

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MACKELLY SIMIONATTO

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS CONTENDO CURCUMINA E PIPERINA COM POTENCIAL
ANTIOXIDANTE EM DISLIPIDEMIAS

PONTA GROSSA

2021

MACKELLY SIMIONATTO

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS CONTENDO CURCUMINA E PIPERINA COM POTENCIAL
ANTIOXIDANTE EM DISLIPIDEMIAS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual de Ponta Grossa, associação ampla com a Universidade Estadual do Centro-Oeste, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Jane Manfron

PONTA GROSSA

2021

Simionatto, Mackelly
S589 Desenvolvimento e caracterização de micropartículas poliméricas contendo curcumina e piperina com potencial antioxidante em dislipidemias / Mackelly Simionatto. Ponta Grossa, 2021.
141 f.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vítor Farago.

Coorientadora: Profa. Dra. Jane Manfron.

1. Dislipidemias. 2. Polimetacrilatos. 3. Spray - drying. 4. Liberação controlada. 5. Perfil lipídico. I. Farago, Paulo Vítor. II. Manfron, Jane. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. IV.T.

CDD: 613.321

Ponta Grossa, 22 de julho de 2021.

ATA DE EXAME DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS -
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCIÊNCIAS APLICADAS À
FARMÁCIA NÚMERO 08/2021 DA DOUTORANDA **MACKELLY SIMIONATTO** REALIZADA NO
DIA 22 DE JULHO DE 2021, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Ao vigésimo segundo dia de julho de dois mil e vinte e um, às 13 horas, via videoconferência, na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em sessão pública sob a presidência da Professora Doutora Jane Manfron reuniu-se a Banca Examinadora de exame de defesa de tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas da doutoranda Mackelly Simionatto, na linha de pesquisa: Desenvolvimento e Controle de Fármacos, Medicamentos e Correlatos, constituída pela Professora Doutora Jane Manfron (UEPG/PR) e demais Doutores (membros titulares): Juliana Berton (Faculdades Ponta Grossa - CESCAGE/PR), Jessica Mendes Nadal (UEPG/PR), Vanessa Cristina Godoy Jasinski (Faculdades Ponta Grossa - CESCAGE/PR) e Patrícia Mathias Doll Boscardin (UEPG/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem o exame de defesa de tese de Doutorado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição.

O título do trabalho foi: **"DESENVOLVIMENTO DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO CURCUMINA E PIPERINA PARA USO POTENCIAL EM DISLIPIDEMIAS"**. Encerrada a defesa, a banca considerou APROVADA a tese, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. A aluna deverá entregar, no prazo de até 30 dias, a versão definitiva da tese de Doutorado, com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): _____

Alteração de título: ☒ não ☐

Novo título: DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO CURCUMINA E PIPERINA COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE EM DISLIPIDEMIAS.

Jane Manfron 1- (UEPG - PR) - Presidente

Jessica Mendes Nadal (UEPG/PR) - Titular

Juliana Berton (Faculdades Ponta Grossa - CESCAGE/PR) - Titular

Patrícia Mathias Doll Boscardin (UEPG/PR) - Titular

Vanessa Cristina Godoy Jasinski (Faculdades Ponta Grossa - CESCAGE/PR) - Titular

À minha família, por todo apoio e compreensão.
E especial, ao meu filho que me transforma a cada dia numa pessoa melhor, meu marido pelo
companheirismo, meus pais por toda ajuda, minha irmã forte e iluminada e aos meus queridos
sobrinhos Alyson (*in memoriam*) e Alexandre por tantas traduções realizadas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, criador de todas as coisas e a quem sempre confiei todos os meus passos;

Ao meu orientador e colega de trabalho, Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, pela amizade, parceria, oportunidade e incentivo. Que toda dedicação, dinamismo e tempo despendido possam ser recompensados com bênçãos de saúde, alegria e prosperidade.

Às contribuições dos membros da banca examinadora da defesa e ao tempo despendido para a correção do trabalho.

Ao Complexo de Laboratórios Multiusuários da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas UEPG/UNICENTRO pela oportunidade de realizar o doutorado.

A todos que contribuíram para a concretização deste trabalho.

RESUMO

O uso de fitofármacos como coadjuvantes no tratamento e na prevenção de dislipidemias são de grande interesse na indústria farmacêutica, para a redução dos eventos de aterosclerose e outras doenças cardiovasculares. A curcumina (CUR) é um composto fenólico extraído dos rizomas da *Curcuma longa* L. e demonstra alto potencial farmacológico por interagir com vários alvos moleculares. Dentre as inúmeras atividades farmacológicas, apresenta fortes evidências na redução dos lipídeos séricos e ação hepatoprotetora. Entretanto, possui fotossensibilidade e baixa biodisponibilidade. A piperina (PIP) é um alcaloide encontrado nos frutos e raízes das espécies *Piper nigrum* L. e *Piper longum* L. Este metabólito secundário possui, dentre algumas propriedades farmacológicas, o consumo calórico de gordura, redução da obesidade e dos níveis de lipídeos sanguíneos. Apresenta alto grau de pungência, baixa solubilidade em água e um efeito promissor de aumentar a biodisponibilidade de outros fármacos. Devido às limitações relacionadas às propriedades físico-químicas das moléculas de CUR e PIP e com o intuito de aumentar sua biodisponibilidade para o uso em futuras formulações farmacêuticas hipolipemiantes e hepatoprotetoras. O objetivo deste trabalho foi desenvolver, caracterizar e avaliar *in vitro* micropartículas poliméricas empregando Eudragit[®] S100 e RS30D pela técnica de *spray drying*. As formulações foram preparadas em etanol:água (50:50, v/v) nas concentrações de 0, 10 e 20% de fármacos puros e/ou associados. Foram obtidas micropartículas com tamanho (1,86 a 7,75 μm), rendimento (12,41 a 69,33%) e umidade (2,54 a 4,93%) adequados. A quantificação do fármaco foi realizada por meio de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O método mostrou-se específico, linear, preciso e exato. As micropartículas obtidas com Eudragit[®] S100 apresentaram formato esférico ou semiesférico, com superfície lisa e algumas irregularidades, nas quais a eficiência de encapsulação do(s) fármaco(s) apresentou entre 81,42 a 109,75%. Já as de Eudragit[®] RS30D apresentaram estruturas colabadas com formato arredondado, com inúmeras concavidades e rugosidades na sua superfície e eficiência de encapsulação entre 84,65 a 102,5%. Não foi constatado fármaco livre na superfície de nenhuma micropartícula. A espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) não evidenciou ligações químicas entre os fármacos e os polímeros. Os resultados obtidos por difração de raios X (DRX) e pela análise térmica (ATG) indicaram amorfização dos fármacos em relação à CUR e PIP puras. Os testes *in vitro* demonstraram ausência de efeito hemolítico e presença de efeito antioxidante correlacionado ao metabolismo lipídico. Considerando os resultados obtidos, as formulações de micropartículas (met)acrílicas contendo CUR e PIP podem ser uma alternativa viável para a realização de futuros ensaios *in vivo* em modelo de aterosclerose.

Palavras-chave: Dislipidemias. Polimetacrilatos. Spray-drying. Liberação controlada. Perfil lipídico.

ABSTRACT

The use of phytopharmaceuticals for preventing and treating dyslipidemias shows remarkable interest in the pharmaceutical industry by reducing atherosclerosis events and other cardiovascular diseases. Curcumin (CUR) is a phenolic compound extracted from the rhizomes of *Curcuma longa* L. and shows high pharmacological potential by interacting with several molecular targets. Among its pharmacological activities, CUR presents strong evidence in the reduction of serum lipids and hepatoprotective action. However, it has photosensitivity and low bioavailability. Piperine (PIP) is an alkaloid found in fruits and roots of the species *Piper nigrum* L. and *Piper longum* L. This secondary metabolite has some pharmacological properties as reduction of fat, obesity, and blood lipid levels. It has a high degree of pungency, low water solubility and a promising effect to increase the bioavailability of other drugs. Considering the physicochemical limitations of CUR and PIP and the aim of increasing their bioavailability for use them in future lipid-lowering and hepatoprotective pharmaceutical formulations, the objective of this work was to develop, to characterize and to evaluate *in vitro* polymeric microparticles using Eudragit[®] S100 and RS30D by spray-drying technique. The formulations were prepared in ethanol:water (50:50, V/V) containing 0, 10 and 20% of pure drugs alone and/or in combination. Microparticles with suitable size (1.86 to 7.75 μm), yield (12.41 to 69.33%), and moisture (2.54 to 4.93%) were achieved. The drug was quantified using an analytical method by high performance liquid chromatography (HPLC). This method was specific, linear, precise, and exact. The Eudragit[®] S100 microparticles were spherical or semi-spherical in shape, presented smooth surface and some irregularities. The encapsulation efficiency was between 81.42 and 109.75%. For Eudragit[®] RS30D, erythrocyte-like structures and encapsulation efficiency between 84.65 and 102.5% were obtained. No free drug was found on the surface of any microparticle formulation. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) did not show chemical bonds between drugs and polymers. The results obtained by X-ray diffraction (XRD) and thermal analysis (TGA) indicated drug amorphization comparing to pure CUR and PIP. *In vitro* tests showed no hemolytic effect and with antioxidant effect associated with lipid metabolism. Considering the results obtained, (meth)acrylic microparticle formulations containing CUR and PIP may be a feasible alternative for further *in vivo* assays in atherosclerosis model.

Keywords: Dyslipidemias. Polymethacrylates. Spray-drying. Controlled release. Lipid profile.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – PLACA ATEROSCLERÓTICA NO INTERIOR DO VASO SANGUÍNEO...	29
FIGURA 2 – ESPÉCIE VEGETAL (A.) E PRODUTO DO RIZOMA DESIDRATADO E MOÍDO (B.) DA <i>Curcuma longa</i> L.	36
FIGURA 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DE CURCUMINOIDES EXTRAÍDOS DE <i>Curcuma longa</i> : (A) CURCUMINA, (B) DESMETOXYCURMINA E (C) BISDESMETOXYCURCUMINA	37
FIGURA 4 – DOENÇAS HUMANAS QUE DEMONSTRARAM RESPOSTA FRENTE À CURCUMINA EM ENSAIOS CLÍNICOS BIOLÓGICOS.....	38
FIGURA 5 – ESPÉCIES VEGETAIS E FRUTOS DA <i>Piper nigrum</i> L. e <i>Piper longum</i> L. ..	41
FIGURA 6 – ESTRUTURA QUÍMICA DE PIPERINA EXTRAÍDOS DE <i>Piper nigrum</i> L.	41
FIGURA 7 – MODELOS DE ESTRUTURAS DAS MICROPARTÍCULAS	46
FIGURA 8 – IMAGEM E DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO EQUIPAMENTO DE SPRAY DRYER	48
FIGURA 9 – ESTRUTURA QUÍMICA DO POLÍMERO EUDRAGIT® S100	51
FIGURA 10 – ESTRUTURA QUÍMICA DO POLÍMERO EUDRAGIT® RS30D.....	51
FIGURA 11 – FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DA PESQUISA	64
FIGURA 12 – ESQUEMA DE PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	66
FIGURA 13 – IMAGEM MACROSCÓPICA DOS AGLOMERADOS DE MICROPARTÍCULAS DE EUDRAGIT® RS30D COM CURCUMINA E PIPERINA ADERIDAS NO CICLONE DO SPRAY DRYER.....	80
FIGURA 14 – CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES ANALÍTICOS DE CURCUMINA E PIPERINA NAS CONCENTRAÇÕES DE 35,0 µg.mL ⁻¹ OBTIDOS POR CLAE	80
FIGURA 15 – CROMATOGRAMA PARA AS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO EUDRAGIT® S100 (MS_0) OBTIDO POR CLAE	81
FIGURA 16 – CROMATOGRAMA PARA AS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO EUDRAGIT® RS30D (MRS_0) OBTIDO POR CLAE	81
FIGURA 17 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CURVA ANALÍTICA MÉDIA PARA A DETERMINAÇÃO DA CURCUMINA OBTIDA POR CLAE (λ = 262 nm)	82
FIGURA 18 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CURVA ANALÍTICA MÉDIA PARA A DETERMINAÇÃO DA PIPERINA OBTIDA POR CLAE (λ = 262 nm)	82

FIGURA 19 – ELETROMICROGRAFIAS FEG-SEM DOS FÁRMACOS PUROS: CURCUMINA (CUR) E PIPERINA (PIP), DOS POLÍMEROS EUDRAGIT [®] S100 (S100) E EUDRAGIT [®] RS30D (RS30D) AUMENTO DE 5 kx	89
FIGURA 20 – ELETROMICROGRAFIAS FEG-SEM DAS MICROPARTÍCULAS PREPARADAS A PARTIR DO POLÍMERO EUDRAGIT [®] S100 COM OU SEM A ADIÇÃO DE CURCUMINA E/OU PIPERINA: MS_0, MS_C10, MS_C20, MS_P10, MS_P20, MS_CP10 E MS_CP20, AUMENTO DE 10 kx	90
FIGURA 21 – ELETROMICROGRAFIAS FEG-SEM DAS MICROPARTÍCULAS PREPARADAS A PARTIR DO POLÍMERO EUDRAGIT [®] RS30D COM OU SEM A ADIÇÃO DE CURCUMINA E/OU PIPERINA: MRS_0, MRS_C10, MRS_C20, MRS_P10, MRS_P20, MRS_CP10 E MRS_CP20, AUMENTO DE 10 kx	91
FIGURA 22 – ESPECTRO IVTF DA CURCUMINA PURA.....	92
FIGURA 23 – ESPECTRO IVTF DA PIPERINA PURA	93
FIGURA 24 – ESPECTRO IVTF DO POLÍMERO EUDRAGIT [®] S100.....	94
FIGURA 25 – ESPECTRO IVTF DO POLÍMERO EUDRAGIT [®] RS30D.....	94
FIGURA 26 – ESPECTRO IVTF DO EUDRAGIT [®] S100 (EUD S100), DOS FÁRMACOS CUR E/OU PIP, DA MISTURA FÍSICA (MF – EUD S100:CUR:PIP; 1:1:1) E DAS MICROPARTÍCULAS MS_0, MS_P10, MS_P20, MS_C10, MS_C20, MS_CP10 E MS_CP20	95
FIGURA 27 – ESPECTRO IVTF DO EUDRAGIT [®] RS30D (EUD RS30D), DOS FÁRMACOS CUR E/OU PIP, DA MISTURA FÍSICA (MF – EUD RS30D:CUR:PIP; 1:1:1) E DAS MICROPARTÍCULAS MRS_0, MRS_P10, MRS_P20, MRS_C10, MRS_C20, MRS_CP10 E MRS_CP20.....	96
FIGURA 28 – DIFRATOGRAMAS DA CURCUMINA, PIPERINA E POLÍMEROS S100 E RS30D	97
FIGURA 29 – DIFRATOGRAMA DO POLÍMERO EUDRAGIT [®] S100, DOS FÁRMACOS CURCUMINA E PIPERINA, DA MISTURA FÍSICA (EUD S100:CUR:PIP, 1:1:1 m/m) E DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PREPARADAS COM O S100	98

FIGURA 30 – DIFRATOGRAMA DO POLÍMERO EUDRAGIT® RS30D, DOS FÁRMACOS CURCUMINA E PIPERINA, DA MISTURA FÍSICA (EUD RS30D:CUR:PIP, 1:1:1 m/m) E DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PREPARADAS COM O RS30D.....	98
FIGURA 31 – CURVAS TERMOGRAVIMÉTRICAS DA CURCUMINA PURA, PIPERINA PURA, DO POLÍMERO EUDRAGIT® S100 E DA MISTURA FÍSICA EUD S100:CUR:PIP (MF).....	100
FIGURA 32 – CURVAS TERMOGRAVIMÉTRICAS DA CURCUMINA PURA, PIPERINA PURA, DO POLÍMERO EUDRAGIT® RS30D E DA MISTURA FÍSICA EUD RS30D: CUR:PIP (MF)	100
FIGURA 33 – CURVAS TERMOGRAVIMÉTRICAS DAS MICROPARTÍCULAS PREPARADAS A PARTIR DO POLÍMERO EUDRAGIT® S100: A) MS_C10 E MS_C20; B) MS_P10 E MS_P20; C) MS_CP10 E MS_CP20...	102
FIGURA 34 – CURVAS TERMOGRAVIMÉTRICAS DAS MICROPARTÍCULAS PREPARADAS A PARTIR DO POLÍMERO EUDRAGIT® RS30D: A) MRS_C10 E MRS_C20; B) MRS_P10 E MRS_P20; C) MRS_CP10 E MRS_CP20.....	103
QUADRO 1 – ANÁLISE DOS ARTIGOS SELECIONADOS NA LITERATURA AVALIANDO A ATIVIDADE <i>IN VIVO</i> DA COADMINISTRAÇÃO DE CURCUMINA-PIPERINA EM DISLIPIDEMIAS E EVENTOS CARDIOVASCULARES.....	53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – VALORES DE REFERÊNCIA PARA EXAMES LABORATORIAIS DO PERFIL LIPÍDICO	31
TABELA 2 – COMPOSIÇÃO DAS FORMULAÇÕES DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO CURCUMINA E PIPERINA	65
TABELA 3 – CARACTERÍSTICAS FÍSICAS MACROSCÓPICAS DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE EUDRAGIT® S100 E RS30D FORMULADAS COM CURCUMINA E PIPERINA OBTIDAS POR <i>SPRAY DRYING</i>	76
TABELA 4 – PERCENTUAIS DE RENDIMENTO E TEOR DE UMIDADE DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE EUDRAGIT®S100 E RS30D FORMULADAS COM CURCUMINA E PIPERINA	77
TABELA 5 – RESULTADOS OBTIDOS POR ANOVA PARA LINEARIDADE DO MÉTODO ANALÍTICO REVALIDADO PARA A DETERMINAÇÃO DA CURCUMINA	83
TABELA 6 – RESULTADOS OBTIDOS POR ANOVA PARA LINEARIDADE DO MÉTODO ANALÍTICO REVALIDADO PARA A DETERMINAÇÃO DA PIPERINA.....	83
TABELA 7 – RESUMO DOS PARÂMETROS DA CURVA ANALÍTICA DA CURCUMINA E PIPERINA PELO MÉTODO REVALIDADO DE RUDNIK (2019).....	84
TABELA 8 – DADOS DA REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA PARA O MÉTODO REVALIDADO DE OBTENÇÃO DE CURCUMINA E PIPERINA POR CLAE	85
TABELA 9 – TEOR DE CURCUMINA E PIPERINA INCORPORADAS NAS MICROPARTÍCULAS DE EUDRAGIT® S100 E RS30D E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE) PELO MÉTODO DE <i>SPRAY DRYING</i>	86
TABELA 10 – ENSAIO DE HEMÓLISE DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE EUDRAGIT® S100 E RS30D FORMULADAS COM CURCUMINA E/OU PIPERINA.....	104
TABELA 11 – EFEITO ANTIOXIDANTE DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE EUDRAGIT® S100 E RS30D FORMULADAS COM CURCUMINA E/OU PIPERINA	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABAP	Dihidrocloreto de 2,2'-azo-bis-ácido (2-amidinopropano)
ABCA1	Transportadores de cassete de ligação de ATP, do inglês (<i>ATP-binding cassette transporter subfamily A number 1</i>)
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ALT	Enzima alanina aminotransferase
AMC	<i>Analytical Methods Committee</i>
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APO	Apolipoproteínas
APO AI	Apolipoproteína A1
APO B	Apolipoproteína B
AST	Enzima aspartato aminotransferase
ATG	Análise termogravimétrica ou Termogravimetria, do inglês (<i>Thermogravimetry</i>)
ATP	Trifosfato de adenosina
AVC	Acidente vascular cerebral
BCRP	Proteína de resistência do câncer de mama
BHT	Butil-hidroxitolueno
CA	Concentração experimental do analito
CAT	Catalase
CERP	Proteína reguladora do efluxo de colesterol
CETP	Proteína transferidora de ésteres de colesterol
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês HPLC (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
Cl ⁻	Íon cloreto
CK-MB	Creatina-fosfoquinase fração mb
COL	Colesterol
CPK	Enzima creatina fosfoquinase
CP-1	Proteína quimioatraente de monócitos 1
CSA	Área de corte transversal
CTA	Concentração teórica do analito adicionado

CUR	Curcumina
CYP7	Colesterol 7-alfahidroxilase
DA	Doença aterosclerótica
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DCV	Doenças cardiovasculares
DF	Graus de liberdade
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DN	Dieta normal
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
DRC	Doenças respiratórias crônicas
DRX	Difração de Raios X, do inglês (<i>X-ray diffraction</i>)
EE	Eficiência de encapsulação
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FAL	Fosfatase alcalina
FDA	Agência Reguladora de Alimentos e Medicamentos, do inglês (<i>Food and Drug Administration</i>)
FEG-SEM	Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo, do inglês (<i>Field Emission Gun Scanning Electron microscopy</i>)
GGT	Enzima gama glutamil transferase
GRO	Oncogene regulador de crescimento humano
GSH	Glutathione
GSH-Px	Glutathione peroxidase
GSH-Rd	Glutathione reductase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HbA1c	Hemoglobina glicada
HDL	Lipoproteína de alta densidade, do inglês (<i>High Density Lipoprotein</i>)
HMgCoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
HOCl	Hipoclorito

HOMA-β	Avaliação de homeostase das células beta
HOMA-IR	Avaliação de homeostase da resistência insulínica
HSI	Índice de esteatose hepática
IA%	Porcentagem de Índice antioxidante
IAM	Infarto agudo do miocárdio
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular ¹
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
ICH	Conselho internacional de harmonização dos requisitos técnicos para medicamentos para uso humano, do inglês (<i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>)
IFN-γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
IVTF	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier, do inglês FTIR (<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
KBr	Brometo de potássio
KC	Quimiocina quimioatraente de neutrófilos
K ⁺	Íon potássio
LCAT	Lecitina colesterol aciltransferase
LD	Limites de detecção
LDH	Lactato desidrogenase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade, do inglês (<i>Low Density Lipoprotein</i>)
LDL-ox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
Lp(a)	Lipoproteína (a)
LQ	Limites de quantificação
LRP	Receptor de LDL remanescentes
MDA	Malonaldeído
MDR-P	Gene de resistência multidrogas
MDR-1	Proteínas associada ao gene resistência multidrogas
MEV-EC	Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo, do inglês (<i>Field Emission Scanning Electron Microscopy</i>)

MF	Mistura física
MS	Média dos quadrados
MS100	Micropartículas preparadas a partir do polímero Eudragit [®] S100
MS_0	Micropartícula CUR e PIP 0,0g, Eudragit [®] S100 2,0 g, etanol:água (50:50, v/v)
MS_C10	Micropartícula CUR 0,2 g, Eudragit [®] S100 1,8 g, etanol:água (50:50, v/v)
MS_C20	Micropartícula CUR 0,4 g, Eudragit [®] S100 1,6 g, etanol:água (50:50, v/v)
MS_CP10	Micropartícula CUR 0,1 g, PIP 0,1 g, Eudragit [®] S100 1,8 g, etanol:água (50:50, v/v)
MS_CP20	Micropartícula CUR 0,2 g, PIP 0,2 g, Eudragit [®] S100 1,6 g, etanol:água (50:50, v/v)
MS_P10	Micropartícula PIP 0,2 g, Eudragit [®] S100 1,8 g, etanol:água (50:50, v/v)
MS_P20	Micropartícula PIP 0,4 g, Eudragit [®] S100 1,6 g, etanol:água (50:50, v/v)
MRS	Micropartículas preparadas a partir do polímero Eudragit [®] RS30D
MRS_0	Micropartícula CUR e PIP 0,0 g, Eudragit [®] RS30D 2,0 g, etanol:água (50:50, v/v)
MRS_C10	Micropartícula CUR 0,2 g, Eudragit [®] RS30D 1,8 g, etanol:água (50:50, v/v)
MRS_C20	Micropartícula CUR 0,4 g, Eudragit [®] RS30D 1,6g, etanol:água (50:50, v/v)
MRS_P10	Micropartícula PIP 0,2 g, Eudragit [®] RS30D 1,8 g, etanol:água (50:50, v/v)
MRS_P20	Micropartícula PIP 0,4 g, Eudragit [®] RS30D 1,6g, etanol:água (50:50, v/v)
N	Número de repetições
Na ⁺	Íon sódio
NPC1P1	<i>Niemann-Pieck C1-like protein 1</i>
NO	Óxido nítrico
NO ₂	Dióxido de nitrogênio

O ₂	Oxigênio singlete
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
O ₂ NOCO ₂ ⁻	Ânion nitrocarbonato
OH [*]	Radical hidroxila
O=NOOCO ₂	Ânion carbonato peroxinitroso
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONO ⁻	Peroxinitrito
O ₃	Ozônio trioxigênio
PCAM-1	Molécula de adesão celular plaquetária 1
PCL	Poli (ε-caprolactona)
PCO	Conteúdo de carbonila na proteína
PCR-US	Proteína C reativa de alta sensibilidade
P.F.	Ponto de fusão
pH	Potencial hidrogeniônico
PIP	Piperina
PLGA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
PPARs	<i>Peroxisome proliferator-activated receptors</i>
PR	Intervalo de tempo entre o início da onda P e do QRS no eletrocardiograma
PTFE	Politetrafluoretileno
PTAH	Método de coloração com ácido fosfotúngstico e hematoxilina
QT	Segmento do total de despolarização ventricular no eletrocardiograma
r	Coeficiente de correlação
r ²	Coeficiente de determinação
R	Rendimento
R [*]	Radicais orgânicos
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
RO	Radical alcóxil
ROO [*]	Radical peróxil
ROOH	Hidróxidos orgânicos
ROS [*]	Radical sulfonil
RR	Intervalo de tempo entre duas ondas R sucessivas do sinal QRS no

	eletrocardiograma
RS	Radical tiol
RSOO	Radical peróxido tiol
RSSR	Dissulfetos
RS30D	Eudragit [®] RS30D - [cloreto de poli (metacrilato de trimetilamonioetila-co-metacrilato de metila-co-acrilato de etila)]
S	Inclinação da curva
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
SBPC/ML	Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial
SCAP	<i>Cleavage-activating protein</i>
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
sdLDL-c	Colesterol de lipoproteína de baixa densidade pequeno e denso
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
SREBFs	<i>Sterol regulatory element binding factors</i>
SREBP2	Proteína 2 do elemento regulador de esterol
SS	Soma dos quadrados
S100	Eudragit [®] S100 - [poli(metacrilato de metila-co-ácido metacrílico)]
TAC	Capacidade total antioxidante
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Espécies reativas do ácido tiobarbitúrico
TIBC	Capacidade total de ligação de ferro
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRI	Triglicerídeos
TSH	Hormônio estimulante da tireoide
Van Gieson	Método de coloração Van Gieson
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular 1
VHS	Velocidade de hemossedimentação
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade, do inglês (<i>Very Low Density Lipoprotein</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca registrada
%	Porcentagem
°	Grau
λ	Comprimento de onda
$\Delta H_{\text{fusão}}$	Variação da entalpia de fusão
Δm	Variação de massa
v/v	Medida volume:volume

LISTA DE UNIDADES

°C	Grau Celsius
μg	Micrograma (10^{-6} g)
μL	Microlitro (10^{-6} L)
Å	Ångström (10^{-10} m)
cm ²	Centímetros (10^{-2} m) quadrados
g	Grama
h	Hora
J	Joule, unidade de energia
kg	Quilograma (10^3 g)
kgf	Quilograma – força
kV	Quilovolt
L	Litro
mg	Miligrama (10^{-3} g)
min	Minuto
mL	Mililitro (10^{-3} L)
mm	Milímetro (10^{-3} m)
mm ³	Milímetro cúbico
nm	Nanômetro (10^{-9} m)
Rpm	Rotações por minuto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	25
2.1 ESTRESSE OXIDATIVO E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	25
2.2 DISLIPIDEMIAS E ATHEROSCLEROSE	27
2.3 A FITOTERAPIA E NOVAS PERSPECTIVAS NO TRATAMENTO DE DISLIPIDEMIAS	35
2.3.1 Aspectos Biofarmacêuticos da Curcumina	35
2.3.2 Aspectos Biofarmacêuticos da Piperina.....	40
2.4 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS	43
2.4.1 Obtenção de Micropartículas pelo Método de <i>Spray Drying</i>	47
2.4.2 Polímeros e Sistemas Dependentes de Liberação Modificada de Fármacos	49
2.4.3 O Uso Concomitante de Curcumina e Piperina no Tratamento de Dislipidemias e Eventos Cardiovasculares	52
3 OBJETIVOS.....	59
3.1 OBJETIVO GERAL.....	59
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS	59
4 MATERIAL E MÉTODOS	60
4.1 EQUIPAMENTOS.....	60
4.2 REAGENTES E SOLVENTES	61
4.2.1 Fármacos	61
4.2.2 Polímeros.....	61
4.2.3 Água Purificada.....	61
4.2.4 Solventes e Demais Reagentes.....	62
4.2.5 Demais Materiais	63
4.3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	63
4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	64
4.4.1 Obtenção das Micropartículas Poliméricas contendo Curcumina e Piperina	64

4.4.2 Tratamento Superficial do Eudragit® RS30D (de Dispersão Aquosa para Pó)	66
4.4.3 Mistura Física.....	66
4.4.4 Rendimento das Micropartículas.....	67
4.4.5 Determinação do Teor de Umidade	67
4.4.6 Avaliação da Eficiência de Encapsulação	67
4.4.6.1 Equipamentos e condições cromatográficas.....	68
4.4.6.2 Preparo das soluções padrão	68
4.4.6.3 Revalidação do método para quantificação de CUR e PIP	69
4.4.7 Caracterização das micropartículas poliméricas	70
4.4.7.1 Determinação do diâmetro médio	70
4.4.7.2 Análise morfológica e de superfície por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (<i>Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy</i> - FEG-SEM)	71
4.4.7.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IVTF)	71
4.4.7.4 Difração de raios X (DRX)	72
4.4.7.5 Análise térmica	72
4.4.7.5.1 Análise Termogravimétrica (ATG)	72
4.5 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i>	73
4.5.1 Ensaio de Hemólise.....	73
4.5.2 Estudo do Potencial Antioxidante pela Determinação de Espécies Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) – PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	73
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	75
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
5.1 OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	76
5.1.1 Rendimento e Teor de Umidade	77
5.1.2 Revalidação do Método Analítico para Quantificação de CUR e PIP	80
5.1.3 Quantificação de CUR e/ou PIP incorporadas às Micropartículas	85
5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	87
5.2.1 Analisador de Tamanho de Partículas.....	87
5.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (<i>Field Emission Gun Scannig Electron Microscopy</i> – FEG-SEM).....	88

5.2.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF)	92
5.2.4 Difração de Raios X (DRX)	96
5.2.5 Análise Térmica	99
5.2.5.1 Análise termogravimétrica (ATG)	99
5.3 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i>	104
5.3.1 Ensaio de Hemólise	104
5.3.2 Estudo do Potencial Antioxidante pela Determinação de Espécies Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	105
6 CONCLUSÃO	108
REFERÊNCIAS	109
APÊNDICE A – EFFECT OF THE CURCUMIN AND PIPERINE CO- ADMINISTRATION ON THE BLOOD LIPID LEVELS AND CARDIOVASCULAR RISK: A SYSTEMATIC REVIEW	126

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2016), 70% das mortes mundiais são causadas por doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) levando a óbito, anualmente cerca de 38 milhões de indivíduos. Dentre as DCNT estão, câncer, *Diabetes mellitus* (DM), doenças crônicas respiratórias (DCR) e doenças do aparelho circulatório, como por exemplo, acidente vascular cerebral (AVC) e doenças cardiovasculares (DCV) (WHO, 2018). Até o momento, essas doenças contribuem para uma grande parcela dos gastos em saúde e acarretam em perda considerável na qualidade de vida do indivíduo (MALTA *et al.*, 2019).

Quanto às DCV, em estudos anteriores o número de óbitos no mundo correspondia a 30% dos casos de DCNT (WHO, 2011) e da mesma maneira, no Brasil foi de 24,9% (BRASIL, 2014). O estudo de Mortensen e Falk (2018) denota que, a incidência de DCV nos Estados Unidos, tem agravado com o envelhecimento acarretando num aumento esperado de 43% (cerca de cinco milhões) na prevalência de doenças cardíacas coronárias, com um custo estimado de \$ 70 milhões até o ano de 2030. No Brasil, estudos de mortalidade prematura (30 a 69 anos de idade) são os mais encontrados em dados epidemiológicos na literatura, assim como o de Malta e colaboradores (2019), os quais verificaram que no período de 2000 a 2013, houve um declínio de 3,4% ao ano na taxa de DCV. No entanto, existe um grande desafio para implementar cuidados para os portadores dessas doenças, bem como instituir um tratamento preciso e eficaz (BRASIL, 2011).

O risco do desenvolvimento de DCV e câncer são agravados por alterações fisiológicas e metabólicas, ocasionadas pelo sobrepeso, obesidade, DM, dislipidemias, hipertensão arterial sistêmica (HAS), estado pró-inflamatório e pró-trombótico. Estes agravantes têm relação direta com a hereditariedade e o estilo de vida do indivíduo, uma vez que fatores como sedentarismo, estresse, consumo de bebidas alcoólicas, excesso de gorduras saturadas na dieta alimentar e o tabagismo podem alavancar e/ou potencializar o quadro clínico (BARBALHO *et al.*, 2015).

Neste contexto, as dislipidemias são caracterizadas por um distúrbio nos níveis de um ou mais componentes lipídicos sanguíneos e a principal evidência deste descontrole é a doença aterosclerótica (DA), que ao longo do tempo acarreta problemas cardiovasculares como infarto agudo do miocárdio (IAM), AVC e insuficiência cardíaca congestiva (ICC) (FERENCE *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2009). Outra complicação clínica é o transtorno hepático ocasionado pelo processo inflamatório em decorrência das alterações lipídicas (DIEBERGER *et al.*, 2018; MARMITT *et al.*, 2016).

A prevenção associada ao adequado tratamento das dislipidemias é a melhor alternativa para o controle da aterosclerose e outras DCV (BARBALHO *et al.*, 2015). O diagnóstico ocorre por meio de exames laboratoriais do perfil lipídico e a escolha do melhor esquema terapêutico, geralmente prescrito para um período prolongado de uso, é baseada em evidências clínicas. O histórico familiar e o grau de risco em que o indivíduo se enquadra também devem ser considerados para avaliar a meta estratégica (SCB, 2017). Existem algumas classes de medicamentos disponíveis no mercado e seus mecanismos de ação estão envolvidos em alguma etapa no processo do metabolismo lipídico, como na síntese do colesterol (COL), ligação em receptores específicos ou ainda mudanças genéticas. Dentre os medicamentos mais utilizados estão as estatinas e os fibratos. Entretanto, comumente apresentam como efeitos colaterais quadros de mialgia e hepatotoxicidade. Sabe-se ainda que o uso de apenas uma classe medicamentosa não é garantia de eficácia terapêutica (BORGES; OFFERMANN, 2008; SCB, 2017).

O tratamento das dislipidemias depende de medidas farmacológicas e não farmacológicas. Uma alternativa interessante e que tem recebido especial atenção na área de tecnologia farmacêutica é o emprego de produtos fitoterápicos. Inúmeros estudos relatam atividade farmacológica comprovada favorecendo sua ampla utilização para as mais variadas alterações fisiológicas (CLEMENT, 2009; YUAN *et al.*, 2016; WHO, 2017).

Algumas espécies vegetais, geralmente de uso tradicional na população, são capazes de prevenir, aliviar ou curar doenças. Sendo uma opção de efetiva resposta terapêutica única ou comocoadjuvante em tratamentos que utilizam medicamentos convencionais (CARVALHO *et al.*, 2007; MOREIRA *et al.*, 2014; YUAN *et al.*, 2016).

Muitos estudos realizados com o intuito de reduzir taxas lipídicas já foram relatados na literatura, dentre os quais os fitofármacos curcumina (CUR) e piperina (PIP) têm se destacado. A *Curcuma longa* L., conhecida mais comumente como açafrão-da-terra e utilizada como tempero na culinária, possui substâncias com propriedades farmacológicas. A CUR é o seu principal composto e apresenta diversas atividades terapêuticas, como ação digestiva (carminativa), imunizante, antialérgica, antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante, antioxidante, ação em doenças respiratórias (como a sinusite) e hepáticas (CARNEIRO, 2009; MARCHI, 2016), bem como, a redução dos níveis plasmáticos de colesterol total (COL) (ALWI *et al.*, 2008; QIN *et al.*, 2017). Já outro condimento da culinária, a *Piperis nigrum* L., também conhecida como pimenta negra, possui como principal componente farmacológico a PIP, a qual possui ação anti-inflamatória, antidepressiva, redutora dos níveis lipídicos, efeito contra a obesidade, aumento da digestão de alimentos e

ativação da proliferação dos melanócitos celulares. Outra ação relevante é o efeito sobre a absorção de nutrientes como as vitaminas A, B6 e C, como também selênio e betacaroteno (ATAL; BEDI, 2010). Apresenta um efeito característico de grande potencial científico e medicamentoso capaz de aumentar a biodisponibilidade de alguns fármacos (MHASKE *et al.*, 2018).

Os fitofármacos CUR e PIP podem auxiliar no controle ou tratamento de dislipidemias e proporcionar um efeito de hepatoproteção. Estudos de CUR (FAN *et al.*, 2017; YING, *et al.*, 2013; ZINGG *et al.*, 2013) e PIP (KAUR e MEENA, 2013; THIRUMALAI *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2016) puras e/ou associadas (MYIASAWA *et al.*, 2018; PANAHI *et al.*, 2018; TU *et al.*, 2014a) têm demonstrado resultados relevantes. Porém algumas características pertinentes limitam a utilização destes fitofármacos, principalmente, a baixa biodisponibilidade de ambos no organismo (LI *et al.*, 2017; NGUYEN *et al.*, 2017) e a pungência da PIP (BARCELOUX, 2009).

A possibilidade da associação de um fármaco a um sistema que permita a alteração e/ou adequação de suas propriedades físico-químicas, sem alterar a sua estrutura química, além de permitir uma liberação prolongada, torna-se viável a partir do emprego de sistemas poliméricos, aumentando seus efeitos farmacológicos. O presente estudo tem por objetivo utilizar sistemas poliméricos de liberação de fármacos por meio de micropartículas contendo CUR e/ou PIP obtidas pelo método de secagem por aspersão, utilizando equipamento de *spray drying*, para avaliar o efeito da redução das dislipidemias.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESTRESSE OXIDATIVO E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

As espécies reativas de oxigênio (EROS) são denominadas de radicais livres. Possuem como característica química, um número ímpar de elétrons na última camada eletrônica tornando átomos ou moléculas altamente instáveis e muito reativos (COTINGUIBA *et al.*, 2013). As EROS são oxidantes e assim, quando estão em maior quantidade em relação aos seus equivalentes antioxidantes podem desencadear diversas patologias. Este desequilíbrio causa um evento de estresse oxidativo (BIRDEN *et al.*, 2012).

A produção de EROS ocorre fisiologicamente por reações metabólicas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010) que utilizam oxigênio decorrente de agentes endógenos ou fatores ambientais e é de extrema importância em processos biológicos do sistema imune de defesa e na sinalização celular (ALVES *et al.*, 2010). O dano causado pelo seu excesso de produção desencadeia uma série de alterações nas funções celulares normais, pois tem como alvo moléculas do organismo como o DNA, proteínas, carboidratos e lipídeos. As lesões oxidativas no DNA celular podem ocasionar mutações e contribuir para a iniciação e progressão da carcinogênese (GOUVEIA; LIMA, 2017).

As EROS são classificadas em dois grupos. As que compreendem os radicais livres são os superóxidos (O_2^-), radical hidroxila (OH^*), óxido nítrico (NO), radicais orgânicos (R^*), radicais peroxil (ROO^*) e alcoxil (RO), radical sulfonil (ROS^*), radical tiol (RS), radical peróxido tiol (RSOO) e dissulfetos (RSSR). Já os compostos não radiculares incluem peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (O_2), ozônio trioxigênio (O_3), hidróxidos orgânicos (ROOH), hipoclorito (HOCl), peroxinitrito (ONO^-), ânion carbonato peroxinitroso ($O=NOOCO_2^-$), ânion nitrocarbonato ($O_2NOCO_2^-$), dióxido de nitrogênio (NO_2) e a carbonila derivada de hidratos de carbono ou lipídios altamente reativos (LIOU; STORZ, 2010; XU *et al.*, 2014).

Já, os antioxidantes são compostos naturais ou sintéticos que possuem estrutura molecular com elevada estabilidade oxidativa. São responsáveis pela prevenção da oxidação resultante da ação dos radicais livres por terem a capacidade de estabilizar ou desativar as EROS previamente ao ataque das células (BARBOSA *et al.*, 2010). Dentre os mecanismos para tal efeito estão: captura ou regeneração de radicais livres, decomposição de peróxidos, eliminação de oxigênio, inibição de enzimas envolvidas no processo de formação de radicais

livres e inibição da cascata de reações que envolvem os radicais livres (GOUVEIA; LIMA, 2017).

Os sistemas antioxidantes podem ser enzimáticos e não enzimáticos. A superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase (GSH-Rd) e a catalase (CAT) são enzimas responsáveis pela remoção do ânion superóxido (O_2^-), hidroperóxidos orgânicos e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BAGCHI *et al.*, 2014). Os sistemas antioxidantes não enzimáticos são compostos produzidos no organismo (glutathione, ubiquinona e ácido úrico) ou obtidos diretamente da dieta (α -tocoferol ou vitamina E, β -caroteno ou pro-vitamina A, ácido ascórbico ou vitamina C, e compostos fenólicos, como flavonoides e poliflavonoides) (KRYSTONA *et al.*, 2011).

A dieta hiperlipêmica altera o metabolismo do oxigênio, pois os ácidos graxos com duplas ligações são vulneráveis às reações oxidativas. A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia dos ácidos graxos poli-insaturados que promove a formação de EROS. Os ácidos graxos: linoleico, araquidônico e docosahexanoico são os que mais sofrem peroxidação lipídica celular. Portanto, o processo pode estar aumentado nos indivíduos com comorbidades como, obesidade, HAS, DM, dislipidemias, DCV e neoplasias podendo estar relacionado à aterosclerose, uma vez que sua etiologia está associada à modificação oxidativa da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (NEVES, 2010).

As lipoproteínas plasmáticas são partículas com grande variabilidade de tamanho, densidade, carga elétrica e composição lipídica e/ou protéica. E, quando sofrem oxidação ocorre modificação estrutural causando alterações nas suas propriedades físico-químicas (HEVONOJA *et al.*, 2000).

A avaliação da peroxidação lipídica pode ser realizada pela determinação dos produtos gerados como isoprostanos, hidroperóxidos lipídicos, aldeídos, fosfolípidios oxidados e produtos da oxidação do COL. Neste trabalho, o biomarcador de maior interesse é o malonaldeído, que é um aldeído bifuncional que tem a capacidade de se ligar aos resíduos de aminoácidos com carga elétrica positiva das apolipoproteínas resultando em alterações das cargas na superfície das lipoproteínas. O método colorimétrico que utiliza o ácido tiobarbitúrico (TBA) é o mais utilizado para a detecção deste biomarcador (LUZ *et al.*, 2011).

Os métodos de avaliação e mensuração dos biomarcadores são indicadores de processos fisiológicos normais, patológicos ou de resposta a uma intervenção terapêutica (GOUVEIA; LIMA, 2017).

2.2 DISLIPIDEMIAS E ATEROSCLEROSE

As dislipidemias são caracterizadas por alterações séricas de um ou mais componentes lipídicos no sangue. Podem ser classificadas em primárias e secundárias, sendo que as primárias não possuem causas aparentes enquanto as dislipidemias secundárias resultam de uma doença pré-existente (GOLDBERG, 2018).

Consideradas ainda, como um fator de risco relevante para o desenvolvimento da aterosclerose, as dislipidemias representam a base para as DCV, responsáveis por altas taxas de morbimortalidade. A prevalência das dislipidemias ocorre de acordo com a população estudada, sendo de 75 a 85% maior nos indivíduos em que a doença coronariana ocorre antes dos 55 a 60 anos para homens e dos 65 anos para mulheres, comparada com 40 a 48% de prevalência nos indivíduos sem DCV, respectivamente. De acordo com a literatura, pode-se dizer que na população brasileira, a prevalência varia entre 12,5 a 20% (BRASIL, 2019).

O aumento sanguíneo de quilomícrons e de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) resulta em hipertrigliceridemia. Isto acontece por meio da diminuição da hidrólise dos triglicerídeos (TRI) pela ação da lipase lipoproteica ou então, pelo aumento da síntese de VLDL. Ambos os mecanismos são ocasionados por variantes genéticas das enzimas ou das apolipoproteínas (Apo) relacionadas a essas lipoproteínas. O aumento de lipoproteínas sanguíneas com grandes quantidades de COL, como a LDL, resulta em hipercolesterolemias monogênicas e poligênicas. As doenças monogênicas ocorrem pelo defeito no gene do receptor para LDL (LDL-R) ou no gene da Apo B100, resultante de mutações, ocasionando respectivamente, redução de expressão em membrana e deformações estruturais ou funcionais, também a deficiência no acoplamento da LDL ao receptor da célula. Nas doenças poligênicas as mutações ocorrem em múltiplos genes envolvidos no metabolismo lipídico e são influenciadas pela interação entre fatores genéticos e ambientais (HANSON, 2005).

As lipoproteínas apresentam diferenças de tamanho, densidade, composição química e podem diferir entre si pela modificação *in vivo* por meio das ações enzimáticas. Estas modificações influenciam seu papel no metabolismo lipídico e no processo aterogênico (SBC, 2017).

A formação da placa aterosclerótica inicia-se com a agressão ao endotélio vascular e como consequência, a disfunção endotelial aumenta a permeabilidade da camada íntima às lipoproteínas plasmáticas que ficam retidas no espaço subendotelial. E assim, as partículas de LDL sofrem oxidação (LDL-ox), por meio de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), além de enzimas como a mieloperoxidase, tornando-as

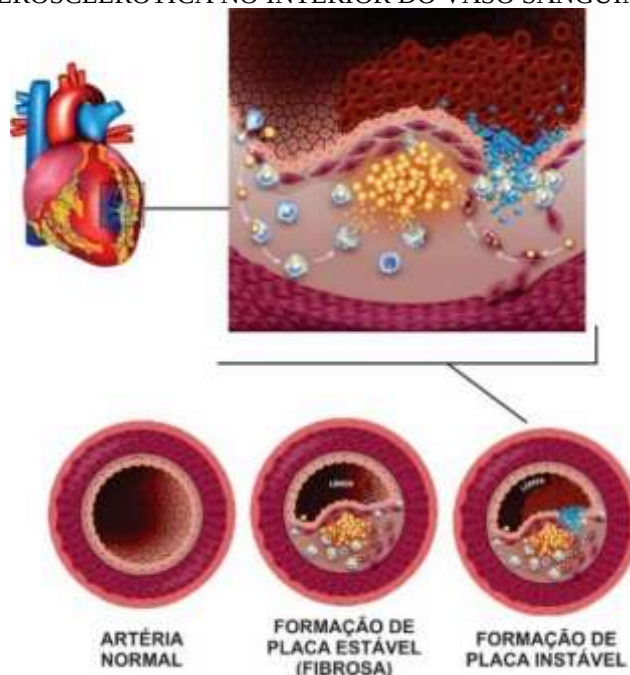
imunogênicas e promovendo o surgimento de moléculas de adesão leucocitária na superfície do endotélio. Dentre as principais, estão a molécula de adesão intercelular1 (ICAM-1) ou CD-54, molécula de adesão celular plaquetária 1 (PCAM-1) ou CD-31, proteína de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) ou CD-106, proteína quimioatraente de monócitos 1 (CP-1) ou CCL2, entre outros. Estas moléculas são proteínas quimiotáticas que produzem citocinas inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon-gama (IFN- γ), que expressam receptores “sequestradores” das LDL-ox, como SR-A, CD36 e CD69 (GALKINA; LEY, 2009; WICK; KNOFLACH; XU, 2004). Após a adesão de monócitos e linfócitos no lúmen da parede arterial, mais precisamente no espaço subendotelial, os monócitos se diferenciam em macrófagos que procuram captar as LDL-ox transformando-se em células espumosas responsáveis pela formação das estrias gordurosas, as quais representam as lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose. Portanto, os macrófagos ativados são responsáveis pela progressão da placa aterosclerótica mediante a secreção de citocinas que amplificam a inflamação e de enzimas proteolíticas capazes de degradar colágeno e outros componentes teciduais. Os linfócitos T, mesmo em menor número, também participam do processo aterosclerótico, uma vez que se diferenciam e também produzem citocinas que modulam o processo inflamatório local (GALKINA; LEY, 2009; HANSON, 2005).

Alguns mediadores de inflamação estimulam a migração e proliferação das células musculares lisas da camada média arterial para a camada íntima, passando a produzir, além das citocinas e fatores de crescimento, matriz extracelular, a qual formará parte da capa fibrosa da placa aterosclerótica (Figura 1). Sendo assim, a placa aterosclerótica desenvolvida é constituída por elementos celulares, componentes da matriz extracelular e núcleo lipídico e necrótico. As formações das placas podem ser estáveis e instáveis. No primeiro caso, o colágeno está organizado em capa fibrosa espessa com núcleo lipídico e necrótico em menores proporções e as células inflamatórias são escassas. As formações instáveis apresentam atividade inflamatória intensa, especialmente nas suas bordas laterais, com grande atividade proteolítica, núcleo lipídico e necrótico proeminente e capa fibrótica tênue. A ruptura desta capa expõe o material lipídico, o qual é altamente trombogênico, levando à formação de um coágulo. Este processo diminui ou interrompe a passagem do fluxo sanguíneo (CUCHEL *et al.*, 2007).

O processo aterogênico ou a aterosclerose é uma doença inflamatória crônica em resposta à agressão endotelial que acomete artérias de médio e grande calibre. Possui características de progressão lenta, irreversível e multifatorial. No entanto, o depósito de lipoproteínas na parede das artérias ocorre de maneira proporcional à concentração plasmática

desses lipídeos. A aterosclerose é a causa principal de DCV, como IAM, AVC, aneurisma da aorta e doença vascular periférica (GONÇALVES *et al.*, 2018; ROSS, 1999).

FIGURA 1 – PLACA ATEROSCLERÓTICA NO INTERIOR DO VASO SANGUÍNEO



Fonte: GUNITA. **Thrombus formation**. Disponível em: https://es.123rf.com/photo_38473543_stock-vector-blood-clot-formation-coronary-artery-disease-anatomy-of-healthy-artery-unhealthy-arteries-human-hear.html. Acesso em: 12 mar. 2020.

Nota: Evolução da placa aterosclerótica com a formação de trombos a partir da artéria saudável ocasionando dano ao músculo cardíaco.

Nos estudos de Nocon *et al.* (2008), Santos *et al.* (2011) e Rodrigues *et al.* (2009), destacaram-se como fatores desencadeantes da DA: hipercolesterolemia, lesão endotelial, inflamação e estresse oxidativo. Outros fatores podem potencializar a velocidade do seu desenvolvimento, como a genética individual do paciente, hereditariedade, condições crônicas como, HAS e DM, além do estresse emocional, depressão, ansiedade e também o estilo de vida (sedentarismo, fumo, obesidade, dieta com excesso de gordura saturada, ingestão alcoólica, entre outros).

Ainda, em adição às DCV e dislipidemias, há uma forte relação entre os níveis altos de COL, bem como de TRI e a hepatite não alcoólica, uma vez que acarreta um processo inflamatório nas células parenquimais do fígado ocasionando lesão ou disfunção hepática. Os medicamentos sintéticos disponíveis para o tratamento de doenças hepáticas são de custo expressivo e podem causar efeitos adversos com o uso prolongado, para tanto, os efeitos hepatoprotetores de fármacos de origem fitoterápica têm sido investigados na possibilidade para tratamento ou como coadjuvante terapêutico (MARMITT *et al.*, 2016).

Outros achados que corroboram para a estreita relação entre dislipidemias e desordens hepáticas foram relatados no estudo de Musial *et al.* (2013), onde em 80% dos casos, as pessoas obesas foram as que apresentaram a maior tendência a desencadear o aparecimento de esteatose hepática, pelo aumento dos níveis lipídicos plasmáticos, e praticamente todos os obesos com DM do tipo II apresentaram algum tipo de alteração hepática. O início da patologia pode ser assintomático, porém as anormalidades do fígado podem levar a várias complicações, que além da esteatose, podem resultar em fibrose, cirrose, hipertensão portal e carcinoma hepatocelular (DIEBERGER *et al.*, 2018).

Para tanto, na investigação de desordens hepáticas, o exame físico do paciente deve avaliar os níveis da pressão arterial sistêmica, das medidas antropométricas e da circunferência abdominal. Associa-se que quanto maior a quantidade de gordura no abdômen maior será o achado de depósito de gordura no fígado, ou seja, acúmulo excessivo de lipídeos nos hepatócitos. Tal alteração caracteriza a esteatose, quadro este que pode permanecer estável por muitos anos, regredir quando as causas forem controladas ou ainda, evoluir para inflamação (esteato-hepatite), morte celular, fibrose (cicatrização), cirrose e carcinoma hepatocelular (câncer do fígado). Exames complementares são importantes para o diagnóstico, como os laboratoriais (enzimas hepáticas, colesterol total e frações, triglicérides, glicemia e insulina), os de imagem (ultrassonografia de abdômen, tomografia computadorizada, ressonância magnética e elastografia hepática) e biópsia do fígado, sendo este, o exame mais adequado para estabelecer o diagnóstico seguro de esteatose hepática (COTRIM, 2021).

Em geral, o diagnóstico precoce das dislipidemias, o acompanhamento do perfil lipídico e o controle de enzimas hepáticas por meio de exames laboratoriais de rotina do paciente, têm o intuito de possibilitar um melhor esquema terapêutico, já que a aterosclerose e outras DCV são passíveis de controle, bem como as disfunções hepáticas associadas (BORGO *et al.*, 2019; DIEBERGER *et al.*, 2018).

A SBC e a SBPC/ML (2017) recomendam os valores do perfil lipídico nas condições de jejum de 12 horas e não-jejum, uma vez que este último tende a facilitar a realização dos exames e a utilização dos dispositivos “*point of care* em métodos validados” que dosam COL e suas frações no sangue capilar. Resultados muito elevados devem ser confirmados em condições de jejum. Os resultados para o COL e o HDL, em ambas as condições de coleta sanguínea, devem ser considerados os mesmos, ou seja, menor que 190 e maior que 40 mg.dL⁻¹, respectivamente. Já os valores para TRI, variam para as condições de jejum e não

jejum, em menor que 150 e 175 mg.dL⁻¹. Os valores de referência para o perfil lipídico podem ser observados na Tabela 1.

TABELA 1 – VALORES DE REFERÊNCIA PARA EXAMES LABORATORIAIS DO PERFIL LIPÍDICO

	JEJUM	NÃO-JEJUM
Colesterol total (mg.dL⁻¹)	< 190	< 190
HDL Colesterol (mg.dL⁻¹)	> 40	> 40
Triglicerídeos (mg.dL⁻¹)	< 150	< 175

Fonte: Adaptado de SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e prevenção de aterosclerose. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, n. 109, 2 supl. 1, p. 1-76, 2017.

Os valores de LDL atualmente devem ser considerados conforme estratificação de risco cardiovascular, com meta para sua redução o uso de doses altas de medicamentos convencionais, como por exemplo, as estatinas. Sendo as categorias: de muito alto risco, alto risco, risco intermediário e baixo risco; com suas respectivas metas atuais para LDL: menor que 50, 70, 100 e 130 mg.dL⁻¹. Os critérios de inclusão levam em consideração uma ferramenta chamada Escore Global para uso do medicamento. A meta de LDL para definição da dose incluem de modo geral, DA assintomática, subclínica, DM tipo I ou II, fatores de risco e índices de LDL altos, de 70 a 189 mg.dL⁻¹ ou maiores ou igual a 190 mg.dL⁻¹ e ainda, situações de obstrução arterial e aneurisma da aorta abdominal (BRASIL, 2018; SBC, 2017).

Segundo o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas - Dislipidemia: prevenção de eventos cardiovasculares e pancreatite (BRASIL, 2019), o tratamento das dislipidemias também tem por objetivo promover a prevenção de pancreatite aguda associada à hipertrigliceridemia grave (com resultados maiores que 500 mg.dL⁻¹). Tal achado é observado na população, porém a patogênese dessa inflamação não está muito clara. Tradicionalmente, o tratamento buscava atingir níveis de LDL abaixo 100 mg.dL⁻¹ ou de TRI abaixo 150 mg.dL⁻¹ e a prioridade passou também a ser a redução do risco cardiovascular do paciente, critério de inclusão do mesmo ao tratamento.

A eficácia no tratamento das dislipidemias depende da ação conjunta de medidas não farmacológicas e farmacológicas, como mencionado anteriormente. No entanto, na farmacoterapia, muitas vezes a meta do tratamento não é alcançada com o uso de apenas um medicamento. As opções se baseiam em diversas classes de fármacos, principalmente aqueles que agem como os inibidores seletivos da absorção de COL e inibidores da 3-hidroxi 3-metilglutaril coenzima A (HMgCoA) redutase que incluem as estatinas, resinas sequestrantes

dos ácidos biliares, niacina, fibratos, ácido nicotínico e ezetimibe. O uso de estatinas tem sido a primeira escolha de tratamento (SBC, 2017).

Fazem parte deste grupo: atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina, rosuvastatina, pitavastatina e sinvastatina. São fármacos que causam a inibição parcial e reversível da enzima HMgCoA redutase, uma vez que inibe a conversão de HMgCoA em mevalonato com consequente redução da síntese do COL (mecanismo responsável por cerca de 60 a 70% do COL circulante). De forma geral, reduzem os níveis de COL, LDL, TRI em até 25, 55 e 15%, respectivamente e podem aumentar em até 10% os níveis de HDL. A utilização das estatinas tende também a diminuir os eventos cardíacos independentemente de outros fatores. Entretanto, mesmo sendo bem tolerada pelo organismo, apresenta alguns efeitos adversos, dentre os mais comuns estão os distúrbios gastrointestinais, dispepsia, dores de cabeça, mialgia, distúrbios no sistema nervoso central (SNC) e desordens do sono. A hepatotoxicidade e anormalidades musculares são os efeitos de maior interesse clínico, onde pode ocorrer aumento de até três vezes o limite considerado normal de enzimas hepáticas e creatina fosfoquinase (CPK) com o uso das estatinas (FIEGENBAUM; HUTZ, 2006).

Os fibratos são comercializados na forma de bezafibrato, etofibrato, fenofibrato, ciprofibrato, clofibrato e genfibrosil. A redução observada para os níveis de COL e TRI geralmente são de, 10 a 25% e de 20 a 40%, respectivamente. Os níveis de HDL podem aumentar de 10 a 25%. Seu mecanismo de ação está relacionado à sua ligação a fatores de transcrição do *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPARs) e modulação de genes envolvidos no metabolismo lipídico resultando na expressão aumentada de lipase lipoproteica e reduzida de Apo C-III, resultando na hidrólise de triglicerídeos. Outra ação é encontrada na redução de Apo B e VLDL (FIEGENBAUM; HUTZ, 2006). Os efeitos adversos para os fibratos são vários e incluem desordens hematológicas (anemia, leucopenia e trombocitopenia), angina, arritmias cardíacas, pancreatite, cálculos biliares, toxicidade renal e hepática, sintomas gripais, exacerbação de úlcera péptica, coceiras generalizadas e alergias de pele (SBC, 2017).

As resinas colestiramina e colestipol se ligam aos ácidos biliares no lúmen intestinal, impedindo a reabsorção do COL. Tal efeito está associado à expressão aumentada da enzima colesterol 7- α -hidroxilase (CYP7), importante na síntese de ácidos biliares. Atuam na redução de até 30% do COL. Já a niacina está relacionada à diminuição da liberação de ácidos graxos dos adipócitos, levando a diminuição dos níveis de TRI em até 45% e de COL em até 20%. Os níveis de HDL aumentam concomitantemente. O probucol é um fármaco antioxidante que tem ação na redução dos níveis de LDL e HDL. Este último ocorre pelo

aumento da atividade da proteína transferidora de ésteres de COL (CETP). De forma geral, há um grande interesse no estudo da Apo E na ação deste medicamento (FIEGENBAUM; HUTZ, 2006).

O ezetimibe inibe a absorção intestinal do COL por bloqueio da proteína *Niemann-Pieck C1-like protein 1* (NPC1P1). Reduz o LDL em aproximadamente 20%. A associação com estatina proporciona uma redução adicional de 20% no LDL em relação ao efeito isolado do fármaco. Portanto, a prescrição de ezetimibe em associação a qualquer estatina em dose mínima equivale à prescrição daquela estatina em dose máxima. Apresenta como efeitos colaterais: dores nas costas, articulações, abdominal, muscular e torácica, bem como cefaleia, infecções respiratórias, diarreia, tosse, faringite, cansaço e tontura (BRASIL, 2018).

O ácido nicotínico, também chamado niacina ou vitamina B3, promove a inibição da lipase tecidual (hormônio-sensível) nos adipócitos, reduzindo o fluxo de ácidos graxos livres para o fígado e assim, reduzindo a síntese de TRI. Atua na estimulação da síntese hepática de Apo A1 (e, diretamente de HDL) e na promoção do catabolismo hepático da Apo B100 (consequentemente no LDL). Pode aumentar o HDL em 15 a 35% e é o único que reduz a lipase lipoproteica. Reduz o LDL em torno de 15% e o TRI em 20 a 50%, mudando o perfil das LDL menores e densas, tornando-as menos aterogênica. Os efeitos colaterais mais comuns são rubor facial (até 30%) e distúrbios gastrintestinais, como náuseas e dispepsia, além de acarretar o aumento da glicemia e da uricemia (BRASIL, 2019; SANTOS, 2005).

Sabe-se que muitos genes estão envolvidos no metabolismo dos lipídeos. Dentre ele estão os genes que codificam proteínas envolvidas na metabolização e/ou transporte dos fármacos, com influência direta na sua farmacocinética, os genes que codificam proteínas envolvidas no mecanismo de ação e/ou nas rotas metabólicas de ação do fármaco, influenciando na farmacodinâmica do mesmo e os genes que codificam proteínas envolvidas no desenvolvimento direto da doença (FIEGENBAUM; HUTZ, 2006).

Um dos genes mais estudados é o que codifica a Apo E. Esta é encontrada em várias partículas lipoproteicas, como os quilomícrons, VLDL e HDL, cuja ação é atuar como ligante para vários receptores [LDL-R e receptor das LDL remanescentes (LRP)]. Outro gene de grande importância é o da proteína transferidora de ésteres de COL (CETP) e que tem como ação, a troca de lipídeos entre partículas lipoproteicas, transferindo ésteres de COL das HDLs para outras lipoproteínas e, na sequência, serem recaptadas pelo fígado. A CETP irá aumentar ésteres de LDL e VLDL e assim, aumentar a aterogenecidade destas lipoproteínas. Atualmente, vem sendo associado a riscos diferenciados de eventos cardiovasculares e variabilidade de aumento dos níveis de HDL. Outros genes envolvidos na síntese e recaptação

de COL, TRI, ácidos graxos e da enzima HMgCoA redutase fazem parte da rota dos genes regulados pela SCAP-SREBF, ou seja, de síntese de COL e seu controle via fatores de transcrição denominados *cleavage-activating protein* (SCAP) e *sterol regulatory element binding factors* (SREBFs). A HMgCoA redutase é um importante alvo para efeito das estatinas (BARBALHO, 2015).

Quanto aos genes que influenciam na metabolização de fármacos, estes estão associados em maior parte ao citocromo P450 e aos seus genótipos Cyp3as e Cyp2c9. Sendo este último responsável por 50% de todo o processo metabólico (FIEGENBAUM; HUTZ, 2006).

Em relação às proteínas transportadoras de fármacos, estas são classificadas em dois grupos, os transportadores de efluxo, que agem exportando fármacos e substâncias do interior da célula para o meio extracelular e os transportadores de captação, que facilitam o transporte do fármaco para o interior das células. Fazem parte da classe de transportadores, a glicoproteína P ou gene de resistência multidrogas (MDR-1), a bomba de efluxo de sais biliares, a proteína associada ao MDR (MDR-P) e a proteína de resistência do câncer de mama (BCRP). O gene ABCA1 (transportador de cassete de ligação ao ATP), também conhecido como CERP (proteína reguladora do efluxo de COL), é fundamental na formação e manutenção do HDL (BOMBO, 2014).

Quanto à avaliação e o acompanhamento da função hepática, a determinação laboratorial das enzimas hepáticas são os melhores parâmetros plasmáticos a buscar por distúrbios do fígado relacionadas às dislipidemias. Dentre as enzimas estão, as transaminases aspartato aminotransferase (AST) e alanino aminotransferase (ALT), a fosfatase alcalina (FAL) e a gama glutamil transferase (GGT). Os valores de referência encontrados na literatura variam com a metodologia utilizada para a sua determinação, além da idade e gênero. Os valores de ALT aumentados indicam lesão especificamente nos hepatócitos. Enquanto que a AST pode refletir lesão em outros órgãos também, pois além do fígado, está presente no coração, rins, pâncreas, músculo esquelético e coração. Na maioria das doenças hepáticas, a razão AST/ALT é < 1 , mas na doença hepática relacionada com o consumo de álcool, a razão é caracteristicamente > 2 , pois há deficiência de piridoxal-5'-fosfato (Vitamina B6 ativa) nos pacientes etilistas. Sendo este metabólito necessário para a síntese da ALT, porém menos essencial para a síntese da AST (TELLI *et al.*, 2016).

Ressalta-se, ainda, que a eficácia do tratamento das dislipidemias e de algumas distúrbios hepáticas requer mudanças nos hábitos alimentares, bem como do estilo de vida como a interrupção do tabagismo, a prática de exercícios físicos, o controle laboratorial dos

parâmetros do perfil lipídico e, quando necessário ou concomitantemente, o uso de medicamentos (BRASIL, 2019; SBC, 2017).

2.3 A FITOTERAPIA E NOVAS PERSPECTIVAS NO TRATAMENTO DE DISLIPIDEMIAS

Ao longo da história, evidências têm demonstrado que muitos compostos de origem vegetal (fitofármacos) têm sido empregados, popularmente e cientificamente, para a melhora de diversas patologias, principalmente as que apresentam ação farmacológica conhecida, sendo benéficas ao tratamento e prevenção de enfermidades (MINATTI, 2010).

Soares *et al.* (2005) demonstravam o interesse no estudo de níveis lipídicos em ratos Wistar após o tratamento com alguns fitofármacos de uso popular como, *Morus alba* L., *Salvia rosmarinus* L., *Zingiber officinale* R. conhecidos como amoreira branca, alecrim e gengibre, respectivamente, onde obtiveram com o uso deste último, variações significativas nas concentrações séricas de COL e TRI. Minatti (2010) avaliou a interferência nas progressões ateroscleróticas de camundongos com o tratamento de *Camelliasinensis* L. Kuntze (chá verde). Panahi *et al.* (2018) salientaram por meio de uma revisão sistemática, os efeitos farmacológicos da CUR como potencial candidata para o tratamento da hiperlipidemia. No estudo de Tu *et al.* (2013), foram administrados em ratos Wistar a associação de CUR e PIP, a fim de aumentar a atividade e expressão genética de Apo AI, CYP7A1, LCAT e LDL-R em comparação com o tratamento apenas com a CUR.

Muitas são as pesquisas sobre o metabolismo lipídico que envolvem a oportunidade do uso de determinados fármacos, incluindo fitofármacos, para que promovam eficácia terapêutica com maior absorção e biodisponibilidade no organismo, uso de doses reduzidas e apresentando mínimos efeitos adversos e melhor custo-benefício à saúde. Neste contexto, este trabalho visa demonstrar a ação dos fitofármacos CUR e/ou PIP, em um sistema de liberação prolongada, para uma terapia auxiliar no controle e/ou prevenção das dislipidemias.

2.3.1 Aspectos Biofarmacêuticos da Curcumina

A CUR é extraída dos rizomas da planta *Curcuma longa* L., de onde tem sido isolada desde o século 19. Possui característica de composto fenólico antioxidante e de coloração amarelada (Figura 2).

FIGURA 2 – ESPÉCIE VEGETAL (A.) E PRODUTO DO RIZOMA DESIDRATADO E MOÍDO (B.) DA *Curcuma longa* L.



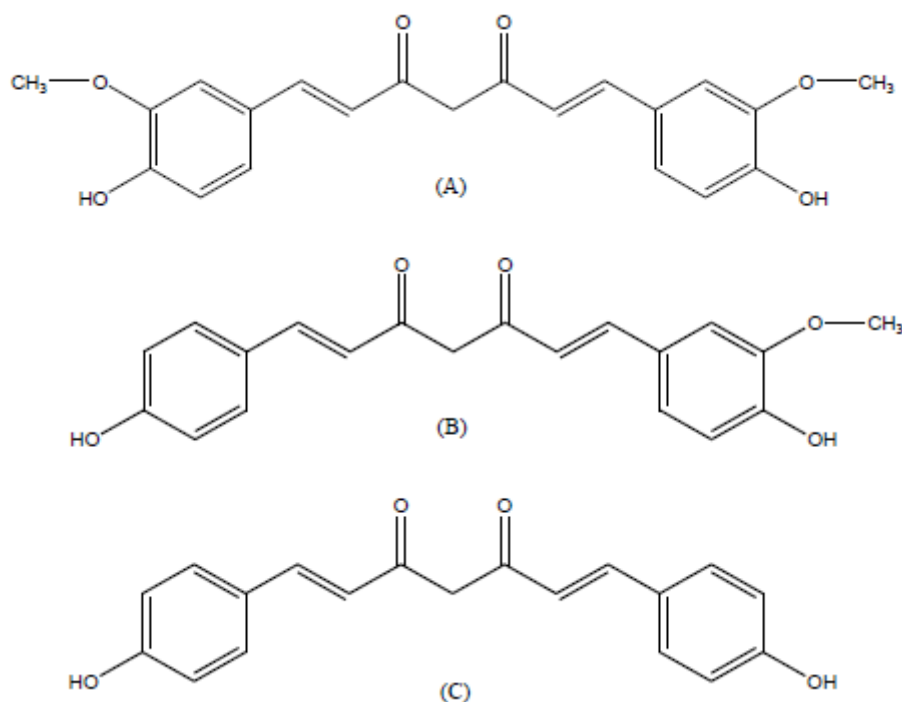
Fonte: Adaptado de KALEL, A. **Cúrcuma – Benefícios dos Curcuminoides para a Saúde**. 2018. Disponível em: <https://nutrinDoideias.com/plantas-medicinais/curcuma-curcumina>. Acesso em: 25 mar. 2021.

No Brasil, *C. longa* é mais comumente conhecida como açafrão-da-terra e usada na culinária como tempero e corante devido à sua intensa coloração, e ainda, associada a seus efeitos terapêuticos e dietéticos. No entanto, o emprego desta planta como remédio caseiro surgiu há séculos, na medicina indiana (NAKSURIYA *et al.*, 2014).

O rizoma desidratado e moído de *C. longa* resulta em um pó dourado denominado turmerico e que em sua composição possuem em maior quantidade, os curcuminoides. Sendo esses compostos fenólicos, a curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina (Figura 3) com características insolúveis em água e éter, e ainda, solúveis em etanol, acetona, dimetilsulfóxido e em outros solventes orgânicos (SANTIAGO *et al.*, 2015).

Foi demonstrado que a CUR possui uma vasta gama de atividades farmacológicas e interessante potencial terapêutico incluindo ação anti-inflamatória, antitumoral, antioxidante, cicatrizante e antimalárico (GUPTA *et al.*, 2012). As ações também foram observadas nas doenças crônicas onde a inflamação desempenha papel importante, como nas doenças neurodegenerativas (Alzheimer e Parkinson), DCV, DM, alergia, asma, bronquite, doença inflamatória intestinal, artrite reumatoide, isquemia renal, psoríase, esclerodermia e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (ANAND *et al.*, 2008).

FIGURA 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DE CURCUMINOIDES EXTRAÍDOS DE *Curcuma longa*: (A) CURCUMINA, (B) DESMETOXYCURMINA E (C) BISDESMETOXYCURCUMINA

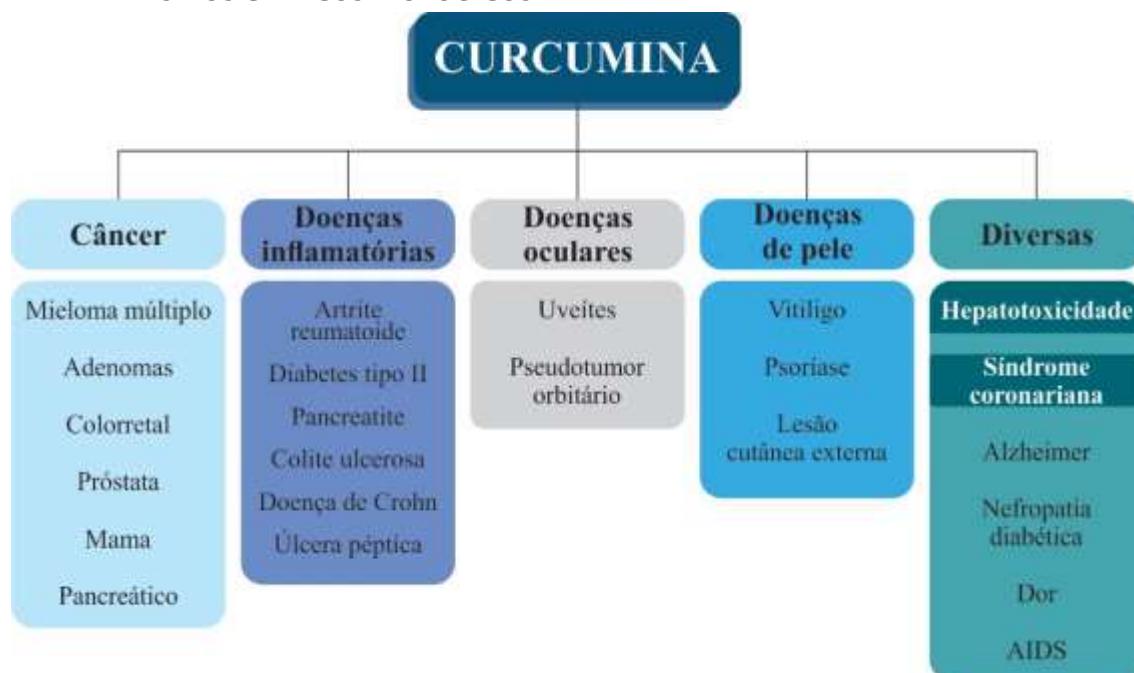


Fonte: NAKSURIYA *et al.* Curcumin nanoformulations: A review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment. **Biomaterials**, v. 35, n. 10, p. 3365-3383, 2014.

Segundo Gupta *et al.* (2012), estudos demonstraram que a CUR é segura e eficaz para o tratamento de uma série de disfunções e quadros patológicos (Figura 4).

A CUR pode ser obtida comercialmente como uma mistura de três componentes: curcumina (~77%), desmetoxicurcumina (~17%) e bisdesmetoxicurcumina (~3%) (SANTIAGO *et al.*, 2015). A CUR apresenta uma maior atividade cardioprotetora, neuroprotetora e anti-diabética quando comparada com os outros curcuminoides devido aos grupos metoxi nos anéis fenil (NAKSURIYA *et al.*, 2014). Pode interagir com vários alvos moleculares, como fatores de transcrição, receptores, citocinas, enzimas e fatores de crescimento, de modo a afetar numerosas cascatas moleculares bioquímicas (NASCIMENTO *et al.*, 2012).

FIGURA 4 – DOENÇAS HUMANAS QUE DEMONSTRARAM RESPOSTA FRENTE À CURCUMINA EM ENSAIOS CLÍNICOS BIOLÓGICOS



Fonte: Adaptado de GUPTA, S. C. et al. Discovery of curcumin a component of Golden spice, and its miraculous biological activities. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 39, n. 3, p. 283-299, 2012.

Os mecanismos que envolvem o seu efeito no metabolismo dos lipídeos ainda não foram bem elucidados, mesmo apresentando inúmeros estudos a respeito dos efeitos na redução lipídica (PANAHI *et al.*, 2018; YING *et al.*, 2013). Entretanto, a maioria das evidências sugere que tal efeito resulta da habilidade em que a CUR reduz o nível de peroxidases lipídicas na circulação, com redução de COL e aumento da circulação dos níveis de HDL (FAN *et al.*, 2017; PANAHI *et al.*, 2018). Outras pesquisas demonstraram que a CUR pode dificultar a absorção do COL proveniente da dieta, provavelmente pela inibição direta da enzima HMGCoA redutase (RANGEL-HUERTA *et al.*, 2015), e ainda, que existe uma estreita relação na prevenção do aparecimento e progressão da aterosclerose, por meio da redução do estresse oxidativo (ZINGG *et al.*, 2013). De acordo com ensaios clínicos, uma dose de 500 mg.dia⁻¹ de CUR presente no extrato de cúrcuma, reduziram os níveis de LDL e COL em 8,6 e 17%, respectivamente (ALWI *et al.*, 2008).

O efeito hepatoprotetor da CUR foi evidenciado em estudos na literatura como o de Tu *et al.* (2014), os quais obtiveram resultados que atenuaram os níveis de hepatite induzida por concanavalina A em animais, também nos trabalhos de Banerjee *et al.* (2012), que observaram a hepatotoxicidade induzida por nicotina atenuada em ratazanas e por fim, El-Amir *et al.* (2012), relataram a redução do número e do tamanho de focos pré-neoplásicos induzidos por N-nitrosodietilamina e tetracloreto de carbono no fígado de ratos.

Estruturalmente a CUR exhibe um tautomerismo ceto-enólico, com predominância da forma de cetona em pH ácido e neutro, sendo que em pH entre 3 e 7, age como um potente doador de prótons. Em pH acima de 8 a forma enólica predomina, atuando como doador de elétrons, um mecanismo típico da atividade dos antioxidantes fenólicos (SHARMA; GESCHER; STEWARD, 2005).

Foi verificado que os grupos fenóis e metoxi presentes na estrutura da CUR são os responsáveis pelas suas várias atividades biológicas, principalmente como antioxidante e antitumoral, em diversas linhagens celulares. Sendo assim, o estudo das diversas atividades biológicas e a investigação de seu mecanismo de ação tem despertado muito interesse em vários pesquisadores. A atividade antioxidante está associada com sua habilidade de reduzir os níveis intracelulares da enzima envolvida no sistema de defesa ao estresse oxidativo das células, a glutathione reduzida e a atividade antitumoral estão relacionadas com a sua capacidade de induzir apoptose em células cancerígenas (JARDIM, 2013).

A CUR sofre rápida fotodegradação (AMANOLAH *et al.*, 2017). Apresenta estabilidade em pH ácido, mas possui dois grupos de cetona em sua estrutura química que causam a degradação rápida em soluções com pH alcalino (TONNESEN; KARLSEN, 1985a). Os produtos mais abundantes de sua decomposição em formas farmacêuticas líquidas e sólidas são ácido vanílico, a vanilina e o ácido ferúlico (TONNESEN; KARLSEN, 1985b). No estudo de Wang *et al.* (1997), demonstraram que os níveis dos produtos de degradação da CUR aumentaram em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 a 37°C e que num período de 30 minutos, 90% da CUR foi degradada. Atualmente, dentre os produtos de degradação da CUR citados anteriormente e que representam a degradação por hidrólise alcalina, estão o feruloaldeído, feruloilmetano e trans-6-(4'-hidroxi-3-metoxifenil)-2,4-dioxo-5-hexenal. Já a biciclopentadiona representa o produto de auto-oxidação da CUR (ZHU *et al.*, 2017).

Apresenta ponto de fusão em 183°C e é solúvel em etanol, acetona, dimetilsulfóxido e outros solventes orgânicos, sendo insolúvel em água e éter (SANTIAGO *et al.*, 2015). Um dos maiores problemas referentes à utilização clínica da CUR, além de sua fotossensibilidade e baixa estabilidade, é a baixa biodisponibilidade decorrente de sua limitada solubilidade em água, devido à sua característica lipofílica, tornando-a pouco absorvível, além da rapidez na metabolização e eliminação do organismo pela presença de sítios lábeis ao metabolismo, que faz com que a mesma sofra metabolismo hepático de primeira passagem antes de alcançar a circulação sistêmica, além do metabolismo intestinal, o que reduz drasticamente sua fração utilizável nos órgãos-alvo (OZAWA *et al.*, 2017; SANTIAGO *et al.*, 2015).

Para melhorar estas propriedades desfavoráveis, uma alternativa é o desenvolvimento de partículas poliméricas e o emprego de adjuvantes às formulações, as quais permitem uma maior penetração em membranas plasmáticas, redução na dose posológica e de uma possível toxicidade, tornando-se uma excelente opção de liberação modificada do fármaco (JARDIM, 2013).

Dentre alguns estudos referenciados na literatura com o objetivo de buscar o aumento da biodisponibilidade da CUR no organismo, estão os de Paolino *et al.* (2016), onde foram avaliados os efeitos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* da mucoadesão e bioadesão de micropartículas de CUR e Eudragit[®] Retard obtidas por coevaporação; o de Massimino (2016), que desenvolveu nanopartículas de CUR recobertas com Eudragit[®] S100, utilizando etanol e clorofórmio como solventes, onde a partir do método de precipitação e emulsificação houve aumento da solubilidade de 37 a 56 vezes em relação à CUR comercial; também Silva; Fideles e Fook (2015) obtiveram esferas de quitosana com CUR pelo método de gelificação ionotrópica e ainda, Silva (2014) desenvolveu com sucesso micropartículas de policaprolactona (PCL) contendo CUR, recobertas com gelatina reticulada por transglutaminase usando a técnica de emulsificação e evaporação do solvente.

2.3.2 Aspectos Biofarmacêuticos da Piperina

A PIP é caracterizada por ser um composto alcaloide extraído da oleoresina dos grãos dos frutos das espécies *Piper nigrum* L. e *Piper longum* L. (Figura 5). No Brasil, é conhecida como pimenta-preta ou pimenta-do-reino. A *Piper nigrum* L. é uma planta trepadeira originária da Índia, pertencente à família da Piperaceae, sendo inicialmente utilizada na medicina. Seu principal uso é como condimento de sabor picante e amargo na culinária, possuindo grande circulação comercial representando uma fonte econômica para muitas regiões de plantio (OLIVEIRA *et al.*, 2014; AHMAD *et al.*, 2012).

A planta é rica em Vitaminas A e C, ferro e potássio. Outros compostos metabólicos também são evidenciados, como amidas/alcaloides, propenilfenóis, lignanas, neolignanas, terpenos, flavonas, cumarina, pironas, flavonoides, neoglignanano, sarmentina, sarmentosina e outros (AHMAD *et al.*, 2012).

FIGURA 5 – ESPÉCIES VEGETAIS E FRUTOS DA *Piper nigrum* L. e *Piper longum* L.



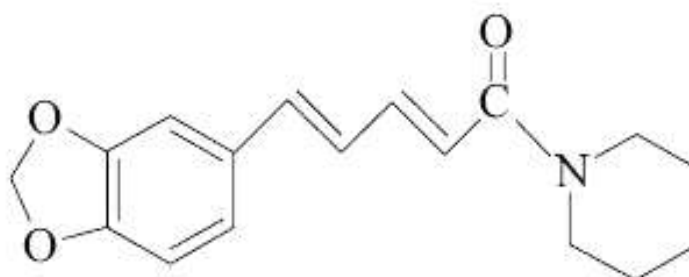
Fonte: Adaptado de PLANTS OF THE WORLD ONLINE. Disponível em:
<http://plantsoftheworldonline.org/>. Acesso em: 25 mar. 2020.

Legenda: *Piper nigrum* L. - A.1: espécie vegetal; A.2: frutos; *Piper longum* L. – B.1: espécie vegetal; B.2: frutos

A PIP é classificada quimicamente como uma amida (1-piperoilpiperidina) e é o composto encontrado em maior quantidade na planta (Figura 6). Sofre uma biotransformação e se desdobra em ácido pipérico e piperidina.(ROGER, 1998).

A PIP é uma substância cristalina incolor ou esbranquiçada, com ponto de fusão entre 128 e 132°C e solúvel em gasolina, clorofórmio, etanol, ácido acético e benzeno, levemente solúvel em éter etílico e insolúvel em água (ALMEIDA, 2017; ROGER, 1998).

FIGURA 6 – ESTRUTURA QUÍMICA DE PIPERINA EXTRAÍDOS DE *Piper nigrum* L.



Vários são os ensaios químicos e biológicos da PIP demonstrando suas inúmeras propriedades farmacológicas, como ação anti-inflamatória, imunomoduladora, antipirética, analgésica, anticonvulsivante, antioxidante, antitumoral, antifúngica, bactericida, uso na cicatrização de feridas, aumento na taxa metabólica para perda de peso, antiespasmódica, antidiarreica, antiparasitária (BONTEMPO, 2007), antidepressiva, bloqueio da formação de novas células adiposas com consequente redução dos níveis lipídicos, aumento da digestão de

alimentos, efeito termogênico, ativação da proliferação dos melanócitos celulares (ATAL; BEDI, 2010) e ainda, pode ser encontrado em formulações na indústria cosmética e como inseticidas no controle de pragas. Neste último, utiliza-se a propriedade de toxicidade do fármaco (AHMAD *et al.*, 2012).

Ying *et al.* (2013) evidenciaram a redução da expressão gênica de Interleucina-1 β (IL-1 β) de condrócitos, com consequente redução no processo inflamatório de pacientes com osteoartrites, utilizando o extrato fenólico de PIP. Sua atividade antifúngica foi avaliada no estudo de Silva Neta *et al.* (2019) e demonstrou 66,61% de inibição contra as cepas de *Candida* sp.

O estudo de Thirumalai *et al.* (2014) demonstrou por meio do tratamento com várias dosagens de pimenta, em ratos alimentados com dieta altamente lipídica, a redução de todos os parâmetros lipídicos, com exceção do HDL. O trabalho de Wang *et al.* (2016) evidenciou o papel da PIP no metabolismo lipídico, o qual no transporte reverso hepático, induziu o aumento do efluxo de COL para diminuir o COL em macrófagos, pelo aumento da regulação de ABCA1 resultando na promoção de um efeito anti-aterosclerótico.

Além da pungência, em quantidades exacerbadas, sabe-se que a PIP pode irritar ou agravar quadros inflamatórios em pacientes com gastrites, úlceras gástricas, pancreatites, hemorroidas e HAS (ROGER, 1998). Com intuito de minimizar os efeitos agravantes características da PIP, Biscaia (2018) promoveu a sua encapsulação em micropartículas poliméricas de Eudragit[®] S100 e RS30D obtidas por *spray drying* e administrou as formulações em ratos tratados com dieta de cafeteria, demonstrando também seu efeito significativo no tratamento da obesidade.

Notavelmente, outra propriedade vem apresentando evidência em trabalhos científicos, onde a PIP foi utilizada como uma substância coadjuvante em formulações para aumentar a biodisponibilidade de outros fármacos. Tal ação foi obtida por meio do bloqueio da via metabólica farmacológica, uma vez que sendo um alcaloide lipofílico, é capaz de inibir a glucuronidação hepática e intestinal (GUPTA *et al.*, 2012). As interações entre dois fármacos podem ser explicadas pelos mecanismos farmacodinâmicos e farmacocinéticos, sendo que na primeira situação, a interação ocorre entre molécula-alvo de duas ou mais substâncias com efeitos similares ou opostos, sem afetar os processos farmacocinéticos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção. Nas interações farmacocinéticas do metabolismo, o sistema microssomal hepático é a via responsável pela biodisponibilidade de fármacos. Para tanto, uma ferramenta do procedimento operacional muito importante vem sendo utilizada, o *docking* ou ancoramento molecular, o qual visa estabelecer as

características de interação entre um ligante e um alvo biológico, sendo os resultados plotados em uma base de dados computacional. A PIP é uma alternativa para o desenvolvimento de inibidores das enzimas do citocromo P450, uma vez que interage com grande afinidade com a enzima CYP3A4 que está envolvida em mais de 50% do metabolismo de outros fármacos (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Estudos como o de Shoba *et al.* (1998) avaliaram o efeito sobre a biodisponibilidade da CUR quando coadministrada com PIP em ratos e voluntários humanos saudáveis. No experimento realizado com ratos, concentrações séricas máximas de CUR foram alcançadas após 4 horas da administração de 2 g.kg⁻¹ de CUR. Com a coadministração de 20 mg.kg⁻¹ de PIP, as concentrações plasmáticas atingiram um valor máximo em 1 hora após a administração e o aumento da biodisponibilidade da CUR foi superior a 100%. No ensaio clínico com voluntários humanos seguindo as mesmas dosagens, as concentrações séricas de CUR encontradas quando a mesma foi administrada sozinha foram muito baixas ou mesmo indetectáveis. Com a coadministração da PIP, a concentração de CUR encontrada foi elevada e aumentou potencialmente a sua biodisponibilidade.

Outros trabalhos foram realizados utilizando a associação dos fármacos puros a outras finalidades, como os de Kaur e Meena (2013) e de Tu *et al.* (2014a), os quais avaliaram o potencial anti-hiperlipidêmico e hipocolesterolêmico em ratos tratados com dieta altamente lipídica. Houve redução da atividade e expressão dos genes da Apo A1, da LCAT, COL 7 α -hidroxilase e ainda, LDL-R, conduzindo à diminuição dos valores de TRI, COL, LDL e aumento do HDL. Foram empregadas doses medicamentosas relativamente mais altas dos fitofármacos nestes estudos, quando comparados aos que empregam sistemas de liberação modificada para fármacos, ou seja, de 50 a 200 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ frente a 10 a 25 ug.ml⁻¹ quando utilizados em nanopartículas poliméricas de quitosana e Eudragit[®] E100, respectivamente, como nos estudos de Baspinar *et al.* (2018) e Tu *et al.* (2014b). Os dois últimos estudos foram realizados de acordo com as condições necessárias para a obtenção de nanopartículas. Sendo assim, além dos efeitos farmacológicos da PIP, a mesma tem sido eficaz para melhorar a solubilidade e biodisponibilidade de outros fármacos.

2.4 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

As pesquisas envolvendo biodisponibilidade e solubilidade são de grande importância no desenvolvimento de produtos farmacêuticos. Em torno de 40% das substâncias ativas utilizadas na indústria farmacêutica apresentam-se pouco solúveis em água,

principalmente, aquelas que se enquadram na Classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) (SCHAFROTH *et al.*, 2012), as quais apresentam propriedades físico-químicas de baixa solubilidade e alta permeabilidade. O SCB faz parte das diretrizes da *Food and Drug Administration* (FDA) e *European Medicines Agency* (EMA) para produção de formas farmacêuticas (ZHANG *et al.*, 2018; AMIGDON *et al.*, 1995).

Técnicas e produtos que possam modificar as características físico-químicas, alterando a liberação de um princípio ativo, podem melhorar significativamente seu desempenho no organismo (JEEVANANDAM *et al.*, 2018).

A tecnologia de liberação modificada de fármacos, área da ciência de grande impacto inovador, tem como objetivo principal a busca pelo sucesso terapêutico. As formas farmacêuticas deste sistema modulam a cinética de liberação no organismo trazendo uma série de vantagens em relação às aquelas convencionais, tais como, minimizar as flutuações nas concentrações plasmáticas do fármaco, melhorar a disponibilidade em alvos específicos no organismo, prolongar a ação farmacológica das substâncias ativas, reduzir o número de administrações diárias, bem como, diminuir as taxas de toxicidade e os efeitos colaterais (RESTANI *et al.*, 2010). A eficácia do tratamento também pode ser obtida em decorrência do aumento da adesão do paciente. Portanto, a referida tecnologia tem sido considerada uma alternativa mais econômica, justificada pela redução de gastos com o uso de sucessivos tratamentos, bem como em serviços de saúde pública, mesmo que o custo inicial seja aparentemente mais elevado do que em outros tratamentos com formas farmacêuticas convencionais (LANZILLOTTI, 2012).

A escolha da formulação ideal exige uma análise prévia de forma criteriosa de alguns fatores tais como a natureza do fármaco, estabilidade, solubilidade, toxicidade, velocidade de liberação desejada e o alvo terapêutico, além de avaliar o método de síntese e da modificação estrutural necessária ao desenvolvimento de partículas poliméricas carreadoras de fármacos (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

Para tanto, vários são os sistemas empregados para esta liberação modificada, dentre eles, nanopartículas, lipossomas e micropartículas são os mais comumente utilizados (MAINARDES, 2007).

A nanotecnologia representa uma área ativa de pesquisa e um setor tecnoeconômico em contínua expansão em muitos domínios de aplicação. As nanopartículas e materiais nanoestruturados como fármacos ou matérias-primas, ganharam destaque nos avanços tecnológicos, em especial na ciência farmacêutica e biomédica, bem como na melhora nos diagnósticos, prevenção e tratamentos de doenças (SHI; LAMMERS, 2019).

As nanopartículas são compostas por polímeros biodegradáveis e formam sistemas carreadores de fármacos com diâmetro inferior a 1 μm . Apresentam-se na forma de reservatório (cápsulas) ou matricial (matriz polimérica) onde o fármaco se encontra encapsulado ou adsorvido na malha polimérica. Sendo denominadas de nanocápsulas e nanoesferas, respectivamente, diferindo entre si segundo a composição e organização estrutural (TRAN; BENOÎT; VENIER-JULIENNE, 2011).

As nanocápsulas formam sistemas nanovesiculares caracterizados por um invólucro polimérico envolvendo um núcleo líquido lipofílico ou hidrofílico, onde geralmente essa cavidade central é composta por um óleo (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). O fármaco pode estar aprisionado ou dissolvido neste núcleo líquido, podendo ocorrer também a adsorção na superfície da partícula. Já as nanoesferas são maciças, destituídas de óleo em sua composição e o fármaco encontra-se geralmente disperso de maneira homogênea na partícula ou aderido somente à superfície. Comparando-as, as nanocápsulas tem se mostrado mais vantajosas devido à sua maior capacidade de carga do fármaco, melhor proteção contra a degradação e redução da liberação imediata (CHASSOT *et al.*, 2015).

Além de manter a estabilidade física do fármaco durante o armazenamento e nos fluídos biológicos, constam entre as vantagens apresentadas pelas nanopartículas: versatilidade dos métodos de preparação, transponibilidade de escala industrial, custo acessível de produção e possibilidade de direcionamento do fármaco para células, tecidos e órgãos específicos, como por exemplo, macrófagos, células tumorais, cérebro entre outros (BRUXEL *et al.*, 2012).

Quanto aos lipossomas, são definidos como vesículas esféricas compostas de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por um meio aquoso. Apresentam tamanhos que variam entre 20 a 5.000 nm e podem encapsular tanto substâncias hidrofílicas (no compartimento aquoso) quanto lipofílicas (inseridas ou adsorvidas na membrana), ou ambas. Estas vesículas são constituídas basicamente por fosfolipídeos de natureza sintética ou natural, esteróis e um antioxidante. Os lipídeos mais utilizados nas formulações de lipossomas são os que apresentam uma forma cilíndrica que tendem a formar uma bicamada estável em solução aquosa. As fosfatidilcolinas são as mais empregadas em estudos de formulação de lipossomas, pois apresentam grande estabilidade frente a variações de pH ou da concentração de sal no meio. Por serem biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicas são altamente versáteis para o uso em pesquisas (MAHERANI *et al.*, 2011).

Os fármacos que possuem características de hidrofobicidade podem ser facilmente encapsulados por técnicas de evaporação de solvente, por exemplo, formando sistemas de liberação de fármacos adequados (SHAHANI; PANYAM, 2011).

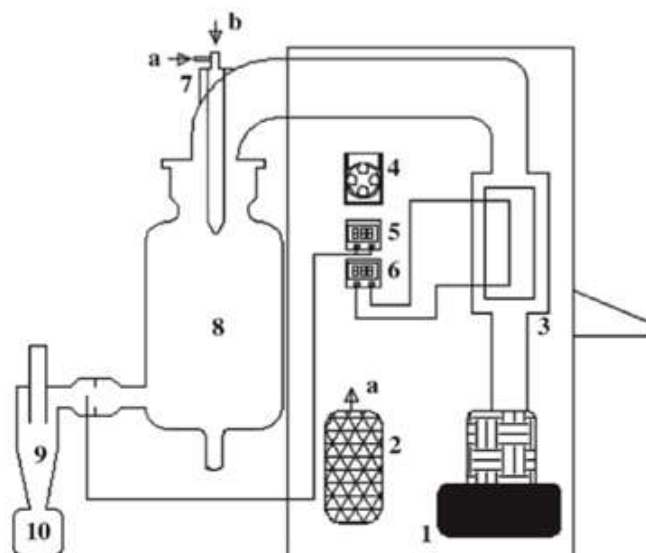
Para o desenvolvimento destas formulações farmacêuticas de micropartículas, são empregados polímeros biodegradáveis (LIU; CHEN; SELOMULYA, 2015). Estes podem ser miscíveis em água, etanol e isopropanol ou parcialmente miscíveis em água, etil acetato, butil lactato, carbonato de propileno e álcool benzílico. O potencial de toxicidade e a facilidade de remoção devem ser considerados durante a escolha do solvente para a formulação de micropartículas (SHIVANI, 2015).

2.4.1 Obtenção de Micropartículas pelo Método de *Spray Drying*

As técnicas de dispersões sólidas apresentam os resultados mais efetivos para melhorar a solubilidade em água e aumentar a biodisponibilidade do fármaco. Existem dois métodos de preparação para as dispersões sólidas, os métodos de fusão, como o de extrusão por fusão a quente e métodos de evaporação de solvente, como o método por *spray drying* (ASHOUR *et al.*, 2016).

A obtenção de micropartículas pelo método de *spray drying* (Figura 8) vem sendo empregada na indústria farmacêutica, bem como em outras áreas podendo ser produzida em grande escala. Possui um custo de execução, quatro ou cinco vezes menor em relação aos métodos de liofilização e secagem a vácuo resultando partículas de qualidade adequada (SHISHIR; CHEN, 2017; SCHAFROTH *et al.*, 2012; TONON *et al.*, 2006).

Além de proteger o princípio-ativo, pode melhorar o sabor, o aroma, a estabilidade, o valor nutricional e a aparência do produto microencapsulado, obtendo-se partículas de alta qualidade, de tamanho uniforme e forma esférica, possibilitando a secagem de produtos à pressão atmosférica, facilitando a produção de grandes volumes em operação contínua utilizando-se equipamentos de fácil operação, ampla aplicabilidade e flexibilidade por permitir o processamento de diversos tipos de materiais com rapidez e baixa umidade (SOSNIK; SEREMETA, 2015; PORRAS-SAAVEDRA *et al.*, 2015).

FIGURA 8 – IMAGEM E DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO EQUIPAMENTO DE *SPRAY DRYER*

Fonte: Adaptado de BISCAIA, P. B. **Desenvolvimento Tecnológico e avaliação biológica de micropartículas poliméricas contendo piperina obtidas por *spray-drying***. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2018 e RATTES, A. L. R.; OLIVEIRA, W. P. Spray drying conditions and encapsulating composition effects on formation and properties of sodium diclofenac microparticles. **Powder Technology**, v. 171, n. 1, p. 7-14, 2007.

Legenda: (1) ventilador + filtro de ar; (2) compressor de ar; (3) aquecedor; (4) bomba peristáltica; (5) controle de temperatura; (6) entrada do termopar; (7) atomizador: (a) ar comprimido; (b) alimentação do microencapsulador; (8) câmara de secagem; (9) ciclone; (10) coletor de produto seco.

Neste método, o processo é geralmente rápido, onde o fármaco é dissolvido, suspenso ou emulsificado juntamente com o polímero em um solvente orgânico ou aquoso. Esta mistura líquida (fármaco/polímero) é alimentada no equipamento por meio de uma bomba peristáltica, entrando em contato rapidamente com o ar aquecido, sendo então forçada a atravessar um orifício de pequeno diâmetro, o bico atomizador. O produto da nebulização resulta em gotículas que serão secas muito rapidamente por evaporação no interior da câmara de secagem, sob ar de alta pressão e temperatura condizente com o ponto de fusão do solvente. O pó fino resultante passa por um ciclone e é acondicionado em um coletor (ENGEL *et al.*, 2017; SHIVANI, 2015).

No estudo de Silva (2014), a técnica de *spray drying* foi viável para modificar a liberação de CUR, a qual foi encapsulada com sucesso em micropartículas de PCL recobertas com gelatina e obtiveram resultados de eficiência de encapsulação em torno de 81%.

Em outro estudo, Lyra (2016) obteve micropartículas de Efaviranz com os polímeros Eudragit L100 e S100 por meio do mesmo método utilizando diferentes proporções de solventes. Todas as formulações aumentaram a solubilidade do fármaco em água e contribuíram para a redução dos efeitos colaterais avaliadas pelo perfil lipídico.

Macêdo (2017) produziu micropartículas de rutina utilizando a polivinilpirrolidona (PVP K-30) e Aerosil® 200 em *spray drying* usando um planejamento fatorial de Box-Behnken, tendo sido estudadas as variáveis do processo como, temperatura, porcentagem de rutina e de Aerosil®.

2.4.2 Polímeros e Sistemas Dependentes de Liberação Modificada de Fármacos

As macromoléculas, tanto naturais quanto sintéticas, que possuem estrutura química com interações intra e intermoleculares por meio de ligações covalentes, e se repetem ao longo da cadeia constituem os polímeros (SEVERINO *et al.*, 2011; MANO; MENDES, 2004).

Para Karolewicz (2016), os polímeros são amplamente utilizados na indústria farmacêutica, em sistemas de liberação de fármacos, em várias vias de administração, como oral, inalatória, tópica e parenteral. Dentre algumas de suas propriedades estão sensibilidade a estímulos, mucoadesão, inibição enzimática, aumento ou aprimoramento das capacidades de penetração do epitélio intestinal, tampão e interação com enzimas metabólicas de fármacos, propriedades absorptivas, habilidade de mascarar sabores, atividades farmacológicas e inibição de bomba de efluxo.

A gelatina, a quitosana e a celulose fazem parte dos polímeros naturais. Já os derivados da celulose, polietilenoglicóis e poliamidas, bem como, a goma xantana (produto de fermentação) são polímeros semissintéticos (KAROLEWICZ, 2016). Para Severino *et al.* (2011), dentre os polímeros sintéticos estão os poliésteres alifáticos e os polialquilcianoacrilatos.

Os poliésteres alifáticos quando em ambiente aquoso, sofrem degradação hidrolítica mediante a clivagem das ligações éster dando origem a ácidos hidroxicarboxílicos atóxicos, e ainda, são metabolizados em dióxido de carbono e água (via do ciclo do ácido cítrico). Os polímeros poli(α -hidroxiácidos), poli(β -hidroxiácidos) e a poli(ϵ -caprolactona) fazem parte deste grupo. Os fatores que influenciam sua biodegradação dependem da proporção dos ácidos DL-lático e glicólico na composição, da massa molar do polímero, do pH e da força iônica do meio. Já, os polialquilcianoacrilatos sofrem polimerização aniônica por meio dos cianoacrilatos de alquila. Os grupos, cianeto e carboxila, ligados ao carbono conferem um caráter dipolar à molécula centralizando a carga positiva neste carbono, de modo a torná-lo susceptível a um ataque nucleófilo, facilitando a reação de polimerização (SEVERINO *et al.*, 2011).

Os polímeros sintéticos biodegradáveis são os mais utilizados para a obtenção de micropartículas. Tais polímeros são aqueles que sofrem degradação química *in vivo*, por hidrólise ou ação enzimática originando produtos atóxicos e biocompatíveis capazes de ser metabolizados e excretados pelas vias fisiológicas normais. Esta degradação resulta da ação de microrganismos como bactérias, fungos e algas (COIMBRA *et al.*, 2011).

O grupo de polímeros biodegradáveis chamados de Eudragit® é muito utilizado em formulações farmacêuticas. Estes polímeros possuem características de maior segurança, versatilidade e disponibilidade de produtos que possibilitam a liberação imediata, prolongada ou sustentada do fármaco, apresentando propriedades de dissolução e absorção apropriadas para o trato gastrointestinal. Fisicamente, apresentam-se nas formas de dispersão aquosa, grânulos de solução orgânica e pós (PATRA *et al.*, 2017; SONJE; CHANDRA, 2013).

Os polímeros Eudragit® são copolímeros derivados de ésteres do ácido acrílico e metacrílico. Os grupos funcionais das moléculas determinam as suas propriedades físico-químicas. São classificados quanto à solubilidade em fluidos digestivos influenciados pelo pH do meio que formam sal com grupos ácidos ou alcalinos, permitindo assim a liberação do ativo. Já a liberação controlada por tempo ocorre por inchamento dos polímeros insolúveis alcalinos e neutros permeáveis em fluidos digestivos (PATRA *et al.*, 2017).

No grupo de polímeros do tipo Eudragit®, o S100 e RS30D foram os de escolha neste estudo.

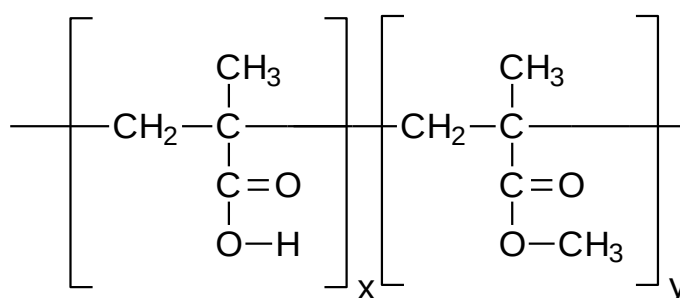
O Eudragit® S100 caracteriza-se como uma substância sólida na forma de pó branco com odor fraco característico. Apresenta como propriedades físicas: 97,2% de substância seca, peso molecular de aproximadamente $125.000 \text{ g.mol}^{-1}$, valor ácido de $188 \text{ mg KOH.g}^{-1}$ de polímero, temperatura de transição vítrea maior que 150°C , viscosidade de $43 \text{ mm}^2.\text{s}^{-1}$ e solubilidade em pH 7,0 (INFORME TÉCNICO, 2018). Quimicamente é um copolímero aniônico, constituído de ácido metacrílico e metacrilato de metila, sendo insolúvel em meio ácido, mas solúvel em meio intestinal, o que o caracteriza como um polímero com solubilidade pH dependente, promovendo gastrorresistência sendo então usado para a liberação de fármacos direcionadas ao cólon. (PATRA *et al.*, 2017).

O Eudragit® RS30D é um copolímero de etil acrilato, metil metacrilato e um baixo teor de éster do ácido metacrílico, com grupos de amônio quaternário na forma de sais os quais tornam a molécula mais permeável. Apresenta-se como um líquido de cor branca ligeiramente leitosa e de odor característico, disponível na forma de dispersão aquosa, com 30% de substância seca, de baixa viscosidade ($15 \text{ mm}^2.\text{s}^{-1}$), peso molecular maior que $32.000 \text{ g.mol}^{-1}$, valor alcalino de $18,8 \text{ mg KOH.gDS}^{-1}$ e temperatura de transição vítrea de 55°C

(INFORME TÉCNICO, 2018). A utilização deste polímero é recomendada para formulações que necessitem de um perfil de liberação personalizado sendo controlado (por tempo), já que de forma geral é insolúvel e exibe baixa permeabilidade com pH inchaço independente. Também tem sido empregado em diferentes proporções juntamente com outros polímeros (PATRA *et al.*, 2017).

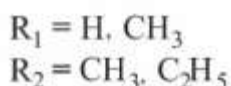
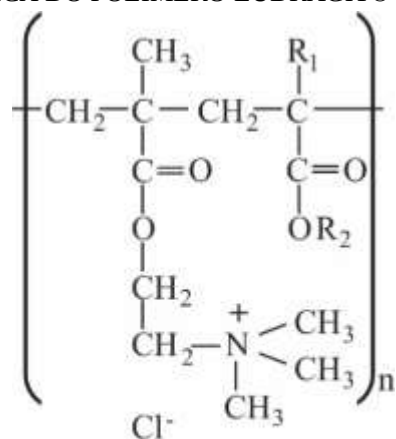
As estruturas químicas, tanto do polímero Eudragit® S100 quanto a do RS30D, podem ser observadas nas Figuras 9 e 10.

FIGURA 9 – ESTRUTURA QUÍMICA DO POLÍMERO EUDRAGIT® S100



Legenda: *x* representa os grupos carboxílicos livres e *y*, os esterificados. Para o S100: proporção dos grupos carboxílicos livres/esterificados = 1:2. A solubilidade ocorre em pH 7,0 e em meio aquoso.

FIGURA 10 – ESTRUTURA QUÍMICA DO POLÍMERO EUDRAGIT® RS30D



Os estados moleculares, tanto do fármaco quanto dos polímeros, em dispersões sólidas são variáveis e dependem da proporção na composição, tempo e condições de armazenamento, além da taxa de dissolução que é significativamente influenciável pelos estados moleculares (HIGASHI *et al.*, 2015).

Cruzet *et al.* (2010) prepararam formulações de alendronato de sódio em mistura de polímeros de Eudragit® S100 e Methocel® K15M para aumentar a solubilidade do alendronato, proteger a mucosa intestinal dos seus efeitos irritantes e garantir uma liberação controlada.

Bunhak *et al.* (2015) desenvolveram filmes de Eudragit® RS30D em combinação de sulfato de condroitina modificado para aumentar a biodisponibilidade e o efeito antiaterogênico.

Portanto, o desenvolvimento de dispersões sólidas por meio da técnica de *spray drying*, utilizando polímeros do tipo Eudragit® tem se mostrado eficaz para aumentar a solubilidade de fármacos em água.

2.4.3 O Uso Concomitante de Curcumina e Piperina no Tratamento de Dislipidemias e Eventos Cardiovasculares

Os estudos de diversos autores remontam a utilização da associação de CUR e PIP para avaliar os seus efeitos em quadros de dislipidemias e de eventos cardiovasculares.

Em uma busca realizada nos meios eletrônicos, em bases de dados como Lilacs, Scielo, Pubmed, Scopus, Science Direct, Web of Science e Google Acadêmico, ao utilizar as seguintes palavras-chave: piperine AND curcumin AND lipid; piperine AND curcumin AND cholesterol; AND piperine AND curcumin AND cardiovascular risk, foram encontradas 4992 referências com documentos datados de 1964 a 2020. Os títulos, resumos e artigos selecionados para leitura na íntegra foram analisados por dois revisores, ou três em caso de discordância entre os primeiros. Foram excluídos da pesquisa, os títulos em duplicata, que não se apresentavam em língua inglesa ou espanhola, artigos em que as substâncias foram testadas em associação, porém com uma terceira ou mais substâncias adicionadas ao meio, e ainda, os estudos que não relatavam tratamentos terapêuticos sob os níveis de lipídeos sanguíneos e riscos cardiovasculares.

As referências disponíveis na literatura apontaram 15 estudos com modelos experimentais *in vivo* a respeito dessa utilização e podem ser observadas no Quadro 1.

QUADRO 1 – ANÁLISE DOS ARTIGOS SELECIONADOS NA LITERATURA AVALIANDO A ATIVIDADE *IN VIVO* DA COADMINISTRAÇÃO DE CURCUMINA-PIPERINA EM DISLIPIDEMIAS E EVENTOS CARDIOVASCULARES

(continua)

OBJETIVO DO ESTUDO	PAÍS	AMOSTRAS	RESULTADOS	REFERÊNCIAS
Verificar se a administração de uma dieta basal acrescida da associação de Piperina e Curcumina pode melhorar o desempenho e estado de saúde de frangos, incluindo sua performance e seus parâmetros sanguíneos	Egito	0,5% <i>Piper nigrum</i> L. + 0,5% <i>Curcuma longa</i> L.	Em relação ao grupo controle, foram observados: ▪ Aumento no acúmulo de ganho de massa em função da alimentação; ▪ Aumento no teor de proteínas totais (g.dL⁻¹); ▪ Ausência de diferenças significativas nos teores de albumina (g.dL⁻¹), COL(mg.dL⁻¹), TRI (mg.dL⁻¹), ALT (U.dL⁻¹), globulina (g.dL⁻¹), AST (U.dL⁻¹) e FAL (mg.dL⁻¹); Redução dos níveis de glicose (g.dL ⁻¹);	ABOU-ELKHAIR <i>et al.</i> , 2014
Verificar a atividade da administração de uma dieta basal acrescida da associação de Piperina e Curcumina no desempenho de frangos, incluindo, seus parâmetros sanguíneos	Irã	-	Em relação ao grupo controle, foram observados: ▪ Não foram observadas diferenças significativas nos teores de: ▪ AST (IU.L⁻¹), ALT (IU.L⁻¹), LDH (IU.L⁻¹), LDL (mg.dL⁻¹), HDL (mg.dL⁻¹), TRI (mg.dL⁻¹), COL (mg.dL⁻¹), Na⁺ (mEq.L⁻¹), K⁺ (mEq.L⁻¹), e Cl⁻ (mEq.L⁻¹).	AKBARIAN <i>et al.</i> , 2012
Verificar a atividade da administração de iogurte adicionado da associação de Piperina e Curcumina sob parâmetros fisiológicos e bioquímicos de ratos com diabetes-induzida	Brasil	90 mg.kg ⁻¹ de curcumina + 20 mg.kg ⁻¹ de piperina; 90 mg.kg ⁻¹ de curcumina + 40 mg.kg ⁻¹ de piperina	Em relação ao grupo controle, foram observados: Para o grupo tratado com 90 mg.kg⁻¹ de curcumina + 20 mg.kg⁻¹ de piperina: ▪ Redução nos níveis de glicemia (mmol.L⁻¹); TRI (mmol.L⁻¹), COL (mmol.L⁻¹); glicose (mmol.L⁻¹.24h⁻¹), ureia (mmol.L⁻¹.24h⁻¹) e proteínas (μmol.L⁻¹.24h⁻¹) urinárias; além dos níveis de ALT, AST e FAL (μKat.L⁻¹) e de MDA plasmático (μmol.L⁻¹) e do fígado (μmol.L⁻¹.g⁻¹ tecido), PCO do fígado (nmol.mg⁻¹ proteína); ▪ Os níveis de HDL, GSH-Px (μKat.mg⁻¹ proteína) e de GSH (mmol.L⁻¹.g⁻¹ tecido) permaneceram inalterados; ▪ Aumento nos níveis da SOD (U.mg⁻¹ proteína) e CAT (μKat.mg⁻¹ proteína). Para o grupo tratado com 90 mg.kg⁻¹ de curcumina + 40 mg.kg⁻¹ de piperina:	ARCARO <i>et al.</i> , 2014

QUADRO 1 – ANÁLISE DOS ARTIGOS SELECIONADOS NA LITERATURA AVALIANDO A ATIVIDADE *IN VIVO* DA COADMINISTRAÇÃO DE CURCUMINA-PIPERINA EM DISLIPIDEMIAS E EVENTOS CARDIOVASCULARES

(continuação)

OBJETIVO DO ESTUDO	PAÍS	AMOSTRAS	RESULTADOS	REFERÊNCIAS
			▪ Não houve diferenças significativas nos níveis de glicemia (mmol.L^{-1}), TRI (mmol.L^{-1}); e de glicose ($\text{mmol.L}^{-1} \cdot 24\text{h}^{-1}$), ureia ($\text{mmol.L}^{-1} \cdot 24\text{h}^{-1}$) e proteínas ($\mu\text{mol.L}^{-1} \cdot 24\text{h}^{-1}$) urinárias. ▪ Os níveis de MDA plasmático ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) e do fígado ($\mu\text{mol.L}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ tecido), SOD (U.mg^{-1} proteína), CAT ($\mu\text{Kat.mg}^{-1}$ proteína), GSH-Px ($\mu\text{Kat.mg}^{-1}$ proteína) e GSH ($\text{mmol.L}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ tecido) e ainda, os níveis de HDL permaneceram inalterados; ▪ Redução nos níveis de COL (mmol.L^{-1}) e de PCO do fígado (nmol.mg^{-1} proteína); Aumento nos níveis de ALT, AST e FAL ($\mu\text{Kat.L}^{-1}$).	
Verificar a eficácia terapêutica da associação de piperina com curcumina na cardiotoxicidade induzida em ratos	Índia	100 mg.kg^{-1} de curcumina + 20 mg.kg^{-1} de piperina; 50 mg.kg^{-1} de curcumina + 20 mg.kg^{-1} de piperina; 25 mg.kg^{-1} de curcumina + 20 mg.kg^{-1} de piperina	Em relação ao grupo controle, foram observados para todos os grupos: ▪ Melhora nos parâmetros eletrocardiográficos – batimentos cardíacos ($\cdot \text{min}^{-1}$), intervalo QRS, segmentos RR e PR (ms), e QT (ms); ▪ Redução dos níveis de AST, ALT, FAL, CK-MB, CPK, LDH (U.L^{-1}), COL e TRI (mg.dL^{-1}) e de níveis de TBARS (unidades.mg^{-1} de proteínas); ▪ Aumento nos níveis de SOD e CAT (unidades.mg^{-1} de proteínas).	CHAKRABORTY <i>et al.</i> , 2017
Verificar os efeitos da administração da associação de Piperina e Curcumina no aumento da pressão sanguínea e remodelação da aorta em ratos deficientes de NO	Eslováquia	100 $\text{mg.kg}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ de curcumina + 20 $\text{mg.kg}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ de piperina	Em relação ao grupo controle, foram observados: ▪ Diminuição na pressão sanguínea apenas na 3ª semana de tratamento, nas demais não houve diferença estatisticamente significativa; ▪ Não houve redução significativa da espessura da parede aórtica; ▪ Houve redução nos níveis de PTAH e de colágeno I; ▪ Aumento nos níveis de actina; ▪ Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de elastina, colágeno III, colágeno total, CSA, Van Gieson, espessura da aorta.	HLAVAČKOVÁ <i>et al.</i> , 2011
Verificar os efeitos da administração de associação de			Em relação ao grupo controle, foram observados:	

QUADRO 1 – ANÁLISE DOS ARTIGOS SELECIONADOS NA LITERATURA AVALIANDO A ATIVIDADE *IN VIVO* DA COADMINISTRAÇÃO DE CURCUMINA-PIPERINA EM DISLIPIDEMIAS E EVENTOS CARDIOVASCULARES

(continuação)

OBJETIVO DO ESTUDO	PAÍS	AMOSTRAS	RESULTADOS	REFERÊNCIAS
Piperina e Curcumina em ratos sujeitos a dieta litogênica	China	500 mg.kg ⁻¹ de curcumina + 20 mg.kg ⁻¹ de piperina	- Redução nos níveis de COL (mmol.L⁻¹) e TRI (mmol.L⁻¹) do soro; e do colesterol (mmol.L⁻¹) da bile; - Pouca variação nos níveis de fosfolipídeos e ácido biliar (mmol.L⁻¹) da bile; - Redução de 70% na incidência de cálculos biliares de COL; - Diminuição do peso do fígado; - Efeito protetor contra dieta litogênica, mudanças histopatológicas inibidas; - Redução na expressão das proteínas NPC1P1 e SREBP2.	LI <i>et al.</i> , 2015
Verificar os efeitos da administração de associação de Piperina e Curcumina em ratos com obesidade-induzida	EUA (1º autor) Japão	1000 mg.kg ⁻¹ de curcumina + 50 mg.kg ⁻¹ de piperina	Em relação ao grupo controle, foram observados: - Redução do percentual total de gordura corporal; - Redução nos níveis de IL-1β e KC/GRO; - Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de IFN-γ, IL-10, IL-12 p70 e IL-6.	MIYAZAWA <i>et al.</i> , 2018
Verificar os efeitos da administração de associação de Piperina e Curcumina sob os níveis séricos de sdLDL em indivíduos obesos	Irã (1º autor) Reino Unido	1000 mg.dia ⁻¹ de curcuminóides + 5 mg.dia ⁻¹ de piperina	Em relação ao grupo controle, foram observados: Não foram encontradas mudanças significativas com relação aos níveis de sdLDL no soro nesses indivíduos.	MOOHEBATI <i>et al.</i> , 2014
Verificar os efeitos da administração de associação de Piperina e Curcumina sob o perfil lipídico de indivíduos com síndrome metabólica	Irã (1º autor) Austrália	1000 mg.dia ⁻¹ de curcuminóides + 10 mg.dia ⁻¹ de Bioperine® (extrato de <i>Piper</i> sp. contendo pelo menos 95% de piperina)	Em relação ao grupo controle, foram observados: - Redução nos níveis de LDL, não-HDL, COL, TRI e Lp (a); - Elevação dos níveis de HDL; - Não foram observadas mudanças significativas nos níveis de sdLDL.	PANAHI <i>et al.</i> , 2014
Verificar os efeitos da administração da associação de Piperina e Curcumina sob índices oxidativos em indivíduos diabéticos	Irã (1º autor) EUA	1000 mg.dia ⁻¹ de curcuminóides + 10 mg.dia ⁻¹ de piperina	Em relação ao grupo controle, foram observados: - Aumento na capacidade antioxidante total sérica e da atividade da SOD; - Redução da atividade da MDA.	PANAHI <i>et al.</i> , 2016

QUADRO 1 – ANÁLISE DOS ARTIGOS SELECIONADOS NA LITERATURA AVALIANDO A ATIVIDADE *IN VIVO* DA COADMINISTRAÇÃO DE CURCUMINA-PIPERINA EM DISLIPIDEMIAS E EVENTOS CARDIOVASCULARES

(continuação)

OBJETIVO DO ESTUDO	PAÍS	AMOSTRAS	RESULTADOS	REFERÊNCIAS
Verificar os efeitos da administração da associação de Piperina e Curcumina sob os parâmetros lipídicos em indivíduos com diabetes tipo 2	Irã (1º autor) Croácia EUA	1000 mg.dia ⁻¹ de curcuminóides + 10 mg.dia ⁻¹ de piperina	Em relação ao grupo controle, foram observados: - Redução nos níveis de Lp (a) sérica; - Aumento nas concentrações de HDL; - Não houve mudanças significativas nos níveis de COL, TRI, LDL e não-HDL.	PANAHI <i>et al.</i> , 2017
Verificar os efeitos da administração de associação de Piperina e Curcumina sob os parâmetros glicêmicos, hepáticos e inflamatórios em indivíduos com diabetes tipo 2	Irã (1º autor) México	500 mg.dia ⁻¹ de curcuminóides + 5 mg.dia ⁻¹ de piperina	Em relação ao grupo controle, foram observados: - Redução no peso (kg) e IMC [kg.(m²)⁻¹]; - Redução dos níveis de glicose (mg.dL⁻¹); - Redução dos níveis de HbA1c (%), peptídeo C (ng.mL⁻¹), ALT (U.L⁻¹), e AST (U.L⁻¹); - Não houve mudanças significativas nos níveis de insulina (mil.L⁻¹), PCR-US (g.L⁻¹), creatinina (mg.dL⁻¹), HOMA-IR, HOMA-β e HSI.	PANAHI <i>et al.</i> , 2018
Verificar os efeitos da administração da associação de Piperina e Curcumina sob as enzimas hepáticas, perfil lipídico, índices glicêmicos, e severidade da doença em indivíduos com Doença Hepática gordurosa Não Alcoólica	Irã (1º autor) EUA	500 mg.dia ⁻¹ de curcuminóides + 5 mg.dia ⁻¹ de piperina	Em relação ao grupo controle, foram observados: - Redução nas concentrações de albumina (g.dL⁻¹); - Não houve mudanças significativas nos níveis de bilirrubinas (mg.dL⁻¹), TRI (mg.dL⁻¹), HDL (mg.dL⁻¹), ferritina (μg.L⁻¹), LDH (U.L⁻¹), glicemia (mg.dL⁻¹), HbA1c (%), ureia (mg.dL⁻¹), creatinina (mg.dL⁻¹), TSH (mil.L⁻¹), número de leucócitos (10⁹.L⁻¹), número de eritrócitos (10⁹.L⁻¹), plaquetas (10⁹.L⁻¹), ALT, AST e FAL (U.L⁻¹), hemoglobina (g.dL⁻¹), hematócrito (%), VHS (mm.hr⁻¹), ferro (μg.dL⁻¹), e TIBC (μg.dL⁻¹); - Redução significativa da severidade da Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica.	PANAHI <i>et al.</i> , 2019
Verificar os efeitos da administração da associação de Piperina e Curcumina sob o perfil lipídico de ratos normais e hiperlipidêmicos	Egito	0,1% de curcumina + 20 mg/kg de piperina 0,25% de curcumina + 20 mg.kg ⁻¹ de	Em relação ao grupo controle, foram observados: - Diminuição relativa da massa do fígado e coração; - Não foram observadas diferenças com relação ao ganho de massa corporal; - Diminuição dos níveis de COL, LDL, VLDL, TRI e fosfolípidos;	SOLIMAN GHADA, 2005

QUADRO 1 – ANÁLISE DOS ARTIGOS SELECIONADOS NA LITERATURA AVALIANDO A ATIVIDADE *IN VIVO* DA COADMINISTRAÇÃO DE CURCUMINA-PIPERINA EM DISLIPIDEMIAS E EVENTOS CARDIOVASCULARES

(conclusão)

OBJETIVO DO ESTUDO	PAÍS	AMOSTRAS	RESULTADOS	REFERÊNCIAS
		piperina 0,5% de curcumina + 20 mg.kg ⁻¹ de piperina	▪ Aumento nos níveis de HDL	
Verificar os efeitos hipocolesterolêmicos da administração da associação de Piperina e Curcumina em ratos sujeitos a uma dieta com altos níveis lipídicos	China	100 mg.kg ⁻¹ .dia ⁻¹ de curcumina + 5mg.kg ⁻¹ .dia ⁻¹ de piperina	Em relação ao grupo controle, foram observados: ▪ Diminuição dos níveis de COL (mmol.L⁻¹), TRI (mmol.L⁻¹) e LDL (mmol.L⁻¹); ▪ Aumento dos níveis de HDL (mmol.L⁻¹) e ApoAI (g.L⁻¹); ▪ Não houve mudanças significativas nos níveis de ApoB (g.L⁻¹); ▪ Diminuição dos níveis de COL e TRI do fígado (μmol.g⁻¹ de fígado); ▪ Aumento dos níveis de COL, TRI e ácido biliar total nas fezes (μmol.g⁻¹ de fezes.dia⁻¹); ▪ Aumento da atividade da LCAT (nmol.h⁻¹.mL⁻¹) e CYP7P1 (nmol.h⁻¹.mL⁻¹.mg⁻¹ proteína).	TU <i>et al.</i> , 2014

Fonte: A Autora

Legenda: **ApoAI**: apolipoproteína A-1; **ApoB**: apolipoproteína B; **ALT**: alanina aminotransferase; **AST**: aspartato aminotransferase; **CAT**: catalase; **Cl⁻**: íon cloreto; **CK-MB**: creatina-fosfoquinase fração mb, **COL**: colesterol total sérico; **CPK**: creatina-fosfoquinase; **CSA**: área de corte transversal; **CYP7A1**: colesterol 7α –hidroxilase; **VHS**: velocidade de hemossedimentação; **FAL**: fosfatase alcalina; **GOT**: transaminase glutamato oxalacética; **GPT**: transaminase glutamato pirúvica; **GRO**: oncogene regulador de crescimento humano; **GSH**: glutatona; **GSH-Px**: atividade da glutatona peroxidase; **HbA1c**: hemoglobina glicada; **HDL**: colesterol de lipoproteína de alta densidade; **HOMA-β**: avaliação do modelo de homeostase da função das células-β; **HOMA-IR**: avaliação do modelo de homeostase que estima a resistência insulínica; **PCR-US**: proteína C reativa de alta sensibilidade; **HSI**: índice de esteatose hepática; **IFN-γ**: interferon gama; **IL-1β**: interleucina 1 beta; **IL-6**: interleucina 6; **IL-10**: interleucina 10, **IL-12 (p70)**: interleucina ou citocina 12 heterodimérica de 70-kDa ligada por dissulfeto; **K⁺**: íon potássio; **IMC**: índice de massa corporal; **KC**: quimiocina quimioatrante de neutrófilos derivada de queratinócitos; **LCAT**: lecitina colesterol aciltransferase; **LDH**: lactato desidrogenase; **LDL**: colesterol de lipoproteína de baixa densidade; **Lp (a)**: lipoproteína (a); **MDA**: malonaldeído; **Na⁺**: íon sódio; **NPC1L1**: proteína Niemann-Pick C1-Like 1; **PCO**: conteúdo de carbonila na proteína; **Intervalo PR**: é o tempo desde o início da onda P até o início do complexo QRS no eletrocardiograma; **PTAH**: método de coloração com ácido fosfotúngstico e hematoxilina; **Intervalo QRS**: ondas que representam a despolarização ventricular; **Segmento QT**: total duração da despolarização ventricular; **Intervalo RR**: é o tempo decorrido entre duas ondas R sucessivas do sinal QRS no eletrocardiograma; **sdLDL-c**: colesterol de lipoproteína de baixa densidade pequeno e denso; **SOD**: superóxido dismutase; **SREBP2**: proteína 2 do elemento regulador de esterol; **TAC**: capacidade total antioxidante; **TBARS**: substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico; **TIBC**: capacidade total de ligação do ferro; **TRI**: triglicerídeos; **TSH**: hormônio estimulante da tireoide; **Van Gieson**: método de coloração Van Gieson; **VLDL**: colesterol de lipoproteína de muito baixa densidade.

De acordo com os estudos selecionados foi possível observar que, diferentes doses e proporções coadjuvantes de PIP e CUR vêm sendo coadministradas em modelos experimentais. Sendo as concentrações mais empregadas, as de 100, 500 e 1000 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ para a CUR e de 5, 10 e 20 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ para a PIP. Dentre os achados, houve alteração nos níveis séricos de alguns parâmetros avaliados, como: redução dos níveis de glicose, COL, TRI, albumina, LDL, LDH, AST, ALT, FAL e TBARS, e aumento dos níveis de HDL, CAT e SOD entre outros.

Diante do exposto, é possível verificar que a utilização de CUR e PIP possa ser eficaz na prevenção e tratamento das dislipidemias, possuindo também uma ação hepatoprotetora associada, e consequentemente, atuando na redução do risco cardiovascular. Em adição, o emprego de micropartículas poliméricas a partir de polímeros (met)acrilados tende a melhorar a biodisponibilidade dos fármacos no organismo, sendo uma alternativa promissora e que possibilita um vasto número de estudos posteriores.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Promover a obtenção, a caracterização e a avaliação *in vitro* de micropartículas poliméricas (met)acrílicas contendo CUR e/ou PIP com potencial antioxidante em dislipidemias.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Realizar a obtenção de micropartículas poliméricas de Eudragit® S100 e RS30D contendo CUR e/ou PIP;
- Calcular o rendimento e a taxa de umidade das micropartículas poliméricas de Eudragit® S100 e RS30D contendo CUR e/ou PIP;
- Efetuar a caracterização dos sistemas poliméricos por meio de análises morfológicas, espectroscópicas e térmicas;
- Determinar a eficiência de encapsulação das micropartículas poliméricas formuladas contendo CUR e/ou PIP;
- Avaliar *in vitro* a hemólise e o efeito antioxidante das micropartículas poliméricas formuladas contendo CUR e/ou PIP.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético (FISATOM, modelo 754A, São Paulo, Brasil);
- Analisador de tamanho de partículas e potencial Zeta (MALVERN INSTRUMENTS, modelo Zetasizer Nano series ZS90, Worcestershire, Reino Unido);
- Analisador de umidade (SHIMADZU, modelo MOC63u, Quioto, Japão);
- Balança analítica (CELTAC, modelo FA2104N, São Paulo, Brasil);
- Centrífuga de mesa (CELM, modelo LS-3 plus, Barueri, Brasil);
- Coluna cromatográfica C₁₈ (PHENOMENEX, modelo Synergi 4 μ Polar – RP 80Å, |Lc Column 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula 4 μ m, Torrance, EUA);
- Pré-coluna cromatográfica (PHENOMENEX, 4 μ Polar – RP 80 Å, 10 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula 4 μ m, Torrance, EUA);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (MERCK-HITACHI, modelo Lachrom D-7000, Tóquio, Japão);
- Destilador de água (FANEM LTDA, modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil);
- Difrátômetro de raios X (RIGAKU, modelo Ultima IV, Quioto, Japão);
- Espectrofotômetro da região do ultravioleta-visível (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Genesys 10 UV Scanning, Madison, Estados Unidos);
- Espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (SHIMADZU, modelo IR-Prestige-21, Quioto, Japão);
- Estufa (NOVA ÉTICA, modelo 410/D, Vargem Grande Paulista, Brasil);
- Liofilizador (TERRONI, modelo LD1500A, São Carlos, Brasil);
- Metalizador (SHIMADZU, modelo IC-50 Ion Coater, Quioto, Japão);
- Microscópio eletrônico de varredura com efeito de emissão de campo (TESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca);
- Potenciômetro digital de bancada (HANNA INSTRUMENTS, modelo HI 221, São Paulo, Brasil);
- Sistema de calorimetria exploratória diferencial STA 6000 (PERKIN ELMER, Waltham, MA, Estados Unidos);

- Sistema de secagem por aspersão, *Spray dryer* (LABMAQ, modelo MSD 0.5; Ribeirão Preto, Brasil);
- Sistema de ultrapurificação de água (Milli-Q[®], MILLIPORE, Bedford, MA, Estados Unidos);
- Ultrassom, *Ultrasonic Cleaner* (ODONTOBRÁS, 1440DA, Ribeirão Preto, Brasil).

4.2 REAGENTES E SOLVENTES

4.2.1 Fármacos

- Curcumina (CUR $\geq 98,0\%$ de pureza, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- Padrão interno: *curcumine* matrix substance for MALDI-MS, $\geq 99,0\%$ (CLAE) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- Piperina (PIP $\geq 95,0\%$ de pureza, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- Padrão interno: *piperine* matrix substance for MALDI-MS, $\geq 99,0\%$ (CLAE) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

4.2.2 Polímeros

- Eudragit[®] RS30D [cloreto de poli (metacrilato de trimetilamonioetila-co-metacrilato de metila-co-acrilato de etila)], dispersão aquosa (teor 30%), doado por Evonik Industries AG (Darmstadt, Alemanha);
- Eudragit[®] S100 [poli (metacrilato de metila-co-ácido metacrílico)], doado por Evonik Industries AG (Darmstadt, Alemanha).

4.2.3 Água Purificada

- Água ultrapura obtida por sistema de ultrapurificação de água (Milli-Q[®], MILLIPORE, Bedford, MA, Estados Unidos) e utilizada para análises em cromatógrafo líquido e ainda, determinação do tamanho de partícula;
- Água destilada obtida em equipamento FANEM LTDA (modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil) e empregada para o desenvolvimento dos sistemas microparticulados e demais análises.

4.2.4 Solventes e Demais Reagentes

- Acetonitrila grau CLAE (APPLYCHEM PANREAC QUÍMICA, Barcelona, Espanha);
- Ácido acético glacial P.A. (100% de pureza, SYNTH, Diadema, Brasil);
- Ácido clorídrico 37% (SYNTH, Diadema, Brasil);
- Ácido fórmico P.A. (85,0% de pureza, SYNTH, Diadema, Brasil);
- Álcool N-butílico (Butanol) P.A. (P.M. 74,12; LAFAN QUÍMICA FINA LTDA., Várzea Grande, Brasil);
- Aldeído fórmico P.A. (37% de pureza, DINAMICA QUÍMICA, Indaiatuba, Brasil);
- Ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) ($\geq 98\%$ de pureza, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, Estados Unidos);
- Brometo de potássio (KBr) grau espectroscópio (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, Estados Unidos);
- Dihidrocloreto de 2,2'-azo-bis-ácido (2-amidinopropano) (ABAP) (MERCK, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, Estados Unidos);
- Dodecil sulfato de sódio (SDS) (P.M. 288,38; 99% de pureza. LGC BIOTECNOLOGIA, Cotia, Brasil);
- Etanol (Álcool etílico) P.A. (99,8% de pureza, VETEC, Rio de Janeiro, Brasil);
- Fosfato de sódio Monobásico Monohidratado P.A. (SYNTH, Diadema, Brasil);
- Fosfato de sódio Bibásico Heptahidratado P.A. (SYNTH, Diadema, Brasil);
- Gema de ovo;
- Hidróxitolueno butilado (BHT) (MERCK, São Paulo, Brasil);
- Metanol grau CLAE (APPLYCHEM PANREAC QUÍMICA, Barcelona, Espanha);
- Propilenoglicol P.A. $d = 1,035$ (SYNTH, Diadema, Brasil);
- Sangue de carneiro desfibrinado comercial Volume globular: 20-40% (NEWPROV, Pinhais, Brasil);
- Solução salina 0,9% (FARMAX, Sorimax, Divinópolis, Brasil);
- Triton[®] X100 (MERCK, São Paulo, Brasil).

Os solventes orgânicos apresentaram grau analítico e foram usados sem tratamento prévio.

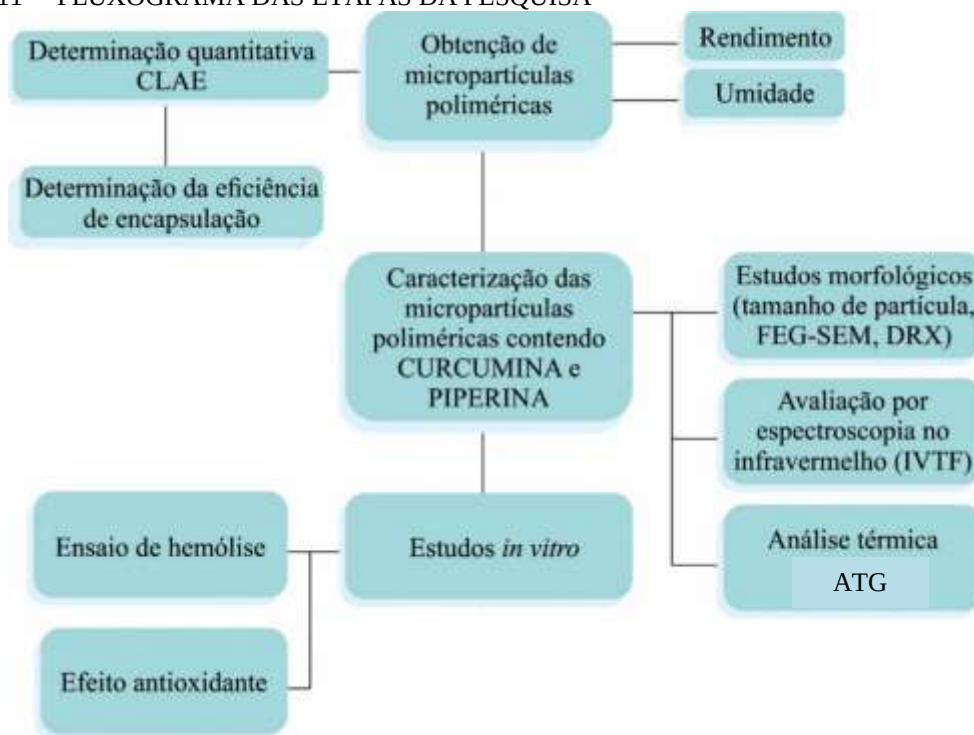
4.2.5 Demais Materiais

- Filtro para seringa PTFE (politetrafluoretileno) (0,20 μm , 0 - 25 mm, Chromafil[®], Xtra PES 20/25, MACHEREY-NAGEL GNBH & CO. KG, Düren, Alemanha);
- Placa de microtitulação para 96 poços (KASVI, São José dos Pinhais, Brasil);
- Seringa para HPLC de 100 μL (Microliter 710, HAMILTON, Bonaduz, Suíça);

4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

O presente estudo foi realizado por meio de diferentes etapas sequenciais. A pesquisa iniciou com a obtenção de micropartículas poliméricas de Eudragit[®] S100 e RS30D contendo CUR e PIP pelo método de secagem por aspersão ou *spray drying*. Em seguida, foi realizada a quantificação dos fitofármacos nas micropartículas, empregando o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), devidamente validado. Os sistemas poliméricos foram caracterizados por meio de estudos morfológicos, espectroscópicos e térmicos. O estudo do efeito antioxidante de CUR e PIP, reduzindo a peroxidação lipídica e demonstrando um efeito hepatoprotetor, bem como, o provável grau de hemólise das micropartículas também foi estudado. As etapas descritas estão esquematizadas no fluxograma da Figura 11.

FIGURA 11 – FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DA PESQUISA



Fonte: A Autora

4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.4.1 Obtenção das Micropartículas Poliméricas contendo Curcumina e Piperina

A obtenção das micropartículas contendo CUR e/ou PIP foi realizada pelo método de secagem por aspersão ou *spray drying*.

As formulações foram preparadas levando em consideração as características físico-químicas dos fármacos e polímeros empregados resultando em microesferas com a mistura molecular de matriz polimérica e do agente encapsulado. Sendo assim, nas preparações com a CUR, tomou-se o cuidado de manipular o fármaco em ambientes escurecidos e de envolver embalagens com papel alumínio para a proteção da luz, bem como para todas as formulações dos fármacos e polímeros e, ainda, os pós-obtidos foram acondicionados em recipientes bem fechados para evitarem a retenção de umidade proveniente do meio externo.

A partir dos fármacos CUR e PIP e dos polímeros poli(ácido metacrílico-co-metacrilato de metila) (Eudragit®) S100 e RS30D foram desenvolvidas as formulações de micropartículas denominadas MS (preparadas com Eudragit® S100) e MRS (preparadas com Eudragit® RS30D). As concentrações teóricas de CUR e/ou PIP utilizadas com ambos os polímeros foram de 0, 10 e 20%, indicadas na Tabela 2.

TABELA 2 – COMPOSIÇÃO DAS FORMULAÇÕES DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO CURCUMINA E PIPERINA

FORMULAÇÃO	COMPOSIÇÃO					
	CUR (g)	PIP (g)	Eudragit® S100 (g)	Eudragit® RS30D (g)	H ₂ O ultrapura (mL)	Álcool etílico (mL)
MS_0	—	—	2,00	—	200	200
MS_C10	0,20	—	1,80	—	200	200
MS_C20	0,40	—	1,60	—	200	200
MS_P10	—	0,20	1,80	—	200	200
MS_P20	—	0,40	1,60	—	200	200
MS_CP10	0,10	0,10	1,80	—	200	200
MS_CP20	0,20	0,20	1,60	—	200	200
MRS_0	—	—	—	6,67	200	200
MRS_C10	0,20	—	—	6,00	200	200
MRS_C20	0,40	—	—	5,34	200	200
MRS_P10	—	0,20	—	6,00	200	200
MRS_P20	—	0,40	—	5,34	200	200
MRS_CP10	0,10	0,10	—	6,00	200	200
MRS_CP20	0,20	0,20	—	5,34	200	200

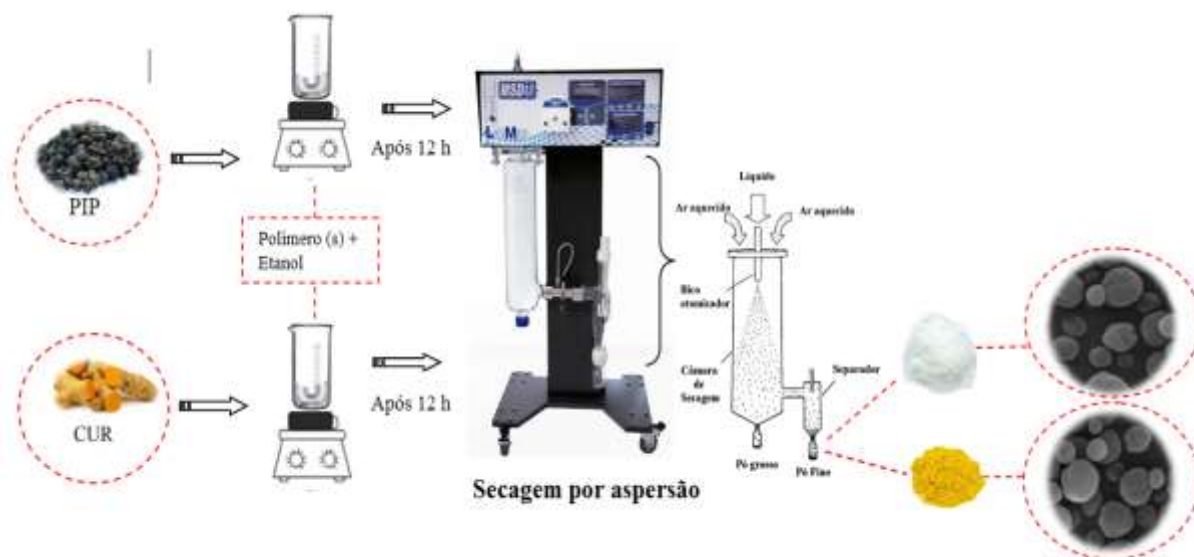
Fonte: A Autora

Nota: MS_0 e MRS_0 (controles negativos, sendo apenas micropartículas de Eudragit® S100 e RS30D sem fármacos); MS_C (micropartículas de Eudragit® S100 e CUR); MS_P (micropartículas de Eudragit® S100 e PIP); MS_CP (micropartículas de Eudragit® S100 com CUR e PIP); MRS_C (micropartículas de Eudragit® RS30D e CUR); MRS_P (micropartículas de Eudragit® RS30D e PIP) e MRS_CP (micropartículas de Eudragit® RS30D com CUR e PIP); 10: concentração a 10% do(s) fármaco(s); 20: concentração a 20% do(s) fármaco(s).

Em béquer graduado, o material polimérico foi dissolvido/disperso vagarosamente até a total dissolução em 200 mL de etanol P.A. por agitação (800 rev.min⁻¹) em agitador magnético (FISATOM, modelo 754A, São Paulo, Brasil), sendo adicionadas em seguida e em igual procedimento, a CUR e a PIR, nesta ordem, quando associadas na mesma formulação. Após a completa dissolução dos fármacos e polímeros, 200 mL de água destilada foi adicionada lentamente pelo centro do béquer com o auxílio de um bastão de vidro e a solução/dispersão aquosa foi mantida sob agitação por 12 horas.

Transcorrido esse período, as formulações foram conduzidas à secagem por aspersão ou atomização, utilizando o equipamento *Spray Dryer* (LABMAQ, modelo MSD 0.5; Ribeirão Preto, Brasil), operando nas seguintes condições: diâmetro do atomizador: 0,82 mm, pressão de atomização: 3 kgf.cm⁻², fluxo do ar de secagem: 50 L.min⁻¹, fluxo de alimentação da formulação em secagem: 0,30.h⁻¹, temperatura de entrada: 135 ± 5°C e temperatura de saída: 60 ± 5°C (Figura 12).

FIGURA 12 – ESQUEMA DE PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.



Fonte: A Autora

4.4.2 Tratamento Superficial do Eudragit® RS30D (de Dispersão Aquosa para Pó)

Para o preparo de misturas físicas, análises de teor de umidade, espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF) e difração de raios X (DRX) utilizou-se o polímero RS30D na forma de pó, após processo de liofilização (liofilizador TERRONI, modelo LD1500A, São Carlos, Brasil), uma vez que a apresentação comercial do polímero é de uma dispersão aquosa. Nesta metodologia não se faz necessário acrescentar nenhum outro reagente de modo a não interferir nos resultados das análises.

4.4.3 Mistura Física

Foram preparadas misturas físicas (MF) homogêneas entre os polímeros utilizados e os fármacos CUR e PIP para uma caracterização comparativa dos dois sistemas microparticulados em estudo. As proporções empregadas para o preparo em massa, foi de 1:1:1 (polímero:CUR:PIP). Todos os pós foram pesados e misturados com auxílio de uma espátula, grau e pistilo, resultando em uma mistura simples e homogênea.

4.4.4 Rendimento das Micropartículas

O rendimento (R) das formulações de micropartículas obtidas pelo método de *spray drying* foi calculado pela razão entre a massa obtida após a preparação e a soma das massas utilizadas do polímero e do(s) fármaco(s), conforme apresentado na Equação 1.

$$R = \frac{\text{massa obtida de micropartícula} \times 100}{\text{massa inicial (polímero + fármacos)}} \quad (1)$$

4.4.5 Determinação do Teor de Umidade

A quantidade de água presente nas micropartículas formuladas foi determinada pelo analisador de umidade (SHIMADZU, modelo MOC63u, Quioto, Japão), previamente calibrado. As amostras foram analisadas individualmente e em triplicata. Após a obtenção das mesmas foi colocado aproximadamente 0,05 g em um prato de alumínio e mantido em aquecimento a 105°C, até peso constante, o que resultou no teor de umidade expresso em porcentagem (%).

4.4.6 Avaliação da Eficiência de Encapsulação

A quantificação dos fármacos CUR e PIP nas micropartículas preparadas foi realizada por meio de CLAE com detecção de arranjos de diodo, empregando método direto analítico previamente validado por Rudnik (2019). Sendo assim, propôs-se uma revalidação do método analítico que atendeu os critérios propostos do *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* – ICH (2005) e pela Resolução 166 de 24 de julho de 2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL, 2017), que recomenda a avaliação dos parâmetros de seletividade, precisão e exatidão para formulações farmacêuticas preparadas. Contudo, são obrigatórios os parâmetros de seletividade e limite de detecção para revalidar um método previamente validado.

A porcentagem da eficiência de encapsulação (EE) foi calculada a partir da concentração dos fármacos nas micropartículas considerando que a concentração do ponto médio da curva analítica equivale a 100% de encapsulação.

4.4.6.1 Equipamentos e condições cromatográficas

As análises por CLAE foram realizadas no cromatógrafo Merck-Hitachi (Lachrom D-7000), equipado com detector de UV L-74000, com bombas L-7100, degaseificador e injetor manual Rheodyne, cujo volume de injeção foi de 20 μL , controlado por software Chromquest. As amostras foram injetadas com auxílio de uma seringa de 100 μL (Microliter710).

A separação cromatográfica foi obtida usando a coluna analítica de fase reversa C_{18} (PHENOMENEX, modelo Synergi 4 μ Polar – RP 80Å, Lc Column 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula 4 μm , Torrance, EUA) com pré-coluna cromatográfica (PHENOMENEX, 4 μ Polar – RP 80 Å, 10 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula 4 μm , Torrance, EUA). A eluição foi realizada de modo isocrático, em temperatura ambiente, sendo a fase móvel constituída de acetonitrila e água (55:45, v/v) acidificados com ácido fórmico a 2%, em fluxo de 1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Foram realizadas corridas com 12 min de duração e o tempo de retenção foi entre 7 e 8 minutos para a CUR e de 9 minutos para a PIP. A detecção dos fármacos foi efetuada em comprimento de onda de 262 nm.

4.4.6.2 Preparo das soluções padrão

A solução padrão estoque foi composta pelos fármacos CUR e PIP associados, onde a mesma foi preparada com metanol grau CLAE (Apply Chem Panreac Química, Barcelona, Espanha) na concentração de 500,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

A partir da solução estoque, foram preparadas diluições em acetonitrila:água (55:45, v/v) acidificadas com ácido fórmico a 2%, a fim de obter soluções com concentração entre 25,0 e 45,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, para um estudo inicial de linearidade e a concentração de 30,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (ponto médio da curva) foi definida como 100%. Para o preparo das diluições, tanto o metanol quanto a acetonitrila foram filtrados e degaseificados em banho de ultrassom Ultrasonic Cleaner (ODONTOBRÁS, 1440DA, Ribeirão Preto, Brasil). A água ultrapura também passou pelo processo de degaseificação e todas as soluções injetadas no cromatógrafo foram previamente filtradas em filtro de politetrafluoretileno (PTFE, Cromafil[®] Xtra, 0,2 μm x 22 mm, Macherey-Nagel GNBH & Co. KG, Düren, Alemanha).

4.4.6.3 Revalidação do método para quantificação de CUR e PIP

Um teste piloto foi realizado nas condições de trabalho reportadas no estudo de Rudnik (2019) com o intuito de verificar se o método analítico em questão seria adequado para este estudo, na obtenção de picos da CUR e PIP de boa resolução. Como controle negativo foi injetada antes de todas as análises, uma amostra contendo os polímeros.

Para a validação do método de quantificação de CUR e PIP em equipamento de CLAE foram estudados os parâmetros de especificidade, linearidade e precisão, conforme os critérios estabelecidos pela ICH e ANVISA mencionados anteriormente.

A **especificidade/seletividade** foi determinada por meio da análise comparativa dos cromatogramas das micropartículas com e sem fármaco, assegurando que nenhum componente da formulação interfira na quantificação da CUR e PIP. Para tanto, foram preparadas soluções de: i) CUR e PIP puras e associadas, formuladas a 10 e 20% para cada polímero em estudo, por meio das micropartículas de Eudragit[®] S100 e RS 30D dispersas ou dissolvidas em metanol (dependendo do polímero) na concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; ii) micropartículas contendo apenas o polímero, tanto Eudragit[®] S100 quanto o RS 30D em metanol na concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Para o preparo das soluções foram pesados em balança analítica (CELTAC, modelo FA2104N, São Paulo, Brasil), 0,005 g de cada pó e solubilizados com 1 mL de metanol em balão volumétrico de 10 mL. Após desgaseificação em banho de ultrassom *Ultrasonic Cleaner* (ODONTOBRÁS, 1440DA, Ribeirão Preto, Brasil) por 20 minutos, os balões foram deixados sob agitação por 24 horas, em agitador magnético (FISATOM, modelo 754A, São Paulo, Brasil). Após a total dissolução dos pós, o volume de 10 mL do balão volumétrico foi ajustado com metanol. As soluções foram preparadas em duplicata e as leituras das formulações, previamente filtradas em filtro de politetrafluoretileno (PTFE, Cromafil[®] Xtra, 0,2 μm x 22 mm, Macherey-Nagel GNBH & Co. KG, Düren, Alemanha), foram determinadas no equipamento de CLAE.

Quanto à **linearidade** do método, a avaliação foi realizada por regressão linear usando o método dos mínimos quadrados, pela média dos pontos de três curvas analíticas autênticas, nas concentrações de 25,0; 30,0; 35,0; 40,0 e 45,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ preparados a partir da solução padrão (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) em fase móvel. A inclinação e outros parâmetros das curvas analíticas foram calculados por regressão linear e análise de variância (ANOVA). O preparo da curva analítica foi realizado em triplicata.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados com base no desvio padrão (DP) e inclinação (S) das curvas analíticas, por meio das Equações 2 e 3.

$$LD = \frac{3,3 \times DP}{S} \quad (2) \quad LQ = \frac{10 \times DP}{S} \quad (3)$$

Segundo o guia do ICH (2005), para a validação de um método a **precisão** é determinada em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária. Entretanto, para a validação do método revalidado foi avaliada apenas o primeiro critério mencionado.

Para **repetibilidade**, três concentrações (15,0; 25,0 e 40,0 µg.mL⁻¹) foram avaliadas em triplicata. A precisão intermediária foi avaliada por desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR) de seis injeções a 50,0 µg.mL⁻¹, analisadas intradia, interdía e com diferentes analistas.

A **exatidão** foi determinada por análises de recuperação, adicionando-se volume de concentração equivalente a 20,0 µg.mL⁻¹ de PIP a soluções de concentração 5,0; 15,0 e 25,0 µg.mL⁻¹, resultando em amostras de 25,0; 35,0 e 45,0 µg.mL⁻¹, respectivamente. Os testes foram feitos em triplicata, e a exatidão do método foi calculada segundo a Equação 4. Onde, CA é a concentração experimental do analito e CTA é a concentração teórica do analito adicionado.

$$\% \text{ Exatidão} = \frac{CA (\text{amostra adicionada}) - CA (\text{amostra}) \times 100}{CTA} \quad (4)$$

4.4.7 Caracterização das Micropartículas Poliméricas

4.4.7.1 Determinação do diâmetro médio

O tamanho médio das micropartículas poliméricas foi determinado por analisador de tamanho de partícula e potencial Zeta (MALVERN INSTRUMENTS, modelo Zetasizer Nano series ZS90, Worcestershire, Reino Unido), após a diluição de uma alíquota de micropartículas em água ultrapura (1:500, v/v) com o auxílio do ultrassom, *Ultrasonic Cleaner* (ODONTOBRÁS, 1440DA, Ribeirão Preto, Brasil), em temperatura ambiente durante 15 minutos. Para cada amostra foram preparadas três diluições (n = 3). Dentre as

condições do equipamento, o dispersante foi a água e o índice de refração empregado foi de 1,33.

4.4.7.2 Análise morfológica e de superfície por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (*Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy* - FEG-SEM)

A microscopia FEG-SEM é uma técnica de bastante versatilidade e usada rotineiramente para a análise morfológica e estrutural de materiais sólidos. O aumento máximo para a visualização de partículas fica entre a microscopia óptica e a eletrônica de transmissão oferecendo imagens satisfatórias. Apresenta como vantagens, a alta resolução e facilidade no preparo das amostras em relação às duas outras microscopias citadas (MALISKI, 2007).

Uma série de fatores como, volume do solvente empregado na formulação, interação dos componentes da formulação com este solvente, altas taxas de evaporação na técnica de secagem por aspersão resultando em partículas mais esféricas e menores que aquelas obtidas por solventes com ponto de ebulição mais alto, podem interferir na uniformidade do tamanho e características da superfície de micropartículas (SCHAFROTH *et al.*, 2012).

A avaliação morfológica e de superfície das micropartículas em comparação aos fármacos e polímeros puros foi realizada em microscópio eletrônico de varredura com efeito de emissão de campo (TESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca) empregando voltagens de aceleração de 15 kV, após tratamento da amostra com ouro em metalizador (SHIMADZU, modelo IC-50 Ion Coater, Quioto, Japão). O registro das eletromicrografias ocorreu por meio da utilização de *software* específico (*Electron Optical Design*).

4.4.7.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IVTF)

O processo de microencapsulação pode resultar em alguma mudança química entre fármacos e polímeros e que podem facilmente serem identificadas. Para tanto, a análise de IVTF promove a caracterização de materiais por meio da detecção de grupos funcionais nas moléculas de um composto. Assim, com a intenção de explorar se o processo de microencapsulação resulta em alguma mudança química, são comparadas as características de bandas entre matérias-primas e formulações. A faixa mais comumente empregada para analisar esses grupos funcionais está situada entre 4000 e 400 cm^{-1} (ROLAND; BHAWANI, 2016; ALMEIDA *et al.*, 2014).

Portanto, os fármacos e polímeros puros, bem como as misturas-físicas e micropartículas poliméricas foram analisadas em equipamento de espectroscopia na região do infravermelho (SHIMADZU, modelo IR-Prestige-21, Quioto, Japão), com valores de intervalos mínimos e máximos, respectivamente, entre 4000 - 400 cm^{-1} e com resolução de 4 cm^{-1} e 32 scan.min^{-1} . Para tanto, foram utilizadas pastilhas de brometo de potássio (KBr) grau microscópio, na proporção (2% m/m) de amostra e KBr, ou seja, utilizando 4 mg de micropartícula e 196 mg de KBr.

4.4.7.4 Difração de raios X (DRX)

A seleção de amostras para a DRX foi semelhante ao IVTF. As mesmas foram analisadas em difratômetro de raios X (RIGAKU, modelo Ultima IV, Quioto, Japão), nas seguintes condições: *scan* de 2°. min^{-1} e 2θ de 5°C a 80°C, radiação $K\alpha$ de cobre ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), corrente contínua de 40 mA e voltagem de 30 kV. Tais condições possibilitam a observação de possíveis picos indicativos de cristalinidade.

4.4.7.5 Análise térmica

4.4.7.5.1 Análise Termogravimétrica (ATG)

A ATG é uma análise qualitativa e baseia-se no estudo da variação de massa de uma amostra resultante de uma transformação física (sublimação, evaporação, condensação) ou química (degradação, decomposição, oxidação), em função do tempo ou da temperatura (OLIVEIRA, 2011), importante para avaliar a estabilidade de um material. Em geral, os polímeros apresentam um decaimento em sua massa entre 350°C e 460°C (FAYAD, 2010).

A variação de massa dos termogramas iniciou a partir de 100°C com a perda da umidade (água). A segunda variação de temperatura indica o decaimento do fármaco e a terceira refere-se à perda do polímero. Tais parâmetros sugerem a estabilidade dos componentes da formulação (OLIVEIRA, 2011). É importante levar em consideração o valor do ponto de fusão de cada um desses na formulação preparada.

A análise termogravimétrica foi realizada no equipamento STA 6000 (PERKIN ELMER, Waltham, MA, Estados Unidos), em que as amostras similares foram colocadas em célula calorimétrica de alumina e aquecidas a uma taxa 10 $^{\circ}\text{C.min}^{-1}$, de 20°C a 600°C, sob fluxo de nitrogênio (50 mL.min^{-1}) constante.

4.5 AVALIAÇÃO *IN VITRO*

4.5.1 Ensaio de Hemólise

O ensaio de hemólise eritrocitária apresenta diversas vantagens para investigar a citotoxicidade de sistemas de liberação modificada. O rompimento da membrana citoplasmática do eritrócito por injúria promove liberação de hemoglobina que pode ser quantificada colorimetricamente por espectrofotometria entre 415 e 570 nm. Dentre as vantagens do ensaio estão rapidez, eficiência, simplicidade e baixo custo da técnica analítica empregada (CÓTICA *et al.*, 2012; UNSWORTH *et al.*, 2008).

No estudo realizado foram utilizados eritrócitos comerciais de sangue de carneiro desfibrinado (LABORCLIN, Pinhais, Brasil), sem anticoagulante e com volume globular previamente avaliado a 33%. A concentração ideal empregada na análise foi de 5% onde foi preparada com tampão fosfato de pH=7,4, resfriado a 4°C.

As soluções etanólicas dos fármacos foram preparadas na concentração de 70 µL/mL, sob agitação por sonificação. Em seguida, adicionou-se a um tubo de ensaio 10 µL desta suspensão dos fármacos e micropartículas e 450 µL da suspensão a 5% dos eritrócitos. Após agitação por 24 horas a 120 rpm foram centrifugadas a 4.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi submetido à leitura óptica a 540 nm. Para os controles negativo e positivo foram utilizados, respectivamente, os eritrócitos a 5% com tampão e os eritrócitos a 5% com tampão e água. Para cada tubo branco das amostras foi adicionado tampão e a respectiva amostra.

Todos os testes foram realizados em triplicata e o grau de hemólise foi calculado pela Equação 5. Onde, H é a porcentagem de hemólise e as absorbâncias das amostras, branco das amostras, controles negativo e positivo são representadas, respectivamente, por *At*, *Ab*, *ACneg* e *ACpos*.

$$H = \frac{(At - Ab) - ACneg}{ACpos - ACneg} \times 100 \quad (5)$$

4.5.2 Estudo do Potencial Antioxidante pela Determinação de Espécies Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) – PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

As micropartículas preparadas a partir dos polímeros Eudragit® S100 e RS30D contendo 10% e 20% de CUR (MS_C10; MS_C20; MRS_C10; MRS_C20), PIP (MS_P10;

MS_P20; MRS_P10; MRS_P20) e ainda, CUR e PIP (MS_CP10; MS_CP20; MRS_CP10; MRS_CP20) foram selecionadas para serem testadas e comparadas com a atividade dos fármacos CUR, PIP puros e em associação em um modelo farmacológico *in vitro*. O propósito foi de avaliar o efeito dessas formulações nas dislipidemias e nas hepatopatias por meio da detecção de subprodutos reativos do ácido tio barbitúrico (TBARS) produzidos pela peroxidação lipídica.

A atividade antioxidante foi analisada por meio da porcentagem do índice antioxidante com o emprego da metodologia modificada de Moraes *et al.* (2006). Para tanto, a formação do malonaldeído (MDA) foi obtida a partir da oxidação de ácidos graxos insaturados. A concentração utilizada para as amostras e do controle positivo (BHT), respectivamente foi de 70 µg/mL e 50 µg/mL. O procedimento foi realizado em quintuplicata e sempre protegido da luz. Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,5 mL de solução de gema de ovo (10% p/v), 0,1 mL de amostra ou padrão (1000 ppm) dissolvido previamente em etanol P.A. e completado o volume para 1 mL com água destilada. Na sequência, para cada tubo de ensaio foi adicionado 0,05 mL de solução de dihidroclorato de 2,2'-azo-bis-ácido (2-amidinopropano) (ABAP) 0,07 mol.L⁻¹ para induzir a peroxidação lipídica, 1,5 mL de solução de ácido acético 20% (pH 3,5), 1,5 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,8% p/v em solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 1,1% p/v. Os tubos foram fechados e mantidos pelo período de 60 minutos à 95°C. Após o resfriamento dos tubos, foi adicionado a cada um deles, 5 mL de n-butanol e que após agitação, foram centrifugados a 3.000 rpm durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram submetidos à leitura em 532 nm do espectrofotômetro. O tubo utilizado para a leitura do branco continha n-butanol. E, para os controles negativo e positivo foram adicionados nos seus respectivos tubos, todos os reagentes mencionados anteriormente seguindo o mesmo volume e ordem. Porém, sem acrescentar as amostras constituídas de fármacos puros, associados e com micropartículas. Na sequência, foram acrescentados o etanol no tubo do controle negativo e butil-hidroxitolueno (BHT) no do controle positivo.

O índice antioxidante (IA%) foi calculado pela Equação 6. Onde, C é a absorbância do controle completamente oxidado e A é a média aritmética da absorbância da amostra.

$$IA\% = \frac{(1 - A) \times 100}{C} \quad (6)$$

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados resultantes da caracterização e atividades de segurança analítica e antioxidante das micropartículas poliméricas foram avaliados pelo programa GraphPad Prism, versão 5.01 para Windows. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. A análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey foi usado para comparações estatísticas, com nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

As micropartículas poliméricas preparadas a partir do Eudragit® S100 e RS30D foram obtidas com sucesso pelo método de *spray drying*.

Após a secagem, os produtos da aspersão apresentaram um aspecto macroscópico pulverulento, de coloração variando de acordo com o fármaco utilizado na formulação conforme a Tabela 3.

Nas micropartículas que não continham nenhum fármaco (MS_0 e MRS_0) verificou-se um aspecto físico de pó branco, enquanto que, nas que continham PIP (MS_P10, MS_P20, MRS_P10 e MRS_P20), a coloração observada foi levemente amarelada e, naquelas que continham CUR (MS_C10, MS_C20, MRS_C10 e MRS_C20) resultaram em uma coloração alaranjada. Tais colorações foram semelhantes àquelas observadas para a PIP e a CUR pura, respectivamente. Nas formulações que continham CUR e PIP associadas (MS_CP10, MS_CP20, MRS_CP10 e MRS_CP20), as micropartículas também apresentaram cor predominantemente alaranjada.

TABELA 3 – CARACTERÍSTICAS FÍSICAS MACROSCÓPICAS DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE EUDRAGIT® S100 E RS30D FORMULADAS COM CURCUMINA E PIPERINA OBTIDAS POR *SPRAY DRYING*

MICROPARTÍCULAS		COLORAÇÃO	ASPECTO
Polímeros	MS_0	Branco	Pulverulento
	MRS_0		
Polímeros + PIP	MS_P10; MS_P20	Levemente amarelado	
	MRS_P10; MRS_P20		
Polímeros + CUR	MS_C10; MS_C20	Alaranjado	
	MRS_C10; MRS_C20		
Polímeros + PIP + CUR	MS_CP10; MS_CP20	Alaranjado	
	MRS_CP10; MRS_CP20		

Fonte: A Autora

Nota: MS_0 e MRS_0 (micropartículas de Eudragit® S100 e RS30D sem fármacos); MS_C (micropartículas de Eudragit® S100 e CUR); MS_P (micropartículas de Eudragit® S100 e PIP); MS_CP (micropartículas de Eudragit® S100 com CUR e PIP); MRS_C (micropartículas de Eudragit® RS30D e CUR); MRS_P (micropartículas de Eudragit® RS30D e PIP) e MRS_CP (micropartículas de Eudragit® RS30D com CUR e PIP); 10: concentração a 10% do(s) fármaco(s); 20: concentração a 20% do(s) fármaco(s).

5.1.1 Rendimento e Teor de Umidade

Os resultados percentuais de rendimento e teor de umidade estão apresentados na forma de valor médio e desvio padrão, das determinações em triplicata e podem ser observados na Tabela 4.

TABELA 4 – PERCENTUAIS DE RENDIMENTO E TEOR DE UMIDADE DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE EUDRAGIT® S100 E RS30D FORMULADAS COM CURCUMINA E PIPERINA

FORMULAÇÃO	RENDIMENTO (%)	UMIDADE (%)
	Média ± DP*; DPR**	Média ± DP*; DPR**
MS_0	69,33 ± 0,75; 1,08	4,53 ± 0,14; 3,09
MS_C10	37,2 ± 0,41; 1,10	2,54 ± 0,16; 6,3
MS_C20	37,5 ± 0,98; 2,61	3,31 ± 0,37; 11,12
MS_P10	57,81 ± 1,02; 1,76	4,93 ± 0,52; 10,55
MS_P20	53,39 ± 0,26; 0,48	3,37 ± 0,35; 10,39
MS_CP10	56,43 ± 0,22; 0,39	3,81 ± 0,16; 4,20
MS_CP20	40 ± 0,97; 2,42	4,52 ± 0,23; 5,09
MRS_0	12,41 ± 0,18; 1,45	3,26 ± 0,14; 4,29
MRS_C10	17,36 ± 0,32; 1,84	3,47 ± 0,31; 8,93
MRS_C20	18,4 ± 0,67; 3,64	3,33 ± 0,25; 7,51
MRS_P10	11,83 ± 0,15; 1,27	4,01 ± 0,24; 5,99
MRS_P20	16 ± 0,46; 2,87	3,69 ± 0,21; 5,69
MRS_CP10	20,87 ± 0,13; 0,62	5,39 ± 0,49; 9,09
MRS_CP20	15,76 ± 0,88; 5,58	4,86 ± 0,24; 4,94

Fonte: A Autora

Nota: MS_0 e MRS_0 (micropartículas de Eudragit® S100 e RS30D sem fármacos: controles negativos); MS_C (micropartículas de Eudragit® S100 e CUR); MS_P (micropartículas de Eudragit® S100 e PIP); MS_CP (micropartículas de Eudragit® S100 com CUR e PIP); MRS_C (micropartículas de Eudragit® RS30D e CUR); MRS_P (micropartículas de Eudragit® RS30D e PIP) e MRS_CP (micropartículas de Eudragit® RS30D com CUR e PIP), 10: concentração a 10% do(s) fármaco(s); 20: concentração a 20% do(s) fármaco(s); *DP: desvio padrão; **DPR: desvio padrão relativo; média (n=3).

Os rendimentos das micropartículas foram calculados com base na Equação 1. Os resultados obtidos variaram entre 11,83 e 69,33%, sendo que as formulações com o Eudragit® S100 apresentaram rendimento superior àquelas contendo o RS30D.

Os resultados encontrados para o teor de umidade dos fármacos puros CUR e PIP e ainda, dos polímeros Eudragit® S100 e RS30D foram, respectivamente, 2,0; 2,92; 3,61 e 3,85%. Estas informações permitiram, por meio de comparação, avaliar o método de obtenção de micropartículas empregado e demonstraram que o teor de umidade nas mesmas com o polímero Eudragit® S100 apresentou valores relativamente menores em relação ao polímero

de partida, variando entre 2,54 e 4,93%. O mesmo não foi observado para as micropartículas formuladas com o Eudragit® RS30D, onde os valores variaram de 3,26 a 5,39%, ligeiramente superiores aos materiais de partida.

Os valores encontrados entre as micropartículas com maiores rendimentos estão condizentes com os de outros trabalhos que utilizaram a metodologia de *spray drying*. Assim como, os resultados para o teor de umidade indicaram que o processo de secagem por aspersão foi efetivo na remoção da mistura água-etanol (50:50, v/v) empregada como solvente no processo de microencapsulação. A remoção da água proporciona um aumento na estabilidade química, físico-química e microbiológica, aumentando assim a vida útil do produto final (LOCH-NECKEL *et al.*, 2018).

Em relação ao estudo de Biscaia (2018), que utilizou nas mesmas condições para a técnica de *spray drying*, os mesmos polímeros e o fármaco PIP, os resultados encontrados para o teor de umidade em ambos os estudos ficaram próximos. Porém, quando comparados os rendimentos, somente para os resultados das micropartículas com o Eudragit® S100 foi observado semelhança, e notadamente, para aquelas com o RS30D, não se obteve um bom rendimento, o que resultou valores bem inferiores aos encontrados no referido estudo. Neste contexto, vale lembrar que o Eudragit® RS30D é uma dispersão sólida a 30%, onde a massa foi corrigida para o emprego nas formulações e que, a temperatura de transição vítrea deste polímero (Tg 55°C) é inferior a do S100 (Tg 130 ± 5°C).

Sabe-se que a obtenção de rendimentos altos na metodologia de *spray drying* é dificultada pela aderência de quantidade significativa do material nas paredes da câmara de secagem e do ciclone durante o processo (SOSNIK; SEREMETA, 2015).

Sendo assim, entende-se que menores concentrações de sólidos necessitam que grande quantidade de solvente seja eliminada e, portanto, requerem uma maior quantidade de calor para a secagem (MASTERS, 1985). Durante o processo de secagem, a temperatura do ar de entrada é determinante na qualidade do produto obtido, ou seja, o aumento na temperatura do material de entrada facilita o processo, pois normalmente reduz a tensão superficial e a viscosidade, facilitando a formação de gotículas (LOCH-NECKEL *et al.*, 2018; OLIVEIRA, PETROVICK, 2010).

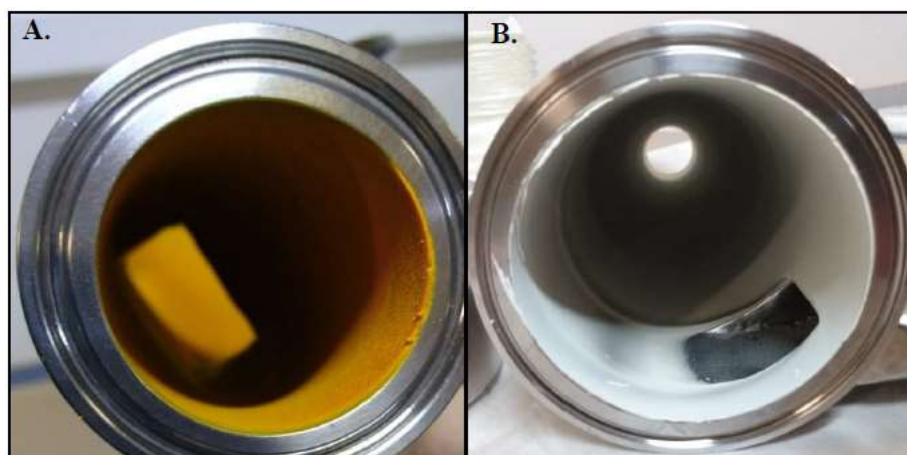
A pegajosidade está relacionada à baixa temperatura de transição vítrea em alguns tipos de produtos e que quando expostos às baixas temperaturas de secagem, estão sujeitos a sofrerem transformação física passando de um estado vítreo para um gomoso. E assim, resultando em pós que apresentam uma maior interação com a água e ainda, maiores coesão e adesão. Alguns trabalhos fazem uso de agentes de transportes que atuam como

adjuvantes/aditivos de secagem buscando melhorar o rendimento pela técnica de *spray drying* e a menor retenção do material na parede da câmara de secagem, por diminuir a higroscopicidade do produto. Os agentes mais comumente empregados são amido, ciclodextrinas, dióxido de silício coloidal, fosfato tricálcico, gelatina, goma arábica, lactose, maltodextrinas, entre outros (LOCH-NECKEL *et al.*, 2018; VARNER, 2014).

Dentre os aditivos citados, o mais comumente utilizado na indústria farmacêutica para a obtenção de micropartículas e disponível em várias apresentações, é o dióxido de silício coloidal amorfo, cujo nome comercial de referência é Aerosil® (EVONIK Industries AG, Darmstadt, Alemanha). Estudos que utilizaram este aditivo na utilização do método de secagem por evaporação do solvente, como o de Domingues e Guterrez (2008), o rendimento das micropartículas nanorrevestidas de indometacina em PCL e Eudragit® RS100 obtidas foi de 70 a 77% e teor de umidade com valores inferiores a 1%. Já o de Loch-Neckel *et al.* (2018), os rendimentos encontrados foram de 87,8 a 94% e resultados de teor de umidade entre 1 e 1,8%, para extratos secos de carotenoides obtidos a partir da biomassa da microalga *Haematococcus pluvialis*.

Os baixos rendimentos encontrados com as micropartículas formuladas com o polímero RS30D estão de acordo com as evidências encontradas por Mohylyuk *et al.* (2020), num estudo acerca do rendimento de micropartículas obtidas por meio dos polímeros Eudragit® NM30D e RS/RL30D. As formulações estudadas compararam os rendimentos com e sem o uso de aditivos de secagem (Aerosil®, estearato de magnésio, talco e citrato de trietila) para a obtenção de micropartículas de succinato de metoprolol pelo método de secagem por evaporação do solvente. Os valores de rendimento encontrados com o uso de aditivos foram maiores que 99% e os sem o uso dos mesmos não ultrapassaram 50% de rendimento. Os autores ainda demonstraram imagens macro e microscópica dos aglomerados de partículas aderidas no cilindro do *spray drying* e aferiram o tamanho que foi superior a 355 µm. A adesão no cilindro do equipamento é fato rotineiro na obtenção de micropartículas nesta metodologia e que, no presente estudo ocorreu principalmente com o emprego do polímero RS30D (Figura 13).

FIGURA 13 – IMAGEM MACROSCÓPICA DOS AGLOMERADOS DE MICROPARTÍCULAS DE EUDRAGIT® RS30D COM CURCUMINA E PIPERINA ADERIDAS NO CICLONE DO SPRAY DRYER



Fonte: A Autora

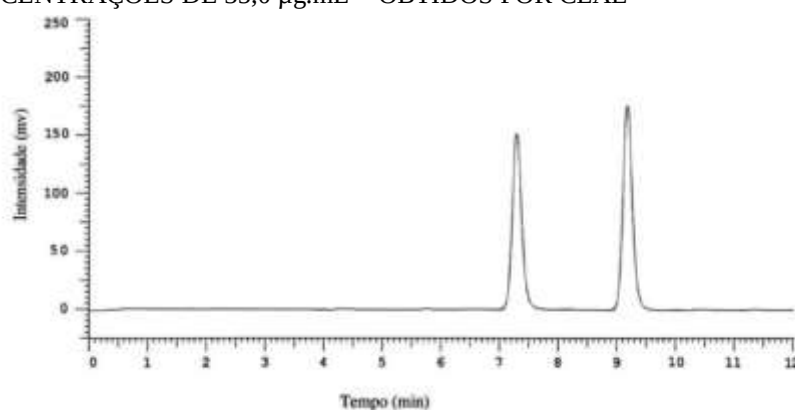
Nota: A.: MRS_C20 e B.: MRS_P20.

5.1.2 Revalidação do Método Analítico para Quantificação de CUR e PIP

No presente estudo foram avaliados os critérios de seletividade/especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, além da precisão e da exatidão conforme os critérios propostos pelo ICH (2005) e BRASIL (2017) para a revalidação de um método analítico.

O cromatograma do padrão analítico de CUR e PIP na concentração de $35 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 14) mostra a especificidade do método para a CUR e PIP simultaneamente, frente a possíveis impurezas. Já a especificidade referente às micropartículas foi demonstrada por meio da comparação dos cromatogramas das mesmas sem o fármaco (MS_0 e MRS_0) e contendo a CUR e PIP (MS_CP10 e MRS_CP10), ilustrados nas Figuras 15 e 16, respectivamente.

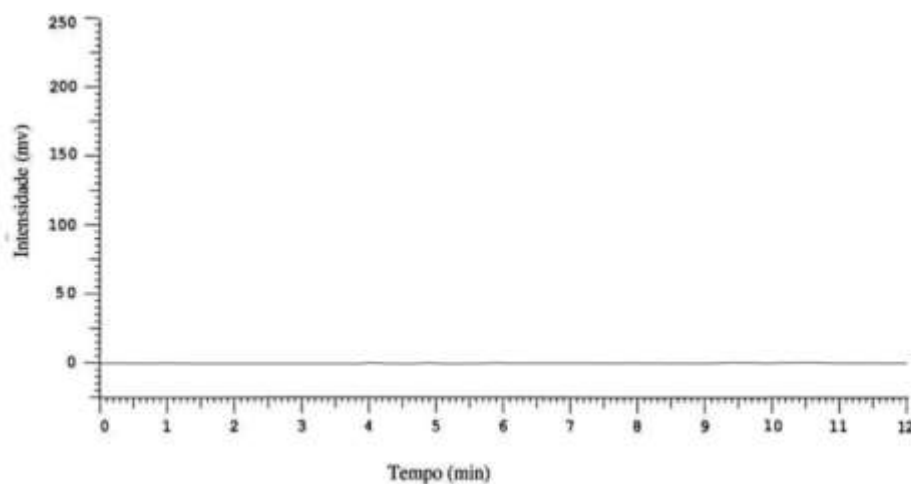
FIGURA 14 – CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES ANALÍTICOS DE CURCUMINA E PIPERINA NAS CONCENTRAÇÕES DE $35,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ OBTIDOS POR CLAE



Fonte: A Autora

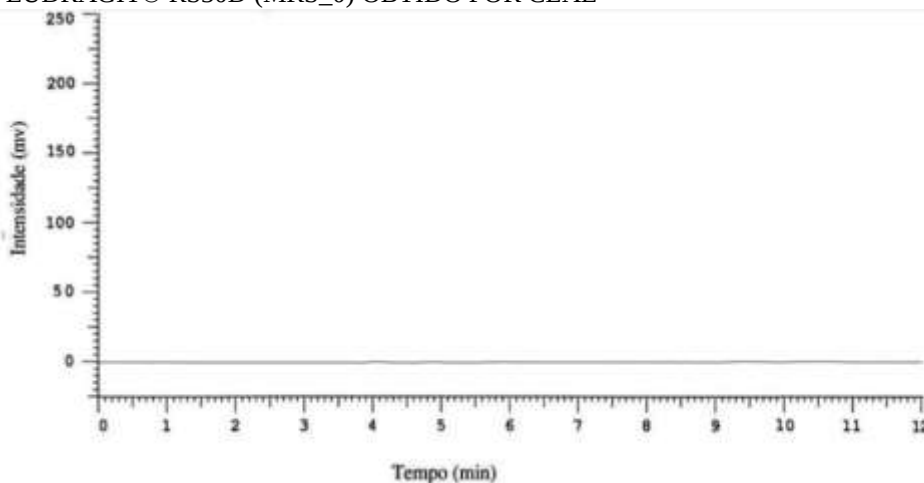
A análise dos cromatogramas evidenciou que houve especificidade do método revalidado, sem interferências no tempo de retenção dos fármacos, conforme os critérios exigidos pela ICH (2005) e BRASIL (2017).

FIGURA 15 – CROMATOGRAMA PARA AS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO EUDRAGIT® S100 (MS_0) OBTIDO POR CLAE



Fonte: A Autora

FIGURA 16 – CROMATOGRAMA PARA AS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO EUDRAGIT® RS30D (MRS_0) OBTIDO POR CLAE



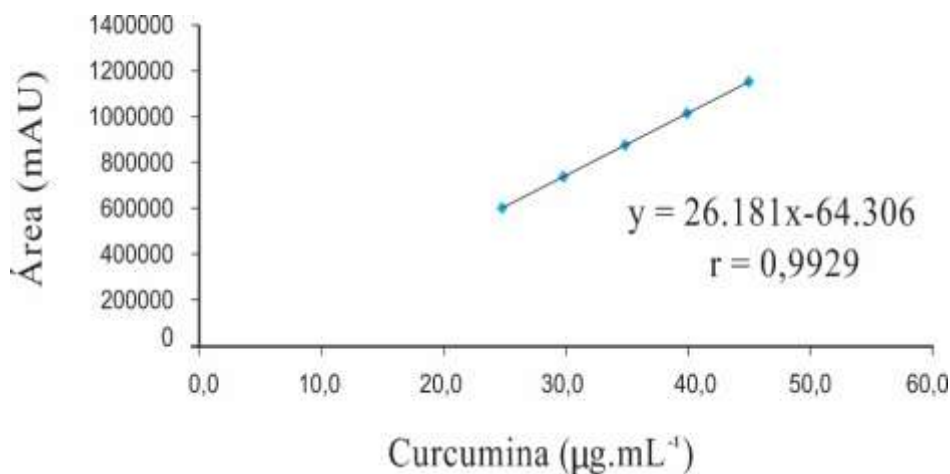
Fonte: A Autora

Para a determinação da linearidade do método revalidado foram avaliados cinco níveis de concentração, sendo eles 25,0; 30,0; 35,0; 40,0; 45,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Portanto, a relação linear entre a área do pico e as concentrações de CUR e PIP podem ser observadas em uma faixa de concentração de 25,0 a 45,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

As equações lineares obtidas pelo método dos mínimos quadrados, bem como, os resultados para o coeficiente de correlação foram $y = 26.181x - 64.306$ ($n = 3$, $r = 0,9929$)

para a CUR e $y = 37.112x - 106.960$ para a PIP ($n = 3$, $r = 0,9976$) e ainda, podem ser observadas na Figura 17 e 18 que ilustram as curvas analíticas médias obtidas para quantificação da CUR e PIP. O método revalidado indicou uma regressão linear significativa para ambos os fármacos.

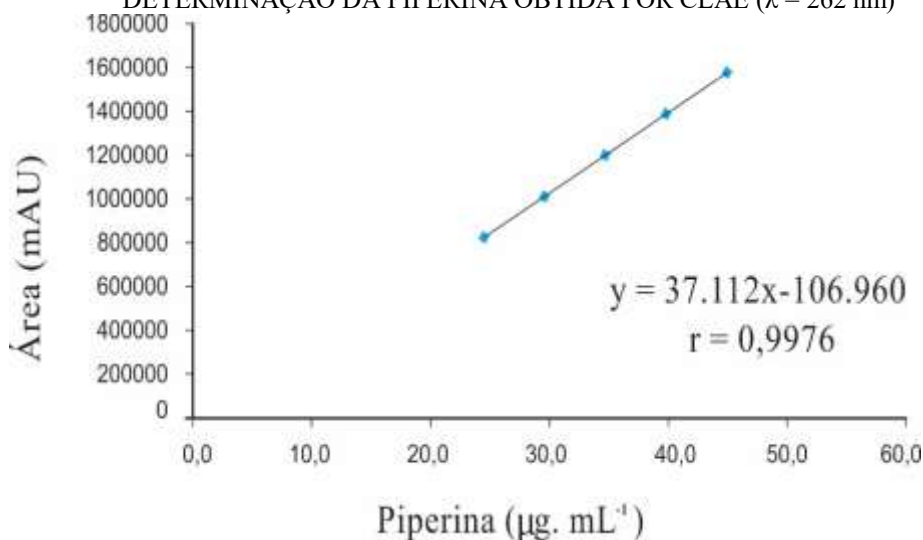
FIGURA 17 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CURVA ANALÍTICA MÉDIA PARA A DETERMINAÇÃO DA CURCUMINA OBTIDA POR CLAE ($\lambda = 262$ nm)



Fonte: A Autora

O DPR da inclinação das curvas analíticas, tanto da CUR quanto da PIP, foi de 3,14 e 1,27%, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com o limite proposto pelo ICH (2005) e pela BRASIL (2017) de até 5%. O valor de b, pelo teste ANOVA está dentro do intervalo de confiança de 95% da curva analítica.

FIGURA 18 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CURVA ANALÍTICA MÉDIA PARA A DETERMINAÇÃO DA PIPERINA OBTIDA POR CLAE ($\lambda = 262$ nm)



Fonte: A Autora

Segundo o *Analytical Methods Committee* (AMC), o teste de falta de ajuste (*lack of fit*) deve ser aplicado para avaliar a variação dos valores residuais quanto à linearidade de um método analítico, uma vez que um valor de coeficiente de correlação próximo a 1 não é necessariamente o resultado de relação linear (GOMES et al., 2015; HADAD; EMARA; MAHMOUD, 2009). As Tabelas 5 e 6 demonstram o teste ANOVA para a linearidade, onde a falta de ajuste é considerada quando o valor de F é menor que o valor de F tabelado, em um intervalo de 95% de confiança ($\alpha = 0,05$). Portanto, a regressão linear não apresentou falta de ajuste para as curvas analíticas estudadas (KLEIN; LONGHINI; DE MELLO, 2012).

TABELA 5 – RESULTADOS OBTIDOS POR ANOVA PARA LINEARIDADE DO MÉTODO ANALÍTICO REVALIDADO PARA A DETERMINAÇÃO DA CURCUMINA

CUR	SS	DF	MS	F	F _{tab}
Modelo	2,432487E+09	1	2,432487E+09	6,262	4,667
Resíduo	7,419371E+09	13	570720826	Linear	
Falta de ajuste	616251879	3	205417293	0,301946	3,708
Erro puro	6,803119E+09	10	680311886	Sem falta de ajuste	

Fonte: A Autora

Legenda: SS: soma dos quadrados; DF: graus de liberdade; MS: média dos quadrados, F : valor F do teste; F_{tab} : valor do F tabelado.

TABELA 6 – RESULTADOS OBTIDOS POR ANOVA PARA LINEARIDADE DO MÉTODO ANALÍTICO REVALIDADO PARA A DETERMINAÇÃO DA PIPERINA

PIP	SS	DF	MS	F	F _{tab}
Modelo	6,729084E+09	1	6,729084E+09	17,863	4,667
Resíduo	4,897170E+09	13	376705370	Linear	
Falta de ajuste	1,872222E+09	3	624073979	2,063090	2,307
Erro puro	3,024948E+09	10	302494787	Sem falta de ajuste	

Fonte: A Autora

Legenda: soma dos quadrados; DF: graus de liberdade; MS: média dos quadrados, F : valor F do teste; F_{tab} : valor do F tabelado.

Os dados provenientes do estudo da linearidade possibilitaram calcular os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), por meio das equações 2 e 3, mencionadas anteriormente. Pode-se dizer que o método teve valores bem reduzidos para estes parâmetros, onde a menor concentração para detecção e quantificação foi 0,203 e 0,614 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, para a CUR e nas mesmas condições, 0,042 e 0,127 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para a PIP. A Tabela 7 resume os parâmetros da curva.

TABELA 7 – RESUMO DOS PARAMETROS DA CURVA ANALÍTICA DA CURCUMINA E PIPERINA PELO MÉTODO REVALIDADO DE RUDNIK (2019)

Linearidade		
	CUR	PIP
Faixa linear ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	25,0 – 45,0	25,0 – 45,0
Limite de Detecção ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,203	0,042
Limite de Quantificação ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,614	0,127
Dados de regressão		
<i>N</i>	3	3
Inclinação (α)	26181	37112
Desvio Padrão da Inclinação	1608	124574
Desvio Padrão Relativo da Inclinação (%)	3,14	1,27
Intercepto (<i>b</i>)	-64.306	-106.960
Coefficiente de correlação (<i>r</i>)	0,9929	0,9976

Fonte: A Autora

Legenda: $y = ax + b$, onde *x* é a concentração do composto e *y* é a área sob a curva.

Conforme o ICH (2005), a precisão de um método analítico descreve a proximidade das medidas individuais de uma substância quando o procedimento é aplicado repetidamente para múltiplas alíquotas. Para tanto, estuda-se a repetibilidade de modo a expressar a precisão sob as mesmas condições de operação durante um curto intervalo de tempo.

Os resultados da repetibilidade e precisão para o método desenvolvido no estudo de Rudnik (2019) estão demonstrados na Tabela 8.

Foi avaliada a precisão intermediária do método revalidado, expressa como variação intradia, interdia e com diferentes analistas. O teste *t-student* avalia a existência de qualquer diferença entre os diferentes níveis de um fator. Até 5% não há diferença significativa na área do pico e no tempo de retenção da CUR e PIP (BRASIL, 2017). O DPR para repetibilidade nas concentrações 15,0; 25,0 e 40,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram de 1,26; 1,76 e 1,29% para a CUR e ainda, de 2,08; 1,63 e 0,67% para a PIP, respectivamente. Quanto à precisão intermediária, os valores de DPR para intradia, interdia e segundo analista, respectivamente foram de 2,56; 2,54 e 3,97% para a CUR e de 2,70; 1,94 e 3,74% para a PIP.

A exatidão foi verificada pelo método de adição do padrão, a qual apresentou valores de desvio padrão relativo de 2,43% para a CUR e 1,90% para a PIR. Como foi menor que 5%, o método pode ser considerado exato para ambos os fármacos.

TABELA 8 – DADOS DA REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA PARA O MÉTODO REVALIDADO DE OBTENÇÃO DE CURCUMINA E PIPERINA POR CLAE

	Concentração Teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração Experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$, Média $\pm$ DP*)	DPR** (%)
Repetibilidade (n = 6)			
CUR	15,0	15,04 $\pm$ 0,19	1,26
	25,0	24,93 $\pm$ 0,44	1,76
	40,0	39,65 $\pm$ 0,51	1,29
PIP	15,0	14,89 $\pm$ 0,31	2,08
	25,0	26,40 $\pm$ 0,43	1,63
	40,0	40,18 $\pm$ 0,27	0,67
Precisão intermediária			
Intradia (n = 3)			
CUR	50,0	49,23 $\pm$ 1,26	2,56
PIP	50,0	52,13 $\pm$ 1,41	2,70
Interdia (n = 3)			
CUR	50,0	51,17 $\pm$ 1,30	2,54
PIP	50,0	50,47 $\pm$ 0,98	1,94
Diferentes analistas (n = 3)			
CUR	50,0	45,86 $\pm$ 1,82	3,97
PIP	50,0	53,47 $\pm$ 2,00	3,74
Média $\pm$ DP* (n = 9)			
CUR	50,0	48,75 $\pm$ 1,46	2,99
PIP	50,0	52,02 $\pm$ 1,46	2,81

Fonte: A Autora

Legenda: *DP: desvio padrão; ** DPR: desvio padrão relativo.

Desta forma, todos os parâmetros necessários para a revalidação do método analítico foram cumpridos, podendo o mesmo ser empregado para a determinação da EE dos fármacos nas micropartículas poliméricas.

5.1.3 Quantificação de CUR e/ou PIP incorporadas às Micropartículas

O teor de fármaco encontrado nas micropartículas poliméricas contendo CUR e/ou PIP foi calculado por meio das equações da reta obtidas pelo método revalidado de Rudnik (2019) e podem ser observados na Tabela 9.

TABELA 9 – TEOR DE CURCUMINA E PIPERINA INCORPORADAS NAS MICROPARTÍCULAS DE EUDRAGIT® S100 E RS30D E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE) PELO MÉTODO DE *SPRAY DRYING*

Micropartículas	Concentração teórica (mg.g ⁻¹)		Concentração encapsulada (mg.g ⁻¹)		EE, *DP, **DPR		
	CUR	PIP	CUR	PIP	CUR	PIP	
S100	MS_C10	100,00	-	105,87 ± 0,13	-	105,88 ± 0,27; 0,25	-
	MS_C20	200,00	-	162,84 ± 0,95	-	81,42 ± 0,95; 1,16	-
	MS_P10	-	100,00	-	101,83 ± 1,78	-	101,83 ± 0,90; 0,88
	MS_P20	-	200,00	-	202,24 ± 0,13	-	101,12 ± 0,25; 0,24
	MS_CP10	50,00	50,00	48,18 ± 0,45	54,87 ± 0,42	97,68 ± 0,45; 0,46	109,75 ± 1,08; 0,98
	MS_CP20	100,00	100,00	91,65 ± 3,45	104,05 ± 3,45	91,65 ± 0,77; 0,84	104,05 ± 1,73; 1,66
RS30D	MRS_C10	100,00	-	99,93 ± 0,18	-	99,93 ± 0,18; 0,18	-
	MRS_C20	200,00	-	169,30 ± 1,93	-	84,65 ± 0,31; 0,36	-
	MRS_P10	-	100,00	-	100,37 ± 0,97	-	100,37 ± 0,67; 0,66
	MRS_P20	-	200,00	-	205,00 ± 1,88	-	102,50 ± 1,67; 1,63
	MRS_CP10	50,00	50,00	46,74 ± 0,64	48,88 ± 0,56	93,47 ± 0,23; 0,25	97,76 ± 0,87; 0,89
	MRS_CP20	100,00	100,00	92,68 ± 1,07	93,37 ± 1,32	92,68 ± 0,49; 0,52	93,37 ± 1,04; 1,11

Fonte: A Autora

Legenda: MS_C (micropartículas de Eudragit® S100 e CUR); MS_P (micropartículas de Eudragit® S100 e PIP); MS_CP (micropartículas de Eudragit® S100 com CUR e PIP); MRS_C (micropartículas de Eudragit® RS30D e CUR); MRS_P (micropartículas de Eudragit® RS30D e PIP) e MRS_CP (micropartículas de Eudragit® RS30D com CUR e PIP); 10: concentração do(s) fármaco(s) a 10%; 20: concentração do(s) fármaco(s) a 20%*DP: desvio padrão; **DPR: desvio padrão relativo; média (n=3).

A partir do teor de fármacos encapsulados foi possível calcular a EE para as micropartículas preparadas em etanol:água (50:50, v/v). Os resultados encontrados para o polímero S100 foram de 81,42 a 105,88% e para o RS30D foram de 84,65 a 102,50% sendo adequados para esta metodologia. Foi observado que em geral, as concentrações a 10% de fármacos nas micropartículas de ambos os polímeros obtiveram praticamente os melhores resultados de EE.

Assim, pode-se concluir que o método revalidado foi adequado para a quantificação de CUR e/ou PIP, as variações demonstradas podem ser justificadas pela metodologia utilizada para a obtenção das micropartículas, e que este estudo apresentou maiores resultados de EE do que em outros reportados na literatura.

No estudo de Silva (2014), foram produzidas micropartículas de CUR e PCL revestidas com gelatina obtidas pela técnica de evaporação do solvente, as quais revelaram EE

de 81%. Em outro estudo realizado com nanopartículas de PLGA e CUR sintetizadas por nanoprecipitação em três diferentes sistemas, foram observados valores de EE 70 a 80%. Já para a PIP em nanonopartículas, Baspinar *et al.*(2018) obtiveram resultados de EE entre 72 a 87%. Pesquisas que associaram CUR e PIP visando aumentar a biodisponibilidade da CUR empregando métodos de liberação modificada de fármacos, também demonstraram resultados significativos de EE. Dentre os quais se podem citar, o de Schaikh *et al.*(2009), que obteve nanopartículas de PLGA e CUR a 5, 10 e 15% por meio da técnica de emulsão, difusão e evaporação do solvente e resultou respectivamente em 84,6, 79,7 e 76,9% de EE. As nanopartículas foram administradas em animais associadas com uma suspensão de PIP e CUR puras. Outro estudo foi o de Moorthi *et al.*(2013), que obtiveram nanopartículas dos fármacos associados com Eudragit[®] E100 e ainda desenvolveram o método analítico de quantificação em CLAE, a EE resultou em 91,87 a 94,0% para a PIP e 94,79 a 95,55% para a CUR.

Em relação ao trabalho de Biscaia (2018), que obteve micropartículas de Eudragit[®] RS30D e S100 com PIP para avaliar os efeitos no tratamento da obesidade, os resultados da EE foram de 66,36 a 90,15% apresentando melhores resultados com a concentração de 10% do fármaco em sua composição. Isto ocorreu principalmente com as micropartículas do polímero RS30D, determinando que estas formulações fossem utilizadas para a avaliação biológica do estudo.

Pode-se dizer que o método de obtenção de micropartículas desenvolvido, apresenta-se adequado para os sistemas modificados de liberação de fármacos propostos.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

5.2.1 Analisador de Tamanho de Partículas

As partículas obtidas apresentaram tamanhos variando entre 1,86 e 7,55 μm e apresentaram concordância no que tange à definição de uma micropartícula. Para as formulações preparadas com o Eudragit[®] S100, os resultados encontrados foram de 1,86 a 2,72 μm , sendo mais uniformes e menores em relação às micropartículas de RS30D, as quais apresentaram tamanhos que variaram de 2,52 a 7,55 μm .

Os diâmetros obtidos foram menores que os encontrados em outros estudos por *spray drying*, tanto para micropartículas de Eudragit[®] S100 (KURMEN; ALVAREZ; RIVERO, 2015; CRUZ *et al.*, 2010; ESPOSITO *et al.*, 2002), quanto para o RS30D (MOHYLYUK *et al.*, 2020; PAOLINO *et al.*, 2016). A obtenção de partículas com tamanho reduzido pode

melhorar a solubilidade favorecendo a taxa de dissolução do fármaco pelo aumento da superfície de contato (KAWABATA *et al.*, 2011).

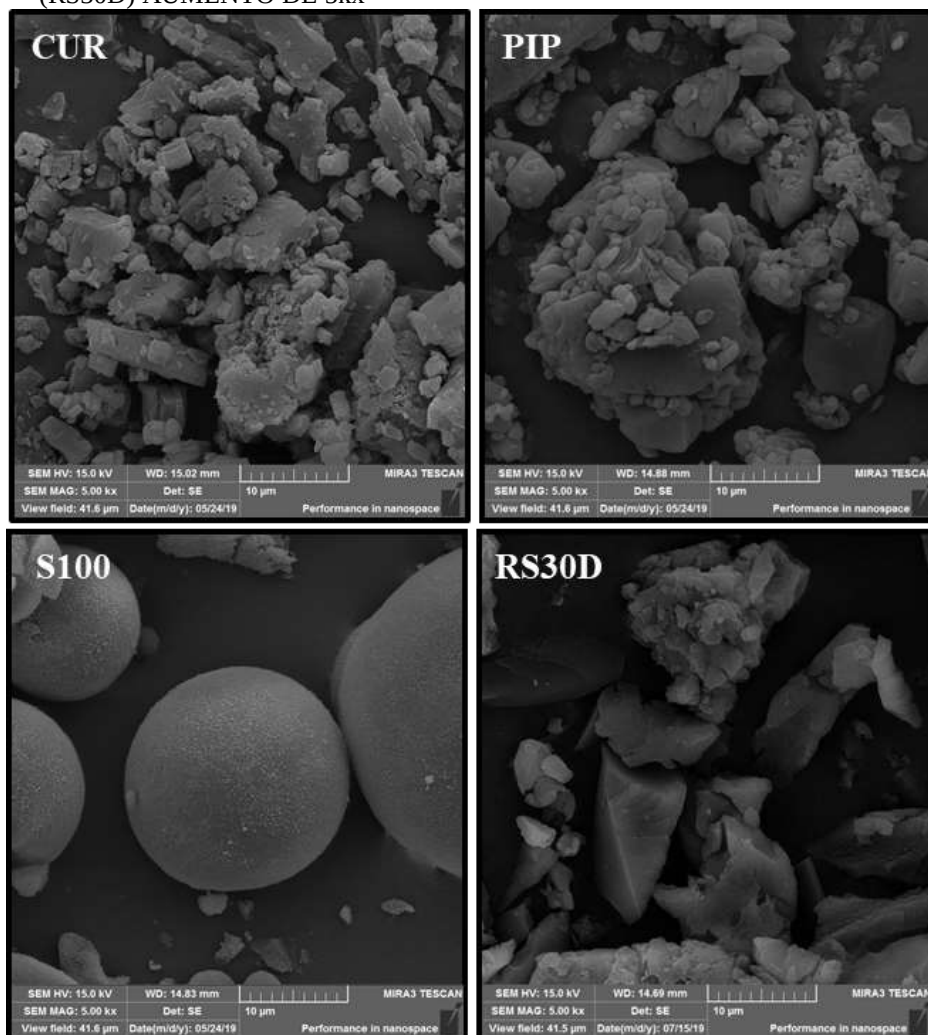
5.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (*Field Emission Gun Scannig Electron Microscopy* – FEG-SEM)

As características morfológicas e de superfície dos fármacos, polímeros e micropartículas puras e associadas em estudo podem ser observadas nas imagens obtidas por FEG-SEM.

A Figura 19 demonstrou as características dos fármacos CUR e PIP, bem como, dos polímeros utilizados para a obtenção das micropartículas. Os fármacos se apresentam nas formas de cristais confirmando o caráter cristalino mencionado na literatura. E, dependendo do solvente utilizado para sua extração podem existir variações de regularidade e porosidade superficial na estrutura.

Para a CUR, a microscopia revelou estruturas retangulares de tamanhos variados, com bordas irregulares, na presença de aglomerados de partículas de tamanhos menores. Tais características foram condizentes com as imagens observadas nos estudos de Freitas (2018), Sharma e Pathak (2016), Silva *et al.*(2015) e Arya e Pathak (2014). A PIP diferiu da CUR em apresentar estruturas com bordas mais arredondadas em sua superfície cristalina e também, em maior variação de tamanho. Imagem igualmente encontrada nos estudos de Biscaia (2018) e Padalkar e Gaikar (2008).

FIGURA 19 – ELETROMICROGRAFIAS FEG-SEM DOS FÁRMACOS PUROS: CURCUMINA (CUR) E PIPERINA (PIP), DOS POLÍMEROS EUDRAGIT® S100 (S100) E EUDRAGIT® RS30D (RS30D) AUMENTO DE 5kx



Fonte: A Autora

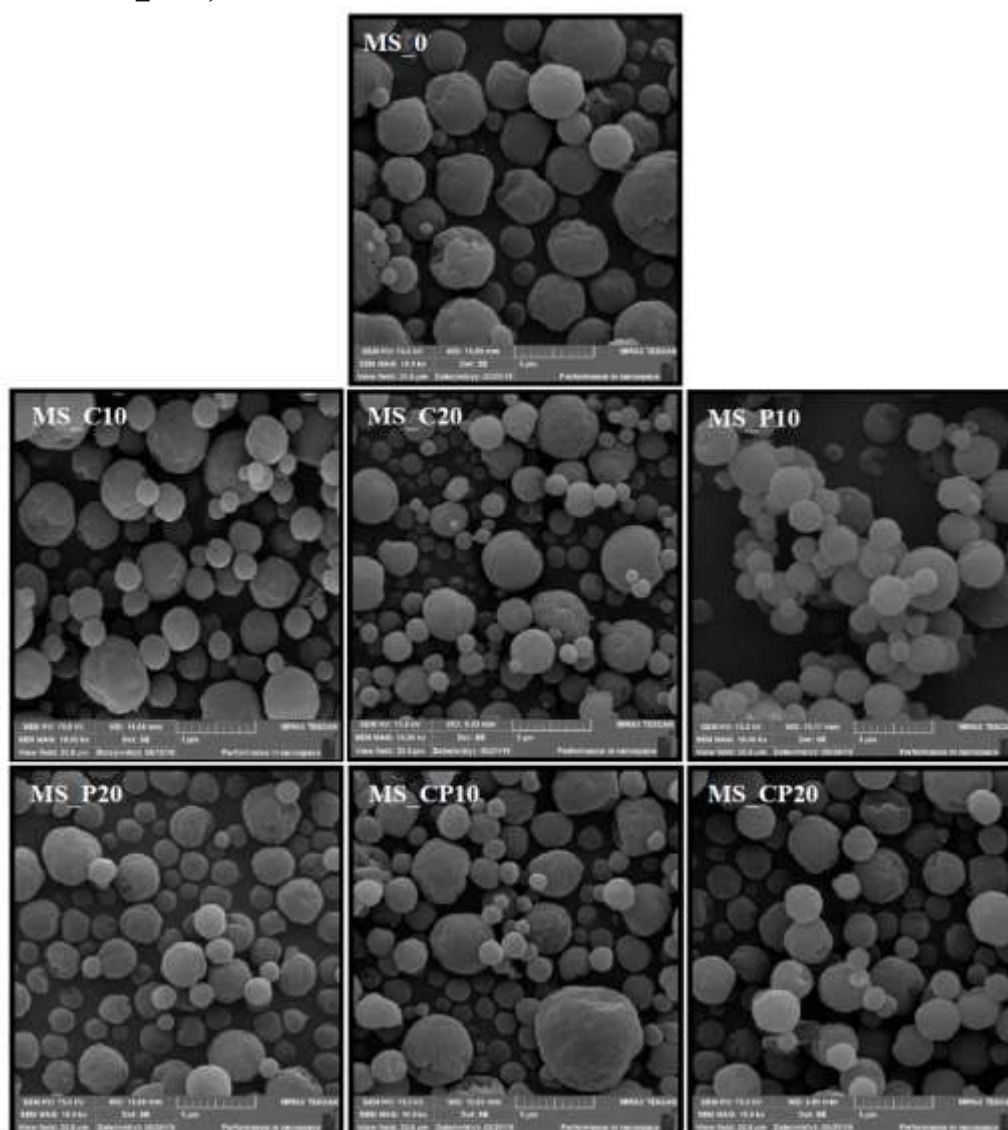
O polímero Eudragit® S100 apresentou formato esférico com pouca variação de tamanho, sendo esta característica comum entre polímeros que estão na forma de pó. Para as fotomicrografias do RS30D foi necessária a sua prévia liofilização ou secagem em estufa a 37°C, pois a sua apresentação é na forma de dispersão aquosa a 30%. A morfologia apresentada foi característica de cristais amorfos em diferentes tamanhos. Trabalhos como os de Sa-Barreto *et al.* (2017) relatam também certa aspereza em sua superfície, similar aos *pellets* de mesma constituição produzidos por aquecimento. Wu e Macginitie (2001) relatam ainda em seus estudos sobre o RS30D, um comportamento frágil e dúctil da estrutura.

A imagem das micropartículas obtidas com o polímero Eudragit® S100 (Figura 20) preparadas em etanol:água (50:50, v/v), demonstrou característica geométrica esférica ou semi esférica, de superfície lisa, com algumas irregularidades. Não apresentou

sobre a sua superfície estruturas menores que sinalizariam o acúmulo de fármaco nesta região, remetendo a eficaz encapsulação do fármaco na micropartícula. O tamanho médio encontrado nas fotomicrografias confere com os encontrados no analisador de tamanho de partículas.

Estes resultados são semelhantes a outros relatados na literatura utilizando a mesma metodologia e mesmo polímero para a obtenção das micropartículas (CRUZ *et al.*, 2010; FARAGO, 2007; ESPOSITO *et al.*, 2002).

FIGURA 20 – ELETROMICROGRAFIAS FEG-SEM DAS MICROPARTÍCULAS PREPARADAS A PARTIR DO POLÍMERO EUDRAGIT® S100 COM OU SEM A ADIÇÃO DE CURCUMINA E/OU PIPERINA: MS_0, MS_C10, MS_C20, MS_P10, MS_P20, MS_CP10 E MS_CP20, AUMENTO DE 10 kx



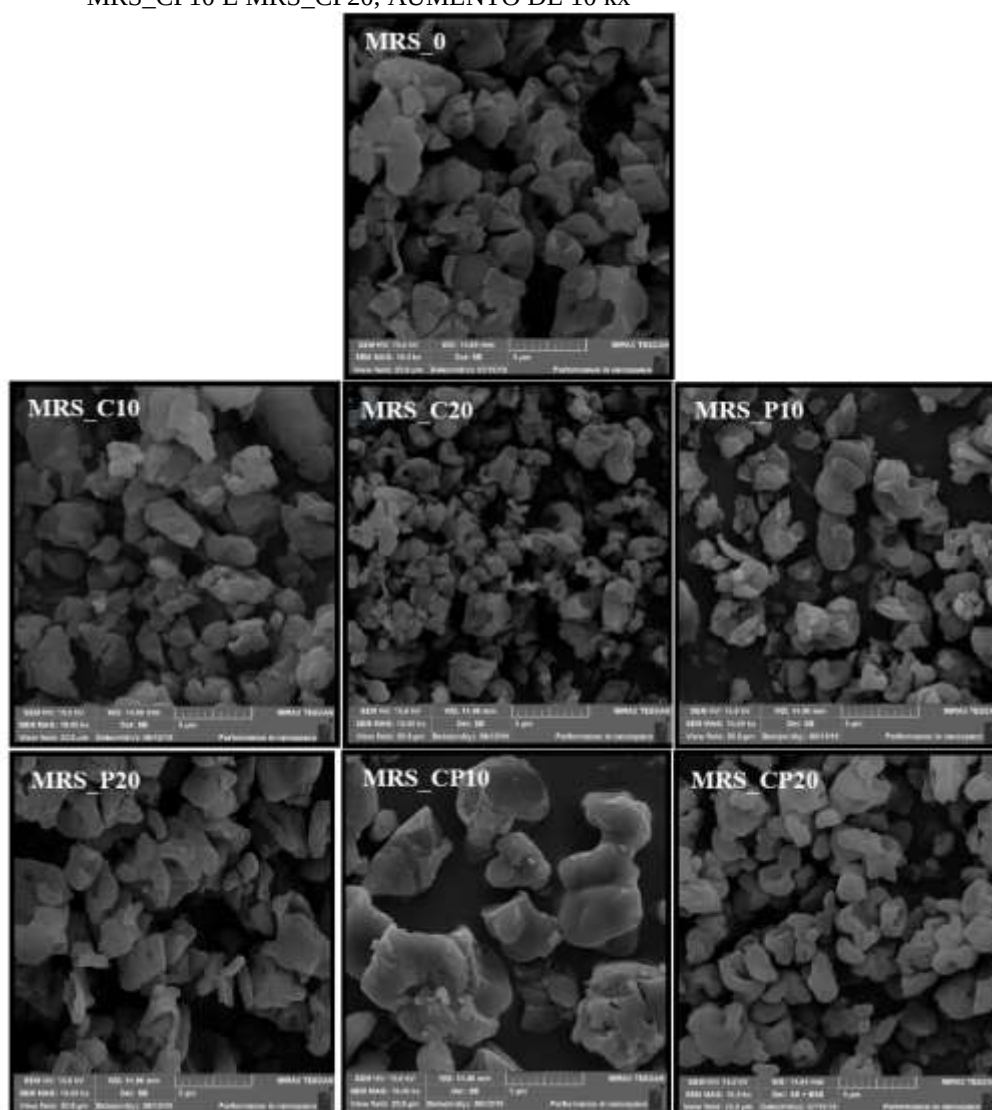
Fonte: A Autora

Para as micropartículas produzidas com o polímero Eudragit® RS30D (Figura 21), a morfologia apresentou estruturas colabadas entre si, com formato arredondado e com

inúmeras concavidades e rugosidades em sua superfície. Essas irregularidades são decorrentes da ação da capilaridade ao seu redor no momento da extração do líquido para o exterior criando uma pressão interna negativa e o aspecto semelhante ao de um eritrócito (KULKARNI; NAIK, 2013; WALTON, 2000). Também não foi constatada a presença de fármaco livre na superfície das micropartículas, sugerindo a total microencapsulação dos fármacos. Resultado semelhante foi obtido nos trabalhos de Rattes e Oliveira (2007), e Biscaia (2018), na obtenção de micropartículas por *spray drying* usando o polímero RS30D.

Não foram verificadas diferenças na morfologia e superfície das micropartículas quanto à ausência ou adição de diferentes concentrações dos fármacos nas formulações.

FIGURA 21 – ELETROMICROGRAFIAS FEG-SEM DAS MICROPARTÍCULAS PREPARADAS A PARTIR DO POLÍMERO EUDRAGIT® RS30D COM OU SEM A ADIÇÃO DE CURCUMINA E/OU PIPERINA: MRS_0, MRS_C10, MRS_C20, MRS_P10, MRS_P20, MRS_CP10 E MRS_CP20, AUMENTO DE 10 kx



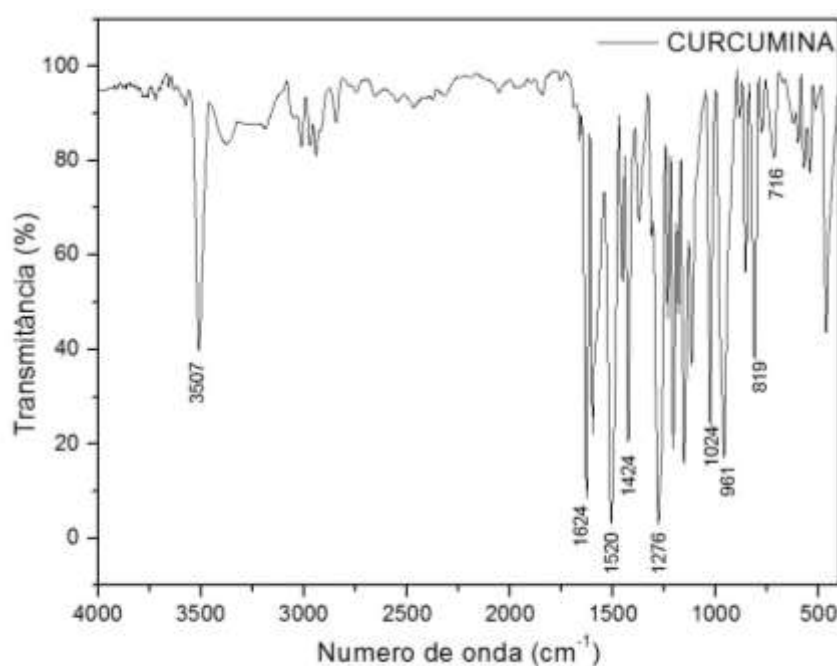
Fonte: A Autora

5.2.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF)

Neste estudo a espectroscopia de infravermelho foi empregada para análise dos espectros dos fármacos (CUR e PIP) e polímeros (Eudragit[®] S100 e RS30D) puros, bem como misturas físicas (MF EUD S100 e MF EUD RS30D) e formulações com adição ou não de fármaco(s), com o objetivo de averiguar a interação química entre fármacos e carreadores. Os sistemas de micropartículas foram organizados conforme o polímero empregado, ou seja, MS_0, MS_C10, MS_C20, MS_CP10 e MS_CP20 para o EUD S100 e ainda, MRS_0, MRS_C10, MRS_C20, MRS_P10, MRS_P20, MRS_CP10 e MRS_CP20 para o EUD RS30D.

O espectro de IVTF da CUR pode ser observado na Figura 22 e demonstrou bandas em 3507 cm^{-1} referente ao grupo OH, em 1624 cm^{-1} a banda refere-se ao estiramento de $\text{C}=\text{O}$ de cetona conjugada, enquanto bandas em 1520 e 1424 cm^{-1} correspondem ao estiramento de $\text{C}=\text{C}$ de anel aromático e alifático, respectivamente. A banda em 1276 cm^{-1} foi atribuída à vibração de $\text{C}-\text{O}$, e em 1024 cm^{-1} , ao estiramento de $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ de éter. As bandas em 961 , 819 e 716 cm^{-1} indicam vibrações de flexão da ligação CH de grupos alcenos ($\text{RCH}=\text{CH}_2$), em conformidade com os estudos de Araújo (2019), Sharma e Pathak (2016), Paiva (2015), Pan *et al.* (2006) e Kolev *et al.* (2005).

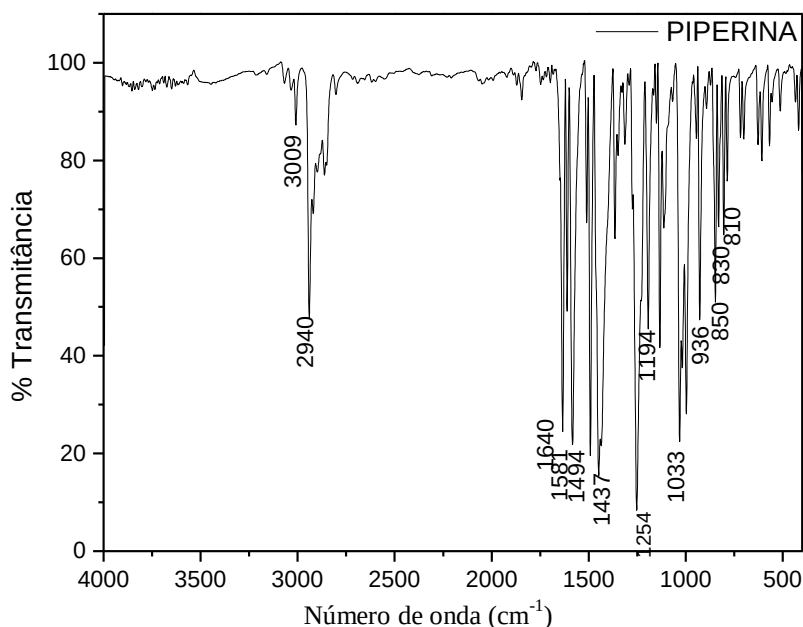
FIGURA 22 - ESPECTRO IVTF DA CURCUMINA PURA



Fonte: A Autora

O espectro do fármaco PIP (Figura 23), apresentou bandas de absorção na região de 3009 cm^{-1} , referente ao estiramento aromático do grupo CH. As bandas em 2940 cm^{-1} correspondem à vibração de estiramento alifática assimétrico do grupo CH_2 . A banda em 1640 cm^{-1} refere-se à vibração de estiramento $\text{CO} - \text{N}$, enquanto em 1581 cm^{-1} corresponde ao estiramento da ligação $\text{C} = \text{C}$ do anel aromático. A banda em 1494 cm^{-1} caracteriza a deformação angular do grupamento CH_2 . A vibração de estiramento assimétrico da ligação $= \text{C} - \text{O} - \text{C}$ está representado em 1254 e 1194 cm^{-1} , e em 1033 cm^{-1} a vibração de estiramento simétrico deste grupo. A banda em 936 cm^{-1} corresponde ao alongamento vibracional da ligação $\text{C} - \text{O}$ (mais característica). A banda em 936 cm^{-1} corresponde à vibração de estiramento do grupamento $\text{C} - \text{O}$, enquanto as detectadas em 850 , 830 e 810 cm^{-1} referem-se à vibração angular das ligações CH (SAHU; CHOURASIYA; GAJBHIYE, 2012; PENG PONG *et al.* 2014).

FIGURA 23 - ESPECTRO IVTF DA PIPERINA PURA

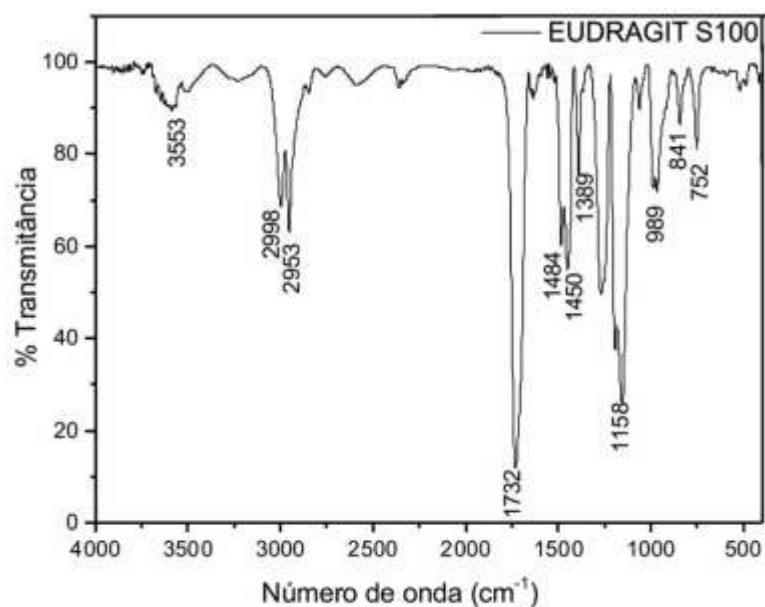


Fonte: A Autora

Os espectros IVTF realizados para os polímeros estão ilustrados nas Figuras 24 e 25 e são semelhantes entre si, visto que os polímeros apresentam a mesma estrutura base em sua composição. Nos espectros obtidos, foi apresentada uma banda larga próxima a 3500 cm^{-1} atribuída à presença de grupos OH e água. As bandas detectadas entre 2900 e 3000 cm^{-1} representam estiramentos simétricos de $\text{C} - \text{H}$ em grupos metila, confirmados pelas bandas em 1389 , 1450 e 1484 cm^{-1} . Em 2950 e 2850 cm^{-1} , são demonstrados os estiramentos assimétricos e simétricos de $\text{C} - \text{H}$ de grupos metilenos ($-\text{CH}_2-$), respectivamente, enquanto

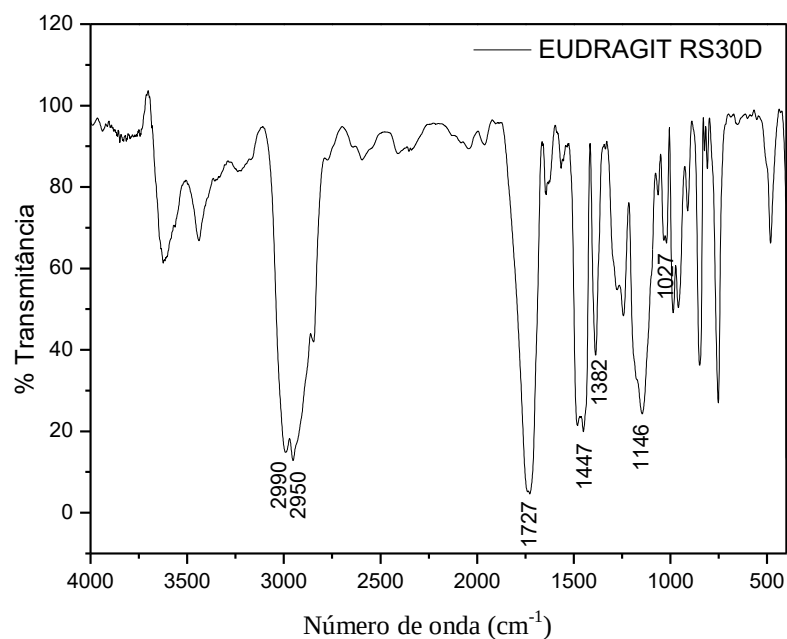
em 1732 cm^{-1} observam-se bandas características de vibração C = O de ácido carboxílico esterificado (ésteres alifáticos). Estes resultados são condizentes com os encontrados na literatura (BISCAIA, 2018; BUNHAK *et al.*, 2015; KHUATHAN; PONGJANYAKUL, 2014; FARAGO, 2007; COLOMÉ, 2006; GHAFARI *et al.*, 2007).

FIGURA 24 – ESPECTRO IVTF DO POLÍMERO EUDRAGIT® S100



Fonte: A Autora

FIGURA 25 – ESPECTRO IVTF DO POLÍMERO EUDRAGIT® RS30D



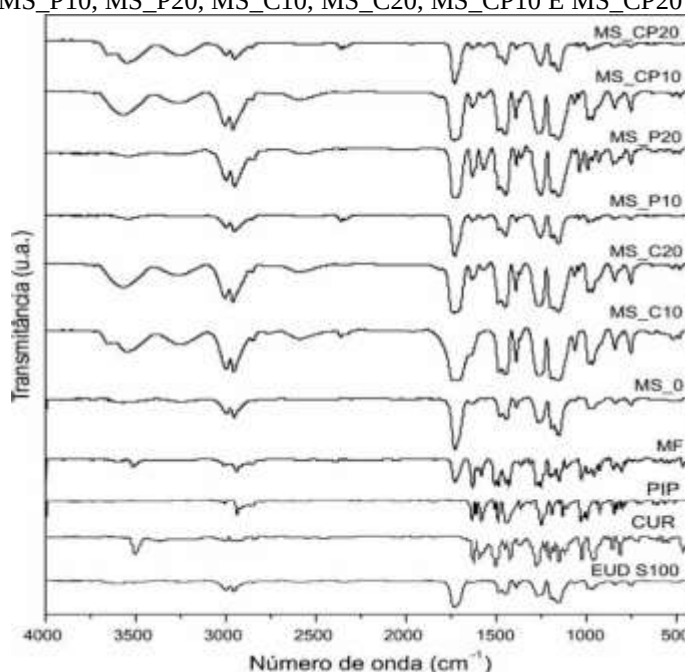
Fonte: A Autora

As figuras 26 e 27 apresentam os comparativos entre os espectros IVTF dos fármacos, polímeros, misturas físicas e micropartículas preparadas com e sem a adição de CUR e/ou PIP a partir dos polímeros Eudragit® S100 e RS30D, respectivamente.

Tanto as MF quanto às micropartículas apresentaram as mesmas bandas de absorção encontradas nos fármacos e polímeros presentes na formulação.

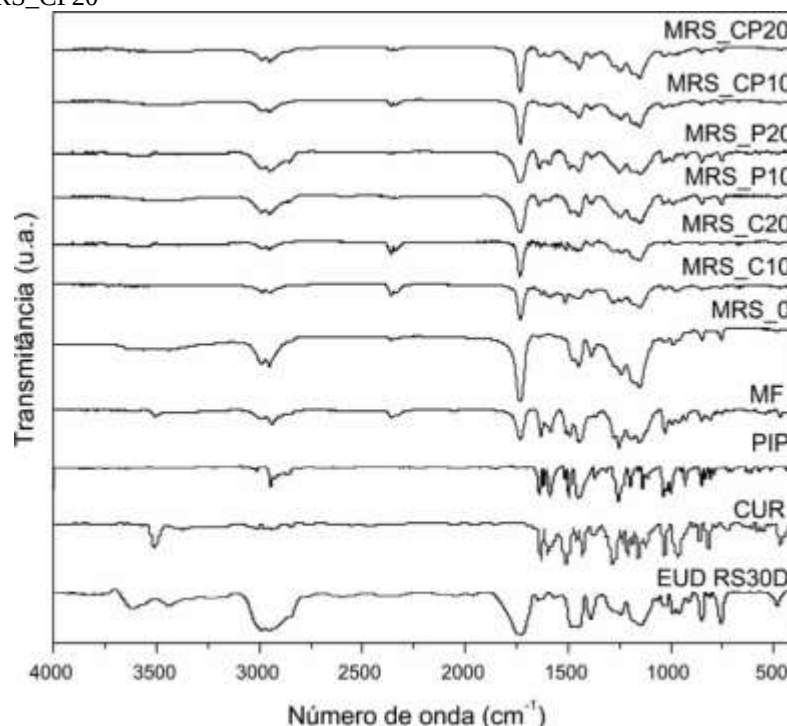
Os resultados dos espectros comparativos dos fármacos puros e dos polímeros apresentaram as suas bandas características, assim como também das micropartículas demonstrando que o processo de obtenção destas últimas ou da própria análise no equipamento de IVTF foi satisfatório e não apresentou interferência de outras partículas nas formulações.

FIGURA 26 – ESPECTRO IVTF DO EUDRAGIT® S100 (EUD S100), DOS FÁRMACOS CUR E/OU PIP, DA MISTURA FÍSICA (MF – EUD S100:CUR:PIP; 1:1:1) E DAS MICROPARTÍCULAS MS_0, MS_P10, MS_P20, MS_C10, MS_C20, MS_CP10 E MS_CP20



Fonte: A autora

FIGURA 27 – ESPECTRO IVTF DO EUDRAGIT® RS30D (EUD RS30D), DOS FÁRMACOS CUR E/OU PIP, DA MISTURA FÍSICA (MF – EUD RS30D:CUR:PIP; 1:1:1) E DAS MICROPARTÍCULAS MRS_0, MRS_P10, MRS_P20, MRS_C10, MRS_C20, MRS_CP10 E MRS_CP20



Fonte: A Autora

5.2.4 Difração de Raios X (DRX)

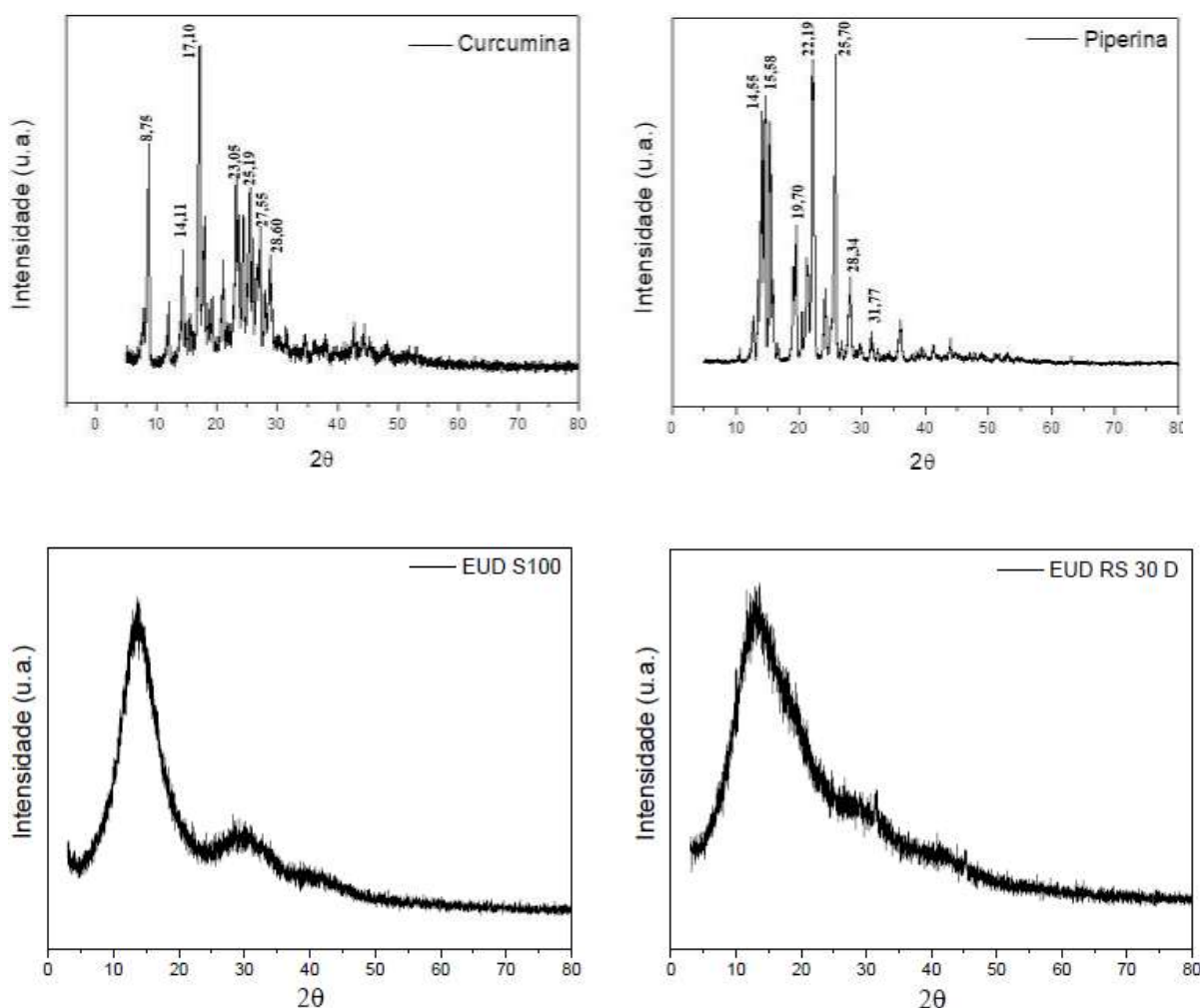
A difração de raios X avaliou a característico do fármaco quanto à sua cristalinidade ou amorfismo, influenciando diretamente na velocidade de dissolução do fármaco e consequentemente seu potencial de solubilidade. Nos difratogramas obtidos nesta análise, a forma cristalina demonstrou picos bem definidos em relação à forma amorfa, a qual é apresentada na forma de halo e condizente com a estrutura de microcápsulas. Sólidos amorfos são mais solúveis devido à disposição aleatória de suas moléculas, requerendo menor quantidade de energia para separá-las (PATEL *et al.*, 2015; KAWABATA *et al.*, 2011; RIEKES *et al.*, 2011).

Os difratogramas para os fármacos puros CUR e PIP, e os polímeros S100 e RS30D utilizados na obtenção das micropartículas estão apresentados na Figura 28. As análises de difração de raios X para a CUR demonstraram picos bem característicos em aproximadamente $2\theta = 8,75^\circ, 14,11^\circ, 17,10^\circ, 23,05^\circ, 25,19^\circ, 27,55^\circ$ e $28,60^\circ$ além de outros de menores intensidades, evidenciando a sua natureza cristalina. Esses resultados são compatíveis com os estudos de Sharma e Pathak (2016) e Silva *et al.* (2015).

O difratograma da PIP apresentou picos bem definidos na região de $2\theta = 14,55^\circ$, $15,58^\circ$, $19,70^\circ$, $22,19^\circ$, $25,70^\circ$, $28,34^\circ$ e $31,77^\circ$, e outros com pequena intensidade, também demonstrando sua cristalinidade, conforme dados da literatura (VINOD *et al.*, 2011; OZAWA *et al.*, 2017).

Os polímeros não apresentaram picos de cristalinidade bem definidos, confirmando sua natureza de caráter amorfo (MITHU *et al.*, 2017; HIGASHI *et al.*, 2015; FARAGO, 2007).

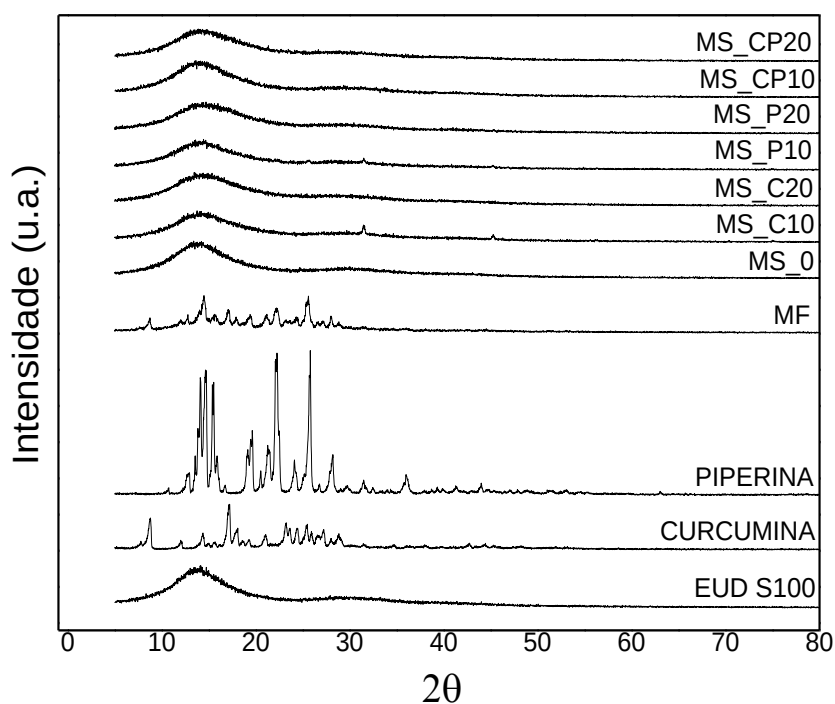
FIGURA 28 – DIFRATOGRAMAS DA CURCUMINA, PIPERINA E POLÍMEROS S100 E RS30D



Fonte: A Autora

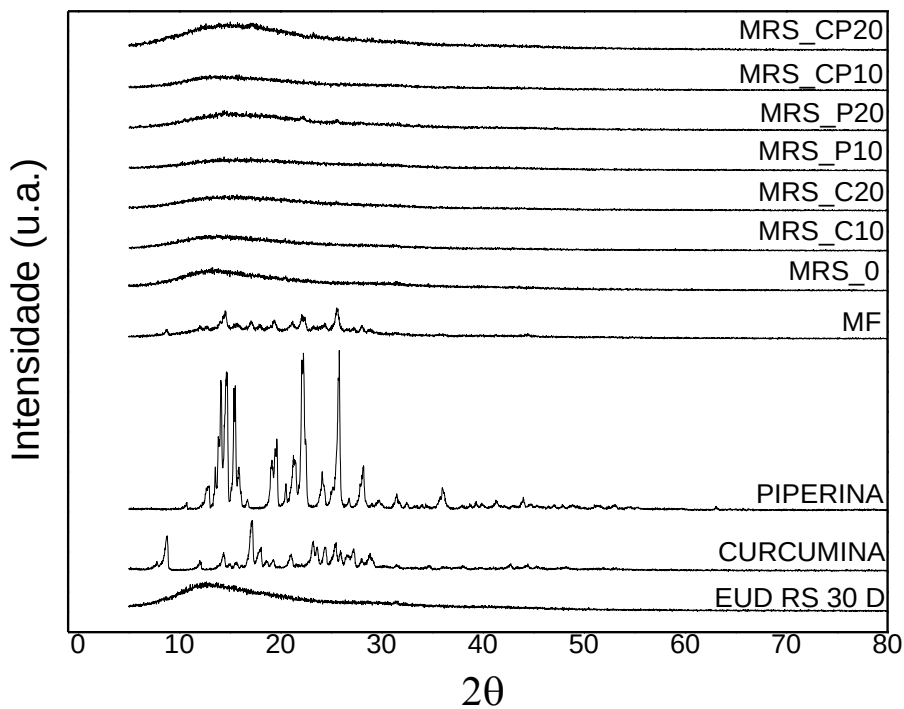
As Figuras 29 e 30 apresentam os difratogramas comparativos entre os fármacos puros (CUR e PIP), a mistura física (MF), as micropartículas preparadas em diferentes concentrações de CUR e PIP a 10% e 20% e os polímeros de partida (S100 e RS30D), respectivamente.

FIGURA 29 – DIFRATOGRAMA DO POLÍMERO EUDRAGIT® S100, DOS FÁRMACOS CURCUMINA E PIPERINA, DA MISTURA FÍSICA (EUD S100:CUR:PIP, 1:1:1 m/m) E DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PREPARADAS COM O S100



Fonte: A Autora

FIGURA 30 – DIFRATOGRAMA DO POLÍMERO EUDRAGIT® RS30D, DOS FÁRMACOS CURCUMINA E PIPERINA, DA MISTURA FÍSICA (EUD RS30D:CUR:PIP, 1:1:1 m/m) E DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PREPARADAS COM O RS30D



Fonte: A Autora

Para todas as formulações preparadas, os perfis encontrados são similares entre si e apresentaram grande redução da cristalinidade dos seus componentes em decorrência do processo de microencapsulação. Estes resultados sugerem dispersão molecular entre os fármacos e os polímeros resultando em micropartículas de caráter amorfo, para as quais são esperadas melhores características de solubilidade em relação aos fármacos puros.

5.2.5 Análise Térmica

5.2.5.1 Análise termogravimétrica (ATG)

A ATG foi um importante estudo para avaliar a estabilidade de um componente da formulação por meio da variação da massa de uma amostra resultante da transformação física ou química dos fármacos em função do tempo ou temperatura, polímeros e suas respectivas micropartículas, conforme mencionado por Oliveira (2011).

Os resultados encontrados foram praticamente os mesmos demonstrados na literatura para os fármacos puros e polímeros. Igualmente aconteceu no estudo de Biscaia (2018), em que as variações termogravimétricas ocorreram entre 300 e 400°C para o RS30D, sem nenhum evento térmico anterior aos 300°C. Para Ghaffari *et al.* (2007) o primeiro evento teve taxa máxima em 354°C e ainda, para Bunhak *et al.* (2015), a principal etapa de degradação térmica ocorreu entre 327 e 440°C.

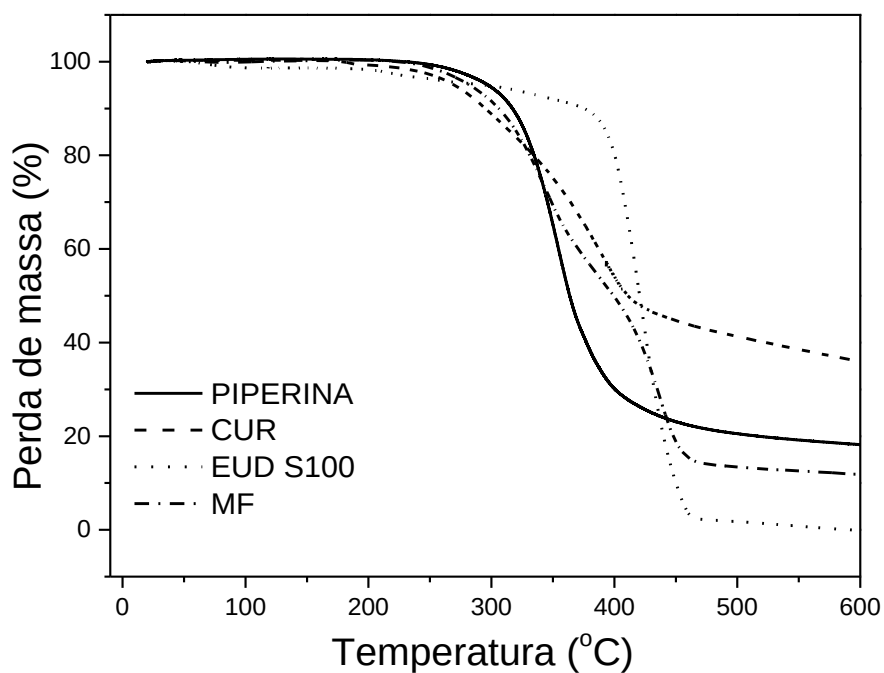
A curva do polímero Eudragit® S100 apresentou um evento de perda de massa entre 300 e 350 °C e que para os mesmos autores poderia chegar até 400°C.

Já a curva termogravimétrica da CUR (Figura 31) foi possível observar dois eventos de perda de massa, em 200 e 400°C, respectivamente. No estudo de Paiva (2015), foram observados três estágios para a CUR, em 67; 252 e 402°C, respectivamente.

A curva termogravimétrica da PIP (Figura 32) apresentou um processo de decomposição térmica em torno de 250°C, valor condizente com a faixa encontrada entre os outros autores. Com valores entre 250°C (DAHIYA *et al.*, 2018) e 330°C (ALSHEHRI; HAQ; SHAKEEL, 2018).

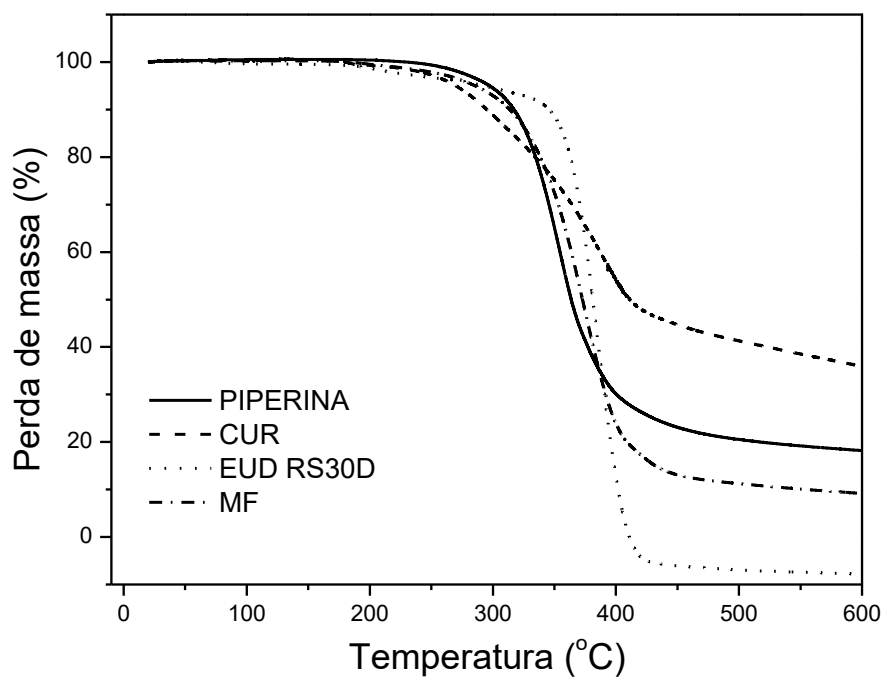
Em conformidade com o estudo de Biscaia (2018), as misturas físicas para o estudo de ambos os polímeros apresentaram três eventos. A perda de água foi muito discreta, a fusão do fármaco ocorreu entre 250 e 320°C e a fusão do polímero entre 350 e 460°C (Figuras 33 e 34).

FIGURA 31 – CURVAS TERMOGRAVIMÉTRICAS DA CURCUMINA PURA, PIPERINA PURA, DO POLÍMERO EUDRAGIT® S100 E DA MISTURA FÍSICA EUD S100:CUR:PIP (MF)



Fonte: A Autora

FIGURA 32 – CURVAS TERMOGRAVIMÉTRICAS DA CURCUMINA PURA, PIPERINA PURA, DO POLÍMERO EUDRAGIT® RS30D E DA MISTURA FÍSICA EUD RS30D:CUR:PIP (MF)



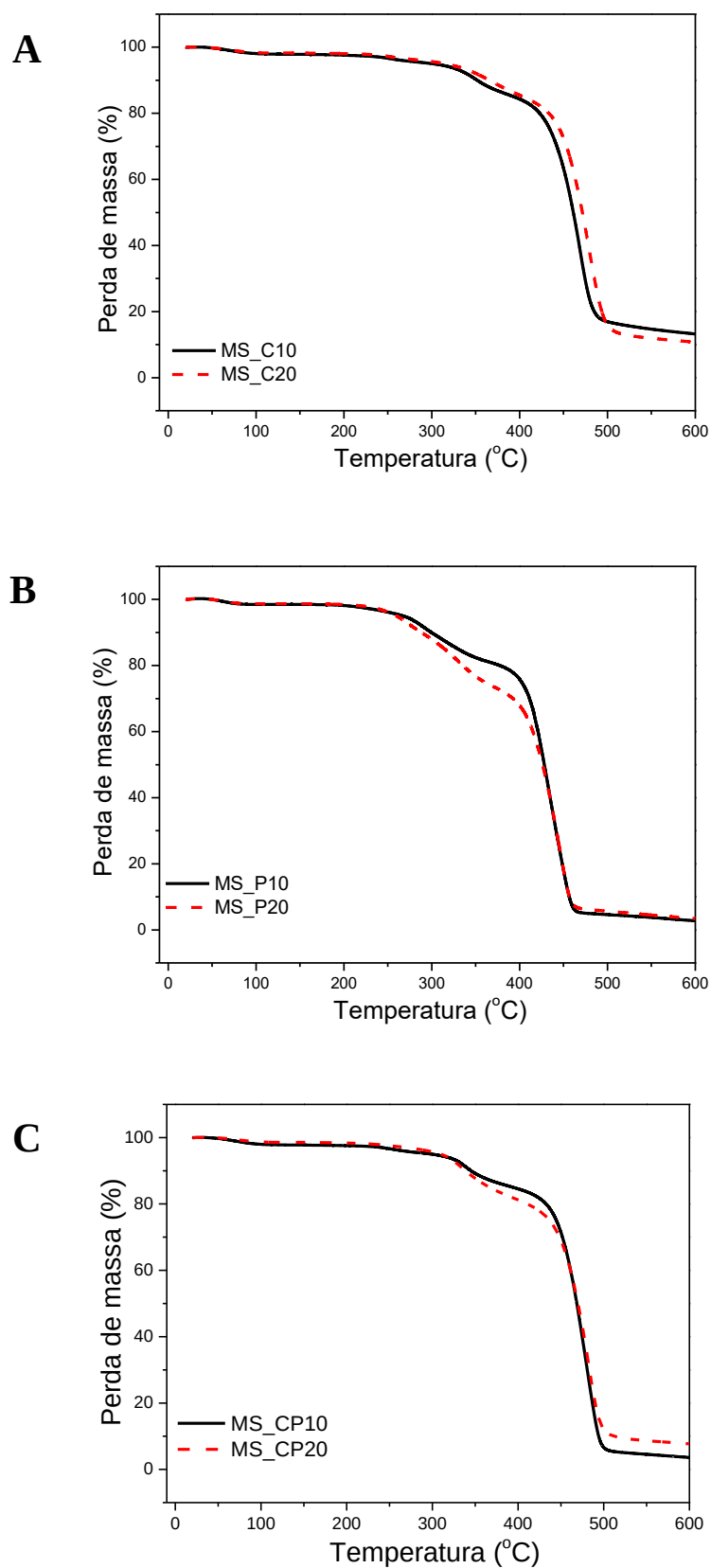
Fonte: A Autora

A produção das micropartículas pelo processo de *spray drying* não interferiu na estabilidade térmica do(s) fármaco(s), visto que as micropartículas apresentaram a variação de massa (Δm) referente à perda de água, um decaimento entre 230 a 300°C, que condiz com a fusão do fármaco e outro decaimento, entre 350 e 460°C referente à fusão do polímero que pode ser observado nas Figuras 33 e 34.

As micropartículas sem fármaco (MS_0 e MRS_0) não foram demonstradas porque apresentaram além da perda de água, apenas a perda de massa entre 350 e 460°C, condizente com o valor encontrado para a fusão dos polímeros.

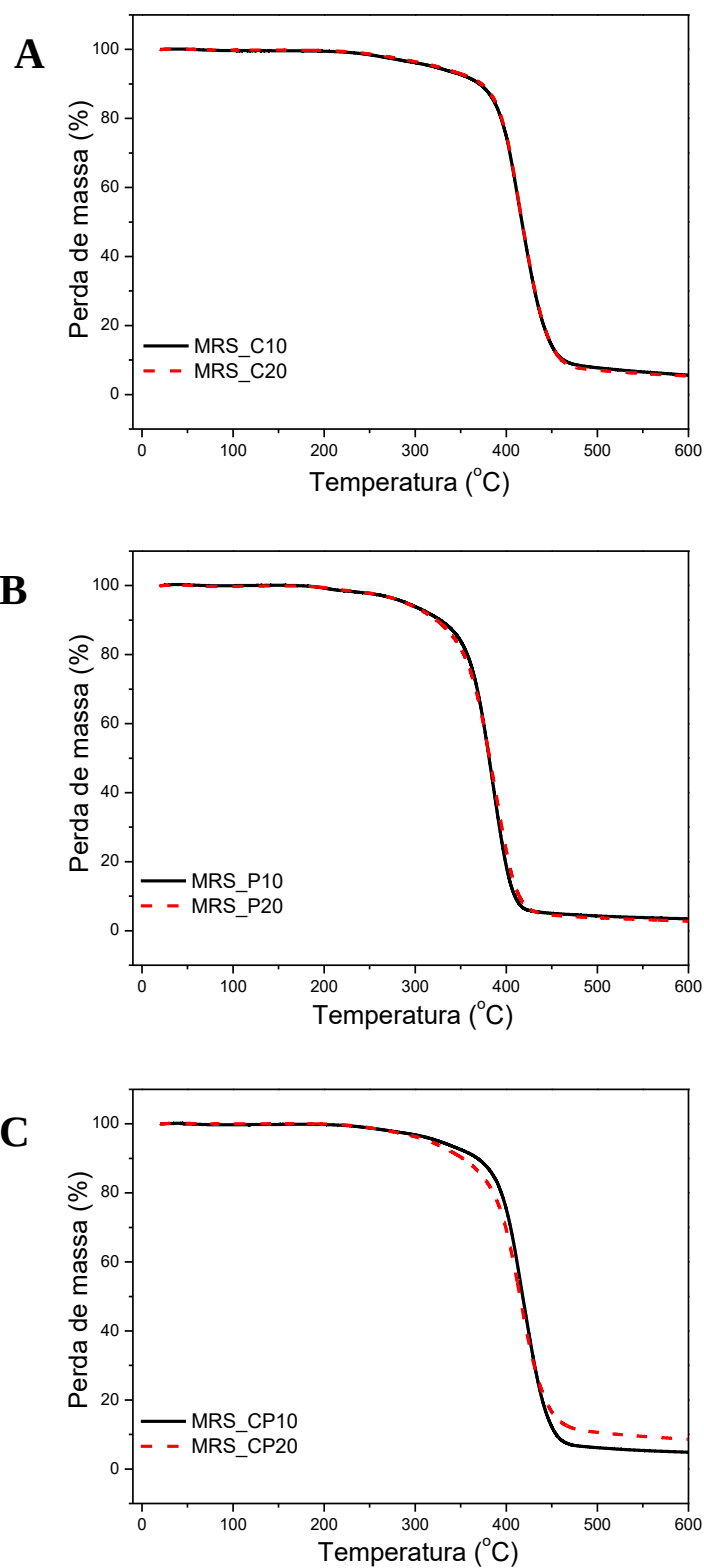
Os termogramas mostram uma primeira, segunda e terceira variação de massas referentes à perda de água até 100°C, ao decaimento do fármaco e ao decaimento do polímero, respectivamente. Assim, sugerindo a estabilidade dos produtos da formulação após processo de obtenção de micropartículas poliméricas contendo CUR e/ou PIP.

FIGURA 33 – CURVAS TERMOGRAVIMÉTRICAS DAS MICROPARTÍCULAS PREPARADAS A PARTIR DO POLÍMERO EUDRAGIT® S100: A) MS_C10 E MS_C20; B) MS_P10 E MS_P20; C) MS_CP10 E MS_CP20



Fonte: A Autora

FIGURA 34 – CURVAS TERMOGRAVIMÉTRICAS DAS MICROPARTÍCULAS PREPARADAS A PARTIR DO POLÍMERO EUDRAGIT® RS30D: A) MRS_C10 E MRS_C20; B) MRS_P10 E MRS_P20; C) MRS_CP10 E MRS_CP20



Fonte: A Autora

5.3 AVALIAÇÃO *IN VITRO*

5.3.1 Ensaio de Hemólise

Os resultados do ensaio de hemólise obtidos para as micropartículas poliméricas estudadas podem ser observados na Tabela 10. Sendo que os valores do grau de hemólise encontrados foram de $1,56 \pm 0,41$ a $3,39 \pm 0,23\%$ para aquelas formuladas com Eudragit® S100 e de $2,84 \pm 0,43$ a $3,75 \pm 0,15\%$ com Eudragit® RS30D.

TABELA 10 – ENSAIO DE HEMÓLISE DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE EUDRAGIT® S100 E RS30D FORMULADAS COM CURCUMINA E/OU PIPERINA

FORMULAÇÃO	GRAU DE HEMÓLISE (%)
	Média $\pm$ DP*
MS_0	$2,48 \pm 0,05$
MS_C10	$1,73 \pm 0,32$
MS_C20	$1,56 \pm 0,41$
MS_P10	$2,75 \pm 0,26$
MS_P20	$3,39 \pm 0,23$
MS_CP10	$2,08 \pm 0,22$
MS_CP20	$2,63 \pm 0,53$
MRS_0	$3,67 \pm 0,70$
MRS_C10	$3,08 \pm 0,32$
MRS_C20	$2,84 \pm 0,43$
MRS_P10	$3,75 \pm 0,15$
MRS_P20	$4,06 \pm 0,20$
MRS_CP10	$3,44 \pm 0,32$
MRS_CP20	$3,15 \pm 0,45$
CONTROLE POSITIVO**	100,00
CONTROLE NEGATIVO***	$1,73 \pm 0,18$

Fonte: A Autora

Legenda: *DP: desvio padrão; **Triton® X100: padronizado para 100% de hemólise; ***solução fisiológica 0,9%

Os menores resultados de hemólise foram encontrados entre as micropartículas de Eudragit® S100. Isto se explica pela característica aniônica que este polímero possui ocasionando uma menor interação com os eritrócitos, que são carregados de carga elétrica negativa em sua superfície. Em contrapartida, o Eudragit® RS30D possui caráter catiônico (INFORME TÉCNICO, 2018), o que acarreta num maior grau de hemólise.

Em relação às micropartículas de CUR e PIP, o efeito hemolítico foi menor para as que continham CUR na formulação. Mas pode-se dizer que todas apresentaram grau de hemólise reduzido quando comparadas com os resultados dos controles negativo e positivo.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram a ausência de toxicidade para a membrana dos eritrócitos das formulações preparadas e sugere a possibilidade do uso terapêutico em testes *in vivo*.

Alguns estudos na literatura relatam o emprego do ensaio de hemólise para avaliar a segurança de fitofármacos, como por exemplo, o de Oliveira *et al.* (2015) que utilizou a *Dicksonia sellowiana* e o de Mendes *et al.*, (2012) que preparou micropartículas de Resveratrol, para avaliação de seus potenciais antioxidantes.

A hemoglobina é liberada no plasma por meio do rompimento da membrana celular do eritrócito durante o processo de hemólise. Devido à toxicidade causada pelo sistema reticuloendotelial na tentativa de remoção da hemoglobina ocorre uma série de danos nos rins, fígado e coração (PRICE; SCHRIER, 2008).

5.3.2 Estudo do Potencial Antioxidante pela Determinação de Espécies Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

O ensaio empregado avaliou os fármacos e suas respectivas micropartículas puras ou em associação frente à peroxidação lipídica refletindo a capacidade dessas moléculas em doar elétrons ou hidrogênio, de modo a inativar o radical. A determinação de TBARS é um método cromatográfico viável e amplamente utilizado para a triagem das propriedades antioxidantes de diferentes compostos (MENDES *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos da atividade antioxidante (%) por meio do cálculo do IA% permitem observar que o aumento dessa atividade nas amostras testadas promove redução da peroxidação lipídica pela capacidade de inibição da formação do MDA dos ácidos graxos. O MDA pode se ligar aos resíduos de aminoácidos e promover alteração de cargas das superfícies das lipoproteínas e participar do processo de aterogênese (ABDALA; SENA, 2008).

A Tabela 11 sumariza os resultados obtidos para o ensaio de TBARS para as micropartículas poliméricas contendo CUR e/ou PIP.

TABELA 11 – EFEITO ANTIOXIDANTE DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE EUDRAGIT® S100 E RS30D FORMULADAS COM CURCUMINA E/OU PIPERINA

FORMULAÇÃO	ATIVIDADE
	ANTIOXIDANTE (%) Média ± DP*
CUR	61,25 ± 2,56
PIP	30,00 ± 2,55
MS_0	5,63 ± 0,75
MS_C10	30,86 ± 3,32
MS_C20	41,07 ± 2,96
MS_P10	12,44 ± 1,50
MS_P20	16,06 ± 3,28
MS_CP10	33,08 ± 3,21
MS_CP20	38,45 ± 2,53
MRS_0	1,84 ± 0,66
MRS_C10	25,08 ± 2,32
MRS_C20	35,10 ± 3,37
MRS_P10	9,55 ± 1,17
MRS_P20	12,65 ± 2,20
MRS_CP10	21,98 ± 2,76
MRS_CP20	26,12 ± 2,50
CONTROLE POSITIVO**	52,5 ± 2,45
CONTROLE NEGATIVO***	1,52 ± 0,43

Fonte: A Autora

Legenda: *DP: desvio padrão; **BHT; ***etanol

Para as micropartículas contendo apenas os polímeros, os resultados encontrados ficaram com valores muito próximos ao do controle negativo, sendo considerados efeitos reduzidos de atividade antioxidante. Os valores encontrados para as micropartículas, tanto de Eudragit® S100 quanto de RS30D, variaram de $25,08 \pm 2,32\%$ a $41,07 \pm 2,96\%$ para os testes que utilizaram somente CUR e $9,55 \pm 1,17\%$ a $16,06 \pm 3,28\%$, igualmente para a PIP. Do mesmo modo, os resultados obtidos das micropartículas de CUR e PIP em associação foram de $21,98 \pm 2,76\%$ a $38,45 \pm 2,53\%$. E, quando comparados os valores encontrados para os fármacos puros e suas respectivas micropartículas, os primeiros apresentaram resultados de maior efeito antioxidante, sendo de $61,25 \pm 2,56\%$ e $30,00 \pm 2,55\%$ para a CUR e PIP, respectivamente.

Entretanto, as associações a 10 e 20% de CUR e PIP nas micropartículas de Eudragit® S100 demonstraram efeito antioxidante maior que a PIP pura, porém menor que a CUR pura. Tal ação pode ser justificada pelo melhor efeito da CUR ($61,25 \pm 2,56\%$) em relação à PIP ($30,00 \pm 2,55\%$), uma vez que o fármaco puro apresentou o melhor efeito antioxidante de todos, inclusive quando comparado ao do controle positivo ($52,5 \pm 2,45\%$). Sabe-se que a propriedade antioxidante da CUR está relacionada aos grupos fenóis e metóxi de sua estrutura química (JARDIM, 2013), bem como da PIP com grupos fenólicos e flavonoides (COSTA *et al.*, 2021).

De modo geral, as micropartículas de Eudragit[®] S100 contendo CUR e/ou PIP apresentaram maior atividade antioxidante que as de Eudragit[®] RS30D, provavelmente pela melhor liberação do(s) fármaco(s) pelas características físico-químicas do polímero.

Os resultados deste estudo mesmo que realizado *in vitro* foram condizentes com outros encontrados na literatura. No estudo de Chakraborty *et al.* (2017), o uso combinado dos fármacos puros CUR a 50 mg.kg⁻¹ e PIP a 20 mg.kg⁻¹ foram utilizados para verificar a cardiotoxicidade em ratos e demonstrou atividade antioxidante pela redução dos níveis de TBARS e aumento dos de SOD e CAT. O grupo de animais tratados com CUR foi o que apresentou o melhor resultado de atividade antioxidante. E ainda, os autores concluíram que a PIP pode ter aumentado a biodisponibilidade da CUR *in vivo*. Arcaro *et al.* (2014) trataram ratos diabéticos-induzidos com um iogurte experimental contendo CUR a 90 mg.kg⁻¹ e PIP a 20 mg.kg⁻¹ e obtiveram redução dos níveis de MDA, aumento dos níveis de SOD e CAT. Já os níveis de GSH-Px e GSH ficaram inalterados. Quando a concentração de PIP a 40 mg.kg⁻¹ foi associada a CUR, não houve melhora de resultados.

Portanto, pode-se dizer que foi encontrado efeito antioxidante no modelo de peroxidação lipídica, sugerindo um provável efeito na prevenção e tratamento das dislipidemias. Contudo, a diferença encontrada entre os efeitos dos fármacos puros e micropartículas pode indicar que potencial antioxidante não foi mantido após o procedimento de secagem por aspersão para as dispersões sólidas preparadas. Sabe-se que este procedimento de obtenção de formulações modificadas fornece a remoção rápida da água minimizando a transferência de calor dos produtos que se assemelham a um líquido. E, geralmente mantem a estabilidade de produtos sensíveis ao calor, o que era esperado com o uso dos antioxidantes (WILKOWSKA *et al.*, 2016). E também, que existem outros mecanismos de ação de CUR e PIP para a redução dos lipídeos plasmáticos conforme foi relatado anteriormente nesta proposta de estudo.

A análise do potencial antioxidante pela determinação de TBARS demonstrou que as micropartículas poliméricas contendo CUR e ou PIP são interessantes para o uso em dislipidemias e suas complicações. E assim, novas perspectivas de estudo devem ser propostas e estes realizados para avaliar *in vitro* e *in vivo*, a peroxidação lipídica e a redução dos lipídeos plasmáticos.

6 CONCLUSÃO

As micropartículas poliméricas contendo PIP e/ou CUR a partir dos polímeros Eudragit[®] S100 e RS30D foram obtidas com sucesso. E por sua vez, apresentaram morfologia, tamanho, teor de fármaco e umidade adequados. As micropartículas com o polímero S100 resultaram nos melhores rendimentos.

O método analítico revalidado de CLAE pode ser empregado para a análise dos fármacos. Como em sua validação, também apresentou características de simplicidade, especificidade, linearidade, precisão e exatidão conforme os critérios recomendados da ICH (2005) e BRASIL (2017). Os picos obtidos nas análises ficaram bem definidos e com boa resolução de imagem.

O processo de obtenção das micropartículas por meio de *spray drying* promoveu a amorfização da CUR e PIP sendo confirmada pelas análises de FEG-SEM, DRX e ATG aumentando a solubilidade dos fármacos.

Não ocorreram ligações químicas entre as estruturas dos componentes iniciais das micropartículas demonstrado pelo espectro de IVTF.

A eficiência de encapsulação para os fármacos puros e associados na concentração de 10%, tanto das micropartículas com Eudragit[®] S100 quanto o RS30D apresentou os melhores resultados.

O ensaio *in vitro* de hemólise demonstrou que as micropartículas estudadas apresentaram adequado grau de segurança para uma possível utilização medicamentosa no organismo.

Os fármacos CUR e PIP, bem como, suas micropartículas poliméricas apresentaram efeito antioxidante no ensaio de peroxidação lipídica, sendo os melhores resultados para as formulações contendo CUR.

O polímero Eudragit[®] S100 apresentou os melhores resultados frente ao emprego do Eudragit[®] RS30D para a obtenção das micropartículas e demais estudos.

Portanto, as micropartículas poliméricas obtidas por *spray drying* contendo CUR e PIP a partir de Eudragit[®] S100 e RS30D, são formulações de custo acessível e transposição de escala facilitada, com potencial atividade antioxidante e que se mostraram viáveis e promissoras para a utilização como coadjuvante ou no tratamento das dislipidemias.

REFERÊNCIAS

- ABDALA, D. S. P.; SENA, K. C. M. Biomarcadores de peroxidação lipídica na aterosclerose. Campinas: **Revista de Nutrição**, v. 21, n. 6, p. 749-756, 2008.
- ABOU-ELKHAIR, R.; AHMED, H. A.; SELIM, S. Effects of Black Pepper (*Piper Nigrum*), Turmeric Powder (*Curcuma Longa*) and Coriander Seeds (*Coriandrum Sativum*) and Their Combinations as Feed Additives on Growth Performance, Carcass Traits, Some Blood Parameters and Humoral Immune Response of Broiler Chickens. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v. 27, n. 6, p. 847-854, 2014. Doi:10.5713/ajas.2013.13644
- AHMAD, N. Biological role of *Piper nigrum* L. (Black pepper): A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. S1945 – S1953, 2012.
- AKBARIAN, A.; GOLIAN, A.; KERMANSHAHI, A. G.; MORADI, S. Influence of turmeric rhizome and black pepper on blood constituents and performance of broiler chickens. **African Journal Biotechnology**, v. 11, n. 34, p. 8606-8611, 2012. Doi:10.5897/AJB11.3318
- ALMEIDA, L. A. **Caracterização fitoquímica de *Piper nigrum* L.** 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.
- ALSHEHRI, S.; HAQ, N.; SHAKEEL, F. Solubility, molecular interactions and mixing thermodynamic properties of piperine in various pure solvents at different temperatures. **Journal of Molecular Liquids**, v. 250, p. 63-70, 2018.
- ALWI, I. *et al.* The effect of curcumin on lipid level in patients with acute coronary syndrome. **Acta Medica Indonesiana**, v. 40, n. 4, p. 201–210, 2008.
- AMIGDON G.L. *et al.* A Theoretical Basis For a Biopharmaceutics Drug Classification: The Correlation of In Vitro Drug Product Dissolution and In Vivo Bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.
- AMANOLAH, F. *et al.* A simple, sensitive and rapid isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography method for determination and stability study of curcumin in pharmaceutical samples. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 7, n. 5, 2017.
- ANAND, P. *et al.* Curcumin and cancer: an “old-age” disease with an “age-old” solution. **Cancer Letters**, v. 267, n. 1, p. 133-164, 2008.
- ARAÚJO, V. H. S. **Desenvolvimento e caracterização de carreador lipídico nanoestruturado contendo curcumina.** 2019. Dissertação. (Mestrado em nanociência e nanobiotecnologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2019.
- ARCARO, C. A.; GUTIERRES, V. O.; ASSIS, R. P.; MOREIRA, T. F.; COSTA, P. I.; BAVIERA, A. M.; BRUNETTI, I. L. Piperine, a Natural Bioenhancer, Nullifies the Antidiabetic and Antioxidant Activities of Curcumin in Streptozotocin-Diabetic Rats. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. e113993, 2014. Doi:10.1371/journal.pone.0113993

ARYA P.; PATHAK K. Assessing the viability of microsponges as gastro retentive drug delivery system of curcumin: optimization and pharmacokinetics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 460, n. 1-2, p. 1-12, 2014.

ASHOUR, E. A. *et al.* Hot melt extrusion as an approach to improve solubility, permeability and oral absorption of a psychoactive natural product, piperine. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 68, n. 8, p. 989-998, 2016.

ATAL, N.; BEDI, K. Bioenhancers: Revolutionary concept to market. **Journal of Ayurveda and Integrative Medicine**, 2 ed., v. 1, p. 96-99, 2010.

BAGCHI D.; SWAROOPB A.; PREUSS H. G.; BAGCHI M. Free radical scavenging, antioxidant and cancer chemoprevention by grape seed proanthocyanidin: An overview. Mutation Research – **Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 14, p. 1016, 2014.

BANERJEE, S. *et al.* Protein dependent fat of hepatic cells under nicotine induced stress and curcumin ameliorated condition. **European Journal Pharmacology**, v. 684, n. 1-3, p. 132-145, 2012.

BARBALHO, S. M. *et al.* Síndrome metabólica, aterosclerose e inflamação: tríade indissociável? **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 14, n. 4, p. 319-327, 2015.

BARBOSA K. B. F.; COSTA N. M. B.; ALFENAS R. C. G.; DE PAULA S. O.; MINIM V. P. R.; BRESSAN F. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARCELOUX, D. G. Pepper and capsaicin (Capsicum and Piper species). **Disease-a-month – Journal**, v. 55, n. 6, p. 380-390, jun. 2009. Doi: 10.1016 / j.disamonth.2009.03.008

BASPINAR, Y. *et al.* Curcumin and piperine loaded zein-chitosan nanoparticles: Development and in-vitro characterization. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, n.3, p. 323-334, 2018.

BIRBEN, E.; SAHINER U. M.; SACKESSEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, p. 9-19, 2012.

BIRNBAUM, D. T.; BRANNON-PEPPAS, L. Microparticles drug Delivery Systems, In: BROWN, D. M., **Drug Delivery Systems Cancer Therapy**, Springer Science Business Media, Chapter 6, p. 117-135, 2003.

BISCAIA, P. B. **Desenvolvimento Tecnológico e avaliação biológica de micropartículas poliméricas contendo piperina obtidas por spray-drying**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2018.

BOMBO, R. P. A. **Ação dos fitoesteróis sobre lesão aterosclerótica em camundongos com ablação gênica do receptor de LDL**. 2014. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

BONTEMPO, M. **Pimenta e seus benefícios à saúde**. São Paulo: Alaude, 2007.

BORGES, E. T.; OFFERMANN, S. Nicotinic acid: an old drug with a promising future. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, supl.1, p. S68-S75, 2008.

BORGO, M. V. Prevalência dos fatores de risco cardiovascular na população de Vitória segundo dados da VIGITEL e da Pesquisa Nacional de Saúde de 2013. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 22, p. E190015, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. **Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022/Ministério da Saúde**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 160 p. il. – (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRASIL. Ministério da Saúde. **Saúde Brasil 2013: uma análise da situação de saúde**. 10 ed., Brasília, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017**. Aprova “Critérios para a validação de métodos analíticos”. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 08 de agosto de 2017.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Relatório de recomendação: Ezitimiba no tratamento das dislipidemias**. Brasília, CONITEC, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêutica de Dislipidemia: Prevenção de Eventos Cardiovasculares e pancreatite**. Brasília, CONITEC, 2019.

BRUXEL, F. *et al.* Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35, n. 9, 2012.

BUNHAK, E. J. *et al.* Análises físico-químicas de biofilmes de sulfato de condroitina modificado. **Química Nova**, v. 38, n. 3, p. 316-320, 2015.

CARNEIRO, D. M. **Ayurveda: saúde e longevidade na tradição milenar da Índia**. Pensamento: São Paulo, 2009.

CARVALHO, A. C. B. *et.al.* Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, v. 5, n. 11, p. 26-32, 2007.

CASSANI, R. S. L.; PAZIN FILHO, A.; SCHIMIDT, A. Prevalência de fatores de risco cardiovascular em trabalhadores de uma indústria brasileira. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 92, n. 1, p. 16-22, 2009.

CLEMENT, Y. Can green tea do that? A literature review of the clinical evidence. **Preventive Medicine**, v. 49, p. 83-87, 2009.

CHAKRABORTY, M.; BHATTACHARJEE, A.; KAMATH, J. V. Cardioprotective effect of curcumin and piperine combination against cyclophosphamide-induced cardiotoxicity. **Indian Journal of Pharmacology**, v.49, n. 1, p. 65–70, 2017. Doi:10.4103/0253-7613.201015

CHASSOT, J. M. *et al.* Stability-indicating RP-HPLC method for determination of beclomethasone dipropionate in nanocapsule suspensions. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 4, p. 803–810, 2015.

COIMBRA, P. *et al.* Preparation and chemical and biological characterization of a pectin/chitosan polyelectrolyte complex scaffold for possible bone tissue engineering applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 1, p. 112-118, 2011.

COLOMÉ L. M. *et al.* Pantoprazole-loaded Eudragit blended microparticles: preparation, characterization, in vitro gastro-resistance and in vivo anti-ulcer evaluation. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 17, n.2, p. 113-118, 2006.

CONTI, R. A. S.; ROCHA, R. S. Risco cardiovascular: abordagem dentro da empresa. **Revista Brasileira de Medicina do Trabalho**, v. 3, n. 1, p. 10-21, 2005.

COTINGUIBA, G. G.; SILVA, J. R. N.; AZEVEDO, R. R. S.; ROCHA, T. J. M.; SANTOS, A. F. Método de Avaliação da Defesa Antioxidante: Uma Revisão de Literatura. **Journal of Health Sciences**, v. 15 n. 3, p. 231-237, 2013.

COSTA, K. P.; FONSECA, E. S.; ANDRADE, R. E. S.; FERREIRA, G. S. *et al.* Atividade antioxidante dos extratos etanólicos e dos óleos essenciais de *Xylopia aromatica* e *Piper nigrum*. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 27904-27912, mar. 2021.

CÓTICA, L. F.; FREITAS, V. F.; DIAS, G. S. *et al.* Simple and facile approach to synthesize magnetite nanoparticles and assessment of their effects on blood cells. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 324, n. 4, p. 559-563, 2012.

COTRIM, H. P. **Esteatose hepática**. In: Sociedade Brasileira de Hepatologia, 2021. Disponível em: <https://sbhepatologia.org.br/imprensa/esteatose-hepatica/>. Acesso em 12, mar. 2021.

CRUZ, L. *et al.* Gastroresistant microparticles containing sodium alendronate prevent the bone loss in ovariectomized rats. **European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 5, p. 441-447, 2010.

CUCHEL, M. *et al.* Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein in familial hypercholesterolemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 2, n. 356, p. 148-156, 2007.

DAHIYA, S. *et al.* Conjugation of epigallocatechin gallate and piperine into a zein nanocarrier: implication on antioxidant and anticancer potential. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 9, n. 3, 2018.

DIEBERGER, A. *et al.* Maternal lipid concentrations during early pregnancy and eating behavior and energy intake in the offspring. **Nutrientes**, v. 10, ago. 2018.

DOMINGUES, G. S.; GUTERREZ, S. S. Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1966-1972, 2008.

ENGEL, B. *et al.* Emprego de *Spray Dryer* na indústria de alimentos: Uma breve revisão. **Revista Jovens Pesquisadores**, v. 7; n. 2, p. 2-11, 2017.

EL-AMIR, Y. O.; HASSANCIN, K. M. A. Protective effect of curcumin on N-nitrosodiethylamine and carbon tetrachloride-induced hepatocarcinogenesis in Sprague-Dawley rats. **Comparative Clinical Pathology**, v. 22, n. 4, p. 631-636, 2012.

ESPOSITO, E. *et al.* Spray dried Eudragit microparticles as encapsulation devices for vitamin C. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, n. 1, p. 329-334, 2002.

FAN, Q. *et al.* HDL-cholesterol levels and risk of age-related macular degeneration: a multiethnic genetic study using Mendelian randomization. **International Journal of Epidemiology**, v. 46, n. 6, p. 1891-1902, 2017.

FARAGO, P. V. **Desenvolvimento de sistemas poliméricos para a liberação modificada do cloridrato de metformina**. 2007. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

FAYAD, S. J. **Obtenção e caracterização de micro e nanopartículas a base de proteína isolada de soja**. 2010. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

REFERENCE, B. A.; HENRY, N. G.; GRAHAM, I.; RAY, K. K.; PACKARD, C. J.; BRUCKERT, E. *et al.* Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. **European Heart Journal**, v. 38, p. 2459-2472, 2017. Doi:10.1093/eurheartj/ehx144

FIEGENBAUM, M.; HUTZ, M. H. Farmacogenética de fármacos hipolipemiantes. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 39, n. 4, p. 543-553, 2006.

FRANÇA B. K.; ALVES, M. R. M.; SOUTO, F. M. S.; TIZIANE, L.; BOAVENTURA, R. F.; GUIMARÃES, A.; Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **Jornal Português de Gastreenterologia**, v. 20, n. 5, p. 199-206, 2013.

FRANCO, G. P. P. *et al.* Síndrome metabólica em hipertensos de Cuiabá – MT: prevalência e fatores associados. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 92, v. 6, p. 472-478, 2009.

FRIEDEWALD, W. T.; LAVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation to density lipoprotein without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 499-502, 1972.

GALKINA, E.; LEY, K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 165-197, 2009.

GHAFFARI, A. *et al.* Preparation and characterization of free mixed-film of pectin/chitosan/Eudragit RS intended for sigmoidal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, n. 1, p. 175-186, 2007.

GOLDBERG, A. C. Dislipidemia. **MANUAL MSD**, mar. 2018. Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt-br/profissional/dist%C3%BArbios-end%C3%B3crinos-e-metab%C3%B3licos/dist%C3%BArbios-lip%C3%ADicos/distlipidemia>. Acesso em: 12 mar 2020.

GOMES, M. L. S. *et al.* A Simple RP-HPLC/UV Method for Determination of Cilostazol in Polymeric Nanoparticles Suspensions: Development and Validation. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 34, n. 4, p.803-809, 2015.

GONÇALVES, P. R. T.*et al.* Aterosclerose e sua relação com as doenças cardiovasculares. **Revista Saúde em Foco**, n. 10, p. 711-717, 2018.

GOUVEIA, S. S.; LIMA, A. A. Insert relationship between reactive species of oxygen and carcinogenic promotion: Relação entre espécies reativas de oxigênio e a promoção carcinogênica. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 20, n. 3. 174-179, set. – nov. 2017.

GUILIANO, I. C. B. *et al.* Diretriz de Prevenção da Aterosclerose na Infância e na Adolescência. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, n. 6, p. 3-36, 2005.

GUNITA. **Thrombus formation.** Disponível em: https://es.123rf.com/photo_38473543_stock-vector-blood-clot-formation-coronary-artery-disease-anatomy-of-healthy-artery-unhealthy-arteries-human-heart.html. Acesso em: 12 mar. 2020.

GUPTA, S. C. *et al.* Discovery of curcumin a component of Golden spice, and its miraculous biological activities. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 39, n. 3, p. 283-299, 2012.

HADAD, G. M.; EMARA, S.; MAHMOUD, W. M. Development and validation of a stability-indicating RP-HPLC method for the determination of paracetamol with dantrolene or/and cetirizine and pseudoephedrine in two pharmaceutical dosage forms. **Talanta**, v. 79, n. 5, p. 1360-1367, 2009.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4 ed; New York, Oxford, 2010.

HANSON, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 16, p. 1685-1695, 2005.

HEVONJOJA T.; PENTIKAINEN M. O.; HYVONEN M. T.; KOVANEN P. T.; ALA-KORPELA M. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. **Biochimica et Biophysica Acta**; v. 488, n. 3, p. 189-210, 2000.

HIGASHI, K. *et al.* The effect of drug and EUDRAGIT® S 100 miscibility in solid dispersions on the drug and polymer dissolution rate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 494, n. 1, p. 9-16, 2015.

HLAVAČKOVÁ, L.; JANEGOVÁ, A.; ULÍČNÁ, O.; JANEĞA, P.; ČERNÁ, A.; BABÁL, P. Spice up the hypertension diet - curcumin and piperine prevent remodeling of aorta in experimental L-NAME induced hypertension. **Nutrition & Metabolism**, v. 8, n. 72, p. 1-10, 2011. Doi: 10.1186/1743-7075-8-72.

ICH. International Conference on the Harmonization of technical requirements for the registration of pharmaceuticals for human use guideline. **Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1)**, v. 1, 2005.

INFORME TÉCNICO: Darmstadt; Germany. **EVONIK Rohm GmbH**. 2018. Disponível em: www.rofarma.com/allegati/97.pdf Acesso em: 31 maio 2018.

JARDIM, K. V. **Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana/sulfato de condroitina para nanoencapsulação da curcumina visando sua liberação controlada e avaliação de sua atividade antitumoral**. 2013. Dissertação (Mestre em Ciências de Materiais) – Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

JEEVANANDAM, J.; BARHOUM, A.; CHAN, Y. S.; DUFRESNE, A.; DANQUAH, M. K. Review of nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 9, p. 1050-1074, 2018.

KALEL, A. **Cúrcuma – Benefícios dos Curcuminoides para a Saúde**. 2018. Disponível em: <https://nutrinDoideias.com/plantas-medicinais/curcuma-curcumina>. Acesso em: 25 mar 2021.

KAROLEWICZ, B. A review of polymers as multifunctional excipients in drug dosage form technology. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 5, p. 525-536, 2016.

KAUR, G.; MEENA, C. Evaluation of anti-hyperlipidemic potential of combinatorial extract of curcumin, piperine and quercetin in triton-induced hyperlipidemia in rats. **Science International**, v. 1, n. 3, p. 57-63, 2013.

KAWABATA, Y. *et al.* Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: basic approaches and practical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, n. 1, p.1-10, 2011.

KHUATHAN, N.; PONGJANYAKUL, T. Modification of quaternary polymethacrylate films using sodium alginate: film characterization and drug permeability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 460, n. 1-2, p. 63-72, 2014.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; DE MELLO, J. C. P. Development of an analytical method using reversed-phase HPLC-PDA for a semipurified extract of *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (guaraná). **Talanta**, v. 88, p.502-506, 2012.

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

KRYSTONA T. B.; GEORGIEVA A. B.; PISSIS P.; GEORGAKILAS A. G. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Mutation Research**, v.711, p. 193–201, 2011.

KULKARNI, N. B.; NAIK, P. S. W. J. B. Metformin hydrochloride microparticles for oral controlled release: Effect of formulation variables. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 3, p. 135-144, 2013.

KUMAR, M. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 2, p.234-258, 2000.

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

KURMEN. J. E. C.; ALVAREZ, M. I. G.; RIVERO, L. F. V. Microencapsulation of a Colombian *Spodoptera frugiperda* Nucleopolyhedrovirus with Eudragit® S100 by *Spray Drying*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 3, p. 468-476, 2015.

LANZILLOTTI, P. F. **Sistemas para liberação de fármacos modificada**. 2012. Monografia (Especialização em Tecnologia Industrial Farmacêutica) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Tecnologia em Fármacos, Rio de Janeiro, 2012.

LI, C.; WANG, Q.; ZHANG, Y.; IAM, C. W. K.; MOSES, C. S. S.; ZHONG, Z. Enhanced Systemic Exposure of Both Piperine and Docetaxel After Their Combination Use in Sprague-dawley Rats. **Abstracts / Drug Metabolism and Pharmacokinetics**. v. 32, p. s107-s127, 2017.

LI, Y.; LI, M.; WU, S.; TIAN, Y. Combination of curcumin and piperine prevents formation of gallstones in C57BL6 mice fed on lithogenic diet: whether NPC1L1/SREBP2 participates in this process? **Lipids in Health and Disease**, v. 14, n. 100, p. 1-8, 2015. Doi:10.1186/s12944-015-0106-2

LIPINSKI, L. C. Oral insulin improves metabolic parameters in high fat diet fed rats. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 3, p. 1700-1705, 2017.

LIU, W.; CHEN, X. D.; SELOMULYA, C. On the spray drying of uniform functional microparticles. **Particuology**, v. 22, p. 1-12, 2015.

LIU G. Y.; STORZ P. Reactive oxygen species in cancer. **Free Radicals Research**, v. 44, n. 5, p. 109, 2010.

LOCH-NECKEL, G. *et al.* Obtenção de extratos secos de carotenoides a partir da biomassa da microalga *Haematococcus pluvialis* por secagem em torre de aspersão (spray-drying). **Matéria**, v. 23, n. 4, 2018.

LUZ H. K. M.; SCHELL L. W.; FAUSTINO L. R.; MANOEL C.; SILVA G.; FIGUEIREDO J. R. *et al.* Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 956, p. 27, 2011.

LYRA, A. M. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação *in vivo* de sistemas de liberação microparticulados contendo Efavirenz**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2016.

MACÊDO, I. S.V. **Desenvolvimento de dispersões sólidas: Incremento da solubilidade da rutina**. 2017. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - PPGCF) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2017.

MAHERANI, B. *et al.* Liposomes: A review of manufacturing techniques and targeting strategies. **Current Nanoscience**, v.7, p.436-452, 2011.

MAINARDES, M. M. **Desenvolvimento de nanopartículas de PLA e PLA-PEG para administração intranasal de zidovudina**. 2007. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

MALISKI, A. M. **Microscopia eletrônica de varredura e análise**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

MALTA, D. C. Probabilidade de morte prematura por doenças crônicas não transmissíveis, Brasil e regiões, projeções para 2025. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 22, 2019.

MANO, E. B.; MENDES L. C. **Introdução a Polímeros**. 2. ed. rev. e ampl. São Paulo: Edgard Blucher, 2004.

MARCHI, J. P.; TEDESCO, L.; MELO, A. C.; FRASSON, A. C.; FRANÇA, V. F.; SATO, S. W.; LOVATO, E. C. W. *Curcuma longa* L., o açafrão da terra e seus benefícios medicinais. Umuarama: **Arquivos de Ciências da Saúde UNIPAR**, v. 20, n. 3, p. 189-194, 2016.

MARMITT, D. J.; REMPEL, C.; COUTO E SILVA, A. Potencial hepatoprotetor das plantas medicinais da RENISUS: revisão sistemática. **Revista de Atenção à Saúde**, v. 14, n. 48, p. 84-91, jul.-set., 2016.

MASSIMINO, L. C. **Nanopartículas de curcumina, obtenção e caracterização**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

MASTERS, K. **Spray Drying Handbook**, 4. ed., New York, John Miley, 1985.

MENDES, J. B. E.; RIEKES, M. K.; OLIVEIRA, V. M.; MICHEL, M. D.; STULZER, H. K.; KHALIL, N. M.; ZAWADSKI, S. F.; MAINARDES, R. M.; FARAGO, P. V. PHPV/PCL microparticles for controlled release of resveratrol: physicochemical characterization, antioxidant potencial, and effect on hemolysis of human erythrocytes. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-13, 2012.

MINATTI, J. **O chá verde no processo aterosclerótico em camundongos knockout para receptor de lipoproteína de baixa densidade**. 2010. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

MITHU, S. H. *et al.* Evaluation of the surface chemistry and drug-polymer interaction of semi-crystalline micro-particles for the development of controlled release formulations. **Materials Science & Engineering: C**, v. 76, p. 559-567, 2017.

MIYAZAWA, T.; NAKAGAWA, K.; KIM, S.H.; THOMAS, M. J.; PAUL, L.; ZINGG, J.-M.; DOLNIKOWSKI, G. G.; ROBERTS, S. B.; KIMURA, F.; MIYAZAWA, T.; AZZI, A.; MEYDANI, M. Curcumin and piperine supplementation of obese mice under caloric

restriction modulates body fat and interleukin-1 β . **Nutrition & Metabolism**, v. 15, n. 12, p. 1-9, 2018. Doi:10.1186/s12986-018-0250-6.

MOOHEBATI, M.; YAZDANDOUST, S.; SAHEBKAR, A.; MAZIDI, M.; SHARGHI-SHAHRI, Z.; FERNS, G.; GHAYOUR-MOBARHAN, M. Investigation of the effect of short-term supplementation with curcuminoids on circulating small dense low-density lipoprotein concentrations in obese dyslipidemic subjects: A randomized double-blind placebo-controlled cross-over trial. **ARYA Atherosclerosis**, v. 10, n. 5, p. 280-286, 2014.

MOHYLYUK, V. *et al.* Wurster fluidized bed coating of microparticles: towards scalable production of oral sustained-release liquid medicines for patients with swallowing difficulties. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 21, n. 3, 2020.

MOORTHY, C. *et al.* Application of validated RP-HPLC-PDA method for the simultaneous estimation of curcumin and piperine in Eudragit E 100 nanoparticles. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, p. 224-229, 2013.

MORA-HUERTAS, C.E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-Based Nanocapsules for Drug Delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113-142. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.10.018>.

MORAIS, S. M.; CATUNDA JUNIOR, F. E. A.; SILVA, A. R. A.; MARTINS NETO, J. S. Atividade Antioxidante de Óleos Essenciais de Espécies de Croton do Nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 29, n.5, p. 907-910, 2006.

MOREIRA, D. L.; TEIXEIRA, S. S.; MONTEIRO, M. H. D.; DE-OLIVEIRA, A. C. A. X.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Traditional use and safety herbal medicines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 248-257, 2014. <https://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2014.03.006>.

MORTENSEN, M. B.; FALK, E. J. Prevention With Statins in the Elderly. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 71, p. 85-94, 2018.

MUSIAL, D. C. *et al.* Hypercholesterolemia and hepatic steatosis in mice fed on low-cost high-fat diet. **Acta Scientiarum Health Sciences**, v. 35, n. 1, p. 23-27, 2013.

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

NASCIMENTO, T. C. F. *et al.* Development and Validation of an HPLC Method Using Fluorescence Detection for the Quantitative Determination of Curcumin in PLGA and PLGA-PEG Nanoparticles. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 8, n. 4, 2012.

NEVES C. F. **Avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo e estado inflamatório em pacientes no pré e pós-operatório de cirurgia da obesidade**. 2010. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana) – Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

NGUYEN, T. T. H.; SI, J.; KANG, C.; CHUNG, B.; CHUNG, D.; KIM, D. Facile preparation of water soluble curcuminoids extracted from turmeric (*Curcuma longa* L.) powder by using steviol glucosides. **Food Chemistry**, v. 214, p. 366-373, 2017.

NOCON, M. Association of physical activity with all-cause and cardiovascular mortality: a systematic review and meta-analysis. **European Journal of Preventive Cardiology**, v. 15, p. 239-246, 2008.

OLIVEIRA, G.; MENDES, R. T.; BOCCALETTO, E. M. A. **Alimentação, Atividade Física e Qualidade de Vida dos escolares do município de Vinhedo/SP**. Campinas: IPÊS. Cap. Dislipidemia Infantil, p. 39-46, 2009.

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. L. Análise térmica aplicada à fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1224-1230, 2011.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. “Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações”. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.

OLIVEIRA, R. G.; ALENCAR-FILHO, E. B.; VASCONCELLOS, M. L. A. A. A influência da piperina na biodisponibilidade de fármacos: uma abordagem molecular. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 69-73, 2014.

OZAWA, H. *et al.* Curcumin β -D-Glucuronide Plays an Important Role to Keep High Levels of Free-Form Curcumin in the Blood. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, n. 9, p. 1515-1524, 2017.

PADALKAR, K. V.; GAIKAR, V. G. Extraction of Piperine from *Piper Nigrum* (Black Pepper) by Aqueous Solutions of Surfactant and Surfactant + Hydrotrope Mixtures. **Separation Science and Technology**, v. 43, p. 3097-3118, 2008.

PAIVA, N. A. **Citotoxicidade da Curcumina presente em nanopartículas de quitosana/sulfato de condroína contendo lecitina**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências de Biomateriais) – Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

PAN, Y. H. J. *et al.* Preparation, characterization and anticoagulation of curcumin-eluting controlled biodegradable coating stents. **Journal of Controlled Release**, v. 116, p. 42-49, 2006.

PANAHI, Y.; KHALILI, N.; HOSSEINI, M. S.; ABBASINAZARI, M.; SAHEBKAR, A. Lipid-modifying effects of adjunctive therapy with curcuminoids—piperine combination in patients with metabolic syndrome: Results of a randomized controlled trial. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 22, p. 851-857, 2014. Doi:10.1016/j.ctim.2014.07.006.

PANAHI, Y.; KHALILI, N.; SAHEBI, E.; NAMAZI, S.; KARIMIAN, M. S.; MAJEED, M.; SAHEBKA, A. Antioxidant effects of curcuminoids in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled trial. **Inflammopharmacology**, v. 25, n. 1, p. 25-31, 2016. Doi:10.1007/s10787-016-0301-4.

PANAHI, Y.; KHALILI, N.; SAHEBI, E.; NAMAZI, S.; REINER, Z.; MAJEED, M.; SAHEBKAR, A. Curcuminoids modify lipid profile in type 2 diabetes mellitus: A randomized controlled trial. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 33, p. 1-5, 2017. Doi:10.1016/j.ctim.2017.05.006.

PANAHI, Y. *et al.* Curcumin as a potential candidate for treating hyperlipidemia: a review of cellular and metabolic mechanisms. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 1, p. 141-152, 2018.

PANAHI, Y.; KHALILI, N.; SAHEBI, E.; NAMAZI, S.; SIMENTAL-MENDÍA, L. E.; MAJEED, M.; SAHEBKAR, A. Effects of Curcuminoids Plus Piperine on Glycemic, Hepatic and Inflammatory Biomarkers in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Trial. **Drug Research**, v. 68, n. 7, p. 403-409, 2018. Doi:10.1055/s-0044-101752.

PANAHI, Y.; VALIZADEGAN, G.; AHAMDI, N.; GANJALI, S.; MAJEED, M.; SAHEBKAR, A. Curcuminoids plus piperine improve nonalcoholic fatty liver disease: A clinical trial. **Journal of Cellular Biochemistry**, p. 1-8, 2019. Doi:10.1002/jcb.28877.

PAOLINO, D.; VERO, A.; COSCO, D.; PECORA, T. M. G.; CIANCIOLO, S.; FRESTA, M.; PIGNATELLO, R. Improvement of Oral Bioavailability of Curcumin upon Microencapsulation with Methacrylic Copolymers. **Frontiers in Pharmacology**. 2016. Doi 10.3389/fphar.2016.00485.

PATEL, B. B. *et al.* Revealing facts behind spray dried solid dispersion technology used for solubility enhancement. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 4, p. 352-365, 2015.

PATRA, C. N. *et al.* Pharmaceutical significance of Eudragit: A review. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 1, p. 33-45, 2017.

PENGPONG, T. *et al.* Design, synthesis and in vitro evaluation of mucoadhesive p-coumarate-thiolated-chitosan as a hydrophobic drug carriers. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 86, n. 3, p. 487-497, 2014.

PLANTS OF THE WORLD ONLINE. Disponível em: <http://plantsoftheworldonline.org/>. Acesso em 25 mar 2020.

PORRAS-SAAVEDRA, J. *et al.* Microstructural properties and distribution of components in microparticles obtained by spray-drying. **Journal of Food Engineering**, v. 152, p. 105-112, 2015.

PRICE, E. A.; SCHRIER, S. L. Hemoglobinopathies and hemolytic anemias. **American College of Physicians Medicine**, p. 1-34, 2008. Disponível em: https://www.medicinanet.com.br/conteudos/acp-medicine/5175/hemoglobinopatias_e_anemias_hemoliticas_%E2%80%93_elizabeth_a_price_stanley_l_schrier.htm. Acesso em 25 mar 2020.

QIN, S.; HUANG, L.; GONG, J.; SHEN, S.; HUANG, J.; REN, H.; HU, H. Efficacy and safety of turmeric and curcumin in lowering blood lipid levels in patients with cardiovascular risk factors: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Nutrition Journal**, v. 16, n. 68, 2017.

RAMALHO, W. S. **Desvios de crescimento intrauterino: aspectos anatomopatológicos macroscópicos placentários na gestação de alto risco**. 2012. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

RANGEL-HUERTA, O. *et al.* Systematic Review of the Efficacy of Bioactive Compounds in Cardiovascular Disease: Phenolic Compounds. **Nutrients**, v. 7, n. 7, p. 5177–5216, 2015.

RATTES, A. L. R.; OLIVEIRA, W. P. Spray drying conditions and encapsulating composition effects on formation and properties of sodium diclofenac microparticles. **Powder Technology**, v. 171, n. 1, p. 7-14, 2007.

RECIO, M. C.; GINER, R. M.; URIBURU, L.; MANEZ, S.; CERDÁ, M.; DE LA FUENTE J. R.; RÍOS, J. L. In vivo activity of pseudoguaianolide sesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation. **Life Sciences**, v. 66, n. 26, p. 2509-2518, 2000.

RESTANI, R. B. Development of functional mesoporous microparticles for controlled drug delivery. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, p. 333-339, 2010.

RIEKES, M. K. P. *et al.* Evaluation of oral carvedilol microparticles prepared by simple emulsion technique using poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and polycaprolactone as polymers. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, n. 5, p.962-968, 2011.

ROCHA, M. S.; CAETANO, J. Á.; SOARES, E.; MEDEIROS, F. L. Caracterização da população atendida em unidade de terapia intensiva: subsídio para assistência. **Revista Enfermagem UERJ**, v. 15, p. 411-416, 2007.

RODRIGUES, R. S. G. *et al.* Perfil socio-demográfico de pacientes atendidos em ambulatório de isquemia cardíaca. **Revista Enfermagem UERJ**, v. 17, n. 4, p. 491-495, 2009.

ROGER, J. D. P. **Plantas mágicas: enciclopédia de plantas medicinais**. São Paulo: Planeta do Brasil, 1998.

ROLAND, R. M.; BHAWANI, S. A. Synthesis and Characterization of Molecular Imprinting Polymer Microspheres of Piperine: Extraction of Piperine from Spiked Urine. **Journal of analytical methods in chemistry**, v. 2016, p. 5671507, 2016.

ROSS, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 2, p. 115-126, 1999.

RUDNIK, L. A. C. **Desenvolvimento, Caracterização e Avaliação de nanopartículas contendo curcumina e metotrexato em células de adenocarcinoma de pulmão (CALU-3)**. 2019. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2019.

SA-BARRETO, L. C. *et al.* SEM-image textural features and drug release behavior of Eudragit-based matrix pellets. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 42, p. 292-298, 2017.

SANTIAGO, V. S. *et al.* Curcumina, o Pó Dourado do Açafrão-Da-Terra: Introspecções Sobre Química e Atividades Biológicas. **Química Nova**, v. 38, n. 4, p. 538-552, 2015.

SAHU, P.; CHOURASIYA, A.; GAJBHIYE, V. Higher Therapeutic Benefits of piperine Loaded Optimized Chitosan Microspheres for Improved Hepatoprotective Potentials. **Reserch Gate: Pharmaceutical Sciences**, v. 1, p. 39-44, 2012.

SANTOS, R. D. Farmacologia da niacina ou ácido nicotínico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, supl. 5, 2005.

SANTOS, M. C. B. *et al.* Hábitos e perfil socioeconômico do paciente aterosclerótico no Brasil. **Comunicação em Ciências da Saúde**, v. 22, n. 3, p. 247-256, 2011.

SCHAFROTH, N. *et al.* Nano and microparticle engineering of water insoluble drugs using a novel spray drying process. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 90, p. 8-15, 2012.

SEVERINO, P. *et al.* Polímeros Sintéticos Biodegradáveis: Matérias-primas e Métodos de produção de Micropartículas para uso em *Drug Delivery* e Liberação Controlada. **Polímeros**, v. 21, n. 4, p. 286-292, 2011.

SHAHANI, K.; PANYAM, J. Highly loaded, sustained-release microparticles of curcumin for chemoprevention. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 7, p. 2599-2609, 2011.

SHARMA, R. A.; GESCHER, A. J.; STEWARD, W. P. Curcumin: The story so far. **European Journal of Cancer**, v. 41, n. 13, p. 1955-1968, 2005.

SHARMA, V.; PATHAK, K. Effect of hydrogen bond formation/replacement on solubility characteristics, gastric permeation and pharmacokinetics of curcumin by application of powder solution technology. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 6, n. 6, p. 600-613, 2016.

SHI, Y.; LAMMERS, T. Combining Nanomedicine and Immunotherapy. **Accounts of Chemical Research**, v. 52, n. 6, p. 1543-1554, 2019.

SHISHIR, M. R. I.; CHEN, W. Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices. **Trends in Food Science & Technology**, v. 65, p. 49-67, 2017.

SHIVANI, S. H. Review article on microparticles. **International Journal of Pharmacy and Analytical Research**, v. 4, n. 3, p. 302-309, 2015.

SHOBA, G. *et al.*, Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. **Planta Medica**, v. 64, n. 4, p. 353-356, 1998.

SILVA, J. T. P. **Desenvolvimento de micropartículas estruturadas contendo curcumina**. 2014. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2014.

SILVA, M. C.; FIDELES, T. B.; FOOK, M. V. L. Esferas de quitosana e quitosana/curcumina pelo método de gelificação ionotrópica: influência da incorporação do fármaco. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 10, n. 1, p. 21-28, 2015.

SILVA NETA, M. N. *et al.* Avaliação antifúngica da piperina contra as cepas de *Candida*. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA E ENSINO EM CIÊNCIAS, 4., 2019, Campina Grande. **Anais [...] Campina Grande: IFPB**, 2019. Disponível em: <https://editorarealize.com.br/artigo/visualizar/56561>. Acesso em: 25 maio 2021.

SOARES, D. *et al.* Estudo dos níveis lipídicos em ratos após o tratamento com infusão de algumas plantas medicinais de uso popular. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 86, n. 2, p. 71-74, 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e prevenção de aterosclerose. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, n. 109, 2 supl. 1, p. 1-76, 2017.

SOLIMAN GHADA, Z. A. Effect of Curcumin, Mixture of Curcumin and Piperine and Curcum (Turmeric) on Lipid Profile of Normal and Hyperlipidemic Rats **Egyptian Journal Hospital Medicine**, v. 21, n. 1, p. 145-161, 2005. Doi:10.12816 / EJHM.2005.18057.

SONJE, A.; CHANDRA, A. Comprehensive Review on Eudragit polymers. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 4, n. 5, p. 71-74, 2013.

SOSNIK, A.; SEREMETA, K. P. Advantages and challenges of the spray drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 223, p. 40-54, 2015.

TELLI, E. M. R. P.; FRIGERI, M.; MELLO, S. R. Avaliação da atividade de enzimas hepáticas em dependentes, ex-dependentes e não usuários do etanol. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 48, n. 3, p. 245-252, 2016.

THIRUMALAI, T.; TAMILSELVAN, N.; DAVID, E. E. Hypolipidemic activity of *Piper betel* in high fat diet in high fat diet induced hyperlipidemic rat. **Journal of Acute Disease**, v. 3, n. 2, p. 131-135, 2014.

TONNESEN, H. H.; KARLSEN, J. Studies on curcumin and curcuminoids. V Alkaline degradation of curcumin. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung and Forschung**, v. 180, p. 132-134, 1985a.

TONNESEN, H. H.; KARLSEN, J. Studies on curcumin and curcuminoids. VI Kinetics of curcumin: degradation in aqueous solution. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung and Forschung**, v. 180, p. 402-404, 1985b.

TONON, R. V.; BRABET, C.; HUBINGER, M. D. Influência da temperatura do ar de secagem e da concentração de agente carreador sobre as propriedades físico-químicas do suco de açaí em pó. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 444-450, 2009.

TRAN, V-T.; BENOÎT, J-P.; VENIER-JULIENNE, M-C. Why and how to prepare biodegradable, monodispersed, polymeric microparticles in the field of pharmacy?. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 407, n. 1-2, p. 1-11, 2011.

TU, C. T. *et al.* Curcumin protects against concanavalin A induced hepatitis in mice through inhibiting the cytoplasmic translocation and expression. Of high mobility group box 1. **Inflammation**, v. 36, n. 1, p. 206-215, 2013.

TU, S. Y. *et al.* Preparation, characterization and evaluation of curcumin with piperine-loaded cubosome nanoparticles. **Journal of Microencapsulation**, v. 31, n. 6, p. 551-559, 2014.

TU, Y.; SUN, D.; ZENG, X.; YAO, N.; HUANG, X.; HUANG, D.; CHEN, Y. Piperine potentiates the hypocholesterolemic effect of curcumin in rats fed on a high fat diet. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 8, n. 1, p. 260-266, 2014. Doi:10.3892/etm.2014.1717

UNSWORTH L. D.; SHEARDOWN, H.; BRASH, J. L. Protein-resistant poly(ethylene oxide)-grafted surfaces: chain density-dependent multiple mechanisms of action. **Langmuir**, v. 24, n. 5, p. 1924-1929, 2008.

VARNER, A. S. **Modeling and optimization of the dehydration of beets for use as a value-added food ingredient**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências) – University of Maryland, Athens, 2014.

VINOD, K. R.; SANTHOSH, D.; ANBAZHAGAN, S. Formulation and evaluation of piperine cream-a new herbal dimensional approach for vitiligo patients. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 29-33, 2011.

WALTON, D. E. The Morphology of spray-dried particles: a qualitative view. **Drying Technology**, v. 18, n. 9, p. 1943-1986, 2000.

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

WANG, L.; PALME, V.; ROTTER, S.; SCHILCHER, N.; CUJAK, M.; WANG, D.; LADURNER, A.; HEISS, E. H.; STANGL, H.; DIRSCH, V. M.; AANASOV, A. G. Piperine Inhibits ABCA1 Degradation and Promotes Cholesterol Efflux from THP-1-derived Macrophages. **Molecular Nutrition & Food Research**. DOI: 10.1002/mnfr.201500960. 2016.

WICK, G.; KNOFLACH, M.; XU, Q. Autoimmune and Inflammatory Mechanisms in Atherosclerosis. **Annual Review of Immunology**, v. 22, p. 361-403, 2004.

WILKOSKA, A.; AMBROZIAK, W.; CZYZOWSKA, A.; ADAMIEC, J. Effect of microencapsulation by spray-drying and freeze-drying technique on the antioxidant properties of blueberry (*Vaccinium myrtillus*) juice polyphenolic compounds. **Polish Journal of Food And Nutrition Sciences**, v. 66, n. 11, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Statistics**. 2011. Disponível em: https://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2011/en/. Acesso em: 05 jan. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health statistics and information systems: disease burden and mortality estimates.** Geneva: WHO; 2016. Disponível em: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html. Acesso em: 05 jan. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Health Estimates 2016: deaths by cause, age, sex, by country and by region, 2000-2016.** Geneva: WHO; 2018. Disponível em: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html. Acesso em: 05 jan. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Annex 1. Technical Series 1003.** 2017. Disponível em: <https://www.who.int/publications/m/item/who-guidelines-for-selecting-marker-substances-of-herbal-origin-for-quality-control-of-herbal-medicines---trs-1003---annex-1>. Acesso em: 05 jan. 2021.

WU, C.; MCGINITY, J. W. Influence of Ibuprofen as a solid-state plasticizer in Eudragit® RS30D on the physicochemical properties of coated beads. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 2, n. 4, article 24, p. 1-9, 2001.

XU Y.; QI J.; YANG X.; WU E.; QIAN S. Y. Free radical derivatives formed from cyclooxygenase-catalyzed dihomo- γ -linolenic acid peroxidation can attenuate colon cancer cell growth and enhance 5-fluorouracil's cytotoxicity. **Redox Biology**, v. 2, p. 610–618, 2014.

YING, X. *et al.* Piperine inhibits IL- β induced expression of inflammatory mediators in human osteoarthritis chondrocyte. **International Immunopharmacology**, v. 17, n. 2, p. 293-299, 2013.

APÊNDICE A – EFFECT OF THE CURCUMIN AND PIPERINE CO-ADMINISTRATION ON THE BLOOD LIPID LEVELS AND CARDIOVASCULAR RISK: A SYSTEMATIC REVIEW

Research, Society and Development, v. 10, n. 1, e27310111682, 2021
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i1.11682>

Effect of the curcumin and piperine co-administration on the blood lipid levels and the cardiovascular risk: a systematic review

Efeito da co-administração de curcumina e piperina nos níveis de lipídeos sanguíneos e no risco cardiovascular: uma revisão sistemática

Efecto de la coadministración de curcumina y piperina sobre los niveles de lípidos en sangre y el riesgo cardiovascular: una revisión sistemática

Received: 01/04/2021 | Reviewed: 01/05/2021 | Accept: 01/11/2021 | Published: 01/13/2021

Mackelly Simionatto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5445-8696>
Universidade Estadual de Ponta Grossa, Brasil
E-mail: mackelly_simionatto@hotmail.com

Katlin Suellen Rech

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6699-2450>
Universidade Federal do Paraná, Brasil
E-mail: katlinsuellen@gmail.com

Mona Lisa Simionatto Gomes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5179-3985>
Centro Universitário Cesumar, Brasil
E-mail: milgsmionatto@yahoo.com.br

Jane Manfron

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1873-2253>
Universidade Estadual de Ponta Grossa, Brasil
E-mail: janemanfron@hotmail.com

Paulo Vítor Farago

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9934-4027>
Universidade Estadual de Ponta Grossa, Brasil
E-mail: pvfarago@gmail.com

Abstract

Some plant species show medicinal potential in atherosclerosis and other coronary diseases. Curcumin (CUR) is a yellow-colored phenolic compound from rhizomes of *Curcuma longa* L. that is mainly used as anti-inflammatory, antioxidant, and anticancer. Piperine (PIP) is an alkaloid from the fruits and the seeds of *Piper nigrum* L. and *Piper longum* L. It has several pharmacological activities, including the antioxidant and the immunomodulatory properties. PIP also increases the nutrients absorption. This review aims at investigating the effect of the CUR and PIP co-administration on the lipid profile and the cardiovascular events based on animal and human studies. This study was performed in the main scientific search bases. Among the 4,992 references found, 2,004 papers were initially chosen for the partial reading and 15 of them filled all the selection criteria for the entire reading. The CUR and PIP co-administration generally demonstrated positive effects on lipid profile in animals and humans by reducing total cholesterol, triglycerides, and LP(a) and by increasing HDL-c. In spite of no long-term clinical trial was carried out for investigating the effect of CUR and PIP co-administration on cardiovascular events, the reduction of glucose, AST, and ALP, and the increase of CAT and SOD were recorded as secondary serum markers to avoid the cardiovascular risk. Therefore, the studies usually report that co-administration of CUR and PIP shows efficacy for reducing serum lipids. The effect on preventing cardiovascular events by reducing the cardiovascular risk is lacking of direct evidence.

Keywords: Cardiovascular risk; Dyslipidemia; Phenolic compound; Piperidine alkaloid.

Resumo

Algumas espécies vegetais apresentam potencial medicinal na aterosclerose e outras doenças coronárias. A curcumina (CUR) é um composto fenólico de cor amarela, extraído dos rizomas de *Curcuma longa* L. e utilizado, principalmente, como antiinflamatório, antioxidante e anticâncer. A piperina (PIP) é um alcaloide dos frutos e sementes de *Piper nigrum* L. e *Piper longum* L. Possui diversas atividades farmacológicas, incluindo a antioxidante e as propriedades imunomoduladoras. A PIP também aumenta a absorção de nutrientes. Esta revisão tem como objetivo investigar o efeito da coadministração de CUR e PIP sobre o perfil lipídico e os eventos cardiovasculares, a partir de estudos em animais e humanos. Este trabalho foi conduzido nas principais bases de pesquisas científicas. Dentre as 4.992 referências encontradas, 2.004 artigos foram inicialmente escolhidos para a leitura parcial e 15 deles

preencheram todos os critérios de seleção para a leitura completa. A coadministração de CUR e PIP geralmente demonstrou efeitos positivos no perfil lipídico em animais e humanos, reduzindo o colesterol total, triglicerídeos e LP(a) e aumentando o HDL-c. Apesar de nenhum ensaio clínico de longo prazo ter sido realizado para investigar o efeito da coadministração de CUR e PIP em eventos cardiovasculares, a redução de glicose, AST e ALP e o aumento de CAT e SOD foram registrados como marcadores séricos secundários para evitar o risco cardiovascular. Portanto, os estudos geralmente relatam que a coadministração de CUR e PIP mostra eficácia para reduzir os lipídios séricos. O efeito na prevenção de eventos cardiovasculares pela redução do risco cardiovascular carece de evidências diretas.

Palavras-chave: Alcaloide piperidínico; Composto fenólico; Dislipidemia; Risco cardiovascular.

Resumen

Algunas especies de plantas tienen potencial medicinal en la aterosclerosis y otras enfermedades coronarias. La curcumina (CUR) es un compuesto fenólico de color amarillo, extraído de los rizomas de *Curcuma longa* L. y utilizado principalmente como antiinflamatorio, antioxidante y anticancerígeno. La piperina (PIP) es un alcaloide de los frutos y semillas de *Piper nigrum* L. y *Piper longum* L. Tiene varias actividades farmacológicas, incluidas las propiedades antioxidantes e inmunomoduladoras. PIP también aumenta la absorción de nutrientes. Esta revisión tiene como objetivo investigar el efecto de la coadministración de CUR y PIP sobre el perfil lipídico y los eventos cardiovasculares, a partir de estudios en animales y humanos. Este trabajo se llevó a cabo en las principales bases de investigación científica. Entre las 4.992 referencias encontradas, inicialmente se eligieron 2.004 artículos para lectura parcial y 15 de ellos cumplían todos los criterios de selección para lectura completa. La coadministración de CUR y PIP generalmente demostró efectos positivos sobre el perfil lipídico en animales y humanos, reduciendo el colesterol total, triglicéridos y LP(a) y aumentando el HDL-c. Aunque no se ha realizado ningún ensayo clínico a largo plazo para investigar el efecto de la coadministración de CUR y PIP en eventos cardiovasculares, la reducción de glucosa, AST y ALP y el aumento de CAT y SOD se han registrado como marcadores séricos secundarios para evitar el riesgo cardiovascular. Por lo tanto, los estudios generalmente informan que la coadministración de CUR y PIP muestra eficacia para reducir los lípidos séricos. El efecto sobre la prevención de eventos cardiovasculares al reducir el riesgo cardiovascular carece de evidencia directa.

Palabras clave: Alcaloide de piperidina; Compuesto fenólico; Dislipidemia; Riesgo cardiovascular.

1. Introduction

According to the World Health Organization, two thirds of deaths worldwide are caused by chronic diseases as stroke, cancer, diabetes mellitus (DM), and cardiovascular diseases (CVD) (WHO, 2011). The risk of developing CVD and cancer are impaired by physiological and metabolic changes, caused by obesity, DM, dyslipidemia, systemic arterial hypertension, pro-inflammatory and pro-thrombotic states. These factors are related to the heredity and lifestyle since sedentary lifestyle, stress, alcohol consumption, excessive intake of saturated fats in the diet, besides the continuous use of tobacco may damage the clinical status (Barbalho et al., 2015).

The disruption of lipid metabolism causes the atherosclerosis disease, which involves the dyslipidemia, the chronic inflammation, and the deposition of atherosclerotic plaques in the arterial endothelium (Basatemur et al., 2019). In addition, it is well known that the oxidative stress is highly activated during the atherosclerotic injury (Galkina & Ley, 2009). Atherosclerosis and other coronary diseases affect more than 10% of the world population and are a remarkable concern of health services (GBD, 2018) since cardiovascular problems, such as acute myocardial infarction, stroke, and heart failure may occur over time (Oliveira et al., 2009). Other clinical complication is the liver disorder caused by the inflammatory process related to the particular changes in the lipid metabolism (Dieberger et al., 2018).

Pharmacological and non-pharmacological interventions can be used for treating dyslipidemia and for preventing atherosclerosis and other coronary diseases (Barbalho et al., 2015). In this context, novel studies have been focused on natural products and dietary nutrients for improving the lipid profile (Torres et al., 2015). Curcumin (CUR) is a yellow-colored phenolic compound, chemically known as [1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione]. CUR is naturally obtained from the rhizomes of *Curcuma longa* L., which are known as turmeric. Turmeric powder containing CUR is widely used as a spice in cooking. CUR demonstrates a high pharmacological potential for interacting with several molecular targets and protein complexes (Nascimento et al., 2012). In particular, CUR reduces the blood lipid levels and has hepatoprotective

effects. These mechanisms are not well elucidated, but includes the reduction in the lipid peroxidases and the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMGCoA reductase) (Alwi et al., 2008). In spite of these promising effects on lipid profile, CUR shows photosensitivity and low bioavailability (Rudnik et al., 2020), which hinder its clinical use alone.

Piperine (PIP), 1-(5-[1,3-benzodioxol-5-yl]-1-oxo-2,4-pentadienyl) piperidine, is an alkaloid from the fruits and the seeds of *Piper nigrum* L. and *Piper longum* L. These species are known as black pepper and are widely used as a food spice (Ahmad, 2012). PIP demonstrates anti-inflammatory, antioxidant, immunomodulatory, and anticancer properties. This compound impairs the formation of fat cells, which leads to the blood lipid reduction. The reasonable mechanism to decrease serum lipid levels and obesity occurs by increasing the cholesterol reverse transport via ATP-binding cassette transporter (ABCA1) (Wang et al., 2016). PIP increases the absorption of vitamin A, vitamin B₆, vitamin C, selenium, and beta-carotene (Atal & Bedi, 2010). Despite its pungency, PIP also is used for enhanced the bioavailability of some drugs, including CUR (Duangjai et al., 2013).

Therefore, the co-administration of CUR and PIP seems to be a feasible strategy to increase the bioavailability of CUR and to potentiate their effect on the blood lipids reduction at the same time. Although proposed mechanisms of action were previously reported (Alwi et al., 2008; Atal & Bedi, 2010), preclinical and clinical trials describing the effect of CUR and PIP co-administration on serum lipids and cardiovascular events are restricted (Chakraborty et al., 2017; Hlavačková et al., 2011). In that sense, this systematic review was carried out for collecting secondary data and for providing an evidence synthesis regarding the main research question: Does co-administration of CUR and PIP in a particular dosage improve the lipid profile and have a beneficial effect on cardiovascular events based on human and animal studies?

2. Methodology

This study is a systematic review carried out in accordance with the recommendations of the Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions (Higgins et al., 2019). In brief, it is an exploratory-descriptive qualitative research (Gondin & Souza, 2021; Pereira et al., 2018) and it was performed using the guidelines of the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and MetaAnalyses (PRISMA) (Moher et al., 2009).

2.1 Study selection

The searches were performed in June 2020 using the electronic sites of the following databases: Cochrane (<https://www.cochrane.org/>), Embase (<https://www.elsevier.com/solutions/embase-biomedical-research>), Google Scholar (<https://scholar.google.com.br/>), Lilacs (<https://lilacs.bvsalud.org/>), Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), Scielo (<https://scielo.org/>), ScienceDirect (<https://www.sciencedirect.com/>), Scopus (<https://www.scopus.com/>), and Web of Science (<https://www.webofknowledge.com/>). The following keywords were searched: curcumin AND piperine AND lipid; curcumin AND piperine AND cholesterol; curcumin AND piperine AND cardiovascular risk. The publication date was not restricted during this process, and documents dated from 1964 to 2020 were achieved. Documents were exported and stored in the EndNote web program. Duplicate documents were deleted using the EndNote tool called "find duplicates". Duplications which were not excluded in this stage were then removed manually. Partial readings were carried out considering the titles and the abstracts. The complete readings were performed by regarding the full paper content. These research selections were read and analyzed by two reviewers. A third reviewer resolved any selection disagreement between the first two reviewers.

2.2 Exclusion criteria

The following documents were initially excluded from the research files: books, indexes, handbooks, pharmacopoeias, contents, blogs, and papers in languages other than English and Spanish. For the next stage of the study, in which the titles and the abstracts were investigated, the exclusion criteria were: review articles, meta-analysis, papers that evaluated CUR or PIP alone, papers that assessed CUR and PIP with other substance in combination. Studies that did not report data regarding the blood lipid levels or the cardiovascular risk were also deleted.

3. Results and Discussion

The initial search provided a total of 4,992 references. Among them, 2,282 duplications were found and automatically excluded by the use of Endnote. Another 171 papers were manually identified as duplication and excluded. In addition to the papers written in English, documents were also found in Spanish (1), Japanese (5), French (2), Polish (1), and Italian (1).

After excluding books, indexes, handbooks, pharmacopoeias, contents, and blogs, 2,004 files in English involving papers and gray literature remained for reading of their titles and abstracts. Taking into consideration the exclusion criteria, 22 papers were chosen for the complete reading. Five of these documents were then excluded for presenting at least one of the features assumed as exclusion criteria: three papers studied only CUR or PIP alone; one document was excluded because it is a review paper; and a document including CUR, PIP, and other substances was also excluded. Two additional papers were excluded due to the exhausting lack of access. Therefore, 15 papers were chosen for writing this systematic review. These analytical steps are detailed in Figure 1.

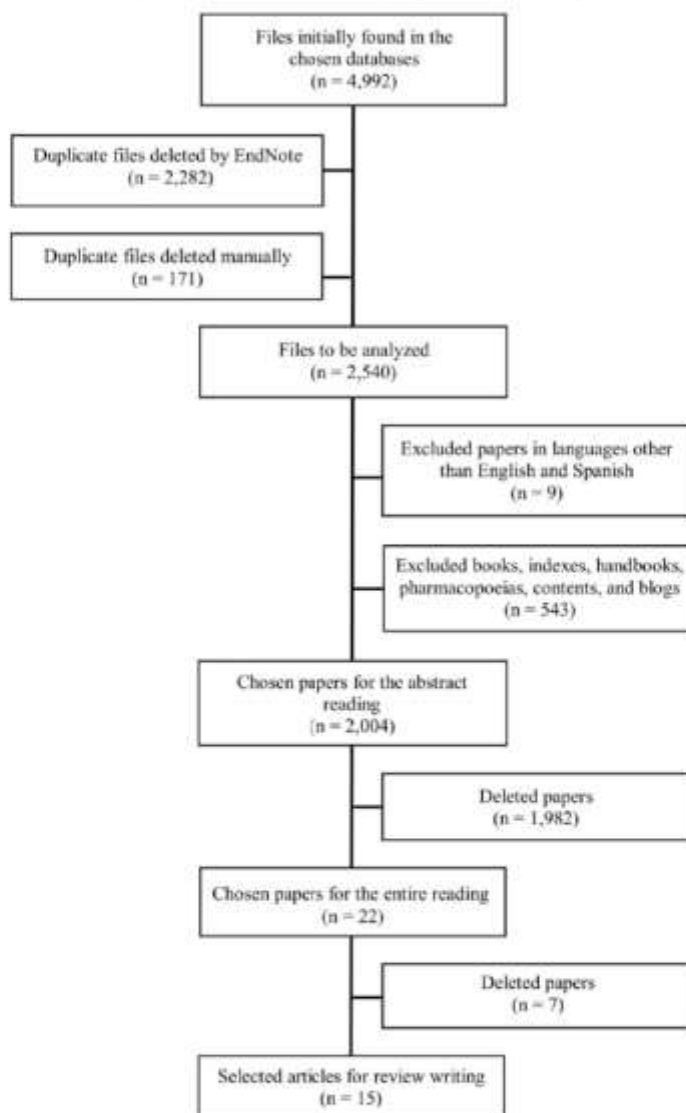
The papers included in the present study refer to animal and human trials regarding to the effect of CUR and PIP co-administration on the blood lipid levels and the cardiovascular risk carried out from 2005 to 2019. Table 1 summarized the analytical data according to the following aspects: aim of the study, country in which the study was performed, tested samples, and observed results. Considering the 15 studies evaluated in full-content structure, 2 of them were carried out in chickens, 7 of them used rats, and 6 of them were performed in humans.

Concerning to the aim of the study, 2 papers reported the CUR and PIP co-administration for improving the chicken performance; 4 of them investigated the antidiabetic effect of these two substances in co-administration; others 2 papers were devoted to study the cardioprotective activity of CUR and PIP; 1 paper aimed at reporting the hepatoprotective effect of CUR and PIP; and others 6 of them investigated the effect of the CUR and PIP co-administration on obese individuals.

Regarding to the country where the studies were carried out, 2 of them involved researchers from Egypt and other 2 papers were performed in China. One paper was written by researches of the following countries: Brazil, India, Slovakia, United States in partnership with Japanese researchers. A total of 7 papers was conducted in Iran, however 6 of them were performed in partnership with researchers from other countries: 1 paper with the United Kingdom; 1 with Australia; 1 with the United States; 1 with the United States and Croatia; and 1 with Mexico. The diversity of countries involved in these studies proves that the CUR and PIP co-administration for providing different pharmacological effects is something of interest worldwide and that the possible biological effects of CUR and PIP, mainly those related to the blood lipid levels and the cardiovascular risk, remain as a question to be answered by science.

Considering the dosage used, a range of doses was reported. CUR was used in a wide range of 25 to 1000 mg/kg/day, while PIP was administrated from 5 to 40 mg/kg/day. These differences can certainly influence the expected pharmacological effects. In addition, a standard dose of CUR and PIP cannot be established for the proposed goals.

Figure 1. Flowchart of the paper selection steps



Note: The paper number is showed in parentheses. Source: Authors.

Table 1. Analysis of chosen papers according to the inclusion criteria that investigated the *in vivo* effect of curcumin and piperine co-administration on the lipid profile and the cardiovascular risk

Paper Aim	Country	Sample(s)	Results	Reference
To check if the curcumin and piperine co-administration in a basal diet can improve the performance and the health status of chickens, including the blood parameters	Egypt	0,5% <i>Piper nigrum</i> L. + 0,5% <i>Curcuma longa</i> L.	In relation to the control group, the following results were found: ▪ Increase in the chicken weight gain as function of food intake; ▪ Increase in the total protein content (g/dL); ▪ Absence of significant differences in the levels of ALB (g/dL), cholesterol (mg/dL), TG (mg/dL), ALT (U/100 mL), globulin (g/dL), AST (U/100 mL), and ALP (mg/dL); ▪ Reduction in glucose levels (g/dL).	Abou-Elkhair et al., 2014
To verify the effect of a basal diet plus the combination of curcumin and piperine on the performance of chickens, including their blood parameters	Iran	no data	In relation to the control group, the following results were achieved: ▪ No significant differences were recorded in the content of AST (UI/L), ALT (UI/L), LDH (UI/L), LDL-c (mg/dL), HDL-c (mg/dL), TG (mg/dL), total cholesterol (mg/dL), Na⁺ (mEq/L), K⁺ (mEq/L), and Cl⁻ (mEq/L).	Akbarian et al., 2012
To investigate the effect of the curcumin and piperine co-administration in a particular yogurt on physiological and biochemical parameters of rats with induced diabetes	Brazil	90 mg/kg curcumin + 20 mg/kg piperine 90 mg/kg curcumin + 40 mg/kg piperine	In relation to the control group, the following results were observed: For the group treated with 90 mg/kg curcumin + 20 mg/kg piperine: ▪ Reduction in blood glucose level (mmol/L), TG (mmol/L), total cholesterol (mmol/L), glucose (mmol/L/24h), urea (mmol/L/24h), and urinary proteins (μmol/L/24h). In addition, decreased serum levels of ALT, AST, ALP (μKat/L), MDA (μmol/L), liver (μmol/L/g tissue), and liver PCO (nmol/mg protein); ▪ HDL-c, GSH-Px (μKat/mg protein), and GSH (mmol/L/g tissue) levels remained unchanged; ▪ Increased levels of SOD (U/mg protein), CAT (μKat/mg protein). For the group treated with 90 mg/kg curcumin + 40 mg/kg piperine: ▪ There were no significant differences in blood glucose level (mmol/L), TG (mmol/L), glycosuria (mmol/L/24h), urea (mmol/L/24h), and urinary proteins (μmol/L/24h); ▪ MDA (μmol/L), liver (μmol/L/g tissue), SOD (U/mg protein), CAT (μKat/mg protein), GSH-Px (μKat/mg protein), GSH (mmol/L/g tissue), and HDL-c remained unchanged; ▪ Reduction in the levels of total cholesterol (mmol/L) and liver PCO (nmol/mg protein); ▪ Increased levels of ALT, AST, and ALP (μKat/L).	Arcaro et al., 2014

To evaluate the efficacy of the curcumin and piperine co-administration against induced cardiotoxicity in rats	India	100 mg/kg curcumin + 20 mg/kg piperine; 50 mg/kg curcumin + 20 mg/kg piperine; 25 mg/kg curcumin + 20 mg/kg piperine	Regarding to the control group, all 3 groups showed: - Improve in the electrocardiographic parameters: heart rate (beats/min), QRS, RR, PR interval (ms), and QT segment (ms); - Reduction of AST, ALT, ALP, CK-MB, CK-NAC, LDH (U/L), total cholesterol, TG (mg/dL), and TBARS (units/mg of protein); - Increased levels of SOD (U/mg protein) and CAT (U/mg protein).	Chakraborty et al., 2017
To study the effect of the curcumin and piperine co-administration on the increase of blood pressure and the aorta remodeling in NO-deficient rats	Slovakia	100 mg/kg/day curcumin + 20 mg/kg/day piperine	In relation to the control group, the following results were recorded: - Decrease in blood pressure only on the 3rd week of treatment; - There was no significant reduction in the aortic wall thickness; - There was a reduction in the levels of PTAH and collagen I; - Increase in actin levels; - No significant differences were observed in the levels of elastin, collagen III, total collagen content, CSA, and Van Gieson.	Hlavačková et al., 2011
To report the effect of curcumin and piperine co-administration on rats subjected to a lithogenic diet	China	500 mg/kg curcumin + 20 mg/kg piperine	In relation to the control group, the following results were achieved: - Reduction in the levels of cholesterol (mmol/L) in serum, TG (mmol/L) in serum, and cholesterol (mmol/L) in bile; - Low change in the levels of phospholipid and bile acid (mmol/L); 70% reduction in the incidence of cholesterol gallstones; - Decreased liver weight; - Protective effect against lithogenic diet, histopathological changes inhibited; - Reduction in the NPC1L1 and SREBP2 expression.	Li et al., 2015
To analyze the effects of the administration of the combination of Piperine and Curcumin in rats with obesity-induced	USA and Japan	1000 mg/kg curcumin + 50 mg/kg piperine	In relation to the control group, the following results were obtained: - Reduction of the total body fat percentage; - Reduction in the levels of IL-1β and KC/GRO; - There were no statistically significant differences in the levels of IFN-γ, IL-10, IL-12 p70, and IL-6.	Miyazawa et al., 2018
To investigate the effect of curcumin and piperine co-administration on the serum levels of sdLDL-c in obese individuals	Iran and United Kingdom	1000 mg/day curcuminoids + 5 mg/day piperine	In relation to the control group, the following data were observed: No significant change was found regarding to the serum sdLDL-c content in these individuals.	Moohebbati et al., 2014

To evaluate the effect of curcumin and piperine co-administration on the lipid profile of individuals with metabolic syndrome	Iran and Australia	1000 mg/day curcuminoids + 10 mg/day of Bioperine® (extract of <i>Piper</i> sp. containing at least 95% piperine)	In relation to the control group, the following results were evidenced: - Reduction in LDL-c, non-HDL-c, total cholesterol, TG, and Lp(a); - Increase in HDL-c; - There was no significant change in sdLDL-c.	Panahi et al., 2014
To report the effect of curcumin and piperine co-administration on oxidative indexes in diabetic individuals	Iran and USA	1000 mg/day curcuminoids + 10 mg/day of piperine	In relation to the control group, the following data were observed: - Increase in total serum antioxidant capacity and SOD activity; - Reduction of MDA activity.	Panahi et al., 2016
To analyze the effect of curcumin and piperine co-administration on the lipid parameters in individuals with type 2 diabetes	Iran, Croatia, and USA	1000 mg/day curcuminoids + 10 mg/day piperine	In relation to the control group, the following results were achieved: - Reduction in serum Lp(a); - Increase in HDL-c; - There was no significant change in the levels of total cholesterol, TG, LDL-c and non-HDL-c.	Panahi et al., 2017
To investigate the effect of curcumin and piperine co-administration on glycemic, hepatic, and inflammatory parameters in individuals with type 2 diabetes	Iran and Mexico	500 mg/day curcuminoids + 5 mg/day piperine	In relation to the control group, the following data were observed: - Reduction in weight (kg) and BMI (kg/m²); - Reduction in blood glucose level (mg/dL); - Reduction of HbA1c (%), C-peptide (ng/mL), ALT (U/L), and AST (U/L); - There was no significant change in insulin (mIU/L), hs-CRP (g/L), Cr (mg/dL), HOMA-IR, HOMA-β, and HSI.	Panahi et al., 2018
To evaluate the effect of curcumin and piperine co-administration on liver enzymes, lipid profile, glycemic indexes, and disease severity in individuals with nonalcoholic fatty liver disease	Iran and USA	500 mg/day curcuminoids + 5 mg/day piperine	In relation to the control group, the following results were recorded: - Reduction in ALB (g/dL); - There was no significant change in the levels of BIL (mg/dL), TG (mg/dL), HDL-c (mg/dL), ferritin (μg/L), LDH (U/L), FPG (mg/dL), HbA1c (%), BUN (mg/dL), Cr (mg/dL), TSH (mIU/L), WBC (10⁹/L), RBC (10⁹/L), Plt (10⁹/L), ALT (U/L), AST (U/L), ALP (U/L), Hb (g/dL), HCT (%), ESR (mm/hr), Fe (μg/dL), and TIBC (μg/dL); - Significant reduction in the NAFLD severity.	Panahi et al., 2019
To observe the effect of curcumin and piperine co-administration on the lipid profile of normal and hyperlipidemic rats	Egypt	0.1% curcumin + 20 mg/kg piperine 0.25% curcumin + 20 mg/kg piperine 0.5% curcumin + 20 mg/kg piperine	In relation to the control group, the following data were found: - Relative decrease in the mass of liver and heart; - No difference was observed in the body mass gain; - Decreased levels of cholesterol, LDL-c, VLDL-c, TG, and phospholipids; - Increase in HDL-c.	Soliman Ghada, 2005
To detect the	China		In relation to the control group, the	Tu et al., 2014

hypocholesterolemic effect of curcumin and piperine co-administration on rats subjected to a high-fat diet	100 mg/kg/day curcumin + 5 mg/kg/day piperine	following data were obtained: ▪ Decreased levels of total cholesterol (mmol/L), TG (mmol/L), and LDL-c (mmol/L); ▪ Increase in HDL-c (mmol/L) and ApoA1 (g/L); ▪ No significant change in ApoB (g/L); ▪ Decreased levels of total cholesterol and TG in liver (μmol/g of liver); ▪ Increased levels of total cholesterol, TG, and total bile acid in the stools (μmol/g of stools/day); ▪ Increased activity of LCAT (nmol/h/mL) and CYP7A1 (nmol/h/mg protein).
--	---	--

Abbreviations:

ALB: albumin; ALP: alkaline phosphatase; ApoA1: apolipoprotein A-1; ApoB: apolipoprotein B; ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; BIL: bilirubin; BMI: body mass index; BUN: blood urea nitrogen; CAT: catalase; Cl: chloride ion; CK-MB: creatine kinase mb fraction; CK-NAC: creatine kinase; Cr: creatinine; CSA: cross sectional area; CYP7A1: cholesterol 7α-hydroxylase; ESR: erythrocyte sedimentation rate; FBS: fasting plasma glucose; Fe: iron; FPG: fasting plasma glucose; GRO: human growth-regulated oncogene; GSH: glutathione; GSH-Px: glutathione peroxidase activity; Hb: hemoglobin; HbA1c: glycated hemoglobin; HCT: hematocrit; HDL-c: high density lipoprotein cholesterol; HOMA-β: the homeostasis model assessment-β cell function; HOMA-IR: the homeostasis model assessment estimated insulin resistance; hs-CRP: high-sensitivity C-reactive protein; HSI: hepatic steatotic index; IFN-γ: interferon gamma; IL-1β: interleukin 1 beta; IL-6: interleukin 6; IL-10: interleukin 10; IL-12 (p70): interleukin 12 disulfide-linked heterodimeric 70-kDa cytokine; K⁺: potassium ion; KC: keratinocytes-derived chemokine; LCAT: lecithin cholesterol acyltransferase; LDH: lactate dehydrogenase; LDL-c: low density lipoprotein cholesterol; Lp (a): lipoprotein (a); MDA: malondialdehyde; Na⁺: sodium ion; NAFLD: nonalcoholic fatty liver disease; NPC1L1: Niemann-Pick C1-Like 1 protein; PCO: protein carbonyl content; Plt: platelet; PR interval: is the time from the onset of the P wave to the start of the QRS complex on the electrocardiogram; PTAH: photungsten acid-hematoxylin staining method; QRS interval: waves represent ventricular depolarization; QT segment: total duration of ventricular depolarization; RBC: red blood cell; RR interval: the time elapsed between two successive R waves of the QRS signal on the electrocardiogram; sdLDL-c: small dense low density lipoprotein cholesterol; SOD: superoxide dismutase; SREBP2: sterol regulatory element-binding protein 2; TAC: total antioxidant capacity; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; TG: triglycerides; TIBC: total iron-binding capacity; TSH: thyroid-stimulating hormone; UA: uric acid; Van Gieson: Van Gieson staining method; VLDL-c: very low density lipoprotein cholesterol; WBC: white blood cell. Fonte: Dados da pesquisa (2015).

Regarding to the aim of the study and its main findings, Abou-Elkhair et al. (2014) investigated the effect of using a basal diet plus the CUR and PIP co-administration on the performance and the health status of chickens, including several blood parameters. These phytopharmaceuticals added to the diet increased the chicken weight and the total protein content, and reduced the glucose level. However, no change occurred in the levels of total cholesterol, triglycerides (TG), aspartate aminotransferase (AST), and alkaline phosphatase (ALP) using *C. longa* extract and *P. nigrum* extract both at 0.5%.

Akbarian et al. (2012) reported a similar study to Abou-Elkhair et al. (2014) using a basal diet plus the CUR and PIP co-administration in chickens, including some additional blood parameters. No significant difference was either observed for lactate dehydrogenase (LDH), low density lipoprotein cholesterol (LDL-c), high density lipoprotein cholesterol (HDL-c), and potassium ion (K⁺).

Arcaro and co-authors (2014) studied the effects of an experimental yogurt containing CUR and/or PIP on the biological and biochemical parameters of STZ-diabetic rats. The treatment using CUR at 90 mg/kg and PIP at 20 mg/kg decreased glucose, TG, total cholesterol, AST, ALP, and malondialdehyde (MDA). The levels of HDL-c, glutathione peroxidase (GSH-Px), and glutathione (GSH) remained unchanged. Superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) presented increased values. When higher amount of PIP (40 mg/kg) was associated with CUR, no additional benefit was achieved. Several mechanisms have been described to explain the antidiabetic activity involving CUR as the stimulation of insulin secretion by pancreatic beta cells, the increasing of muscle tissue, and the loss of body weight by reducing food intake (Best et al., 2007). Other mechanisms have been reported, including the inhibition of hepatic gluconeogenesis and the increased glucose uptake by muscle tissue, which are based on the activation of adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK) by CUR (Ejaz et al., 2009). These indirect effects on blood glucose of CUR show high relevance in this study since DM produces inflammation and excessive availability of energy-rich substrates (glucose and/or free fatty

acids), which increase the production of triglyceride-rich lipoproteins and may lead to a higher cardiovascular risk (Parhofer, 2015). The authors (Arcaro et al., 2014) also detailed that CUR decreased AST, ALP, and MDA, which promote an additive effect since high levels of these enzymes would be related to higher oxidative stress and tissue damage. Unfortunately, these results were statistically similar to those observed for STZ-diabetic rats treated with CUR alone, which represent that PIP did not show any effect on the aforementioned antidiabetic properties and antioxidant activity.

Chakraborty et al. (2017) described that the CUR and PIP co-administration improved some electrocardiographic parameters and presented a significant effect against induced cardiotoxicity. CUR at 50 mg/kg and PIP at 20 mg/kg demonstrated the better results, which were superior to those found for the CUR group. These authors attributed the enhanced effect of these phytopharmaceuticals for three reasons: (a) PIP increased the bioavailability of CUR; (b) CUR and PIP demonstrated antioxidant activity; and (c) CUR also enhanced the nitric oxide (NO) release.

Hlavačková et al. (2018) reported the effect of CUR and PIP at 100 and 20 mg/kg, respectively, on blood pressure and aortic remodeling in NO-deficient rats. The co-administration prevented the increase in blood pressure on 3-week treatment. CUR and PIP also lead to the vascular remodeling and the high elastin level in the blood vessel walls possibly due to the inhibition of matrix metalloproteinase 2 (Banerji et al., 2004). These findings show relevance in this study since atherosclerosis may give rise to acute myocardial infarction and the remodeling of artery vessels can prevent this serious pathologic event.

Li et al. (2015) described the effect of CUR and PIP co-administration on rats subjected to a lithogenic diet. This combination reduced total cholesterol and TG in blood and bile cholesterol. In addition, the gallstone incidence was decreased in 70%. These authors explained these suitable results based on the following rationale: (a) CUR is able to prevent the gallstone formation probably by reducing the expression of the Niemann-Pick C1 like intracellular cholesterol transporter 1 protein (NPC1L1), (b) PIP may increase the CUR bioavailability, and (c) PIP is capable of reducing serum cholesterol levels through its internalization by cholesterol transporting proteins (Duangjai et al., 2013).

Miyazawa et al. (2018) demonstrated the effects of CUR and PIP co-administration obese rats and reported that this combination induced the total body fat loss and the inflammation suppression. According to these authors, these two substances reduce the production of inflammatory cytokines, such as interleukin 1 beta (IL-1 β) and keratinocytes-derived chemokine (KC)/human growth-regulated oncogene (GRO) in plasma. However, CUR and PIP did not decrease the expression of interferon gamma (IFN- γ), interleukin 10 (IL-10), interleukin 12 disulfide-linked heterodimeric 70-kDa cytokine (IL-12 p70), and interleukin 6 (IL-6). Miyazawa et al. (2018) postulated that the cytokines decrease had no connection to the increase of CUR bioavailability by PIP, but was due to its anti-inflammatory and antioxidant properties, which enhanced the final activity. The authors suggested further studies for clarifying the effect of CUR and PIP co-administration on reducing the oxidative stress.

Moohebati et al. (2014) studied the effect of curcuminoids at 1000 mg/day and PIP at 5 mg/day on the serum levels of LDL-c of obese individuals and observed no significant response. These authors proposed that the cardiovascular effects of curcuminoids might occur by mechanisms that were mainly related to TG levels and did not affect LDL-c subfractions. Moohebati et al. (2014) affirmed the importance of exploring the impact of these substances on serum lipoproteins in more depth.

Panahi et al. (2014) reported the effect of CUR and PIP co-administration on the lipid profile of humans with metabolic syndrome. Reduced values for LDL-c, non-high-density lipoprotein cholesterol (non-HDL-c), total cholesterol, TG and lipoprotein (a) [Lp(a)] were achieved. The increase in HDL-c was also found. Further studies including a high dose and a longer treatment time were suggested. The authors mentioned that several molecular and cellular mechanisms have been described to explain the effect of curcuminoids on lipids, such as the inhibition of lipid biosynthesis by the negative regulation

of lipogenic factors, such as HMG-CoA, sterol regulatory element-binding proteins 1 and/or 2 (SREBP-1/2), and fatty acid synthase. The catabolic stimulus, the biliary excretion of lipids, and the lipid mobilization from adipose tissue (Shin et al., 2011; Zhao et al., 2008) were also involved. Panahi et al. (2014) recommended that an adjuvant therapy using CUR and PIP for a long-lasting treatment could enhance the effect of statins on blood lipid levels.

Panahi et al. (2016) evaluated the CUR and PIP co-administration concerning to the oxidative indices in diabetic individuals. These authors observed an increase in the total serum antioxidant capacity after 12 weeks. The oxidative stress has been involved in harmful damage in type 2 DM patients, which has been led to the long-term complications. In that sense, these substances could be used safely by this particular group due to the antioxidant activity. These authors explained that curcuminoids show phenolic hydroxyl functional groups, which can decrease the NO bioavailability and can protect against reactive intermediates. These compounds can also chelate redox-active metals and can suppress chain reactions that produce radicals induced by metal ions (Baum & Ng, 2004). However, new studies should be further performed to confirm its long-term impact, including at the cardiovascular level.

Panahi et al. (2017) investigated the effect of CUR and PIP co-administration on lipid parameters in DM2 individuals and described their ability to reduce the serum level of Lp(a) and to increase the HDL-c value, while the other lipoproteins did not change. The authors suggested that these phytopharmaceuticals could be used as a dietary supplement for treating dyslipidemia by DM2 patients. Panahi et al. (2017) also discussed that high levels of Lp(a) have been considered an important risk factor for premature atherosclerosis, regardless of LDL-c and non-HDL-c levels. Therefore, the finding that CUR and PIP can decrease Lp(a) in these patients is very clinically relevant (Aguilar et al., 2015; Reimer, 2013).

The CUR and PIP co-administration was also studied regarding the effect on blood glucose, hepatic and inflammatory parameters in DM2 individuals by Panahi et al. (2018). Lower blood glucose, as well as reduced liver parameters were reported. The antidiabetic effect of CUR and PIP was attributed to the hepatic glucose production decrease by the activation of AMPK and the inhibition of glucose-6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxylase (Fujiwara et al., 2008; Meghana et al., 2007). Curcuminoids can also protect pancreatic islets against oxidative stress, eliminate free radicals and improve the β -cell function (Seo et al., 2008). The current authors suggested again that long-term clinical trials are required to elucidate the anti-diabetic and hepatoprotective properties of CUR and PIP in DM2 patients to verify their effect on vascular complications.

Panahi et al. (2019) investigated the effect of CUR and PIP co-administration on liver enzymes, lipid profile, glycemic indexes, and disease severity in individuals with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). The results demonstrated the hepatoprotective effect of these natural products in combination by reducing the disease severity due to the inhibition of liver lipogenesis. These data are in agreement with literature since the bile acid metabolism decreased liver steatosis and reversed serum lipid levels abnormalities in mice with NAFLD (Yan et al., 2018). The possible mechanism of action of CUR could be explained by activating AMPK and by inhibiting SREBP-1, which could reduce the hepatic fat accumulation in obese mice and could prevent hepatic steatosis (Um et al., 2013). Another mechanism could be the SREBP-1 expression and the inhibition of SREBP-2 and LDL-c receptor genes (LDL-R), which could restore the lipid storage capacity of hepatic stellate cells and could protect against steatosis and liver fibrosis (Chen & Zheng, 2008; Graham, 2009; Kang & Chen, 2009a; Kang & Chen, 2009b).

Soliman Ghada (2005) described the effect of CUR and PIP co-administration on the lipid profile of normal and hyperlipidemic rats. Decreased levels of cholesterol, LDL-c, very low-density lipoprotein cholesterol (VLDL-c), TG, and phospholipids were recorded. In addition, increased levels of HDL-c were achieved. The aforementioned authors suggested that this drug combination could be used in the treatment of cardiovascular diseases since PIP provided an increased bioavailability for CUR. As supposed mechanisms of action, CUR interfered with the intestinal cholesterol uptake, improved

the cholesterol conversion in bile acids, increased the bile acid excretion, and inhibited lipid peroxidation that led to cholesterol reduction (Patil & Srinivasan, 1971; Soudamini et al., 1992; Sreejayan, 1994).

Tu et al. (2014) studied the hypocholesterolemic effects of CUR and PIP co-administration in rats subjected to a high-fat diet. These phytopharmaceuticals were able to decrease serum and hepatic levels of total cholesterol, TG, LDL-c, besides increasing HDL-c levels and fecal levels of total cholesterol, TG, and total bile acid. CUR and PIP regulated the gene expression levels of Apolipoprotein AI (ApoAI), lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT), cholesterol 7 alpha-hydroxylase (CYP7A1), and LDL-R (Yiu et al., 2011). This study demonstrated that the drug co-administration showed high efficacy than CUR alone against hypercaloric diets. Tu et al. (2014) suggested that the mechanism of action involved the increase of cholesterol efflux to the HDL-c particles and of ApoAI and LCAT mRNA levels (Anand et al., 2007; Shoba et al., 1998; Srinivasan, 2007; Suresh & Srinivasan, 2010).

When comparing the results obtained for these 15 studies (Table 1), 6 papers demonstrated that the CUR and PIP co-administration reduced the total cholesterol levels (Arcaro et al., 2014; Chakraborty et al., 2017; Li et al., 2015; Panahi et al., 2014; Soliman Ghada, 2005; Tu et al., 2014), while 2 other papers reported no significant change for this assay parameter (Akbarian et al., 2012; Panahi et al., 2017). Regarding to the TG levels, 6 chosen studies showed the TG reduction (Arcaro et al., 2014; Chakraborty et al., 2017; Li et al., 2015; Panahi et al., 2014; Soliman Ghada, 2005; Tu et al., 2014). No significant difference in the TG levels was observed by Abou-Elkhair et al. (2014), Akbarian et al. (2012), Panahi et al. (2017), and Panahi et al. (2019). One of the CUR and PIP combination tested by Arcaro et al. (2014) also presented no significant difference in TG.

The CUR and PIP co-administration decreased LDL-c levels in 3 papers (Panahi et al., 2014; Soliman Ghada, 2005; Tu et al., 2014), while LDL-c remained unchanged in 4 other studies (Akbarian et al., 2012; Arcaro et al., 2014; Moohebati et al., 2014; Panahi et al., 2017). For HDL-c levels, 4 trials described an increase in this assay parameter (Panahi et al., 2014; Panahi et al., 2017; Soliman Ghada, 2005; Tu et al., 2014), while 3 other papers showed no significant difference when compared with the control group (Akbarian et al., 2012; Arcaro et al., 2014; Panahi et al., 2019). LP(a) was decreased in the studies performed by Panahi et al. (2014) and Panahi et al. (2016). Tu et al. (2014) was the only study that assessed the Apo A1 and Apo B levels, when the CUR and PIP co-administration was used. Apo A1 showed an increase, while Apo B remained unchanged.

Two chosen studies (Chakraborty et al., 2017; Panahi et al., 2018) observed a decrease in AST and ALT values. These parameters remained statistically similar to the control for Akbarian et al. (2012) and Panahi et al. (2019). The drug combination containing lower PIP content tested by Arcaro et al. (2014) reduced AST, ALT, and ALP levels, while the combination containing higher PIP dose led to an increase of these biochemical parameters. A reduction in ALP was reported by Chakraborty et al. (2017). Panahi et al. (2019) described no significant difference for ALP. Two papers demonstrated that the CUR and PIP co-administration reduced the LDH levels (Arcaro et al., 2014; Chakraborty et al., 2017), while 2 other studies reported no significant change for this assay parameter when compared to control (Akbarian et al., 2012; Panahi et al., 2019).

An increase in the CAT and SOD concentration was observed in the studies carried out by Chakraborty et al. (2017) and Arcaro et al. (2014), when lower PIP amount was used. SOD was also measured by Panahi et al. (2016), who reported an increase in its level. Panahi et al. (2017) observed a reduction in the MDA levels, as well as Arcaro et al. (2014) at lower PIP concentration. A decrease in blood glucose levels were recorded in 2 papers (Arcaro et al., 2014; Panahi et al., 2018).

In brief, the CUR and PIP co-administration generally demonstrated positive effects on lipid profile in animals and humans by reducing total cholesterol, triglycerides, and LP(a) and by increasing HDL-C. In spite of no long-term clinical trial

was carried out for investigating the effect of CUR and PIP co-administration on cardiovascular events, the reduction of glucose, AST, and ALP, and the increase of CAT and SOD were recorded as secondary serum markers to avoid the cardiovascular risk. No particular dose was used as a standard. Therefore, the studies usually report that co-administration of CUR and PIP at different doses shows efficacy for reducing serum lipids. The effect on preventing cardiovascular events by reducing the cardiovascular risk is lacking of direct evidence.

The differences observed in the aforementioned clinical trials may be due to the heterogeneity of the studies, since diverse dosages of CUR and PIP were reported. In addition, different animal species or human groups, time intervals, and matrices as yogurt were also used, besides the phytopharmaceutical composition was varied since the curcuminoids were described in some papers. Hence, there was some confounding factors that hinder the question analysis as outlined. Therefore, it is recommended to perform a meta-analysis study in order to facilitate the data understanding, to compare the obtained results more accurately by suitable statistical techniques, and to draw more reliable conclusions or even new information (Egger & Smith, 1997; Filho et al., 2014). In addition to the meta-analysis, further long-lasting clinical trials with appropriate standard parameters must be performed in order to evidently ensure the effect of CUR and PIP co-administration on the lipid profile and the cardiovascular risk.

Piyachaturawat et al. (1983) who reported histopathological changes in rats described the PIP toxicity in doses ranging from 100 to 500 mg/kg. Thus, its long-term use should be more widely investigated. Burgos-Morón et al. (2010) sent a letter to the International Journal of Cancer reporting that the CUR and PIP co-administration may present some negative effects. In this document, the authors described that PIP have been usually used in order to increase the CUR levels in the biological tissues. However, they reported that PIP has been described as a drug inhibitor of the cytochrome P450 metabolism and may cause toxicity in people who are using certain medications. Besides, they recorded some reports that demonstrated the CUR toxicity in certain situations. Thus, Burgos-Morón et al. (2010) suggested that a risk-benefit profile should be established for the safety use of CUR and PIP.

4. Conclusion

According to the chosen studies, different CUR and PIP combinations have been investigated in experimental models in order to evaluate the effect on the lipid profile and the reduction of cardiovascular risk. It was observed that the concentrations of 100, 500, and 1000 mg/kg/day for CUR, and 5, 10, and 20 mg/kg/day for PIP were widely used.

The CUR and PIP co-administration usually demonstrated positive effects on lipid profile in clinical studies involving animals and humans by reducing total cholesterol, triglycerides, and LP(a) and by increasing HDL-C. In spite of no long-term clinical trial was performed for evaluating the effect of CUR and PIP co-administration on cardiovascular events, the reduction of glucose, AST, and ALP, and the increase of CAT and SOD were recognized as secondary serum markers to circumvent the cardiovascular risk. Therefore, a meta-analysis or further standardized long-lasting clinical trial should be performed.

In summary, the studies generally report that co-administration of CUR and PIP at different doses shows certain efficacy for reducing serum lipids. The effect on preventing cardiovascular events by reducing the cardiovascular risk is lacking of direct evidence. Safety and toxicology issue remain unknown.

References

- Abou-Elkhair, R., Ahmed, H. A., & Selim, S. (2014). Effects of Black Pepper (*Piper Nigrum*), Turmeric Powder (*Curcuma Longa*) and Coriander Seeds (*Coriandrum Sativum*) and Their Combinations as Feed Additives on Growth Performance, Carcass Traits, Some Blood Parameters and Humoral Immune Response of Broiler Chickens. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.*, 27(6): 847-854. doi:10.5713/ajas.2013.13644

- Aguilar, C., Alegria, E., Bonadonna, R.C., Catapano, A.L., Cosentino, F., Elisaf, M., Famer, M., Ferrières, J., Filardi, P.P., Hancu, N., Kayikcioglu, M., Mello e Silva, A., Milan, J., Retner, Z., Tokgozoglu, L., Valensi, P., Vignina, M., Vrablik, M., Zambon, A., Zamorano, J.L. (2015). A review of the evidence on reducing macrovascular risk in patients with atherogenic dyslipidaemia: a report from an expert consensus meeting on the role of fenofibrate-statin combination therapy. *Atheroscler Suppl*, 19:1-12. 10.1016/S1567-5688(15)30001-5
- Ahmad, N. (2012). Biological role of *Piper nigrum* L. (Black pepper): A review. *Asian Pac J Trop Med*, 5: 1945-53. 10.11474.3674
- Alkbarian, A., Golian, A., Kermanshahi, A.G., Moradi, S. (2012). Influence of turmeric rhizome and black pepper on blood constituents and performance of broiler chickens. *Afr. J. Biotechnol*, 11(34):8606-8611. 10.5897/AJB113318
- Alwi, I., Santoso, T., Suyono, S., Sutrisna, B., Suyatna, F.D., Kresno, S.B., Ernie, S. (2008). The effect of curcumin on lipid level in patients with acute coronary syndrome. *Acta Med Indones*, 40(4): 201-210
- Anand, P., Kumumakara, A. B., Newman, R. A., Aggarwal, B. B. (2007). Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm*, 4:807-818. doi:10.1021/mp700113r
- Arcaro, C. A., Gutierrez, V. O., Assis, R. P., Moreira, T. F., Costa, P. I., Baviera, A. M., Brunetti, I. L. (2014). Piperine, a Natural Bioenhancer, Nullifies the Antidiabetic and Antioxidant Activities of Curcumin in Streptozotocin-Diabetic Rats. *PLoS ONE*, 9(12): e113993. 10.1371/journal.pone.0113993
- Atal, N., & Bedi, K. (2010). Bioenhancers: Revolutionary concept to market. *J. Ayurveda Integr Med*, 1(2): 96-99. 10.4103/0975-9476.65073
- Banerji, A., Chakrabarti, J., Mitra, A., & Chatterjee, A. (2004). Effect of curcumin on gelatinase A (MMP-2) activity in B16F10 melanoma cells. *Cancer Lett*, 211:235-242.
- Barbalho, S. M., Bechara, M. D., Quesada, K., Gabaldi, M. R., Goulart, R. A., Tofano, R. J., & Gasparini, R. G. (2015). Síndrome metabólica, aterosclerose e inflamação: triade indissociável? *J Vasc Braz*, 14(4): 319-327. 10.1590/1677-5449.04315
- Basatemur, G. L., Jorgensen, H. F., Clarke, M. C. H., Bennett, M. R., & Mallat, Z. (2019). Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Nat. Rev. Cardiol*, 16(12): 727-744. 10.1038/s41569-019-0227-9
- Baum, L., & Ng, A. (2004). Curcumin interaction with copper and iron suggests one possible mechanism of action in Alzheimer's disease animal models. *J. Alzheimer's Dis*, 6(4): 367-377. 10.3233/jad-2004-6403
- Best, L., Elliott, A. C., Brown, P. D. (2007). Curcumin induces electrical activity in rat pancreatic beta-cells by activating the volume-regulated anion channel. *Biochem Pharmacol*, 73(11):1768-1775. 10.1016/j.bcp.2007.02.006
- Burgos-Morón, E., Calderón-Morales, J. M., Salvador, J., Robles, A., & López-Lázaro, M. (2010). The dark side of curcumin. *Int. J. Cancer*, 126(7):1771-1775. 10.1002/ijc.24967
- Chakraborty, M., Bhattacharjee, A., Kamath, J.V. (2017). Cardioprotective effect of curcumin and piperine combination against cyclophosphamide-induced cardiotoxicity. *Indian J Pharmacol*, 49(1):65-70. 10.4103/0253-7613.201015
- Chen, A., & Zheng, S. (2008). Curcumin inhibits connective tissue growth factor gene expression in activated hepatic stellate cells in vitro by blocking NF- κ B and ERK signalling. *Br J Pharmacol*, 153(3):557-567. 10.1038/sj.bjp.0707542
- GBD. Contributors to the incidence and prevalence of GBD diseases and injuries 2017 (2018) Global, regional and national incidence, prevalence and years of living with 354 diseases and injuries in 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the global burden of diseases Study 2017. *The Lancet* 392(10159), 1789-1858
- Dieberger, A., Rooij, S. R., Korosi, A., & Vrijkotte, T. G. M. (2018). Maternal lipid concentrations during early pregnancy and eating behavior and energy intake in the offspring. *Nutrients*, 10:1026. 10.3390/nu10081026
- Duangjai, A., Ingkamon, K., Praputbut, S., & Limpeanchob, N. (2013). Black pepper and piperine reduce cholesterol uptake and enhance translocation of cholesterol transporter proteins. *J. Nat Med*, 67(2):303-310. 10.1007/s11418-012-0682-7
- Egger, M., & Smith, G. D. (1997). Meta-Analysis. Potentials and promise. *BMJ*, 315(7119):1371-1374. 10.1136/bmj.315.7119.1371
- Ejaz, A., Wu, D., Kwan, P., & Meydani, M. (2009). Curcumin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and angiogenesis and obesity in C57/BL mice. *J. Nutr*, 139(5): 919-925. 10.3945/jn.108.100966
- Filho, D. B. F., Paranhos, R., Júnior, J. A. S., Rocha, E. C., & Alves, D. P. (2014). O que é, para que serve e como se faz uma meta-análise? *Teoria & Pesquisa: Revista de Ciência Política*, 23(2):205-228
- Fujwara, H., Hosokawa, M., Zhou, X., Fujimoto, S., Fukuda, K., Toyoda, K., Nishi, Y., Fujita, Y., Yamada, K., Yamada, Y., Seino, Y., & Inagaki, N. (2008). Curcumin inhibits glucose production in isolated mice hepatocytes. *Diabetes Res Clin Pract*, 80(2): 185-191. doi:10.1016/j.diabres.2007.12.004
- Galkina, E., & Ley, K. (2009). Mecanismos imunológicos e inflamatórios da aterosclerose. *Annu. Rev. Immunol*, 27:165-197
- Graham, A. (2009). Curcumin adds spice to the debate: lipid metabolism in liver disease. *Br J Pharmacol*, 157(8):1352-1353. 10.1111/j.1476-5381.2009.00335.x
- Gondim, F. M. L., & Souza, B. E. S. de (2021) The use of laser therapy in the prevention and treatment of oral mucositis: a literature review. *Research, Society and Development*, [S. L.], 10(1). e5910110149. 10.33448/rsd-v10i1.10149
- Higgins, J. P. T., Thomas, J., Chandler, J., Cumpston, M., Li, T., Page, M. J., & Welch, V. A. (2019). *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions*. (2th ed.), John Wiley and Sons: 728p.

- Hlavačková, L., Janegová, A., Uličná, O., Janega, P., Černá, A., & Babál, P. (2011). Spice up the hypertension diet - curcumin and piperine prevent remodeling of aorta in experimental L-NAME induced hypertension. *Nutr. Metab.*, 8(72):1-10. 10.1186/1743-7075-8-72
- Kang, Q., & Chen, A. (2009a). Curcumin inhibits srebp-2 expression in activated hepatic stellate cells in vitro by reducing the activity of specificity protein-1. *Endocrinology*, 150:5384-5394. 10.1210/en.2009-0517
- Kang, Q., & Chen, A. (2009b). Curcumin suppresses expression of low-density lipoprotein (LDL) receptor, leading to the inhibition of LDL-induced activation of hepatic stellate cells. *Br J Pharmacol*, 157(8):1354-1367. 10.1111/j.1476-5381.2009.00261
- Li, Y., Li, M., Wu, S., & Tian, Y. (2015). Combination of curcumin and piperine prevents formation of gallstones in C57BL/6 mice fed on lithogenic diet: whether NPC1L1/SREBP2 participates in this process? *Lipids Health Dis*, 14(100):1-8. 10.1186/s12944-015-0106-2
- Meghana, K., Sanjeev, G., & Ramesh, B. (2007). Curcumin prevents streptozotocin-induced islet damage by scavenging free radicals: A prophylactic and protective role. *Eur J Pharmacol*, 577(1-3):183-191. 10.1016/j.ejphar.2007.09.002
- Miyazawa, T., Nakagawa, K., Kim, S. H., Thomas, M. J., Paul, L., Zingg, J.-M., Dolmakowski, G. G., Roberts, S. B., Kimura, F., Miyazawa, T., Azzi, A., & Meydani, M. (2018). Curcumin and piperine supplementation of obese mice under caloric restriction modulates body fat and interleukin-1 β . *Nutr. Metab.*, 15(12):1-9. 10.1186/s12986-018-0250-6
- Mohr, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., & Altman, D. G. (2009). Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA Statement. *Open Medicine*, 3(2): 123-130. doi:10.1016/j.jclinepi.2009.06.005
- Moohebati, M., Yazdandoust, S., Sahebkar, A., Mazidi, M., Sharghi-Shahri, Z., Ferns, G., & Ghayour-Mobarhan, M. (2014). Investigation of the effect of short-term supplementation with curcuminoids on circulating small dense low-density lipoprotein concentrations in obese dyslipidemic subjects: A randomized double-blind placebo-controlled cross-over trial. *ARYA Atheroscler*, 10(5):280-286
- Nascimento, T. C. F., Casa, D. M., Dalmoim, L. F., Mattos, A. C., Khalil, N. M., & Mainardes, R. M. (2012). Development and Validation of an HPLC Method Using Fluorescence Detection for the Quantitative Determination of Curcumin in PLGA and PLGA-PEG Nanoparticles. *Curr. Pharm. Anal.*, 8(4): 324-333. 10.2174/157341212803341654
- Oliveira, G., Mendes, R. T., & Boccaletto, E. M. A. (2009). *Alimentação, Atividade Física e Qualidade de Vida*. Campinas: Ipês Editorial, 1(5): 39-46
- Panahi, Y., Khalili, N., Hosseini, M. S., Abbasizadeh, M., & Sahebkar, A. (2014). Lipid-modifying effects of adjunctive therapy with curcuminoids—piperine combination in patients with metabolic syndrome: Results of a randomized controlled trial. *Complement. Ther. Med*, 22:851-857. 10.1016/j.ctim.2014.07.006
- Panahi, Y., Khalili, N., Sahebi, E., Namazi, S., Karimian, M. S., Majeed, M., & Sahebkar, A. (2016). Antioxidant effects of curcuminoids in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled trial. *Inflammopharmacol*, 25(1):25-31. 10.1007/s10787-016-0301-4
- Panahi, Y., Khalili, N., Sahebi, E., Namazi, S., Reiner, Z., Majeed, M., & Sahebkar, A. (2017). Curcuminoids modify lipid profile in type 2 diabetes mellitus: A randomized controlled trial. *Complement. Ther. Med*, 33:1-5. 10.1016/j.ctim.2017.05.006
- Panahi, Y., Khalili, N., Sahebi, E., Namazi, S., Simental-Mendia, L. E., Majeed, M., & Sahebkar, A. (2018). Effects of Curcuminoids Plus Piperine on Glycemic, Hepatic and Inflammatory Biomarkers in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Trial. *Drug Res*, 68(7):403-409. 10.1055/s-0044-101752
- Panahi, Y., Valizadegan, G., Ahmadi, N., Ganjali, S., Majeed, M., & Sahebkar, A. (2019). Curcuminoids plus piperine improve nonalcoholic fatty liver disease: A clinical trial. *J Cell Biochem*, 1-8. 10.1002/jcb.28877
- Patil, T. N., & Srinivasan, M. (1971). Hypocholesterolaemic effect of curcumin in induced hypocholesterolaemic rats. *Indian J. Exp. Biol.*, 9:167-169. doi:0.4162/nrp.2010.4.3.191
- Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Pereira, F. J., & Shitsuka, R. (2018). Scientific research methodology. UAB / NTE / UFSM.
- Piyachaturawat, P., Ginsukon, T., & Toskulkao, C. (1983). Acute and subacute toxicity of piperine in mice, rats and hamsters. *Toxicol Lett*, 16(3-4):351-359. 10.1016/0378-4274(83)90198-4
- Reimer, Z. (2013). Managing the residual cardiovascular disease risk associated with HDL-cholesterol and triglycerides in statin-treated patients: a clinical update. *Nutr. Metabol. Cardiovasc. Dis. NMCD*, 23(9):799-807. 10.1016/j.numecd.2013.05.002
- Rudnik, L. A. C., Farago, P. V., Budel, J. M., Lyra, A., Barboza, F. M., Klein, T., Kanunfre, C. C., Nadal, J. M., Bandeca, M. C., Raman, W., Novitski, A., Loguercio, A. D., Zamin, S. M. W. (2020). Co-loaded curcumin and methotrexate nanocapsules enhance cytotoxicity against non-small-cell lung cancer cells. *Molecules*, 25: 1913. 10.3390/molecules25081913
- Seo, K. I., Choi, M. S., Jung, U. J., Kim, H. J., Yeo, J., Jeon, S. M., & Lee, M. K. (2008). Effect of curcumin supplementation on blood glucose, plasma insulin, and glucose homeostasis related enzyme activities in diabetic db/db mice. *Mol Nutr Food Res*, 52(9):995-1004. 10.1002/mnfr.200700184
- Shin, S. K., Ha, T. Y., McGregor, R. A., & Choi, M. S. (2011). Long-term curcumin administration protects against atherosclerosis via hepatic regulation of lipoprotein cholesterol metabolism. *Mol Nutr Food Res*, 55:1829-1840. 10.1002/mnfr.201100440
- Shoba, G., Joy, D., Joseph, T., Majeed, M., Rajendran, R., & Srinivas, P. S. (1998). Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med*, 64:353-356. 10.1055/s-2006-957450
- Soliman Ghada, Z. A. (2005). Effect of Curcumin, Mixture of Curcumin and Piperine and Curcumin (Turmeric) on Lipid Profile of Normal and Hyperlipidemic Rats Egypt J Hosp Med. 21(1):145-161. 10.12816 / EJHM.2005.18057

- Soudamini, K. K., Umikrishnan, M. C., Soni, K. B., & Kuttan, R. (1992). Inhibition of lipid peroxidation and cholesterol levels in mice by curcumin. *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, 36(4):239-243.
- Sreejayan, M. N. R. (1994). Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation. *J. Pharm. Pharmacol.*, 46(12):1013-1016. doi:10.1111/j.2042-7158.1994.tb03258.x.
- Srinivasan, K. (2007). Black pepper and its pungent principle-piperine: a review of diverse physiological effects. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 47(8):735-748. 10.1080/0408390601062054
- Suresh, D., & Srinivasan, K. (2010). Tissue distribution & elimination of capsaicin, piperine & curcumin following oral intake in rats. *Indian J Med Res*, 131:682-691.
- Torres, N., Guevara-Cruz, M., Velazquez-Villegas, L. A., & Tovar, A. R. (2015). Nutrição e aterosclerose. *Arch Med Res*, 46(5):408-426.
- Tu, Y., Sun, D., Zeng, X., Yao, N., Huang, X., Huang, D., & Chen, Y. (2014). Piperine potentiates the hypocholesterolemic effect of curcumin in rats fed on a high fat diet. *Exp. Ther. Med.*, 8(1):260-266. 10.3892/etm.2014.1717
- Um, M. Y., Hwang, K. H., Ahn, J., & Ha, T. Y. (2013). Curcumin attenuates diet- induced hepatic steatosis by activating AMP-activated protein kinase. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 113(3):152-157. 10.1111/bcpt.12076
- Wang, L., Palme, V., Rotter, S., Schlicher, N., Cujak, M., Wang, D., Ladumer, A., Heiss, E. H., Stangl, H., Dirsch, V. M., & Atanasov, A. G. (2016). Piperine Inhibits ABCA1 Degradation and Promotes Cholesterol Efflux from THP-1-derived Macrophages. *Mol. Nutr. Food Res.* 61(4). 1500960. 10.1002/mnfr.201500960
- WHO, World Health Statistics (2011). < https://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2011/en/>
- Yan, C., Zhang, Y., Zhang, X., Aa, J., Wang, G., & Xiem Y. (2018). Curcumin regulates endogenous and exogenous metabolism via Nrf2- FXR-LXR pathway in NAFLD mice. *Biomed Pharmacother*, 105:274-281. 10.1016/j.biopha.2018.05.135
- Ym, W. F., Kwan, P. L., Wong, C. Y., Kam, T. S., Chau, S. M., Chan, S. W., & Chan, R. (2011). Attenuation of fatty liver and prevention of hypercholesterolemia by extract of *Curcuma longa* through regulating the expression of CYP7A1, LDL-receptor, HO-1, and HMG-CoA reductase. *J Food Sci*, 76(3): H80-H89. 10.1111/j.1750-3841.2011.02042.x
- Zhao, J., Sun, X. B., Ye, F., & Tian, W. X. (2008). Suppression of fatty acid synthase, differentiation and lipid accumulation in adipocytes by curcumin. *Mol Cell Biochem* 351:19-28. 10.1007/s11010-010-0707-z