

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS CONTENDO
CURCUMINA E AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* EM MODELO DE
MELANOMA MURINO B16-F10**

LETÍCIA MAZZARINO

FLORIANÓPOLIS

2009

LETÍCIA MAZZARINO

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS CONTENDO
CURCUMINA E AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* EM MODELO DE
MELANOMA MURINO B16-F10**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientadora: Profa. Dra. Elenara Lemos Senna

FLORIANÓPOLIS

2009

Letícia Mazzarino

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS CONTENDO
CURCUMINA E AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* EM MODELO DE
MELANOMA MURINO B16-F10**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelo Orientador e membros da Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau (UFSC – Membro Titular)

Profa. Dra. Simone Gonçalves Cardoso (UFSC – Membro Titular)

Profa. Dra. Betina Giehl Zanetti Ramos (UFSC – Membro Titular)

Profa. Dra. Elenara Lemos Senna (UFSC – Orientadora)

Profa. Dra. Elenara Lemos Senna

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

Florianópolis, 08 de maio de 2009.

À minha família, minha mãe e irmã pelo incentivo, apoio e amor e,
em especial, ao meu pai, meu grande exemplo de vida.

AGRADECIMENTOS

À minha amada mãe Lizete e minha irmã Raquel pelo carinho, compreensão e atenção. E ao meu pai, meu grande exemplo de vida, pelas eternas lembranças de carinho que me deram força para seguir em frente.

Ao Lucas, pelo amor, companheirismo e incentivo em todos os momentos.

À minha orientadora, Profa. Dra. Elenara Lemos Senna muito obrigada pela orientação, compreensão e carinho.

Ao Prof. Dr. Edson Minatti pela colaboração. E ao Ismael, que além de ter me auxiliado na utilização do fluorímetro inúmeras vezes, tornou-se um grande amigo.

À Profa. Dra. Maria Cláudia Santos Silva pela disponibilidade e otimismo, e à Juliana e Marley pela dedicação e auxílio com a cultura celular.

Ao Prof. Dr. Jamil Assreuy por permitir a utilização de seu laboratório. E à Letícia e ao Jarbas por me ajudarem na realização dos ensaios *in vivo*.

À Profa. Dra. Simone Cardoso Gonçalves pelas contribuições feitas durante o planejamento e análise do estudo de estabilidade.

À minha professora de graduação Miriam Knorst, por ter sempre acreditado em mim e ser minha maior incentivadora.

Às colegas e amigas do laboratório Mariana, Daiane, Daniela, Juliana, Carine e Tatyane pela amizade, companheirismo e apoio. E um agradecimento especial à Cristiana, que considero minha “co-orientadora”, pelas importantes informações e conselhos durante o trabalho.

Aos funcionários Nilson e Sandra, pela atenção dispensada.

Muito obrigada!

RESUMO

A vetorização de agentes antineoplásicos através de nanopartículas é uma estratégia promissora para o tratamento do câncer. Dentre os fármacos existentes, a curcumina, composto natural extraído do açafrão (*Curcuma longa* L.), tem sido extensivamente estudada devido a sua ampla variedade de propriedades farmacológicas, em especial a atividade antitumoral. Porém, os problemas de baixa estabilidade e biodisponibilidade inerentes a este composto requerem o aprimoramento da forma farmacêutica. Assim, o presente trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento de suspensões coloidais de nanocápsulas lipídicas e poliméricas contendo curcumina a fim de melhorar a estabilidade e eficácia terapêutica deste fármaco. As suspensões de nanocápsulas lipídicas e poliméricas foram preparadas pelas técnicas de inversão de fases e nanoprecipitação, respectivamente. Após o desenvolvimento e validação de um método fluorimétrico para quantificação da curcumina nas formulações, a influência da quantidade de curcumina inicialmente adicionada sobre a eficiência de encapsulação, taxa de recuperação e teor de fármaco foi avaliada. A eficiência de encapsulação foi superior a 99 % e a curcumina foi completamente recuperada em todas as preparações, enquanto o teor de fármaco variou entre 127,04 a 509,49 µg/mL. Ambos os métodos permitiram a obtenção de partículas submicrônicas com um diâmetro médio de 140 nm para os sistemas poliméricos e 40 nm para os lipídicos. Partículas esféricas, apresentando uma estrutura do tipo núcleo-casca foram visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão. Os ensaios de liberação *in vitro* realizados em tampão acetato pH 5,0 a 37 °C contendo 0,25 % (p/v) de lauril sulfato de sódio demonstraram um efeito *burst* inicial, seguido por uma liberação sustentada por até 48 horas para todas amostras testadas. As nanocápsulas lipídicas conduziram a mais rápida liberação da curcumina, quando comparadas as nanocápsulas poliméricas, podendo este resultado ser relacionado ao tamanho reduzido, à maior área superficial e à parede mais fina das partículas. Estudos de estabilidade hidrolítica e fotoquímica mostraram que a associação da curcumina às nanocápsulas reduz a velocidade de degradação do fármaco frente à exposição à luz UV e em pH 7,4. A captura da curcumina livre e encapsulada foi observada por microscopia de fluorescência, após incubação com células de macrófagos murino J774. Os resultados indicaram que a captura do fármaco é reduzida pelo uso destes sistemas coloidais. A eficácia das suspensões de nanocápsulas foi avaliada em linhagem celular de melanoma murino B16-F10 *in vitro* e *in vivo*. A curcumina livre e encapsulada reduziu significativamente a viabilidade das células tumorais de maneira concentração e tempo dependente, por indução de apoptose celular. Nos estudos *in vivo*, estas formulações induziram a redução significativa do volume tumoral formado. Assim, a encapsulação da curcumina em nanocápsulas poliméricas e lipídicas mostrou ser benéfica no que diz respeito à melhoria da estabilidade e da eficácia terapêutica deste fármaco.

Palavras-chave: Curcumina. Nanocápsulas Lipídicas. Nanocápsulas Poliméricas. Sistemas de Liberação de Fármacos. Melanoma. Células B16-F10.

ABSTRACT

The targeting of antineoplastic drugs with nanoparticles is a promising strategy for the treatment of cancer. Within the existing drugs, curcumin, a natural compound extracted from turmeric (*Curcuma longa* L.), has been extensively studied due to its wide variety of pharmacological properties, in special its antitumor activity. However, problems arising from the low stability and bioavailability exhibited by this compound require the improvement of its pharmaceutical form. So, the main objective of the present work was to develop colloidal suspensions of lipid and polymeric nanocapsules containing curcumin, aiming to improve the stability and therapeutic efficacy of this drug. Lipid and polymeric nanocapsule suspensions were prepared using the phase inversion and nanoprecipitation methods, respectively. After the development and validation of a fluorimetric method for the quantitation of curcumin in the formulations, the influence exerted by the initial amount of curcumin on encapsulation efficiency, drug recovery, and drug content was evaluated. The encapsulation efficiency values were higher than 99 % and curcumin was completely recovered in all preparations, with drug content ranging from 127.04 to 509.49 $\mu\text{g/mL}$. Both methods yielded submicronic particles with a mean size of 140 nm for polymeric and 40 nm for lipid systems. Spherical particles, displaying core-shell type structures were visualized by transmission electronic microscopy. The *in vitro* release studies carried out using buffer acetate pH 5.0 containing 0.25 % (w/v) of sodium dodecyl sulfate maintained at 37 °C demonstrated an initial burst effect followed by a sustained release of the drug over 2 days for all samples tested. Lipid nanocapsules induced faster release of curcumin when compared to polymeric nanocapsules, possibly due to the smaller size, higher particle surface area, and the thinner shell of lipid nanocapsules. Hydrolytic and photochemical stability studies showed that the association of curcumin with nanocapsules delayed the degradation of curcumin under UV radiation and at 7.4 pH. The uptake of free and curcumin-loaded nanocapsules was assayed by fluorescence microscopy after incubation with murine macrophage J774 cells. The results indicate that drug uptake is reduced with the use of these colloidal systems. The efficacy of nanocapsules suspensions was evaluated in B16-F10 mouse epithelial-like melanoma cell line *in vitro* and *in vivo*. Free and encapsulated curcumin caused significant reduction of cell viability in a concentration- and time-dependent manner inducing apoptosis. In the *in vivo* studies, these formulations significantly reduced tumor volume. Thus, the encapsulation of curcumin in lipid and polymeric nanocapsules proved beneficial for the improvement of stability and therapeutic efficacy of this drug.

Keywords: Curcumin. Lipid Nanocapsules. Polymeric Nanocapsules. Drug Delivery Systems. Melanoma. B16-F10 Cells.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1: Revisão de Literatura

Figura 1. Tipos de câncer mais incidentes na população brasileira, excluindo câncer de pele não melanoma, estimados para o ano de 2008 23

Figura 2. Representação espacial das taxas brutas de incidência de melanoma maligno de pele por 100 mil homens e mulheres, estimadas para o ano de 2008, segundo a Unidade da Federação..... 27

Publicação: Curcumin: a review about the strategies aiming at the improvement of its bioavailability and its effective use in therapeutics

Figura 1. *Curcuma longa* Linn 43

Figura 2. Estrutura química dos curcuminóides: curcumina (A), demetoxicurcumina (B) e bisdemetoxicurcumina (C) 46

Figura 3. Aspectos macroscópicos das suspensões de nanocápsulas: (A) lipídicas brancas (sem fármaco); (B) lipídicas contendo curcumina; (C) poliméricas brancas preparadas com Pluronic F68; (D) poliméricas contendo curcumina preparadas com Pluronic F68, e (E) poliméricas contendo curcumina preparadas com Solutol HS15 como surfactante..... 57

Capítulo 2: Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para Doseamento da Curcumina Encapsulada em Sistemas Nanoestruturados

Publicação: Development and validation of a fluorimetric method to determine curcumin in lipid and polymeric nanocapsule suspension

Figure 1. Chemical structure of curcumin 70

Figure 2. Emission spectra obtained for: (A) curcumin standard solution, 1 µg/mL; (B,C,D) unloaded polymeric nanocapsule suspensions prepared using Pluronic F68, unloaded polymeric nanocapsule suspensions prepared using Solutol HS15, and unloaded lipid nanocapsule suspensions, respectively 77

Capítulo 3: Desenvolvimento, Caracterização e Avaliação da Estabilidade de Nanocápsulas Contendo Curcumina

Publicação: Curcumin-loaded polymeric and lipid nanocapsules: preparation, characterization and chemical stability evaluation

- Figure 1.** Transmission electron micrographs of nanocapsules suspensions: (a) LNC, (b) PNC_P and (c) PNC_S 102
- Figure 2.** *In vitro* curcumin release from nanocapsule suspensions in sodium acetate buffer solution pH 5.0 containing 0.25 % (w/v) of sodium dodecyl sulfate buffer at 37 °C 104
- Figure 3.** Degradation kinetics obtained in the evaluation of hydrolytic (a) and photochemical stability (b) of curcumin associated with polymeric and lipid nanocapsule suspensions. *P < 0.05 when compared with initial curcumin content (n = 3) 107

Capítulo 4: Avaliação da Atividade Antitumoral de Nanocápsulas contendo Curcumina

Publicação: Lipid and polymeric nanocapsules containing curcumin: in vitro and in vivo activity on B16-F10 melanoma

- Figure 1.** Cytotoxic effect of free curcumin and curcumin-loaded nanocapsules suspensions on B16-F10 melanoma cells after 24, 48, and 72 hours of incubation. Free curcumin (*circle*), Cur-LNC (*square*), Cur-PNC_P (*triangle*) and Cur-PNC_S (*inversed triangle*). Optical density of control groups was taken as 100% cell viability as confirmed by Trypan Blue exclusion method. *P < 0.05 compared with the control group; #P < 0.05 compared with free curcumin at the same concentration (n = 3) 128
- Figure 2.** Cytomorphological changes of B16-F10 melanoma cells induced by free curcumin and curcumin-loaded nanocapsules suspensions upon 48 h incubation. (A) Control, (B) Free curcumin, (C) Cur-LNC, (D) Cur-PNC_S and (E) Cur-PNC_P. Viable cells exhibited a green fluorescence (acridine orange staining) whereas apoptotic cells exhibited an orange-red nuclear fluorescence (ethidium bromide staining) 129
- Figure 3.** Fluorescence microscopy images of J774 cells upon 60 min incubation in the dark with (A) Cur-LNC, (B) Cur-PNC_S, (C) Cur-PNC_P and (D) free curcumin. Yellow fluorescence indicates the distribution of curcumin in the macrophages 131
- Figure 4.** Effect of free curcumin, unloaded and curcumin-loaded nanocapsules on tumor growth inhibition in mice inoculated with 1×10^6 B16-F10 melanoma cells. *P < 0.05 and **P < 0.01 compared with control (n = 8) 132

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1: Revisão de Literatura

Publicação: Curcumin: a review about the strategies aiming at the improvement of its bioavailability and its effective use in therapeutics

Tabela 1. Atividades farmacológicas da curcumina	44
Tabela 2. Melhoria das propriedades da curcumina proporcionada pelo emprego de sistemas de liberação.....	48

Capítulo 2: Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para Doseamento da Curcumina Encapsulada em Sistemas Nanoestruturados

Publicação: Development and validation of a fluorimetric method to determine curcumin in lipid and polymeric nanocapsule suspension

Table 1. Results obtained in the precision evaluation of the method	78
Table 2. Recovery of curcumin standard solution added to nanocapsule suspension samples	79
Table 3. Drug content and drug recovery results obtained after curcumin quantitation of the nanocapsule suspensions	80

Capítulo 3: Desenvolvimento, Caracterização e Avaliação da Estabilidade de Nanocápsulas Contendo Curcumina

Publicação: Curcumin-loaded polymeric and lipid nanocapsules: preparation, characterization and chemical stability evaluation

Table 1. Entrapment efficiency and curcumin content obtained after curcumin quantitation of the nanocapsule suspensions	100
Table 2. Physicochemical characteristics of unloaded and curcumin-loaded polymeric and lipid nanocapsules	101
Table 3. The rate constants and half-lives for the overall degradation of curcumin in lipid and polymeric nanocapsule after 30 days of UV exposure, according to first-order kinetics	108

Capítulo 4: Avaliação da Atividade Antitumoral de Nanocápsulas contendo Curcumina

Publicação: Lipid and polymeric nanocapsules containing curcumin: in vitro and in vivo activity on B16-F10 melanoma

Table 1. Summary of the physicochemical properties of curcumin-loaded lipid and polymeric nanocapsule suspensions	126
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN - ácido desoxirribonuclêico

ANOVA - analysis of variance

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

Cur-LNC - curcumin-loaded lipid nanocapsules

Cur-PNC_P - curcumin-loaded polymeric nanocapsules prepared using Pluronic F68

Cur-PNC_S - curcumin-loaded polymeric nanocapsules prepared using Solutol HS15

DMEM - Dulbecco's modified Eagle's medium

EPR - enhanced permeability and retention

FDA - Food and Drug Administration

IC₅₀ - concentração inibitória para 50 % de células

ICH - International Conference on Harmonization

INCA - Instituto Nacional do Câncer

LNC - lipid nanocapsules

LOD – limit of detection

LOQ - limit of quantification

MPS - mononuclear phagocyte system

NC - nanocapsule

OMS - Organização Mundial de Saúde

P.I. - polydispersity index

PBS - phosphate-buffered saline

PCL - poli- ϵ -caprolactona

PEG - polietilenoglicol

PGA - poli ácido glicólico

Pgp - glicoproteína-P

PHAs – polihidroxiálcanoatos

PIT- process inversion temperature

PLA - poli ácido láctico

PLA-PEG - poli ácido láctico-polietilenoglicol

PLGA - poli ácido láctico-co-glicólico

PLGA-PEG - poli ácido láctico-co-glicólico-polietilenoglicol

PNC - polymeric nanocapsules

PNC_P - polymeric nanocapsules prepared using Pluronic F68

PNC_S - polymeric nanocapsules prepared using Solutol HS15

RSD - relative standard deviation

SD - standard deviation

SFM - sistema fagocitário mononuclear

TEM - transmission electron microscope

UV - ultravioleta

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	15
OBJETIVOS	19
Objetivo Geral	19
Objetivos Específicos	19
CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA	21
1 CÂNCER.....	22
1.1 Patogenia do câncer	24
1.2 Tratamento do câncer	25
1.3 Melanoma	26
2 VETORIZAÇÃO DE FÁRMACOS	28
2.1 Nanopartículas	29
2.1.1 Nanocápsulas poliméricas	30
2.1.2 Nanocápsulas lipídicas	32
2.2 Destino das nanopartículas <i>in vivo</i>	34
2.3 Nanopartículas no tratamento do câncer	36
3 CURCUMINA.....	39
<i>Publicação: Curcumin: a review about the strategies aiming at the improvement of its bioavailability and its effective use in therapeutics</i>	<i>40</i>
CAPÍTULO 2: VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DOSEAMENTO DA CURCUMINA ENCAPSULADA EM SISTEMAS NANOESTRUTURADOS	65
<i>Publicação: Development and validation of a fluorimetric method to determine curcumin in lipid and polymeric nanocapsule suspensions.....</i>	<i>68</i>
CAPÍTULO 3: DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE NANOCÁPSULAS CONTENDO CURCUMINA.....	86
<i>Publicação: Curcumin-loaded polymeric and lipid nanocapsules: preparation, characterization and chemical stability evaluation</i>	<i>88</i>

CAPÍTULO 4: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE NANOCÁPSULAS CONTENDO CURCUMINA.....	112
<i>Publicação: Lipid and polymeric nanocapsules containing curcumin: in vitro and in vivo activity on B16-F10 melanoma.....</i>	<i>114</i>
DISCUSSÃO GERAL	138
CONCLUSÕES.....	143
REFERÊNCIAS	145
ANEXOS	155

INTRODUÇÃO GERAL

O câncer é uma das principais causas de morte nos países desenvolvidos e a segunda causa de morte por doença no Brasil, seguindo-se as doenças cardiovasculares (ALMEIDA et al., 2005). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), as estimativas para o ano de 2008, válidas também para 2009, apontam 466.730 novos casos de câncer (BRASIL, 2007). O melanoma é a forma mais agressiva de câncer de pele e é caracterizado pela proliferação anormal dos melanócitos que invadem a membrana basal (SIWAK et al., 2005). O melanoma é menos freqüente do que os outros tumores de pele, no entanto sua letalidade é a mais elevada, sendo responsável por 80 % das mortes associadas a este tipo de câncer (MOLIFE & HANCOCK, 2002). Entre os fatores de risco para o desenvolvimento do melanoma pode-se citar: exposição solar, fenótipo do paciente, história familiar, história de melanoma prévio, doenças imunossupressoras e exposição ocupacional, sendo a exposição excessiva à radiação UV responsável pela ocorrência da maioria dos casos de melanoma (BRAUD et al., 2003; BRASIL, 2007). Apesar de ser perfeitamente prevenível, o melanoma está atingindo proporções alarmantes. Sua taxa de incidência vem aumentando mais rapidamente que qualquer outro tumor, a Organização Mundial de Saúde estima 132.000 novos casos de melanoma cutâneo por ano (GIBLIN & THOMAS, 2007). Nos Estados Unidos, esta forma de câncer é a mais comum (PAPPO, 2003). Para o Brasil, as estimativas do INCA em 2008 foram de 5.920 novos casos de melanoma, tendo as maiores taxas estimadas na região Sul. Sendo assim, faz-se necessário a investigação de novas estratégias terapêuticas que reduzam a mortalidade e a morbidade associada a esta doença.

A quimioprevenção baseia-se no uso de substâncias que possam inibir, reverter ou retardar o processo de carcinogênese em vários estágios. Estudos experimentais e epidemiológicos descrevem que mais de 90 % dos cânceres são associados tanto a processos mutagênicos como mitogênicos. Assim, as estratégias de quimioprevenção incluem a utilização de substâncias capazes de inibir ou reverter estes processos celulares, em especial a apoptose diminuída, proliferação acelerada e maturação ou diferenciação celular. Os agentes de quimioprevenção presentes na alimentação humana constituem um grupo promissor de compostos, considerando-se sua segurança, baixa toxicidade e aceitabilidade (FRESCO et al., 2006). Uma ampla variedade de compostos naturais, principalmente compostos fenólicos e flavonóides provenientes da dieta, vêm sendo investigada pela sua potencial utilização no câncer como agentes quimopreventivos. Estas substâncias têm demonstrado atividades anticarcinogênicas e antimutagênicas, que estão principalmente relacionadas às suas propriedades antioxidantes e antiinflamatórias. Neste sentido, recentemente, um grande

interesse tem surgido na identificação de compostos naturais para a prevenção da fotocarcinogênese (BALIGA & KATIYAR, 2006).

A curcumina é a substância ativa extraída do rizoma da *Curcuma longa* Linn, uma planta pertencente à família Zingiberaceae, característica de regiões tropicais e subtropicais da Índia e China. Popularmente chamada de açafrão, é amplamente empregada na alimentação como corante e flavorizante. O emprego desta planta como remédio caseiro para uma variedade de doenças surgiu há séculos na medicina Indiana. A medicina Ayurveda documenta a utilização do pó obtido do rizoma do açafrão para o tratamento de várias condições respiratórias, desordens hepáticas, anorexia, reumatismo, sintomas da diabetes, coriza, tosse e sinusite, e o uso de uma pasta dessa substância em infecções oculares, picadas de insetos, queimaduras, acne e outras doenças de pele (ARAÚJO & LEON, 2001).

Nas últimas décadas, muitos dos efeitos terapêuticos observados na medicina tradicional do Oriente pela utilização do açafrão têm sido confirmados pela pesquisa científica moderna. A curcumina exibe diversas atividades farmacológicas incluindo antiinflamatória, antitumoral, antioxidante, antimicrobiana, entre outras, além de estar relacionada a efeitos benéficos à saúde. Extensivas pesquisas têm demonstrado o potencial da utilização da curcumina no tratamento do câncer, devido ao efeito inibitório da formação de lesões neoplásticas induzidas por carcinógenos químicos ou pela radiação. De fato, pesquisas científicas têm provado que a curcumina interage com diversos alvos moleculares, influenciando numerosas rotas bioquímicas. Dentre os alvos moleculares encontram-se fatores de transcrição, fatores de crescimento e seus receptores, citocinas, enzimas, e genes que regulam a proliferação celular e a apoptose (GOEL et al., 2008).

Embora o grande interesse farmacêutico relacionado à curcumina tenha aumentado consideravelmente, o uso terapêutico deste composto tem sido limitado devido a sua baixa solubilidade aquosa, a qual resulta numa baixa absorção após administração oral ou impede a obtenção de soluções para administração intravenosa. Além disso, a curcumina exibe alta taxa de decomposição em pH neutro ou básico e susceptibilidade à degradação fotoquímica (TONNESEN, 2002; TONNESEN et al., 2002; TOMREN et al., 2007). Em conjunto com estes fatores, o rápido metabolismo e a rápida eliminação sistêmica também contribuem para os reduzidos níveis séricos e teciduais deste interessante composto fenólico e, portanto, para a sua baixa biodisponibilidade (ANAND et al., 2007).

A utilização de carreadores nanoestruturados para a liberação de fármacos vem sendo uma área de grande interesse nas últimas décadas (SCHAFFAZICK et al., 2003). Entre os novos sistemas de liberação de fármacos, as nanopartículas têm sido consideradas promissores carreadores para agentes terapêuticos, devido à capacidade de proteger as moléculas ativas contra degradação em meio fisiológico, liberar controladamente a substância ativa no sítio de ação e conduzir à redução dos efeitos colaterais indesejáveis decorrentes da ampla destruição do fármaco no organismo (GREF et al., 1995; GUPTE & CIFTCI, 2004). O uso de nanopartículas ainda pode ser associado a outras importantes vantagens como a possibilidade de veicular fármacos hidrofóbicos pela via intravenosa, a facilidade de preparação e sua estabilidade nos fluidos biológicos e durante o armazenamento (FONSECA et al., 2002). A associação de carreadores nanoestruturados a agentes antineoplásicos constitui uma estratégia promissora para contornar os efeitos colaterais, limitações e inconveniências da quimioterapia convencional (FERRARI, 2005; YIH & WEI, 2005). A utilização das nanopartículas no tratamento do câncer baseia-se na sua habilidade em extravasar para o interstício de tumores sólidos liberando doses concentradas de fármacos em locais específicos, pelo efeito de permeabilidade e retenção aumentadas e, conseqüentemente, reduzindo a exposição aos tecidos saudáveis e diminuindo a possibilidade de efeitos tóxicos (BARRATT, 2003; MOHANRAJ & CHEN, 2006).

Entre as técnicas utilizadas para obtenção destes sistemas coloidais, uma das mais empregadas é a nanoprecipitação ou nanodeposição do polímero pré-formado. As propriedades das nanopartículas poliméricas podem ser facilmente controladas pela modificação das condições de preparação e dos materiais empregados. Entretanto, a utilização dos sistemas poliméricos apresenta algumas limitações provenientes dos resíduos dos solventes orgânicos usados na produção, da citotoxicidade dos materiais polímeros e da dificuldade de escalonamento da produção (MEHNERT & MÄDER, 2001; HEURTAULT et al., 2002). Neste sentido, esforços têm sido realizados com o intuito de obter carreadores de fármacos nanoestruturados usando somente excipientes aprovados para uso interno. O método de inversão de fases tem se mostrado promissor uma vez que é relativamente simples, consome pouca energia, não apresenta problemas quanto ao escalonamento da produção, e permite a obtenção de suspensões coloidais de nanocápsulas lipídicas com tamanho de partícula reduzido e elevada estabilidade, sem a utilização de solventes orgânicos, cujos resíduos representam um risco potencial para a saúde humana (HEURTAULT et al., 2002; HEURTAULT et al., 2003; DULIEU & BAZILE, 2005; BÉDUNEAU et al., 2006).

Assim, considerando o exposto acima, este trabalho tem como objetivo desenvolver nanocápsulas lipídicas e poliméricas contendo curcumina com vista à melhoria das suas propriedades biofarmacêuticas, na busca do aproveitamento de seu potencial terapêutico no tratamento do melanoma. Neste trabalho, suspensões de nanocápsulas lipídicas e poliméricas são preparadas e caracterizadas, e a capacidade em incorporar a curcumina, bem como protegê-la da degradação, é avaliada e comparada.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Desenvolver suspensões coloidais de nanocápsulas lipídicas e poliméricas contendo curcumina e avaliar a atividade citotóxica *in vitro* e antitumoral *in vivo* em modelo de melanoma murino B16-F10.

Objetivos Específicos

- Preparar suspensões coloidais de nanocápsulas lipídicas e poliméricas contendo curcumina por meio da técnica de inversão de fases e nanoprecipitação, respectivamente;
- Desenvolver e validar uma metodologia analítica para o doseamento da curcumina nas suspensões de nanocápsulas;
- Caracterizar as suspensões coloidais de nanocápsulas quanto ao teor de fármaco, eficiência de encapsulação, tamanho das partículas, potencial zeta e morfologia;
- Avaliar o efeito da encapsulação da curcumina sobre sua estabilidade hidrolítica e fotoquímica;
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* da curcumina a partir das nanocápsulas;
- Avaliar e comparar a atividade citotóxica *in vitro* da curcumina livre e nanoencapsulada sobre a linhagem celular de melanoma murino B16-F10, bem como o mecanismo de indução da morte celular;

- Avaliar e comparar a eficácia terapêutica da curcumina livre e nanoencapsulada em modelo de melanoma murino B16-F10 subcutâneo.

CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA

1 CÂNCER

Câncer pode ser definido como uma doença caracterizada pela multiplicação e propagação descontroladas de formas anormais das próprias células corporais (RANG et al., 2004). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA, 2008).

A definição científica de câncer refere-se ao termo neoplasia, especificamente aos tumores malignos, diferenciando-se dos tumores benignos pelas suas propriedades de desdiferenciação, poder de invasão e capacidade de formação de metástases (RANG et al., 2004). Por outro lado, um tumor benigno refere-se simplesmente a uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo risco de vida (INCA, 2008).

O câncer é uma das principais causas de morte nos países desenvolvidos. Em 2005, o câncer foi responsável por 7,6 milhões de mortes, aproximadamente 13 % de todas as mortes ocorridas no mundo. Os cinco principais tipos de câncer com maior mortalidade foram: de pulmão, estômago, fígado, cólon e mama. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que em 2020 o número de casos novos anuais seja em torno de 15 milhões (BRASIL, 2007).

Atualmente, esta doença é o maior problema de saúde pública nos Estados Unidos, sendo responsável por uma em quatro mortes neste país. Para o ano de 2008, foram estimados 1.437.180 novos casos e 565.650 mortes de câncer nos Estados Unidos (JEMAL et al., 2008). No Brasil, o câncer constitui a segunda causa de morte por doença, depois das doenças cardiovasculares. De acordo com o INCA, as estimativas para o ano de 2008, válidas também para 2009, apontam 466.730 novos casos de câncer no Brasil. Os tipos de câncer mais incidentes na população brasileira, excluindo câncer de pele não melanoma, estimados para o ano de 2008 estão mostrados na Figura 1 (BRASIL, 2007).

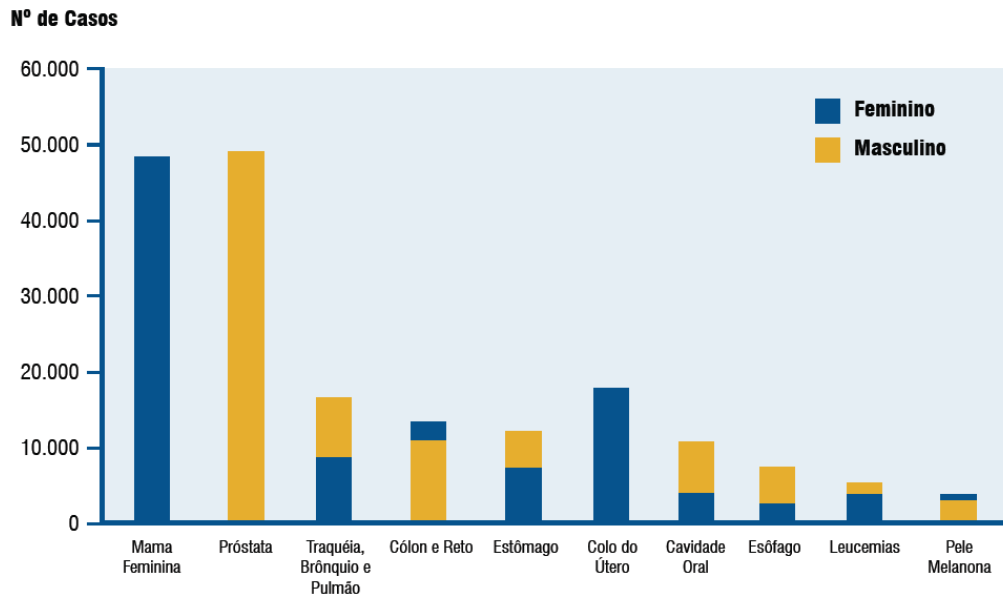


Figura 1. Tipos de câncer mais incidentes na população brasileira, excluindo câncer de pele não melanoma, estimados para o ano de 2008.

Fonte: BRASIL, 2007.

As causas de câncer são variadas podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas são aquelas relacionadas ao meio ambiente e aos hábitos de um ambiente social ou cultural. Enquanto, as causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas e estão relacionadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. Esses fatores causais podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais (INCA, 2008).

Cerca de 80 a 90 % dos casos de câncer estão associados a fatores ambientais. No meio ambiente são encontrados um grande número de fatores de risco. Entende-se por ambiente o meio em geral (água, terra e ar), o ambiente ocupacional (indústrias químicas e afins), o ambiente social e cultural (estilo e hábitos de vida) e o ambiente de consumo (alimentos e medicamentos). As mudanças provocadas no meio ambiente pelo homem, os hábitos e o estilo de vida adotados pelas pessoas podem determinar diferentes tipos de câncer, como por exemplo: o cigarro pode causar câncer de pulmão, a exposição excessiva ao sol pode causar câncer de pele, e alguns vírus podem causar leucemia. Os fatores de risco ambientais de câncer são denominados cancerígenos ou carcinógenos, e atuam alterando a estrutura genética das células. O surgimento do câncer depende da intensidade e duração da exposição das células aos agentes causadores de câncer (INCA, 2008).

Os casos de cânceres que se devem exclusivamente a fatores hereditários, familiares e étnicos são raros, apesar de o fator genético exercer um importante papel na oncogênese. Um exemplo são os indivíduos portadores de retinoblastoma que, em 10 % dos casos, apresentam história familiar deste tumor. Alguns tipos de câncer de mama, estômago e intestino parecem ter um forte componente familiar, embora não se possa afastar a hipótese dos membros da família a uma causa comum (INCA, 2008).

1.1 Patogenia do câncer

As células tumorais se distinguem das células normais por apresentarem quatro características principais: proliferação descontrolada, desdiferenciação e perda da função, poder de invasão e metástase.

Uma célula normal transforma-se em uma célula tumoral em decorrência de uma ou mais mutações em seu ADN (mutação genética), que podem ser herdadas ou adquiridas. As principais alterações genéticas que levam ao desenvolvimento do câncer são:

- *Ativação de proto-oncogenes em oncogenes*: os proto-oncogenes, genes especiais inativos em células normais, podem ser convertidos a oncogenes, responsáveis pela malignização de células normais, pela ação de determinados vírus ou carcinógenos;
- *Inativação de genes supressores tumorais*: as células normais contêm genes supressores tumorais (capazes de suprimir alterações malignas), cuja perda da função pode constituir um evento crítico na carcinogênese (RANG et al., 2004).

As células alteradas passam a comportar-se de maneira anormal, multiplicando-se de forma descontrolada. Com a proliferação celular constante, faz-se necessário o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos (angiogênese) para que haja a nutrição das células e o crescimento da massa tumoral. As células cancerosas, ainda, podem adquirir a capacidade de se desprenderem do tumor e migrarem para tecidos vizinhos, podendo alcançar o interior de um vaso sanguíneo ou linfático e disseminarem-se até órgãos distantes, formando metástases. Em geral, as células tumorais são menos especializadas nas suas funções do que as suas correspondentes normais. Assim, conforme as células cancerosas vão substituindo as normais, os tecidos invadidos vão perdendo as suas funções (ALMEIDA et al., 2005).

1.2 Tratamento do câncer

Existem três principais caminhos para alcançar a estabilização do câncer: intervenção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. A técnica cirúrgica pode levar à remoção dos tumores com eficácia, quando não houver metástase. Contudo, em alguns tipos específicos de câncer pode ser necessário o uso de outros tipos de terapias, como por exemplo, o transplante de medula no caso de leucemias. A radioterapia é usada comumente em conjunto com a cirurgia, com o intuito de aumentar a eficiência do tratamento. E mesmo isoladamente, a radioterapia pode diminuir o tamanho do tumor, a recorrência e a chance de metástase, sendo uma metodologia muito utilizada apesar das severas limitações decorrentes dos efeitos colaterais. Um terço dos pacientes consegue ser curado através de medidas locais (cirurgia ou radioterapia), porém, em cerca de 60 a 70 % dos casos é necessário o tratamento quimioterápico devido à formação de metástases (ALMEIDA et al., 2005).

A efetividade do tratamento quimioterápico está diretamente relacionada à sua habilidade em destruir as células cancerosas, afetando o menor número possível de células saudáveis. A seletividade do tratamento é inerente a natureza do agente antineoplásico em atuar mais intensivamente sobre células cancerosas. Contudo, a administração de altas doses de quimioterápicos ocasiona alguns efeitos colaterais que algumas vezes são tão intensos que promovem a descontinuidade do tratamento pelo paciente antes que o fármaco tenha erradicado o câncer (BRANNON-PEPPAS & BLANCHETTE, 2004).

A maioria dos agentes antineoplásicos atualmente utilizados na clínica afeta apenas o processo de divisão celular das células cancerosas, ou seja, trata-se apenas de agentes antiproliferativos. Estes fármacos não exercem nenhum efeito inibitório específico sobre o poder de invasão, perda da diferenciação ou tendência metastática. Além disso, afetam células de tecidos normais que se dividem rapidamente e, por conseguinte, tendem a produzir efeitos tóxicos como: mielossupressão, cicatrização deficiente de feridas, alopecia, lesão do epitélio gastrointestinal, retardamento do crescimento em crianças, esterilidade e teratogenicidade, além de náuseas e vômitos intensos, que são considerados obstáculos à adesão do paciente ao tratamento (RANG et al., 2004).

1.3 Melanoma

O melanoma é a forma mais agressiva de câncer de pele e é caracterizado pela proliferação anormal dos melanócitos que invadem a membrana basal (SIWAK et al., 2005). O melanoma é menos freqüente do que os outros tumores de pele, no entanto sua letalidade é a mais elevada, sendo responsável por 80 % das mortes associadas a este tipo de câncer (MOLIFE & HANCOCK, 2002). Entre os fatores de risco para o desenvolvimento do melanoma pode-se citar: exposição solar, fenótipo do paciente, história familiar, história de melanoma prévio, doenças imunossupressoras e exposição ocupacional, sendo a exposição excessiva à radiação UV responsável pela ocorrência da maioria dos casos de melanoma (BRAUD et al., 2003; BRASIL, 2007).

Embora seja perfeitamente prevenível, o melanoma está atingindo proporções alarmantes. A taxa de incidência vem aumentando mais rapidamente que qualquer outro tumor. A OMS estima a ocorrência de 132.000 novos casos de melanoma cutâneo por ano no mundo (GIBLIN & THOMAS, 2007). Nos Estados Unidos, esta forma de câncer é a sexta mais comum, sendo estimados 62.480 novos casos e 8.420 mortes por melanoma para o ano de 2008 (JEMAL et al., 2008). Para o Brasil, as estimativas do INCA em 2008 foram de 5.920 novos casos de melanoma, tendo as maiores taxas estimadas na região Sul (Figura 2) (BRASIL, 2007).

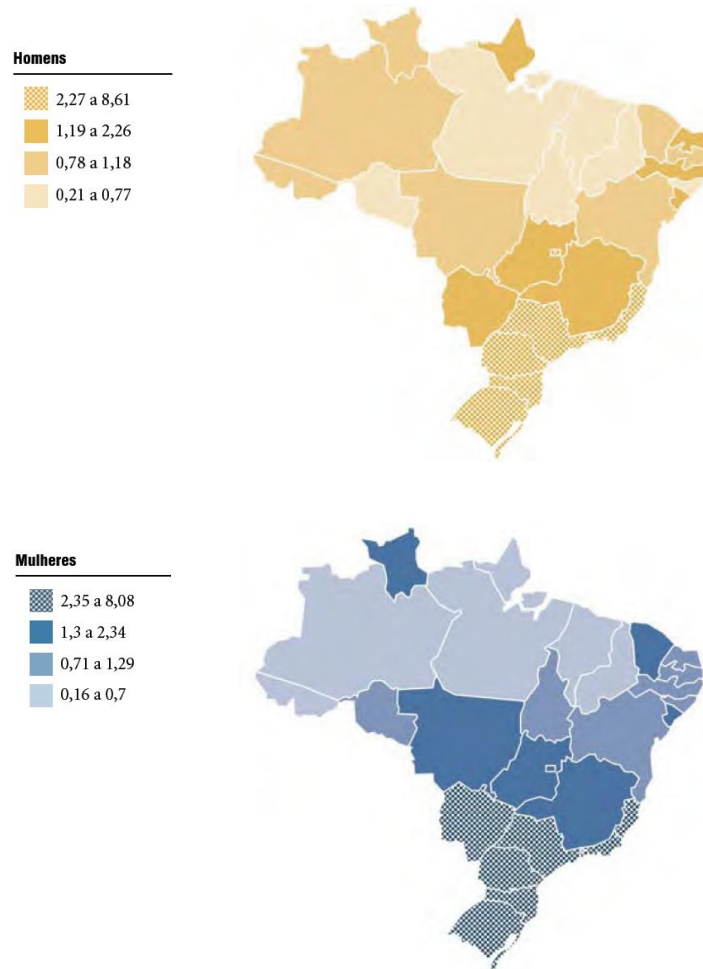


Figura 2. Representação espacial das taxas brutas de incidência de melanoma maligno de pele por 100 mil homens e mulheres, estimadas para o ano de 2008, segundo a Unidade da Federação.

Fonte: BRASIL, 2007.

Apesar da variedade de estratégias antitumorais, a taxa de sobrevida média ainda é de 6 a 10 meses. Entretanto, o prognóstico do melanoma pode ser considerado bom, se detectado nos estágios iniciais, antes dos melanócitos tornarem-se invasivos. Nos últimos anos houve uma grande melhora na sobrevida dos pacientes com esse tipo de câncer, principalmente devido a detecção precoce do mesmo (BRASIL, 2007). A excisão cirúrgica completa do tumor primário apresenta mais de 95 % de sucesso nos estágios I/II e pode prolongar substancialmente o tempo de sobrevida dos pacientes com infiltrações em linfonodos (estágio III). No estágio IV, as células de melanoma disseminam-se a múltiplos órgãos incluindo cérebro, pulmão, fígado e medula, limitando o uso de intervenções cirúrgicas (SOENGAS & LOWE, 2003).

Mesmo com todos os avanços na compreensão dos mecanismos envolvidos neste tipo de câncer, o tratamento do melanoma ainda permanece desapontador, representando um dos tumores sólidos mais difíceis de tratar atualmente (JACK et al., 2006). De acordo com o National Cancer Institute (2009), os tipos de tratamento padrão do melanoma incluem: a cirurgia, tratamento primário para todos os estágios de melanoma; quimioterapia; radioterapia e terapia biológica, também chamada de bioterapia ou imunoterapia; sendo que a escolha do tratamento adequado varia com o estágio do melanoma.

Apesar dos agentes quimioterápicos teoricamente alcançarem os sítios metastáticos, atualmente os tratamentos disponíveis não promovem benefícios terapêuticos significativos. O agente alquilante dacarbazina, único aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento do melanoma maligno como agente único, permite a completa remissão do tumor em somente 5 a 10 % dos pacientes. Outros agentes quimioterápicos que apresentam resistência *in vivo* incluem as nitrosuréias, taxanos, alcalóides da vinca e fármacos análogos da platina. Os tumores de melanoma também são notoriamente refratários a outros fármacos como doxorrubicina e etoposídeo. Além disso, a combinação de fármacos antineoplásicos com a interleucina-2 e/ou interferon- α (denominado bioquimioterapia) têm apresentado resistência em estudos clínicos de fase III (SOENGAS & LOWE, 2003). Assim, levando em consideração a elevada resistência dos melanomas metastáticos aos agentes quimioterápicos, torna-se necessário a investigação de novos fármacos e novas estratégias terapêuticas.

2 VETORIZAÇÃO DE FÁRMACOS

Ao longo do tempo, o princípio básico para o desenvolvimento de novas terapias medicamentosas tem residido na otimização da ação do fármaco. De fato, a intensidade do efeito farmacológico está diretamente relacionada à concentração de fármaco que atinge o local de ação desejado. Após administração do medicamento, o fármaco é liberado a partir da forma farmacêutica e então dissolvido nos fluidos biológicos. Após estas etapas, o destino do fármaco é determinado pela combinação dos seguintes processos farmacocinéticos: absorção, distribuição, metabolismo e eliminação, que dependem essencialmente das características estruturais e físico-químicas do mesmo. Durante as últimas décadas, o desenvolvimento dos sistemas de liberação de fármacos tem contribuído para controlar sua velocidade de liberação no organismo, modulando a velocidade com que estas substâncias atravessam barreiras

fisiológicas, penetram na circulação e atingem o alvo farmacológico. Particularmente, os carreadores nanoestruturados permitem direcionar o fármaco no organismo, evitando seu acúmulo em tecidos não-específicos, onde pode ser potencialmente tóxico, e aumentando sua concentração no local onde deve exercer seu efeito farmacológico. Eles podem ser solúveis ou particulados e apresentam tamanho menor que 1 μm , podendo ser administrados por diversas vias, incluindo a via intravenosa. A este grupo pertencem os lipossomas, as nanocápsulas, as nanoesferas, as micelas e as nano e microemulsões. A associação da molécula ativa a um sistema carreador conduz a alteração do seu perfil de distribuição que passa a depender das características físico-químicas do mesmo e não mais daquelas do fármaco. Isto pode levar ao aumento da seletividade do fármaco, permitindo deste modo, melhorar sua eficácia terapêutica e reduzir os efeitos colaterais (COUVREUR et al., 2002; BARRATT, 2003).

Além da possibilidade de direcionar o transporte de fármacos diretamente aos tecidos alvos, a utilização de sistemas nanoestruturados apresenta outras vantagens, tais como: prolongar a liberação do fármaco, proteger a molécula contra a degradação *in vivo* e durante o armazenamento, aumentar o conforto do paciente devido à redução do número de administrações, além de permitir a administração de fármacos hidrofóbicos pela via intravenosa em dispersões aquosas (GREF et al., 1995; FONSECA et al., 2002; GUPTE & CIFTCI, 2004).

2.1 Nanopartículas

Nanopartículas são sistemas coloidais que apresentam diâmetro inferior a 1 μm . O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, que diferem entre si por sua composição e organização estrutural. As nanocápsulas são sistemas reservatórios nos quais o fármaco encontra-se confinado em um núcleo aquoso ou oleoso revestido por um invólucro, geralmente polimérico, podendo o fármaco estar dissolvido no núcleo oleoso ou adsorvido à parede polimérica. As nanoesferas, por sua vez, são sistemas matriciais onde o fármaco encontra-se disperso (SOPPIMATH et al., 2001; SCHAFFAZICK et al., 2003). A maior vantagem das nanocápsulas sobre as nanoesferas está relacionada à sua capacidade de encapsular maiores quantidades de fármacos hidrofóbicos e ao reduzido efeito de liberação inicial (efeito *burst*), em virtude do confinamento do fármaco no núcleo oleoso (COUVREUR et al., 2002).

As vantagens da utilização de nanopartículas como sistemas de liberação de fármacos incluem a facilidade de controle do tamanho de partícula e das propriedades de superfície, e a possibilidade de modulação das características de liberação do fármaco e de degradação do carreador, por meio da seleção dos materiais e da técnica de preparação. Além disso, ainda pode-se citar: facilidade de modulação das características de liberação e degradação do carreador pela escolha dos constituintes da partícula, vetorização do fármaco ao sítio de ação obtida pela adição de ligantes específicos à superfície das partículas e administração por diferentes vias, incluindo as vias oral, nasal, parenteral, intra-ocular, entre outras (MOHANRAJ & CHEN, 2006).

2.1.1 Nanocápsulas poliméricas

Os métodos de preparação de nanocápsulas poliméricas podem ser classificados em métodos baseados na polimerização de monômeros (cianoacrilatos de alquila) ou na dispersão de polímeros pré-formados, tais como poli(ácido lático), poli(ácido lático-co-ácido glicólico), poli(ϵ -caprolactona) e copolímeros do ácido acrílico ou metacrílico (GUTERRES et al., 2006). Os métodos que utilizam polímeros pré-formados ainda podem ser divididos em quatro categorias: evaporação do solvente, difusão do solvente, *salting-out* e difusão-emulsificação (SOPPIMATH et al., 2001).

O método mais comum para obtenção de nanocápsulas poliméricas é a nanoprecipitação, também conhecida como nanodeposição do polímero pré-formado. Este processo consiste em dissolver o polímero em um solvente orgânico que é miscível com a água (por ex.: acetona ou etanol). Na fase orgânica também são adicionados o fármaco insolúvel ou pouco solúvel em água, o óleo e um estabilizante lipofílico. A fase orgânica é, então, adicionada a fase aquosa contendo um tensoativo hidrofílico sob agitação magnética moderada (MONTASSER, 2000). A mistura torna-se imediatamente leitosa e as nanocápsulas são formadas instantaneamente devido à rápida difusão do solvente orgânico na fase aquosa, que leva a formação de nanogotículas de óleo contendo fármaco, onde o polímero insolúvel é depositado, formando uma parede polimérica. Após, a acetona é removida sob pressão reduzida e a suspensão coloidal é concentrada até o volume final desejado. A origem do mecanismo de formação de nanocápsulas pode ser explicada em termos da turbulência interfacial ou agitação espontânea da interface entre as duas fases líquidas em desequilíbrio,

envolvendo fluxo, difusão e processos de superfície. Assim, a rápida difusão da acetona da fase orgânica para a fase aquosa leva à formação de nanogotículas de óleo, como resultado da tensão interfacial diminuída, e à migração do polímero insolúvel para a interface óleo-água onde é depositado, formando uma parede polimérica (FESSI, 1989; QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998).

A preparação de nanocápsulas utilizando polímeros pré-formados evita algumas limitações do processo de polimerização de monômeros, tais como a presença de resíduos tóxicos de monômeros ou oligômeros, a possibilidade de inativação do fármaco através de reações cruzadas, e a dificuldade de controlar o peso molecular do polímero formado (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998). Dentre eles destacam-se o poli ácido lático (PLA), o poli ácido lático-co-glicólico (PLGA), os polihidroxicanoatos (PHAs) e a poli- ϵ -caprolactona (PCL) (MOSQUEIRA et al., 2001).

Polímeros biodegradáveis tem sido alvo de grande interesse na área de liberação controlada de fármacos devido a sua habilidade em serem reabsorvidos pelo corpo. Uma ampla variedade de polímeros naturais e sintéticos tem sido estudada nesta área. Devido a problemas relacionados ao alto custo e o grau variável de pureza dos polímeros naturais, os polímeros sintéticos têm sido amplamente utilizados no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos nos últimos anos (JAIN, 2000).

A maioria dos polímeros biodegradáveis contém grupos hidrolisáveis como amida, éster, uréia e uretano ao longo da cadeia carbônica. Contudo, os polímeros contendo ligação éster, particularmente os poliésteres alifáticos, apresentam grande interesse na área médica devido às suas propriedades físicas, químicas e biológicas e características de biodegradabilidade. Por serem aprovados pelo FDA para uso humano e pela longa história de segurança, os poliésteres de ácido lático e glicólico são de grande interesse para o desenvolvimento de sistemas coloidais. Os homopolímeros de poli ácido lático (PLA) e poli ácido glicólico (PGA) e seus copolímeros (PLGA) têm sido empregados na absorção de fios cirúrgicos para suturas e numa variedade de aplicações em biomateriais, incluindo materiais para implantes e enxertos, e principalmente na obtenção de nano e micropartículas (RÉ & RODRIGUES, 2006).

O PLA tem atraído interesse dos pesquisadores por ser obtido a partir do ácido lático, apresentar alto ponto de fusão (175°C), alto grau de transparência e fácil fabricação. Este polímero possui isômeros opticamente ativos (D e L) ou uma mistura racêmica de ambos

(D,L). Além disso, o PLA pode ser considerado um polimetabólito, pois seu produto de degradação é o ácido láctico gerado pela quebra da porção terminal da cadeia polimérica. Nas células, o ácido láctico é convertido em piruvato pela lactato desidrogenase presente como diferentes isoenzimas no coração, músculos e fígado, e sua eliminação ocorre via ciclo de Krebs, principalmente pelos pulmões e rins, na forma de dióxido de carbono e água (BRANNON-PEPPAS, 1995; JAIN, 2000; TOKIWA & CALABIA, 2006).

2.1.2 Nanocápsulas lipídicas

Apesar da ampla utilização das nanopartículas poliméricas para a encapsulação de fármacos, esses sistemas apresentam algumas limitações que provêm dos resíduos de solventes orgânicos utilizados na produção, requeridos para a solubilização dos materiais poliméricos, da citotoxicidade de alguns polímeros e da dificuldade de escalonamento do processo de produção. Nos últimos anos, o principal objetivo dos pesquisadores em relação às técnicas de preparação de carreadores nanoestruturados de fármacos reside no desenvolvimento de sistemas estáveis e no emprego de solventes ou excipientes aprovados para uso interno (MEHNERT & MÄDER, 2001; HEURTAULT et al., 2002).

Recentemente, nanocápsulas lipídicas foram propostas como novos carreadores de fármacos hidrofóbicos. As nanocápsulas lipídicas são partículas submicrométricas constituídas de um núcleo líquido oleoso revestido por uma parede sólida ou semi-sólida de tensoativo (HEURTAULT et al., 2002). Esta fina camada interfacial atua como uma barreira para a difusão do óleo, reduzindo o amadurecimento de Ostwald (*Ostwald ripening*) e conferindo estabilidade a suspensão, sendo responsável pela denominação de “nanocápsulas” (ANTON et al., 2007). Esses sistemas são compostos por lipídios e uma combinação de tensoativos hidrofílicos/lipofílicos aprovados pelo FDA. Os componentes biocompatíveis mais empregados para a obtenção das nanocápsulas lipídicas são os triglicerídeos de cadeia média (ex. triglicerídeos do ácido caprílico) como fase oleosa e, surfactantes não-iônicos baseado em poli(óxido de etileno) (como 12-hidroxiestearato de polioxietileno 660), água e cloreto de sódio como fase aquosa. Algumas formulações incluem a adição de fosfolipídios para aumentar a sua estabilidade. A lecitina, por exemplo, atua como um “esqueleto” na estrutura da parede semi-sólida ao redor do núcleo, conferindo grande estabilidade a esses sistemas (ANTON et al., 2008). As nanocápsulas lipídicas apresentam tamanho médio

variando entre 20 e 100 nm e possuem uma grande capacidade de encapsulação de fármacos hidrofóbicos sem requerer o emprego de solventes orgânicos na sua preparação. Além disso, o método relativamente simples e de baixo consumo de energia, permite o fácil escalonamento do processo de produção, o que torna esses sistemas uma alternativa interessante para a liberação de fármacos (HEURTAULT et al., 2002; HOARAU et al., 2004; DULIEU & BAZILE, 2005).

Heurtault e colaboradores (2002) descreveram um novo método baseado na inversão de fases (PIT, *process inversion temperature*) para a preparação de nanocápsulas lipídicas. A técnica de preparação consiste na mistura composta por uma fase aquosa, contendo cloreto de sódio e estabilizante hidrofílico, e outra oleosa, contendo estabilizante lipofílico, óleo e o fármaco a ser encapsulado, que é submetida a um processo de aquecimento-resfriamento, sob agitação magnética. Para alcançar o processo de inversão de fases são aplicados três ciclos de temperatura. Durante o último resfriamento, as formulações são diluídas com água fria (aproximadamente 0 °C) e mantidas sob agitação por um tempo pré-determinado. O choque irreversível obtido pelo processo de resfriamento-diluição com água fria promove a quebra do sistema, levando a obtenção das nanopartículas e conferindo estabilidade as mesmas. A adição de cloreto de sódio permite que o processo de inversão de fases seja alcançado a temperaturas mais baixas, o que é especialmente interessante na encapsulação de fármacos termolábeis (HEURTAULT et al., 2002; HEURTAULT et al., 2003; BÉDUNEAU et al., 2006). O método de inversão de fases baseia-se principalmente no comportamento dos surfactantes polietoxilados em relação à temperatura. Esses surfactantes, geralmente não-iônicos, apresentam a habilidade de modificar sua afinidade pela água e pelo óleo em função da temperatura e, desta maneira, permitir a inversão de fases (ANTON et al., 2008). A presença dos grupamentos etoxilas na molécula do surfactante é necessária para a indução da inversão de fases, porém, quando a cabeça do grupo polietoxilado é muito curta ou muito longa o surfactante pode não ser sensível o suficiente a temperatura para induzir o processo (ANTON et al., 2007).

Entre os tensoativos não-iônicos, o 12-hidroxiestearato de polietilenoglicol 660 (Solutol HS15, BASF) têm se destacado por apresentar boa tolerância fisiológica, baixa toxicidade e elevada capacidade solubilizante para uma ampla variedade de fármacos, além de ser aprovado para uso em formulações parenterais (THAYSEN, 1999; KOLTER & RUCHATZ, 2003). Estudos de calorimetria exploratória diferencial forneceram algumas informações sobre a interação dos compostos nas nanocápsulas. Através da análise dos

resultados, o estudo definiu a estrutura do sistema lipídico como sendo constituído por um núcleo líquido oleoso circundado por uma camada rígida de tensoativos, composta pela associação de lecitina e 12-hidroxiestearato de polietilenoglicol 660. A lecitina foi ancorada na fase oleosa (núcleo), enquanto o Solutol estava orientado para a fase aquosa (meio externo).

Recentemente, o uso do 12-hidroxiestearato de polietilenoglicol 660 também tem sido relacionado à liberação prolongada de fármacos antitumorais. O perfil de liberação *in vitro* de nanocápsulas lipídicas contendo triptentona foi avaliado em tampão fosfato pH 7,4 a 37°C por Malzert-Fréon e colaboradores (2006). Os resultados mostraram que a triptentona nanoencapsulada apresentou uma liberação inicial rápida nos primeiros 2 dias, e após este período, uma liberação lenta e prolongada, sendo que após 10 dias de experimento apenas 60 % do fármaco havia sido liberado. Em outro trabalho, Lacoeyille e colaboradores (2007) realizaram estudos de biodistribuição *in vivo* de nanocápsulas lipídicas contendo paclitaxel. Análise da distribuição das partículas no sangue demonstrou propriedades furtivas desses sistemas equivalentes às aquelas apresentadas por nanocápsulas obtidas de copolímeros PLGA-PEG. Resultados similares também foram observados para nanocápsulas lipídicas e nanocápsulas PLA-PEG quanto à farmacocinética (tempo de residência médio, área sob a curva e depuração), demonstrando as propriedades furtivas desses sistemas. Por outro lado, Béduneau e colaboradores (2006) descreveram que os sistemas lipídicos obtidos pela utilização do 12-hidroxiestearato de polietilenoglicol 660 são rapidamente removidos da circulação sangüínea. Neste estudo, as propriedades de longa circulação das nanocápsulas foram observadas através da utilização do PEG₁₅₀₀-estearato e demonstraram-se dependentes da densidade e do comprimento da cadeia de PEG do surfactante.

2.2 Destino das nanopartículas *in vivo*

Sistemas coloidais nanoestruturados têm sido desenvolvidos visando inúmeras aplicações, sendo planejadas, principalmente, para administração parenteral, oral e ocular. Uma das áreas mais promissoras na utilização de carreadores nanoestruturados é a vetorização de fármacos hidrofóbicos principalmente através da via parenteral almejando uma distribuição mais seletiva do fármaco após a injeção de acordo com as propriedades do carreador (COUVREUR et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003). Contudo, a rápida remoção das

nanopartículas da corrente sanguínea após administração intravenosa pelo sistema fagocitário mononuclear (SFM), principalmente representado pelas células de Kupffer do fígado e macrófagos do baço e da medula óssea, compromete a eficiência terapêutica desses sistemas e a liberação controlada de fármacos para outros órgãos além do SFM (SANTANDER-ORTEGA et al., 2007).

Os sistemas coloidais são reconhecidos como substâncias estranhas pelas proteínas plasmáticas e rapidamente removidos da circulação. A fagocitose da partícula ocorre após adsorção de certos componentes sanguíneos conhecidos como opsoninas, tais como proteínas C3b do sistema complemento, imunoglobulinas G e M, fibronectina e apolipoproteínas, na superfície da partícula seguida pela interação com receptores específicos e não-específicos presentes na membrana plasmática dos macrófagos (GREF et al., 1995; MOSQUEIRA et al., 2001; VONARBOURG et al., 2006).

Os fatores que determinam a adsorção das proteínas plasmáticas à superfície das partículas incluem composição química, carga e hidrofobicidade. A interação das partículas com as proteínas plasmáticas irá depender das propriedades de superfície das mesmas. A carga da superfície das partículas influencia a interação eletrostática com os componentes da corrente sanguínea, sendo que superfícies carregadas negativamente favorecem a eliminação das partículas da circulação em relação às neutras ou carregadas positivamente. As características de hidrofobicidade/hidrofobicidade das partículas também influenciam no processo de opsonização e na força de interação que governa na adesão de partículas à célula. Em geral, quanto maior a hidrofobicidade da partícula, maior é a adsorção de opsoninas e mais rápida é sua remoção pelo SFM (STOLNIK et al., 1995).

Uma alternativa para utilização de nanocápsulas pela via parenteral consiste no uso de carreadores cuja superfície tenha sido modificada a fim de evitar a remoção pelos órgãos do SFM e prolongar o tempo de permanência na circulação sistêmica, permitindo sua distribuição para outros sítios de ação. Essas partículas denominadas “furtivas” possuem suas características de superfície alteradas pela adsorção ou ligação covalente de polímeros hidrofílicos. Carga da superfície, tamanho, hidrofobicidade e conformação do polímero são outros fatores que influenciam a interação das partículas com o meio biológico. A formação de um revestimento hidrofílico impede estericamente a opsonização por proteínas plasmáticas, que é o primeiro passo para o reconhecimento pelo sistema imune (LEGRAND et al., 1999; MOSQUEIRA et al., 2001; COUVREUR et al., 2002).

Duas alternativas têm sido propostas para a obtenção de nanocápsulas furtivas: a adsorção de surfactantes à superfície das partículas e o desenvolvimento de copolímeros biodegradáveis contendo segmentos hidrofílicos, como os polietileglicóis (LEGRAND et al., 1999). Estudos demonstram que o polietilenoglicol (PEG) confere propriedades de longa circulação a nanocápsulas de poli ácido lático, poli ácido lático-co-glicólico e poli caprolactona. Entre os polímeros utilizados, o PEG tem se mostrado particularmente eficaz provavelmente devido a sua alta hidrofiliicidade, flexibilidade das cadeias, neutralidade eletrônica e ausência de grupos funcionais, que previnem interações com os componentes biológicos. Além disso, o PEG apresenta a vantagem de ser atóxico e aprovado pelo FDA para uso interno em humanos (GREF et al., 1995; MOSQUEIRA et al., 2001; AVGOUSTAKIS et al., 2003).

2.3 Nanopartículas no tratamento do câncer

A eficácia terapêutica de fármacos destinados a combater as células tumorais é limitada devido a três principais aspectos: as barreiras fisiológicas existentes desde o local de administração do fármaco até o sítio de ação; a resistência das células tumorais ao fármaco; e os processos distribuição, biotransformação e eliminação do fármaco do organismo (BRIGGER et al., 2002). Além disso, a maioria dos anticancerígenos atualmente utilizados na quimioterapia são pouco seletivos e apresentam efeitos tóxicos dose-limitantes. Devido à rápida eliminação e à distribuição não seletiva dos antitumorais aos órgãos ou tecidos alvo, altas doses de fármaco são requeridas para obtenção do efeito terapêutico. Além disso, a incapacidade dos antitumorais em diferenciar células normais e tumorais freqüentemente compromete o sucesso da terapia, pela acentuada toxicidade sistêmica e efeitos adversos, que além de limitar a dose máxima permitida do fármaco, podem levar à desistência do tratamento pelo paciente (SINHA et al., 2006).

O uso de partículas e sistemas de tamanho nanométrico para detectar e tratar doenças a nível molecular (nanomedicina) apresenta-se como uma importante ferramenta no combate ao câncer. O emprego de sistemas nanoestruturados como carreadores de fármacos antitumorais constitui uma estratégia promissora para contornar os efeitos colaterais, limitações e inconveniências da quimioterapia convencional (FERRARI, 2005; YIH & WEI, 2005). Vários trabalhos relatam que a associação de fármacos como a actinomicina D, 5-fluoracil,

doxorubicina e metotrexato a nanopartículas aumentou significativamente a eficácia terapêutica dessas substâncias em modelo de tumores experimentais, com redução da toxicidade (GUTERRES et al., 2006). Loch-Neckel e colaboradores (2007) demonstraram que a encapsulação da camptotecina em nanocápsulas poliméricas aumentou a efetividade do fármaco em modelo de melanoma B16-F10 *in vivo*, além de reduzir a neutropenia, quando comparado a administração do fármaco livre.

Quando planejadas adequadamente, nanopartículas além de permitirem a vetorização de fármacos até tecidos ou células tumorais, também os protegem da inativação precoce durante o seu transporte (BRIGGER et al., 2002). O uso de nanopartículas como carreadores de fármacos antitumorais baseia-se em dois princípios: (i) as nanopartículas possibilitam a liberação de grande parte da dose administrada do fármaco nos tumores; (ii) as nanopartículas reduzem a exposição dos agentes antitumorais aos tecidos saudáveis (MOHANRAJ & CHEN, 2006).

Por um lado, a associação de agentes antitumorais a sistemas coloidais convencionais modifica o perfil de biodistribuição do fármaco. Após administração, essas nanopartículas são rapidamente capturadas pelas células do sistema fagocitário mononuclear, principalmente os macrófagos circulantes e as células Kupffer do fígado, e rapidamente removidas da circulação sistêmica. Esta biodistribuição pode beneficiar o tratamento quimioterápico de tumores localizados em órgãos ricos nestas células, especificamente, o fígado, baço, pulmão e medula. Doenças como hepatocarcinoma ou tumores hepáticos, tumor broncopulmonar, mieloma múltiplo e as leucemias podem ser tratadas com sucesso com o uso destes sistemas. Por sua vez, as nanopartículas furtivas não são reconhecidas pelas células do sistema fagocitário mononuclear, apresentando prolongado tempo na circulação sangüínea. Como resultado, a utilização desses sistemas possibilita o tratamento de tumores em outros órgãos (BRIGGER et al., 2002).

Por outro lado, nanopartículas podem extravasar para o interstício de tumores sólidos e locais infeccionados ou inflamados, caracterizados por serem altamente permeáveis (BARRATT, 2003). Esta propriedade também conhecida como efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (EPR, *enhanced permeability and retention*), desempenha um papel essencial na distribuição do fármaco no espaço intersticial. O endotélio capilar dos tecidos tumorais é mais desordenado e, portanto, mais permeável às nanopartículas que o endotélio dos tecidos normais, presumidamente devido à exposição das células endoteliais vasculares dos tumores às citocinas, tais como o fator de crescimento endotelial e o fator de

permeabilidade vascular. Isso permite o extravasamento das nanopartículas circulantes para o interstício do tumor, através das fenestras dos capilares. O efeito de retenção aumentado é resultante da ausência de drenagem linfática, que leva ao acúmulo das partículas no interior dos tecidos tumorais. Ainda, o fármaco associado a nanopartículas pode ser liberado diretamente em um sítio específico por meio de um processo de reconhecimento molecular. Este processo é usualmente alcançado pela conjugação de um ligante à superfície das nanopartículas, que possa interagir com receptores expressos na membrana celular das células, permitindo o acúmulo do fármaco no tecido alvo. Um exemplo desta estratégia denominada vetorização ativa é a ligação de folato na superfície de partículas peguadas, para interação com receptor folato superexpresso na superfície de certas células tumorais. Após a ligação com o receptor, o fármaco é liberado, iniciando a ação citotóxica na célula alvo (SINHA et al. 2006; HALEY & FRENKEL, 2008).

Agentes antineoplásicos, mesmo quando localizados no interstício tumoral, podem ter sua eficácia comprometida especialmente devido aos mecanismos de resistência desenvolvidos pelas células tumorais. A resistência múltipla a fármacos é um dos maiores problemas durante a quimioterapia e ocorre principalmente devido a superexpressão da glicoproteína-P (Pgp), capaz de expulsar diversos xenobióticos carregados positivamente, incluindo alguns antitumorais, para fora das células (BRIGGER et al., 2002).

Carreadores coloidais também são úteis como um modo de contornar a resistência mediada pela Pgp. A razão em promover a associação de agentes quimioterápicos a sistemas coloidais, como as nanopartículas, baseia-se no fato que a Pgp reconhece o fármaco a ser expulso somente quando este está localizado na membrana plasmática, e não quando ele está no citoplasma ou em lisossomas após o processo de endocitose das partículas ter ocorrido (MOHANRAJ & CHEN, 2006). Para serem efetivos, estes sistemas devem contemplar três critérios: a estrutura particulada deve aderir à membrana plasmática fornecendo um gradiente de concentração, a liberação do fármaco e a degradação das nanopartículas devem ocorrer simultaneamente, e haver a formação de um par iônico a fim de mascarar a carga positiva do fármaco (BRIGGER et al., 2002).

Barraud e colaboradores (2005) compararam a eficácia antitumoral *in vitro* e *in vivo* da doxorrubicina livre e nanoencapsulada em nanopartículas de poli(isohexilcianoacrilato) em carcinoma hepatocelular, conhecido como quimiorresistente. Ensaio *in vitro* demonstraram que a doxorrubicina nanoencapsulada apresentou menor IC₅₀ que o fármaco livre para diferentes linhagens de hepatocelular humano. A eficácia da doxorrubicina *in vivo* avaliada

em camundongos inoculados com células de hepatocarcinoma com superexpressão de genes resistentes (mdr1 e mdr3) também foi maior quando associada a nanocápsulas em comparação ao efeito produzido pela administração da doxorubicina livre na mesma dose, demonstrando o potencial desses sistemas em reverter à resistência múltipla a fármacos.

3 CURCUMINA

Com base em dados da literatura e dados obtidos em trabalhos práticos, no artigo a seguir é realizada uma revisão sobre o potencial terapêutico da curcumina, dando ênfase as estratégias utilizadas para aumentar sua biodisponibilidade e eficácia terapêutica. O trabalho descreve resultados de melhoria do potencial terapêutico da curcumina obtidos com a utilização de sistemas de liberação como ciclodextrinas, nanopartículas, lipossomas, entre outros.

Publicação: Curcumin: a review about the strategies aiming at the improvement of its bioavailability and its effective use in therapeutics

Submetido à Latin American Journal of Pharmacy

Curcumina: uma revisão sobre as estratégias que visam a melhoria da sua biodisponibilidade e aproveitamento do seu potencial terapêutico

Curcumin: a review about the strategies aiming at the improvement of its bioavailability and its effective use in therapeutics

Letícia MAZZARINO & Elenara LEMOS-SENNA*

Laboratório de Farmacotécnica, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, Florianópolis, SC, Brasil, CEP 88040-900.

*Autor a quem correspondência deve ser enviada: *E-mail*: lemos@ccs.ufsc.br

RESUMO. A curcumina é um polifenol amarelo extraído do rizoma da planta *Curcuma longa* Linn, popularmente conhecida como açafrão, que apresenta diversas atividades farmacológicas incluindo antiinflamatória, antioxidante, antimicrobiana e antitumoral. Contudo, sua aplicação terapêutica é limitada devido a sua baixa solubilidade aquosa, alta taxa de decomposição em pH neutro ou básico, e rápido metabolismo e eliminação sistêmica, que conduzem à reduzida biodisponibilidade deste fármaco. Diferentes estratégias têm sido testadas a fim de contornar as limitações do uso da curcumina e aproveitar o seu potencial terapêutico, incluindo a incorporação em sistemas de liberação. A curcumina tem sido associada a ciclodextrinas, micelas, nano e microemulsões, lipossomas e nanopartículas, além de filmes poliméricos e stents. Os trabalhos realizados na busca da melhoria das propriedades terapêuticas da curcumina são revisados e discutidos neste artigo, dando ênfase no desenvolvimento farmacotécnico de sistemas de liberação deste interessante fármaco.

PALAVRAS-CHAVE: Biodisponibilidade, Compostos Polifenólicos, Curcumina, Sistemas de Liberação de Fármacos.

SUMMARY. “Curcumin: a review about the strategies aiming at the improvement of its bioavailability and its effective use in therapeutics”. Curcumin is a yellow polyphenol extracted from the rhizome of the plant *Curcuma longa*, commonly known as turmeric. Curcumin displays several pharmacological activities including anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial and antitumoral. However, its clinical application has been limited due to poor aqueous solubility, rapid hydrolysis at neutral and basic pH, and fast metabolism and systemic elimination, which together are responsible by the low bioavailability exhibited by this drug. Various strategies have been undertaken to overcome the limitations of the use of curcumin and to allow its therapeutic application, including the incorporation in delivery systems. Curcumin has been associated with cyclodextrins, micelles, nano and microemulsions, liposomes and nanoparticles, polymeric films and stents. Studies realized with the aim to improve the therapeutic properties of curcumin are reviewed and discussed in this paper, emphasizing the technological development of delivery systems loaded with this interesting drug.

KEY WORDS: Bioavailability, Curcumin, Drug Delivery Systems, Polyphenol Compounds.

INTRODUÇÃO

A curcumina é o princípio ativo extraído do rizoma da *Curcuma longa* Linn (Figura 1), uma planta característica de regiões tropicais e subtropicais da Índia e China. Popularmente chamada de açafrão, é amplamente empregada na alimentação como corante e flavorizante. O emprego desta planta como remédio caseiro para uma variedade de doenças surgiu há séculos na medicina Indiana^{1,2}. A curcumina exibe diversas atividades farmacológicas incluindo antiinflamatória, antitumoral, antioxidante, antimicrobiana, entre outras, além de estar relacionada a efeitos benéficos à saúde. Alguns dos efeitos farmacológicos descritos para a curcumina encontram-se listados na Tabela 1.



Figura 1. *Curcuma longa* Linn (<http://www.wepwawet.com.br/plantas.html>).

Tabela 1. Atividades farmacológicas da curcumina.

Atividade	Referência
Antiartrítica	3
Antiaterogênica	4,5
Antimetastática	6
Antimicrobiana	7
Antiinflamatória	8,9
Antioxidante	10,11,12
Antiprotozoária	13
Antitumoral	14,15,16
Antiviral	17,18
Cardioprotetora	19,20,21,22
Desordens respiratórias	23,24
Hepatoprotetora	25,26
Hipoglicêmica	27,28
Neuroprotetora	29

Pesquisas clínicas e laboratoriais têm demonstrado o potencial da curcumina na prevenção e tratamento do câncer e outras doenças crônicas. A curcumina apresenta efeitos anti-proliferativos e pró-apoptóticos contra diversos tipo de tumor, incluindo tumores de mama, próstata, fígado, melanoma, leucemia, câncer de cólon, duodenal, estômago, pulmão, esofágico e oral³⁰. A curcumina contribui com a inibição da formação, promoção e progressão do tumor, sendo descrita como um bom agente anti-angiogênico^{31,32}. Estudos têm relacionado à atividade antitumoral da curcumina a diferentes mecanismos de ação, tais como: inibição da ação das metaloproteinases (MMP), diminuição da expressão da quinase de adesão focal (FAK), depleção da glutathiona (GSH), diminuição da expressão dos fatores anti-apoptóticos bcl-2 e bcl-x_L, diminuição da expressão da prócaspase 3 e pró-caspase 9, diminuição do fator de necrose tumoral e da IL-1 β , inibição do fator de transcrição NF- κ B, supressão da proteína-1 (AP-1), inibição do *c-Jun* e *c-Fos*, ativação da proteína pró-apoptótica Bax, redução da atividade do fator de crescimento endotelial vascular, aumento da expressão dos inibidores de quinases dependentes de ciclina p21 e p27, e da proteína supressora de tumor p53, inibição da

tirosina quinase Flk-1/KDR e da telomerase reversa e supressão da atividade de enzimas como citocromo P450 e COX-2^{31,33,34}.

Embora o grande interesse farmacêutico relacionado à curcumina tenha aumentado consideravelmente, o uso terapêutico deste composto tem sido limitado devido a sua baixa solubilidade aquosa, a qual resulta numa baixa absorção após administração oral ou impede a obtenção de soluções para administração intravenosa. Além disso, a curcumina exibe alta taxa de decomposição em pH neutro ou básico e susceptibilidade à degradação fotoquímica³⁵⁻³⁷. Em conjunto com estes fatores, o rápido metabolismo e a rápida eliminação sistêmica também contribuem para os reduzidos níveis séricos e teciduais deste interessante composto fenólico e, portanto, para a sua baixa biodisponibilidade³⁸.

Tendo em vista as limitações decorrentes da baixa absorção e rápido metabolismo da curcumina, diversos grupos de pesquisa vêm investigando formas para aumentar a sua biodisponibilidade sistêmica e/ou melhorar a sua eficácia terapêutica. Uma forma promissora para contornar os problemas de degradação, a baixa solubilidade em água e reduzida biodisponibilidade é a associação da curcumina a sistemas carreadores como nanopartículas, lipossomas, ciclodextrinas, micelas e complexos fosfolipídicos. Tais sistemas parecem prolongar o tempo de circulação, melhorar a estabilidade durante o armazenamento e proteger o fármaco dos processos metabólicos³⁸, além de permitir a formação de sistemas aquosos facilmente dispersíveis nos fluídos biológicos, prevenindo a agregação de fármacos pouco solúveis em água após administração intravenosa³⁹.

Neste trabalho é realizada uma revisão sobre o potencial terapêutico da curcumina, dando ênfase às estratégias que visam melhorar as propriedades terapêuticas deste fármaco. Nesta revisão pretendemos igualmente demonstrar como o potencial terapêutico de fármacos de origem natural pode ser aproveitado, por meio do desenvolvimento farmacotécnico de sistemas de liberação de fármacos.

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DA CURCUMINA

As propriedades medicinais da *Curcuma longa* têm sido atribuídas principalmente aos curcuminóides, pigmento amarelo obtido do rizoma da planta. Os principais curcuminóides são a curcumina, demetoxicurcumina e bisdemetoxicurcumina³⁸ (Figura 2), além da ciclocurcumina que foi recentemente identificada³⁰. A curcumina, 1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona, é o principal constituinte da *C. longa*, perfazendo de 4 a 8 % de seu extrato seco⁴⁰. O polifenol apresenta ponto de fusão de 183 °C, fórmula $C_{21}H_{20}O_6$ e peso molecular de 368,37 g/mol. É insolúvel em água e éter, mas apresenta-se solúvel em etanol, dimetilsulfóxido, acetona e outros solventes orgânicos^{41,42}.

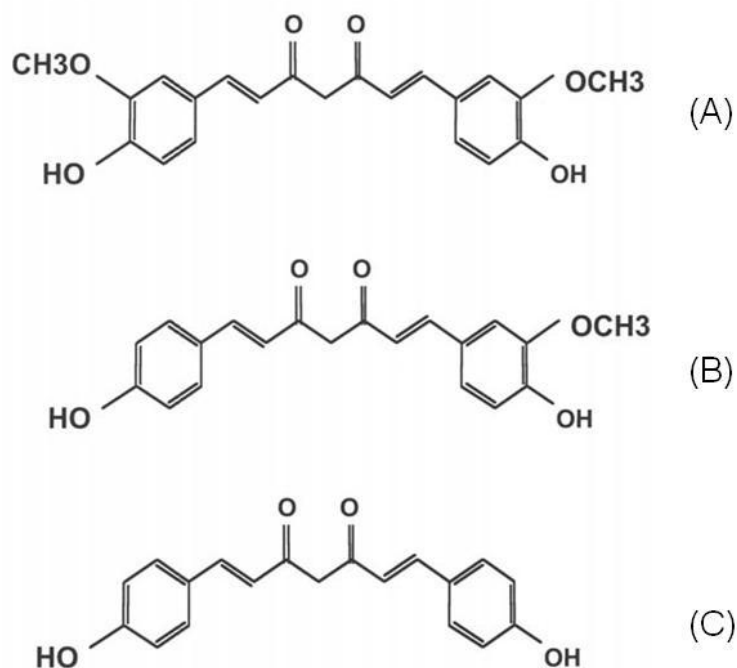


Figura 2. Estrutura química dos curcuminóides: curcumina (A), demetoxicurcumina (B) e bisdemetoxicurcumina (C).

A curcumina é estável em pH ácido, mas instável em pH neutro e básico, sendo suscetível a hidrólise alcalina em soluções com altos valores de pH. A estabilidade da curcumina tem sido investigada por vários pesquisadores^{35-37,43-45}. Wang *et al.*⁴³

demonstraram em estudos *in vitro* que a maior parte da curcumina (> 90 %) é rapidamente degradada em condições fisiológicas (tampão fosfato isotônico, pH 7.2 a 37 °C). A estabilidade da curcumina é grandemente aumentada pela redução do pH, devido à manutenção da estrutura dieno conjugada da molécula. Quando o ajuste do pH para valores neutro ou alcalino é realizado, o próton do grupamento fenólico é removido levando à destruição desta estrutura. Este fármaco também demonstrou ser mais estável em cultura de células contendo 10% de soro bovino fetal e em sangue humano, onde menos que 20% se decompôs em 1 hora. O trans-6-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-2,4-dioxo-5-hexenal foi o principal produto de degradação, mas vanilina, ácido ferúlico e feruolmetano também foram identificados. A suscetibilidade à degradação fotoquímica é outra limitação importante apresentada pela curcumina^{36,45}.

SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE CURCUMINA

O desenvolvimento de novos sistemas de liberação de curcumina tem sido objeto de inúmeros estudos visando melhorar a eficácia terapêutica deste fármaco. Os diferentes sistemas de liberação estudados e os benefícios produzidos são relatados a seguir. Um resumo destes benefícios encontra-se apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Melhoria das propriedades da curcumina proporcionada pelo emprego de sistemas de liberação.

Sistema de liberação	Efeito benéfico relatado	Referência
Micelas	Aumento da solubilidade aquosa com manutenção da atividade citotóxica, aumento da estabilidade, possibilidade de administração oral e parenteral, controle da liberação controlada.	46, 47, 48, 49, 50, 51
Complexos fosfolipídicos	Aumento da atividade hepatoprotetora <i>in vivo</i> , aumento da concentração plasmática após administração oral, manutenção da concentração plasmática efetiva por maior tempo.	52, 53, 54
Ciclodextrinas	Aumento da solubilidade aquosa, aumento da estabilidade frente à hidrólise alcalina.	35, 37, 55
Lipossomas	Obtenção de sistemas dispersos aquosos aplicáveis à administração intravenosa, maior ou igual atividade antiproliferativa e antiangiogênica sobre células tumorais <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> em relação ao fármaco livre, aumento da estabilidade em tampão fosfato, redução da dose, obtenção de efeito sinérgico inibitório com oxaliplatina, transporte mais efetivo do fármaco para o interior celular.	56, 57, 58, 59, 60, 61
Nanopartículas	Facilidade de dispersão em meio aquoso, atividade citotóxica similar ao fármaco livre, prolongamento da liberação de curcuminóides, aumento da estabilidade, efeito sobre a hidratação, firmeza e elasticidade da pele, ampla distribuição nos tecidos contendo macrófagos.	62, 63, 64
Nano e microemulsões	Aumento da atividade antiinflamatória, liberação controlada, aumento da solubilidade, aumento da absorção oral do fármaco.	65, 66, 67

Micelas e complexos fosfolipídicos

O emprego de micelas de tensoativos permite a solubilização de compostos hidrofóbicos em água e o aumento da absorção gastrointestinal, resultando no aumento dos níveis plasmáticos e, portanto, na melhoria da biodisponibilidade³⁸. Alguns trabalhos relatam a solubilização da curcumina em sistemas micelares. Letchford *et al.*⁴⁶ mostraram que micelas obtidas a partir de copolímeros em bloco constituídos de unidades de policaprolactona e metoxi polietilenoglicol aumentaram a solubilidade aquosa da curcumina. Neste caso, a concentração do fármaco solubilizado mostrou estar diretamente relacionada ao comprimento do bloco de policaprolactona. A síntese de moléculas anfifílicas a partir do metoxi polietilenoglicol (mPEG) e ácido palmítico (PA), como segmentos hidrofílico e hidrofóbico, respectivamente, foi descrita por Sahu *et al.*⁴⁷. As micelas apresentando formato esférico e diâmetro de 41.43 nm exibiram boa capacidade de solubilizar a curcumina, além de apresentar boa estabilidade em condições fisiológicas (pH 7,4), em fluido gástrico simulado (pH 1,2) e em fluido intestinal simulado (pH 6,8). Além disso, a liberação do fármaco pode ser desencadeada por enzimas com atividade de estearase, como a lipase, a qual mostrou ser capaz de degradar o conjugado facilmente.

A formação do complexo de curcumina com micelas de caseína bovina e seu emprego como veículo para a liberação do fármaco também foi investigada por Sahu *et al.*⁴⁸. Estudos de espectroscopia de fluorescência demonstraram que a curcumina se associa às micelas de caseína através de interações hidrofóbicas. Ensaios em cultura de células de carcinoma de pescoço humano (HeLa) mostraram que o complexo micelar curcumina-caseína exibe efeito citotóxico de modo similar à curcumina livre, podendo ser usado para a administração oral deste fármaco.

Micelas de poli- ϵ -caprolactona (PCL) e polioxido de etileno (PEO) contendo curcumina foram preparadas pela técnica de evaporação do cosolvente. As características das

micelas resultantes demonstraram ser dependentes do grau de polimerização da ϵ -caprolactona. Enquanto a PEO(5000)-PCL(24500) demonstrou ser mais eficiente em solubilizar a curcumina, a PEO(5000)-PCL(13000) permitiu o controle da liberação do fármaco. A encapsulação nas micelas reteve a citotoxicidade do fármaco, conforme verificado em ensaios *in vitro* em linhagens de melanoma murino B16F10 e de linfoma de células do manto humano JeKo-1, Mino e SP-53, mostrando o potencial destes sistemas em formulações de curcumina de uso injetável⁴⁹.

Estudos farmacocinéticos em ratos demonstraram que a associação em micelas poliméricas aumentou 162 vezes o tempo de meia-vida e reduziu em 70 vezes o volume de distribuição da curcumina⁵⁰. A curcumina solubilizada em micelas de brometo de cetiltrimetilamônio apresentou-se isotropicamente clara por um longo período de tempo, e a alta energia livre negativa de transferência deste polifenol da água para a fase micelar, juntamente com os parâmetros de constante de ligação e coeficiente de partição, indicaram a elevada estabilidade termodinâmica no sistema micelar descrito⁵¹.

Diversos trabalhos têm indicado os benefícios dos complexos fosfolipídicos sobre o aumento da biodisponibilidade e eficácia terapêutica de moléculas apresentando baixa absorção oral. O efeito protetor do complexo curcumina-fosfatidilcolina de soja hidrogenada foi avaliado em modelo de dano hepático agudo induzido pelo tetracloreto de carbono em ratos. O complexo fosfolipídico exibiu maior atividade hepatoprotetora que a curcumina livre nas mesmas doses (100 e 200 mg/kg, via oral), restaurando os níveis hepáticos do sistema glutaciona, assim como da superóxido dismutase, catalase e substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico. Após administração oral (1,0 g/Kg), o complexo fosfolipídico produziu uma maior concentração plasmática (C_{max} 1,2 $\mu\text{g/ml}$) que aquela produzida pela curcumina livre (C_{max} 0,5 $\mu\text{g/ml}$), além de manter uma concentração sérica efetiva do polifenol por um período mais prolongado, resultando num aumento da biodisponibilidade em 125,8%⁵².

Resultados similares foram obtidos por Liu *et al.*⁵³, após a validação de metodologia analítica de cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa tandem para determinação sérica da curcumina e seu metabólito tetrahidrocurcumina. Marczylo *et al.*⁵⁴ avaliaram o efeito da administração oral em ratos (340 mg/Kg) da curcumina formulada em fosfatidilcolina de soja sobre a biodisponibilidade e metabolização deste polifenol. A administração do complexo com fosfatidilcolina de soja produziu um pico plasmático e uma área sob a curva 5 vezes maiores quando comparado com a administração de curcumina livre. A curcumina, os curcuminóides desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina, e seus metabólitos tetrahidrocurcumina, hexahidrocurcumina, curcumina glucoronida e curcumina sulfato foram identificados na mucosa intestinal e fígado dos ratos após a administração do complexo fosfolipídico. Em contraste, as concentrações na mucosa gastrintestinal foram mais baixas após a administração do complexo, sugerindo a obtenção de níveis sistêmicos mais elevados do que aqueles obtidos para a curcumina livre.

Ciclodextrinas

Igualmente buscando a melhoria da solubilidade em meio aquoso, alguns trabalhos relatam a formação de complexos solúveis de curcumina e ciclodextrinas. As ciclodextrinas, oligossacarídeos cíclicos formados por pelo menos 6 moléculas de glucopiranosose unidas através de ligações glicosídicas, são capazes de formar compostos de inclusão devido a sua cavidade interna lipofílica⁶⁸. Tonnesen *et al.*³⁷ investigaram o efeito de diferentes ciclodextrinas substituídas sobre a solubilidade e estabilidade da curcumina em meio aquoso. A formação do complexo resultou no aumento da solubilidade do fármaco em água em pelo menos 10^4 vezes em pH 5. Além disso, a curcumina complexada com a ciclodextrina mostrou-se muito mais estável frente à hidrólise alcalina, sendo que as ciclodextrinas neutras ofereceram maior proteção que aquelas apresentando carga. Contudo, a fotodegradação do

fármaco foi maior quando comparado à solução de curcumina livre em solventes orgânicos. Neste caso, o tipo de substituinte da ciclodextrina exerceu pouco efeito sobre a fotodegradação, tendo o tamanho da cavidade sido mais importante.

Estudos posteriores avaliaram a solubilidade e estabilidade química e fotoquímica de uma série de curcuminóides, inclusive a curcumina, em soluções de diferentes ciclodextrinas. Todos os derivados da curcumina foram mais estáveis frente à degradação hidrolítica, sendo que a complexação com a hidroxipropil- β -ciclodextrina proporcionou uma maior proteção deste fármaco. Por outro lado, estudos de fotodegradação demonstraram que a curcumina é geralmente mais estável que seus derivados³⁵. Recentemente, combinações de ciclodextrinas e alginatos foram testadas para solubilizar a curcumina em veículos aquosos destinados à liberação tópica. O fluxo de curcumina através de membranas semipermeáveis hidrofílicas foi medido com o objetivo de avaliar o efeito da complexação sobre a permeação. Enquanto o fluxo global da curcumina não pareceu ser afetado pela composição do veículo, mas pela viscosidade, o fluxo de curcumina livre foi dependente de ambos composição e da viscosidade do veículo. Os resultados indicaram que a combinação de hidroxipropil- β -ciclodextrina e alginato de propilenoglicol foi a melhor opção para aumentar a solubilidade do fármaco e permitir sua liberação a partir do veículo⁵⁵.

Lipossomas

Os lipossomas têm sido amplamente utilizados para formulação de agentes terapêuticos pouco solúveis em água. Eles podem ser definidos como estruturas vesiculares formadas por bicamadas lipídicas concêntricas e são considerados excelentes sistemas de liberação de fármacos, devido a sua capacidade de incorporar tanto fármacos lipofílicos quanto hidrofílicos^{69,70}. A técnica de infusão do etanol mostrou-se fácil e prática, permitindo a

obtenção de nanolipossomas contendo curcumina com tamanho médio de 136 nm e altos valores de eficiência de encapsulação (em torno de 88 %) ⁷¹.

Li *et al.* ⁵⁶ estudaram os efeitos *in vitro* e *in vivo* da curcumina lipossomal sobre a proliferação, apoptose, sinalização e angiogênese usando linhagem de células de carcinoma pancreático humano. A curcumina lipossomal suprimiu a ligação do NFkB e reduziu a expressão dos produtos genéticos regulado pelo NFkB, incluindo a cicloxigenase-2 e a interleucina-8, ambas implicadas no crescimento e invasividade do tumor. Estas alterações foram associadas com a atividade antiproliferativa concentração e tempo dependentes da curcumina, além de efeitos pró-apoptóticos. A atividade da curcumina lipossomal foi igual ou melhor que aquela produzida pela curcumina livre em concentrações equimolares. A administração intravenosa de 40 mg/kg da curcumina lipossomal, 3 vezes por semana durante 20 dias, suprimiu o crescimento e inibiu a angiogênese do tumor em camundongos inoculados com células de carcinoma pancreático humano BxPC-3 e MiaPaCa2.

A atividade antitumoral pré-clínica da curcumina lipossomal em câncer colo-retal também foi avaliada em um estudo recente. Em linhagens Colo205 e LoVo, o tratamento com a curcumina lipossomal inibiu o crescimento e induziu a apoptose de maneira dose dependente. O estudo também demonstrou um efeito inibitório sinérgico após o tratamento das células LoVo com a curcumina lipossomal e a oxaliplatina, quimioterápico padronizado para o tratamento deste tipo de câncer, na razão de 4:1. Os resultados *in vivo* demonstraram que a administração de curcumina lipossomal (40 mg/kg, i.v.) e oxaliplatina (5 mg/kg, i.p.), isoladamente ou em associação, 3 vezes por semana, inibiu significativamente o crescimento do tumor em camundongos inoculados com células Colo205 e LoVo. Uma maior inibição foi verificada após administração da curcumina lipossomal, quando comparada a oxaliplatina, nos camundongos que receberam as células Colo205. O efeito antiangiogênico também foi verificado nos animais tratados com a curcumina lipossomal. O estudo revelou, portanto, que

a curcumina lipossomal apresenta efeito antitumoral comparável ou maior que a oxaliplatina tanto *in vitro* quanto *in vivo* em modelo de câncer coloretal, sugerindo a sua promissora utilização na prática clínica⁵⁷.

A atividade antiproliferativa da curcumina lipossomal contendo sítios de ligação antígeno-anticorpo específicos foi avaliada em linhagens celulares de câncer de próstata humano (LNCaP e C4-2B). O tratamento com a curcumina lipossomal (5-10 μM) por 24 a 48 horas resultou na inibição de pelo menos 70-80 % da proliferação celular. A curcumina livre, por sua vez, apresentou inibição similar somente em doses 10 vezes maiores ($> 50 \mu\text{M}$)⁵⁸. A curcumina encapsulada em lipossomas também demonstrou suprimir o crescimento de células de carcinoma (HNSCC) de cabeça e pescoço, de maneira dose-dependente. O tratamento reduziu a ativação do NF- κ B e a expressão da ciclina D1, COX-2, MMP-9, Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1L e Mcl-1S, sem afetar a expressão da pAKT. A administração intravenosa da curcumina lipossomal em camundongos inoculados com HNSCC durante 3,5 semanas reduziu o crescimento do tumor e confirmou a inibição do NF- κ B, sem demonstrar toxicidade⁵⁹.

A estabilidade, toxicidade e atividade biológica de lipossomas contendo curcumina foram estudadas por Chen *et al.*⁶⁰. A encapsulação da curcumina em lipossomas aumentou a estabilidade do fármaco em tampão fosfato, e exibiu estabilidade similar a do fármaco livre em sangue, plasma e meio RPMI contendo 10 % de soro bovino fetal. A curcumina lipossomal demonstrou efeito inibitório similar ou maior sobre a proliferação celular de linfócitos humanos estimulados por concanavalina A, esplenócitos e linfoblastóides-B humanos transformados pelo Epstein-Barr vírus.

Kunwar *et al.*⁶¹ avaliaram a captura celular da curcumina em diferentes veículos usando linhagens de linfócitos de baço murino e linfoma de células T murino EL4, por métodos de espectroscopia de absorção e fluorescência. O transporte da curcumina para o

interior das células foi mais efetivo quando o veículo lipossomal foi empregado, quando comparado ao complexo formado com a albumina ou com a solução água-DMSO deste fármaco. Além de confirmar a liberação mais eficiente de fármaco após a incorporação em lipossomas, o estudo também demonstrou que a curcumina é preferencialmente capturada pelas células de linfoma murino que pelos linfócitos normais.

Nanopartículas

O desenvolvimento de nanopartículas biodegradáveis como carreadores de fármacos tem sido uma área de intensa pesquisa nas últimas décadas. A utilização destes sistemas permite o controle da liberação, o alcance em sítios específicos de ação, a redução dos efeitos adversos, a proteção da molécula frente à degradação *in vivo*, e a administração de fármacos hidrofóbicos pela via intravenosa⁷²⁻⁷⁴. O uso de nanopartículas ainda pode ser associado a outras importantes vantagens como a possibilidade de veicular fármacos hidrofóbicos pela via intravenosa, a facilidade de preparação e sua estabilidade nos fluidos biológicos e durante o armazenamento⁷². A técnica de nanoprecipitação foi testada com o intuito de encapsular curcuminóides, usando o poli ácido láctico (PLA) para a obtenção da matriz polimérica. A eficiência de encapsulação, teor e taxa e recuperação de curcuminóides nas nanopartículas de PLA foi de 94.26 %, 14.35 % e 91.23 %, respectivamente. Estes valores foram superiores àqueles encontrados com a encapsulação de curcubitacinas, tendo as diferenças encontradas sido associadas às diferentes interações entre fármaco, polímero e solvente, além das características de solubilidade dos mesmos⁷⁵.

Bisht *et al.*⁶² relataram a síntese de nanopartículas poliméricas contendo curcumina usando agregados micelares de copolímeros da N-isopropilacrilamida com N-vinil-2-pirrolidona e monoacrilato de polietilenoglicol. As nanopartículas, denominadas “nanocurcumina”, mostraram-se facilmente dispersíveis em meio aquoso, contrastando com

uma suspensão aquosa de uma mesma quantidade do fármaco, a qual apresentou agregados de partículas na superfície do líquido. A nanocurcumina demonstrou atividade citotóxica *in vitro* comparável à curcumina livre, em linhagem de células pancreáticas humana. Similarmente à curcumina livre, a nanocurcumina também induziu a apoptose celular, bloqueou a ativação do NFκB e diminuiu os níveis de citocinas pró-inflamatórias como interleucinas IL-6 e IL-8, e fator de necrose tumoral.

O desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo curcuminóides foi realizado por Tiyaboonthai *et al.*⁶³, a partir do ácido esteárico e monoestearato de glicerila, usando a técnica de microemulsão a temperatura moderada. As NLS conduziram ao prolongamento da liberação dos curcuminóides por mais de 12 horas, além de manter a curcumina encapsulada estável por 6 meses, quando armazenadas à temperatura ambiente e na ausência de luz. O estudo também mostrou que a estabilidade dos curcuminóides incorporados em um creme base é aumentada pela encapsulação, em relação aos curcuminóides livres. O estudo *in vivo* com voluntários saudáveis revelou que a utilização do creme contendo curcuminóides incorporados nas NLS reduziu significativamente a rugosidade, aumentou a hidratação, firmeza e elasticidade da pele após 3 semanas de aplicação. Lertsutthiwong *et al.*⁷⁶ descreveram a encapsulação do óleo do açafrão em nanocápsulas de alginato, biopolímero aniônico produzido por algas. As nanocápsulas foram produzidas por um procedimento envolvendo a emulsificação do óleo de açafrão, a reticulação do biopolímero com cloreto de cálcio e a eliminação do solvente. O estudo avaliou a influência do tipo de solvente, concentração de óleo, sonicação e razão óleo:alginato sobre as características das nanocápsulas em termos de tamanho médio, potencial zeta, morfologia, capacidade de encapsulação e estabilidade a 4° e a 25° C.

Sou *et al.*⁶⁴ avaliaram a biodistribuição de nanoesferas lipídicas e vesículas contendo curcumina, preparadas a partir da 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfolina (DMPC), 1,2-

distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-monometoxi polietilenoglicol, e um éster do ácido glutâmico, após administração intravenosa em ratos. Observações de microscopia confocal mostraram que os sistemas nanoparticulados foram amplamente distribuídos nos tecidos contendo macrófagos, especialmente baço e medula óssea, após 6 horas de injeção pela veia caudal, na dose curcumina de 2 mg/kg.

Recentemente, nanocápsulas lipídicas (NL) e poliméricas (NP) contendo curcumina foram preparadas pelas técnicas de inversão de fases e nanoprecipitação, respectivamente (Figura 3). Inicialmente, a caracterização dos sistemas foi realizada a fim de avaliar a adequabilidade da técnica de preparação e do tipo de material empregado⁷⁷. Os resultados mostraram que ambos os métodos utilizados permitiram a produção de partículas pequenas com diâmetro médio variando entre de 40 e 140 nm. Além disso, todas as formulações apresentaram valores de eficiência de encapsulação maiores que 99%, o que pode ser explicado pela baixa solubilidade do fármaco na fase aquosa externa e alta afinidade pelo núcleo oleoso da nanocápsula.

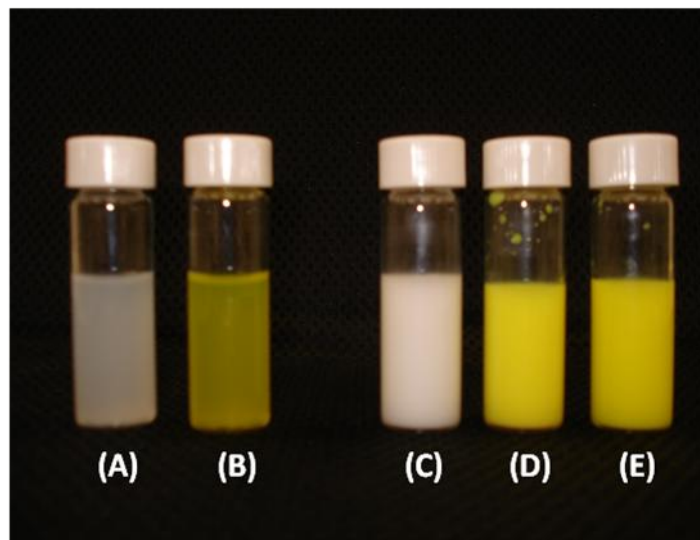


Figura 3. Aspectos macroscópicos das suspensões de nanocápsulas: (A) lipídicas brancas (sem fármaco); (B) lipídicas contendo curcumina; (C) poliméricas brancas preparadas com Pluronic F68; (D) poliméricas contendo curcumina preparadas com Pluronic F68, e (E) poliméricas contendo curcumina preparadas com Solutol HS15 como surfactante.

Nano e microemulsões

Wang *et al.* ⁶⁵ desenvolveram nanoemulsões óleo em água contendo curcumina, usando trigliceróis de cadeia média e Tween 20 como emulsificante, visando aumentar a atividade antiinflamatória do fármaco. As nanoemulsões obtidas por homogeneização por alta velocidade ou alta pressão apresentaram tamanho de gotícula de 618.6 e 79.5 nm, respectivamente. A atividade antiinflamatória da curcumina nanoemulsionada foi avaliada após administração oral, utilizando o modelo de inflamação de orelha de camundongo induzida pelo acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA). A inibição do edema de orelha foi de 43 % e 85 % para as nanoemulsões contendo 1 % de curcumina obtidas por alta velocidade e alta pressão, respectivamente, enquanto o efeito observado foi negligenciável após a administração de uma solução aquosa de curcumina livre 1 % contendo 10% de Tween 20.

A incorporação da curcumina em microemulsões também tem sido investigada. Lee *et al.* ⁶⁶ prepararam microemulsões contendo curcumina a partir do oleato de etila, tendo lecitina e Tween 80 como surfatantes. O controle da liberação da curcumina foi obtido pela aplicação de ultrassom de baixa frequência (40 kHz) com uma intensidade de 3.8 ou 9.8 W/cm². Os resultados mostraram que em condições básicas ou ácidas, a aplicação de ultrassom aumentou a taxa de liberação da curcumina a partir da microemulsão. A dependência da velocidade da liberação em função do pH e a alteração do tamanho da gota da microemulsão indicaram que mecanismos mecânicos, como ruptura da gota, e moleculares estão envolvidos no processo de liberação.

Sistemas de liberação automicroemulsionáveis (*do inglês self-microemulsifying drug delivery system, SMEEDS*) foram preparados com o intuito de aumentar a absorção oral da curcumina. A formulação ótima constituiu de 57,5% de uma mistura do emulsificante OP e Cremophor EL 1:1, 30% de polietilenoglicol 400 como co-surfatante e 12,4% de oleato de etila, e foi capaz de aumentar significativamente a solubilidade da curcumina que alcançou 21

g/grama da microemulsão. Ensaio de dissolução demonstraram que mais do que 95% de curcumina é dissolvida em tampão pH 1,2 e 6,8 em 20 min, contrastando com a dissolução do fármaco livre que foi de unicamente 2% em 60 min. A absorção intestinal da curcumina associada ao SMEEDS foi avaliada em modelo de perfusão *intestinal in situ*. Os resultados demonstraram que a absorção oral da curcumina foi significativamente aumentada quando associada à microemulsão, ocorrendo via transporte passivo através das membranas lipídicas⁶⁷.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A curcumina constitui um bom exemplo de um fármaco de origem natural cujas propriedades terapêuticas podem ser potencializadas mediante a utilização de estratégias farmacotécnicas. Principalmente o aumento da solubilidade aquosa e a proteção frente à degradação em meio fisiológico são cruciais para o alcance de concentrações plasmáticas efetivas deste fármaco. Inúmeros exemplos bem sucedidos utilizando sistemas de liberação foram apresentados nesta revisão, destacando-se a incorporação em nanoestruturas como micelas, lipossomas, nano e microemulsões e nanopartículas. Entretanto, ensaios clínicos em seres humanos ainda devem ser realizados para avaliar a segurança de utilização e a eficácia destas novas formas de administração na terapêutica.

REFERÊNCIAS

- ¹ Araújo, C. & L. Leon (2001) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **96**:723-8.
- ² Heath, D.D., M.A. Pruitt, D.E. Brenner & C.L. Rock (2003) *J. Chromatogr. B* **783**:287-95.
- ³ Funk, J.L., J.N. Oyarzo, J.B. Frye, G. Chen, R.C. Lantz, S.D. Jolad, A.M. Sólyom & B.N. Timmermann (2006) *J. Nat. Prod.* **69**:351-5.
- ⁴ Miquel, J., A. Bernd, J.M. Sempere, J. Díaz-Alperi & A. Ramírez (2002) *Arch. Gerontol. Geriatr.* **34**:37-46.
- ⁵ Olszanecki, R., J. Jawiën, M. Gajda, L. Mateuszuk, A. Gebaska, M. Korabiowska, S. Chlopicki & R. Korbut (2005) *J. Physiol. Pharmacol.* **56**:627-35.
- ⁶ Menon, L.G., R. Kuttan & G. Kuttan (1999) *Cancer Lett.* **141**:159-65.
- ⁷ Negi, P.S., G.K. Jayaprakasha, L.J.M. Rao & K.K. Sakariah (1999) *J. Agric. Food Chem.* **47**:4297-300.
- ⁸ Huang, M.T., T. Lysz, T. Ferraro, T.F. Abidi, J.D. Laskin & A.H. Conney (1991) *Cancer Res.* **51**:813-19.
- ⁹ Jiang, H., C.S. Deng, M. Zhang & J. Xia (2006) *World J. Gastroenterol.* **12**:3848-53.
- ¹⁰ Jayaprakasha, G.K., L.J. Rao & K.K. Sakariah (2006) *Food Chemistry.* **98**:720-4.
- ¹¹ Reddy, A.C. & B.R. Lokesh (1994) *Food Chem. Toxicol.* **32**:279-83.
- ¹² Unnikrishnan, M.K. & M.N.A. Rao (1992) *FEBS Lett.* **301**:195-6.
- ¹³ Araújo, C.A.C., L.V. Alegrio, D.C.F. Gomes, M.E.F. Lima, L. Gomes-Cardoso & L.L. Leon (1999) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **94**:791-4.
- ¹⁴ Aggarwal, B., A. Kumar & A. Bharti (2003) *Antic. Res.* **23**:363-98.
- ¹⁵ Huang, M.T., W. Ma, P. Yen, J.G. Xie, J. Han, K. Frenkel, D. Grunberger & A.H. Conney (1997) *Carcinogenesis.* **18**:83-8.
- ¹⁶ Ozaki, K., Y. Kawata, S. Amano & S. Hanazawa (2000) *Biochem. Pharmacol.* **59**:1577-81.
- ¹⁷ Bourne, K.Z., N. Bourne, S.F. Reising & L.R. Stanberry (1999) *Antiviral Res.* **42**:219-26

- ¹⁸ Mazumder, A., K. Raghavan, J. Weinstein, K.W. Kohn & Y. Pommer (1995) *Biochem. Pharmacol.* **49**:1165-70.
- ¹⁹ Li, H.L., C. Liu, G. de Couto, M. Ouzounian, M. Sun, A.B. Wang, Y. Huang, C.W. He, Y. Shi, X. Chen, M.P. Nghiem, Y. Liu, M. Chen, F. Dawood, M. Fukuoka, Y. Maekawa, L. Zhang, A. Leask, A.K. Ghosh, L.A. Kirshenbaum, P.P. Liu (2008) *J. Clin. Invest.* **118**:850-2.
- ²⁰ Ansari, M.N., U. Bhandari & K.K. Pillai (2007) *Hum. Exp. Toxicol.* **26**:933-8.
- ²¹ Manikandan, P., M. Sumitra, S. Aishwarya, B.M. Manohar, B. Lokanadam & R. Puvanakrishnan (2004) *IJBCB.* **36**:1967-80.
- ²² Nirmala, C. & R. Puvanakrishnan (1996) *Biochem. Pharm.* **51**:47-51.
- ²³ Venkatesan, N. (2000) *Life Sci.* **66**:PL21-8.
- ²⁴ Venkatesan, N., V. Punithavathi & G. Chandrakasan (1997) *Life Sci.* **61**:PL51-8.
- ²⁵ Reyes-Gordillo, K., J. Segovia, M. Shibayama, P. Vergara, M.G. Moreno & P. Muriel (2007) *Biochim. Biophys. Acta.* **1770(6)**:989-96.
- ²⁶ Kiso, Y., Y. Suzuki, N. Watanabe, Y. Oshima & H. Hikino (1983) *Planta Med.* **49**:185-7.
- ²⁷ Weisberg, A.P., R. Leibel & D.V. Tortoriello (2008) *Endocrinology.* **149(7)**:3549-58.
- ²⁸ Arun, N. & N. Nalini (2002) *Plant Foods Hum. Nutr.* **57**:41-52.
- ²⁹ Cole, G.M., B. Teter & S.A. Frautschy (2007) *Adv. Exp. Med. Biol.* **595**:197-212.
- ³⁰ Goel, A., A. Kunnumakkara & B. Aggarwal (2008) *Biochem. Pharmacol.* **75(4)**:787-809.
- ³¹ Duvoix, A., R. Blasius, S. Delhalle, M. Schnekenburger, F. Morceau, E. Henry, M. Dicato & M. Diederich (2005) *Cancer Lett.* **223**:181-90.
- ³² Wahl, H., L. Tan, K. Griffith, M. Choi & R. Liu (2007) *Gynecol. Oncol.* **105**:104-12.
- ³³ Thangapazham, R.L., A. Sharma & R.K. Maheshwari (2006) *AAPS J.* **8**:E443-E449.
- ³⁴ Shishodia, S., M.M. Chaturvedi & B.B. Aggarwal (2007) *Curr. Probl. Cancer* **31**:243-305.
- ³⁵ Tomren, M., M. Másson, T. Loftsson & H. Tonnesen (2007) *Int. J. Pharm.* **338**:27-34.

- ³⁶ Tonnesen, H. (2002) *Pharmazie* **57**:820-4.
- ³⁷ Tonnesen, H., M. Másson, & T. Loftsson (2002) *Int. J. Pharm.* **244**:127-35.
- ³⁸ Anand, P., A. Kunnumakkara, R. Newman & B. Aggarwal (2007) *Mol. Pharm.* **4**:807-18.
- ³⁹ Torchilin, V.P. (2007) *Pharm. Res.* **24**:1-16.
- ⁴⁰ Ruby, A., G. Kuttan, K.D. Badu, K.N., Rajasekharan & R. Kuttan (1995) *Cancer Lett.* **94**:79-83.
- ⁴¹ Sharma, R., A. Gescher & W. Steward (2005) *Eur. J. Cancer* **41**:1955-68.
- ⁴² Wang, F., W. Huang & Y. Wang (2008) *J. Luminescence* **128**:110-6.
- ⁴³ Wang, Y., M. Pan, A. Cheng, L. Lin, Y. Ho, C. Hsieh & J. Lin (1997) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **15**:1867-76.
- ⁴⁴ Pfeiffer, E., S. Höhle, A.M. Solyom & M. Metzler (2003) *J. Food Eng.* **56**:257-9.
- ⁴⁵ Ansari, M.J., S. Ahmad, K. Kohli, J. Ali & R.K. Khar (2005) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **39**:132-8.
- ⁴⁶ Letchford, K., R. Liggins & H. Burt (2008) *J. Pharm. Sci.* **97**:1179-90.
- ⁴⁷ Sahu, A., U. Bora, N. Kasoju & P. Goswami (2008) *Acta Biomater.* **4**:1752-61.
- ⁴⁸ Sahu, A., N. Kasoju, U. Bora (2008) *Biomacromolecules* **9**:2905-12.
- ⁴⁹ Ma, Z., A. Haddadi, O. Molavi, A. Lavasanifar, R. Lai & J. Samuel (2008) *J. Biomed. Mat. Res. A.* **86**(2):300-10.
- ⁵⁰ Ma, Z., A. Shayeganpour, D.R. Brocks, A. Lavasanifar & J. Samuel (2007) *Biomed. Chromatogr.* **21**:546-552.
- ⁵¹ Iwunze, M. (2004) *J. Mol. Liquids* **111**:161-5.
- ⁵² Maiti, K., K. Mukherjee, A. Gantait, B.P. Saha & P.K. Mukherjee (2007) *Int. J. Pharm.* **330**:155-63.
- ⁵³ Liu, A., H. Lou, L. Zhao & P. Fan (2006) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **40**:720-7.

- ⁵⁴ Marczylo, T.H., R.D. Verschoyle, D.N. Cooke, P. Morazzoni, W.P. Steward & A.J. Gescher (2007) *Cancer Chemother. Pharmacol.* **60**:171-7.
- ⁵⁵ Hegge, A.B., R.B. Schüller, S. Kristensen & H.H. Tonnesen (2008) *Pharmazie* **63**:585-92.
- ⁵⁶ Li, L., F. Braiteh & R. Kurzrock (2005) *Cancer* **104**:1322-31.
- ⁵⁷ Li, L., B. Ahmed, K. Mehta & R. Kurzrock (2007) *Mol. Cancer Ther.* **6**:1276-82.
- ⁵⁸ Thangapazham, R.L., A. Puri, S. Tele, R. Blumenthal & R.K. Maheshwari (2008) *Int. J. Oncol.* **32**:1119-23.
- ⁵⁹ Wang, D., M.S. Veena, K. Stevenson, C. Tang, B. Ho, J.D. Suh, V.M. Duarte, K.F. Faull, K. Mehta, E.S. Srivatsan & M.B. Wang (2008) *Clin. Cancer Res.* **14**:6228-36.
- ⁶⁰ Chen, C., T.D. Johnston, R. Gedaly, P.P. McHugh, T.G. Burke & D. Ranjan (2009) *Int. J. Pharm.* **366**:133-9.
- ⁶¹ Kunwar, A., A. Barik, R. Pandey & K.I. Priyadarsini (2006) *Biochim. Biophys. Acta* **1760**:1513-20.
- ⁶² Bisht, S., G. Feldmann, S. Soni, R. Ravi, C. Karikari, A. Maitra & A. Maitra (2007) *J. Nanobiotechnology* **5**:3.
- ⁶³ Tiyaboonchai, W., W. Tungpradit & P. Plianbangchang (2007) *Int. J. Pharm.* **337**:299-306.
- ⁶⁴ Sou, K. S. Inenaga, S. Takeoka & E. Tsuchida (2007) *Int. J. Pharm.* **352**:287-93.
- ⁶⁵ Wang, X., Y. Jiang, Y. Wang, M. Huang, C. Ho & Q. Huang (2008) *Food Chem.* **108**:419-24.
- ⁶⁶ Lee, M., H. Lin, H. Chen & J. Thomas (2008) *Langmuir* **24**:1707-13.
- ⁶⁷ Cui, J., B. Yu, Y. Zhao, W. Zhu, H. Li, H. Lou & G. Zhai (2009) *Int. J. Pharm.* (in press).
- ⁶⁸ Challa, R., A. Ahuja, J. Ali & R.K. Khar (2005) *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **6**:E329-57.
- ⁶⁹ Huwyler, J., J. Drewe & S. Krähenbühl (2008) *Int. J. Nanomedicine* **3**:21-9.
- ⁷⁰ Kshirsagar, N.A., S.K. Pandya, B.G. Kirodian & S. Sanath (2008) *J. Postgrad. Med.* **51**:S5-15.

- ⁷¹ Hong, W., D.W. Chen, X.L. Zhao, M.X. Qiao & H.Y. Hu (2008) *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **33**:889-92.
- ⁷² Gref, R., A. Domb, P. Quellec, T. Blunk, R. Müller, J. Verbavatz & R. Langer (1995) *Adv. Drug Del. Rev.* **16**:215-33.
- ⁷³ Gupte, A. & K. Ciftci (2004) *Int. J. Pharm.* **276**:93-106.
- ⁷⁴ Fonseca, C., S. Simões & R. Gaspar (2002) *J. Control. Rel.* **83**:273-86.
- ⁷⁵ Zhang, J.F., S.X. Hou & H.L. Liu (2007) *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **32**:303-6.
- ⁷⁶ Lertsutthiwong, P., K. Noomun, N. Jongaroonngamsang, P. Rojsitthisak & U. Nimmannit (2008) *Carbohydr. Polym.* **74**:209-93.
- ⁷⁷ Mazzarino, L. & E. Lemos-Senna (2008) “*Preparation and characterization of polymeric and lipid nanocapsules containing curcumin*”, in “^{2nd} French-Brazilian Meeting on Polymers”, Florianopolis, B33.

**CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA
ANALÍTICA PARA DOSEAMENTO DA CURCUMINA ENCAPSULADA EM
SISTEMAS NANOESTRUTURADOS**

A quantificação de fármacos é necessária nas diversas fases do desenvolvimento de um produto farmacêutico. O emprego de métodos analíticos validados serve como suporte no monitoramento das várias etapas do estudo de formulação, assim como para os estudos pré-clínicos, os quais são essenciais para atestar a eficácia das inovações farmacotécnicas propostas. A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método proposto atenda às exigências das aplicações analíticas assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003). Diversos órgãos, como Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), *International Conference on Harmonization* (ICH) e *Food and Drug Administration* (FDA), têm disponibilizado guias contendo as diretrizes que devem ser adotadas em processos de validação. Entre os parâmetros de validação que devem ser avaliados estão:

- Especificidade: é a capacidade do método analítico de quantificar a substância de interesse em presença de outros componentes que possam estar presentes, como impurezas, produtos de degradação e excipientes;
- Linearidade: é a habilidade do método de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração de analito na amostra, em um dado intervalo;
- Exatidão: expressa a concordância entre os resultados obtidos pelo método e o valor verdadeiro ou aceito como referência;
- Precisão (repetibilidade e precisão intermediária): expressa a proximidade de resultados obtidos em uma série de medidas de uma mesma amostra;
- Limite de detecção: corresponde à menor concentração de analito presente na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada;
- Limite de quantificação: corresponde à menor concentração de analito presente na amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão adequadas (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Alguns métodos têm sido descritos para a quantificação da curcumina em formas farmacêuticas (BISHT et al., 2007; TIYABOONCHAI et al., 2007; XIE et al., 2007), alimentos (DÍAZ & PEINADO, 1992; HISERODT et al., 1996; JAYAPRAKASHA et al., 2002) e materiais biológicos (HEATH et al., 2003; PAK et al., 2003; MAY et al., 2005; LIU et al., 2006), empregando, na maioria, a espectroscopia de absorção no ultravioleta ou a cromatografia líquida de alta eficiência. A curcumina apresenta a propriedade de exibir elevada fluorescência em solventes orgânicos e mesmo que alguns trabalhos enfoquem o

desenvolvimento de sistemas nanoestruturados contendo curcumina, não há relato na literatura de um método analítico fluorimétrico validado para quantificação deste fármaco em suspensões coloidais. Diante do exposto, o presente capítulo tem como objetivo descrever o desenvolvimento e a validação de uma metodologia analítica por fluorescência para quantificação da curcumina.

Publicação: Development and validation of a fluorimetric method to determine curcumin in lipid and polymeric nanocapsule suspension

Submetido à Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences

Development and validation of a fluorimetric method to determine curcumin in lipid and polymeric nanocapsule suspensions

Letícia Mazzarino¹, Ismael Casagrande Bellettini², Edson Minatti², Elenara Lemos-Senna^{1*}

¹*Laboratório de Farmacotécnica, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina,* ²*Laboratório de Polímeros e Surfactantes em Solução, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina.*

***Correspondência:**

E. L. Senna

Laboratório de Farmacotécnica

Departamento de Ciências Farmacêuticas

Universidade Federal de Santa Catarina

Campus Universitário Trindade

88040-900 – Florianópolis - SC, Brazil.

E-mail: lemos@ccs.ufsc.br

A simple, rapid, and sensitive fluorimetric method was developed and validated to quantify curcumin in lipid and polymeric nanocapsule suspensions, using acetonitrile as solvent. The excitation and emission wavelengths were set at 397 nm and 508 nm, respectively. The calibration graph was linear from 0.1 to 0.7 µg/mL with a correlation coefficient of 0.9957. The detection and quantitation limits were 0.01 and 0.04 µg/mL, respectively. The validation results confirmed that the developed method is specific, linear, accurate, and precise for its intended use. The current method was successfully applied to the evaluation of curcumin content in lipid and polymeric nanocapsule suspensions during the early stage of formulation development.

Uniterms: Curcumin/determination. Fluorimetric method/quantitative analysis. Polymeric nanocapsule/evaluation. Lipid nanocapsule/evaluation.

INTRODUCTION

Curcumin [1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione] (Figure 1) is a yellow polyphenol extracted from the rhizome of the plant *Curcuma longa*, commonly known as turmeric. It is widely used in food as a spice flavoring and coloring agent. The medicinal use of this plant has been recognized in Ayurveda for over 6000 years (Aggarwal *et al.*, 2003; Heath *et al.*, 2003). Curcumin has been shown to possess several pharmacological activities including antiinflammatory, anticancer, antioxidant and antimicrobial effects (Maheshwari *et al.*, 2006). Curcumin has demonstrated chemopreventive properties, suppressing the tumorigenic activity of a wide variety of carcinogens in several kinds of cancer. In culture cell and animal studies, curcumin has been shown to exhibit antiproliferative, anti-invasive, and antiangiogenic properties. Curcumin has also demonstrated its usefulness for the treatment of other maladies as diabetes, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and arthritis (Syng-ai *et al.*, 2004).

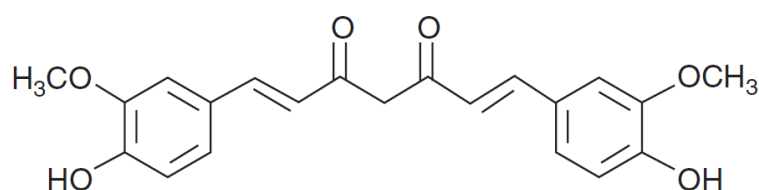


FIGURE 1 - Chemical structure of curcumin.

In spite of the great potential of the use of curcumin in therapeutics, its clinical application has been limited due to some drawbacks. This drug displays a poor aqueous solubility, preventing its administration by intravenous route. When administered orally, the majority of curcumin is secreted in the feces and only negligible amounts in the urine, indicating that this drug is poorly absorbed from the gut. Pharmacokinetic studies have indicated that curcumin is rapidly metabolized in the liver, undergoing extensive reduction via alcohol dehydrogenase (Syng-ai *et al.*, 2004). Besides the low systemic bioavailability expected from its pharmacokinetic characteristics, curcumin is quickly hydrolyzed at neutral and basic pH and is susceptible to photochemical degradation (Wang *et al.*, 1997; Sharma *et al.*, 2001; Tonnesen *et al.*, 2002; Tomren *et al.*, 2007). In order to overcome these problems, curcumin has been associated with colloidal carriers. Among them, polymeric nanoparticles

have been considered as promising drug delivery systems due to their potential to increase the therapeutic efficacy and to reduce the undesirable side effects of drugs. Other important advantages of nanoparticles include their ability to carry water-insoluble drugs by intravenous route, their protection of active molecules against *in vivo* degradation, their ability to control the drug release, ease of preparation and high stability in biological fluids and during storage (Gref *et al.*, 1995; Fonseca *et al.*, 2002; Gupte, Ciftci, 2004). On the other hand, some drawbacks of polymeric nanoparticles derive from the residues of organic solvents required in their preparation, polymer cytotoxicity, and the difficult scaling up of the production processes.

In recent years, the main objective of researchers concerning the preparation of colloidal drug carriers has been the development of drug delivery systems using only acceptable excipients for human use (Heurtault *et al.*, 2002; Mehnert, Mäder, 2002). Recently, lipid nanocapsules have been proposed as carriers for hydrophobic drugs. Lipid nanocapsules are submicronic particles composed of an oily liquid core surrounded by a solid or semi-solid shell of surfactant. These systems are prepared with lipids and a combination of hydrophilic/lipophilic surfactants approved by the FDA (Heurtault *et al.*, 2002; Dulieu, Bazile, 2005). Lipid nanocapsules have been prepared using the phase inversion process, which is based in the ability of polyethoxylated surfactants to change their affinities by the water and oil phase, as a function of the emulsion temperature, resulting in more stable and smaller nanoparticles. This method also has the advantages of being relatively simple and low-energy consuming, allowing easy industrial scale-up, and especially, avoiding the use of organic solvents, whose residues represent a potential risk to human health (Witschi, Doelker, 1997; Heurtault *et al.*, 2003; Anton *et al.*, 2008).

The preparation of lipid and polymeric nanocapsules has been explored in our research group with the aim to improve the stability and biological performance of curcumin. Firstly, we aimed to evaluate the effect of the type of the materials (lipid or polymer) and the procedures employed in the preparation of the nanocapsule suspensions on curcumin encapsulation. As support for formulation development as well as for future preclinical studies, a specific and sensitive analytical method must be developed and validated. The method most widely used for quantification of curcumin is a direct ultraviolet spectrophotometry method, but a lack of reproducibility has been observed. High performance liquid chromatography methods have been also developed to quantify curcumin, but they display the disadvantages of being more time-consuming and expensive (Bisht *et al.*, 2007;

Nam *et al.*, 2007; Tiyafoonchai *et al.*, 2007; Sou *et al.*, 2008). Given that curcumin exhibits strong fluorescence in organic solvents (Díaz, Peinado, 1992), and the fact that no validated method has been described to quantify curcumin in colloidal suspensions, the development and validation of a spectrofluorimetric method was undertaken to determine curcumin loading in polymeric and lipid nanocarrier suspensions.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals and Reagents

Curcumin and poly (D,L-lactide) (PLA, MW 90,000 – 120,000) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Soybean hydrogenated lecithin (LIPOID S 75-3N) was provided by Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany) and castor oil was obtained from Via Farma Importadora Ltda. (São Paulo, Brazil). Hydroxystearic acid-polyethylene glycol copolymer (Solutol HS 15) and Poloxamer (Pluronic F 68) were kindly donated by the BASF Chemical Company (Ludwigshafen, Germany). Sodium chloride was obtained from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). Except for the acetonitrile of HPLC grade used in the analysis (Carlo Erba, Milan, Italy), all other reagents and solvents were of analytical grade.

Preparation of the Colloidal Suspensions

Lipid Nanocapsule Suspensions

Lipid nanocapsule suspensions were prepared by phase inversion method as described by Heurtault *et al.* (2002). An aqueous phase containing 8.40 g distilled water, 0.75 g NaCl and 4.20 g Solutol HS 15 was added to the oil phase containing 1.40 g castor oil, 0.14 g lecithin, and 5 or 10 mg curcumin, both previously heated to 90°C, under magnetic stirring. Three temperature cycles alternating from 60 to 95°C were applied to reach the inversion process. During the last cooling, the suspensions were rapidly diluted with 25.0 mL cold water (approximately 0°C) and continuously stirred for 30 min.

Polymeric Nanocapsule Suspensions

Polymeric nanocapsule suspensions were prepared using the interfacial deposition process after solvent displacement as described by Fessi *et al.* (1989). Briefly, 60.0 mg PLA, 0.250 mL castor oil, and 2.5 or 5.0 mg curcumin were dissolved in 2 mL of acetone. The resulting solution was mixed with a 10 mL acetone:ethanol (60:40, v/v) mixture containing 25.0 mg lecithin, and the final volume was adjusted to 12.0 mL. This organic phase was poured into an aqueous phase (26.0 mL) containing 0.375% (w/v) of Pluronic F 68 or Solutol HS 15, maintained under magnetic stirring. The organic solvents were then eliminated by evaporation under reduced pressure, and the final volume of the colloidal suspension was adjusted to 10.0 mL.

Lipid and polymeric nanocapsule suspensions were filtered through filter paper with a pore size of 8 μm (J-Prolab, São José dos Pinhais, Brazil). Unloaded lipid and polymeric nanocapsule suspensions were prepared and treated in the same manner as the samples. The nanocapsule suspensions were analyzed in the fluorimetric system after dissolution in acetonitrile.

Fluorimetric method

Steady-state fluorescence

The steady-state fluorescence spectra of curcumin were recorded on a Hitachi F4500 Spectrofluorimeter equipped with a thermostatted cell holder set at 25.0 °C. The sample was continuously stirred in a standard 1 cm quartz cell. Both slits of excitation and emission monochromators were adjusted to 5.0 nm. The samples were excited at 397 nm and the emission spectra were recorded from 440 to 600 nm. The relative fluorescence intensities were measured at $\lambda_{\text{emi}} = 508 \text{ nm}$.

Preparation of Stock and Working Solutions

A stock solution was prepared by accurately dissolving 100.0 mg of curcumin in 100.0 mL of acetonitrile. From this solution, a working standard solution of 10.0 $\mu\text{g/mL}$ was prepared in acetonitrile. This solution was then diluted as needed to prepare different standard solutions: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 and 0.7 $\mu\text{g/mL}$ in acetonitrile.

Method Validation

The validation parameters evaluated were specificity, linearity and range, accuracy, precision, limit of quantification (LOQ) and limit of detection (LOD). The performance characteristics were based on the pharmaceutical regulatory guidelines of the International Conference on Harmonization (2005) and United States Pharmacopeia (2007).

- (a) *Specificity*. The specificity of the fluorimetric method was evaluated by analyzing unloaded nanocapsule suspensions in order to verify whether the excipients used in the formulations of the nanocapsule suspensions interfered in the curcumin quantification. The samples were analyzed in the fluorimetric system in triplicate.
- (b) *Linearity and range*. Seven standard solutions ranging from 0.1 to 0.7 µg/mL, in concentration, 3 replicates each, were analyzed in the fluorescence system. The calibration graph was obtained by plotting the fluorescence intensity of the standard solutions against the theoretical standard concentrations. The linearity was evaluated by linear least-square regression analysis.
- (c) *Accuracy*. The accuracy was investigated by spiking unloaded nanocapsule suspensions with known concentrations of curcumin standard solution at 3 different levels (lower, medium and upper concentration) corresponding to curcumin final concentrations of 0.1, 0.4 and 0.7 µg/mL. The analysis was performed in triplicate. The recovery (R) was estimated after fluorescence analysis using the following equation:

$$R, \% = \frac{C_{snc} - C_{nc}}{C_{ss}} \times 100$$

where R is recovery, C_{snc} is the curcumin concentration in the spiked nanocapsule suspension, C_{nc} is the curcumin concentration in unloaded nanocapsule suspension, and C_{ss} is the curcumin concentration in standard solution.

- (d) *Precision*. The precision of the method was determined by measuring the repeatability (intraday precision) and the intermediate precision (interday precision), both expressed as relative standard deviation (RSD). The precision was evaluated by assaying of standard solutions with different concentrations of curcumin (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 and 0.7 µg/mL). The repeatability was evaluated by measuring 3 samples of each concentration of curcumin on the same day under the same experimental conditions. The intermediate precision was

evaluated by assaying each standard solution on 3 different days. The RSD was calculated.

- (e) *Limit of Quantification (LOQ)*. The LOQ value was calculated directly from the calibration graph. It is defined as the lowest concentration in the standard curve that can be measured with suitable precision and accuracy. LOQ may be expressed as:

$$LOQ = \frac{10\delta}{S}$$

where δ is the standard deviation (SD) of y-intercepts of regression lines and S is the slope of the calibration graph.

- (f) *Limit of detection (LOD)*. The LOD value was calculated directly from the calibration graph. It is defined as the lowest concentration in the standard curve that can be detected, but not necessarily quantified as an exact value. LOD may be expressed as:

$$LOD = \frac{3.3\delta}{S}$$

where δ is the standard deviation (SD) of y-intercepts of regression lines and S is the slope of the calibration graph.

Determination of curcumin loading in nanocapsules

Entrapment efficiency and drug content were estimated after determination of the curcumin concentration in the nanocapsule suspensions by fluorescence spectrophotometry. The entrapment efficiency (%) was estimated as being the difference between the total concentration of curcumin found in the nanocapsule suspensions after their complete dissolution in acetonitrile and the concentration of drug in the supernatant obtained by suspension ultrafiltration/centrifugation procedure using Microcon Centrifugal Filter Devices with Ultracel YM-100 membrane (100 000 nominal molecular weight limit, Millipore Corp., USA). The drug content was expressed in μg of curcumin/mL of suspension.

RESULTS AND DISCUSSION

The validation of analytical procedures is proof of the suitability of the method for the intended purpose. The actual guidelines define the validation characteristics needed for various types of test procedures, but it is the responsibility of the analyst to identify the critical performance parameters and to design the validation study adequately (Ermer, 2001). Fluorimetric methods have shown to be sensitive, simple, rapid and reproducible for the quantitative determination of many compounds (Aktas *et al.*, 2003; Abdellatef *et al.*, 2006). Considering the biological interest of curcumin, several studies have reported the determination of this drug by fluorimetric methods (Wang *et al.*, 2006; Wang, Huang, 2007; Wang *et al.*, 2008). However, the steady-state absorption and fluorescence characteristics of curcumin have been found to be sensitive to the solvent's characteristics. Diaz and Peinado (1992) demonstrated that the relative fluorescence intensity of curcumin increases with increasing solvent dielectric constant. The highest value of relative fluorescence intensity was obtained using acetonitrile. Degradation of curcumin in acetonitrile solution was also reported after irradiation with light (400-700 nm), but the live-times were long enough to realize fluorimetric analysis of curcumin; fluorescence readings were constant for at least 1 h (Khopde *et al.*, 2000). Besides the use of acetonitrile to provide higher values of fluorescence intensities, this solvent is able to dissolve curcumin and the lipid and polymeric constituents of nanocapsule suspensions, and for these reasons this solvent was chosen to carry out the analysis (Tonnesen, 2002).

A representative emission spectrum of curcumin obtained under the specified fluorescence conditions is shown in Figure 2A. This spectrum shows an intense emission band in the 450 - 600 nm wavelength region, exhibiting a fluorescence maximum at 508 nm. In order to prove the specificity of the method, unloaded lipid and polymeric nanocapsule suspensions containing the same concentration of the excipients were analyzed. The fluorescence spectra obtained from unloaded lipid and polymeric nanocapsule suspensions are shown in Figures 2B, 2C and 2D).The spectra showed that the method was specific because no interference from the excipients was detected at 508 nm with the employed fluorimetric conditions.

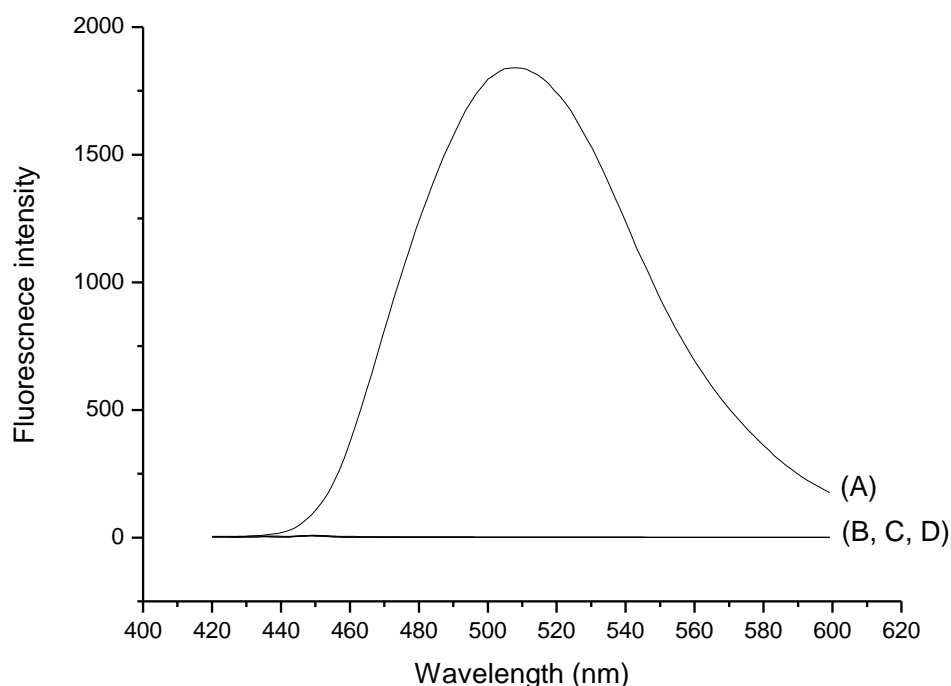


FIGURE 2 - Emission spectra obtained for: (A) curcumin standard solution, 1 $\mu\text{g/mL}$; (B,C,D) unloaded polymeric nanocapsule suspensions prepared using Pluronic F 68, unloaded polymeric nanocapsule suspensions prepared using Solutol HS15, and unloaded lipid nanocapsule suspensions, respectively.

The calibration graph for curcumin in lipid and polymeric nanocapsules was linear over the range of 0.1 to 0.7 $\mu\text{g/ml}$ with a correlation coefficient of 0.9957. The regression equation of the media calibration graph ($n=3$) was:

$$y = 1810x + 44.42$$

The slope and the intercept SDs were 19.03 and 7.79, respectively. The validity of the assay was verified by analysis of variance (ANOVA), which confirmed that the regression equation was linear ($F_{\text{calculated}} = 1156.95 > F_{\text{critical}} = 4.13 \times 10^{-7}$, $P = 5\%$). The LOQ and LOD of the method calculated were 0.04 and 0.01 $\mu\text{g/mL}$ (RSD = 2.18%), respectively, indicating that the method was sufficiently sensitive to be used for the drug entrapment evaluation.

The precision of the developed method is displayed in Table I. The results showed that the intraday and interday RSD values were lower than 5.0 % (Brasil, 2003). The fluorescence intensities indicated satisfactory intraday and interday variability.

TABLE I - Results obtained in the precision evaluation of the method.

Theoretical amount of curcumin, ug/ml	Day n°		Fluorescence intensity \pm SD	RSD, %
0.1	Intraday (n=3)	1	205.71 \pm 5.25	2.55
		2	197.54 \pm 6.30	3.19
		3	202.6 \pm 1.76	0.87
	Interday (n=9)		202.6 \pm 4.12	2.04
0.2	Intraday (n=3)	1	413.13 \pm 12.20	2.95
		2	398.03 \pm 11.39	2.86
		3	403.08 \pm 2.32	0.57
	Interday (n=9)		403.08 \pm 7.69	1.91
0.3	Intraday (n=3)	1	602.02 \pm 23.20	3.85
		2	586.78 \pm 17.04	2.90
		3	605.10 \pm 9.13	1.51
	Interday (n=9)		602.02 \pm 9.81	1.63
0.4	Intraday (n=3)	1	800.08 \pm 10.43	1.30
		2	807.88 \pm 10.18	1.26
		3	790.59 \pm 13.71	1.73
	Interday (n=9)		800.08 \pm 8.66	1.08
0.5	Intraday (n=3)	1	981.17 \pm 7.07	0.72
		2	993.43 \pm 15.95	1.61
		3	944.98 \pm 20.57	2.18
	Interday (n=9)		981.17 \pm 25.19	2.57
0.6	Intraday (n=3)	1	1100.58 \pm 4.48	0.41
		2	1130.48 \pm 18.26	1.62
		3	1163.38 \pm 29.68	2.55
	Interday (n=9)		1130.48 \pm 31.41	2.78
0.7	Intraday (n=3)	1	1254.41 \pm 1.8	0.14
		2	1368.68 \pm 9.14	0.67
		3	1272.35 \pm 18.31	1.44
	Interday (n=9)		1272.35 \pm 61.45	4.83

The accuracy of the method was evaluated using three developed nanocapsule suspensions: lipid prepared using Solutol HS15, and polymeric prepared using Pluronic F 68 or Solutol HS 15 as hydrophilic surfactants. The recovery was determined as a percentage of

the difference between the experiments at 3 different levels. Each level was tested 3 times. The results given in Table II demonstrate that the method exhibits an acceptable accuracy.

TABLE II - Recovery of curcumin standard solution added to nanocapsule suspension samples.

Sample	Amount of curcumin		Recovery, %	RSD, %
	Added concn, µg/mL	Measured concn, µg/mL		
Lipid NC	0.10	0.10	100.00	3.13
	0.40	0.40	100.00	2.89
	0.70	0.66	94.29	0.27
Polymeric NC (Pluronic F 68)	0.10	0.10	100.00	2.85
	0.40	0.40	100.00	0.43
	0.70	0.67	95.71	0.48
Polymeric NC (Solutol HS 15)	0.10	0.10	100.00	0.75
	0.40	0.40	100.00	0.21
	0.70	0.67	95.71	1.45

The results obtained in the evaluation of curcumin loading in the two kinds of nanocapsules are summarized in Table III. The concentration of drug in the supernatant obtained by suspension ultrafiltration/centrifugation procedure was lower than the LOQ of the method, indicating that only a very low concentration ($< 0.04 \mu\text{g/mL}$) was not encapsulated. Since the total concentration of curcumin varied from 127.04 to 509.49 $\mu\text{g/mL}$, it is possible to state that for all formulations, the entrapment efficiency values were higher than 99 %. These high values of entrapment efficiency obtained for curcumin can be related to the higher affinity of this hydrophobic drug for the oil core of nanocapsules. Moreover, the pH of the nanocapsule suspension was maintained below 6 to obtain the optimum stability of the preparations, preventing degradation of the drug. The curcumin was completely recovered in the colloidal suspensions, independent of the drug amount initially added to the formulations. The differences of drug content values in the nanocapsule suspensions are related only to the differences in the final volume of the preparations. The results demonstrated that the fluorimetric method can be successfully applied to determine curcumin in lipid and polymeric nanocapsule suspensions.

TABLE III - Drug content and drug recovery results obtained after curcumin quantitation of the nanocapsule suspensions.

Sample	Amount of curcumin, mg	Drug content $\mu\text{g/mL} \pm \text{RSD}$	Drug recovery $\% \pm \text{RSD}$
Lipid NC	5.0	127.04 ± 1.90	101.38 ± 1.90
	10.0	258.90 ± 0.54	103.00 ± 0.50
Polymeric NC (Pluronic F68)	2.5	249.99 ± 1.11	100.00 ± 1.11
	5.0	502.00 ± 0.79	100.40 ± 0.79
Polymeric NC (Solutol HS 15)	2.5	256.16 ± 0.75	102.47 ± 0.75
	5.0	509.49 ± 0.56	101.90 ± 0.56

CONCLUSIONS

The developed and validated fluorimetric method proved to be specific, linear, accurate, precise and sensitive. It was successfully used to quantify curcumin in lipid and polymeric nanocapsule suspensions, and can be applied for the determination of entrapment efficiency and drug content, not only for formulation studies, but also as a requirement to undertake further chemical stability evaluation and preclinical studies of the nanocapsule suspensions.

RESUMO

Desenvolvimento e validação de um método fluorimétrico para a determinação de curcumina em suspensões de nanocápsulas poliméricas e lipídicas

Um método fluorimétrico simples, rápido e sensível foi desenvolvido e validado para quantificação da curcumina em suspensões de nanocápsulas lipídicas e poliméricas, usando acetoneitrila como solvente. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 397 nm e 508 nm, respectivamente. Nas condições testadas, a curva de calibração demonstrou-se linear na faixa de 0,1 a 0,7 µg/mL, exibindo coeficiente de correlação de 0,9957. Os limites de detecção e quantificação foram 0,01 e 0,04 µg/mL, respectivamente. Os resultados da validação confirmaram que o método desenvolvido é específico, linear, exato e preciso para o uso proposto. O presente método foi aplicado com sucesso para a avaliação do teor de curcumina nas suspensões de nanocápsulas lipídicas e poliméricas durante o estágio inicial do desenvolvimento da formulação.

Unitermos: *Curcumina/determinação. Método fluorimétrico/análise quantitativa. Nanocápsulas poliméricas/avaliação. Nanocápsulas lipídicas/avaliação.*

REFERENCES

- ABDELLATEF, H.E.; EL-HENAWEE, M.M.; EL-SAYED, H.M.; AYAD, M.M. Spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for analysis of acyclovir and acebutolol hydrochloride. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, v.65, p.997-999, 2006.
- AGGARWAL, B.; KUMAR, A.; BHARTI, A. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.*, v.23, p.363-398, 2003.
- AKTAS, E.S. ; ERSOY, L. ; SAGIRH, O. A new spectrofluorimetric method for the determination of lisinopril in tablets. *Farmaco*, v.58, p.165-168, 2003.
- ANTON, N.; BENOIT, J.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates – a review. *J. Control. Release*, v.128, p.185-199, 2008.
- BISHT, S.; FELDMANN, G.; SONI, S.; RAVI, R.; KARIKARI, C.; MAITRA, A.; MAITRA, A. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin (nanocurcumin): a novel strategy for human cancer therapy. *J. Nanobiotechnology*, v. 5, n. 3, 2007. Disponível em: <<http://www.jnanobiotechnology.com/content/5/1/3>>. Acesso em: 27 fev. 2009.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 - Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 15 fev. 2009.
- DÍAZ, A.N.; PEINADO, R. Fluorometric determination of curcumin in yogurt and mustard. *J. Agric. Food Chem.*, v.40, p.56-59, 1992.
- DULIEU, C.; BAZILE, D. Influence of lipid nanocapsules composition on their aptness to freeze-drying. *Pharm. Res.*, v.22, p.285-292, 2005.
- ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: an integrated approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v.24, p.755-767, 2001.
- FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.*, v.55, R1-R4, 1989.

FONSECA, C.; SIMÕES, S.; GASPAR, R. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. *J. Control. Release*, v.83, p.273-286, 2002.

GRAF, R., DOMB, A., QUELLEC, P., BLUNK, T., MÜLLER, R. H., VERBAVATZ, J. M., LANGER, R. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. *Adv. Drug Deliv.*, v.16, p.215-233, 1995.

GUPTE, A.; CIFTCI, K. Formulation and characterization of paclitaxel, 5-FU and paclitaxel + 5-FU microspheres. *Int. J. Pharm.*, v.276, p.93-106, 2004.

HEATH, D.; PRUITT, M.; BRENNER, D.; ROCK, C. Curcumin in plasma and urine: quantitation by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, v.783, p.287-295, 2003.

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J.; BENOIT, J. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm. Res.*, v.19, p.875-880, 2002.

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; VENIER-JULIENNE, M.; PROUST, J.; PHAN-TAN-LUU, R.; BENOIT, J. The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v.18, p.55-61, 2003.

International Conference on Harmonization (ICH). Validation of analytical procedures: text and methodology, Q2(R1), 2005. Disponível em: <<http://www.ich.org>>. Acesso em: 27 fev. 2009.

KHOPDE, S.M.; PRIYADARSINI, K.I.; PALIT, D.K.; MUKHERJEE, T. Effect of solvent on the excited-state photophysical properties of curcumin. *Photochem. Photobiol.*, v.72, p.625-631, 2000.

MAHESHWARI, R.; SINGH, A.; GADDIPATI, J.; SRIMAL, R. Multiple biological activities of curcumin: a short review. *Life Sci.*, v.78, p.2081-2087, 2006.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles. Production, characterization and applications. *Adv. Drug Deliv.*, v.47, p.165-196, 2001.

NAM, S.; NAM, H.; JOO, J.; BAEK, I.; PARK, J. Curcumin-loaded PLGA nanoparticles coating onto metal stent by electrophoretic deposition techniques. *Bull. Korean Chem. Soc.*, v.28, p.397-402, 2007.

SHARMA, R.; MCLELLAND, H.; HILL, K.; IRESON, C.; EUDEN, S.; MANSON, M.; FIRMOHAMED, M.; MARNETT, L.; GESCHER, A.; STEWARD, W. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral curcuma extract in patients with colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.*, v.7, p.1894-1900, 2001.

SOU, K.; INENAGA, S.; TAKEOKA, S.; TSUCHIDA, E. Loading of curcumin into macrophages using lipid-based nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, v.352, p.287-293, 2008.

SYNG-AI, C.; KUMARI, A.; KHAR, A. Effect of curcumin on normal and tumor cells: role of glutathione and bcl-2. *Mol. Cancer Ther.*, v.9, p.1101-1108, 2004.

TIYABOONCHAI, W.; TUNGPRADIT, W.; PLIANBANGCHANG, P. Formulation and characterization of curcuminoids loaded solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, v.337, p.299-306, 2007.

TOMREN, M.; MÁSSON, M.; LOFTSSON, T.; TONNESEN, H. Studies on curcumin and curcuminoids XXXI. Symmetric and asymmetric curcuminoids: stability, activity and complexation with cyclodextrin. *Int. J. Pharm.*, v.338, p.27-34, 2007.

TONNESEN, H. Solubility, chemical and photochemical stability of curcumin in surfactant solutions. *Pharmazie*, v.57, p.820-824, 2002.

TONNESEN, H.; MÁSSON, M.; LOFTSSON, T. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. *Int. J. Pharm.*, v.244, p.127-135, 2002.

UNITED States Pharmacopeia. 30 ed. Validation of compendial procedures. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007. Cap. 1225.

WANG, F.; HUANG, W. Determination of curcumin by its quenching effect on the fluorescence of Eu³⁺-tryptophan complex. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v.43, p.393-398, 2007.

WANG, F.; HUANG, W.; WANG, Y. Fluorescence enhancement effect for the determination of curcumin with yttrium (III)-curcumin-sodium dodecyl benzene sulfonate system. *Luminescence*, v.128, p.110-116, 2008.

WANG, F.; WU, X.; WANG, F.; LIU, S.; JIA, Z.; YANG, J. The sensitive fluorimetric method for the determination of curcumin using the enhancement of mixed micelle. *J. Fluoresc.*, v.16, p.53-59, 2006.

WANG, Y.; PAN, M.; CHENG, A.; LIN, L.; HO, Y., HSIEH, C.; LIN, J. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v.15, p.1867-1876, 1997.

WITSCHI, C.; DOELKER, E. Residual solvents in pharmaceutical products: acceptable limits, influences on physicochemical properties, analytical methods and documented values. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.43, p.215-242, 1997.

**CAPÍTULO 3: DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
ESTABILIDADE DE NANOCÁPSULAS CONTENDO CURCUMINA**

Curcuma longa L., popularmente chamada de açafrão, é amplamente conhecida pelo seu uso na alimentação como tempero, corante e flavorizante. O uso medicinal da planta tem sido documentado na Ayurveda por mais de 6000 anos (AGGARWAL et al., 2003; HEATH et al., 2003; WANG et al., 1997). A curcumina, principal constituinte e responsável pelas propriedades medicinais da planta, apresenta diversas atividades farmacológicas como antiinflamatória, antitumoral, antioxidante e antimicrobiana, além de estar relacionada com outros efeitos benéficos à saúde humana (SYNG-AI et al., 2004; MAHESHWARI et al., 2006). Porém o uso terapêutico da curcumina é limitado devido a sua baixa solubilidade em água, baixa biodisponibilidade sistêmica, alta taxa de decomposição em pH neutro e básico e susceptibilidade à degradação fotoquímica (TONNESEN, 2002; TONNESEN et al., 2002; TOMREN et al., 2007).

Tendo em vista os problemas de baixa biodisponibilidade e baixa estabilidade, algumas pesquisas propõem a associação da curcumina com diferentes sistemas coloidais, como micelas (IWUNZE, 2004; TONNESEN, 2002), ciclodextrinas (TOMREN et al., 2007; TONNESEN et al., 2002), lipossomas (LI et al., 2005), nanopartículas lipídicas sólidas (TIYABOONCHAI et al., 2007) e nanopartículas poliméricas (BISHT et al., 2007). Entretanto, tais sistemas ainda exibiram certas desvantagens como não permitir que uma concentração suficientemente grande de fármaco seja veiculada ou não protegê-lo frente à degradação. Portanto, neste capítulo é relatado o desenvolvimento de nanocápsulas lipídicas e poliméricas contendo curcumina e a avaliação da estabilidade química, empregando diferentes materiais. As formulações são comparadas quanto às suas características físico-químicas, a capacidade de liberar o fármaco e de proporcionar melhorias na estabilidade química. A possibilidade de obter partículas furtivas é testada pelo uso de um surfactante peguilado, para posteriormente verificar esta propriedade na melhoria da eficácia terapêutica da curcumina.

Publicação: Curcumin-loaded polymeric and lipid nanocapsules: preparation, characterization and chemical stability evaluation

Submetido à Drug Delivery

Curcumin-Loaded Polymeric and Lipid Nanocapsules: Preparation, Characterization and Chemical Stability Evaluation

CURCUMIN-LOADED POLYMERIC AND LIPID NANOCAPSULES

Letícia Mazzarino, Cristiana Lima Dora, Simone Gonçalves Cardoso, and Elenara Lemos-Senna

Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

Ismael Casagrande Bellettini and Edson Minatti

Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

Address correspondence to Elenara Lemos-Senna, Laboratório de Farmacotécnica, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário Trindade, 88040-900, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. E-mail: lemos@ccs.ufsc.br

The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support.

Polymeric and lipid nanocapsules suspensions of the natural compound curcumin were prepared in order to overcome limitations associated with its clinical applications, such as poor aqueous solubility and susceptibility to hydrolytic and photochemical degradation. For all formulations, the entrapment efficiency values were higher than 99%. The aqueous colloidal suspensions of curcumin resulted in an increase in drug concentration by a factor of up to 46.10^3 times. Moreover, stability studies indicated that nanoencapsulation slows down the hydrolytic and photochemical degradations of curcumin, representing a good strategy for the delivery of this drug.

Keywords: Curcumin, Lipid Nanocapsules, Polymeric Nanocapsules, Drug Delivery Systems, Stability Studies

INTRODUCTION

Curcumin or diferuloylmethane is a low-molecular weight polyphenol extracted from the rhizome of the *Curcuma longa* herb, which exhibits a variety of biological activities and pharmacological properties such as anti-tumor, anti-inflammatory, antimicrobial, anti-oxidant, hepatoprotective, thrombosuppressive, hypoglycemic, and antiarthritic activities (Maheshwari et al. 2006). In fact, mounting evidence indicate that curcumin has a wide range of molecular targets, which supports the notion that this drug influences numerous biochemical and molecular cascades. Among its molecular targets are transcription factors, growth factors and their receptors, cytokines, enzymes, and genes that regulate cell proliferation and apoptosis. Pre-clinical studies have demonstrated curcumin is able to suppress the tumorigenic activity of a variety of carcinogens in several kinds of cancers, is able to inhibit the proliferation of an extremely wide array of cancer cell types *in vitro*, and also displays anti-tumor activity in various animal models *in vivo*. Furthermore, clinical trials have suggested curcumin as a potential therapeutic agent in several diseases such as inflammatory bowel disease, ulcerative colitis, colon cancer, pancreatic cancer, atherosclerosis, and others (Goel et al. 2008).

Despite of the potential use of curcumin in the prevention and treatment of cancer and other diseases, its clinical application has been limited due to several drawbacks. Curcumin exhibits extremely poor water solubility, which results in low absorption of this drug by the gastrointestinal tract and precludes the preparation of aqueous solutions for intravenous administration (Tonnensen et al. 2002; Anand et al. 2007). When administered orally, most of the ingested curcumin is excreted in the feces and though no detectable amount of curcumin was found in urine some of its derivates like curcumin glucuronide and sulfates were observed, indicating that this drug undergoes fast metabolization in the liver and is rapidly removed from systemic circulation (Anand et al. 2007). Besides, curcumin is unstable at

neutral and basic pH and undergoes alkaline hydrolysis in higher pH solutions. Wang et al. (1997) have demonstrated that approximately 90 % of curcumin is rapidly decomposed in physiological conditions (phosphate buffer pH 7.2 at 37 °C). Its susceptibility to photodegradation is another important limitation exhibited by curcumin in the solid state as well as when dissolved in organic solvents (Ansari et al. 2005).

In order to overcome these problems, curcumin has been associated with colloidal carriers. Among them, polymeric nanoparticles have been considered as promising drug delivery systems due to their potential to increase the therapeutic efficacy and to reduce undesirable side effects of drugs. Other important advantages of nanoparticles include their ability to carry water-insoluble drugs intravenously, their protection of active molecules against *in vivo* degradation, their ability to control drug release, ease of preparation, and high stability in biological fluids as well as during storage (Gref et al. 1995; Fonseca et al. 2002; Gupte and Ciftci 2004). On the other hand, some drawbacks of polymeric nanoparticles arise from the residues of organic solvents required for their preparation, polymer cytotoxicity, and the challenge of scaling up production processes.

In recent years, efforts have been made to develop new techniques for the preparation of drug nanocarriers using only excipients which are pharmaceutically acceptable for human use. Recently, lipid nanocapsules were obtained by Heurtault et al. (2002) using a technique based on phase inversion process provided by the ability of polyethoxylated non-ionic surfactants to modify their affinity to water or oil according to changes in temperature. Lipid nanocapsules are submicronic particles composed of an oily liquid core surrounded by a solid or semi-solid shell of surfactant, which have been proposed as new delivery system for hydrophobic drugs. Special attention has been given to their preparation using the phase inversion technique since it is relatively simple and because of its low energy consumption, allowing easy scale-up, besides preventing drug degradation during the process, and

avoiding the use of organic solvents, whose residues represent a potential risk for human health (Witschi and Doelker 1997; Anton et al. 2008).

In this context, the preparation of curcumin-loaded lipid and polymeric nanocapsules has been explored by our research group with the aim of improving the stability and biological performance of this drug. In this study, we evaluate and compare the ability of polymeric and lipid nanocapsules to load curcumin, as well as to protect the drug from degradation. The curcumin formulations were investigated for physicochemical characteristics, and the degradation kinetics of the drug associated with the nanocarriers was determined.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Curcumin and poly (D,L-lactide) (PLA, MW 90,000 – 120,000) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Soybean hydrogenated lecithin (LIPOID S 75-3N) was provided by Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany) and castor oil was obtained from Via Farma Importadora Ltda. (São Paulo, Brazil). Hydroxystearic acid-polyethylene glycol copolymer (Solutol HS15) and Poloxamer (Pluronic F68) were kindly donated by BASF Chemical Company (Ludwigshafen, Germany). Sodium chloride was obtained from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). Except for the acetonitrile of HPLC grade used in the analysis (Carlo Erba, Milan, Italy), all other reagents and solvents were of analytical grade.

Preparation of the Colloidal Suspensions

Polymeric Nanocapsules Suspensions

Polymeric nanocapsule suspensions (PNC) were prepared using the interfacial deposition process after solvent displacement (nanoprecipitation method) as described by Fessi et al. (1989). Briefly, 60 mg PLA, 0.250 mL castor oil, and 2.5 or 5.0 mg curcumin were dissolved in 2 mL of acetone. The resulting solution was mixed with 10 mL of an acetone and ethanol (60:40, v/v) mixture containing 25 mg lecithin, and the final volume was adjusted to 12 mL. This organic phase was poured into an aqueous phase (26.0 mL) containing 0.375% (w/v) of Pluronic F68 (PNC_p) or Solutol HS15 (PNC_s), maintained under magnetic stirring. The organic solvents were then eliminated by evaporation under reduced pressure, and the final volume of the colloidal suspension was adjusted to 10 mL. The polymeric nanocapsules suspensions were filtered through 8 µm pore-sized filter paper (J-Prolab, São José dos Pinhais, Brazil). Unloaded polymeric nanocapsule suspensions were prepared and treated in the same manner as the samples.

Lipid Nanocapsules Suspensions

Lipid nanocapsule suspensions (LNC) were prepared using the phase inversion method previously described (Heurtault et al. 2002). An aqueous phase containing 8.40 g distilled water, 0.75 g NaCl and 4.20 g Solutol HS15 was added to the oil phase containing 1.40 g castor oil, 0.14 g lecithin, and 5 or 10 mg curcumin, both previously heated to 90 °C, under magnetic stirring. Three temperature cycles alternating between 60 to 95 °C were applied to reach the inversion process. During the last cooling, the suspensions were rapidly diluted with 25.0 mL cold water (approximately 0 °C) and continuously stirred for 30 min. The lipid nanocapsules suspensions were filtered through an 8 µm pore-sized filter paper (J-

Prolab, São José dos Pinhais, Brazil). Unloaded lipid nanocapsule suspensions were prepared and treated in the same manner as the samples.

Characterization of the nanocapsule suspensions

Determination of curcumin in the nanocapsule suspensions

Fluorimetric method

The curcumin concentration in the nanocapsule suspensions was determined by fluorescence spectrophotometry, using a Hitachi F4500 Spectrofluorimeter equipped with a thermostatted cell holder set at 25.0 °C. The sample underwent continuous stirring in a standard 1 cm quartz cell. Both slits of excitation and emission monochromators were adjusted to 5.0 nm. The samples were excited at 397 nm and the emission spectra were recorded from 440 to 600 nm. The relative fluorescence intensities of the samples were measured at $\lambda_{\text{emi}} = 508$ nm. The calibration graph for curcumin in acetonitrile was linear over the range of 0.1 to 0.7 $\mu\text{g/ml}$ ($R^2 = 0.9957$).

Determination of entrapment efficiency, drug loading, and drug recovery

The entrapment efficiency (%) was estimated as being the difference between the total concentration of curcumin found in the nanocapsule suspensions after their complete dissolution in acetonitrile and the concentration of drug in the supernatant obtained by suspension ultrafiltration/centrifugation procedure using Microcon Centrifugal Filter Devices with Ultracel YM-100 membrane (100,000 nominal molecular weight limit, Millipore Corp., USA). The drug content was expressed in μg of curcumin/mL of suspension. Drug recovery (%) was estimated by comparing the total amount of drug found in the colloidal suspensions with the initial amount added to the formulations.

pH measurements

After preparation, the pH of the nanocapsule suspensions were determined using a pH meter (PHTEK pH100, São Paulo, Brazil), previously calibrated with buffer solutions pH 4.0 and 7.0.

Particle size and zeta potential

The mean particle diameter and zeta potential were determined by photon correlation spectroscopy and laser-Doppler anemometry, respectively, using a Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). The measurements were made at 25 °C after appropriate dilution of the samples in distilled water. Each size analysis lasted 120 s and was performed with an angle detection of 173°. For measurements of zeta potential, nanocapsule samples were placed in the electrophoretic cell, where a potential of ± 150 mV was established. The ζ potential values were calculated as mean electrophoretic mobility values using Smoluchowski's equation.

Morphology evaluation

The morphology of the nanocapsule suspensions was examined using a Philips CM200 transmission electron microscope (FEI Company, Hillsboro, USA). The samples were spread onto a glow discharge carbon coated grid and negatively stained with 2% (w/v) phosphotungstic acid solution at pH 5.0.

***In vitro* drug release studies**

To evaluate curcumin release, 1 mL of each nanocapsule suspension was dispersed in 60 mL of a sodium acetate buffer pH 5.0 containing 0.25 % (w/v) of sodium dodecyl sulfate. The samples were maintained under magnetic stirring at 37 °C and protected from light to avoid degradation. At previously established time intervals, 500 μ L of the release medium

were withdrawn, placed in Microcon Centrifugal Filter Device with Ultracel YM-100 membrane (100,000 nominal molecular weight limit, Millipore Corp., USA), and centrifuged at 6,200 rpm for 15 min. The ultrafiltered was then analyzed for curcumin content by fluorescence spectrophotometry as described above, except this time the samples were excited at 424 nm and the relative fluorescence intensities were measured at λ_{emi} of 495 nm. Both slits of excitation and emission monochromators were adjusted to 10 nm. A calibration curve of curcumin was constructed using sodium acetate buffer pH 5.0 containing 0.25 % (w/v) of sodium dodecyl sulfate as solvent, exhibiting linearity within the range of 0.1 to 0.7 $\mu\text{g/ml}$ ($R^2 = 0.9985$). From these results, curves of released curcumin (%) versus time (h) were plotted.

Stability studies

Hydrolytic degradation studies

The hydrolytic stability of curcumin encapsulated in polymeric and lipid nanocapsules was investigated after dispersion of the colloidal suspensions in acetate pH 5.0 and phosphate pH 7.2 buffer solutions to obtain curcumin concentrations around of 25 $\mu\text{g/mL}$ (67.9 μM). The samples were stored at room temperature in the dark in order to avoid the possible degradative effect of light. After 0, 7, 24, 48 hours, 7, 15, and 30 days, an aliquot of each sample was withdrawn and diluted in acetonitrile in order to quantify curcumin by fluorescence spectrophotometry according to the method described above.

Photodegradation studies

The photochemical stability of curcumin encapsulated in polymeric and lipid nanocapsules was evaluated using an artificial UV lamp (254 nm, SANKYO DENKI). The pH of the curcumin-loaded nanocapsules was adjusted to pH 5.0. Curcumin-loaded nanocapsules at concentrations of 250 $\mu\text{g/mL}$ (678.6 μM) were packaged in transparent vials

and irradiated in a UV chamber for 30 days. After 0, 7, 24, 48 hours, 7, 15, and 30 days, an aliquot of each sample was withdrawn and diluted in acetonitrile. The curcumin was then assayed by fluorescence spectrophotometry according to the method described above. The order of curcumin photodegradation was investigated by fitting the experimental stability data (concentration versus exposure time to UV radiation) to zero, first, and second order kinetics (Carstensen and Rhodes 2000).

Data presentation and statistical analysis

Each experiment was carried out in triplicate and the data were expressed as mean \pm S.D. Statistical analysis was conducted by multiple comparisons with analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post hoc test ($P < 0.05$). All statistical analyses were performed using the Graph-Pad Prism software (San Diego, CA, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Preparation and characterization of the nanocapsule suspensions

In this study curcumin-loaded polymeric and lipid nanocapsules were prepared using two different techniques, the nanoprecipitation and the phase inversion method, respectively. The nanoprecipitation method has been successfully employed in the production of polymeric nanocapsules in an efficient and reproducible manner, and the mechanism of nanocapsules formation has been largely discussed in the literature (Fessi 1989; Quintanar-Guerrero et al. 1998; Soppimath et al. 2001). Poly D,L-lactide acid and two different surfactants, Pluronic F68 and Solutol HS15, were employed in the preparation of the polymeric nanocapsule suspensions due to their excellent biodegradation and biocompatibility properties, which are

essential when the administration of the colloidal suspensions by parenteral route is desired (Jain 2000; Tokiwa and Calabia 2006). On the other hand, the phase inversion method is particularly interesting since it is a solvent-free and low-energy method. This technique basically consists of emulsifying a mixture, constituted by an aqueous phase (water, sodium chloride and hydrophilic surfactant) and an oil phase (hydrophobic surfactant, oil and drug), using a heating-cooling process. The phase inversion method is governed by the ability of polyethoxylated surfactant, as Solutol HS15, to change its affinity to water and oil according to changes in temperature, producing phase inversion. The addition of lecithin to the formulation increases lipid nanocapsule stability, creating a “framework” on the final shell structure. Furthermore, the addition of sodium chloride shifts the inversion phase zone from higher to lower temperatures, allowing the encapsulation of thermolabile drugs (Miller et al. 2001; Heurtault et al. 2002; Anton et al. 2008).

Curcumin-loaded nanocapsules were prepared using different initial amounts of the drug in the formulations and the results of encapsulation efficiency and drug loading are shown in Table 1. The encapsulation efficiency values were higher than 99% for all formulations. The pKa values for the dissociation of the three acid protons of curcumin have been previously determined to be 7.8, 8.5, and 9.0, respectively (Tonnesen and Karlsen 1985). At acid or slightly acid pH exhibited by the colloidal suspensions (Table 2), curcumin displays very low solubility, which was reported to be $11 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ in plain aqueous buffer pH 5.0 (Tonnesen et al. 2002). Therefore, the high values of encapsulation efficiency observed for curcumin can be explained by the higher affinity of the drug to the particles than to the aqueous external phase during the preparation process. Curcumin content ranged from 127.04 to $509.49 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ and the drug was completely recovered in the colloidal suspensions, regardless of the initial amount of drug added to the formulations. The differences in drug content pertain only to differences in the final volume of the colloidal suspensions. Thus,

aqueous colloidal dispersions of curcumin were obtained with an increase in drug concentration by a factor of up to 46.10^3 times, regarding its solubility in acidic aqueous solutions.

TABLE 1

Entrapment efficiency and curcumin content obtained after curcumin quantitation of the nanocapsule suspensions.

Sample	Initial amount of curcumin, mg	Entrapment efficiency, % \pm SD	Curcumin content, $\mu\text{g/mL} \pm$ SD
Cur-LNC	5.0	> 99	127.04 ± 1.90
	10.0	> 99	258.90 ± 0.54
Cur-PNC _P	2.5	> 99	249.99 ± 1.11
	5.0	> 99	502.00 ± 0.79
Cur-PNC _S	2.5	> 99	256.16 ± 0.75
	5.0	> 99	509.49 ± 0.56

PNC_P and PNC_S: polymeric nanocapsules prepared using Pluronic F68 or Solutol HS15, respectively; LNC: lipid nanocapsules.

A summary of the physicochemical properties of the nanocapsule suspensions is presented in Table 2. The mean particle size of polymeric nanocapsules obtained using the nanoprecipitation method ranged from 132 to 152.7 nm. On the other hand, lipid nanocapsules produced by the phase inversion method exhibited smaller mean diameters, ranging from 34.7 to 47.3 nm. However, colloidal suspensions displaying monodisperse distributions of the particles are obtained through both preparation techniques, as seen by the low values of polydispersion index displayed in Table 2. Spherical particles displaying a core-

shell structure can be visualized in the micrographs obtained by TEM (Figure 1). The particle size of the lipid and polymeric nanocapsules appear to match the results obtained by photon correlation spectroscopy. In addition, TEM micrographs clearly shown that the shells of polymeric nanocapsules are thicker than those of lipid nanocapsules.

TABLE 2

Physicochemical characteristics of unloaded and curcumin-loaded polymeric and lipid nanocapsules.

Sample	Initial amount of curcumin (mg)	Particle diameter (nm) and P.I.*	ζ -Potential (mV)	pH
Unloaded-PNC	-	132.0 (0.158)	- 29.3	4.50
Cur-PNC _P	2.5	137.7 (0.208)	- 32.9	4.65
Cur-PNC _P	5.0	152.7 (0.174)	- 28.5	3.90
Unloaded-PNC _S	-	132.0 (0.151)	- 33.4	4.10
Cur-PNC _S	2.5	143.3 (0.191)	- 26.4	4.60
Cur-PNC _S	5.0	135.0 (0.141)	- 35.3	3.95
Unloaded-LNC	-	37.2 (0.285)	- 2.1	6.40
Cur-LNC	5.0	47.3 (0.349)	- 3.8	5.85
Cur-LNC	10.0	34.7 (0.247)	- 4.5	5.95

*P.I = Polydispersity index (*in parenthesis*)

PNC_P and PNC_S: polymeric nanocapsules prepared using Pluronic F68 or Solutol HS15, respectively; LNC: lipid nanocapsules.

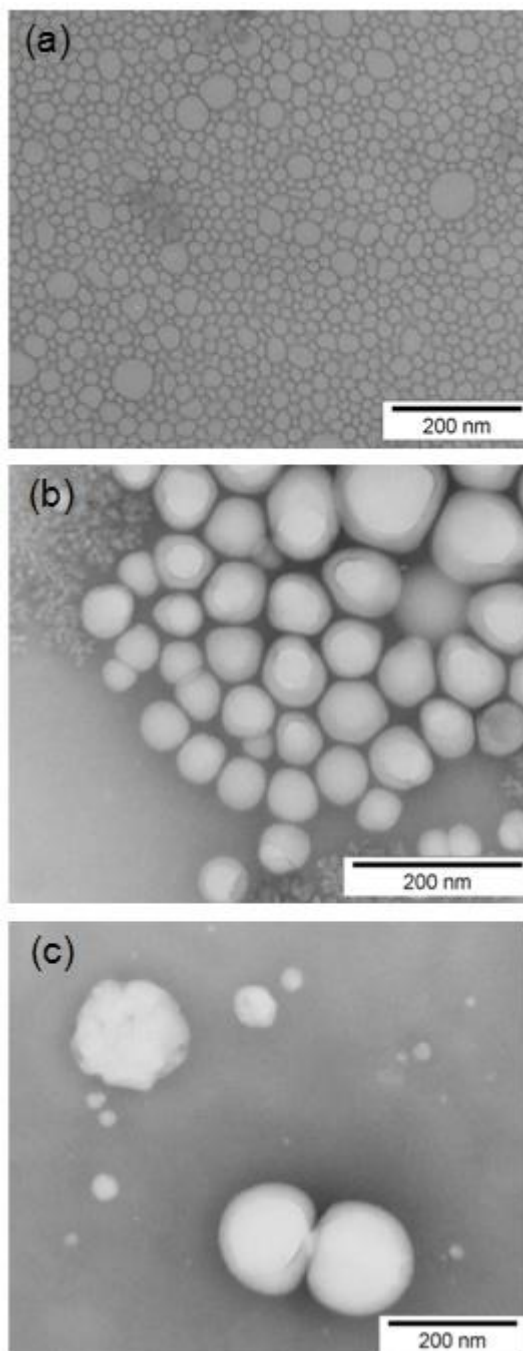


FIG. 1. Transmission electron micrographs of nanocapsules suspensions: (a) LNC, (b) PNC_P and (c) PNC_S.

The zeta potential values ranged from -26.4 mV to -35.3 mV and from -2.1 mV to -4.5 mV for polymeric and lipid nanocapsules, respectively. The negative zeta potential values displayed by the polymeric nanocapsules may be caused by the presence of the carboxyl end groups of PLA, which constitutes the polymeric wall of the particles. Neither the type of the

surfactant nor the curcumin load appeared to affect the zeta potential of the polymeric nanocapsules. The negative zeta potential of lipid nanocapsules may be caused by the presence of the soybean lecithin phospholipids, which are preferentially located on the nanocapsule surface. However, negative charge was lower than expected, probably due to the masking effect produced by the presence of PEG chains of the Solutol HS15 on the surface. This effect was not observed in PNC_s, probably because of the lower concentration of surfactant employed in the preparation of the nanocapsule suspension. Also, drug loading did not affect the zeta potential of LNC. On the other hand, the high stability demonstrated by lipid nanocapsules seems to be associated not with the presence of charge at the surface, but with the steric repulsion promoted by the PEG chains (Heurtault et al. 2003).

***In vitro* curcumin release**

Figure 2 shows the *in vitro* release kinetics of curcumin from polymeric and lipid nanocapsules in sodium acetate buffer solution pH 5.0 containing 0.25 % (w/v) of sodium dodecyl sulfate buffer at 37 °C. Release experiments were carried out at pH 5.0 due to the low stability of curcumin in neutral and basic pH values. The experiments were carried out in *sink* conditions, since the maximum concentration of curcumin that could be reached in the release medium corresponded to 15.98 % of its saturation concentration (57.50 µg/mL).

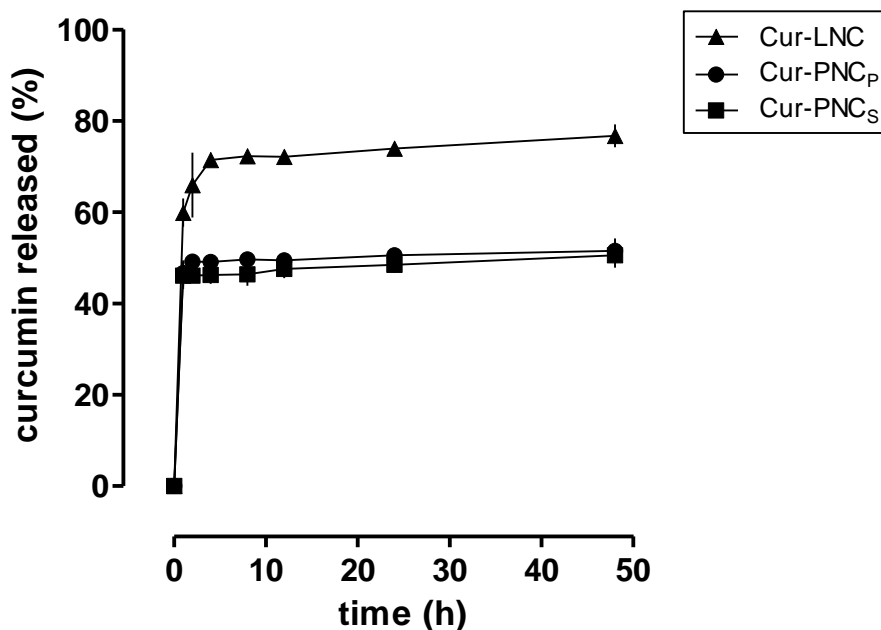


FIG. 2. *In vitro* curcumin release from nanocapsule suspensions in sodium acetate buffer solution pH 5.0 containing 0.25 % (w/v) of sodium dodecyl sulfate buffer at 37 °C.

All curcumin release profiles were characterized by an initial burst effect, followed by a sustained release of the drug over 2 days (Figure 2). The rapid initial release can, to some extent, be attributed to the fraction of the drug adsorbed onto the particle's surface. However, curcumin was released faster from LNC than from PNC. These results can be explained by the structural features of the particles, mainly the smaller size exhibited by LNC, which increases considerably particle surface area, and the thinner shell of lipid nanocapsules, which, in turn, presents a smaller obstacle for drug diffusion from core oil to external phase. No difference in the drug release rate was found between PNC_p and PNC_s. After 48 h of experiment, approximately 51% and 77% of the total encapsulated curcumin was released from polymeric (PNC_p or PNC_s) and lipid nanocapsules, respectively.

Stability studies

Several studies have evaluated the stability of curcumin in aqueous and organic solvent solutions. In aqueous solutions at pH above neutral, when acid proton dissociation takes place, curcumin undergoes rapid hydrolytic degradation (Tonnesen and Karlsen 1985). In fact, when curcumin was added to 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2 (physiological condition *in vitro*), within 30 min more than 90 % of the drug was degraded to trans-6-(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-2,4-dioxo-5-hexenal as major degradation product, and vanillin, ferulic acid, feruloyl methane as minor degradation products of short-time reaction. Under acid pH, the degradation of curcumin was demonstrated to be significantly slower. The increased stability of curcumin in acidic pH conditions was attributed to the presence of a conjugated diene structure. When the pH is adjusted to neutral-basic conditions, a proton is removed from the phenolic group, leading to its destruction (Wang et al. 1997). In addition, curcumin is degraded upon exposure to light when the drug is dissolved in organic solvents, and a number of photolysis products have been previously identified (Tonnesen et al. 1986).

Some studies focused on the improvement of the chemical stability of curcumin by using several pharmaceutical adjuvants. The hydrolytic stability of curcumin under alkaline conditions was strongly improved by the incorporation into micelles (Tonnesen 2002; Leung 2008) and by complex formation with cyclodextrin (Tonnesen et al. 2002). However, photodecomposition rate was increased when compared to curcumin degradation rate in organic solvents or aqueous solutions (Tonnesen 2002). In this study, we are interested in evaluating whether encapsulation within polymeric and lipid nanocapsules provides curcumin with some degree of protection against hydrolysis and photodegradation. Initially, curcumin-loaded nanocapsules were dispersed in buffered solutions at pH 5.0 and 7.4. Drug concentration was monitored by a simple and fast fluorescence-based spectroscopic method. Figure 3a shows the kinetics of curcumin degradation at pH 5.0 and 7.4, room temperature. At

pH 5.0, no significant decrease in curcumin content was verified for LNC and PNC_P throughout the experiment, and statistical difference in the drug content was observed only after 30 days for PNC_S ($p < 0.05$). At the end of the experiment, drug concentrations were 97.9 %, 92.1 %, and 87.1 % for LNC, PNC_P, and PNC_S, respectively. In pH 7.4 buffered solution, less than 8 % of curcumin decomposed after 14 days. However, within 30 days, the curcumin contents of all nanocapsule suspensions significantly decreased to approximately 70 % ($p < 0.001$). Compared to the fast degradation of free curcumin in pH 7.4 buffered solution described in the literature, it is possible to argue that the encapsulation of this drug within polymeric and lipid nanocapsules increased its hydrolytic stability.

In order to evaluate the photostability of curcumin associated with LNC and PNC, the colloidal suspensions were placed under protection from light and under UV irradiation. The curcumin degradation profiles are shown in Figure 3b. Under protection from light, no significant difference was observed in the curcumin content after 30 days of exposition, despite the slight reduction of the drug concentration for Cur-PNC_P and Cur-PNC_S. However, when irradiated, a significant decrease in curcumin content was verified after 7 h for Cur-PNC_P, and after 24 h of exposure for Cur-PNC_S and Cur-LNC ($p < 0.001$). The curcumin degradation rate appears to be slower when associated with LNC, as suggested by Figure 3. After 30 days of UV exposure, the curcumin content was totally decomposed, regardless of the formulation.

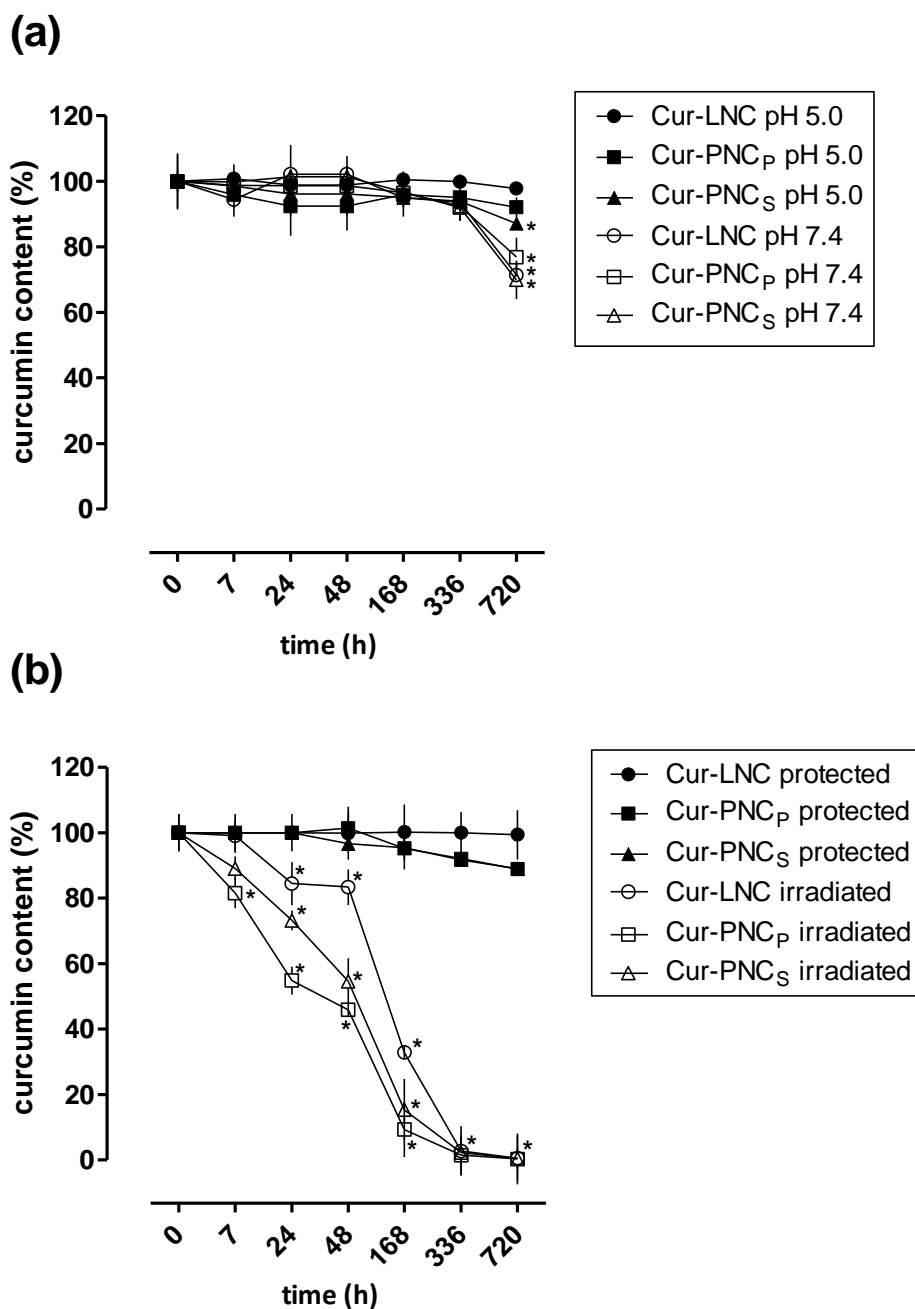


FIG. 3. Degradation kinetics obtained in the evaluation of hydrolytic (a) and photochemical stability (b) of curcumin associated with polymeric and lipid nanocapsule suspensions. * $P < 0.05$ when compared with initial curcumin content ($n = 3$).

Curcumin degradation after UV exposition followed a first order reaction, since logarithmic plots of the residual curcumin concentration versus time were reasonably linear (Table 3). A first order reaction was also observed for photochemical degradation of curcumin

in organic solvents such as methanol, ethyl acetate, chloroform or acetonitrile. However, half-lives were highly depend on the ability of curcumin to form inter- and intra-molecular bonds, decreasing from 99.0 min to 4.8 min when dissolved in methanol and chloroform, respectively (Tonnesen 2002). According to first-order kinetics, the half-lives of curcumin were 4.3, 3.6, and 3.9 days when the drug was associated with LNC, PNC_P, and PNC_S, respectively, indicating that lipid nanocapsules provide this drug with more protection from photochemical degradation. These half-lives were greater than that found by Tonnesen (2002), which was 52.5 min when the drug was dissolved in an ethanol/phosphate buffer mixture. Even considering that the photochemical stability of curcumin in acidic aqueous solutions cannot be determined due to its very low solubility, the results indicated that the encapsulation of curcumin in polymeric and lipid nanocapsules provides a way to obtain higher concentrations of this drug in an aqueous preparation, while still maintaining drug stability for longer periods of time.

TABLE 3

The rate constants and half-lives for the overall degradation of curcumin in lipid and polymeric nanocapsule after 30 days of UV exposure, according to first-order kinetics.

Sample	R^2	k ($days^{-1}$)	$t_{1/2}$ ($days$)
Cur-LNC	0.956	0.160	4.323
Cur-PNC _P	0.944	0.195	3.559
Cur-PNC _S	0.960	0.178	3.888

REFERENCES

- Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Newman, R. A., and Aggarwal, B. B. 2007. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol. Pharm.* 4:807-818.
- Ansari, M. J., Ahmad, S., Kohli, K., Ali, J., and Khar, R. K. 2005. Stability-indicating HPTLC determination of curcumin in bulk drug and pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39:132-138.
- Anton, N., Benoit, J., and Saulnier, P. 2008. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates – a review. *J. Control. Release.* 128:185-199.
- Carstensen, J. T., and Rhodes, C. T. *Drug stability: principles and practices*. New York: Dekker, 2000.
- Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. P., Ammoury, N., and Benita, S. 1989. Nanocapsule formation by interfacial deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* 55:R1-R4.
- Fonseca, C., Simões, S., and Gaspar, R. 2002. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. *J. Control. Release.* 83:273-286.
- Goel, A., Kunnumakkara, A. B., and Aggarwal, B. B. 2008. Curcumin as “curecumin”: from kitchen to clinic. *Biochem. Pharmacol.* 75:787-809.
- Gref, R., Domb, A., Quellec, P., Blunk, T., Müller, R., Verbavatz, J., and Langer, R. 1995. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 16:215-233.
- Gupte, A., and Ciftci, K. 2004. Formulation and characterization of paclitaxel, 5-FU and paclitaxel + 5-FU microspheres. *Int. J. Pharm.* 276:93-106.

- Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J., and Benoit, J. 2002. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm. Res.* 19:875-880.
- Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J., and Benoit, J. 2003. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials* 24:4283-4300.
- Jain, R. A. 2000. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* 21:2475-2490.
- Leung, M. H. M., Colangelo, H., and Kee, T. K. 2008. Encapsulation in cationic micelles suppresses alkaline hydrolysis. *Langmuir* 24:5672-5675.
- Maheshwari, R. K., Singh, A. K., Gaddipati, J., and Srimal, R. C. 2006. Multiple biological activities of curcumin: a short review. *Life Sci.* 78:2081-2087.
- Miller, D. J., Henning, T., and Grünbein, W. 2001. Phase inversion of W/O emulsions by adding hydrophilic surfactant – a technique for making cosmetics products. *Colloids Surf. A.* 183-185:681-688.
- Quintanar-Guerrero, D., Allémann, E., Doelker, E., and Fessi, H. 1998. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. *Pharm. Res.* 15:1056-1062.
- Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R., and Rudzinski, W. E. 2001. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Release* 70: 1-20.
- Tokiwa, Y., and Calabria, B. P. 2006. Biodegradability and biodegradation of poly(lactide). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72:244-251.
- Tonnesen, H. 2002. Solubility, chemical and photochemical stability of curcumin in surfactant solutions. *Pharmazie* 57:820-824.

Tonnesen, H. H., and Karlsen, J. 1985. Studies on curcumin and curcuminoids VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solution. *Z. Lebensm Unters Forsch* 180:402-404.

Tonnesen, H. H., Karlsen, J., and Henegouwen, J. B. 1986. Studies on curcumin and curcuminoids VIII. Photochemical stability of curcumin. *Z. Lebensm Unters Forsch* 183:116-122.

Tonnesen, H., Másson, M., and Loftsson, T. 2002. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. *Int. J. Pharm.* 244:127-135.

Wang, Y., Pan, M., Cheng, A., Lin, L., Ho, Y., Hsieh, C., and Lin, J. J. 1997. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15:1867-1876.

Witschi, C., and Doelker, E. 1997. Residual solvents in pharmaceutical products: acceptable limits, influences on physicochemical properties, analytical methods and documented values. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 43:215-242.

**CAPÍTULO 4: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE
NANOCÁPSULAS CONTENDO CURCUMINA**

Nos últimos anos, pesquisas clínicas e pré-clínicas têm demonstrado o potencial da curcumina na prevenção e tratamento do câncer e outras doenças crônicas. A curcumina apresenta efeitos anti-proliferativos e pró-apoptóticos contra diversos tipos de tumor, incluindo tumores de mama (SYNG-AI et al., 2004; AGGARWAL et al., 2007) mieloma múltiplo, melanoma (MENON et al., 1995), leucemia mielogênica (HEATH et al., 2003), câncer de cólon (SONG et al., 2005), duodenal (HUANG et al., 1994), estômago (HUANG et al., 1994), pulmão (PILLAI et al., 2004), fígado (SYNG-AI et al., 2004), próstata (AGGARWAL et al., 2007), esofágico e oral (MAHESHWARI et al., 2006).

A curcumina contribui com a inibição da formação, promoção e progressão do tumor, sendo descrita como um bom agente anti-angiogênico (DUVOIX et al., 2005; WAHL et al., 2007). Em modelo de melanoma murino B16-F10, a curcumina demonstrou-se eficaz na inibição de metástases e redução do número de nódulos de células tumorais presentes no pulmão, aumentando significativamente a sobrevivência dos animais (MENON et al., 1995; MENON et al., 1999; RAY et al., 2003). Estudos têm associado a atividade antimetastática do composto no melanoma à inibição da ação das metaloproteinases, diminuição da expressão da quinase de adesão focal (FAK), inibição da fosforilação da tirosina e atividade da colagenase, e aumento da expressão de proteínas antimetastáticas (MENON et al., 1999; PHILIP & KUNDU, 2003; BANERJI et al., 2004), sugerindo o possível uso da curcumina no tratamento deste tipo de câncer.

Assim sendo, a avaliação da atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* de nanocápsulas lipídicas e poliméricas contendo curcumina em modelo de melanoma murino B16-F10 é descrita neste capítulo. Tendo em vista que alguns relatos da literatura descrevem que o Solutol HS15 confere propriedades furtivas às partículas (LACOEUILLE et al., 2007), um estudo sobre a captura destes sistemas em cultura de macrófagos J774 também é relatada. O objetivo principal foi, portanto, verificar e comparar as melhorias proporcionadas pela utilização destes sistemas na eficácia terapêutica da curcumina.

Publicação: Lipid and polymeric nanocapsules containing curcumin: in vitro and in vivo activity on B16-F10 melanoma

Submetido ao Journal of Pharmaceutical Sciences

Lipid and Polymeric Nanocapsules containing Curcumin: *In Vitro* and *In Vivo* Activity on B16-F10 Melanoma

LETÍCIA MAZZARINO,¹ LUÍS F. C. SILVA,¹ JULIANA C. CURTA,² MARLEY A. LICÍNIO,² ALINE COSTA,² LETÍCIA K. PACHECO,³ JARBAS M. SIQUEIRA,³ JORGE MONTANARI,⁴ EDER ROMERO,⁴ JAMIL ASSREUY,³ MARIA C. SANTOS-SILVA,² ELENARA LEMOS-SENNA¹

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Laboratório de Farmacotécnica, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, Florianópolis, Brazil, 88040-970

²Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

³Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

⁴Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires, Argentina

Correspondence to: Elenara Lemos-Senna (Telephone: 55 48 37215067; Fax: 55 48 37219350; E-mail: lemos@ccs.ufsc.br)

ABSTRACT: Curcumin is a polyphenol obtained from the plant *Curcuma longa* (called turmeric) that displays numerous activities, including potential anticancer activity, but clinical use has been limited by its poor solubility in water and, consequently, minimal systemic bioavailability. We have therefore formulated the drug into nanocarrier systems in an attempt to improve its therapeutic properties. This study evaluates the effect of intraperitoneally administered nanocapsules containing curcumin on subcutaneous melanoma in mice inoculated with B16-F10 cells, and on the cytotoxicity activity against B16-F10 cells *in vitro*. Phagocytic uptake of formulations was also evaluated upon incubation with macrophage J774 cells by fluorescence microscopy. Lipid and polymeric nanocapsules were prepared by the phase inversion and nanoprecipitation methods, respectively. The uptake of the lipid nanocapsules prepared using Solutol HS15 was significantly reduced by J774 cells. Curcumin, as free drug or as drug-loaded nanocapsules, was administered at a dose of 6 mg/kg twice a week for 21 days. Free drug and curcumin-loaded nanocapsules significantly reduced tumor volume ($P < 0.05$ vs. control), but no difference was found in the antitumor activity displayed by lipid and polymeric nanocapsules. This assumption was supported by the *in vitro* study, in which free curcumin as well as loaded into nanocapsules caused significant reduction of cell viability in a concentration- and time-dependent manner.

Keywords: Curcumin, Lipid Nanocapsule, Polymeric Nanocapsule, Drug Delivery Systems, Melanoma, B16-F10 Cells, Antitumor Activity, Cytotoxicity, Apoptosis, Macrophage Uptake.

INTRODUCTION

Melanoma is the most aggressive form of skin cancer and is characterized by abnormal proliferation of melanocytes that invade the basement membrane.¹ The incidence rate is increasing faster than any other tumor, and the World Health Organization (WHO) estimates 132.000 new cases of cutaneous melanoma per year.² Sun exposure, patient phenotype, family history and previous history of melanoma are the major risk factors related to melanoma.³

Chemoprevention has been described as an under-explored approach that could significantly decrease morbidity and mortality from this deadly cancer.⁴ Chemoprevention strategies mostly imply the use of substances which are able to inhibit or reverse cellular process such as decreased apoptosis, increased proliferation, and cell maturation or differentiation.⁵ Particularly, a wide variety of botanicals, mostly dietary flavonoids or phenolic substances, have been reported to possess substantial chemopreventive properties because of their antioxidant and anti-inflammatory ability. Concerning skin cancers, laboratory and epidemiological studies have evidenced that routine consumption of these polyphenol compounds may favorably provide some antiphotocarcinogenic protection against skin disorders caused by solar UV radiation.⁶

Curcumin is a yellow polyphenol derived from the rhizome of turmeric (*Curcuma longa* L). Extensive research has pointed out its potential in the prevention and treatment of cancer and other diseases. Several studies carried out over the past two decades have implied that curcumin displays antimutagenic activity and inhibits the radiation- as well as chemical carcinogen-induced neoplastic lesions in many tumor models, including skin cancer.⁶ The anticancer potential of curcumin is related to its ability to down-regulate transcription factors

NF- κ B, AP-1, Erg-1 and MAPK; to down-regulate the expression of COX-2, LOX, NOS, MMP, TNF- α , IL-1 β and cyclin D1; to modulate cytochrome P450 function; to down-regulate growth factor receptors and to inhibit the activity of the oncogenes ras, fos, jun and myc.⁷⁻⁹ *In vivo* studies have demonstrated that curcumin inhibits lung tumor nodule formation in mice inoculated with B16-F10 melanoma cells and increases life span by inhibiting the expression of metalloproteinases.^{10,11} Moreover, the combination treatment of polyphenol with a prophylactic immune preparation caused substantial growth inhibition of B16-R melanoma cells resistant to doxorubicin and significantly increased the median survival time of animals with this kind of cancer.¹²

Despite the potential application of curcumin in the prevention and treatment of skin cancer, this drug exhibits very low bioavailability due to its extremely poor water solubility, which results in low drug absorption in the gastrointestinal tract and fast metabolization in the liver.¹³ In addition, curcumin undergoes alkaline hydrolysis at neutral and basic pH, being quickly decomposed in physiological conditions.¹⁴ Among the alternatives to overcome these limitations, the association of curcumin with drug delivery systems has been considered a promising strategy to improve its bioavailability.¹³ Recently, some studies have demonstrated the potential of nanostructured drug delivery systems to render hydrophobic agents like curcumin dispersible in aqueous media, thus circumventing the pitfalls of its poor water solubility while maintaining its cytotoxic activity against a number of cancer cell lines.¹⁵⁻²⁰ However, *in vivo* evaluation of anticancer properties of curcumin-loaded nanocarriers is wanting, despite the great potential of these delivery systems in targeting drugs directly to cancer tissues. The rationale behind the use of these systems for targeting tumors is based on their ability to deliver a concentrated dose of the antineoplastic agent to specific sites via the enhanced permeability and retention effect (EPR) and, consequently, reduce the exposure of healthy tissues, decreasing the possibility of toxic effects.²¹

However, when administrated intravenously, conventional nanoparticles are rapidly opsonized and removed from circulation by the mononuclear phagocyte system (MPS), mainly represented by the Kupffer cells of the liver and spleen macrophages.²² Consequently, the contribution of conventional nanoparticles towards increasing anticancer drug efficacy is limited to targeting tumors at the MPS level. Coating nanoparticle surface with hydrophilic polymers such as polyethylene glycol (PEG), so-called Stealth particles, has been shown to reduce clearance by the MPS. As a result, Stealth nanoparticles remained in the circulation for a longer period of time and were also able to extravasate in pathological sites, such as solid tumors located outside the MPS regions.^{21,23}

In previous studies we reported the development of lipid and polymeric nanocapsules containing curcumin with high encapsulation efficiency. Nanocapsules suspensions were prepared using Poloxamer (Pluronic F68) or hydroxystearic acid-polyethylene glycol copolymer (Solutol HS15) as hydrophilic surfactants. It is possible that these nanocapsule suspensions exhibit different cytotoxic and antitumor activities related to stealth properties provided by the presence of PEG chains of Solutol HS15, which are located on the surface of the particles. Therefore, in this study we evaluate *in vitro* and *in vivo* activities of curcumin-loaded lipid and polymeric suspensions on a B16-F10 melanoma murine model. Also, fluorescence microscopy studies were carried out on J774 murine macrophage-like cells to verify and compare the uptake of the nanocapsules by macrophages.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Curcumin and poly (D,L-lactide) (PLA, MW 90,000 – 120,000) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Soybean hydrogenated lecithin (LIPOID S 75-3N) was provided by Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany) and castor oil was obtained from Via Farma Importadora Ltda. (São Paulo, Brazil). Hydroxystearic acid-polyethylene glycol copolymer (Solutol HS15) and Poloxamer (Pluronic F68) were kindly donated by BASF Chemical Company (Ludwigshafen, Germany). Sodium chloride was obtained from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). Except for the acetonitrile of HPLC grade used in the analysis (Carlo Erba, Milan, Italy), all other reagents and solvents were of analytical grade.

Cell Lines

A highly metastatic B16-F10 mouse epithelial-like melanoma cell line was donated from Bio-Rio (Rio de Janeiro, Brazil). The cells were cultured in a Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma-Aldrich) pH 7.4 supplemented with 10% fetal calf serum, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 10 mM HEPES in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂ at 37 °C. For *in vivo* experiments, cells were harvested with a trypsin:EDTA (0.05:0.03 w/v) solution, washed and inoculated into mice in phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4).

For uptake studies, the murine macrophage-like J774 cells were cultured in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal calf serum, 100UI/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 0,25 µg/ml amphotericin B, in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂ at 37 °C

Preparation of the Nanocapsule Suspensions

Lipid Nanocapsules Suspensions

Lipid nanocapsule suspensions (LNC) were prepared using the phase inversion method.²⁴ An aqueous phase containing 8.40 g distilled water, 0.75 g NaCl and 4.20 g Solutol HS15 was added to the oil phase containing 1.40 g castor oil, 0.14 g lecithin and 10 mg curcumin, both previously heated to 90°C, under magnetic stirring. Three temperature cycles alternating from 60 to 95°C were applied to reach the inversion process. During the last cooling, the suspensions were rapidly diluted with 25.0 mL cold water (approximately 0°C) and continuously stirred for 30 min.

Polymeric Nanocapsules Suspensions

Polymeric nanocapsule suspensions (PNC) were prepared using the interfacial deposition process after solvent displacement.²⁵ Briefly, 60.0 mg PLA, 0.250 mL castor oil and 2.5 mg curcumin were dissolved in 2 mL of acetone. The resulting solution was added to a 10 mL acetone:ethanol (60:40, v/v) mixture containing 25.0 mg lecithin, and the final volume was adjusted to 12.0 mL. This organic phase was poured into an aqueous phase (26.0 mL) containing 0.375% (w/v) of Pluronic F68 (PNC_P) or Solutol HS15 (PNC_S), maintained under magnetic stirring. The organic solvents were then eliminated by evaporation under reduced pressure, and the final volume of the colloidal suspension was adjusted to 10.0 mL.

Lipid and polymeric nanocapsules suspensions were filtered through 8 µm pore size of filter paper (J-Prolab, São José dos Pinhais, Brazil). Unloaded lipid and polymeric nanocapsule suspensions were prepared and treated in the same manner as the samples.

Determination of Encapsulation Efficiency and Drug Content

Entrapment efficiency and drug content were estimated after determination of the curcumin concentration in the nanocapsule suspensions by fluorescence spectrophotometry. The analysis was carried out using a Hitachi F4500 Spectrofluorimeter equipped with a thermostatted cell holder set at 25.0 °C. The samples were continuously stirred in a standard 1 cm quartz cell. Both slits of excitation and emission monochromators were adjusted to 5.0 nm. The samples were excited at 397 nm and the emission spectra were recorded from 440 to 600 nm. The relative fluorescence intensities of the samples were measured at $\lambda_{\text{emi}} = 508$ nm and compared with that obtained by a curcumin standard solution. A calibration curve for curcumin in acetonitrile was constructed and was linear over the range of 0.1 to 0.7 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0.9957$). The entrapment efficiency (%) was estimated as being the difference between the total concentration of curcumin found in the nanocapsule suspensions after their complete dissolution in acetonitrile and the concentration of drug in the supernatant obtained by suspension ultrafiltration/centrifugation procedure using Microcon Centrifugal Filter Devices with Ultracel YM-100 membrane (100 000 nominal molecular weight limit, Millipore Corp., USA). The drug content was expressed in μg of curcumin/mL of suspension.

Determination of Particle Size and Zeta Potential

The mean particle diameter and zeta potential were determined by photon correlation spectroscopy and laser-Doppler anemometry, respectively, using a Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). The measurements were taken at 25 °C after appropriate dilution of the samples in distilled water. Each size analysis lasted 120 s and was performed with an angle detection of 173°. For measurements of zeta potential, nanocapsule samples were placed in an electrophoretic cell, where a potential of ± 150 mV was

established. The ζ potential values were calculated from mean electrophoretic mobility values using Smoluchowski's equation.

pH Measurements

After preparation, the pH of the nanocapsule suspensions were determined using a pH meter (PHTEK pH100, São Paulo, Brazil), previously calibrated with buffer solutions pH 4.0 and 7.0.

Evaluation of *In Vitro* Cytotoxicity

In vitro cell viability was assessed using MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-diphenyltetrazolium bromide) assay.²⁶ Free curcumin or curcumin-loaded lipid and polymeric nanocapsule suspensions were added to B16-F10 cells at different concentrations. Cells were incubated at 37 °C for 24, 48 or 72 hours. After incubation, MTT was added to each well, followed by 3 h incubation. Cells were centrifugated, the supernatant was discarded and the formazan precipitated was dissolved with 100 μ L 0.04 N isopropyl alcohol/HCl solution. The absorbance was determined at 540 nm using a microplate reader. Control groups were only plated with MTT reagent. All assays were performed in triplicate. The statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferoni's post-hoc, using the Graph-Pad Prism (San Diego, CA, USA) software.

Morphological Assessment of Apoptosis

Apoptosis was verified as described by Geng et al.²⁷ B16-F10 cells were incubated with free curcumin and curcumin-loaded lipid and polymeric nanocapsule suspensions for 48

hours. Then, acridine orange and ethidium bromide dyes at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were mixed with cells and the slide was examined under a fluorescence microscope (Olympus BX41) using 40 x objective. Viable cells exhibited green fluorescence (acridine orange staining) whereas apoptotic cells exhibited an orange-red nuclear fluorescence (ethidium bromide staining).

Macrophage Uptake Studies

Phagocytic uptake and intracellular fate of the fluorescent free curcumin or curcumin-loaded nanocapsules were monitored by fluorescence microscopy upon incubation with J774 cells. Cell uptake was determined in cells grown near to confluence on rounded coverslips in 24-well plates. Upon 60 min incubation with free curcumin (previously dissolved in DMSO) or curcumin-loaded lipid or polymeric nanocapsules at 37 °C in the dark, the nanocapsules suspensions were removed, cells were washed three times with phosphate buffered saline (PBS) and coverslips were mounted on a fluorescence microscope. Cell-associated fluorescence of curcumin was monitored with a Nikon Alphaphot 2 YS2 fluorescence microscope (Nikon Corporation Instruments, Japan). Images of the cells were acquired in the emission mode with 40 x objective after exciting the sample at 450 to 490 nm using barrier filter. Fluorescence imaging in the wavelength of 505 nm was collected.

Evaluation of *In Vivo* Antitumor Activity

Male specific pathogen-free C57BL/6 3-month-old mice were used. The animals were kept in a light controlled room (12-hour-light-dark cycle) at a room temperature of 23 ± 2 °C and 60 ± 10 % humidity. Food and water were given ad libitum. All animal studies were carried out in accordance with the procedures outlined in protocol number PP00161/CEUA, for the care and ethical use of animals in research (CEUA/UFSC, Florianópolis, SC, Brazil).

B16-F10 melanoma cells (1×10^6 cells suspended in 100 μ l of DMEM medium) were subcutaneously inoculated into the back of male C57BL/6 mice ($n = 8$). Eleven days after inoculation of B16-F10 cells, free curcumin, unloaded or curcumin-loaded nanocapsule suspensions were administered intraperitoneally at a dose of 6 mg/kg, twice a week, corresponding to a total of 4 doses, according to the experimental schedule tested. In order to improve the dispersion of curcumin in the vehicle, the drug was suspended in PBS pH 6.0 containing 0.3 % (w/v) of carboxymethylcellulose and Tween 80 0.05 % (w/v). The negative control received the cells and PBS while the positive control received the cells and cisplatin at a dose of 1 mg/kg, once a week.

Tumor volumes were measured in the days of treatment throughout 21 days of experiment using a precision caliper and estimated according to the following standard formula: tumor volume (mm^3) = width² x length x 0.52, according to Lee et al.²⁸ The animal body weight was verified in the beginning and the end of the experiment. Twenty-one days after inoculation, mice were sacrificed by cervical dislocation and tumors were excised and weighted. The statistical analysis was performed using analysis of variance followed by Dunnet post-hoc.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of the Lipid and Polymeric Nanocapsule Suspensions

A summary of the physicochemical properties of the nanocapsule suspensions is presented in Table 1. Curcumin-loaded polymeric nanocapsule suspensions (Cur-PNC_P and Cur-PNC_S) prepared by the nanoprecipitation method displayed a mean particle diameter of around 140 nm, while curcumin-loaded lipid nanocapsule (Cur-LNC) produced by the phase

inversion process shown a mean size of around 40 nm. Zeta potential values were clearly higher for polymeric nanocapsules (-32.9 and -26.4 mV for Cur-PNC_P and Cur-PNC_S, respectively) than for lipid nanocapsules (-4.5 mV). The high zeta potential values observed for PLA nanocapsules have been attributed to the carboxyl end groups of the polymer, which constitute the polymeric wall of the particles. The negative zeta potential of lipid nanocapsules may be caused by the presence of soybean lecithin phospholipids, which are preferentially located on the nanocapsule surface. However, negative charge was lower than expected, probably due to the masking effect produced by the presence of PEG chains of the Solutol HS15 on the surface of LNC as recently described by Mazzarino et al. Encapsulation efficiency was above 99 % for all formulations. These high values can be explained by the poor water solubility of curcumin in the acidic external phase of the nanosuspensions. Drug contents were very close in all preparations, with values around 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Table 1. Summary of the physicochemical properties of curcumin-loaded lipid and polymeric nanocapsule suspensions.

Sample	Mean diameter (nm) (polydispersity index)	Zeta potential (mV)	Drug content ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	pH
Cur-LNC	34.7 (0.247)	- 4.5	258.90 \pm 0.54	5.95
Cur-PNC _P	137.7 (0.208)	- 32.9	249.99 \pm 1.11	4.65
Cur-PNC _S	143.3 (0.191)	- 26.4	256.16 \pm 0.75	4.60

Cytotoxic Effect of Free and Encapsulated Curcumin on B16-F10 Melanoma

Data obtained in the *in vitro* cytotoxic study with B16-F10 melanoma cells are shown in Figure 1. Incubation of B16-F10 melanoma cells with free curcumin and curcumin-loaded nanocapsules caused significant reduction of cell viability, in a concentration- and time-dependent manner. After 24 h of incubation, statistically significant reduction in the number of viable cells was observed for free curcumin at a concentration of $\geq 25 \mu\text{M}$, when compared to the control group ($P < 0.05$). At $100 \mu\text{M}$ concentration, the incubation of cells with free curcumin caused a 75 % reduction in the number of viable cells, while a 25 % reduction occurred after incubation of Cur-LNC and Cur-PNC_S at same time. On the contrary, after 48 h and 72 h of incubation, Cur-LNC induced a significantly higher cytotoxic effect than free drug at the lowest tested concentration ($10 \mu\text{M}$), producing a 75 % reduction in the number of viable cells ($P < 0.05$). At $10 \mu\text{M}$ and 72 h of incubation, the cytotoxic effect in increasing order was Cur-LNC > free curcumin > Cur-PNC_S. Cur-PNC_P only exhibited cytotoxic effect at concentration of $\geq 25 \mu\text{M}$ after 72 h of incubation, when compared to the control group ($P < 0.05$). These results may be associated, to some extent, with the small size and lipid structure of LNC, which seems favorable in delivering curcumin inside the cells. Previous studies carried out by our research group (data not shown) demonstrated that curcumin is released more quickly from LNC than PNC (77 % and 48 % for LNC and PNC, respectively, after 48h), due to smaller particle size and thinner shell. Perhaps this nanocapsule property has contributed to the higher cytotoxic effect of LNC when compared to PNC_S and PNC_P. In addition, the nanoencapsulation may have protected the drug from inactivation in the culture medium, since free curcumin is more prone to undergo hydrolytic decomposition at pH 7.4.²⁹

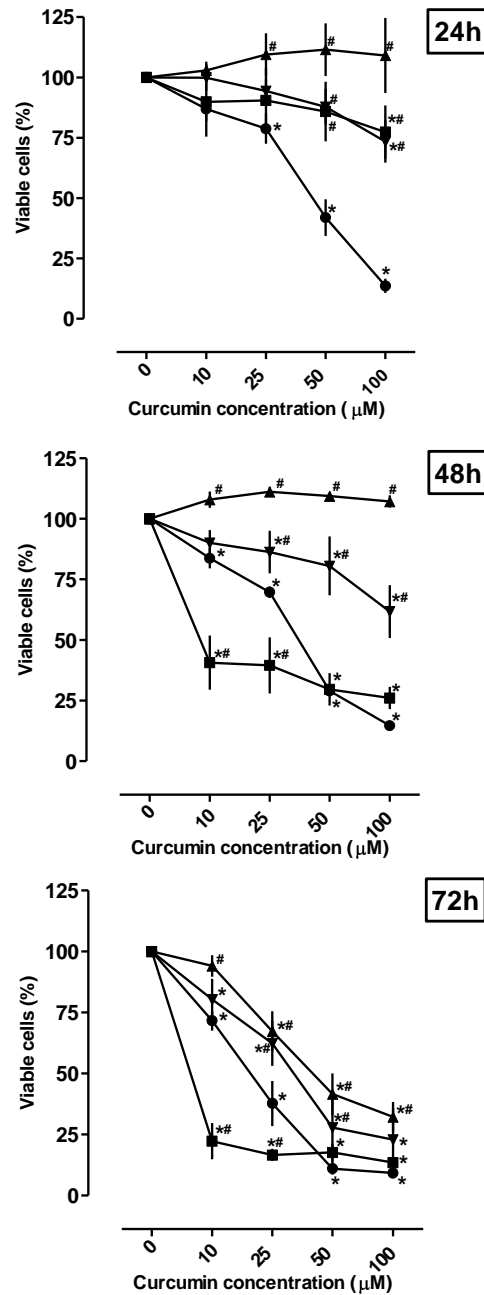


Figure 1. Cytotoxic effect of free curcumin and curcumin-loaded nanocapsules suspensions on B16-F10 melanoma cells after 24, 48, and 72 hours of incubation. Free curcumin (*circle*), Cur-LNC (*square*), Cur-PNC_p (*triangle*) and Cur-PNC_s (*inversed triangle*). Optical density of control groups was taken as 100% cell viability as confirmed by Trypan Blue exclusion method. *P < 0.05 compared with the control group; #P < 0.05 compared with free curcumin at the same concentration (n = 3).

The ability of free curcumin and curcumin-loaded nanocapsules to induce apoptosis on B16-F10 melanoma cells was initially screened by using acridine orange/ ethidium bromide staining. The treated B16-F10 melanoma cells showed obvious nuclear condensation after 48 h of treatment. Control cells showed bright green nuclei with uniform intensity and had not taken up ethidium bromide, where the apoptotic cells appeared orange in color (Figure 2). Based on the cytomorphological changes and cell death described above, the effect of free curcumin or encapsulated curcumin on these cells was indicative of apoptosis.

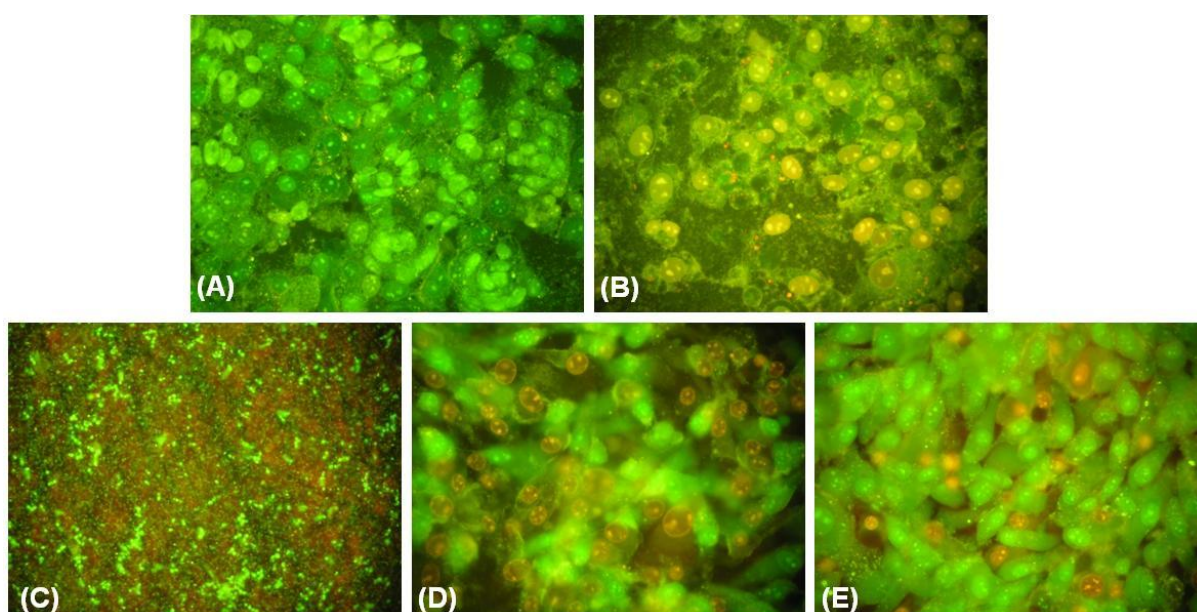


Figure 2. Cytomorphological changes of B16-F10 melanoma cells induced by free curcumin and curcumin-loaded nanocapsules suspensions upon 48 h incubation. (A) Control, (B) Free curcumin, (C) Cur-LNC, (D) Cur-PNC_S and (E) Cur-PNC_P. Viable cells exhibited a green fluorescence (acridine orange staining) whereas apoptotic cells exhibited an orange-red nuclear fluorescence (ethidium bromide staining).

Uptake Studies

Uptake of the nanocapsules by macrophages was monitored by morphologic observation of the cells after 60 min of incubation (Figure 3). The yellow fluorescence in the

micrographs confirmed the intracellular accumulation of curcumin. Cur-LNC seemed scarcely captured by cells as can be verified by the weak fluorescence in the cytoplasm of the macrophages. On the other hand, polymeric nanocapsules, especially Cur-PNC_P, were more actively phagocytosed and accumulated in the cells as was revealed by the bright fluorescence observed. These results suggest that the PEG chains of Solutol HS15 located on the surface of Cur-LNC and Cur-PNC_S reduce the interaction of the particles with J774 cells. Previous studies stated that even though the PEG chains of Solutol HS15 are short, pharmacokinetic data of lipid nanocapsules and mPEG-PLA nanocapsules were very similar in terms of mean residence time, area under the curve, and clearance. Also, the stealth properties observed by lipid nanocapsules were comparable to those achieved by other long circulating carriers, such as surface-modified nanocapsules obtained from PLGA-PEG copolymers.^{22,30} In addition, the images showed substantial difference in phagocytic uptake between free and encapsulated curcumin, which indicates that drug uptake can be significantly reduced with the use of colloidal systems.

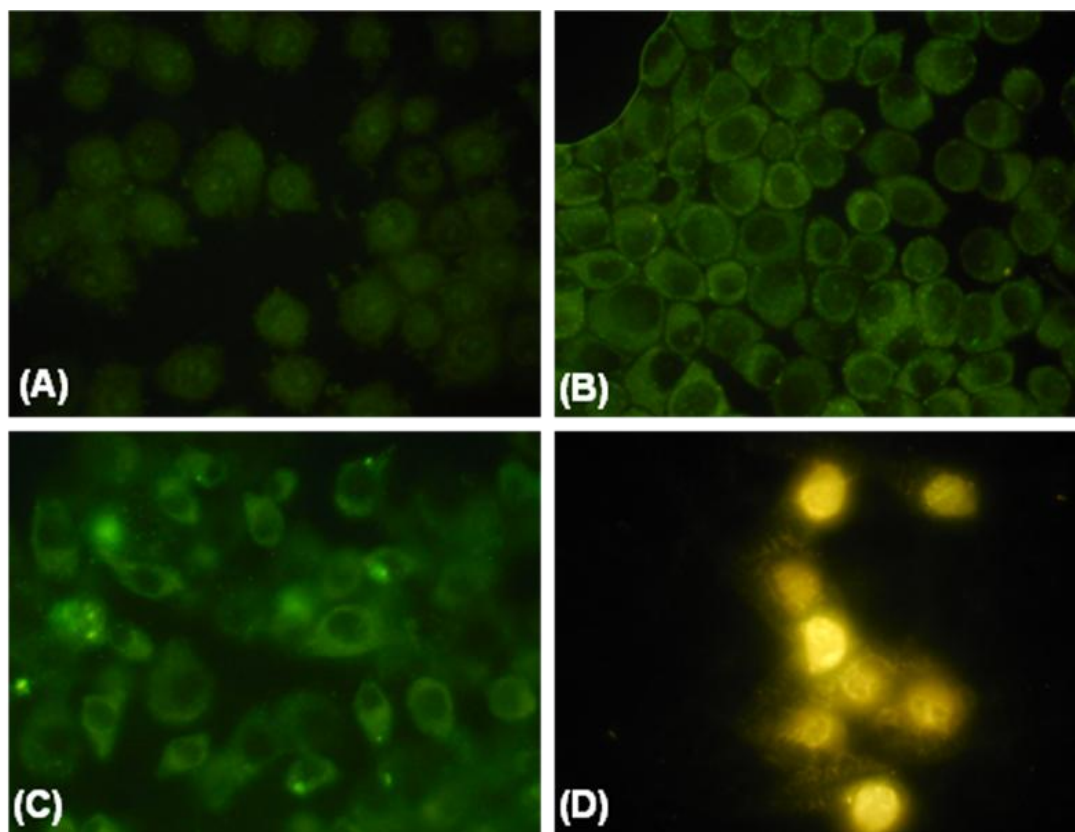


Figure 3. Fluorescence microscopy images of J774 cells upon 60 min incubation in the dark with (A) Cur-LNC, (B) Cur-PNC_s, (C) Cur-PNC_p and (D) free curcumin. Yellow fluorescence indicates the distribution of curcumin in the macrophages.

Inhibition of Tumor Growth in Mice inoculated with B16-F10 Melanoma Cells

To evaluate the effect of free curcumin and curcumin-loaded nanocapsules on tumor growth, C57BL/6 mice were inoculated subcutaneously with B16-F10 melanoma cells (1×10^6 in $100 \mu\text{l}$ /animal) and treated with the samples. The results of these experiments are summarized in Figure 4. Given twice a week, intraperitoneal injections of free curcumin or curcumin-loaded nanocapsule suspensions, at a dose of 6 mg/kg , significantly decreased tumor growth rate throughout the 21 days of experiment. By the end of the experiment, tumor growth was significantly inhibited by about 59.6 % (1128.4 mm^3), 61.4 % (1078.2 mm^3) and 71.3 % (801.4 mm^3) after treatment with free curcumin, Cur-LNC and Cur-PNC_s,

respectively, when compared to the control group treated with cell culture medium only (2791.0 mm³) ($P < 0.05$). Cisplatin at a dose of 1 mg/kg, once a week, decreased the tumor volume by 72.4 % (770.0 mm³). No difference was found in the reduction of tumor volume in mice administered with free curcumin or curcumin-loaded nanocapsules, in spite of the differences found in the cytotoxicity and cell uptake exhibited by the colloidal carriers. No differences were observed in tumor volume with the administration of unloaded nanocapsules, when compared to the control group.

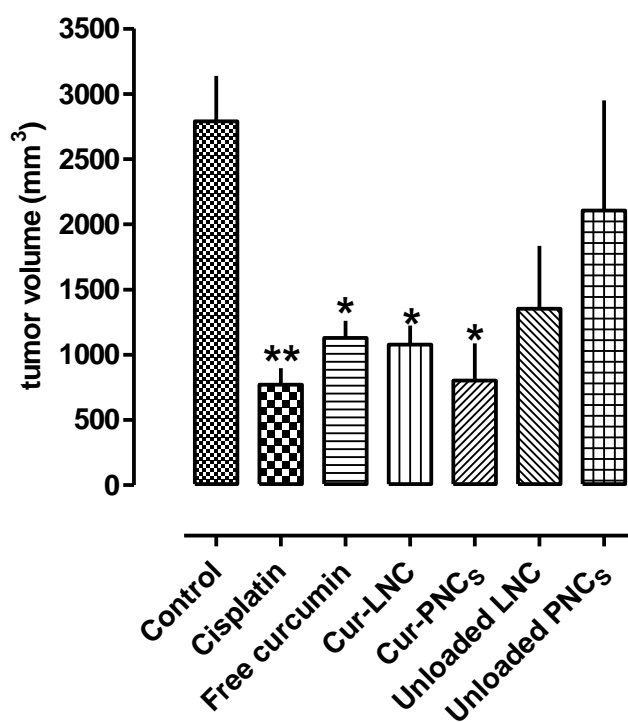


Figure 4. Effect of free curcumin, unloaded and curcumin-loaded nanocapsules on tumor growth inhibition in mice inoculated with 1×10^6 B16-F10 melanoma cells. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared with control ($n = 8$).

Although both free curcumin and curcumin-loaded nanocapsules demonstrated significant inhibition of melanoma growth, the association of the drug with colloidal systems seems to be beneficial, since it allows the administration of this hydrophobic drug by several routes, particularly the intravenous route, as an aqueous dispersion. Other important

advantages related to the formulation of curcumin in nanocapsules include the improvement of its hydrolytic stability. Further studies are still necessary to confirm if Cur-LNC exhibits *in vivo* stealth properties that could to increase the antitumor activity of this drug against B16-F10 melanoma, mainly when administered by other routes of administration such as the intravenous route.

REFERENCES

1. Siwak DR, Shishodia S, Aggarwal BB, Kurzrock R 2005. Curcumin-induced antiproliferative and proapoptotic effects in melanoma cells are associated with suppression of I κ B kinase and nuclear factor κ B activity and are independent of the B-raf/mitogen/activated/extracellular signal-regulated protein kinase pathway and the akt pathway. *Cancer* 104:879-890.
2. Giblin AV, Thomas JM 2007. Incidence, mortality and survival in cutaneous melanoma. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 60(1):32-40.
3. Braud F, Khayat D, Kroon BBR, Valdagni R, Bruzzi P, N. Cascinelli 2003. Malignant melanoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 47(1):35-63.
4. Lao CD, Demierre MF, Sondak VK 2006. Targeting events in melanoma carcinogenesis for the prevention of melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 6(11):1559-1568.
5. Fresco P, Borges F, Diniz C, Marques MP 2006. New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Med Res Rev* 26(6):747-766.
6. Baliga MS, Katiyar SK 2006. Chemoprevention of photocarcinogenesis by selected dietary botanicals. *Photochem Photobiol Sci* 5(2):243-253.
7. Aggarwal B, Kumar A, Bharti A 2003. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 23(1A):363-398.
8. Thangapazham R, Sharma A, Maheshwari R 2006. Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin. *AAPS J* 8(3):E443-E449.
9. López-Lázaro M 2008. Anticancer and carcinogenic properties of curcumin: considerations for its clinical development as a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent. *Mol Nutr Food Res* 52(1):S103-S127.

10. Menon L, Kuttan R, Kuttan G 1995. Inhibition of lung metastasis in mice induced by B16F10 melanoma cells by polyphenolic compounds. *Cancer Lett* 95(1-2):221-225.
11. Menon L, Kuttan R, Kuttan G 1999. Anti-metastatic activity of curcumin and catechin. *Cancer Lett* 141(1-2):159-165.
12. Odot J, Albert P, Carlier A, Tarpin M, Devy J, Madoulet C 2004. In vitro and in vivo anti-tumoral effect of curcumin against melanoma cells. *Int J Cancer* 111(3):381-387.
13. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB 2007. Bioavailability of curcumin : problems and promises. *Mol Pharm* 4(6):807-818.
14. Wang Y, Pan M, Cheng A, Lin L, Ho Y, Hsieh C, Lin JJ 1997. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J Pharm Biomed Anal* 15(12):1867-1876.
15. Bisht S, Feldmann G, Soni S, Ravi R, Karikari C, Maitra A, Maitra A 2007. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin (nanocurcumin): a novel strategy for human cancer therapy. *J Nanobiotechnology* 5(3).
16. Sou K, Inenaga S, Takeoka S, Tsuchida E 2008. Loading of curcumin into macrophages using lipid-based nanoparticles. *Int J Pharm* 352(1-2):287-293.
17. Tiyaboonchai W, Tungpradit W, P. Plianbangchang 2007. Formulation and characterization of curcuminoids loaded solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm* 337(1-2):299-306.
18. Sahu A, Bora U, Kasoju N, Goswami P 2008. Synthesis of novel biodegradable and self-assembling methoxy poly(ethylene glycol)-palmitate nanocarrier for curcumin delivery to cancer cells. *Acta Biomater* 4(6):1752-1761.
19. Wang D, Veena MS, Stevenson K, Tang C, Ho B, Suh JD, Duarte VM, Faull KF, Mehta K, Srivatsan ES, Wang MB 2008. Liposome-encapsulated curcumin suppresses growth of head and neck squamous cell carcinoma in vitro and in xenografts through the

- inhibition of nuclear factor $\hat{\text{P}}\text{B}$ by an AKT-independent pathway. *Clin Cancer Res* 14(19):6228-6236.
20. Chen C, Johnston TD, Jeon H, Gedaly R, McHugh PP, Burke TG, Ranjan D 2009. An in vitro study of liposomal curcumin: Stability, toxicity and biological activity in human lymphocytes and Epstein-Barr virus-transformed human B-cells. *Int J Pharm* 366(1-2):133-139.
 21. Mohanraj V, Chen Y 2006. Nanoparticles - a review. *Trop J Pharm Res* 5:561-573.
 22. Mosqueira VCF, Legrand P, Gulik A, Bourdon O, Gref R, Labarre D, Barratt G 2001. Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. *Biomaterials* 22(22):2967-2979.
 23. Brigger I, Dubernet C, Couvreur P 2002. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev* 54(5):631-651.
 24. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP 2002. Process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm Res* 19(6):876-880.
 25. Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S 1989. Nanocapsule formation by interfacial deposition following solvent displacement. *Int J Pharm* 55:R1-R4.
 26. Loosdrecht AVd, Beelen R, Ossenkoppele G, Broekhoven M, Langenhuijsen M 1994. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. *J Immunol Methods* 174(1-2):311-320.
 27. Geng YJ, Azuma T, Tang JX, Hartwig JH, Muszynski M, Libby QWP, Kwiatkowski DJ 1998. Caspases-3-induced gelsolin fragmentation contributes to actin cytoskeletal collapse, nucleolysis, and apoptosis of vascular smooth muscle cells exposed to proinflammatory cytokines. *Eur J Cell Biol* 77(4):294-302.

28. Lee YS, Yang HO, Shin KH, Choi HS, Jung SH, Kim YM, Oh DK, Linhardt RJ, Kim YS 2003. Suppression of tumor growth by a new glycosaminoglycan isolated from the African giant snail *Achtina fulica*. *Eur J Pharmacol* 465(1-2):191-198.
29. Tonnesen HH, Másson M, Loftsson T 2002. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. *Int J Pharm* 244(1-2):127-135.
30. Lacoeyille F, Hindre F, Moal F, Rpux J, Passirani C, Couturier O, Cales P, Jeune JLL, Lamprecht A, Benoit JP 2007. In vivo evaluation of lipid nanocapsules as a promising colloidal carrier for paclitaxel. *Int J Pharm* 344(1-2):143-149.

DISCUSSÃO GERAL

O polifenol curcumina, composto natural extraído do açafrão, apresenta uma longa história de uso na medicina tradicional da China e Índia devido sua ampla gama de atividades farmacológicas. Dados de estudos recentes evidenciam que a curcumina pode ser benéfica na terapia do câncer (DUVOIX et al., 2005; HATCHER et al., 2008), considerado um dos principais problemas de saúde pública do mundo (BRASIL, 2007). Entretanto, a utilização da curcumina na clínica é limitada devido a sua insolubilidade em água, baixa biodisponibilidade sistêmica e instabilidade em meio fisiológico (TONNESEN, 2002; TOMREN et al., 2007).

Diante destes aspectos, a nanoencapsulação da curcumina foi proposta como uma estratégia interessante para melhorar as suas propriedades biofarmacêuticas. A fim de avaliar a adequabilidade da técnica de preparação e do tipo de material empregado, foram desenvolvidos dois diferentes sistemas de nanocápsulas: poliméricas e lipídicas. As nanocápsulas poliméricas foram obtidas através de uma técnica simples, porém amplamente utilizada para este fim, denominada nanoprecipitação (FESSI et al., 1989). Como polímero para o desenvolvimento destes sistemas, o PLA foi selecionado devido à sua excelente biodegradabilidade e biocompatibilidade. As nanocápsulas lipídicas, por sua vez, foram preparadas através do método de inversão de fases (HEURTAULT et al., 2002), técnica que tem atraído a atenção de pesquisadores uma vez que, além de ser relativamente simples, evita a utilização de solventes orgânicos, cujos resíduos podem representar um risco potencial para saúde humana (WITSCHI & DOELKER, 1997; ANTON et al., 2008).

Durante o estudo de formulação, ambos os métodos permitiram o desenvolvimento eficaz e reprodutível de partículas esféricas com estrutura do tipo núcleo-casca. A dispersão aquosa de curcumina nos sistemas coloidais aumentou a concentração do fármaco em 46.10^3 vezes, levando em consideração sua baixa solubilidade em soluções aquosas ácidas. O teor de curcumina variou de 127,04 a 509,49 $\mu\text{g/mL}$ e o fármaco foi completamente recuperado nas suspensões coloidais, independentemente da quantidade inicial adicionada. Todas as formulações apresentaram valores de eficiência de encapsulação maiores que 99 %, o que pode ser explicado pela baixa solubilidade do fármaco na fase aquosa externa, alta afinidade pela partícula durante a preparação e, ainda, pela manutenção do pH abaixo do neutro, ótimo para estabilidade da curcumina nas suspensões. A confiabilidade dos resultados obtidos foi garantida pela prévia validação do método fluorimétrico que provou ser específico, linear, exato, preciso e sensível para a quantificação da curcumina nas suspensões de nanocápsulas. Além disso, os baixos valores de tamanho de partícula das nanocápsulas mostraram-se adequados para a administração parenteral das formulações, incluindo a via intravenosa.

A liberação do fármaco a partir da nanocápsula é essencial para que a formulação exerça a ação terapêutica pretendida. De acordo com Soppimath e colaboradores (2001), a liberação do fármaco a partir da nanopartícula depende da dessorção do fármaco ligado à superfície da partícula, da difusão através da parede polimérica, da erosão da matriz polimérica e da combinação de processos de difusão e erosão. Apesar dos contínuos esforços no desenvolvimento de métodos para caracterizar os perfis de liberação *in vitro* de fármacos a partir de sistemas coloidais, ainda existem alguns inconvenientes, sobretudo decorrentes da dificuldade de separação das pequenas nanopartículas do meio de liberação (SOPPIMATH et al., 2001). Os ensaios de liberação *in vitro* das nanocápsulas poliméricas e lipídicas foram realizados pelo método de ultrafiltração-centrifugação em tampão acetato pH 5,0 a 37 °C contendo 0,25 % (p/v) de lauril sulfato de sódio, para assegurar as condições *sink*. Todos os perfis de liberação de curcumina foram caracterizados por um efeito *burst* inicial seguido por uma liberação controlada por mais de 48 horas. As nanocápsulas lipídicas conduziram a mais rápida liberação da curcumina, quando comparadas as nanocápsulas poliméricas, o que pode estar relacionado à maior área superficial e à parede mais fina das partículas, que oferecem menor resistência a difusão do fármaco a partir do núcleo oleoso para a fase externa.

Entre os principais problemas associados à utilização da curcumina na terapêutica pode-se citar a instabilidade em pH básico e neutro, bem como a rápida degradação fotoquímica (TONNESEN, 2002). Neste trabalho, os estudos de estabilidade demonstraram que a encapsulação da curcumina nas nanocápsulas poliméricas e lipídicas foi capaz de aumentar a estabilidade hidrolítica em pH 7,4 e o tempo de meia vida do fármaco frente a radiação UV, mantendo sua estabilidade por tempos mais prolongados. A proteção do princípio ativo contra a degradação é considerada uma das principais vantagens das nanocápsulas sobre outros sistemas coloidais e ocorre principalmente pelo confinamento do fármaco no interior da cavidade central da partícula.

A vetorização de fármacos hidrofóbicos, principalmente através da via parenteral, almejando uma distribuição mais seletiva do fármaco após a injeção constitui uma das áreas mais promissoras na utilização de sistemas carreadores (COUVREUR et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003). Assim, o desenvolvimento de partículas furtivas, cujas características de superfície foram alteradas pela adsorção ou ligação covalente de polímeros hidrofílicos, torna-se uma alternativa para evitar a opsonização e remoção pelo sistema fagocitário mononuclear que poderia comprometer a eficiência terapêutica desses sistemas (MOSQUEIRA et al., 2001). No presente estudo, a captura da curcumina livre e encapsulada

foi observada pela incubação com células de macrófagos murino J774. As imagens de microscopia de fluorescência mostraram notável diferença entre a captura da curcumina livre e encapsulada pelos macrófagos. As nanocápsulas preparadas utilizando Solutol HS15, especialmente as nanocápsulas lipídicas que apresentam maior concentração do tensoativo, exibiram menor captura pelos macrófagos, o que parece estar relacionado à presença do polietilenoglicol na superfície das partículas. O caráter hidrofílico, assim como o impedimento estérico proporcionado pela presença de cadeias de polietilenoglicol, provavelmente impediu a adsorção de proteínas e o reconhecimento das partículas pelas células fagocitárias.

Diversos estudos têm demonstrado o potencial da curcumina na prevenção e tratamento do câncer. A curcumina pode inibir a iniciação, promoção e progressão de diversos tipos de tumores, incluindo o melanoma, além de atuar em uma variedade de alvos moleculares envolvidos no desenvolvimento desta doença (DUVOIX et al., 2005; AGGARWAL et al., 2007). Em estudos de citotoxicidade *in vitro*, a incubação de células de melanoma B16-F10 com a curcumina livre e encapsulada reduziu significativamente a viabilidade celular de maneira concentração e tempo dependente. Após 24 horas de incubação, a curcumina livre demonstrou maior atividade citotóxica que as nanocápsulas lipídicas e poliméricas. Entretanto, com o aumento do tempo de exposição, as nanocápsulas lipídicas apresentam maior efeito citotóxico na menor concentração testada (10 μM). Após 72 horas de experimento, na concentração de 100 μM , todas as formulações apresentaram efeito citotóxico e diferenças significativas não foram observadas entre a curcumina livre e as nanocápsulas lipídicas e poliméricas preparadas com o Solutol HS15. Estas diferenças podem ser explicadas, em parte, pelo tamanho reduzido e o caráter lipofílico das nanocápsulas lipídicas, que permitiria a liberação do fármaco no interior das células. Além disso, a mais rápida liberação e a melhoria da estabilidade da curcumina proporcionada pelas nanocápsulas lipídicas podem ter contribuído para a obtenção destes resultados. As mudanças citomorfológicas das células mortas indicaram a indução de apoptose. O efeito antitumoral da curcumina ainda pode ser observado em modelo de melanoma murino B16-F10 *in vivo*, em que tanto o fármaco livre como encapsulado foram capazes de reduzir significativamente o volume do tumor de 60 a 70 %, em relação ao grupo controle ($P < 0.05$). Nestes estudos não foram observadas diferenças significativas entre as formulações testadas, apesar dos estudos em cultura de macrófagos terem indicado o caráter de furtividade das nanocápsulas lipídicas preparadas pelo método de inversão das fases. Entretanto, estudos posteriores são ainda

necessários para verificar se tais sistemas exibem propriedades furtivas que poderiam proporcionar um aumento da eficácia terapêutica deste fármaco no melanoma, quando administrados por outras vias, como a via intravenosa, ou em outras doses.

CONCLUSÕES

- A preparação das suspensões de nanocápsulas poliméricas e lipídicas contendo curcumina, pelas técnicas de nanoprecipitação e inversão de fases respectivamente, demonstrou-se viável.
- O desenvolvimento e validação do método fluorimétrico provou ser específico, linear, exato, preciso e sensível para quantificação da curcumina nas suspensões de nanocápsulas lipídicas e poliméricas.
- A eficiência de encapsulação da curcumina nas nanocápsulas foi elevada (acima de 99 %) demonstrando a grande afinidade deste fármaco hidrofóbico pela partícula. Além disso, o fármaco foi totalmente recuperado em todas as suspensões, independente da quantidade de curcumina inicialmente adicionada.
- Ambos os sistemas apresentaram-se relativamente monodispersos, sendo constituídos de partículas esféricas do tipo núcleo-casca com diâmetro médio de 140 e 40 nm para nanocápsulas poliméricas e lipídicas, respectivamente.
- O perfil de liberação da curcumina a partir das nanocápsulas foi sustentado por até 48 horas, sendo mais acelerado para os sistemas lipídicos, provavelmente devido ao tamanho de partícula reduzido e a fina parede ao redor do núcleo oleoso.
- A encapsulação da curcumina aumentou a estabilidade hidrolítica do fármaco em pH 7,4 e retardou sua fotodegradação.
- A captura das nanocápsulas lipídicas preparadas pelo método de inversão das fases pelos macrófagos foi significativamente reduzida, provavelmente devido à presença de cadeias de polietilenoglicol na superfície das partículas.
- A curcumina livre e encapsulada reduziu significativamente a viabilidade celular de células de melanoma murino B16-F10 *in vitro* de maneira dose e tempo dependente, induzindo o processo de apoptose celular.
- A curcumina livre e encapsulada nos sistemas coloidais demonstrou significativa atividade antitumoral em modelo de melanoma B16-F10 *in vivo*, o que pode ser observado pela redução do volume tumoral, quando comparado com o grupo controle ($P < 0,05$). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre as formulações testadas no que diz respeito à atividade antitumoral do fármaco.
- A encapsulação da curcumina em nanocápsula poliméricas e lipídicas mostrou ser uma estratégia promissora para a melhoria das propriedades biofarmacêuticas deste fármaco.

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, B.; KUMAR, A.; BHARTI, A. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. **Anticancer Research**, v. 23, p. 363-398, 2003.

AGGARWAL, B.; BANERJEE, S.; BHARADWAJ, U.; SUNG, B.; SHISHODIA, S.; SETHI, G. Curcumin induces the degradation of cyclin E expression through ubiquitin-dependent pathway and up-regulates cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27 in multiple human tumor cell lines. **Biochemical Pharmacology**, v. 73, p. 1024 – 1032, 2007.

ALMEIDA, V.; LEITÃO, A.; REINA, L.; MONTANARI, C.; DONNICI, C. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.

ANAND, P., KUNNUMAKKARA, A. B., NEWMAN, R. A., AND AGGARWAL, B. B. Bioavailability of curcumin: problems and promises. **Molecular Pharmacology**, v. 4, p. 807-818, 2007.

ANTON, N.; BENOIT, J.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates – a review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, p. 185-199, 2008.

ANTON, N.; GAYET, P.; BENOIT, J.; SAULNIER, P. Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method: an investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 34, p. 44-52, 2007.

AVGOUSTAKIS, K.; BELETSI, A.; PANAGI, Z.; KLEPETSANIS, P.; LIVANIOU, E.; EVANGELATOS, G.; ITHAKISSIOS, D. Effect of copolymer composition on the physicochemical characteristics, in vitro stability, and biodistribution of PLGA-mPEG nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 259, p. 115-127, 2003.

ARAÚJO, C.; LEON, L. Biological activities of *Curcuma longa* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 723-728, 2001.

BALIGA, M. S.; KATIYAR, S. K. Chemoprevention of photocarcinogenesis by selected dietary botanicals. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 5, p. 243-253, 2006.

BANERJI, A.; CHAKRABARTI, J.; MITRA, A.; CHATTERJEE, A. Effect of curcumin on gelatinase A (MMP-2) activity in B16F10 melanoma cells. **Cancer Letters**, v. 211, p. 235-242, 2004.

BARRATT, G. Colloidal drug carriers: achievements and perspectives. **CMLS Celular and Molecular Life Sciences**, v. 60, p. 21-37, 2003.

BARRAUD, L.; MERLE, P.; SOMA, E.; LEFRANÇOIS, L.; GUERRET, S.; CHEVALLIER, M.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P.; TRÉPO, C.; VITVITSKI, L. Increase of doxorubicin sensitivity by doxorubicin-loading into nanoparticles for hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. **Journal of Hepatology**, v. 42, p. 736-743, 2005.

BÉDUNEAU, A.; SAULNIER, P.; ANTON, N.; HINDRÉ, F.; PASSIRANI, C.; RAJERISON, H.; NOIRET, N.; BENOIT, J. Pegylated nanocapsules produced by an organic solvent-free method: evaluation of their stealth properties. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 9, p. 2190-2199, 2006.

BISHT, S.; FELDMANN, G.; SONI, S.; RAVI, R.; KARIKARI, C.; MAITRA, A.; MAITRA, A. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin (nanocurcumin): a novel strategy for human cancer therapy. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 5, n. 3, 2007.

BRANNON-PEPPAS, L. Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 116, p. 1-9, 1995.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Resolução nº899, de 29 de maio de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Estimativas 2008: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2007.

BRAUD, F.; KHAYAT, D.; KROON, B.B.R.; VALDAGNI, R.; BRUZZI, P.; CASCINELLI, N. Malignant melanoma. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 47, p. 35-63, 2003.

BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 631-651, 2002.

COUVREUR, P.; BARRAT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. **Therapeutic drug carrier systems**, v. 19, p. 99-134, 2002.

DÍAZ, A.N.; PEINADO, R. Fluorometric determination of curcumin in yogurt and mustard. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 56-59, 1992.

DULIEU, C.; BAZILE, D. Influence of lipid nanocapsules composition on their aptness to freeze-drying. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 2, p. 285-292, 2005.

DUVOIX, A.; BLASIUS, R.; DELHALLE, S.; SCHNEKENBURGER, M.; MORCEAU, F.; HENRY, E.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. **Cancer Letters**, v. 223, p. 181-190, 2005.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. **Nature Reviews**, v. 5, p. 161-171, 2005.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, R1-R4, 1989.

FONSECA, C.; SIMÕES, S.; GASPAR, R. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. **Journal of Controlled Release**, v. 83, p. 273-286, 2002.

GIBLIN, A.V.; THOMAS, J.M. Incidence, mortality and survival in cutaneous melanoma. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v. 60, p. 32-40, 2007.

GOEL, A.; KUNNUMAKKARA, A. B.; AGGARWAL, B. B. Curcumin as "curecumin": from kitchen to clinic. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, p. 787-809, 2008.

GREF, R., DOMB, A., QUELLEC, P., BLUNK, T., MÜLLER, R. H., VERBAVATZ, J. M., LANGER, R. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.16, p. 215-233, 1995.

GUPTE, A.; CIFTCI, K. Formulation and characterization of paclitaxel, 5-FU and paclitaxel + 5-FU microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 276, p. 93-106, 2004.

GUTERRES, S.; BENVENUTTI, E.; POHLMANN, A. Nanopartículas poliméricas para administração de fármacos. In: DURÁN, N.; MATTOSO, L.; MORAIS, P. **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo: Artliber Editora, 2006. P. 161-166.

HALEY, B.; FRENKEL, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. **Urologic Oncology**, v. 26, p. 57-64, 2008.

HATCHER, H.; PLANALP, R.; CHO, J.; TORTI, F.M.; TORTO, S.V. Curcumin: from ancient to current clinical trials. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, p. 1631-1652, 2008.

HEATH, D.; PRUITT, M.; BRENNER, D.; ROCK, C. Curcumin in plasma and urine: quantitation by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 783, p. 287-295, 2003.

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J.; BENOIT, J. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. **Pharmaceutical Research**, v. 19, p. 875-880, 2002.

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; VENIER-JULIENNE, M.; PROUST, J.; PHAN-TAN-LUU, R.; BENOIT, J. The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 18, p. 55-61, 2003.

HISERODT, R.; HARTMAN, T.G.; HO, C.; ROSEN, R.T. Characterization of powdered turmeric by liquid chromatography mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 740, p. 51-63, 1996.

HOARAU, D.; DELMAS, P.; DAVID, S.; ROUX, E.; LEROUX, J. Novel long-circulating lipid nanocapsules. **Pharmaceutical Research**, v. 21, p. 1783-1789, 2004.

HUANG, M.; LOU Y.; MA, W.; NEWMARK, H.; REUHL, K.; CONNEY, A. Inhibitory effects of dietary curcumin on forestomach, duodenal, and colon carcinogenesis in mice. **Cancer Research**, v. 54, p. 5841-5847, 1994.

ICH – INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. **Validation of analytical procedures: text and methodology**, Q2(R1), 2005.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **O que é o câncer?** Disponível em: <www.inca.gov.br>. Acesso em: 15 de dezembro de 2008.

IWUNZE, M. Binding and distribution characteristics of curcumin solubilized in CTAB micelle. **Journal of Molecular Liquids**, v. 111, p. 161-165, 2004.

JACK, A.; BOYES, C.; AYDIN, N.; ALAM, K.; WALLACK, M. The treatment of melanoma with an emphasis on immunotherapeutic strategies. **Surgical Oncology**, v. 15, p. 13-24, 2006.

JAIN, R.A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**, v. 21, p. 2475-2490, 2000.

JAYAPRAKASHA, G.; RAO, L.; SAKARIAH, K. Improved HPLC method for the determination of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3668-3672, 2002.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; HAO, Y.; XU, J.; MURRAY, T.; THUN, M.J. Cancer statistics 2008. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 58, p. 71-96, 2008.

KOLTER, K.; RUCHATZ, F. **Solutol HS 15: practical aspects for the production of solubilizates**. Disponível em: <www.basf.com>. Acesso em: 17 de abril de 2007.

LACOEUILLE, F.; HINDRE, F.; MOAL, F.; ROUX, J.; PASSIRANI, C.; COUTURIER, O.; CALES, P.; LE JEUNE, J.; LAMPRECHT, A.; BENOIT, J. In vivo evaluation of lipid nanocapsules as a promising colloidal carrier for paclitaxel. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 344, p. 143-149, 2007.

LEGRAND, P.; BARRAT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems. **Pharma Sciences**, v. 9, n. 5, p. 411-418, 1999.

LI, L.; BRAITEH, F.; KURZROCK, R. Liposome-encapsulated curcumin. **Cancer**, v. 104, p. 1322-1331, 2005.

LIU, A.; LOU, H.; ZHAO, L.; FAN, P. Validated LC/MS/MS assay for curcumin and tetrahydrocurcumin in rat plasma and application to pharmacokinetic study of phospholipid complex of curcumin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, p. 720-727, 2006.

LOCH-NECKEL, G.; NEMEN, D.; PUHL, A. C.; FERNANDES, D.; STINAMIGLIO, M. A.; ALVAREZ SILVA, M.; HANGAI, M.; SANTOS SILVA, M. C.; LEMOS-SENNA, E. Stealth and non-stealth nanocapsules containing camptothecin: in-vitro and in-vivo activity on B16-F10 melanoma. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, n. 10, p. 1359-1364, 2007.

MAHESHWARI, R.; SINGH, A.; GADDIPATI, J.; SRIMAL, R. Multiple biological activities of curcumin: a short review. **Life Sciences**, v. 78, p. 2081-2087, 2006.

MALZERT-FRÉON, A.; VRIGNAUD, S.; SAULNIER, P.; LISOWSKI, V.; BENOÎT, J.; RAULT, S. Formulation of sustained release nanoparticles loaded with tripenone, a new anticancer agent. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 320, p. 157-164, 2006.

MAY, J.; TOURKINA, E.; HOFFMAN, S.R.; DIX, T.A. Detection and quantitation of curcumin in mouse lung cell cultures by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 337, p. 62-69, 2005.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles. Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, p. 165-196, 2001.

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

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

MOHANRAJ, V.; CHEN, Y. Nanoparticles – a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, p. 561-573, 2006.

MOLIFE, R.; HANCOCK, B.W. Adjuvant therapy of malignant melanoma. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 44, p. 81-102, 2002.

MONTASSER, I.; BRIANÇOM, S.; LIETO, J.; FESSI, H. Méthodes d'obtention et mécanismes de formation de nanoparticules polymériques. **Journal de Pharmacie de Belgique**, v. 55, p. 155-167, 2000.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; GULIK, A.; BOURDON, O.; GREF, R.; LABARRE, D.; BARRATT, G. Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. **Biomaterials**, v. 22, p. 2967-2979, 2001.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Melanoma**. Disponível em: <www.cancer.gov>. Acesso em: 10 de março de 2009.

PAK, Y.; PATEK, R.; MAYERSOHN, M. Sensitive and rapid isocratic liquid chromatography method for the quantitation of curcumin in plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 796, p. 339-346, 2003.

PAPPO, A.S. Melanoma in children and adolescents. **European Journal of Cancer**, v. 39, p. 2651-2661, 2003.

PHILIP, S.; KUNDU, G. C. Osteopontin induces nuclear factor κ B-mediated promatrix metalloproteinase-2 activation through $I\kappa$ B α /IKK signaling pathways, and curcumin

(diferulolymethane) down-regulates these pathways. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 14487-14497, 2003.

PILLAI, G.; SRIVASTAVA, A.; HASSANEIN, T.; CHAUHAN, D.; CARRIER, E. Induction of apoptosis in human lung cancer cells by curcumin. **Cancer Letters**, v. 208, p. 163-170, 2004.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E.; FESSI, H. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. **Pharmaceutical Research**, v. 15, p. 1056-1062, 1998.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RAY, S.; CHATTOPADHYAY, N.; MITRA, A.; SIDDIGI, M.; CHATTERJEE, A. Curcumin exhibits antimetastatic properties by modulating integrin receptors, collagenase activity, and expression of Nm23 and E-cadherin. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 22, p. 49-58, 2003.

RÉ, M. I.; RODRIGUES, M. F. A. Polímeros biodegradáveis. In: DURÁN, N.; MATTOSO, L.; MORAIS, P. **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo: Artliber Editora, 2006. P. 149-159.

SANTANDER-ORTEGA, M.J.; CSABA, N.; ALONSO, M.J.; ORTEGA-VINUESA, J.L.; BASTOS-GONZÁLEZ, D. Stability and physicochemical characteristics of PLGA, PLGA:poloxamer and PLGA:poloxamine blend nanoparticles – a comparative study. **Colloids and Surfaces A**, v. 296, p. 132-140, 2007.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SINHA, R.; KIM, G.; NIE, S.; SHIN, D. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, p. 1909-1917, 2006.

SIWAK, D.R.; SHISHODIA, S.; AGGARWAL, B.B.; KURZROCK, R. Curcumin-induced antiproliferative and proapoptotic effects in melanoma cells are associated with suppression of I κ B kinase and nuclear factor κ B activity and are independent of the B-Raf/mitogen-activated/extracellular signal-regulated protein kinase pathway and the Akt pathway. **Cancer**, v. 15, p. 879-890, 2005.

SOENGAS, M.S.; LOWE, S.W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. **Oncogene**, v. 22, p. 3138-3151, 2003.

SONG, G.; MAO, Y.; CAI, Q.; YAO, L.; OUYANG, L.; BAO, S. Curcumin induces human HT-29 colon adenocarcinoma cell apoptosis by activating p53 and regulating apoptosis-related protein expression. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 1791-1798, 2005.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1-20, 2001.

STOLNIK, S.; ILLUM, L.; DAVIS, S. Long circulating microparticulate drug carriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, p. 195-214, 1995.

SYNG-AI, C.; KUMARI, A.; KHAR, A. Effect of curcumin on normal and tumor cells: role of glutathione and bcl-2. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 9, p. 1101-1108, 2004.

THAYSEN, G. **Applications of Solutol HS 15**. Disponível em: <www.basf.com>. Acesso em: 12 de abril de 2007.

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

TOKIWA, Y.; CALABRIA, B.P. Biodegradability and biodegradation of poly(lactide). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 244-251, 2006.

TOMREN, M. ; MÁSSON, M.; LOFTSSON, T.; TONNESEN, H. Studies on curcumin and curcuminoids XXXI. Symmetric and asymmetric curcuminoids: stability, activity and complexation with cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 338, p. 27-34, 2007.

TONNESEN, H. Solubility, chemical and photochemical stability of curcumin in surfactant solutions. **Pharmazie**, v. 57, p. 820-824, 2002.

TONNESEN, H.; MÁSSON, M.; LOFTSSON, T. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 244, p. 127-135, 2002.

VONARBOURG, A.; PASSIRANI, C.; SAULNIER, P.; BENOIT, J. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. **Biomaterials**, v. 27, p. 4356-4373, 2006.

WAHL, H.; TAN, L.; GRIFFITH, K.; CHOI, M.; LIU, R. Curcumin enhances Apo2L/TRAIL-induced apoptosis in chemoresistant ovarian cancer cells. **Gynecologic Oncology**, v. 105, p. 104-112, 2007.

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

WITSCHI, C.; DOELKER, E. Residual solvents in pharmaceutical products: acceptable limits, influences on physicochemical properties, analytical methods and documented values. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 43, p. 215-242, 1997.

XIE, Y.; JIANG, Z.; ZHOU, H.; CAI, X. ; WONG, Y. ; LIU, Z. ; BIAN, Z. ; XU, H.; LIU, L. Combinative method using HPLC quantitative and qualitative analyses for quality consistency assessment of a herbal medicinal preparation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 204-212, 2007.

YIH, T.; WEI, C. Nanomedicine in cancer treatment. **Nanomedicine**, v. 1, p. 191-192, 2005.

ANEXO I: APROVAÇÃO DO PROTOCOLO DE PESQUISA PELO COMITE DE ÉTICO NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UFSC

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo

PP00161

Título

Desenvolvimento de sistemas de liberação nanoestruturados como carreadores de compostos de origem natural e avaliação da atividade antitumoral in vitro e in vivo. Avaliação da atividade antitumoral de nanocápsulas poliméricas e lipídicas contendo curcumina em modelo de melanoma murino B16F10.

Data de Entrada

22/01/2008

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

09/05/2008

Considerações

Ofício nº 058/CEUA/PRPe/2008

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Elenara Lemos Senna, Departamento de Ciências Farmacêuticas - CCS

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por 2 (dois) anos, para a utilização de 59 camundongos (*Mus musculus*).

- Processo cadastrado sob o número: 23080.003594/2008-29

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 15/08/2010

Data 15/05/2008

Parecer(es):



**Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE**