principais atividades biológicas atribuídas a curcumina.



Fonte: Adaptada de Sueth-Santiago et. al (2015)<sup>3</sup>.

Apesar da curcumina possuir um elevado potencial farmacológico, sua administração oral é praticamente inviável para um tratamento eficaz. Devido a sua baixa solubilidade em água, a curcumina apresenta baixa biodisponibilidade, baixo metabolismo e baixa absorção no organismo. Atualmente existem algumas estratégias para aumentar a biodisponibilidade deste ativo, como por exemplo, formulações com nanocarreadores desta biomolécula.<sup>12</sup>

### 2.3. Associação da curcumina à Nanocarreadores

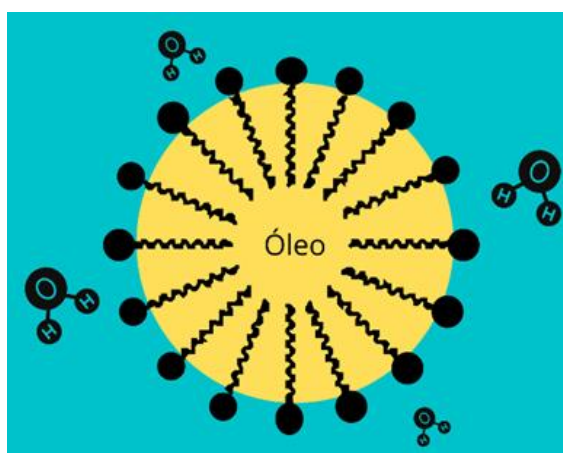
O método de administração mais comum de fármacos/ativos é a administração oral, pois é uma maneira de fácil administração, além de não ser invasiva e ter uma maior aceitação dos pacientes.<sup>13</sup> Entretanto, um dos maiores desafios em empregar o uso de curcumina como agente terapêutico é sua baixa biodisponibilidade, porque é praticamente insolúvel em água e acaba sendo rapidamente eliminada pelo organismo.<sup>6,12,14</sup>

Nesse sentido, a nanotecnologia está sendo usada como ferramenta para desenvolver o uso terapêutico desse ativo, onde é possível reduzir a dose terapeuticamente eficaz, além de melhorar a solubilidade, permeação e como consequência acaba aumentando a biodisponibilidade da curcumina.<sup>14</sup> A distribuição

de uma substância em carreadores de tamanho nanométrico (entre 50 e 300 nm) é chamada de nanoencapsulação.<sup>15</sup> Esses nanocarreadores também podem ser denominados de nanopartículas (NPs), e englobam uma variedade de sistemas nanoestruturados de entrega, sendo que os mais utilizados na indústria farmacêutica são: micelas, lipossomas, NPs poliméricas, nanogéis, NPs lipídicas sólidas, ciclodextrinas, micro e nanoemulsões.<sup>14,15</sup>

As micelas são definidas como agregados de dimensão coloidal, que são formadas a partir de tensoativos em solução aquosa, onde os agregados micelares estão em equilíbrio com os tensoativos na forma livre.<sup>16</sup> Elas possuem um arranjo esférico em escala nanométrica, que pode ser estruturado com lipídios ou polímeros anfifílicos em um sistema aquoso. As micelas são caracterizadas por possuírem um núcleo hidrofóbico e uma superfície hidrofílica (Figura 6). De forma contrária, as micelas reversas são caracterizadas de maneira invertida (núcleo lipofóbico e superfície lipofílica).<sup>17</sup>

**Figura 6.** Representação esquemática de uma micela.



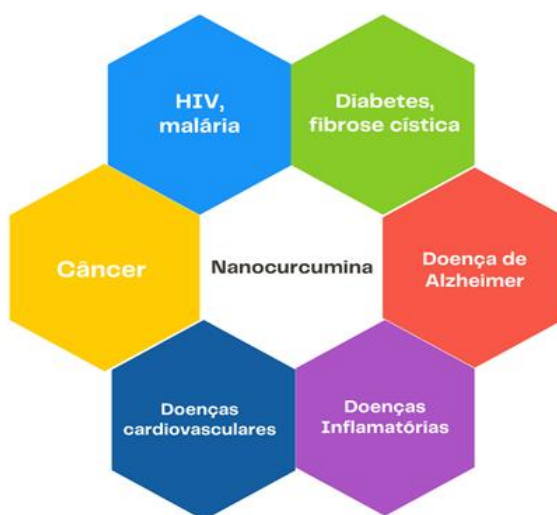
A superfície é hidrofílica (por conta da porção hidrofílica do tensoativo, a bolinha) e no seu interior é hidrofóbica (porção hidrofóbica do tensoativo, a cauda). Fonte: Adaptada de Patel et al. (2020)<sup>17</sup>.

As nanoemulsões são dispersões coloidais com diâmetro de gota em tamanho nanométrico.<sup>15</sup> São emulsões água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A) com dois líquidos imiscíveis dispersos e estabilizados com adição de surfactantes,<sup>18</sup> que podem ir de 50 até 1000 nm.<sup>13</sup> De maneira geral, o tamanho médio do diâmetro das gotículas é de 100 até 500 nm, sendo divididas em nanoemulsões leitosas (até 500 nm) e translúcidas (50 a 200 nm).<sup>13</sup> Por conta do seu tamanho reduzido de gota, apresentam

alta estabilidade cinética,<sup>15</sup> e com isso as nanoemulsões reduzem os fenômenos de desestabilização, como precipitação e coalescência.<sup>18</sup>

Nesse contexto, sistemas como micelas e nanoemulsões podem potencializar os efeitos terapêuticos da curcumina, encapsulando o ativo e protegendo ele das possíveis degradações, e dessa forma, desencadeando uma liberação controlada e um maior tempo de circulação sanguínea. Existem diversos trabalhos associando a encapsulação de curcumina em escala nanométrica viabilizando sua administração oral para o tratamento de uma variedade de doenças, algumas das quais estão apresentadas no diagrama (Figura 7).<sup>14</sup>

**Figura 7.** Diagrama associado a nanocurcumina com o tratamento de diversas doenças via administração oral.



Fonte: Adaptada de Kakkar et al. (2020)<sup>14</sup>

A busca por nanoformulações mais fáceis de escalonar é constante, e em meio a isso hoje já existem diferentes técnicas de preparação. Uma delas é o sistema de entrega de drogas auto-nanoemulsificantes (SNEDDS), que são basicamente misturas isotrópicas contendo óleo, tensoativo e co-surfactantes, que podem formar uma nanoemulsão instantaneamente em contato com água ou no trato gastrointestinal.<sup>19,20</sup> Joshi e colaboradores<sup>20</sup> desenvolveram uma formulação de entrega de curcumina auto-nanoemulsificante (SNEDDS) e constataram que houve uma melhora na biodisponibilidade da curcumina, através do parâmetro cinético de concentração plasmática máxima em ratos, que foi aumentada de 32,29 ng/mL (suspensão aquosa de curcumina) para 527,01 ng/mL (curcumina-SNEDDS).

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Realizar a caracterização físico-química de um sistema auto nanoemulsionável contendo curcumina e avaliar suas propriedades físico-químicas frente a estabilização do fármaco.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Preparar um sistema com propriedade auto nanoemulsionável usando tecnologia e apoio da empresa Nanoscopying;
- Realizar a caracterização das nanoestruturas através de análise de tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta;
- Avaliar a estabilidade coloidal do sistema desenvolvido em diferentes valores de pH;
- Avaliar o aumento de disponibilidade da curcumina utilizando o teste de estabilidade em temperatura ambiente comparando o ativo livre e o nanoencapsulado;
- Determinar o teor de ativo presente nas nanopartículas e a eficiência de encapsulação por utilizando metodologia analítica de Fluorescência;
- Determinar a atividade antioxidante da nanoemulsão usando a técnica de DPPH.

## **4. Material e métodos**

### **4.1. Materiais**

As amostras da nanoformulação do tipo SNEDDS de curcumina foram cedidas pela empresa Nanoscopying (NCN), que foram diluídas a 10% em água purificada para formar as nanoemulsões. Para a obtenção da curva de calibração e os testes de melhora de solubilidade foi utilizado Extrato de *Curcuma longa* (Active Pharmaceutica, 95% curcuminóides). Os outros insumos e solventes são todos de grau analítico e foram utilizados sem qualquer purificação prévia.

### **4.2. Métodos**

#### **4.2.1. Obtenção da formulação**

A Formulação contendo curcumina (lote: NCN0106/22), base para o estudo e que possui características nanoemulsionáveis foi desenvolvida pela empresa Nanoscopying, utilizando a tecnologia da própria empresa, e que foi cedida para realização das análises deste trabalho.

Para obter as nanoemulsões, foram feitas dispersões em água utilizando 1,0 g de amostra e 9 mL de água destilada em tubo tipo falcon, com agitação manual ou em Vortex até a completa homogeneização do sistema. Após o preparo das dispersões, as amostras foram armazenadas em geladeira durante o estudo, com o intuito de evitar a degradação da amostra. Para cada tipo de análise, uma nova dispersão foi preparada.

#### **4.2.2. Determinação do tamanho de partícula e índice de polidispersão**

O tamanho médio de partícula, a distribuição de tamanho e o índice de polidispersão das nanopartículas foram determinados por espalhamento de luz dinâmico (DLS) em um Zetasizer Nano Series modelo SZ (Malvern Instruments, Reino Unido), (utilizando ângulo de 173°) disponível no laboratório do grupo de estudos de materiais poliméricos (Polimat). As dispersões da formulação em água foram feitas conforme descrito em 4.2.1, e posteriormente foram analisadas em triplicata pelo equipamento de DLS em temperatura ambiente utilizando uma cubeta DTS1070 (Malvern Instruments, Reino Unido).

#### 4.2.3. Determinação do potencial Zeta

O potencial Zeta foi avaliado por anemometria laser-doppler usando um equipamento Zetasizer Nano Series modelo SZ (Malvern Instruments, Reino Unido), operando em 4,0 mW, disponível no laboratório do grupo de estudos de materiais poliméricos (Polimat). As dispersões da formulação em água foram feitas conforme descrito em 4.2.1, e posteriormente colocadas na célula eletroforética onde foi estabelecido um potencial de  $\pm 150$  mV e foram analisadas em triplicata em temperatura ambiente.

#### 4.2.4. Determinação do teor de ativo e eficiência de encapsulação das nanopartículas

A concentração de ativo nas nanoemulsões foi determinada por espectrofotometria de fluorescência, elaborando uma curva de calibração, de acordo com o método descrito por Mazzarino et al.,<sup>21</sup>. Primeiramente foi produzida uma solução estoque de  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$  de extrato de *Curcuma longa* (Active Pharmaceutica, 95% curcuminóides) em Acetonitrila P.A. (Vetec), e a partir desta solução estoque foi obtida a solução trabalho  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . A partir desta solução, foram feitas diluições de 0,1 a  $0,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ , todas em acetonitrila, que foram analisadas em triplicata usando um Espectrofluorímetro Cary Eclipse (Varian), disponível no laboratório de catálise e fenômenos interfaciais (LACFI). A amostra foi analisada em uma célula de quartzo padrão de 1 cm. Ambas as fendas de monocromadores de excitação e emissão foram ajustadas para 5,0 nm. As amostras foram excitadas a 397 nm e os espectros de emissão foram registrados de 440 a 600 nm.

A eficiência de encapsulação (%) foi estimada como sendo a diferença entre a concentração total de curcumina encontrada nas suspensões de nanopartículas após sua completa dissolução em acetonitrila e a concentração do ativo no sobrenadante obtida pelo procedimento de ultrafiltração/centrifugação usando filtros de centrifugação Amicon com membrana ultracel 100 kDa (Merck) e uma mini centrífuga miniSpin plus (Eppendorf), onde a amostra foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos. O teor de ativo foi expresso em mg de curcumina por mL de suspensão ( $\text{mg mL}^{-1}$ ).

$$EE \% = ((C_T - C_S)/C_T) \times 100$$

Sendo  $C_T$  = concentração total de curcumina no sistema;  $C_S$  = concentração de curcumina no sobrenadante; EE % = eficiência de encapsulação.

#### 4.2.5. Estudo de estabilidade do sistema coloidal em diferentes pH's

Foram separados aproximadamente 60 mL da nanoemulsão e colocados em 6 tubos falcon de 15 mL (10mL em cada tubo). Utilizando um pHmetro de bancada modelo W3B (Bel engineering), foram feitos 6 ajustes de pH nas nanoemulsões, na faixa de pH 3 até 8, utilizando soluções de HCl e NaOH 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. Após este procedimento, as amostras foram analisadas utilizando o Zetasizer Nano Series modelo SZ (Malvern Instruments, Reino Unido) para avaliar o tamanho médio das partículas e o potencial zeta como é descrito em 4.2.1 e 4.2.2, respectivamente. As mesmas amostras foram analisadas novamente em diferentes períodos de tempo (7, 15, 21, 28 e 35 dias), em termos de aspecto visual, tamanho de partícula e potencial zeta das nanoestruturas, a fim de caracterizar a estabilidade coloidal.

Nos sistemas mantidos a pH 7,0 e maiores que pH 8,0 foi realizada uma análise espectroscópica utilizando um espectrofotômetro UV-vis modelo NOVA 1800UV (Nova instrument) com uma lâmpada de W e usando um intervalo de 400 a 600 nm no espectro, disponível laboratório do grupo de estudos de materiais poliméricos (Polimat), para avaliar o deslocamento do comprimento de onda de absorção máximo da curcumina e comparar com a amostra sem a alteração do pH.

#### 4.2.6. Determinação da capacidade antioxidante do ativo

A avaliação da capacidade do ativo livre e nanoemulsionado de sequestrar o radical 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH•) foi determinada utilizando a metodologia descrita por Dumore e Mukhopadhyay<sup>22</sup> com algumas modificações. Primeiramente foi preparada uma solução estoque de DPPH 0,008 mol.L<sup>-1</sup> em metanol PA, e a partir desta foi feita uma solução trabalho de DPPH 0,000077 mol.L<sup>-1</sup> em metanol 80%, de modo que a absorbância do DPPH ficasse entre 0,5 e 0,6. Para as amostras, primeiro foi feita uma dispersão da formulação em água purificada utilizando a proporção mencionada em 4.2.1, e a partir dessa solução foram feitas diluições de 0,001, 0,0025,

0,005, 0,01, 0,025, 0,05 e 0,1% considerando a concentração de curcumina na formulação. Para o ativo livre, foi pesada a mesma quantidade existente na formulação e colocado na mesma proporção de água, esse sistema foi agitado por aproximadamente 30 minutos e posteriormente foi filtrado para a realização do teste.

Para o teste, em eppendorfs de 4,0 mL foi adicionado 2,9 mL da solução trabalho de DPPH mais 100 µL de cada amostra, então foram mantidos à temperatura ambiente pelo período de 30 min. A absorvância foi medida a 530 nm por meio de um espectrofotômetro UV-vis modelo UV – 2000A (Instrutherm) disponível no laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal do departamento de fitotecnia no Centro de Ciências Agrárias. Primeiro foi feito o branco para zerar o equipamento com a solução 80% metanol e depois as amostras foram lidas uma a uma.

Os resultados obtidos foram explícitos em percentual de atividade antioxidante utilizando a equação:

$$\%AA = ([Abs_{controle} - Abs_{amostra}] / Abs_{controle}) \times 100$$

Sendo,  $Abs_{controle}$  = valor de absorvância do controle (solução trabalho de DPPH) e  $Abs_{amostra}$  = valor de absorvância da amostra (100 µL de amostra e 2,9 mL de DPPH).

#### **4.2.7. Avaliação da estabilidade do ativo livre e nanoencapsulado em temperatura ambiente**

Inicialmente foi feita a mesma dispersão da formulação em água purificada como descrito em 4.2.1, e após completa homogeneização do sistema, a nanoemulsão foi separada em um frasco âmbar e um frasco transparente. Para o ativo livre, foi pesado quantidade equivalente de curcumina na formulação e deixado agitar por 30 minutos aproximadamente, após isso a mistura também foi separada em um frasco âmbar e um frasco transparente. As amostras foram deixadas em temperatura ambiente durante 5 dias, onde foi feito um estudo de estabilidade, avaliando o aspecto da curcumina pura e nanoemulsionada, e fazendo a quantificação diária da curcumina no sistema coloidal usando o Espectrofluorímetro Cary Eclipse (Varian), através da curva de calibração descrita em 4.2.4. A mistura com curcumina e água foi previamente filtrada, usando papel filtro e um funil de vidro, e então foi separada uma alíquota de 300 µL e diluída em 2,7 mL de acetonitrila PA para posterior análise. Nas amostras contendo o sistema nanoestruturado, foram separadas alíquotas que foram

diluídas aproximadamente 7000 vezes, com o intuito de ter o sinal dentro da curva de calibração. Os resultados foram expressos em  $\text{mg mL}^{-1}$  de concentração de curcumina nos sistemas.

#### **4.2.8. Segurança no laboratório e destino dos resíduos gerados**

Todos os procedimentos que foram realizados nos laboratórios seguiram as condutas internas dos mesmos e o manual de regras básicas de segurança para laboratório de química do DQ-UFSC. Todos os experimentos foram administrados seguindo os princípios gerais da química verde, de forma a gerar menor quantidade de resíduo possível. Os resíduos que foram gerados durante o desenvolvimento do projeto foram em maioria líquidos, originados a partir de soluções orgânicas ou aquosas. As soluções orgânicas usadas para a curva de calibração e quantificações e as soluções aquosas com pH básico foram devidamente descartadas em recipientes adequados e identificados e foram separados em: aquosos e orgânicos. Sabendo que nenhum resíduo é tratado no laboratório onde será executada a pesquisa, estes resíduos foram recolhidos por pessoas autorizadas da gestão de resíduos da UFSC e depois direcionados a uma empresa especializada, para posterior tratamento. Outros materiais que foram utilizados durante os experimentos, como tubos falcons, eppendorfs, papéis filtro, luvas e ponteiros foram devidamente descartados, e separados desta forma: luvas e papéis contaminados em um recipiente e plásticos em outro, que também foram recolhidos da mesma maneira que foi citada anteriormente.

## **5. Resultados e discussão**

### **5.1. Avaliação inicial e caracterização do sistema nanoestruturado com curcumina**

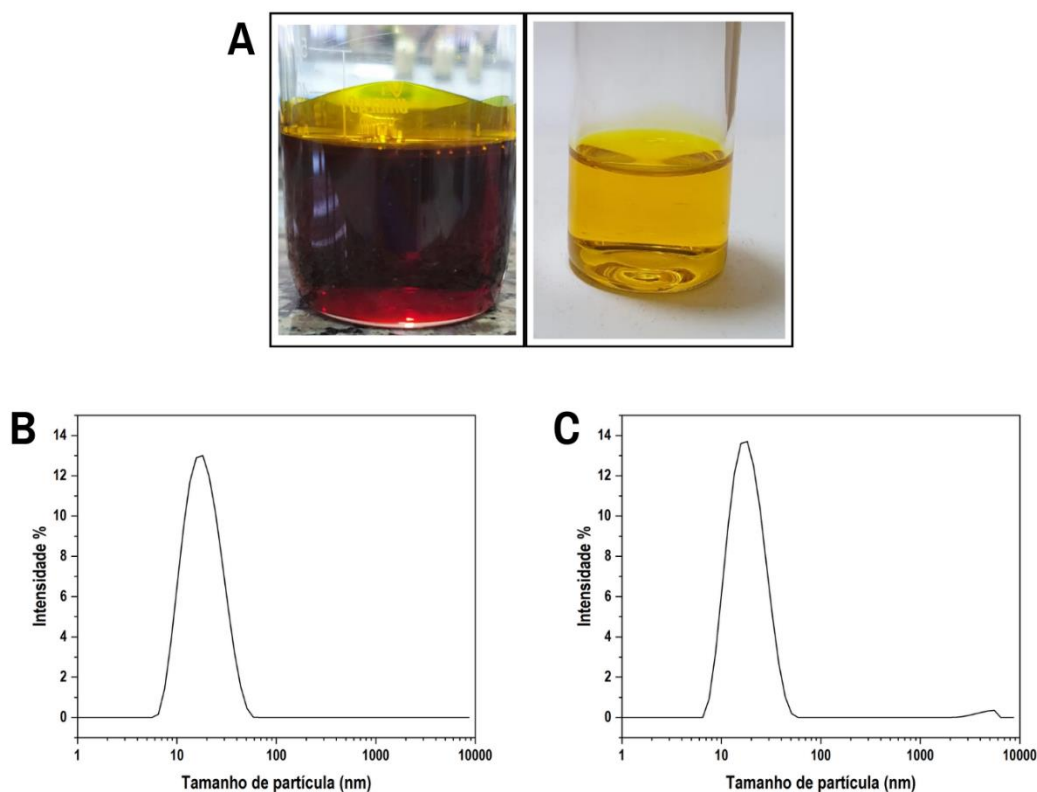
A técnica mais utilizada para fazer caracterização de sistemas como micro e nanoemulsões é o espalhamento de luz dinâmico (*dynamic light scattering* – DLS), que se baseia no princípio de que partículas suspensas sofrem movimento browniano induzido pelo bombardeio de moléculas de solvente que estão em movimento devido à energia térmica. Quando o laser ilumina as partículas ou moléculas do sistema em estudo, a intensidade da luz espalhada flutua a uma velocidade que depende de seu tamanho. Quanto menor o tamanho, mais rápido elas se movimentam.<sup>23</sup> Outra técnica comumente utilizada na caracterização das nanopartículas é o índice de polidispersão (*polydispersity index* – PDI), que se baseia na largura da distribuição do tamanho das partículas e, portanto, na homogeneidade da formulação. Um PDI pequeno abaixo de 0,2 indica uma distribuição de tamanho de gota estreita e, portanto, maior estabilidade contra fenômenos de desestabilização, como o amadurecimento de Ostwald.<sup>24</sup>

Tanto o tamanho médio de partícula quanto o PDI estão associados a estabilidade de nanoemulsões, se ambos se manterem praticamente inalterados durante um certo período, a formulação geralmente é considerada fisicamente estável.<sup>24</sup>

Hunter (1981)<sup>27</sup> descreveu o Potencial Zeta como a medida da carga de superfície da partícula em um determinado meio, utilizado para estudar e prever interações entre as partículas em suspensão. É considerado um sistema estável quando o valor de potencial zeta para as partículas é igual a  $\pm 30$  mV ou acima disso (em módulo), pois esses valores indicam que elas tendem a se repelir, e dessa forma evitam fenômenos de desestabilização do sistema coloidal como floculação/sedimentação.<sup>28</sup>

Conforme descrito na metodologia, para fazer a caracterização inicial do sistema foi pesado 1,0 g da formulação e dispersado em 10 mL de água destilada até a completa homogeneização. Após dispersar em água, foi observado que a amostra possui um aspecto límpido e transparente com uma coloração amarela intensa (Figura 8A). De acordo com Tarik et al (2021)<sup>13</sup>, nanoemulsões que são transparentes a olho nu são caracterizadas por possuírem tamanho médio de partícula entre 50 a 200 nm.

**Figura 8.** Aspecto inicial do sistema em estudo.



**A)** Formulação pura antes de dispersar à esquerda e formulação dispersa em água à direita. **B)** Distribuição de tamanho de partícula do sistema nanoestruturado com curcumina. **C)** Distribuição de tamanho de partícula do sistema nanoestruturado com curcumina que apresentou pequena população em microescala. Fonte: Autoral.

A partir da dispersão, foi feita então análise do tamanho médio de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta da amostra. Através do espalhamento de luz dinâmico, obteve-se um tamanho médio igual a 16,8 nm (Figura 8B). O índice de polidispersão para o sistema coloidal em estudo foi de 0,159, indicando que é bem homogêneo e monodisperso.

Sharma et al (2020)<sup>25</sup> descreveu as microemulsões como dispersões claras, transparentes e termodinamicamente estáveis de dois líquidos imiscíveis estabilizados pela adição de surfactante e co-surfactante adequados com tamanho de gotícula geralmente na faixa de 10-100 nm. Por serem termodinamicamente estáveis possuem a vantagem de serem fáceis de preparar sem necessidade de energia.<sup>25</sup> Apesar da contradição entre o termo “microemulsão” e sua escala nanométrica, esse termo vem sendo utilizado na literatura para descrever sistemas coloidais

termodinamicamente estáveis que possuem tamanho médio menor que 100 nm. Diferente disso, as nanoemulsões são cineticamente estáveis.<sup>26</sup>

Observando o aspecto do sistema coloidal deste trabalho, a facilidade de mistura, seu tamanho e comparando com a literatura é possível dizer que o sistema em estudo parece ser uma microemulsão. O fato de ser termodinamicamente estável facilita sua preparação, porém da Silva et al (2015)<sup>26</sup> expôs que fatores como temperatura e diluição afetam mais significativamente as microemulsões do que as nanoemulsões, podendo alterar o tamanho médio das partículas.

Em algumas leituras feitas por espalhamento de luz dinâmico, foi observado o surgimento de uma pequena população com tamanho entre 4000 e 6000 nm (Figura 8C). Essa população em tamanho maior pode estar relacionada ao movimento browniano das partículas onde uma pequena população forma agregados em microescala. Mesmo assim os índices de polidispersão se mantiveram iguais ou menores que 0,2 em todas as leituras, indicando que o sistema coloidal deste estudo é homogêneo em tamanho.

O potencial Zeta apresentou valores negativos, porém muito próximos de zero para essa amostra, com uma média de - 0,6 mV para as leituras feitas, esses valores muito pequenos podem estar relacionados ao equilíbrio ceto-enólico da curcumina presente no interior das nanoestruturas, indicando a possibilidade de alguma carga residual pequena na superfície das partículas, causada pela influência deste equilíbrio no comportamento dos surfactantes na superfície. Entretanto, esses valores não são significativos para ditarem a estabilidade do sistema. A partir desses valores, pode-se inferir que o sistema não possui estabilidade por repulsão eletrostática, dessa forma o sistema pode estar sendo estabilizado por repulsão estérica, através da formação de uma barreira física formada pelos surfactantes sem carga na superfície.

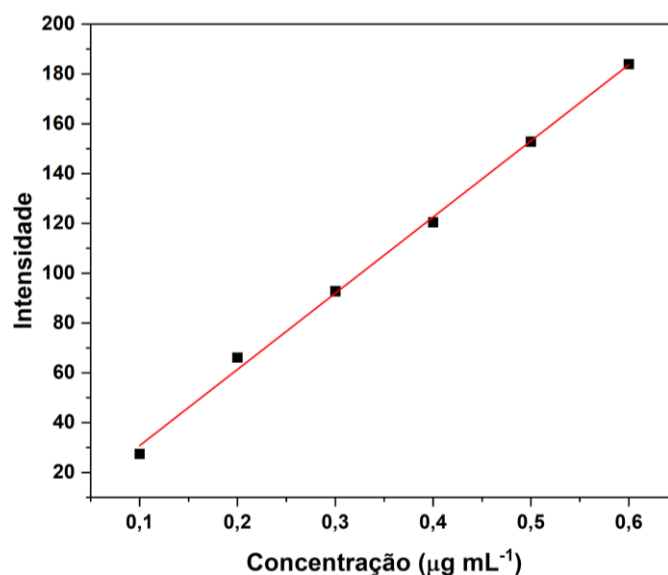
## **5.2. Teor de ativo e eficiência de encapsulação**

### **5.2.1. Construção da Curva de calibração**

A partir da metodologia descrita por Mazzarino et al,<sup>19</sup> foi feita a curva de calibração para a curcumina através da técnica de fluorescência (Figura 9). Foram feitas 6 leituras em triplicata, que variaram de 0,1 a 0,6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do ativo puro (extrato de cúrcuma longa, 95% curcuminóides) em acetonitrila. Dessa forma foram obtidos os

valores de intensidade de emissão da curcumina, e a partir da média deles, foi possível plotar o gráfico através da tabela no apêndice I.

**Figura 9.** Curva de calibração para o extrato de cúrcuma longa (95% curcuminóides)



Ajuste linear dos pontos:  $y = 305,9182x + 0,1959$ ,  $R^2 = 0,9977$ . Fonte: Autoral.

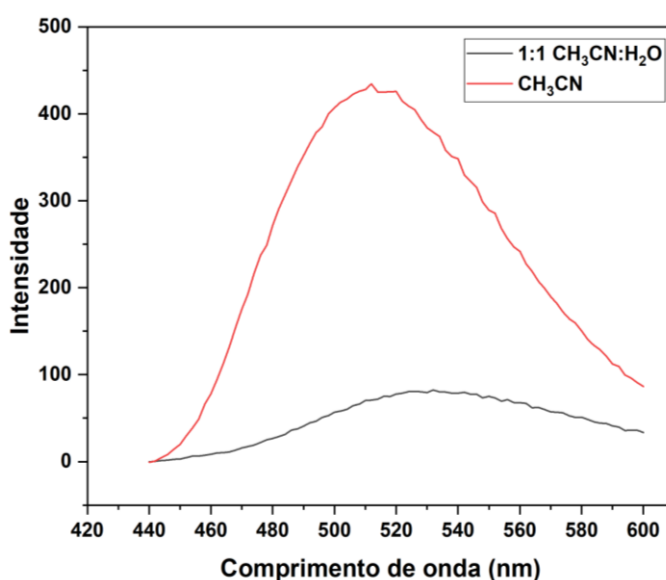
A equação obtida para a curva de calibração foi:  $y = 305,9182x + 0,1959$ , com um  $R^2 = 0,9977$ , indicando que os pontos possuem linearidade. A partir dessa equação é possível então quantificar a curcumina e determinar o teor de ativo na formulação.

### 5.2.2. Determinação do teor de ativo e efeito da água

Partindo do princípio de que há aproximadamente 4% de ativo na formulação cedida pela empresa, foram realizados cálculos de diluição para se chegar em uma concentração próxima do meio da curva de calibração, para assim quantificar e verificar se o teor de ativo está conforme a indicação. A fim de se utilizar menor quantidade de solvente, primeiro a formulação foi dispersa em água (utilizando proporção 1:9) e depois uma alíquota dessa solução foi retirada e diluída novamente em água e acetonitrila 1:1, porém a concentração de curcumina nessa diluição ainda seria alta para cair na curva de calibração, por isso foram feitas mais diluições para chegar próximo da concentração desejada.

Entretanto, foi observado que a intensidade da cor nas diluições não era compatível com o esperado, e fazendo uma análise no fluorímetro, foi obtido um valor muito mais baixo do que a concentração calculada. Dessa forma, foi pega uma alíquota da mesma solução inicial que possui proporção 1:9 (formulação:água) e feita a mesma diluição de antes, porém apenas em acetonitrila. Neste caso, o sinal obtido foi bem alto. Essa observação mostrou que a água diminui a emissão da curcumina, de forma que soluções com mesma concentração possam dar sinais tão diferentes, uma apenas com acetonitrila e uma com água e acetonitrila na mesma proporção (Figura 10).

**Figura 10.** Influência da água na fluorescência da curcumina.

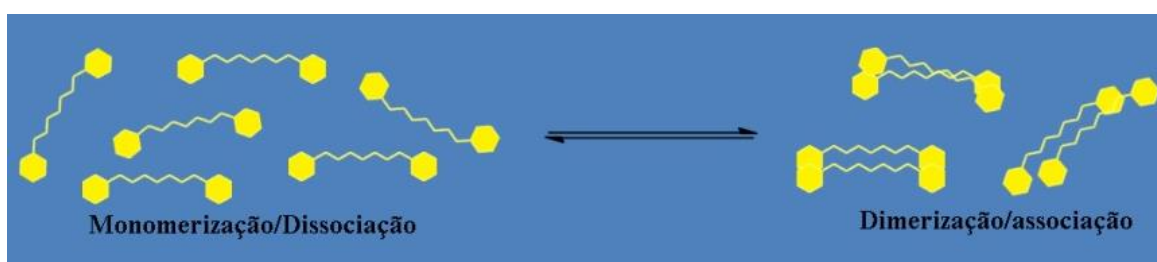


Nesta imagem é possível ver a fluorescência da nanoformulação com curcumina em acetonitrila e em 1:1 acetonitrila:água, ambas com mesma concentração. Fonte: Autoral

Esse resultado pode ser confirmado pelo trabalho de Jasim e Ali (1992)<sup>9</sup>, que fez uma análise espectral da curcumina em acetona utilizando a técnica de fluorescência e constatou que a adição de água diminui muito a fluorescência da curcumina (Anexo I). Segundo eles, ocorre uma reação entre H<sub>2</sub>O (doador de elétrons = D) e o complexo fluorescente curcumina-acetona (C\*), que resulta na formação de um complexo não fluorescente e mais estável (C\*·D<sup>+</sup>) com menor nível S<sub>0</sub> de energia vibracional e consequentemente intensidade menor da emissão.

Essa observação também é confirmada pelo trabalho de Enumo Jr (2020)<sup>29</sup>, que avaliou a fluorescência da curcumina em vários solventes e mostrou também a redução da fluorescência da curcumina em soluções aquosas. No estudo dele, foi mostrado que a diminuição da fluorescência da curcumina em água ocorre possivelmente por dois fatores, supressão (causada pela água nas moléculas de curcumina) e um processo de auto agregação, ocasionado por um equilíbrio de dimerização que a curcumina possui (Figura 11), onde ela forma dímeros do tipo H (em orientação paralela) que são favorecidos em meio aquoso.

**Figura 11.** Esquema do equilíbrio de dimerização da curcumina.



Fonte: Adaptada de Enumo Jr (2020)<sup>29</sup>

Uma outra tentativa de doseamento foi feita, dessa vez diluindo a 10 mg da formulação pura diretamente e apenas em acetonitrila, de forma que a concentração ficasse próxima do centro da curva de calibração. Considerando que 10 mg do produto foram diluídos em 10 mL de acetonitrila, e desta solução foi retirada uma alíquota de 75  $\mu\text{L}$  que foi diluída em mais 10 mL do solvente, (eliminando qualquer efeito de matriz, já que o solvente é capaz de dissolver toda a curcumina presente na quantidade pesada) a média do sinal obtido para essa amostra foi de 109,483 no espectrofluorímetro, é possível então fazer o caminho inverso para descobrir a concentração de curcumina na formulação.

Sabendo que a equação da reta para a curva de calibração feita corresponde a  $y = 305,9182x + 0,1959$ , temos que:

$$y = 109,483 = 305,9182x + 0,1959$$

$$x = 0,35724 \mu\text{g mL}^{-1} = 0,0003572 \text{ mg mL}^{-1}$$

Considerando que a solução estava diluída, segue que:

$$C \times (0,075 \text{ mL}) = (0,0003572 \text{ mg mL}^{-1}) \times (10 \text{ mL})$$

$$C = 0,04763 \text{ mg mL}^{-1}$$

Deste modo, foi encontrada a quantidade de curcumina nos 10 mg de produto analisado, que foi igual a 0,4763 mg. Se a curcumina está presente em 4% da formulação, em 10 mg haveria aproximadamente 0,4 mg. Portanto o resultado está em conformidade com o esperado, com um erro relativo de 19,1%. Há vários fatores que podem ter culminado nesse erro, podendo estar relacionado com o próprio equipamento usado para medição, já que o espectrofluorímetro é muito sensível, ou pode indicar algum erro de diluição ou alguma pipeta mal calibrada. A concentração de curcumina na formulação poderia também ser um pouco maior ou menor do que 4%, considerando que a cada lote é feita uma nova produção com novas pesagens. Por conseguinte, a concentração total de curcumina encontrada na formulação foi igual a 4,76%.

### 5.2.3. Determinação da eficiência de encapsulação

Para determinar a eficiência de encapsulação, foi feita a mesma dispersão do produto em água descrito em 4.2.1, onde foi pesado 1,0 g da formulação e diluído até 10 mL com água destilada. Desta solução foi retirado 500  $\mu\text{L}$  e colocado em um filtro de eppendorf como descrito em 4.2.4, após a centrifugação foi colhida uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  do sobrenadante que foi diluída até 4 mL com acetonitrila, posteriormente foi feita a análise no espectrofluorímetro.

Foi obtido um sinal médio igual a 161,9238, e aplicando a mesma equação da reta utilizada em 5.2.2, foi encontrada uma concentração igual a  $x = 0,52866 \mu\text{g mL}^{-1} = 0,00052866 \text{ mg mL}^{-1}$ .

Sabendo que essa concentração é da alíquota diluída, temos que:

$$C \times (0,050 \text{ mL}) = (0,00052866 \text{ mg mL}^{-1}) \times (4 \text{ mL})$$

$$C = 0,04229 \text{ mg mL}^{-1} \text{ no sobrenadante}$$

Considerando que foi pesada 1,0 g de formulação e o volume completado para 10 mL com água, e que o teor de ativo encontrado foi de 4,76%, é correto afirmar que a concentração total de curcumina nessa dispersão é igual a  $4,76 \text{ mg mL}^{-1}$ .

Aplicando a fórmula de eficiência de encapsulação, segue:

$$EE \% = ((C_T - C_S)/C_T) \times 100$$

$$EE \% = ((4,76 - 0,04229)/ 4,76) \times 100$$

$$EE \% = 99,1\%$$

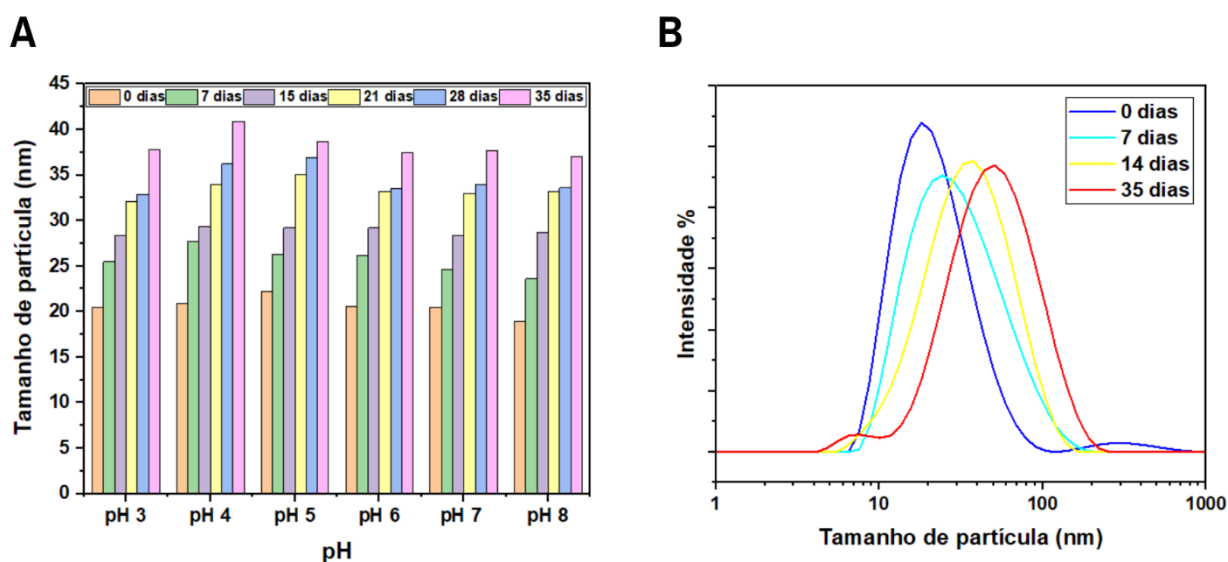
Esse resultado mostra que o ativo está praticamente todo presente no interior das nanoestruturas, já que quanto mais próximo de 100% mais efetiva é a encapsulação, e neste caso a hidrofobicidade da curcumina faz com que ela fique o mais afastada possível da água, ou seja, no interior lipofílico de uma micela por exemplo.

### 5.3. Estudo de estabilidade em diferentes pH's

#### 5.3.1. Tamanho médio de partícula e potencial zeta

Foi avaliado para os sistemas nanoemulsionados a influência do pH no tamanho e carga, onde os dados estão sumarizados no apêndice II e os resultados expressos nas figuras 12 e 13. O tamanho médio de partícula e o potencial zeta da NCUR com ajuste de pH foram avaliados uma vez por semana durante 35 dias, e durante esse período, os tubos falcon foram mantidos em condições de baixa temperatura (aproximadamente 4° C).

**Figura 12.** Tamanho de partícula em função do pH e do tempo.

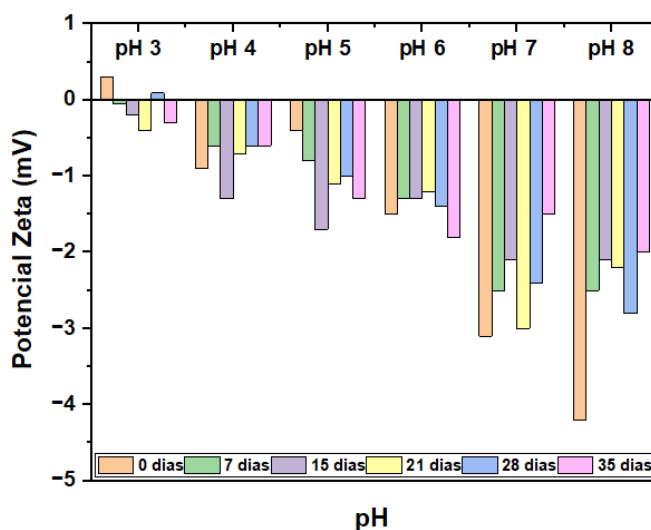


**A)** Tamanho de partícula em função do tempo em todos os pH's (3 até 8). **B)** Distribuição de tamanho de partícula do sistema em pH 4 em função do tempo. Fonte: Autoral.

Na Figura 12 A, é possível observar que o tamanho médio das partículas independente do pH aumentou gradualmente com o tempo. Em todos os valores de pH houve esse aumento brando e gradativo, onde todos no começo possuíam valores próximos de 20 nm e no final já tinham valores de aproximadamente 40 nm. Portanto pode-se dizer que a mudança de pH não afetou significativamente o tamanho médio de partícula. Com isso, foi escolhido a NCUR com pH 4 para avaliar a distribuição do tamanho ao longo do tempo, avaliando a Figura 12B observa-se que os picos de distribuição de tamanho mantiveram-se relativamente estreitos, mostrando que o sistema nanoemulsionado se manteve monodisperso durante o tempo do estudo de estabilidade, e dessa forma os PDI's tiveram bons valores durante a avaliação não só para o pH 4, mas para todos os outros ajustes realizados ( $< 0,3$ ).

No trabalho de Lin et al (2009)<sup>30</sup> foi observado um comportamento similar do sistema, onde foi feito um estudo de estabilidade durante 60 dias em 4°C de microemulsões com curcumina. Eles observaram que houve um aumento gradual do tamanho médio de partícula durante o período de 2 meses, e associaram isso com a agregação das partículas devido à baixa proporção surfactante:óleo na formulação.

**Figura 13.** Potencial zeta em função do pH e do tempo.



Fonte: autoral.

Na figura 13, o potencial zeta no dia 0 para os pH's 7 e 8 apresentou valores médios iguais a -3,1 mV e -4,2 mV, respectivamente. Esses valores pequenos e negativos podem estar relacionados com a estrutura da curcumina nesses pH's, já

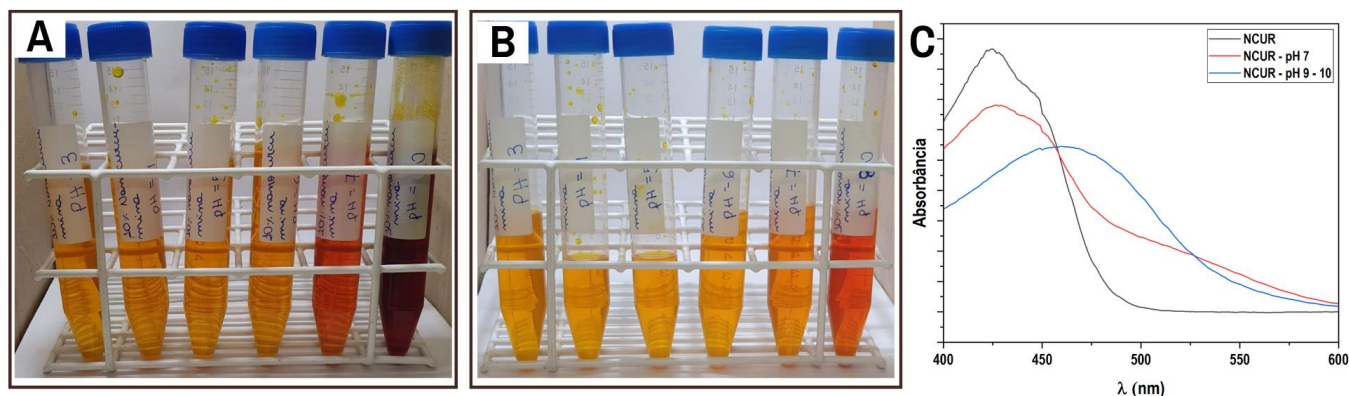
que em pH 7 começa a ter um deslocamento do equilíbrio ceto-enólico para a forma enólica da curcumina e em pH 8 pode já ocorrer desprotonação dela (conforme visto nos equilíbrios polipróticos). Em meio básico, a curcumina é solúvel em água, e, portanto, pode ser que nos pH's em questão parte dela migrou para a superfície das nanoestruturas, afetando os valores de zeta. Nos outros pH's os valores foram muito próximos de zero ou -1, podendo também estar relacionado com o equilíbrio ceto-enólico da curcumina, como foi avaliado também em 5.1, pois como a forma enólica é solúvel em água, ela poderia ir para a superfície também vinda do próprio equilíbrio, por ser em quantidade muito menor os valores lidos pelo equipamento também foram pequenos. Foi observado também que o potencial zeta diminuiu significativamente da primeira semana para a última nos pH's 7 e 8, podendo acusar que parte do ativo migrou para o meio, por conta do aumento da solubilidade da curcumina em meio básico, diminuindo a influência da carga do ativo no comportamento dos surfactantes na superfície. Entretanto, como foi discutido em 5.1, esses valores de zeta não são significativos para ditarem a estabilidade do sistema. O sistema deve estar sendo estabilizado pela repulsão estérica, através da formação de uma barreira física formada pelos tensoativos sem carga na superfície.

Não houve formação de precipitado ou fenômeno de separação de fases durante o estudo de estabilidade em diferentes pH's. Portanto, pode-se dizer que a condição de baixa temperatura diminuiu os efeitos macroscópicos de desestabilização do sistema. Entretanto, mesmo em baixas temperaturas, o tamanho de partícula aumentou de 20 para 40 nm em 35 dias, o que pode indicar que a temperatura baixa apenas desacelerou o processo de agregação ou coalescência do sistema.

### **5.3.2. Ajuste de pH e aspecto das dispersões**

Também foi avaliado para os sistemas nanoemulsionados a influência do pH no aspecto referente à coloração e junto a isso os máximos de absorção no UV-vis, cujos resultados estão representados na Figura 14. Neste estudo primeiramente foi feita a dispersão da formulação em água, conforme descrito na metodologia 4.2.1. Após isso, a solução foi separada em 6 tubos falcon que passaram por um ajuste de pH, na faixa de 3,0 até 8,0.

**Figura 14.** Aspecto das nanoemulsões em função do tempo e efeito do pH na absorção.



**A)** Aspecto das nanoemulsões no dia 0 do estudo, da esquerda para a direita estão os pH's 3, 4, 5, 6, 7 e 8, respectivamente. **B)** Aspecto das nanoemulsões depois de 35 dias, da esquerda para a direita estão os pH's 3, 4, 5, 6, 7 e 8, respectivamente. **C)** Análise qualitativa espectral da NCUR normal, em pH 7 e pH entre 9 e 10. Fonte: Autoral

Inicialmente, em meio mais ácido ( $< \text{pH } 6,0$ ), a solução continuou com a coloração amarela intensa (Figura 14A), indicando que nesses pH's a forma ceto é favorecida no equilíbrio ceto-enólico da curcumina (Figura 2), a partir de pH 7,0 até meio básico, a dispersão coloidal assumiu coloração alaranjada e vermelha respectivamente (Figura 14A). Essa mudança de coloração é característica da desprotonação da curcumina, deslocando o equilíbrio (Figura 2) e favorecendo a forma enólica do ativo.

A fim de se observar essa mudança de coloração no espectro UV-vis, foi feito um ajuste qualitativo de pH em 3 eppendorfs para mostrar o deslocamento do comprimento de onda máximo de absorção da espécie no sistema coloidal NCUR. Observando a Figura 14C, a NCUR sem ajuste de pH apresentou um comprimento de onda máximo próximo em 425 nm. Em pH próximo de 7, a NCUR ficou com coloração alaranjada e apresentou um pequeno deslocamento do comprimento de onda máximo sendo em 427 nm, porém a intensidade da banda diminuiu mesmo a concentração estando mantida, o que pode indicar que o equilíbrio ceto-enólico da curcumina está sendo deslocado para a forma enólica. Já em pH entre 9 e 10 a NCUR apresentou coloração vermelha intensa, e no espectro o deslocamento do comprimento de onda máximo de absorção é evidente, mostrando um novo  $\lambda_{\text{máx}} = 459 \text{ nm}$ , indicando que a curcumina foi desprotonada, sendo a espécie predominante na solução.

Este resultado é condizente com o trabalho de Priyadarsini (2014)<sup>6</sup> que descreveu o máximo de absorção no espectro visível da curcumina de 410 a 430 nm

(coloração amarela), e da curcumina desprotonada, em meio básico, como sendo 467 nm, quando ela assume uma cor vermelha intensa.

Com relação à coloração das soluções NCUR, inicialmente (Figura 14A) pH 7 possuía uma coloração alaranjada forte, e pH 8 assumiu uma coloração vermelha intensa. Entretanto, essas soluções perderam sua intensidade de cor depois de alguns dias, como se tivessem “desbotado” (Figura 14B), isso acontece por causa da degradação do ativo em meio básico. A curcumina degrada geralmente em pH acima de 7, possivelmente ocasionada pela hidrólise da fração diceto, resultando em outros produtos como descreve Priyadarsini (2014)<sup>6</sup>, e consequentemente a solução perde um pouco da sua coloração característica, além de perder sua efetiva ação.

#### **5.4. Avaliação da atividade antioxidante**

O teste DPPH baseia-se na redução do radical livre 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH•) por um composto antioxidante doador de hidrogênio, o que resulta na geração da forma não radical do DPPH, expressa pela perda da cor violeta. O grau de descoloração condiz com o potencial de eliminação de radicais do antioxidante estudado.<sup>32</sup>

Os resultados podem ser expressos em porcentagem de atividade antioxidante (AA%) calculada pela fórmula descrita em 4.2.6, como também podem ser mostrados em IC<sub>50</sub>, que corresponde a concentração necessária do ativo antioxidante em reduzir 50% do radical DPPH. Quanto menor o valor de IC<sub>50</sub>, maior a atividade antioxidante do fármaco.<sup>33</sup>

Para avaliar a atividade antioxidante do ativo nanoestruturado, foi preciso utilizar concentrações muito pequenas, pois foi observado que a curcumina possui uma capacidade muito alta de sequestrar o radical DPPH. As concentrações utilizadas foram preparadas utilizando como base o valor obtido para o doseamento em 5.2.2. Para calcular a atividade antioxidante, foi utilizada a equação descrita em 4.2.6. Os resultados estão expressos no apêndice III e apresentados na Figura 15.

A partir da concentração próxima a 0,05% de curcumina no sistema coloidal disperso em água a atividade antioxidante ficou em 89,8%. Ao tentar aumentar a concentração para 0,1%, a AA% continuou em 89,2%, indicando que talvez esse seja o valor limite que o ativo consegue sequestrar o radical livre. Entretanto, foi possível preparar concentrações menores para mostrar o aumento da atividade antioxidante

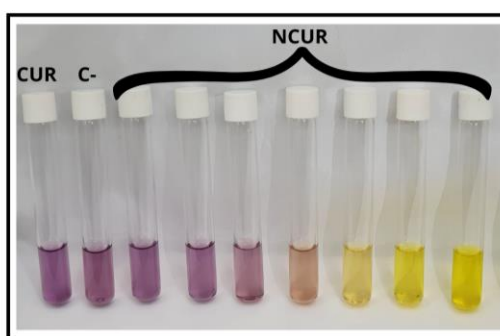
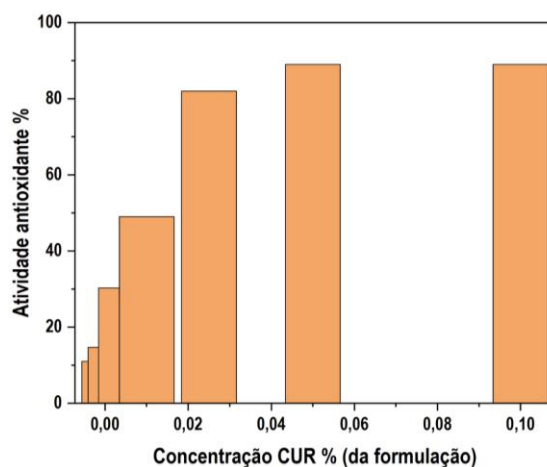
com o aumento da concentração de curcumina na dispersão, e dessa forma foi vista a descoloração gradual do DPPH (Figura 15). Por conta do limite mínimo da pipeta analítica utilizada (6,25µL), a concentração mínima que foi feita para avaliar o teste DPPH foi de 0,001%, que mesmo pequena, apresentou %AA igual a 11%. O ativo puro (CUR) foi diluído em água purificada em quantidade proporcional ao que há na formulação, foi agitado por 30 minutos e depois filtrado, e apresentou uma atividade antioxidante de 6,0%.

Utilizando concentração 0,01% de NCUR, foi obtida uma %AA igual a 49,6%, portanto o valor de  $IC_{50}$  para a amostra dispersa estaria próxima desta concentração utilizada. Passando esse valor para  $mg\ mL^{-1}$ , temos que  $IC_{50}$  é aproximadamente 0,119  $mg\ mL^{-1}$  para o sistema nanoestruturado com curcumina deste estudo.

Doković et al (2021)<sup>32</sup> estudou a atividade antioxidante de nanoemulsões com curcumina. No trabalho, foi determinado o  $IC_{50}$  da curcumina pura (fazendo diluição em isopropanol) que foi igual a 0,1195  $mg\ mL^{-1}$ . Também foi notado que as nanoemulsões do trabalho obtiveram maior atividade sequestrante (menores  $IC_{50}$ ) com valores iguais a 0,0807, 0,0788 e 0,0779  $mg\ mL^{-1}$ , que eles justificaram pela presença de BHT nas formulações que pode ter potencializado esse efeito.

Esse resultado está de acordo com o obtido experimentalmente neste trabalho, só que foi para a NCUR, mostrando que ela pura solubilizada em isopropanol no trabalho de Doković obteve a mesma atividade que a nano dispersa em água deste estudo. Fazendo a comparação utilizando o solvente água, o valor apresentado de %AA para a NCUR é muito maior do que para a CUR, justamente pela baixa solubilidade em água do ativo. Isso mostra que a NCUR teve sua disponibilidade aumentada, pois sua mistura com água é espontânea.

**Figura 15.** Resultado do teste DPPH para a NCUR, considerando a concentração de curcumina na formulação.



A ordem no gráfico é a mesma mostrada na imagem para a NCUR, onde foram preparadas concentrações iguais a 0,001%, 0,0025%, 0,005%, 0,01%, 0,025%, 0,05%, 0,1%. O ativo puro (CUR) e o controle negativo (C-) que aparecem na foto não estão representados no gráfico. Fonte: Autoral.

### 5.5. Comparação e Avaliação da estabilidade da curcumina pura e nanoemulsionada na luz/escuro em temperatura ambiente

Neste teste foi feita a comparação da estabilidade do ativo puro e nanoencapsulado em temperatura ambiente, utilizando frasco âmbar e transparente, para avaliar o efeito da degradação da luz no fármaco durante 5 dias. Para isso, primeiramente foi feita uma dispersão da formulação em água, como descrito em 4.2.1, e logo depois foi feita uma quantificação no fluorímetro, os valores estão sumarizados no apêndice IV e os resultados expressos na Figura 16.

Como foi observado em 5.2.2, já se sabe que a água provoca uma diminuição na fluorescência da curcumina, então as diluições foram feitas em acetonitrila, de forma a pegar a menor alíquota possível em água. Inicialmente foi pego 50 µL da NCUR, que foi diluído em 5 mL de acetonitrila, e desta solução foi tirada uma alíquota

de 69  $\mu\text{L}$  que também foi diluída em 5 mL de acetonitrila. Como no primeiro dia não teria diferença entre a luz e o escuro, foi feita apenas uma quantificação, referente a NCUR, onde foi obtido um valor de concentração igual a  $3,397 \text{ mg mL}^{-1}$ . Apesar de ser um valor diferente do que foi obtido no doseamento por conta da influência da água, isso não interfere na visualização da tendência de degradação da curcumina como é possível notar na Figura 16A.

Na Figura 16A também foi observado que no dia 2 do estudo, a concentração aumentou, indicando uma reorganização do sistema que culminou num aumento de disponibilidade da curcumina. No dia 3, a NCUR que estava exposta a luz já apresentou degradação. Isso foi observado tanto na Figura 16A quanto no aspecto da amostra que já apresentava precipitado no fundo. Entretanto a NCUR que estava no frasco âmbar teve sua concentração aumentada, podendo dizer que ela pôde se reorganizar e como estava protegida da luz, não teve sua concentração real afetada.

No dia 4 foi vista a tendência à degradação, onde a concentração de ambos os testes com NCUR (luz/escuro) diminuiu. Apesar disso, nota-se que mesmo degradando, a concentração da NCUR no escuro se manteve maior do que a mesma na luz, mostrando que a degradação ocorre muito mais rápido quando a amostra está exposta. Então é correto inferir que uma indicação para a formulação seria manter fora do alcance da luz, em frasco âmbar.

No último dia de estudo (dia 5), foi obtido um aumento da concentração de curcumina tanto no escuro quanto na luz para NCUR, provavelmente ocorreu algum erro experimental que resultou em uma ressolubilização do ativo no sistema e por conta disso esses valores foram desconsiderados para o gráfico.

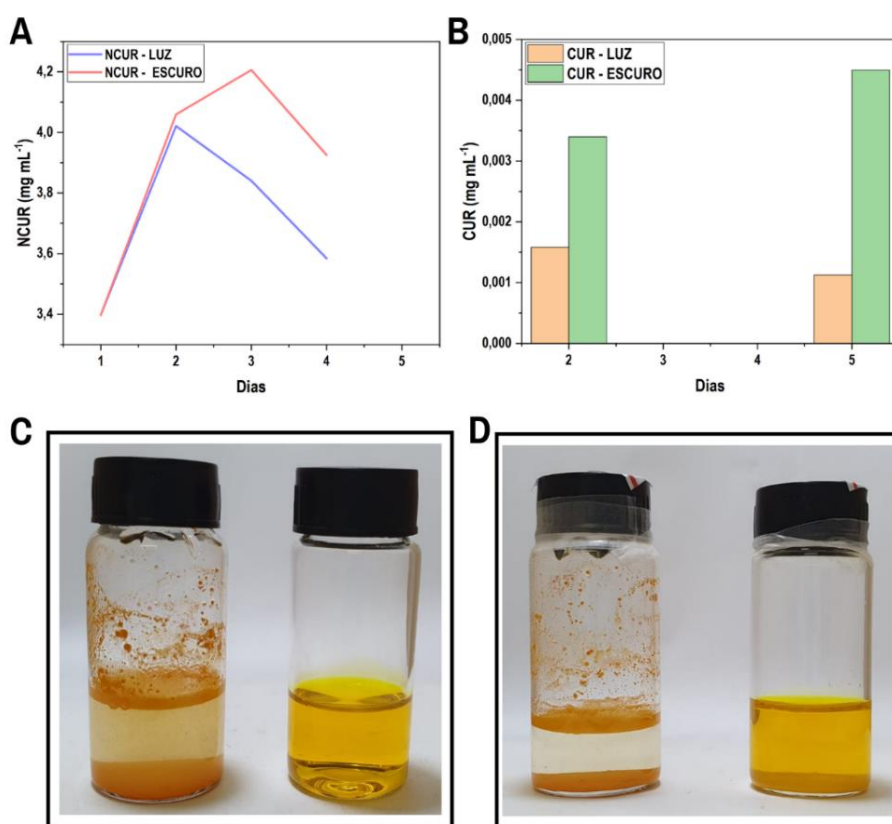
Sobre o aspecto da NCUR tanto no escuro quanto na luz, ambas precipitaram formando um sedimento no fundo dos frascos. Esse tipo de desestabilização do sistema pode estar relacionado tanto com o equilíbrio de dimerização da CUR, que tem a tendência de se auto agregar em água, quanto à fácil degradação do ativo, indicando instabilidade do sistema e podendo ocorrer fenômenos de floculação/sedimentação.

Para o ativo puro (CUR) foi feita uma diluição em água purificada em quantidade proporcional ao que há na formulação, posteriormente agitado por 30 minutos. Após isso foi armazenado em um frasco âmbar transparente, e foi quantificado no dia 2 e no dia 5 (por conta da baixa solubilidade). Antes da

quantificação no dia, a alíquota retirada dos frascos foi previamente filtrada e depois diluída em acetonitrila.

Como é possível observar na Figura 16B, a diferença no dia 2 já é nítida, onde o ativo livre no escuro apresentou uma concentração muito maior do que o ativo livre exposto a luz, o que reforça o quão rápido a curcumina degrada na presença de luz. Os valores de concentração mostrados também são muito menores para o ativo livre do que para ativo nanoencapsulado, podendo-se afirmar que a curcumina teve sua disponibilidade aumentada na formulação NCUR dispersa em água. Já no dia 5 para os ativos livres, a CUR na presença de luz manteve uma tendência, apresentando um valor menor que no dia 2, porém a CUR no escuro teve um valor muito alto de concentração, onde possivelmente houve um erro experimental no momento da filtração desse sistema. Pelo aspecto da mistura de ativo puro e água mostrado nas figuras 16C e 16D, pode-se afirmar que visualmente não houve muita diferença do dia 2 para o 5.

**Figura 16.** Resultados do estudo de estabilidade em temperatura ambiente.



**A)** Gráfico da NCUR dispersa em água que mostra a concentração durante os dias do estudo. **B)** Concentração do ativo puro no dia 2 e 5. **C)** Ativo puro e nanoestruturado no primeiro dia. **D)** Ativo puro e nanoestruturado no último dia. Fonte: Autoral.

## **6. Conclusão**

Foi visto que o sistema pode se tratar de uma microemulsão, por apresentar um aspecto límpido, transparente e ser de fácil preparação. O sistema apresentou inicialmente tamanho médio de partícula igual a 16,8 nm, e PDI igual a 0,159 indicando ser monodisperso e homogêneo. Os valores de potencial zeta negativos e muito próximos de zero indicam a possibilidade do equilíbrio cetó-enólico da curcumina estar influenciando o comportamento dos surfactantes na superfície. Isso parece ser evidenciado no estudo de estabilidade em diferentes valores de pH, onde foi visto valores de potencial zeta no começo do estudo iguais a - 3,1 e - 4,2 mV para pH 7 e 8 respectivamente, mostrando que o ativo desprotonado exerceu maior influência ainda, podendo até ter migrado para a superfície por ser solúvel em água em meio básico. Entretanto, todos os valores de potencial zeta obtidos são pouco significativos para indicarem que o sistema é estabilizado por repulsão eletrostática, e dessa forma é possível dizer que o sistema possui estabilização causada pela repulsão estérica entre as partículas. Além disso, o pH não parece ser um fator determinante para o tamanho de partícula, pois em todos os valores da faixa de pH utilizada, os tamanhos aumentaram de maneira similar e gradual, e esse aumento gradual pode estar associado a agregação das partículas. Nota-se também que a água exerce forte influência sobre a fluorescência da curcumina, diminuindo sua intensidade, podendo estar relacionada com o equilíbrio de dimerização da curcumina ou a formação de um complexo não fluorescente. Obteve-se um valor igual a 4,76 % para o doseamento do ativo no sistema coloidal, sendo que a referência da empresa era de 4%, então teve um erro relativo de 19,1%, que foi considerado como um resultado satisfatório. A eficiência de encapsulação do sistema foi igual a 99,1%, indicando que praticamente toda a curcumina presente no sistema está encapsulada. Além disso, foi possível observar a degradação da curcumina nanoemulsionada tanto em pH básico quanto na luz, através dos dois testes de estabilidade realizados. Em pH ainda foi notado o deslocamento do comprimento de onda máximo de absorção da curcumina, que passou de 425 nm para 459 nm em meio básico, assumindo coloração vermelha intensa, característica da desprotonação do ativo. Tanto no teste DPPH quanto no teste de estabilidade em temperatura ambiente luz/escuro foi visto o aumento da disponibilidade da curcumina, já que o ativo é pouco solúvel em água, e o sistema SNEDDS forma uma nanoemulsão instantânea em água, e com isso notou-se o

aumento da atividade antioxidante e dos valores de concentração obtidos em temperatura ambiente, que mesmo degradando, ainda apresentava concentração muito maior a NCUR do que a CUR.

Para perspectivas futuras, é esperado que a empresa realize um ensaio de liberação *in vitro*, a fim de se determinar o perfil de liberação do sistema SNEDDS de curcumina criado pela mesma, comparando o ativo livre com o nanoencapsulado. Também se espera mais testes de estabilidade da formulação antes e depois de dispersar em água, em diferentes temperaturas, para avaliar como o sistema se comporta em todas as condições previstas, além de avaliar a estabilidade do sistema frente a ciclos de congelamento e descongelamento com o intuito de estudar condições extremas de armazenamento. Com isso, visando futuramente ser um produto para administração oral que será comercializado pela empresa Nanoscopy.

## **7. Referências**

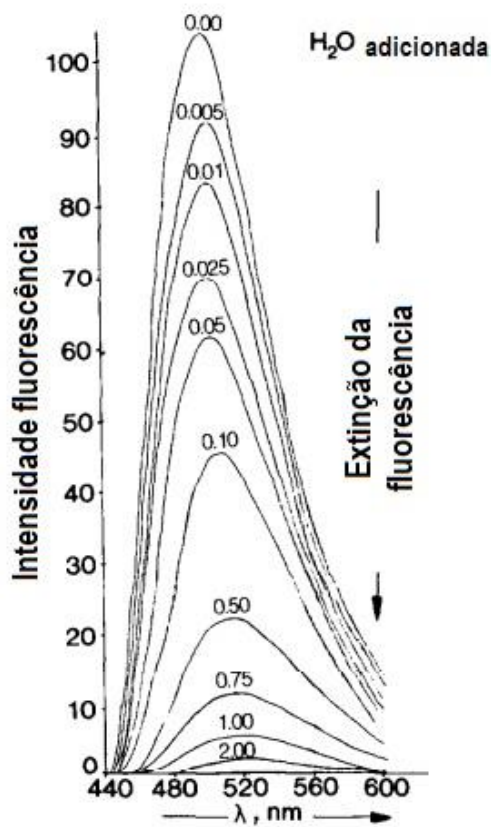
1. Grandi, Telma Sueli Mesquita. **Tratado Das Plantas Medicinais: Mineiras, Nativas e Cultivadas**. Vol 1. 1st ed. Adaequatio Estúdio; 2014.
2. Marchi JP, Tedesco L, Melo ADC, et al. CURCUMA LONGA L., **O AÇAFRÃO DA TERRA, E SEUS BENEFÍCIOS MEDICINAIS**. *Arq Ciênc Saúde UNIPAR*. 2016;20(3). doi:10.25110/arqsaude.v20i3.2016.5871
3. Sueth-Santiago V, Mendes-Silva GP, Decoté-Ricardo D, Lima MEF de. **CURCUMIN, THE GOLDEN POWDER FROM TURMERIC: INSIGHTS INTO CHEMICAL AND BIOLOGICAL ACTIVITIES**. *Quím Nova*. Published online 2015. doi:10.5935/0100-4042.20150035
4. Silva Filho CRM da, Souza AG de, Conceição MM da, Silva TG da, Silva TMS, Ribeiro APL. **Avaliação da bioatividade dos extratos de cúrcuma (Curcuma longa L., Zingiberaceae) em Artemia salina e Biomphalaria glabrata**. *Rev Bras Farmacogn*. 2009;19(4). doi:10.1590/S0102-695X2009000600022
5. National Center for Biotechnology Information. **PubChem Compound Summary for CID 969516, Curcumin**. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Curcumin>. Acesso em 9 de fevereiro de 2022.
6. Priyadarsini K. **The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent**. *Molecules*. 2014;19(12):20091-20112. doi:10.3390/molecules191220091
7. Van Nong H, Hung LX, Thang PN, et al. **Fabrication and vibration characterization of curcumin extracted from turmeric (Curcuma longa) rhizomes of the northern Vietnam**. SpringerPlus. 2016;5(1):1147. doi:10.1186/s40064-016-2812-2
8. Xing, Li, e Robert C. Glen. **“Novel Methods for the Prediction of LogP, p K a , and LogD”**. Journal of Chemical Information and Computer Sciences 42, nº 4 (1º de julho de 2002): 796–805. doi: 10.1021/ci010315d
9. Jasim F, Ali F. **A novel and rapid method for the spectrofluorometric determination of curcumin in curcumin spices and flavors**. *Microchem J*. 1992;46(2):209-214. doi:10.1016/0026-265X(92)90040-A
10. Jovanovic SV, Boone CW, Steenken S, Trinoga M, Kaskey RB. **How Curcumin Works Preferentially with Water Soluble Antioxidants**. *J Am Chem Soc*. 2001;123(13):3064-3068. doi:10.1021/ja003823x
11. Sun YM, Zhang HY, Chen DZ, Liu CB. **Theoretical Elucidation on the Antioxidant Mechanism of Curcumin: A DFT Study**. *Org Lett*. 2002;4(17):2909-2911. doi:10.1021/ol0262789
12. Prasad S, Tyagi AK, Aggarwal BB. **Recent Developments in Delivery, Bioavailability, Absorption and Metabolism of Curcumin: the Golden Pigment from Golden Spice**. *Cancer Res Treat*. 2014;46(1):2-18. doi:10.4143/crt.2014.46.1.2

13. Tarik Alhamdany A, Saeed AMH, Alaayedi M. **Nanoemulsion and Solid Nanoemulsion for Improving Oral Delivery of a Breast Cancer Drug: Formulation, Evaluation, and a Comparison Study.** *Saudi Pharm J.* 2021;29(11):1278-1288. doi:10.1016/j.jsps.2021.09.016
14. Kakkar V, Saini K, Saini M, Kumar M, Narula P, Duggal I. **Comparison of Therapeutic Efficacy of Nanoformulations of Curcumin vs Tetrahydrocurcumin in Various Disorders.** In: Talegaonkar S, Rai M, eds. *Nanoformulations in Human Health.* Springer International Publishing; 2020:377-401. doi:10.1007/978-3-030-41858-8\_17
15. Daudt RM, Emanuelli J, Kulkamp-Guerreiro IC, Pohlmann AR, Guterres SS. **A nanotecnologia como estratégia para o desenvolvimento de cosméticos.** *Ciênc E Cult.* 2013;65(3):28-31. doi:10.21800/S0009-67252013000300011
16. Gold V, ed. **The IUPAC Compendium of Chemical Terminology: The Gold Book.** 4th ed. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC); 2019. doi:10.1351/goldbook
17. Patel KK, Agrawal AK, Singh S. **Preformulation Challenges: The Concept Behind the Selection, Design and Preparation of Nanoformulations.** In: Talegaonkar S, Rai M, eds. *Nanoformulations in Human Health.* Springer International Publishing; 2020:43-71. doi:10.1007/978-3-030-41858-8\_3
18. Pratishtha, Srivastava S, Gupta S. **Nose to Brain Drug Delivery for the Treatment of Epilepsy.** In: Talegaonkar S, Rai M, eds. *Nanoformulations in Human Health.* Springer International Publishing; 2020:169-185. doi:10.1007/978-3-030-41858-8\_8
19. Pandey V, Kohli S. **Nanoformulations in Human Health Conditions: The Paradigm Shift.** In: Talegaonkar S, Rai M, eds. *Nanoformulations in Human Health.* Springer International Publishing; 2020:13-42. doi:10.1007/978-3-030-41858-8\_2
20. Joshi RP, Negi G, Kumar A, et al. **SNEDDS curcumin formulation leads to enhanced protection from pain and functional deficits associated with diabetic neuropathy: An insight into its mechanism for neuroprotection.** *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med.* 2013;9(6):776-785. doi:10.1016/j.nano.2013.01.001
21. Mazzarino, L., Casagrande Bellettini, I., Minatti, E., & Lemos-Senna, E. (2010). **Development and validation of a fluorimetric method to determine curcumin in lipid and polymeric nanocapsule suspensions.** In *Article Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* (Vol. 46, Issue 2).
22. Dumore, Nilesh S., e Mausumi Mukhopadhyay. **“Antioxidant Properties of Aqueous Selenium Nanoparticles (ASeNPs) and Its Catalysts Activity for 1, 1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH) Reduction”.** *Journal of Molecular Structure* 1205 (abril de 2020): 127637. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127637>.
23. Joshi, Mangala & Bhattacharyya, Amitava. (2008). **Characterization techniques for nanotechnology applications in textiles.** *Indian Journal of Fibre and Textile Research.* 33. 304-317.

24. Klang, Victoria, Nadejda B. Matsko, Claudia Valenta, e Ferdinand Hofer. **“Electron Microscopy of Nanoemulsions: An Essential Tool for Characterisation and Stability Assessment”**. *Micron* 43, nº 2–3 (fevereiro de 2012): 85–103. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2011.07.014>.
25. Sharma, Radhika, Shivani Sharma, e Vikas Rana. **“Nanostructure Drug Delivery System: An Inimitable Approach for Candidiasis Therapy”**. Em *Nanoformulations in Human Health*, organizado por Sushama Talegaonkar e Mahendra Rai, 325–57. Cham: Springer International Publishing, 2020. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-41858-8\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-030-41858-8_15).
26. Silva, José Dilson F. da, Yara P. da Silva, Clarisse M. S. Piatnicki, Wolmir José Böckel, e Carla R. B. Mendonça. **“MICROEMULSIONS: COMPONENTS, CHARACTERISTICS, POTENTIALITIES IN FOOD CHEMISTRY AND OTHER APPLICATIONS”**. *Química Nova*, 2015. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150135>.
27. HUNTER, R.J. **Zeta potential in colloid science: principles and applications**. New York: Academic Press, 1981.
28. Massimo, Livia Contini. **Nanopartículas de curcumina: obtenção e caracterização**. 2016. Tese (mestrado) – Curso de bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.
29. Enumo Junior, Adalberto. **Desenvolvimento de fibras eletrofiadas de acetato de celulose recobertas com quitosana contendo curcumina aplicadas em tratamentos cutâneos**. 2020. Tese (doutorado) - Curso de química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020.
30. Lin, Chuan-Chuan, Hung-Yin Lin, Hsu-Chih Chen, Ming-Wen Yu, e Mei-Hwa Lee. **“Stability and Characterisation of Phospholipid-Based Curcumin-Encapsulated Microemulsions”**. *Food Chemistry* 116, nº 4 (outubro de 2009): 923–28. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.052>.
31. Liu, Weirong, Dejun Sun, Caifu Li, Qian Liu, e Jian Xu. **“Formation and Stability of Paraffin Oil-in-Water Nano-Emulsions Prepared by the Emulsion Inversion Point Method”**. *Journal of Colloid and Interface Science* 303, nº 2 (novembro de 2006): 557–63. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2006.07.055>.
32. Đoković, Jelena B., Sanela M. Savić, Jelena R. Mitrović, Ines Nikolic, Bojan D. Marković, Danijela V. Randjelović, Jelena Antic-Stankovic, et al. **“Curcumin Loaded PEGylated Nanoemulsions Designed for Maintained Antioxidant Effects and Improved Bioavailability: A Pilot Study on Rats”**. *International Journal of Molecular Sciences* 22, nº 15 (27 de julho de 2021): 7991. <https://doi.org/10.3390/ijms22157991>.
33. Negri, Myrian Lane Soares, João Carlos Possamai, e Tomoe Nakashima. **“Atividade Antioxidante Das Folhas de Espinheira-Santa - Maytenus illicifolia Mart. Ex Reiss., Secas Em Diferentes Temperaturas”**. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 19, nº 2b (junho de 2009): 553–56. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000400007>.

**Anexo I - Efeito de várias concentrações de água (ml) e poder de fluorescência do sistema curcumina-acetona.**

**Figura 17.** Efeito da água na fluorescência da curcumina avaliado por Jasim e Ali (1992).



Fonte: Adaptado de Jasim e Ali (1992)<sup>9</sup>

### **Apêndice I - tabela com dados utilizados para a curva de calibração**

A concentração corresponde ao ativo utilizando na formulação cedida pela empresa Nanoscopy, que é Extrato de cúrcuma longa (Active Pharma, 95 % curcuminóides).

**Tabela 1.** Dados utilizados para a curva de calibração de extrato de cúrcuma longa (95% curcuminóides)

| <b>Amostra</b> | <b>Intensidade</b>               | <b>[CUR] mg mL<sup>-1</sup></b> | <b>média I</b> |
|----------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------|
| <b>Curc_1</b>  | 26,28097<br>27,20562<br>28,89079 | 0,1                             | 27,45913       |
| <b>Curc_2</b>  | 65,30847<br>66,78981<br>66,17648 | 0,2                             | 66,09159       |
| <b>Curc_3</b>  | 94,00901<br>92,37562<br>91,81783 | 0,3                             | 92,73415       |
| <b>Curc_4</b>  | 119,695<br>120,335<br>121,432    | 0,4                             | 120,48733      |
| <b>Curc_5</b>  | 152,3809<br>153,824<br>152,2349  | 0,5                             | 152,81327      |
| <b>Curc_6</b>  | 182,8445<br>184,8084<br>184,4017 | 0,6                             | 184,01820      |

## **Apêndice II – Tabela com resultados dos testes de estabilidade em diferentes pH**

**Tabela 2.** Variação dos tamanhos de partícula da NCUR em função do pH e do tempo

| pH          | Tamanho de partícula (nm) |        |         |         |         |         |
|-------------|---------------------------|--------|---------|---------|---------|---------|
|             | 0 dias                    | 7 dias | 15 dias | 21 dias | 28 dias | 35 dias |
| <b>pH 3</b> | 20,5                      | 25,5   | 28,3    | 32,1    | 32,9    | 37,8    |
| <b>pH 4</b> | 20,9                      | 27,7   | 29,4    | 33,9    | 36,2    | 40,9    |
| <b>pH 5</b> | 22,2                      | 26,3   | 29,2    | 35,0    | 36,9    | 38,7    |
| <b>pH 6</b> | 20,6                      | 26,2   | 29,2    | 33,2    | 33,5    | 37,5    |
| <b>pH 7</b> | 20,5                      | 24,6   | 28,4    | 33,0    | 34,0    | 37,7    |
| <b>pH 8</b> | 18,9                      | 23,6   | 28,7    | 33,2    | 33,6    | 37,0    |

**Tabela 3.** Variação do potencial zeta da NCUR em função do pH e do tempo

| pH          | Potencial Zeta (mV) |        |         |         |         |         |
|-------------|---------------------|--------|---------|---------|---------|---------|
|             | 0 dias              | 7 dias | 15 dias | 21 dias | 28 dias | 35 dias |
| <b>pH 3</b> | 0,3                 | -0,05  | -0,2    | -0,4    | 0,09    | -0,3    |
| <b>pH 4</b> | -0,9                | -0,6   | -1,3    | -0,7    | -0,6    | -0,6    |
| <b>pH 5</b> | -0,4                | -0,8   | -1,7    | -1,1    | -1,0    | -1,3    |
| <b>pH 6</b> | -1,5                | -1,3   | -1,3    | -1,2    | -1,4    | -1,8    |
| <b>pH 7</b> | -3,1                | -2,5   | -2,1    | -3,0    | -2,4    | -1,5    |
| <b>pH 8</b> | -4,2                | -2,5   | -2,1    | -2,2    | -2,8    | -2,0    |

## **Apêndice III – Tabela com resultados do teste DPPH**

**Tabela 4.** Resultados obtidos no teste DPPH para a curcumina nanoencapsulada

| <b>[CUR] % na dispersão</b> | <b>Atividade antioxidante %</b> |
|-----------------------------|---------------------------------|
| 0,001                       | 11,4                            |
| 0,0025                      | 14,7                            |
| 0,005                       | 30,3                            |
| 0,01                        | 49,8                            |
| 0,025                       | 82,1                            |
| 0,05                        | 89,6                            |
| 0,1                         | 89,2                            |

**Apêndice IV – Tabela com resultados do teste de estabilidade em temperatura ambiente luz/escuro**

**Tabela 5.** Variação da concentração de ativo livre e nanoencapsulado em temperatura ambiente exposto a luz e no escuro

| <b>Dia</b> | <b>[NCUR] LUZ<br/>(mg mL<sup>-1</sup>)</b> | <b>[NCUR] ESCURO<br/>(mg mL<sup>-1</sup>)</b> | <b>[CUR] LUZ<br/>(mg mL<sup>-1</sup>)</b> | <b>[CUR] ESCURO<br/>(mg mL<sup>-1</sup>)</b> |
|------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------|
| <b>1</b>   | 3,397                                      | 3,397                                         | -                                         | -                                            |
| <b>2</b>   | 4,021                                      | 4,060                                         | 0,00158                                   | 0,00340                                      |
| <b>3</b>   | 3,841                                      | 4,206                                         | -                                         | -                                            |
| <b>4</b>   | 3,584                                      | 3,925                                         | -                                         | -                                            |
| <b>5</b>   | 3,747                                      | 4,154                                         | 0,00112                                   | 0,00449                                      |