

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

LOANDA APARECIDA CABRAL RUDNIK

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS CONTENDO CURCUMINA E METOTREXATO EM CÉLULAS
DE ADENOCARCINOMA DE PULMÃO (CALU-3)**

PONTA GROSSA

2017

LOANDA APARECIDA CABRAL RUDNIK

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS CONTENDO CURCUMINA E METOTREXATO EM CÉLULAS
DE ADENOCARCINOMA DE PULMÃO (CALU-3)**

Dissertação apresentada como requisito para à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos, medicamentos e correlatos.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago
Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Carla Cristine Kanunfre

PONTA GROSSA

2017

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

R913 Rudnik, Loanda Aparecida Cabral
Desenvolvimento, caracterização e
avaliação de nanopartículas contendo
curcumina e metotrexato em células de
adenocarcinoma de pulmão (CALU-3)/ Loanda
Aparecida Cabral Rudnik. Ponta Grossa,
2017.
99f.

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor
Farago.

Coorientadora: Prof^a Dr^a Carla Cristine
Kanunfre.

1.Curcumina. 2.Metotrexato.
3.Nanopartículas poliméricas.
4.Glicoproteína P. 5.Efeito sinérgico.
I.Farago, Paulo Vitor. II. Kanunfre,
Carla Cristine. III. Universidade Estadual
de Ponta Grossa. Mestrado em Ciências
Farmacêuticas. IV. T.

CDD: 615.321

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS-
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS
APLICADAS À FARMÁCIA, NÚMERO DA ATA 06/2017, DA MESTRANDA LOANDA
APARECIDA CABRAL RUDNIK REALIZADO NO DIA 21 DE AGOSTO DE 2017, NA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos vinte um dias de agosto de dois mil e dezessete, às 09h00min no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Bloco M, sala 115, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em seção pública sob a presidência do Professor Doutor Paulo Vitor Farago, reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da mestrand Loanda Aparecida Cabral Rudnik na linha de pesquisa: Desenvolvimento e Controle de Fármacos, Medicamentos e Correlatos, constituída pelas demais Doutoradas (membros titulares): Patrícia Mathias Döll Boscardin (UEPG/PR) e Yasmine Mendes Pupo (UFPR/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e à candidata das normas que regem a defesa de dissertação de Mestrado e definiu - se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título do trabalho foi: "DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO CURCUMINA E METOTREXATO EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE PULMÃO (CALU-3)." Encerrado a defesa, a banca pronunciou-se aprovado a dissertação, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. A aluna deverá entregar, no prazo de até 30 dias, a versão definitiva da dissertação de Mestrado, 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: sim ☐ não ☒

Novo título:

Paulo Vitor Farago 1- (DEFAR - UEPG) - Presidente

Patrícia Mathias Döll Boscardin (DEFAR - UEPG) - Titular

Yasmine Mendes Pupo (UFPR) - Titular

Ponta Grossa, 21 de agosto de 2017.

AGRADECIMENTOS

A Deus acima de tudo, por sempre derramar bênçãos e graças sobre mim, dando-me saúde, sabedoria e discernimento necessários à realização desse trabalho.

Aos meus pais Erivaldo e Lucélia, que em todos os momentos me apoiaram e não mediram esforços para que eu pudesse chegar até aqui. Por cuidarem com maior amor do meu bem mais valioso, meu filho Miguel, nos momentos em que não me era permitido estar ao seu lado pelos compromissos com a pesquisa. À minha avó Maria, “vó Mara”, que sempre cuidou de mim e de minha irmã com muito amor e também é responsável por essa conquista.

Ao meu lindo e amado filho Miguel, que foi muito desejado e esperado. Hoje é a principal razão para que eu procure sempre ser uma pessoa melhor, é minha inspiração, minha alegria de viver.

Ao meu esposo Márcio por todo amor, apoio, paciência e ajuda no decorrer do curso. Esta conquista não seria possível sem sua presença em minha vida.

À minha irmã Luana, sempre muito presente em minha vida, pelo apoio, amor, incentivo, preocupação e por sempre acreditar em mim juntamente com meu cunhado Joelmir.

Aos meus amigos pela amizade, preocupação e carinho. Em especial às minhas queridas amigas Renata, Maria Luiza, Geisamara e Karine que sempre se fizeram muito presentes nos principais momentos da minha vida.

À minha coorientadora professora Dr^a. Carla Cristine Kanunfre pela competência com que me orientou, paciência, dedicação, preocupação, ensinamentos, disponibilidade e principalmente pela amizade.

Ao meu orientador professor Dr. Paulo Vitor Farago, pela oportunidade, orientação e ensinamentos transmitidos.

À professora Dr^a. Jessica Mendes Nadal pelo auxílio nas análises, correções do trabalho, dedicação, disponibilidade e pela amizade.

À professora Dr^a. Traudi Klein e à doutoranda Amanda Martinez Lyra pela grande ajuda no desenvolvimento do método analítico.

Às professoras Dr^a. Patrícia Mathias Doll-Böscardin e Dr^a. Priscileila Colerato Ferrari pelas valiosas contribuições no exame de qualificação.

Aos funcionários e técnicos dos laboratórios, que me atenderam e ajudaram com o que eu precisava.

Ao curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

Às instituições de fomento CAPES e Fundação Araucária pelo auxílio financeiro.

E a todos que acreditaram, me apoiaram e incentivaram.

RESUMO

RUDNIK, Loanda A.C. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação de nanopartículas contendo curcumina e metotrexato em células de adenocarcinoma de pulmão (CALU-3)**. 2017. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2017.

Curcumina (CUR) é um composto polifenólico extraído dos rizomas de *Curcuma longa* L. e possui vários efeitos biológicos, como anti-inflamatório, antioxidante e antitumoral. O metotrexato (MTX) é um fármaco antimetabólito, muito indicado para o tratamento de câncer e possui a desvantagem de sofrer efluxo pela glicoproteína P (gp P). Com o intuito de melhorar características indesejáveis como baixa solubilidade aquosa e reduzida biodisponibilidade, CUR e MTX são modelos de substâncias a serem nanoencapsuladas. O objetivo do trabalho foi desenvolver e caracterizar nanopartículas poliméricas contendo CUR e MTX e avaliar a função sinérgica dos dois compostos em células de adenocarcinoma de pulmão (CALU-3). Foram desenvolvidas sete formulações (NCUR-1, NCUR-2, NMTX-1, NMTX-2, NCM-0, NCM-1 e NCM-2) a partir de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e polietilenoglicol 6000 (PEG 6000) pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado. Linhagens de células tumorais CALU-3 e células normais NHI-3T3 foram usadas para avaliação da viabilidade. Foram obtidas nanopartículas com tamanhos (278 a 325 nm), pH (5,26 a 6,32), potenciais zeta (-33 a -41 mV) e índices de polidispersão (0,237 a 0,341) adequados. Foi desenvolvido e validado um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para quantificação dos fármacos nos nanocarreadores. O método mostrou-se específico, linear, preciso, exato e robusto, na faixa de 10 a 70 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ para o MTX e de 10 a 90 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ para a CUR. Todas as formulações apresentaram formato esférico e escala nanométrica. Não foi observado alteração dos grupos funcionais dos fármacos nos espectros de infravermelho (FTIR). As análises térmicas (DSC e TGA) e de difração de raios X (DRX) indicaram que a incorporação do MTX e CUR às nanopartículas levou a amorfização dos fármacos. Os estudos *in vitro* utilizando a linhagem CALU-3, mostram que a formulação NCM-2, utilizando MTX (0,3 mg/mL) e CUR (0,5 mg/mL) mostrou-se mais interessante, inferindo-se que a CUR desempenhou a função de inibidora da gp P, permitindo a entrada do MTX levando à morte celular pelo seu efeito citotóxico. A análise morfológica por fluorescência evidenciou predominância de apoptose inicial e apoptose tardia para a formulação contendo NCM-2. Conclui-se que a formulação NCM-2 apresentou efeito sinérgico pela associação de MTX e CUR.

Palavras-chave: Curcumina. Metotrexato. Nanopartículas poliméricas. Glicoproteína P. Efeito sinérgico.

ABSTRACT

RUDNIK, Loanda A.C. **Development, characterization and evaluation of nanoparticles containing curcumin and methotrexate in lung adenocarcinoma cells (CALU-3)**. 2017. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2017

Curcumin (CUR) is a polyphenolic compound extracted from the rhizomes of *Curcuma longa* L. and has several biological effects, such as anti-inflammatory, antioxidant and antitumor. Methotrexate (MTX) is an antimetabolite drug, very indicated for the treatment of cancer and has the disadvantage of suffering efflux by the P-glycoprotein (gp P). In order to improve undesirable characteristics such as low aqueous solubility and reduced bioavailability, CUR and MTX are models of substances to be nanoencapsulated. The objective of this work was to develop and characterize polymeric nanoparticles containing CUR and MTX and to evaluate the synergistic function of the two compounds in lung adenocarcinoma cells (CALU-3). Seven formulations (NCUR-1, NCUR-2, NMTX-1, NMTX-2, NCM-1, NCM-1 and NCM-2) were developed from poly (ϵ -caprolactone) (PCL) and polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) by the interfacial deposition method of the preformed polymer. Calu-3 tumor cell lines and normal NHI-3T3 cells were used for assessing viability. Nanoparticles with sizes (278 to 325 nm), pH (5.26 to 6.32), zeta potentials (-33 to -41 mV) and suitable polydispersion indexes (0.237 to 0.341) were obtained. An analytical method was developed and validated by high performance liquid chromatography (HPLC) for quantification of the drugs in the nanocarreadores. The method was specific, linear, accurate, accurate and robust, in the range of 10 to 70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for MTX and 10 to 90 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for CUR. All formulations were spherical and nanoscale. No change was observed in the functional groups of the drugs in the infrared spectra (FTIR). Thermal analysis (DSC and TGA) and X-ray diffraction (XRD) indicated that the incorporation of MTX and CUR into nanoparticles led to the amorphization of the drugs. In vitro studies using the CALU-3 strain show that the NCM-2 formulation, using MTX (0.3 mg / mL) and CUR (0.5 mg / mL) was more interesting, inferring that the CUR performed the inhibitory role of P gp, allowing the entry of MTX leading to cell death by its cytotoxic effect. Fluorescence morphological analysis showed a predominance of early apoptosis and late apoptosis for the formulation containing NCM-2. It is concluded that the NCM-2 formulation presented synergistic effect by the association of MTX and CUR.

Key words: Curcumin. Methotrexate. Polymer nanoparticles. P glycoprotein. Synergistic effect.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas..... 26
- FIGURA 2 – Estrutura química de curcuminoides extraídos de *Curcuma longa* L: Curcumina (A), Desmetoxicurmina (B) e Bisdesmetoxicurcumina (C)..... 28
- FIGURA 3 – Esquema ilustrativo das várias atividades biológicas da curcumina.. 29
- FIGURA 4 – Estrutura química do ácido fólico e do metotrexato..... 31
- FIGURA 5 – Fluxograma das etapas da pesquisa..... 36
- FIGURA 6 – Ilustração esquemática do método de deposição interfacial do polímero pré- formado utilizado na preparação das nanopartículas contendo CUR e MTX..... 37
- FIGURA 7 – Fluxograma das etapas dos ensaios biológicos *in vitro* realizadas com as células CALU-3 e 3T3..... 44
- FIGURA 8 – Formulação com forte coloração amarela pela presença de CUR..... 49
- FIGURA 9 – Representação gráfica da curva analítica média para a determinação do MTX obtida em HPLC ($\lambda = 261$ nm) em fase móvel metanol:água acidificados com 0,5% de ácido acético (50:50 v/v)..... 50
- FIGURA 10 – Representação gráfica da curva analítica média para a determinação da CUR obtida em CLAE ($\lambda = 261$ nm) em fase móvel metanol:água acidificados com 0,5% de ácido acético (50:50 v/v)..... 51
- FIGURA 11 – Cromatogramas ($\lambda = 261$ nm) dos fármacos puros em comparação com o das nanocápsulas preparadas sem e com os fármacos: CUR 60 $\mu\text{g/mL}$ (A), MTX 70 $\mu\text{g/mL}$ (B), NCM-0 (C) e NCM-1 0,1 $\mu\text{g/mL}$ MTX e 3 $\mu\text{g/mL}$ CUR (D) em fase móvel metanol: água (50:50 v/v) acidificados com 0,5% de ácido acético.... 52

FIGURA 12 – Aspectos morfológicos dos materiais de partida obtidos por MEV-FEG: A) curcumina pura (aumento de 1.94 kX); B) metotrexato puro (aumento de 1.90 kX); C) PCL (aumento de 1.00 kX) e D) PEG (aumento de 1.00 kX).....	58
FIGURA 13 – Fotomicrografias das nanocápsulas obtidas por MEV-FEG: A) NCM-0 (aumento de 48kX); B) NCUR-1 (aumento de 35kX); C) NCUR-2 (aumento de 49kX); D) NMTX-1 (aumento de 35kX); E) NMTX-2 (aumento de 31kX); F) NCM-1 (aumento de 28kX); G) NCM-2 (aumento de 42kX).....	59
FIGURA 14 – Difractogramas dos fármacos puros e polímeros utilizados.....	60
FIGURA 15 – Difractogramas comparativos entre fármacos puros, misturas físicas e nanossuspensões.....	61
FIGURA 16 – Espectro FTIR da CUR, MTX, PEG e PCL.....	64
FIGURA 17 – Espectro IVTF comparativo entre os fármacos puros (CUR e MTX), polímeros puros (PEG e PCL), misturas físicas (MF CUR, MF MTX e MF NCM) e as formulações das nanocápsulas (NCUR-1, NCUR-2, NMTX-1, NMTX-2, NCM-1 e NCM-2).....	65
FIGURA 18 – Curvas de ATG: A) PCL, PEG 6000 e lactose; B) CUR, MF e NCUR-2; C) MTX, MF e NMTX-1 e D) NCM-0, NCM-1 e NCM-2.....	66
FIGURA 19 – Termogramas obtidos por CED: A) CUR, PCL, PEG 6000, lactose, MF CUR e NCUR-2; B) MTX, PCL, PEG 6000, lactose, MF MTX e NMTX-1 e C) CUR, MTX, PCL, PEG 6000, lactose, MF NCM, NCM-0, NCM-1 e NCM-2.....	68
FIGURA 20 – Valores de pH, após a preparação e após 60 dias para as formulações NCM-0, NCUR-1, NCUR-2, NMTX-1, NMTX-2, NCM-1 e NCM-2. Controle negativo (NCM-0); Nanocápsulas de CUR 1 mg.mL ⁻¹ (NCUR-1); Nanocápsulas de CUR 3 mg.mL ⁻¹ (NCUR-2); Nanocápsulas de MTX 0,1 mg.mL ⁻¹ (NMTX-1); Nanocápsulas de MTX 0,3 mg.mL ⁻¹ (NMTX-2); Nanocápsulas de CUR:MTX 3 mg.mL ⁻¹ : 0,1mg.mL ⁻¹ (NCM-1); Nanocápsulas de CUR:MTX 0,5 mg.mL ⁻¹ : 0,3 mg.mL ⁻¹ (NCM-2) * p<0,05; ** p<0,01.....	70

FIGURA 21 – Tamanho das nanopartículas, após a preparação e após 60 dias para as formulações NCM-0, NCUR-1, NCUR-2, NMTX-1, NMTX-2, NCM-1 e NCM-2. Controle negativo (NCM-0); Nanocápsulas de CUR 1 mg.mL⁻¹ (NCUR-1); Nanocápsulas de CUR 3 mg.mL⁻¹ (NCUR-2); Nanocápsulas de MTX 0,1 mg.mL⁻¹ (NMTX-1); Nanocápsulas de MTX 0,3 mg.mL⁻¹ (NMTX-2); Nanocápsulas de CUR:MTX 3 mg.mL⁻¹: 0,1mg.mL⁻¹ (NCM-1); Nanocápsulas de CUR:MTX 0,5 mg.mL⁻¹: 0,3 mg.mL⁻¹ (NCM-2) * p<0,05..... 71

FIGURA 22 – Potencial zeta das nanopartículas, após a preparação e após 60 dias para as formulações NCM-0, NCUR-1, NCUR-2, NMTX-1, NMTX-2, NCM-1 e NCM-2. Controle negativo (NCM-0); Nanocápsulas de CUR 1 mg.mL⁻¹ (NCUR-1); Nanocápsulas de CUR 3 mg.mL⁻¹ (NCUR-2); Nanocápsulas de MTX 0,1 mg.mL⁻¹ (NMTX-1); Nanocápsulas de MTX 0,3 mg.mL⁻¹ (NMTX-2); Nanocápsulas de CUR:MTX 3 mg.mL⁻¹: 0,1mg.mL⁻¹ (NCM-1); Nanocápsulas de CUR:MTX 0,5 mg.mL⁻¹: 0,3 mg.mL⁻¹ (NCM-2)..... 72

FIGURA 23 – Índice de polidispersão das nanopartículas, após a preparação e após 60 dias para as formulações NCM-0, NCUR-1, NCUR-2, NMTX-1, NMTX-2, NCM-1 e NCM-2. Controle negativo (NCM-0); Nanocápsulas de CUR 1 mg.mL⁻¹ (NCUR-1); Nanocápsulas de CUR 3 mg.mL⁻¹ (NCUR-2); Nanocápsulas de MTX 0,1 mg.mL⁻¹ (NMTX-1); Nanocápsulas de MTX 0,3 mg.mL⁻¹ (NMTX-2); Nanocápsulas de CUR:MTX 3 mg.mL⁻¹: 0,1mg.mL⁻¹ (NCM-1); Nanocápsulas de CUR:MTX 0,5 mg.mL⁻¹: 0,3 mg.mL⁻¹ (NCM-2)..... 73

FIGURA 24 – Efeito dos polímeros PCL e PEG e da formulação NCM-0 sobre células Calu-3 (72h). A viabilidade celular (%) foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT. A concentração da PCL e do PEG na formulação NCM-0 é equivalente à concentração dos polímeros puros. Os resultados são expressos com média e erro padrão da média, obtidos de 3-5 ensaios independentes, com n=4 por ensaio. Os símbolos * representam diferença significativa em relação ao controle obtida por análise de ANOVA uma via, seguida pelo teste POST-HOC de TUKEY (***) p< 0,0001)..... 74

FIGURA 25 – Efeito dos polímeros PCL e PEG e da formulação NCM-0 sobre células Calu-3 (72h). A viabilidade celular (%) foi avaliada pelo ensaio de SRB. A concentração da PCL e do PEG na formulação NCM-0 é equivalente à concentração dos polímeros puros. Os resultados são expressos com média e erro padrão da média, obtidos de 3-5 ensaios independentes, com n=4 por ensaio. Os símbolos * representam diferença significativa em relação ao controle obtida por análise de ANOVA uma via, seguida pelo teste POST-HOC de TUKEY (*p<0,05, ***p<0,0001).... 75

FIGURA 26 – Efeito dos fármacos puros e nanocápsulas sobre células Calu-3 (72h). A viabilidade celular (%) foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT. Os resultados são expressos com média e erro padrão da média, obtidos de 3-7 ensaios independentes, com n=4 por ensaio. Os símbolos * representam diferença significativa em relação ao controle obtida por análise de ANOVA uma via, seguida pelo teste POST-HOC de TUKEY (*p<0,05, ** p<0,001, ***p<0,0001) A: CUR pura; B: MTX puro; C: NCUR-2; D: NMTX-1; E: NCM-1; F: NCM-2..... 77

FIGURA 27 – Gráfico comparativo das formulações NCUR-2, NMTX-1, NCM-1 e NCM-2 para o ensaio de redução do MTT. Os resultados são expressos com média e erro padrão da média, obtidos de 3-7 ensaios independentes, com n=4 por ensaio. Os símbolos * representam diferença significativa em relação ao controle obtida por análise de ANOVA uma via, seguida pelo teste POST-HOC de TUKEY (*p<0,05, ** p<0,001, ***p<0,0001)..... 80

FIGURA 28 – Efeito dos fármacos puros e nanocápsulas sobre células Calu-3 (72h). A viabilidade celular (%) foi avaliada pelo ensaio de SRB. Os resultados são expressos com média e erro padrão da média, obtidos de 3-7 ensaios independentes, com n=4 por ensaio. Os símbolos * representam diferença significativa em relação ao controle obtida por análise de ANOVA uma via, seguida pelo teste POST-HOC de TUKEY (*p<0,05, ** p<0,001, ***p<0,0001) A: CUR pura; B: MTX puro; C: NCUR-2; D: NMTX-1; E: NCM-1; F: NCM-2..... 83

- FIGURA 29 – Gráfico comparativo das formulações NCUR-2, NMTX-1, NCM-1 e NCM-2 para o ensaio de SRB. Os resultados são expressos com média e erro padrão da média, obtidos de 3-7 ensaios independentes, com n=4 por ensaio. Os símbolos * representam diferença significativa em relação ao controle obtida por análise de ANOVA uma via, seguida pelo teste POST-HOC de TUKEY (*p<0,05, ** p<0,001, ***p<0,0001)..... 84
- FIGURA 30 – Efeito das formulações NCUR-2, NMTX-1 e NCM-2 na viabilidade celular de 3T3 avaliadas no período de 72 horas pelo ensaio de redução do MTT. Os resultados são expressos com média e erro padrão da média, obtidos de 4 ensaios independentes, com n=4 por ensaio. Os símbolos * representam diferença significativa em relação ao controle obtida por análise de ANOVA uma via, seguida pelo teste POST-HOC de TUKEY (*p<0,05, ** p<0,001, ***p<0,0001)..... 85
- FIGURA 31 – Efeito das formulações NCUR-2, NMTX-1 e NCM-2 na viabilidade celular de 3T3 avaliadas no período de 72 horas pelo ensaio de SRB. Os resultados são expressos com média e erro padrão da média, obtidos de 4 ensaios independentes, com n=4 por ensaio. Os símbolos * representam diferença significativa em relação ao controle obtida por análise de ANOVA uma via, seguida pelo teste POST-HOC de TUKEY (*p<0,05, ** p<0,001, ***p<0,0001)..... 86
- FIGURA 32 – Efeito das nanopartículas sobre a morfologia das células CALU-3 coradas com alaranjado de acridina e brometo de etídio. O controle apenas com meio está demonstrado em (A) e em (B) o controle NCM-0 (20,76: 12,12 µM PCL:PEG). Células tratadas por 24 horas com a formulação NCUR-2 25µM (C), NMTX-1 4µM (D), NCM-2 4:8,2 µM MTX:CUR (E) e NMC-2 8:16,4 µM MTX:CUR (F). As setas brancas indicam células viáveis, as setas de cor amarela indicam apoptose inicial, de cor azul indicam células em apoptose tardia e setas vermelha indicam os *blebs*. (Microscopia óptica de fluorescência – aumento 400X)..... 88

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	– Composição das formulações de nanocápsulas poliméricas contendo CUR e MTX.....	37
TABELA 2	– Tratamentos aplicados nas células – Concentrações dos fármacos puros, polímeros puros e formulações.....	45
TABELA 3	– Tratamentos aplicados nas células – Concentrações dos controles e formulações.....	47
TABELA 4	– Resultados obtidos por ANOVA para linearidade do método analítico para o MTX.....	51
TABELA 5	– Resultados obtidos por ANOVA para linearidade do método analítico para a CUR.....	51
TABELA 6	– Resultados obtidos para os ensaios de precisão na análise do MTX	53
TABELA 7	– Resultados obtidos para os ensaios de precisão na análise da CUR	54
TABELA 8	– Variações do método para avaliação da robustez para o MTX e para a CUR.....	55
TABELA 9	– Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AO/BE	corante alaranjado de acridina com brometo de etídio
ATP	adenosina trifosfato
B	coeficiente angular
CO ₂	dióxido de carbono
CUR	curcumina
CV%	coeficiente de variação percentual
DHFR	dihidrofolato redutase
DNA	ácido desoxirribonucleico
DP	desvio padrão
DPR	desvio padrão relativo
DSC	calorimetria exploratória diferencial
EPM	erro padrão da média
EROs	espécies reativas de oxigênio
FAE	fase aquosa externa
FO	fase orgânica
FTIR	infravermelho com transformada de Fourier
g	grama
gp-P	Glicoproteína P
h	hora
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
LD	limite de detecção
LQ	limite de quantificação
MDR	Resistência a múltiplas drogas
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MF	mistura física
mg	miligrama
MSC	critério de seleção do modelo
MTT	brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
MTX	metotrexato

mV	milivolt
n	número de repetições
NCUR-1	nanopartículas contendo 0,01 g de curcumina
NCUR-2	nanopartícula contendo 0,03 g de curcumina
NCM-0	nanopartícula sem fármaco
NMTX-1	nanopartícula contendo 0,001 g de metotrexato
NMTX-2	nanopartícula contendo 0,003 g de metotrexato
NCM-1	formulação contendo 0,03 g de curcumina e 0,001 g de metotrexato
NCM-2	formulação contendo 0,005 g de curcumina e 0,003 g de metotrexato
NF- κ B	fator de transcrição nuclear <i>κ</i> B
PBS	tampão fosfato salino
PCL	poli(ϵ -caprolactona)
PEG 6000	polietilenoglicol 6000
pH	potencial hidrogeniônico
PLA	poli(ácido láctico)
PLGA	poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
PZ	potencial zeta
r	coeficiente de correlação
RNA	ácido ribonucléico
SRB	sulforodamina básica
t	tempo
T_g	temperatura de transição vítrea
TGA	análise termogravimétrica
Tween [®] 80	polissorbato 80, monooleato de sorbitano etoxilado
UV	radiação ultravioleta
UV-Vis	espectrofotometria na região do ultravioleta-visível
Δm	evento térmico de perda de massa
μ M	micromolar
%	porcentagem
~	aproximado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	OBJETIVOS.....	21
2.1	OBJETIVO GERAL.....	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3	REVISÃO DA LITERATURA	22
3.1	CÂNCER DE PULMÃO	22
3.1.1	Liberação pulmonar.....	24
3.1.2	Resistência a múltiplas drogas (MDR)	24
3.2	NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE FÁRMACOS.....	25
3.3	ASPECTOS BIOFARMACÊUTICOS DA CURCUMINA.....	27
3.4	ASPECTOS BIOFARMACÊUTICOS DO METOTREXATO	30
3.5	SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA CONTENDO CURCUMINA E METOTREXATO.....	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	EQUIPAMENTOS.....	34
4.2	SUBSTÂNCIAS E REAGENTES.....	34
4.2.1	Fármacos	34
4.2.2	Produção das nanopartículas.....	35
4.2.3	Cultivo celular	35
4.2.4	Demais reagentes	35
4.3	DESENHO EXPERIMENTAL	36
4.4	OBTENÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO CURCUMINA E METOTREXATO	36
4.4.1	Mistura física	38
4.5	CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	38
4.5.1	Determinação do pH.....	38
4.5.2	Análises morfológicas e de superfície	38
4.5.2.1	Determinação do diâmetro médio e do potencial zeta.....	38
4.5.2.2	Microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão por efeito de campo (MEV-FEG)	39
4.5.2.3	Análise por difração de Raios-X (DRX)	39
4.5.3	Avaliação por espectroscopia no infravermelho	39
4.5.4	Análise térmica	40
4.6	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC.....	40

4.6.1	Equipamentos e Condições Cromatográficas.....	40
4.6.2	Preparo das Soluções Padrão.....	41
4.6.3	Desenvolvimento e Validação do Método para quantificação de CUR e MTX.....	41
4.7	ESTUDO DE ESTABILIDADE	43
4.8	ENSAIO BIOLÓGICO <i>IN VITRO</i> – CULTIVO CELULAR.....	43
4.8.1	Cultura das linhagens CALU-3 e 3T3	43
4.8.2	Estratégia experimental e tratamento das células	44
4.8.2.1	Determinação da citotoxicidade dos fármacos, polímeros e nanopartículas	45
4.8.2.1.1	Ensaio de redução de MTT	45
4.8.2.1.2	Ensaio de coloração de proteínas	46
4.8.2.2	Avaliação do padrão de morte por meio do emprego dos corantes fluorescentes alaranjado de acridina com brometo de etrídio (AO/BE).....	47
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	OBTENÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO CURCUMINA E METOTREXATO.....	49
5.2	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS NAS NANOCÁPSULAS.....	49
5.2.1	Linearidade.....	50
5.2.2	Especificidade	52
5.2.3	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação	53
5.2.4	Precisão	53
5.2.5	Exatidão	54
5.2.6	Robustez	54
5.3	CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS.....	55
5.4	ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA COM FONTE DE EMISSÃO POR EFEITO DE CAMPO (MEV-FEG).....	57
5.5	ANÁLISE POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX).....	60
5.6	ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO.....	62
5.7	ANÁLISE TÉRMICA	65
5.8	ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS.....	69
5.9	ENSAIOS BIOLÓGICOS- ESTUDO <i>IN VITRO</i>	73
5.9.1	Avaliação da viabilidade celular.....	73

5.9.1.1	Toxicidade dos polímeros na linhagem CALU-3.....	74
5.9.1.2	Toxicidade dos fármacos puros e formulações na linhagem CALU-3.....	76
5.9.1.3	Toxicidade das formulações na linhagem 3T3.....	84
5.9.2	Avaliação morfológica celular de CALU-3 por meio do emprego dos corantes alaranjado de acridina com brometo de etídio (AO/BE).....	88
6	CONCLUSÃO	90
	REFERÊNCIAS	91

1 INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão está entre as principais causas de morte consideradas evitáveis no mundo, pois em 90% dos casos diagnosticados, está associado ao tabagismo (BRASIL, 2012). Fatores como mudanças bruscas no estilo de vida, poluição ambiental e o hábito de fumar contribuem para um aumento de pacientes com doenças respiratórias, aumentando em até 10 vezes a chance de desenvolver câncer de pulmão, quando comparado a uma pessoa que não fuma (WAHEED; GUPTA; PATEL, 2015; BRASIL, 2012).

Contemplando uma alta malignidade associada à grande chance de desenvolver metástase, o câncer de pulmão é alvo de inúmeras pesquisas.

O prognóstico para os pacientes com esse tipo de câncer ainda é sombrio, pois na maioria dos casos a taxa de sobrevida é baixa pelo fato do câncer ser detectado tardiamente e em estágios avançados (SEGALLA et al., 2005).

O insucesso da quimioterapia no tratamento do câncer se dá principalmente pelo desenvolvimento de resistência aos agentes quimioterápicos utilizados, resultando em baixa resposta terapêutica por parte das células tumorais (HUBER; MARUIAMA; ALMEIDA, 2010).

Dentre os principais fatores envolvidos no fenômeno de resistência está o transporte de substâncias através da membrana plasmática por bombas de efluxo, como a glicoproteína P (gp P) expressa em células humanas, que ativamente transportam os agentes quimioterápicos (substratos da gp P) para o lado de fora da célula (HUBER; MARUIAMA; ALMEIDA, 2010). Pela grande importância clínica desse mecanismo de efluxo para o tratamento do câncer, vários compostos com propriedades inibidoras da gp P vêm sendo estudados (CHEARWAE et al., 2004).

Nesse sentido, a busca por fármacos efetivos capazes de modular a resistência aos agentes quimioterápicos utilizados na terapia contra o câncer tem se acentuado.

Curcumina (CUR) é um polifenol proveniente dos rizomas da planta *Curcuma longa* L. É amplamente utilizada na culinária como tempero e corante devido à sua forte coloração amarela (SANTIAGO et al., 2015). Diversas pesquisas evidenciam importantes efeitos biológicos da CUR, como propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, cicatrizante, digestiva e antitumoral (SANTIAGO et al., 2015, SHARMA; GESCHER; STEWARD, 2005). Em adição, a CUR é um inibidor

não competitivo da gp P bloqueando o processo de hidrólise do ATP dessa bomba, portanto tal substância apresenta grande possibilidade de ter ação positiva frente às células de câncer de pulmão (CHEARWAE et al., 2004, TENG et al., 2015).

Apesar dos interessantes efeitos biológicos da CUR, a molécula apresenta algumas desvantagens como baixa solubilidade aquosa, fotossensibilidade, limitada absorção, baixa biodisponibilidade, rápido metabolismo e rápida eliminação (KHALIL et al., 2013).

Metotrexato (MTX) é um agente citotóxico, classificado como antimetabólito que atua inibindo a ação da enzima dihidrofolato redutase. É indicado para o tratamento de câncer de pulmão e sua administração se dá por via oral e parenteral. A administração sistêmica pode causar considerável toxicidade e provocar importantes efeitos colaterais, como hepatotoxicidade, depressão da medula óssea, leucopenia entre outros (RUBINO, 2001; SARTORI, 2007; GENNARO, 2012).

Cabe ressaltar que o insucesso da quimioterapia com o MTX no tratamento do câncer resulta do desenvolvimento do fenômeno de resistência ao fármaco utilizado. Sabidamente, o MTX é um substrato da gp P, sofrendo a ação da bomba de efluxo (CHOI, 2005; ZHU et al., 2014).

O desenvolvimento de nanotransportadores é uma estratégia viável do ponto de vista tecnológico, pois possibilita a proteção do fármaco frente à degradação, melhora a solubilidade e biodisponibilidade, alcança tecidos e órgãos alvos e reduz possíveis efeitos secundários (DIAS, 2013).

Liberação de fármacos nos pulmões é considerado um modo não-invasivo de administração e apresenta inúmeras vantagens. Diferente da administração oral, a pulmonar confere ao fármaco um melhor efeito terapêutico pela diminuição a exposição sistêmica da droga. Os nanocarreadores podem aumentar a deposição do fármaco nos pulmões, reduzir toxicidade e controlar a liberação da droga no alvo (WAHEED; GUPTA; PATEL, 2015; CHASSOT et al., 2014).

Assim, considerando o MTX um substrato da gp P, os importantes efeitos colaterais ocasionados pela sua administração, sua reduzida solubilidade aquosa somados com a função inibitória da CUR sobre a gp P e as desvantagens associadas à molécula, o desenvolvimento de nanopartículas contendo essas duas substâncias pode ser uma alternativa viável no desenvolvimento farmacotécnico, visando resultados terapêuticos mais satisfatórios.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de

nanopartículas poliméricas contendo CUR e MTX para melhorar o potencial terapêutico desses fármacos, a caracterização e avaliação dos nanocarreadores em células de adenocarcinoma de pulmão (CALU-3).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter, caracterizar e avaliar *in vitro* o potencial antitumoral de nanopartículas poliméricas contendo CUR e MTX.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter nanopartículas poliméricas contendo CUR e MTX, a partir dos polímeros poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e polietilenoglicol 6000 (PEG 6000);
- Desenvolver e validar um método por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para a quantificação simultânea de CUR e MTX incorporados nas nanopartículas poliméricas;
- Caracterizar as nanopartículas poliméricas por meio de estudos morfológicos, espectroscópicos e térmicos;
- Determinar a estabilidade das formulações desenvolvidas;
- Investigar a citotoxicidade das nanopartículas poliméricas, com diferentes concentrações de CUR e MTX, sobre a viabilidade celular das linhagens CALU-3 e 3T3;
- Avaliar e estabelecer nanopartículas com concentrações adequadas de CUR e MTX que confirmam a atividade sinérgica sobre a linhagem CALU-3;
- Avaliar a morfologia das células CALU-3 por meio de fluorescência para evidenciar o padrão de morte celular após tratamento com as nanopartículas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CÂNCER DE PULMÃO

Células normais do corpo crescem, dividem-se em novas células e morrem de forma ordenada. O câncer é caracterizado por células que crescem fora de controle. O crescimento de células cancerígenas é diferente do crescimento celular normal, em vez de morrer, estas células continuam a crescer e formar novas células anormais. As células anormais também podem invadir outros tecidos, algo que as normais não podem fazer (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014).

As causas do câncer estão condicionadas a fatores internos e externos, sendo a hereditariedade com fatores geneticamente pré-determinados associada aos fatores internos. Os principais fatores externos, relacionados ao meio ambiente são o tabagismo, exposição excessiva ao sol, vírus e os alimentos. Todos esses fatores podem interagir e se somar para provocar alterações na estrutura genética das células, levando assim ao surgimento do câncer (MINISTÉRIO DA SAÚDE et al., 1996 citado por INCA).

Levando em conta essa informação, pode-se afirmar que as neoplasias são constituídas por uma massa de células anormais com grande crescimento, quando comparado com tecidos normais. Os tumores podem apresentar diferenciação celular ou serem indiferenciados, sendo esse último considerado portador de um grau de malignidade superior. Entre os tumores malignos, com crescimento rápido e alto poder de metástase está o câncer de pulmão (BRASIL, 2012; ZHOU et al., 2015).

O câncer de pulmão é o segundo tipo de câncer mais comum e uma das principais causas de morte considerada evitável em todo o mundo, pois em aproximadamente 90% dos casos diagnosticados está associado ao tabagismo (BRASIL, 2012). É a principal causa de morte relacionada a câncer em homens e mulheres nos Estados Unidos e em todo o mundo (ZHOU et al., 2015). No Brasil entre 2008 e 2012, de acordo com a distribuição proporcional do total de mortes por câncer, a mortalidade por câncer de pulmão para homens foi de 14,70% e para mulheres de 10,69% (BRASIL, 2014).

Mudanças rápidas no estilo de vida, poluição ambiental e hábito de fumar contribuem para o aumento de pacientes com doenças respiratórias, sendo o

tabagismo um fator que aumenta 10 vezes a chance de desenvolvimento de câncer de pulmão, risco que está relacionado à quantidade de cigarros consumida, duração do hábito e idade em que começou a fumar (WAHEED; GUPTA; PATEL, 2015; BRASIL, 2012).

A ação do tabagismo é tão maléfica, que, mesmo se todos os fumantes parassem com seu vício imediatamente, o número de casos de câncer de pulmão não diminuiria nos próximos 20 anos (INCA, 2002).

O pulmão é o único entre todos os órgãos a ter um grau elevado de exposição interna e externa, através da circulação pulmonar e por exposição ao fluxo de ar, respectivamente, e isto o torna vulnerável ao desenvolvimento de doenças. Pacientes portadores de câncer metastático possuem células cancerígenas circulando no sangue que são eliminadas a partir do tumor primário, dessa forma os pulmões são continuamente expostos a células neoplásicas. Devido aos mecanismos de defesa natural, os pulmões conseguem eliminar a maioria das células que são depositadas nos capilares pulmonares e no interstício. No entanto algumas células sobrevivem e se proliferam, tornando os pulmões um local comum de doença metastática (ANABOUSHI, 2006).

As primeiras alterações no DNA podem fazer com que ocorra um crescimento rápido de células nos pulmões. Essas células podem parecer anormais se vistas sob um microscópio, mas nesse momento ainda não formam uma massa ou tumor. Elas não podem ser vistas em um exame de raio X e não causam sintomas. Com o passar do tempo outras alterações genéticas podem acontecer fazendo com que as células cresçam para formar um tumor grande suficiente para ser visto em exames de imagem. Em alguns pontos, as células cancerígenas podem romper do tumor original e se espalhar (metástase) para outras partes do corpo. O câncer de pulmão é frequentemente uma doença com risco à vida, pois tende a metástase (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014).

Para fins terapêuticos e de prognóstico o câncer de pulmão é classificado em dois grupos: carcinoma de pequenas células e carcinomas de células não pequenas. O carcinoma de pequenas células representa aproximadamente 15% dos casos de câncer de pulmão e geralmente se apresenta com um tumor de localização central e é caracterizado por uma evolução clínica mais agressiva, já o carcinoma de células não pequenas representa um total de aproximadamente 85% e compreende o carcinoma epidermoide, adenocarcinoma, carcinoma de grandes células, carcinoma

adenocarcinoma e carcinoma indiferenciado (INCA, 2003; BRASIL, 2012).

A seleção do tratamento deverá ser adequada ao estadiamento clínico da doença, capacidade funcional, condições clínicas e preferência do doente (BRASIL, 2012), podendo ser realizado quimioterapias, radioterapias e cirurgias.

3.1.1 Liberação pulmonar

Pulmões fornecem uma grande área de superfície, uma alta vascularização e epitélio pulmonar fino, o que permite a distribuição rápida das moléculas do fármaco. Na administração sistêmica de fármacos antitumorais tem-se uma estreita faixa de segurança, pois uma quantidade limitada do fármaco chega ao local do tumor e uma grande quantidade da droga circulando nos demais tecidos, levando a uma toxicidade. Já na administração pulmonar, o fármaco tem um melhor efeito terapêutico por diminuir a exposição sistêmica da droga (WAHEED; GUPTA; PATEL, 2015).

Os pulmões possuem uma exposição relativamente baixa de atividade metabólica, portanto na inalação pulmonar o fármaco não está sujeito a um metabolismo de primeira passagem, o que ocorre na administração oral (WAHEED; GUPTA; PATEL, 2015).

Liberação de fármacos nos pulmões é considerado um modo não-invasivo de administração de ação local e sistêmica, o qual apresenta muitas vantagens. A administração pulmonar de nanocarreadores pode melhorar as vantagens oferecidas por essa via, uma vez que essas estruturas podem aumentar a deposição do fármaco nos pulmões, devido ao seu tamanho, além disso, possuem a possibilidade de reduzir a toxicidade e controlar a liberação da droga no alvo (CHASSOT et al., 2014).

Existem várias patologias nos pulmões que podem ser tratadas por terapia inalatória, como asma, enfisema pulmonar, doença obstrutiva crônica, fibrose cística, hipertensão pulmonar primária e câncer de pulmão (DIAS, 2013).

3.1.2 Resistência a múltiplas drogas

O insucesso da quimioterapia no tratamento do câncer resulta do desenvolvimento do fenômeno de resistência aos fármacos (MDR) utilizados por

parte das células tumorais e reduz a resposta ao tratamento em aproximadamente 90% dos casos de câncer metastático (HUBER; MARUIAMA; ALMEIDA, 2010).

Segundo Huber, Maruiama e Almeida (2010) são vários os fatores envolvidos no fenômeno da resistência, sendo que o principal está relacionado à presença de bombas de efluxo que transportam ativamente o agente quimioterápico para fora da célula. Essas proteínas pertencem à superfamília ABC (ATP-binding cassette). Nas células humanas o gene envolvido no fenômeno da resistência a múltiplas drogas é o gene *mdr1*. Como resultado tem-se a expressão de um tipo específico de glicoproteína, a glicoproteína P (gp P).

Existem substâncias que são consideradas substratos e inibidoras da gp P. Os substratos são aqueles compostos que a glicoproteína reconhece e transporta para fora da célula, não deixando com que esses compostos se acumulem intracelularmente. Essas substâncias não têm relação estrutural e farmacológica entre si (CHAN; LOWES; HIRST, 2004).

Os inibidores da gp P são substâncias que fazem sua inibição por meio competitivo (competem pelo sítio de ligação de fármacos) ou não competitivo (bloqueiam o processo de hidrólise do ATP) (MARCHETTI et al., 2007). A inibição faz com que aumente a acumulação intracelular dos compostos considerados substratos através da diminuição do transporte de efluxo (AZEREDO; UCHÔA, COSTA, 2009).

3.2 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE FÁRMACOS

Sistemas de liberação modificada de fármacos representam uma área promissora da ciência. Esses sistemas oferecem inúmeras vantagens em comparação às formas de dosagem convencionais, como uma melhor eficácia, redução de toxicidade e melhor adesão do paciente (RESTANI et al., 2010).

Na liberação de fármacos, o interesse pelas nanopartículas reside no fato de que podem ser injetados diretamente e ter acesso a tecidos além dos capilares sanguíneos (FLORENCE; ATTWOOD, 2011).

Em âmbito farmacêutico, a nanotecnologia é aplicada principalmente no desenvolvimento de sistemas lipídicos e poliméricos nanoestruturados para carrear e/ou vetorizar novos fármacos ou para melhorar aqueles já usados

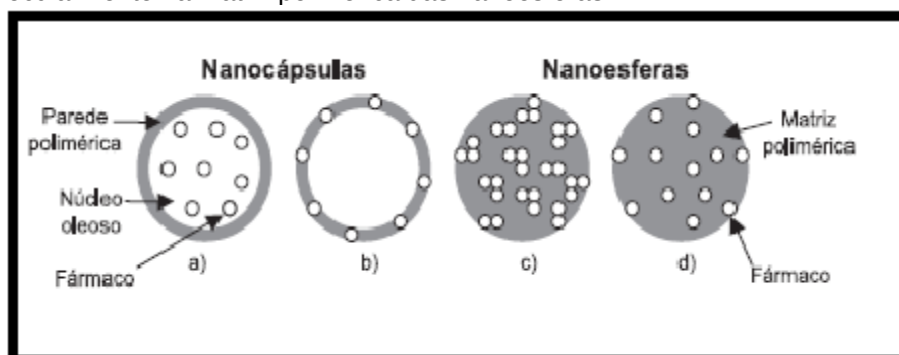
convencionalmente na medicina (MENDES, 2012).

Em todo o mundo através de inúmeras pesquisas é explorado o uso potencial de nanopartículas poliméricas como veículos para um grande número de fármacos. Devido a sua versatilidade e propriedades estão sendo cada vez mais utilizadas como sistemas de liberação. Em particular, o sistema é promissor nas áreas de terapia de câncer e de liberação controlada de vacinas (STORPIRTIS et al., 2009).

Nanopartículas poliméricas são partículas com tamanho inferior a $1\mu\text{m}$ preparadas a partir de polímeros de origem natural ou sintética, lipídios ou fosfolipídios e até mesmo metais. O termo nanopartículas é amplo e utilizado para distinguir as nanoesferas e nanocápsulas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural (JARDIM, 2013; STORPIRTIS et al., 2009).

As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido no núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica e as nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido, como mostra a Figura 1 (SCHAFFAZICK; GUTERRES, 2003).

FIGURA 1 - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas



Fonte: SCHAFFAZICK et al., 2003

Muitas técnicas são usadas para incorporar o fármaco ao material polimérico, como polimerização interfacial, nanoprecipitação, emulsão e evaporação do solvente, entre outras (STORPIRTIS et al., 2009).

Devido ao tamanho reduzido e a modificações na superfície, as nanopartículas têm sido utilizadas para evitar a eliminação das partículas e aumentar seu tempo de circulação, para o transporte através das barreiras físicas, ou para

prolongar o tempo de permanência no local de absorção e também podem ser produzidas para direcionar a sua ação às células tumorais na terapia contra o câncer (DIAS, 2013).

Na escolha do método e do polímero adequados é necessário levar em conta as características físico-químicas do fármaco ou da substância a encapsular. A composição do polímero, a natureza dos adjuvantes e o próprio fármaco têm uma forte influência na absorção, distribuição, metabolismo e eliminação das nanopartículas (REIS, 2007).

Polímeros são macromoléculas que apresentam na sua constituição subunidades (monômeros) unidos por polimerização. Dentre os polímeros mais utilizados para desenvolvimento de nanopartículas estão os sintéticos como a poli (ϵ -caprolactona) (PCL), poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), poli (cianoacrilato), e dentre os naturais os principais são a quitosana, albumina e a gelatina (MARCATO, 2009).

Nanopartículas de polímeros biodegradáveis, como a PCL, oferecem um aumento promissor do desempenho terapêutico de agentes antitumorais, aumentando sua biodisponibilidade (YALLAPU et al., 2010).

A adição do polímero polietilenoglicol (PEG) às nanopartículas poliméricas confere aos nanocarreadores capacidade furtiva (longa circulação) e favorece o acúmulo do fármaco na área do tumor. Essa capacidade é devido ao PEG promover a formação de uma camada hidrofílica superficial, favorecendo o tempo de circulação dos nanocarreadores e prevenindo o processo de reconhecimento molecular e captura pelas células do sistema fagocitário (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007).

No tratamento de tumores sólidos, uma vez acumuladas na área tumoral, as nanopartículas poliméricas biodegradáveis atuam como um depósito de substâncias, promovendo uma liberação contínua do agente quimioterápico (FENG; SONG; ZHAI, 2012).

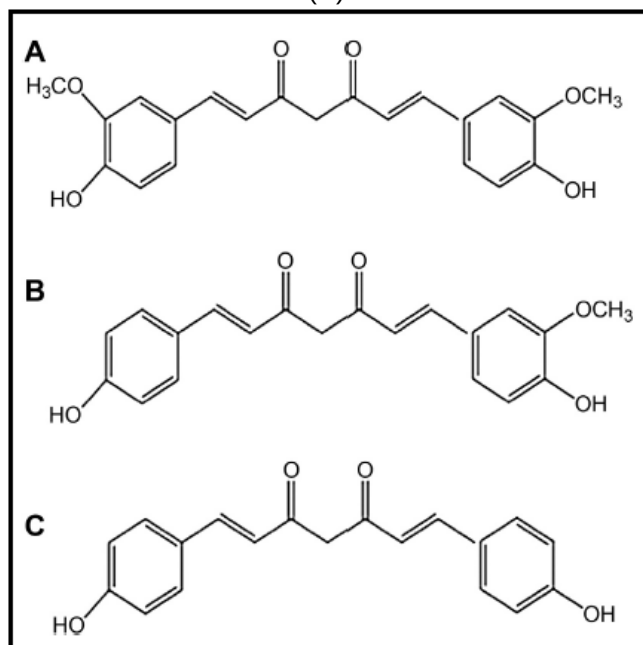
3.3 ASPECTOS BIOFARMACÊUTICOS DA CURCUMINA

Curcumina (CUR) é um composto antioxidante fenólico de cor amarela obtido através dos rizomas de *Curcuma longa* L. (NASCIMETO et al., 2012; NAKSURIYA, et al., 2014). Foi isolado no século 19 quando foi conhecida como o principal

componente desta planta. No Brasil, *Curcuma longa* L. é conhecida como açafrão da terra, e é muito utilizada na culinária como tempero e corante devido à sua forte coloração amarela, associada a efeitos terapêuticos e dietéticos. No entanto, o emprego desta planta como remédio caseiro, para uma variedade de doenças, surgiu há séculos, na medicina Indiana (RAMSEWAK; WITT; NAIR, 2000; ARAÚJO; LEON, 2001; JARDIM, 2013;).

O rizoma desidratado e moído de *Curcuma longa* L. gera um pó de coloração dourada denominada turmerico que possui em sua composição, como componentes majoritários, os curcuminoides, com destaque para curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina (Figura 2) que são compostos fenólicos, insolúveis em água e éter, solúveis em etanol, acetona, dimetilsulfóxido e em outros solventes orgânicos (JARDIM, 2013; SANTIAGO et al., 2015).

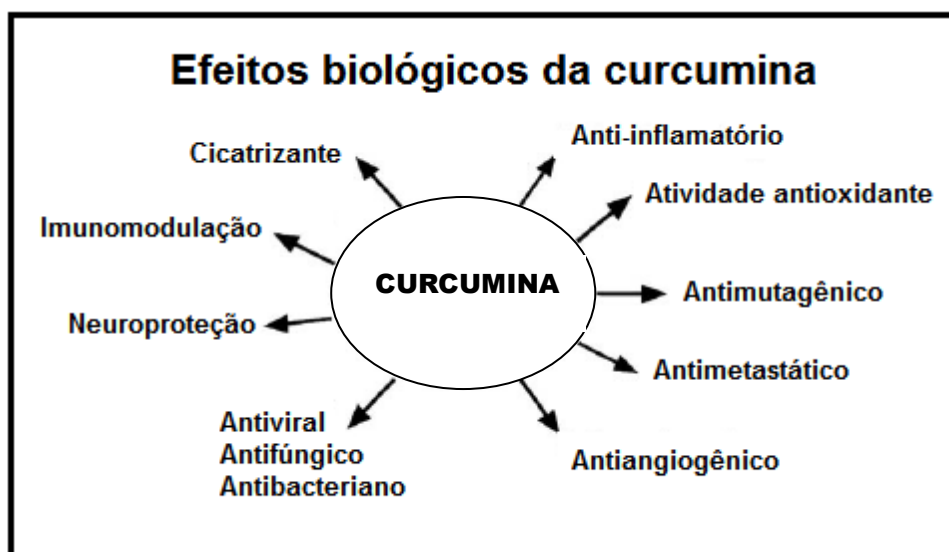
FIGURA 2: Estrutura química de curcuminoides extraídos de *Curcuma longa* L: Curcumina (A), Desmetoxicurcumina (B) e Bisdesmetoxicurcumina (C)



Fonte: NAKSURIYA, et al., 2014

Foi demonstrado que a CUR possui uma vasta gama de atividades farmacológicas incluindo ação anti-inflamatória, antitumoral, antioxidante, cicatrizante e antimicrobiano, como é demonstrado na Figura 3.

FIGURA 3 - Esquema ilustrativo das várias atividades biológicas da curcumina



Fonte: Adaptado de MAHESHWARI et al., 2005

Atualmente a CUR pode ser obtida comercialmente como uma mistura dos três componentes: curcumina (~77%), desmetoxicurcumina (~ 17%) e bisdesmetoxicurcumina (~3%) (SANTIAGO et al., 2015), sendo que em um estudo realizado por Sandur et al., informou que para a supressão do fator de necrose tumoral (TNF) induzida por ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) a CUR mostrou-se com uma maior atividade frente a desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina, sugerindo um papel crítico dos grupos metoxila nos anéis fenil e também comprovando que a CUR tem uma maior atividade cardioprotetora, neuroprotetora e anti-diabética quando comparada com os outros curcuminoides (SANDUR et al., 2007; NAKSURIYA, et al., 2014).

Em decorrência da CUR possuir uma grande capacidade para interagir com vários alvos moleculares, acaba afetando numerosas cascatas moleculares e bioquímicas, sendo alguns dos alvos: fatores de transcrição, receptores, citocinas, enzimas e fatores de crescimento. A ação antitumoral é devido à capacidade da CUR em afetar o ciclo celular da célula cancerígena, provocar apoptose, reduzir proliferação, invasão, angiogênese e metástase por meio da regulação negativa dos alvos envolvidos na sua via de sinalização (NASCIMENTO et al., 2012).

Estruturalmente a CUR exibe um tautomerismo ceto-enólico, com predominância da forma “ceto” em pH ácido e neutro, sendo que em pH 3-7 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).

Vários estudos evidenciam que os grupos fenóis e metoxila presentes na estrutura da CUR são os responsáveis pelas 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 (JARDIM, 2013). CUR tem sido associada com a regressão de lesões pré-malignas de vários órgãos demonstrando nenhuma toxicidade para órgãos saudáveis, mesmo quando ela é utilizada em doses de até 12 g ao dia (SANTIAGO et al., 2015).

A atividade antitumoral da CUR tem sido largamente investigada como um agente potencial para prevenção e tratamento de uma grande variedade de cânceres, como gastrointestinal, melanoma, genito-urinário, de mama, pulmão, hematológicas, cabeça e pescoço, neurológico e sarcoma (NAKSURIYA, et al., 2014).

As principais pesquisas sobre as atividades biológicas da CUR têm focado em conhecer sua atividade antioxidante e antitumoral. 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 está relacionada com a sua capacidade de induzir apoptose em células cancerígenas (JARDIM, 2013).

Um dos maiores problemas referentes à utilização clínica da CUR além de sua fotossensibilidade e baixa estabilidade, é devido à sua baixa biodisponibilidade decorrente de sua limitada solubilidade em água, e a presença de sítios lábeis ao metabolismo faz com que a mesma sofra metabolismo hepático de primeira passagem (CHEREDDY et al., 2013; SANTIAGO et al., 2015).

Para melhorar estas propriedades desfavoráveis da CUR, uma alternativa é o desenvolvimento de nanopartículas, as quais permitem uma maior penetração em membranas plasmáticas, diminuição da dose, redução de possível toxicidade, tornando-se excelente transportador de medicamento (JARDIM, 2013).

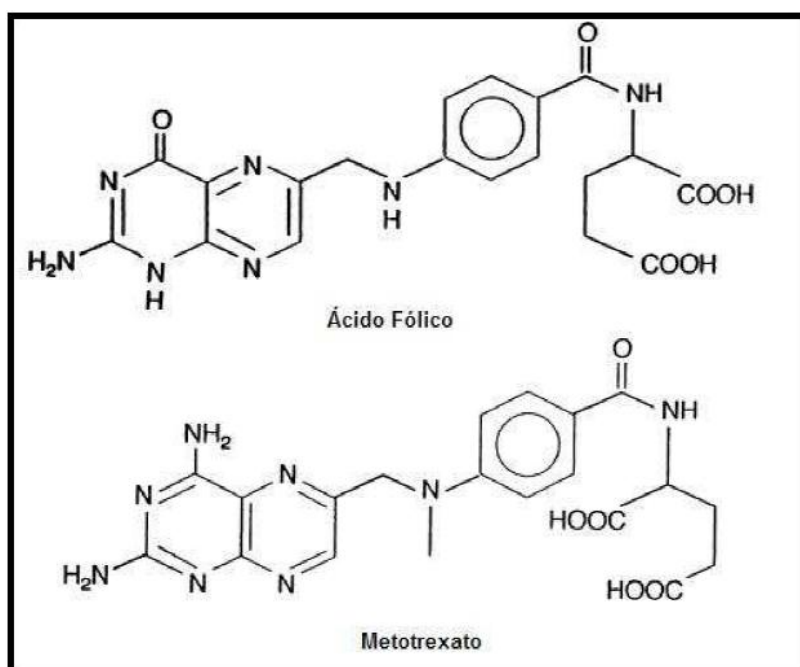
3.4 ASPECTOS BIOFARMACÊUTICOS DO METOTREXATO

Metotrexato (MTX) é um fármaco citotóxico, análogo do ácido fólico que atua inibindo a ação da enzima dihidrofolato redutase. Desde 1940 vem sendo usado no

tratamento de tumores sólidos, leucemias, agente imunossupressor em transplantes de órgãos e no tratamento de doenças autoimunes. Devido à falta de folatos na forma reduzida, as células malignas tornam-se carentes desses precursores necessários para a síntese de DNA e RNA e dessa forma, a proliferação e divisão celular das células malignas reduzem a condições terapêuticas (SARTORI, 2007).

A principal diferença estrutural do MTX em relação ao seu análogo, o ácido fólico, é a substituição de uma hidroxila por uma amina no C2 e uma metilação no N10 (Figura 4) (SARTORI, 2007).

FIGURA 4 - Estrutura química do ácido fólico e do metotrexato



Fonte: RUBINO, 2001

É caracterizado como um pó cristalino marrom-alaranjado, praticamente insolúvel em água, álcool, clorofórmio ou éter e solúvel em soluções alcalinas e com peso molecular de 454,4. Trata-se de um componente de combinação de primeira escolha para indução e manutenção do tratamento de leucemia linfocítica aguda, câncer cervical, câncer de pulmão entre outras doenças. Seus efeitos tóxicos consistem em extensões de seus efeitos antimetabólitos e algumas vezes ela ocorre em primeiro lugar e consiste em hipoplasia da medula óssea, com leucopenia, trombocitopenia e anemia (GENNARO, 2012).

Sua administração é realizada tanto por via oral como parenteral. No caso da administração oral, os esquemas posológicos mais utilizados são: dose única oral

semanal de 10-25 mg ou 2,5 mg de 12/12h três vezes por semana. Na administração parenteral 10-25 mg dose única semanal via endovenosa ou intramuscular. Baixas doses (25 mg/mL da superfície corporal) são prontamente absorvidas pelo trato gastrointestinal, enquanto altas doses não são completamente absorvidas por estas vias e, portanto, é administrado por infusão intravenosa. MTX é facilmente distribuído por todos os tecidos corporais e sua eliminação segue farmacocinética tri-fase, com um tempo de meia vida da fase de absorção entre os dez primeiros minutos, fase de distribuição de aproximadamente 2 h e fase de eliminação de aproximadamente 8 h (RUBINO, 2001).

Apesar de ser amplamente utilizado como agente quimioterápico, sua eficácia clínica é muitas vezes comprometida pela aquisição de resistência no câncer, devido ao efluxo celular da molécula. Neste sentido, a encapsulação de fármacos antitumorais em sistemas como nanopartículas poliméricas, que internaliza uma maior concentração de fármaco no interior da célula, pode superar as deficiências associadas com sistemas convencionais de liberação de fármacos (NOGUEIRA et al., 2013).

3.5 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA CONTENDO CURCUMINA E METOTREXATO

Yallapu et al., (2010) encapsularam CUR em PLGA para melhorar sua aplicabilidade na terapia do câncer. Puderam observar que o fármaco estava em um estado altamente disperso no polímero e mostrou-se com uma boa compatibilidade sólido-sólido. As nanopartículas exibiram um aumento de duas a seis vezes na absorção celular realizada em células cancerígenas ovarianas (A2780CP) e metastáticas de câncer de pulmão (MDA-MB-231), respectivamente, em comparação com a CUR livre.

Wang et al., em 2011 conjugaram O-carboximetilquitosano com MTX com objetivo de criar um novo sistema de liberação do fármaco. No estudo, os pesquisadores observaram que as nanopartículas apresentaram comportamento de liberação sustentada significativas em soluções tampão PBS (pH 4,0; 7,2 e 9,0), indicando que a formulação teve uma boa estabilidade *in vitro* e um potencial para ser utilizada como um novo sistema carreador de fármaco.

Shehzad et al. (2013), investigaram a eficácia da CUR em células HCT-15

provenientes de carcinoma colorretal humano. A CUR inibiu a proliferação celular e induziu a apoptose, bem como geração de ROS (espécies reativas de oxigênio) nesta linhagem celular. A análise por Western blot revelou que o tratamento de CUR ativou caspase-3 e reduziu a expressão de p53 e Prp4B de um modo dependente do tempo.

Em 2013 Wang et al., estudaram a liberação de CUR em nanopartículas lipídicas sólidas para o tratamento de câncer de pulmão. O estudo foi realizado *in vitro* e *in vivo*. A formulação aumentou a segmentação da CUR para o pulmão e para o tumor a qual aumentou a eficiência de inibição de proliferação celular da CUR e indução da apoptose.

Nogueira et al., em 2013 investigaram o efeito de um agente surfactante bioativo com propriedades pH-sensível sobre a atividade antitumoral e o comportamento intracelular de nanopartículas de quitosana carregadas com MTX. As nanopartículas foram preparadas utilizando um processo de complexação ionotrópico modificado, em que foi incluído o surfactante derivado a partir de Na, Nε-diocanoil lisina com um lítio inorgânico. Os pesquisadores puderam observar que o comportamento de nanopartículas pH-sensíveis permitiu liberação acelerada de MTX em meio ácido. Além disso, os resultados demonstraram claramente que nanopartículas com MTX eram mais ativas contra o tumor HeLa e contra a linhagem celular. As propriedades físico-químicas e sensíveis ao pH combinados das nanopartículas em geral, permitiu que o fármaco ficasse retido para induzir uma maior parada do ciclo celular e os efeitos apoptóticos.

Dey et. al., (2016) desenvolveram nanopartículas de ouro contendo CUR e MTX e avaliaram seu efeito citotóxico em células de glioma C6 e células de câncer de mama MCF-7. OS resultados mostraram-se satisfatório, pois em comparação com os fármacos puros observaram uma redução significativa da viabilidade de ambas as linhagens quando tratadas com as nanopartículas.

Dessa forma, considerando o pequeno número de artigos que tratam sobre sistema de liberação modificada contendo CUR e MTX juntos, associado principalmente, a possibilidade de melhorar a biodisponibilidade dos fármacos, surge a perspectiva de obter e avaliar um sistema polimérico com a associação destas duas substâncias antitumorais para tratamento de câncer de pulmão.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético com aquecimento (SOLAB, modelo SL-91, Piracicaba, Brasil);
- Balança analítica (CELTAC, modelo FA2104N, São Paulo, Brasil);
- Balança termogravimétrica (SHIMADZU, modelo TGA-50, Quioto, Japão);
- Bomba de vácuo (FISATOM, modelo 830, São Paulo, Brasil);
- Destilador de água (FANEM LTDA, modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil);
- Difratorômetro de raios X (RIGAKU, modelo Ultima IV, Quioto, Japão);
- Espectrômetro infravermelho com transformada de Fourier (SHIMADZU, modelo IR Prestige-21, Quioto, Japão);
- Espectrômetro de auto-correlação a laser (MALVERN INSTRUMENTS, modelo ZetasizerNanoseries ZS90, Malvern, Reino Unido);
- Evaporador rotativo (FISATOM, modelo 801, São Paulo, Brasil);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (MERCK-HITACHI, modelo Lachrom D-7000, Tóquio, Japão);
- Metalizador (SHIMADZU, modelo IC-50 IonCoater, Quioto, Japão);
- Microscópio eletrônico de varredura (SHIMADZU, modelo SSX-550, Quioto, Japão);
- Seringa de 100 µL (HAMILTON, modelo Microliter710, Reno, Estados Unidos);
- Sistema de ultrapurificação de água (Milli-Q®, MILLIPORE, Bedford, Estados Unidos);
- Sistema de calorimetria exploratória diferencial (STA 6000 Perkin Elmer, Waltham, MA, Estados Unidos);
- Potenciômetro digital de bancada (HANNA INSTRUMENTS, modelo HI 221, São Paulo, Brasil).

4.2 SUBSTÂNCIAS E REAGENTES

4.2.1 Fármacos

- Curcumina – Sigma Aldrich, St. Louis - USA
- Metotrexato – Fagron, Fermion – Finlândia

4.2.2 Produção das Nanopartículas

- Poli(ϵ -caprolactona) (PCL, $\overline{Mw}$ 10.000-14000 g.mol⁻¹, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, Estados Unidos);
- Polietilenoglicol 6000 (PEG, $\overline{Mw}$ 5.400-6.600 g.mol⁻¹, CROMATO PRODUTOS QUÍMICOS, Diadema, Brasil);
- Monooleato de sorbitano – Span 80[®] (OXITENO, Mauá, São Paulo);
- Polissorbato 80 – Tween 80[®] (DELAWARE, Porto Alegre, Brasil);
- Triglicerídeos de cadeia média – Triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico (FOCUS QUÍMICA, São Paulo, Brasil);
- Acetona P.A (VETEC QUÍMICA FINA, Rio de Janeiro, Brasil);
- Água ultrapura – Sistema Milli-Q[®] (MILLIPORE, Bedford, Estados Unidos).

4.2.3 Cultivo celular

- Meio RPMI1640 (Vitrocel);
- Soro fetal bovino (Vitrocel);
- L-glutamina (Biotec);
- Piruvato sódico (Sigma-Aldrich);
- Penicilina (Vitrocel);
- Estreptomicina (Vitrocel);
- Bicarbonato sódico (Biotec);
- Azul de tetrazólio MTT (Sigma-Aldrich);
- Sulfarodamina-B (Sigma Aldrich).

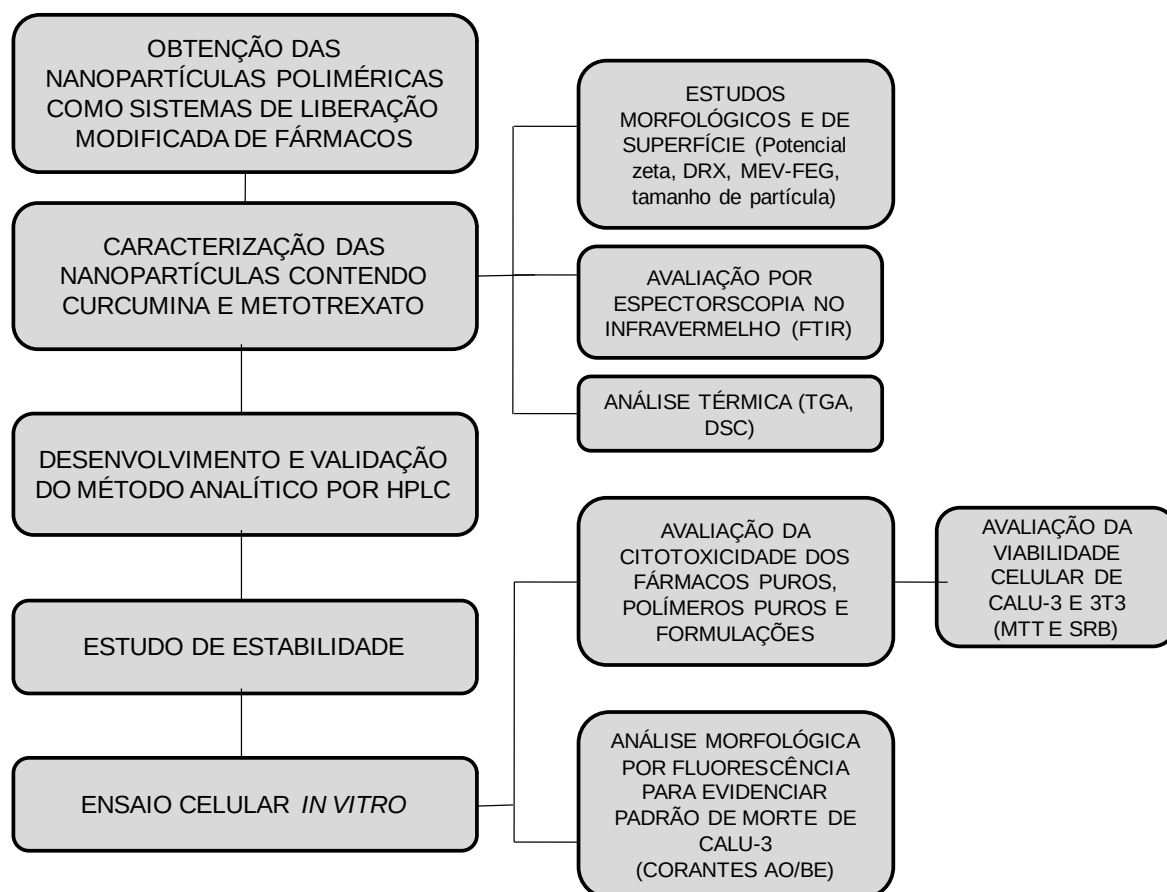
4.2.4 Demais reagentes

- Brometo de potássio grau espectroscópico (KBr) (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, Estados Unidos);
- Metanol grau HPLC (EMD CHEMICALS INC., Darmstadt, Alemanha);

4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

As etapas da pesquisa estão descritas no fluxograma da Figura 5.

FIGURA 5 – Fluxograma das etapas da pesquisa

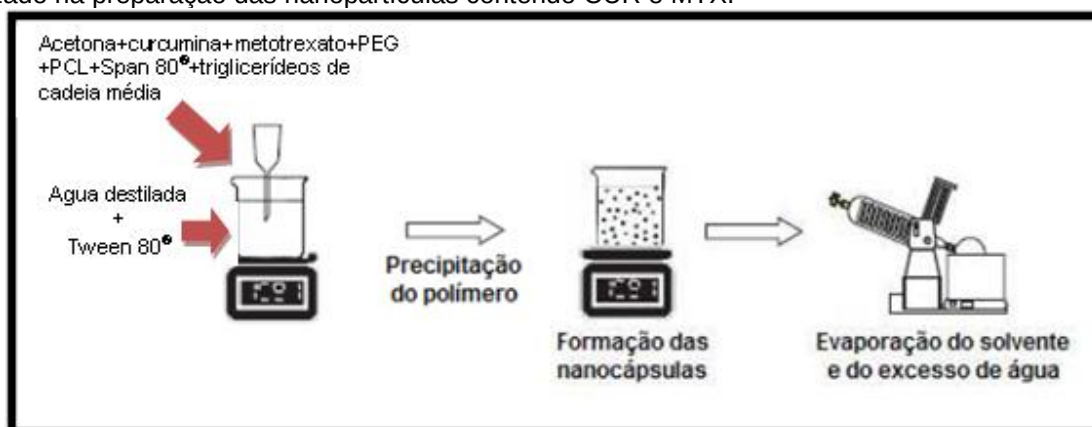


4.4 OBTENÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO CURCUMINA E METOTREXATO

Suspensões de nanopartículas obtidas a partir dos polímeros PEG e PCL contendo CUR e MTX foram preparadas pelo procedimento de deposição interfacial do polímero pré-formado (Figura 6) descrito inicialmente por Fessi et al (1988). Resumidamente, a PCL (0,08 g) e o PEG 6000 (0,02 g) foram dissolvidas em 27 mL de acetona em presença de Span 80[®] (0,077 g), CUR (0,005, 0,01 ou 0,03 g), metotrexato (0,001 ou 0,003 g) e triglicerídeos de cadeia média (0,3 g). Após 10 minutos de agitação magnética moderada a 40°C, a fase orgânica foi adicionada na fase aquosa contendo 0,077 g de Tween 80[®] e 53 mL de água destilada, por meio de

gotejamento e sob agitação magnética vigorosa à temperatura de 40°C. A agitação magnética foi mantida por 10 minutos após o término do gotejamento e o solvente orgânico foi então eliminado por rota-evaporação para atingir um volume final de 10 mL. Para fins comparativos, foi preparada uma suspensão de nanopartículas sem a adição dos fármacos (NCM-0), como controle negativo. Todas as formulações foram preparadas em triplicata e protegidas da luz.

FIGURA 6 - Ilustração esquemática do método de deposição interfacial do polímero pré- formado utilizado na preparação das nanopartículas contendo CUR e MTX.



Fonte: Adaptado de SCHAFFAZICK et al., 2003

A composição das formulações de nanopartículas está descrita na Tabela 1.

TABELA 1 – Composição das formulações de nanopartículas contendo CUR e MTX

Formulação	FASE ORGÂNICA						FASE AQUOSA		
	CUR (g)	MTX (g)	PEG (g)	PCL (g)	Span 80® (g)	TCM* (g)	Acetona (mL)	Tween 80® (g)	Água Destilada (mL)
NCM-0	---	---	0,02	0,08	0,077	0,300	27	0,077	53
NCUR-1	0,01	---	0,02	0,08	0,077	0,300	27	0,077	53
NCUR-2	0,03	---	0,02	0,08	0,077	0,300	27	0,077	53
NMTX-1	---	0,001	0,02	0,08	0,077	0,300	27	0,077	53
NMTX-2	---	0,003	0,02	0,08	0,077	0,300	27	0,077	53
NCM-1	0,03	0,001	0,02	0,08	0,077	0,300	27	0,077	53
NCM-2	0,005	0,003	0,02	0,08	0,077	0,300	27	0,077	53

*TCM – Triglicerídeos de cadeia média

Fonte: O autor

As cocentrações de MTX foram determinadas de acordo com as doses

posológicas de utilização desse fármaco, sendo de até 2,5 mg de 12/12 horas três vezes por semana (RUBINO, 2001) e a CUR a partir de concentrações relatadas na literatura (SILVA; FIDELES; FOOK, 2015; NASCIMENTO, 2011, WANG, 2013).

As formulações foram denominadas seguindo uma ordem numérica de preparação. Formulação NCM-0 refere-se à formulação sem fármaco, NCUR-1 à formulação com 1 mg/mL de CUR, NCUR-2 à formulação com 3 mg/mL de CUR, NMTX-1 à formulação com 0,1 mg/mL de MTX, NMTX-2 à formulação com 0,3 mg/mL, NCM-1 à formulação com 3 mg/mL de CUR e 0,1 mg/mL de MTX e formulação NCM-2 com 0,5 mg/mL de CUR e 0,3 mg/mL de MTX.

4.4.1 Mistura física

Misturas físicas entre os polímeros utilizados (PCL de PEG 6000) e os fármacos (CUR e MTX) foram preparadas para a caracterização comparativa entre as nanossuspensões. Foram elaboradas misturas físicas na proporção, em massa de 1:1:1 (CUR:PCL:PEG), 1:1:1 (MTX:PCL:PEG) e 1:1:1:1 (CUR: MTX:PEG:PCL).

4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

4.5.1 Determinação do pH

A determinação do pH das suspensões de nanopartículas foi realizada em potenciômetro digital previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0, diretamente nas suspensões coloidais, após a preparação. Os resultados representaram a média de três amostras diferentes.

4.5.2 Análises morfológicas e de superfície

4.5.2.1 Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão e do potencial zeta

O tamanho médio de partícula e o índice de polidispersão (distribuição de tamanho) foram medidos ($n=3$) por espectroscopia de correlação de fótons após a diluição de uma alíquota de suspensão de nanopartículas em água purificada (1:500)

(Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, Reino Unido). A análise de potencial zeta ($n=3$) foi feita no mesmo equipamento após a diluição da amostra em uma solução de NaCl a 10 mmol/L (1:500).

4.5.2.2 Microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão por efeito de campo (MEV-FEG)

A caracterização morfológica das nanossuspensões contendo CUR e MTX foi realizada usando microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão por efeito de campo, com aumento de 20 a 200 kx (MEV-FEG-TESCAN, modelo MIRA 3, Brno, República Checa). As amostras foram depositadas sobre o *stub* polido, deixadas a temperatura ambiente para secagem e posteriormente recobertas com ouro usando o equipamento de recobrimento (QUORUM Technologies Ltda, modelo SC7620, East Sussex, BN8 6BN, Reino Unido), durante 1 minuto e 10mA.

4.5.2.3 Análise por difração de raios X (DRX)

As nanopartículas poliméricas contendo CUR e MTX, os polímeros puros, os fármacos puros e as misturas físicas foram examinadas em difratômetro de raio-X XRD-6000 (Shimadzu), scan de $2^\circ \cdot \text{min}^{-1}$ e 2θ de 5° a 80° , radiação $K\alpha$ de cobre ($\lambda=1.5418\text{\AA}$), corrente de 40 mA e voltagem 40 kV, para a observação de possíveis picos indicativos de cristalinidade. As nanossuspensões foram gotejadas em lamínulas e secas para posterior análise por DRX.

4.5.3 Avaliação por espectroscopia no infravermelho (FTIR)

As nanopartículas poliméricas contendo CUR e MTX, foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho, em pastilha com KBr, empregando 4 mg de cada amostra e 196 mg de KBr grau espectroscópico (2% m/m), no equipamento IR Prestige-21 (Shimadzu), 32 scans. min^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} . Os espectros obtidos por infravermelho com transformada de Fourier das amostras preparadas foram avaliados frente aos espectros dos fármacos puros, dos polímeros de partida e das respectivas misturas físicas. As nanossupensões foram gotejadas sobre a pastilha de KBr para a análise.

4.5.4 Análise térmica

A estabilidade térmica das amostras foi estudada por meio das curvas de TGA, que foram obtidas na faixa de temperatura entre 20°C e 600°C. Para isso, foi empregada uma termobalança modelo STA 6000 (Perkin Elmer, Waltham, MA, Estados Unidos), sob razão dinâmica de nitrogênio (50 mL.min⁻¹), empregando uma razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹, em microcadinho cilíndrico de alumina contendo aproximadamente $5 \pm 0,1$ mg da amostra. O equipamento foi previamente aferido com sulfato de cobre penta-hidratado.

As curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram realizadas para a CUR e MTX, para os polímeros de partida, para as misturas físicas e para as nanopartículas poliméricas preparadas, após liofilização, na faixa de temperatura entre 20 °C e 600°C. Foi utilizada uma célula calorimétrica (STA 6000, Perkin Elemer), em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL.min⁻¹), razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹, sendo que a amostra (5 mg) foi acondicionada em cadinho de alumina. O equipamento foi previamente calibrado com índio (m.p. = 429,6 K; $\Delta H_{fusão} = 28,54$ J.g⁻¹) e zinco (m.p. = 692,6 K).

As amostras foram previamente liofilizadas com 10% de lactose para obtenção de um pó e posterior análise.

4.6 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC

4.6.1 Equipamentos e Condições Cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo MERCK-HITACHI (Lachrom D-7000; Tóquio, Japão), equipado com detector UV L-7400, bomba L-7100, desgaseificador e injetor manual Rheodyne (volume de injeção de 20 µL), software Chromquest. As amostras foram injetadas com auxílio de seringa de 100 µL (Microliter 710, HAMILTON, Bonaduz, Suíça).

Foi utilizada uma coluna de fase reversa C18 GL Sciences Inertsil® ODS3 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm, Tóquio, Japão), acoplada a pré-coluna GL Sciences Inertsil® ODS3 (10 mm x 4 mm, 5 µm, Tóquio, Japão).

O comprimento de onda utilizado para otimizar o método foi escolhido após

varredura em espectrofotômetro de UV-Vis entre 190 a 400 nm, sendo observado que a melhor absorção para ambos os fármacos, simultaneamente, ocorreu no comprimento de onda de 261 nm.

As análises foram realizadas em gradiente de concentração utilizando como fase móvel metanol:água acidificados com 0,5% de ácido acético (44:56/90:10), com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ e tempo de corrida de 12 minutos.

4.6.2 Preparo das Soluções Padrão

A solução padrão estoque de CUR foi preparada em metanol, 500,0 µg.mL⁻¹. Diluições usando metanol:água (50:50 v/v) ambos acidificados com 0,5% de ácido acético foram realizadas com objetivo de obter soluções com concentração entre 10 a 90 µg.mL⁻¹, onde a concentração de 30 µg.mL⁻¹ (ponto médio da curva) foi definida como 100%. A solução padrão estoque de MTX foi preparada em metanol acidificado com 2% de ácido fórmico, para melhor solubilização do fármaco, 500,0 µg.mL⁻¹. Diluições usando metanol:água (50:50 v/v) ambos acidificados com 0,5% de ácido acético foram realizadas com objetivo de obter soluções com concentração entre 10 a 70 µg.mL⁻¹, onde a concentração de 40 µg.mL⁻¹ (ponto médio da curva) foi definida como 100%. Antes de serem injetadas no cromatógrafo, as soluções foram filtradas em filtro de politetrafluoretileno (PTFE, Cromafil® Xtra, 0,45 µm x 22 mm, Macherey-Nagel GNBH & Co. KG, Düren, Alemanha).

4.6.3 Desenvolvimento e Validação do Método para Quantificação de CUR e MTX

Para avaliar a melhor condição para a corrida cromatográfica, foi realizado um experimento em gradiente exploratório, variando a concentração de metanol de 5 a 100% em 60 minutos. Após isso, as condições cromatográficas foram otimizadas para se obter melhor resolução dos picos para CUR e MTX.

A validação do método analítico por HPLC foi realizada segundo os critérios propostos pelo *International Conference on Harmonisation* (ICH, 2005) e pela Resolução 899 de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003). Foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão, exatidão e robustez.

Para o estudo da linearidade, foram elaboradas três curvas analíticas, com

cinco níveis de concentração para a CUR (10, 20, 30, 60, 90 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e para o MTX (10, 20, 40, 60 e 70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). A equação de reta e o coeficiente de correlação (r) foram determinados. Os limites de detecção e de quantificação foram calculados, por meio da relação entre o desvio padrão da curva analítica e a sua inclinação, usando os fatores multiplicadores sugeridos pela norma ICH (1996), conforme demonstrado nas Equações 2 e 3.

$$LD = \frac{3,3 \times DP}{B} \quad (\text{Equação 2})$$

$$LQ = \frac{10 \times DP}{B} \quad (\text{Equação 3})$$

Sendo, LD, o limite de detecção; LQ, o limite de quantificação; DP, o desvio padrão da curva analítica; e B, o coeficiente angular.

Para avaliar a repetibilidade, três concentrações diferentes para a CUR (15, 45 e 70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e para o MTX (15, 45 e 65 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram analisadas em triplicata, totalizando nove determinações para cada fármaco, sendo o resultado expresso em termos de desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação percentual (CV%) intra-dia.

A precisão intermediária foi avaliada por meio da comparação entre as determinações de uma mesma concentração para a CUR (30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e para o MTX (40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), em triplicata, mas realizadas em três dias consecutivos, calculando-se posteriormente o DPR ou CV% inter-dia.

A exatidão foi determinada por meio do método de recuperação. Para isso, foi adicionada uma quantidade conhecida dos fármacos (3mg) à solução-mãe (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Alíquota de 120 μL da solução-mãe (500,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ou 800,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de ambos os fármacos foi diluída para 1,5 mL e resultando nas concentrações 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. As soluções foram elaboradas em triplicata e os resultados foram expressos como porcentagem de recuperação.

Para a avaliação da robustez, as concentrações de 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de CUR e 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de MTX foram submetidas a diferentes condições de fluxo da fase móvel e concentração da fase móvel e avaliadas em triplicata. O fluxo foi modificado de

1,000 mL.min⁻¹ para 0,995 mL.min⁻¹ e para 1,005 mL.min⁻¹. A concentração da fase móvel metanol:água foi modificada de 44:56/90:10 (v/v) para 43:57/89:11 (v/v) e 45:55/91:09 (v/v).

Análise de variância (ANOVA) com pós teste de Tukey foi realizado para avaliar se as variações alteram o resultado das análises cromatográficas. Os resultados de cada parâmetro foram analisados por meio do DPR e comparados com os valores obtidos para a condição padrão.

4.7 ESTUDO DE ESTABILIDADE

As suspensões de nanopartículas foram armazenadas em temperatura ambiente e protegidas da luz em frascos de vidro âmbar. As formulações foram monitoradas durante 2 meses de armazenamento e avaliou-se os valores de pH, tamanho médio de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta.

4.8 ENSAIO BIOLÓGICO *IN VITRO* - CULTIVO CELULAR

4.8.1 Cultura das linhagens CALU-3 e 3T3

As células CALU-3 foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e foram gentilmente cedidas pela Prof^a Dr^a Katia Sabrina Paludo (UEPG). As células 3T3 número CRL-1658 foram adquiridas da ATCC (*American Type Culture Collection*) e foram gentilmente cedidas pelas Prof^a Dr^a Patrícia Mathias Döll Boscardin (UEPG).

A linhagem celular CALU-3, são células de adenocarcinoma pulmonar humano, derivada de um sítio metastático, que se caracterizam como células epiteliais e se desenvolvem de forma aderida. As células 3T3 são consideradas uma linhagem de fibroblastos padrão, com características de célula normal, ou seja, não tumoral, que originalmente foram obtidas de tecido de embrião de rato albino suíço (ATCC, 2015).

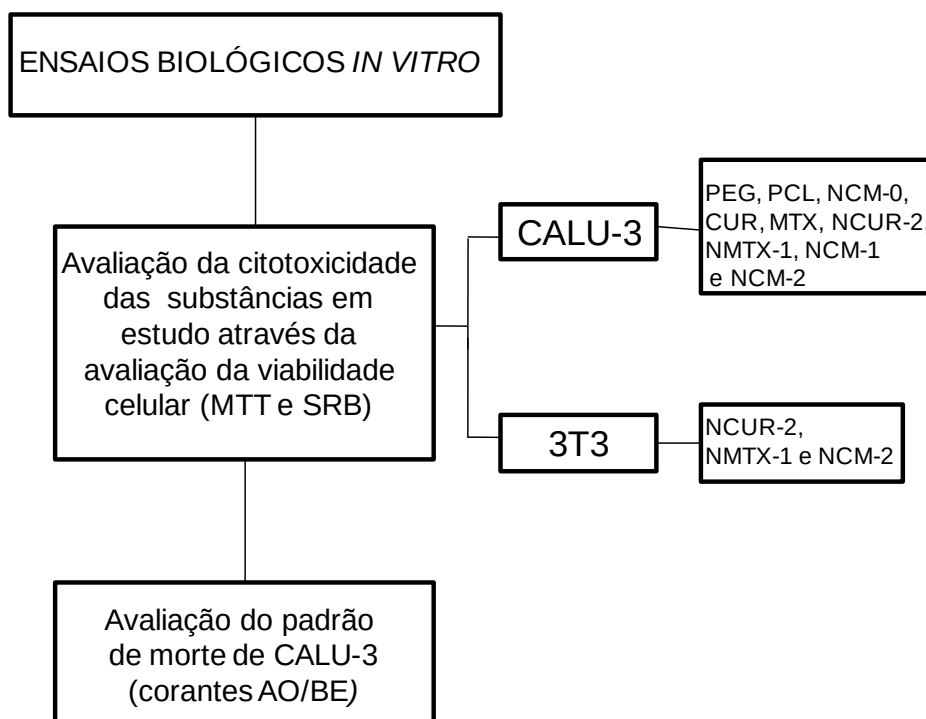
Ambas as células foram cultivadas em meio RPMI 1640 pH 7,4, contendo soro fetal bovino (SFB) a 10%, suplementado com 24 mmol.L⁻¹ de bicarbonato de sódio, 2 mM de L-glutamina, 1mM de piruvato sódico e com 10.000 U de penicilina e 10 mg de estreptomicina por litro. As culturas foram mantidas em estufa umidificada

a 37°C com atmosfera de CO₂ a 5%.

4.8.2 Estratégia experimental e tratamento das células

A Figura 7 apresenta um fluxograma com as etapas dos ensaios biológicos *in vitro* realizadas com as células CALU-3 e 3T3.

FIGURA 7 – Fluxograma das etapas dos ensaios biológicos *in vitro* realizadas com as células CALU-3 e 3T3



Para avaliar o efeito das amostras em estudo, as células CALU-3 ($1,5 \times 10^4$ células/poço) e as células 3T3 (8×10^3 células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h com meio completo para reestabelecimento das condições adequadas como, por exemplo, a completa adesão celular. Para a avaliação da citotoxicidade, as linhagens CALU-3 e 3T3 foram incubadas por um período de 72 horas com os tratamentos descritos na Tabela 2.

TABELA 2 – Tratamentos aplicados nas células – Concentrações dos fármacos puros, polímeros puros e formulações

Tratamento		Concentração (µM)				
CUR pura		2,50	5,00	25,00	50,00	100,00
MTX puro		0,25	0,50	1,00	2,00	4,00
PCL		0,52	2,60	5,19	10,39	20,78
PEG		0,30	1,51	3,03	6,06	12,12
NCM-0	{ PCL	0,52	2,60	5,19	10,39	20,78
	{ PEG	0,30	1,51	3,03	6,06	12,12
NCUR-2		2,50	5,00	25,00	50,00	100,00
NMTX-1		0,25	0,50	1,00	2,00	4,00
NCM-1	{ MTX	0,25	0,50	1,00	2,00	4,00
	{ CUR	9,25	18,50	37,00	74,00	148,00
NCM-2	{ MTX	0,25	0,50	1,00	2,00	4,00
	{ CUR	0,50	1,00	2,00	4,10	8,20

Fonte: O autor

As concentrações testadas foram obtidas após uma série de diluições em meio RPMI das formulações iniciais.

4.8.2.1 Determinação da citotoxicidade dos fármacos puros, polímeros puros e nanopartículas

A determinação da citotoxicidade foi realizada avaliando-se a viabilidade celular por meio de duas metodologias descritas abaixo:

4.8.2.1.1 Ensaio de redução de MTT

As células nas condições de cultivo descritas acima foram tratadas com os fármacos puros (CUR e MTX) e nas nanopartículas nas concentrações descritas na Tabela 2 pelo período de 72 horas sendo o metabolismo celular avaliado pela redução do reagente MTT 3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo (MOSMANN et al., 1983). Resumidamente, após o período de tratamento, o meio de cultivo foi retirado e desprezado, 200µL de uma solução de azul de tetrazólio (MTT)

a 0,5 mg/mL foi adicionada nos poços que continham as células, seguindo a metodologia descrita por Mosmann (1983). Em seguida, as culturas foram incubadas a 37°C durante 2 horas, ao abrigo da luz, até a observação da presença dos cristais de formazan. Após este período foi retirado o sobrenadante (solução de MTT) e na sequência os cristais formados foram solubilizados em 200 µL de dimetilssulfóxido (DMSO). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 550 nm, em leitora de placas (Biotek, µQuant). Para o cálculo da viabilidade celular (%) utilizou-se a equação abaixo.

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{\text{Absorbância média das amostras} \times 100}{\text{Absorbância média do controle}}$$

4.8.2.1.2 Ensaio de coloração de proteínas

As células nas condições de cultivo descritas acima foram tratadas com os fármacos puros (CUR e MTX) e nas nanopartículas nas concentrações descritas na Tabela 2 pelo período de 72 horas sendo a viabilidade celular determinada pelo ensaio colorimétrico empregando-se a sulforodamina B (SRB) (PAPAZISIS et al., 1997). Decorrido a incubação de tratamento, o sobrenadante foi desprezado e as células foram lavadas com 200 µL de tampão de fosfato de sódio (PBS) pH 7,4. Em seguida, foram adicionado 200 µL de ácido tricloroacético 10% gelado e as placas foram colocadas na geladeira por 30 minutos, para fixação das células. Após, as células foram lavadas três vezes com 200 µL de água destilada e colocadas para secar por 24 horas em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, foi adicionado 200 µL de uma solução de SRB 0,2% e aguardado 30 minutos.

Na sequência, as placas foram lavadas (5x) com 200 µL de ácido acético 1% e foram colocadas para secar por 30 minutos. Após este período foi adicionado 150 µL de TrisBase 10/mM (preparado em água) e a leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 432 nm, em leitora de placas (Biotek, µQuant). Para o cálculo da viabilidade celular (%) utilizou-se a equação abaixo.

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{\text{Absorbância média das amostras} \times 100}{\text{Absorbância média do controle}}$$

4.8.2.2 Avaliação do padrão de morte por meio do emprego dos corantes fluorescentes alaranjado de acridina com brometo de etídio (AO/BE)

Em placas de 24 poços foram semeadas as células CALU-3 sobre lamínulas na concentração de 1×10^5 células/poço em meio de cultura RPMI 1640. Após 24 horas de adesão celular, todo o meio foi retirado e os tratamentos em um volume de 500 μ L foram adicionados.

As concentrações dos controles e formulações estão descritas na Tabela 3.

TABELA 3 – Tratamentos aplicados nas células – Concentrações dos controles e formulações

Tratamento	Concentração (μ M)
Meio	---
NCM-0 { PCL	20,78
PEG	12,12
NCUR-2	25,00
NMTX-1	4,00
NCM-2 { MTX	4,00
CUR	8,20
NCM-3 { MTX	8,00
CUR	16,40

Fonte: O autor

As células foram então incubadas por 24 horas a 37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Após este período de tratamento, os poços foram lavados com 200 μ L de tampão de fosfato de sódio pH 7,4 e em seguida foram adicionados 10 μ L da mistura de corantes alaranjado de acridina (AO) com brometo de etídio (BE) (200 μ g de cada corante/mL) sobre as lamínulas e estas colocadas invertidas sobre lâminas.

A coloração foi visualizada em microscópio óptico de fluorescência Olympus BX41 (filtro com excitação de 480/30 nm e emissão 535/40 nm) e os campos foram registrados com câmera fotográfica Olympus DP71 acoplada.

Os critérios utilizados para a classificação das células submetidas à coloração AO/BE, segundo Ribble e colaboradores (2005), foram: a) Células viáveis: núcleos normais e coloração verde; b) Células apoptóticas em fase inicial (membranas

intactas): núcleo verde e brilhante, porém sem uniformidade com condensação ou fragmentação da cromatina; c) Células apoptóticas em fase tardia (perda da integridade da membrana): com condensação de cromatina e áreas alaranjadas no núcleo; d) Células necróticas: núcleo laranja uniforme com perda da integridade de membrana.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Software estatístico GraphPadPrism versão 5.03 (San Diego, CA, EUA). Neste trabalho foi empregado análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida teste POST-HOC de Tukey. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) ou média $\pm$ desvio padrão (DP). Valores de p menores do que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO CURCUMINA E METOTREXATO

Por meio de análise macroscópica, as nanossuspensões apresentaram-se com aspecto de líquido leitoso, opalescente com reflexo azulado para as formulações que continham os polímeros e o MTX. Já as formulações com CUR, devido à sua forte coloração amarela (SANTIAGO, et al., 2015), apresentaram um aspecto amarelo intenso, conforme mostra a Figura 8.

FIGURA 8 – Formulação com forte coloração amarela pela presença de CUR



5.2 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS NAS NANOCÁPSULAS

Desenvolver um método analítico requer um processo de avaliação que estabeleça sua eficiência, demonstrando que o método é adequado para o seu propósito, desta forma é considerado validado se suas características estiverem coerentes com os pré requisitos estabelecidos (BRITO et al., 2003).

Após a corrida em gradiente exploratório, foi definida a fase móvel metanol:água 44:56/90:10 (V/V) acidificados com 0,5% de ácido acético e o fluxo de 1,000 mL.min⁻¹ como sendo as condições padrão para o restante das análises. O tempo de corrida foi de 12 minutos, o que se mostra adequado para rotina

laboratorial, onde é imprescindível que as análises sejam simples e rápidas.

5.2.1 Linearidade

A linearidade é representada pela relação diretamente proporcional entre o sinal emitido pelo detector e a concentração da substância em análise dentro de um determinado intervalo entre a menor e a maior concentração da curva de calibração (STORPIRTIS et al., 2015).

As curvas analíticas foram lineares no intervalo de 10 a 70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o MTX e de 10 a 90 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para a CUR. A equação da reta representativa da linearidade para o MTX foi $y = 22262x - 9079.4$ ($n = 3$, $r = 0,9998$) (Figura 9) e para a CUR foi $y = 32449x - 34557$ ($n = 3$, $r = 0,9994$) (Figura 10).

FIGURA 9 - Representação gráfica da curva analítica média para a determinação do MTX obtida em HPLC ($\lambda = 261 \text{ nm}$) em fase móvel metanol:água acidificados com 0,5% de ácido acético (50:50 v/v)

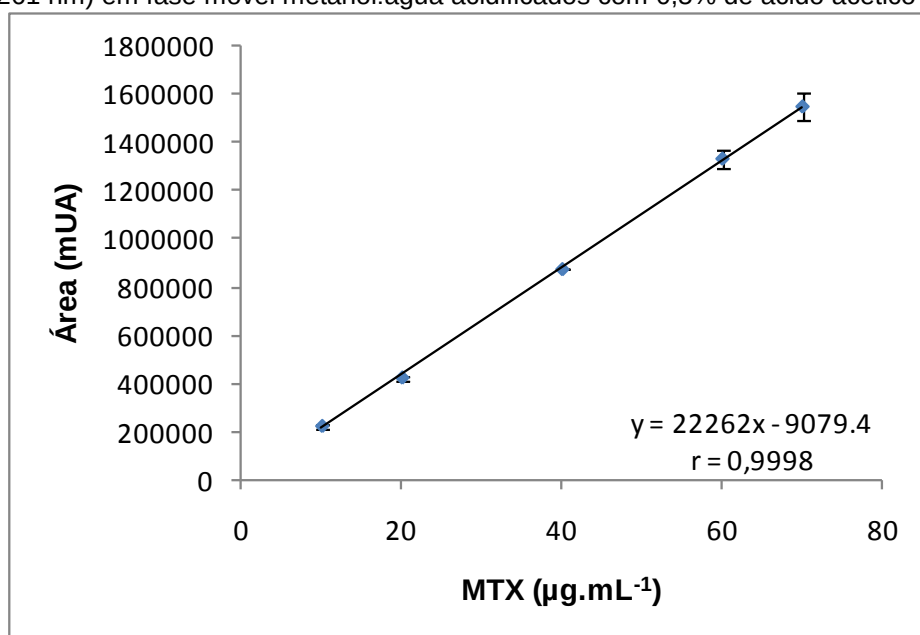
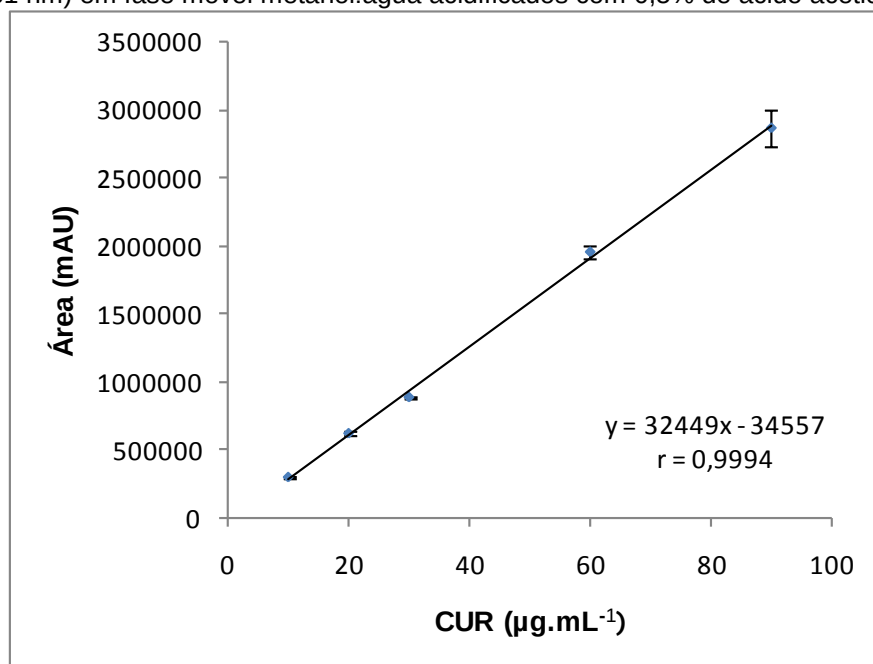


FIGURA 10 - Representação gráfica da curva analítica média para a determinação da CUR obtida em HPLC ($\lambda = 261$ nm) em fase móvel metanol:água acidificados com 0,5% de ácido acético (50:50 v/v)



Em adição ao valor de coeficiente de regressão, o teste para a falta de ajuste que avalia a variação dos valores residuais foi aplicado. Para o MTX, os resultados da análise de variância (ANOVA) para a linearidade do método estão apresentados na Tabela 4 e para a CUR na Tabela 5.

TABELA 4: Resultados obtidos por ANOVA para linearidade do método analítico para o MTX

	SS	DF	MS	F	F _{tab}
Modelo	3.865681E+12	1	3.865681E+12	4738.125	4,667
Resíduo	1.060627E+10	13	8.158673E+08		Linear
Falta de ajuste	986451888	3	328817296	0.341812	3,708
Erro puro	9.619823E+09	10	961982283		Não há falta de ajuste

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

Fonte: O autor

TABELA 5: Resultados obtidos por ANOVA para linearidade do método analítico para a CUR

	SS	DF	MS	F	F _{tab}
Modelo	1.351975E+13	1	1.351975E+13	2969.202	4,667
Resíduo	5.919326E+10	13	4.553327E+09		Linear
Falta de ajuste	1.498533E+10	3	4.995111E+09	1.129913	3,708
Erro puro	4.420792E+10	10	4.420792E+10		Não há falta de ajuste

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

Fonte: O autor

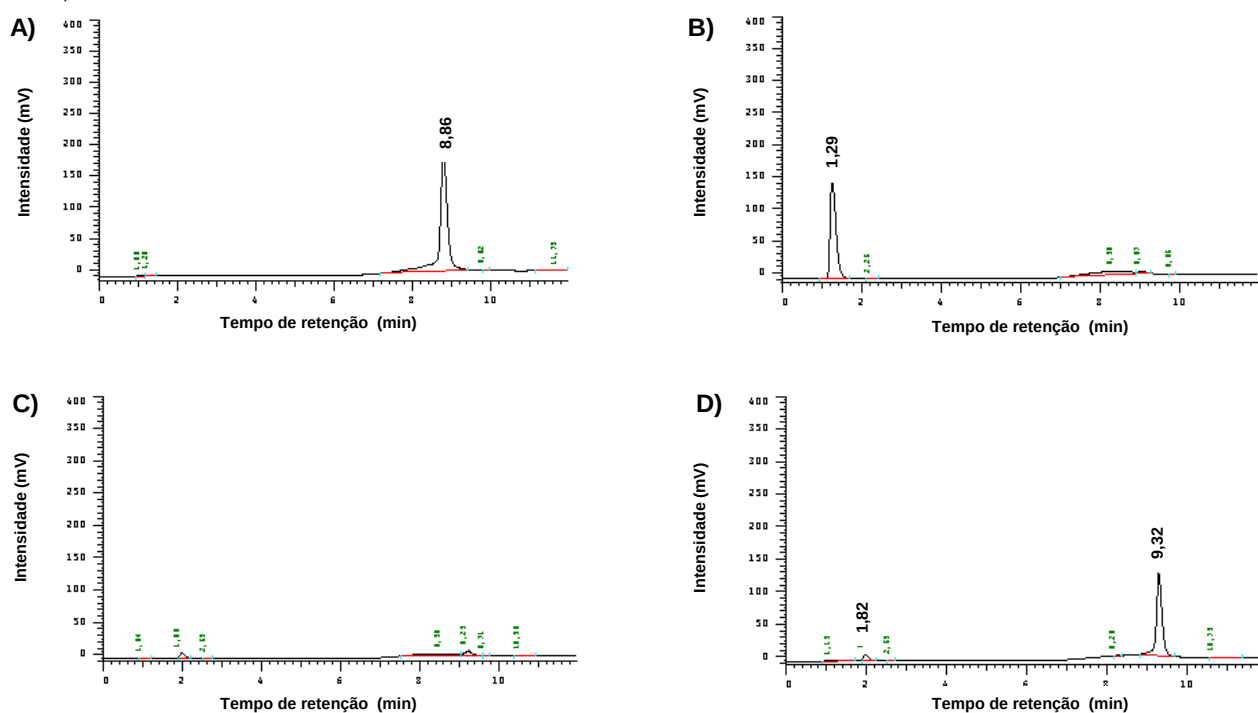
Para ser linear, o F do modelo precisa ser maior que o F tabelado e para não ter falta de ajuste o F para falta de ajuste precisa ser menor que o F tabelado. Desta forma, para o intervalo de 95% de confiança ($\alpha = 0,05$) a regressão se mostrou linear e sem falta de ajuste.

5.2.2 Especificidade

Um método é considerado específico quando produz uma resposta apenas para um analito, avaliando se há interferência de outros compostos tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz que possa influenciar a análise (BRITO et al., 2003; STORPIRTIS et al., 2015)

Foi avaliada por meio de análises comparativas entre os cromatogramas da suspensão de nanocápsulas sem CUR e MTX (NCM-0) e das suspensões com CUR e MTX, como ilustrado na Figura 11.

FIGURA 11 - Cromatogramas ($\lambda = 261$ nm) dos fármacos puros em comparação com o das nanocápsulas preparadas sem e com os fármacos: CUR 60 $\mu\text{g/mL}$ (A), MTX 70 $\mu\text{g/mL}$ (B), NCM-0 (C) e NCM-1 0,1 $\mu\text{g/mL}$ MTX e 3 $\mu\text{g/mL}$ CUR (D) em fase móvel metanol: água (50:50 v/v) acidificados com 0,5% de ácido acético.



Quando comparados os cromatogramas obtidos, o método demonstrou-se específico e de acordo com as especificações da ANVISA (ANVISA, 2003) e do ICH

(ICH, 2005).

5.2.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

LD é a menor quantidade do analito presente na mostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificado e o LQ é a menor quantidade da substância em uma mostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003).

Empregando as equações 2 e 3, os valores obtidos para o LD e LQ, foram 0,15 e 0,45 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, para o MTX e 0,16 e 0,48 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, para a CUR, indicando uma boa sensibilidade do método para a determinação dos analitos.

5.2.4 Precisão

Precisão é um parâmetro que representa a proximidade dos resultados entre uma série de medições em uma mesma amostra e pode ser expressa como variância, desvio padrão ou coeficiente de variação (ICH, 2005)

Os resultados obtidos para a precisão (repetibilidade e precisão intermediária) para o MTX estão demonstrados na Tabela 6. O desvio padrão relativo (DPR) para a repetibilidade para as três concentrações foi inferior a 5% e para a precisão intermediária foi de 0,98%, indicando que o método desenvolvido é preciso dentro da faixa de concentração e das condições adotadas.

TABELA 6: Resultados obtidos para os ensaios de precisão na análise do MTX

	Concentração Teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração Experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$, Média $\pm$ DP*)	DPR** (%)
Repetibilidade (n = 9)			
	15	15,67 $\pm$ 0,09	0,56
	45	44,56 $\pm$ 0,16	0,36
	65	63,98 $\pm$ 0,66	1,03
Precisão intermediária			
Intradia (n = 3)	40	40,35 $\pm$ 0,16	0,40
Interdia (n = 3)	40	39,91 $\pm$ 0,22	0,55
Diferentes analistas (n = 3)	40	40,61 $\pm$ 0,25	0,63
Média $\pm$ DP* (n = 9)	40	40,29 $\pm$ 0,39	0,98

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

Fonte: O autor

Para a CUR, os resultados estão apresentados na Tabela 7. O desvio padrão relativo (DPR) para repetibilidade para as três concentrações foi inferior a 5% e para a precisão intermediária foi de 4,15%, indicando que o método desenvolvido é preciso dentro da faixa de concentração e das condições adotadas.

TABELA 7: Resultados obtidos para os ensaios de precisão na análise da CUR

	Concentração Teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração Experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$, Média $\pm$ DP*)	DPR** (%)
Repetibilidade (n = 9)			
	15	14,92 $\pm$ 0,06	0,37
	45	44,74 $\pm$ 0,25	0,57
	70	69,17 $\pm$ 1,22	1,76
Precisão intermediária			
Intradia (n = 3)	30	30,98 $\pm$ 0,29	0,94
Interdia (n = 3)	30	31,15 $\pm$ 1,21	3,87
Diferentes analistas (n = 3)	30	29,90 $\pm$ 1,02	3,42
Média $\pm$ DP* (n = 9)	30	30,68 $\pm$ 1,27	4,15

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

Fonte: O autor

5.2.5 Exatidão

Exatidão de um método analítico é expressa pela proximidade dos resultados em relação ao valor verdadeiro (ANVISA, 2003)

A exatidão por ensaio de recuperação foi determinada pela adição de uma quantidade exata dos fármacos CUR e MTX a uma solução de concentração conhecida dos mesmos. A % média de recuperação $\pm$ DP e DPR foram 101,75 $\pm$ 0,62 e 0,61%, respectivamente para o MTX. Para a CUR os resultados de % média de recuperação $\pm$ DP e DPR foram 102,37 $\pm$ 0,92 e 0,90%, respectivamente. Estes resultados, portanto, indicam que o método proposto é considerado exato.

5.2.6 Robustez

Robustez indica a capacidade do método em permanecer inalterado sob pequenas variações (BRITO et al., 2003).

Para a avaliação da robustez, o fluxo de 1,000 mL.min⁻¹ e a concentração inicial da fase móvel metanol:água 44:56/90:10 (v/v) foram consideradas condições padrão. As alterações que o método sofreu estão demonstradas na Tabela 8.

TABELA 8 – Variações do método para avaliação da robustez para o MTX e para a CUR

	MTX (DPR)	CUR (DPR)
Fluxo de 1,000 mL.min ⁻¹ para 0,995 mL.min ⁻¹	0,90%	4,45%
Fluxo de 1,000 mL.min ⁻¹ para 1,005 mL.min ⁻¹	0,90%	0,67%
Concentração inicial da fase móvel metanol:água de 44:56/90:10 (V/V) para 43:57/89:11 (V/V)	1,58%	1,68%
Concentração inicial da fase móvel metanol:água de 44:56/90:10 (V/V) para 45:55/91:09 (V/V)	0,80%	0,97%

Fonte: O autor

O teste Tukey a um nível de significância de 5% mostrou que não houve diferença significativa na área do pico e o tempo de retenção do MTX e da CUR quando o método sofreu as alterações, portanto o método provou ser robusto para os fármacos analisados, sob as condições avaliadas.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

Os resultados obtidos de pH, tamanho de partícula, índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta (PZ) podem ser observados na Tabela 9.

TABELA 9: Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas*

Formulação	pH	Tamanho de partícula (nm)	IPD	PZ (mV)
NCM-0**	6,16±0,29	313,30±48,20	0,351±0,15	-39,83±2,46
NCUR-1	5,80±0,17	307,26±29,40	0,323±0,07	-38,8±7,45
NCUR-2	5,86±0,20	315,96±10,30	0,351±0,02	-41,2±7,20
NMTX-1	6,13±0,41	287,83±28,00	0,287±0,11	-40,60±5,80
NMTX-2	6,32±0,37	278,60±5,00	0,237±0,009	-38,06±1,60
NCM-1	6,11±0,61	312,03±23,60	0,344±0,05	-39,43±6,26
NCM-2	5,26±0,31	325,16±28,90	0,351±0,03	-33,4±3,29

* Média (n=3) ± desvio padrão

**Controle negativo das nanocápsulas poliméricas

Fonte: O autor

O pH apresentou valores entre 5,26 e 6,32. O caráter ácido das nanossuspensões deve-se principalmente à natureza dos polímeros presentes, em função da presença do grupo éster (DURÁN; MATOSSO; MORAIS, 2006). O tamanho das nanocápsulas variou de 278,60 a 325,16 nm, ficando próximos ao tamanho considerado satisfatório por Gupta & Kompella (2006).

Valores maiores de nanopartículas contendo curcumina também foram observados no trabalho de Yallapu et al., (2010) onde nanoencapsularam curcumina com o polímero PLGA pela técnica de nanoprecipitação.

Nanopartículas de diâmetro maior podem ser explicadas pela quantidade de polímero utilizada em sua formação. As unidades das cadeias poliméricas se agregam e permanecem associadas durante o processo de difusão com o aumento da concentração do polímero, isso leva à formação de partículas maiores (SOUZA et.al., 2012) e outra explicação é pelo fato do polímero PEG tornar a fase orgânica mais viscosa interferindo em sua dispersão na fase aquosa durante a agitação,

gerando assim nanopartículas com diâmetros e índices de polidispersão maiores (MAINARDES, 2007).

Alguns fatores podem influenciar diretamente o diâmetro de partículas em sistemas nanoestruturados. Um deles é a natureza do óleo para a formação de nanocápsulas, influenciando algumas características das substâncias utilizadas, como viscosidade, hidrofobicidade e tensão superficial. Outro importante fator é a presença do fármaco na fase orgânica antes da fase de precipitação do polímero no meio aquoso, pois este influencia o processo de nucleação resultando em partículas de diâmetro maior com grande distribuição de tamanho (SCHAFFAZICK et. al., 2003).

Valores de índice de polidispersão próximos a 0 são considerados monodispersos e próximos ou maiores a 0,5 indicam uma dispersão heterogênea (AVADI et al., 2010). As nanossuspensões apresentaram valores entre 0,237 e 0,351, demonstrando pequena variação, indicando que os valores foram adequados.

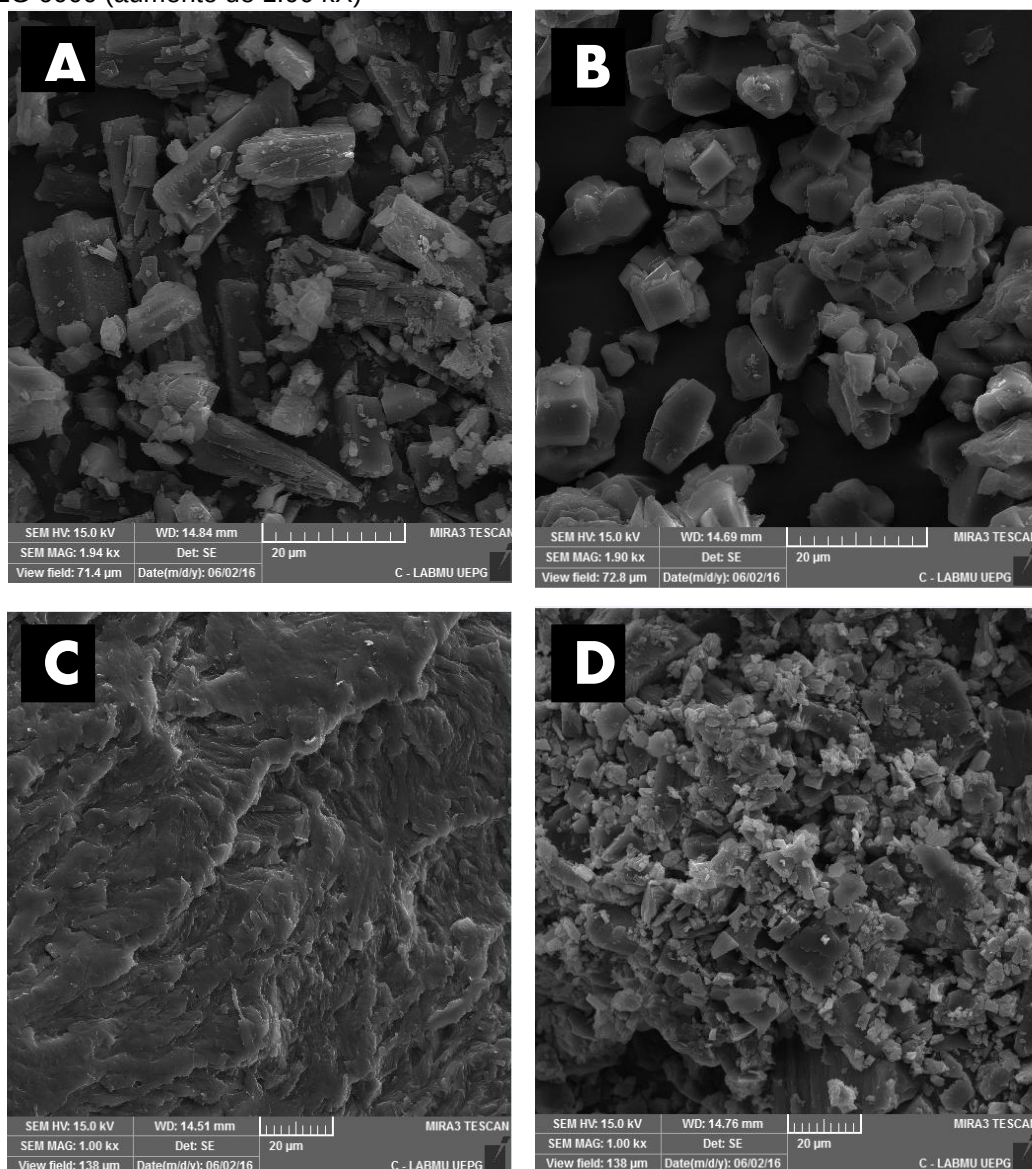
Os valores para o potencial zeta variaram de -33,4 a -41,2 mV. Todos os valores ficaram negativos, condizendo com a natureza aniônica dos polímeros devido à presença de grupos carboxílicos, sugerindo estabilidade das formulações (SCHAFFAZICK et al., 2003).

A análise de potencial zeta permite identificar as cargas elétricas que se encontram na superfície das nanopartículas. Partículas são consideradas estáveis quando o valor do potencial zeta for próximo a 30 mV (NEVES et al., 2013).

5.4 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA COM FONTE DE EMISSÃO POR EFEITO DE CAMPO (MEV-FEG)

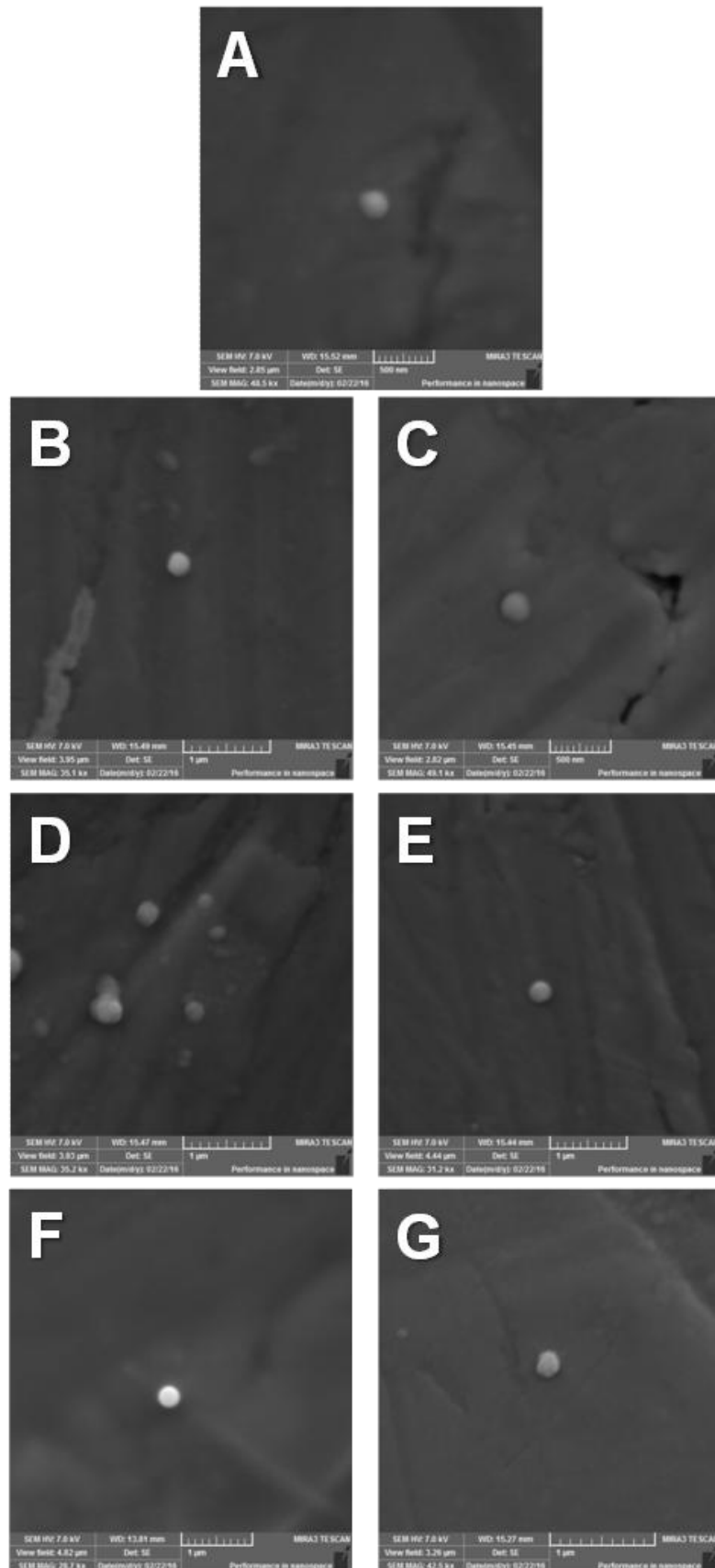
Os resultados obtidos por MEV-FEG para os fármacos puros e polímeros estão indicadas na Figura 12. A CUR pura (Figura 12 A) apresentou-se com uma morfologia cristalina. O MTX puro (Figura 12 B) também apresentou estrutura cristalina, porém com cristais menores que a CUR. Os péletes de PCL (Figura 12 C) apresentaram superfície irregular e o PEG 6000 (Figura 12 D) apresentou aglomerados cristalinos.

FIGURA 12- Aspectos morfológicos dos materiais de partida obtidos por MEV-FEG.: A) curcumina pura (aumento de 1.94 kX); B) metotrexato puro (aumento de 1.90 kX); C) PCL (aumento de 1.00 kX) e D) PEG 6000 (aumento de 1.00 kX)



Por meio das fotomicrografias das nanocápsulas representadas na Figura 13, as dimensões nanométricas foram comprovadas. Foi observado que mesmo alterando as concentrações dos fármacos, as estruturas apresentam-se morfológicamente similares. Não foi observado presença de cristais dos fármacos na superfície das nanopartículas. Os tamanhos correspondem aos encontrados no método de espectroscopia de correlação de fótons para o tamanho de partícula.

FIGURA 13 - Fotomicrografias das nanocápsulas obtidas por MEV-FEG: A) NCM-0 (aumento de 48kX); B) NCUR-1 (aumento de 35kX); C) NCUR-2 (aumento de 49kX); D) NMTX-1 (aumento de 35kX); E) NMTX-2 (aumento de 31kX); F) NCM-1 (aumento de 28kX); G) NCM-2 (aumento de 42kX).

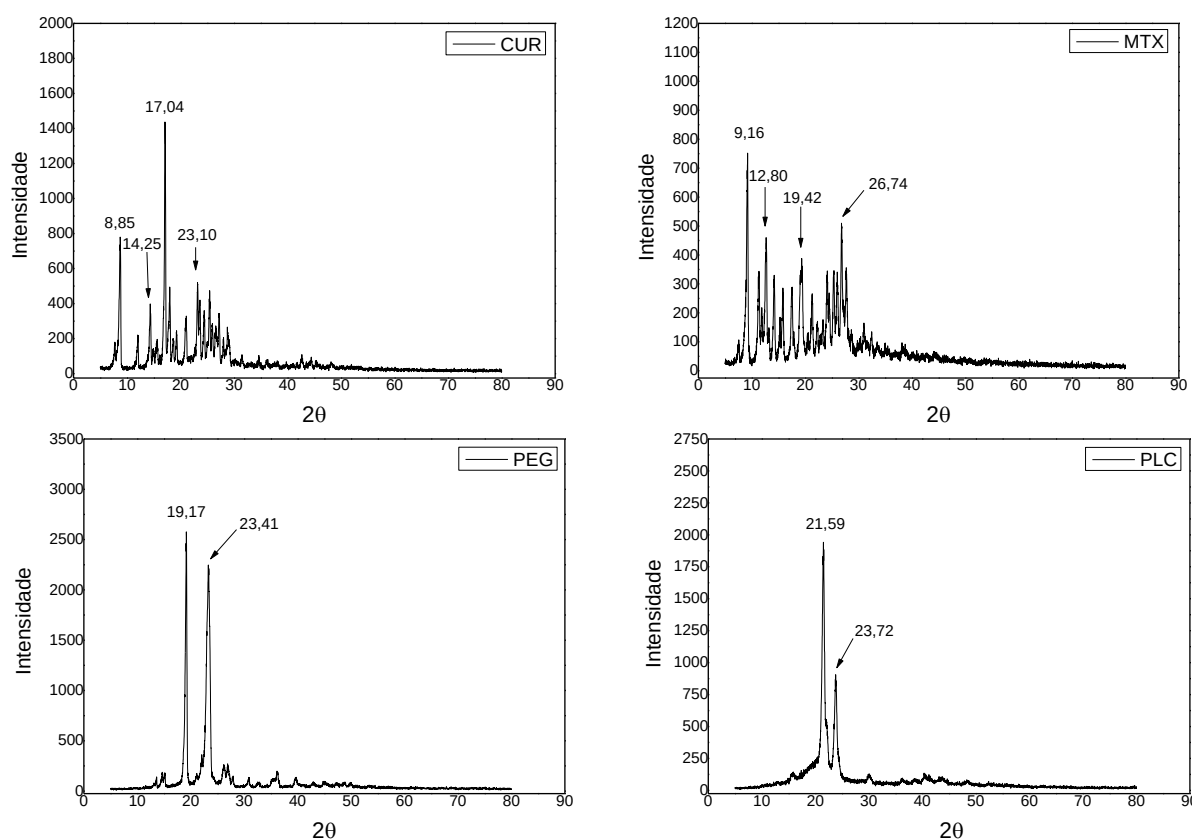


5.5 ANÁLISE POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX)

Substâncias em estado sólido podem possuir características cristalinas e/ou amorfas. Geralmente, os sólidos em estado amorfo são mais solúveis do que os que se encontram em estado cristalino, devido às energias livres, presentes no processo de dissolução. Sólidos no estado amorfo possuem moléculas dispostas aleatoriamente e sendo assim, pouca energia é necessária para separá-las resultando em uma dissolução mais rápida quando comparado à forma cristalina (RIEKES et al., 2011).

A Figura 14 sumariza os resultados obtidos por difração de raios X para os fármacos CUR e MTX e os polímeros PEG 6000 e PCL.

FIGURA 14 – Difratogramas dos fármacos puros e polímeros utilizados

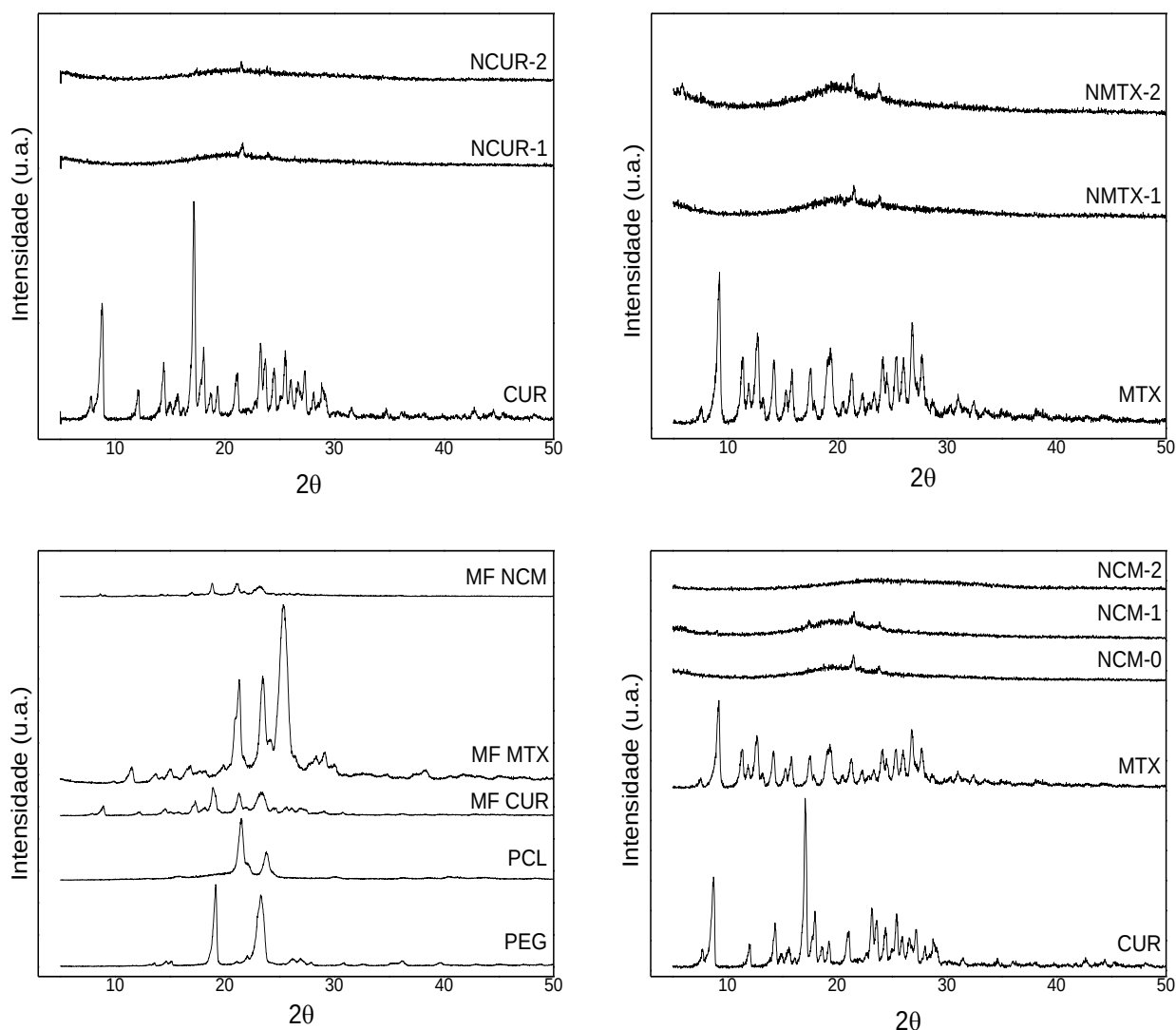


A CUR apresentou picos bem característicos em $2\theta = 8,85^\circ$, $14,25^\circ$, $17,04^\circ$, $23,10^\circ$ além de outros, evidenciando sua natureza cristalina. Os resultados são compatíveis com os estudos de Silva, Fideles e Fook (2015) e Teng, Luo e Wang (2012). O MTX apresentou picos em

$2\theta = 9,16^\circ, 12,8^\circ, 19,42^\circ$ e $26,74^\circ$ entre outros de menor intensidade, mostrando sua cristalinidade. Os resultados estão de acordo com os resultados encontrados por Garcia (2014). O polímero PEG 6000 apresentou valores para os picos em $2\theta = 19,17^\circ$ e $23,41^\circ$ e para a PCL em $2\theta = 21,59^\circ$ e $23,72^\circ$ estando em concordância com resultados obtidos por Silva (2008).

A Figura 15 apresenta os difratogramas comparativos entre os fármacos puros (CUR e MTX), os polímeros de partida (PCL, PEG 6000), misturas físicas (MF CUR, MF MTX e MF NCM) e as suspensões de nanocápsulas preparadas em diferentes concentrações (NCUR-1, NCUR-2, NMTX-1, NMTX-2, NCM-0, NCM-1 e NCM-2).

FIGURA 15 – Difratogramas comparativos entre fármacos puros, polímeros , misturas físicas e nanossuspensões



Quando avaliadas as formulações NCUR-1, NCUR-2, NMTX-1, NMTX-2, NCM-1 e NCM-2, observa-se que os perfis obtidos são similares entre si apresentando uma drástica redução dos picos de cristalinidade dos fármacos e polímeros, resultado da dispersão molecular dos fármacos e os polímeros, levando a amorfização dos compostos. Quando o fármaco se encontra em sua forma amorfa, espera-se uma melhor solubilidade em comparação ao fármaco puro.

A característica amorfa da formulação é considerada benéfica, pois favorece a difusão das moléculas dos fármacos através da parede polimérica resultando em uma liberação controlada dos fármacos encapsulados (SONG et. al., 2014 citado por SILVA, FIDELES; FOOK, 2015)

Resultados semelhantes foram obtidos por Silva, Fideles e Fook (2015) onde observaram grande redução dos picos de cristalinidade da CUR em esferas de quitosana. Teng, Luo e Wang (2012) também observaram a redução da cristalinidade da CUR e melhora de sua solubilidade quando nanoencapsulada com proteína isolada de soja.

Garcia (2014) observou redução da cristalinidade do MTX em micropartículas de PLGA, sugerindo a distribuição do fármaco no interior da matriz polimérica levando ao estado amorfo e assim melhorando seu perfil de liberação.

5.6 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRATERMELHO (FTIR)

A radiação infravermelha está situada entre as regiões do visível e das microondas, sendo que a porção de maior interesse está entre 4.000 e 400 cm^{-1} (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000). Esta análise é de grande importância, pois permite a identificação estrutural de substâncias orgânicas através da detecção de suas ligações e grupos funcionais além de demonstrar possíveis interações moleculares entre os fármacos e os polímeros na nanoencapsulação quando comparado com os compostos puros (LOPES; FASCIO, 2004).

Neste intuito, os espectros visam confirmar os principais grupos químicos presentes nos compostos da formulação e também confirmar a integridade dos fármacos CUR e MTX após o processo da nanoencapsulação.

Os espectros FTIR obtidos a partir da análise do CUR, MTX, PEG e PCL estão representados na Figura 16.

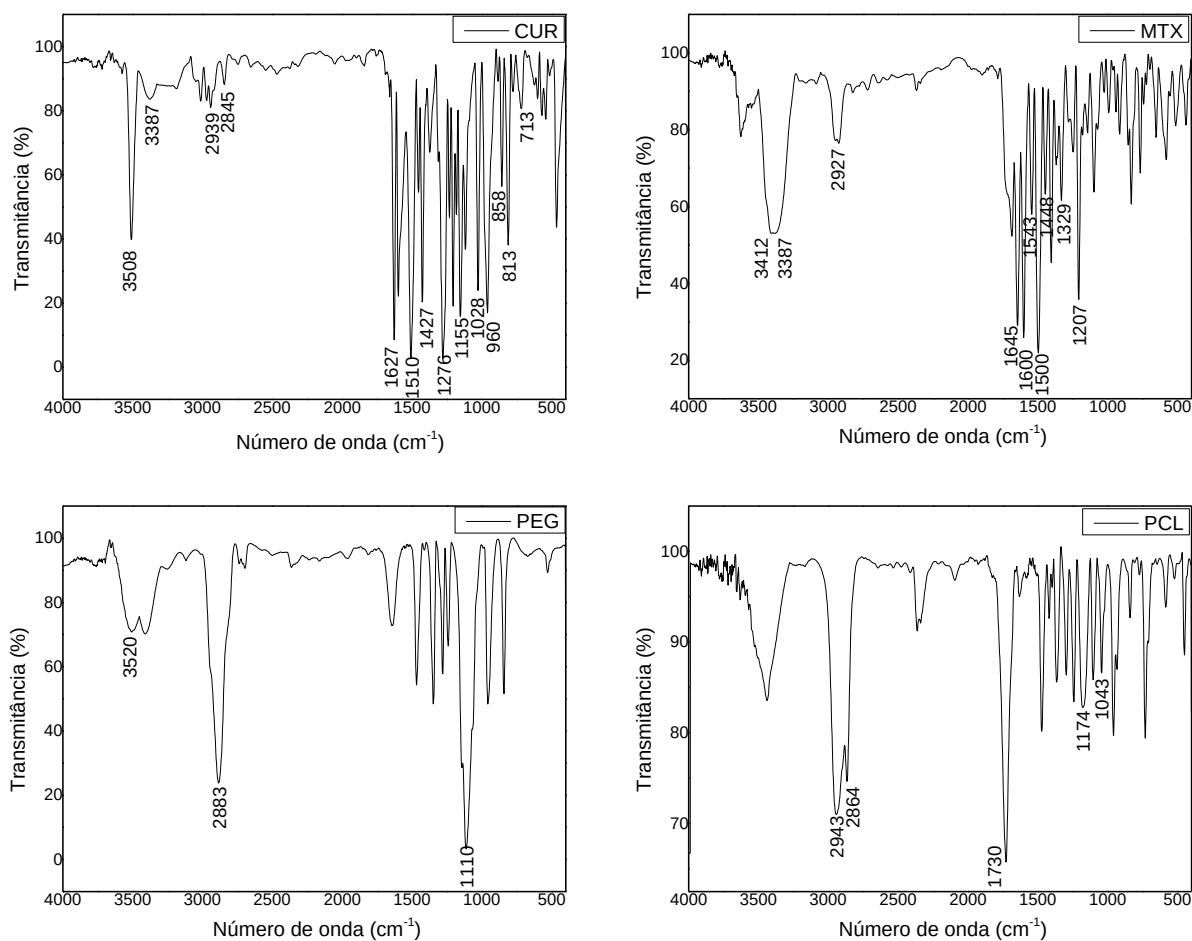
A CUR apresentou banda intensa em 3508 cm^{-1} indicando vibração do alongamento do grupo -OH . Em 3387 cm^{-1} indica vibração do grupo OH livre do fenol. Vibrações do grupo carbonila e do estiramento da ligação C-C do anel de benzeno foi observado em 1627 cm^{-1} e 1510 cm^{-1} respectivamente. Em 1427 cm^{-1} a CUR apresentou flexão da vibração do grupo CH ligado ao anel benzênico. Em 1276 cm^{-1} indica vibração de C-O em 1155 cm^{-1} estiramento do grupo C-O de éter e $1028 - 858\text{ cm}^{-1}$ estiramento do grupo C-O-C. As bandas em 960 , 813 e 713 cm^{-1} indicam vibrações de flexão da ligação CH de grupos alcenos (RCH=CH_2). Os dados encontrados para a CUR estão de acordo com os reportados por Massimino e Yoshioka (2016), Fugita (2011), Teng, Luo e Wang (2012), Hu et al. (2015) e Silva et al. (2016).

Para o MTX foram observadas bandas em 3412 e 3387 cm^{-1} referente à vibração do alongamento dos grupos amina. Em 2927 cm^{-1} indica o grupamento O-H do ácido carboxílico. Alongamento da ligação C=O foi observado em 1645 cm^{-1} enquanto que em 1600 cm^{-1} indica estiramento da ligação N-H do grupamento amida. As bandas em 1500 , 1543 e 1448 cm^{-1} são características do anel aromático e em 1329 e 1207 cm^{-1} representa bandas típicas de ligação C-H da amina secundária aromática e estiramento das ligações C-O do ácido carboxílico, respectivamente. Os resultados apresentados estão em concordância com os autores Garcia (2014), Ajmal et al. (2015), e Oliveira (2011), que em seus trabalhos também reportaram resultados semelhantes para a análise por IVTF do MTX.

O espectro do polímero PEG exibiu absorções características em 3520 cm^{-1} referente aos grupos hidroxilas terminais -OH associados por pontes de hidrogênio, banda em 2883 cm^{-1} referente ao grupamento C-H da cadeia alifática e vibração de estiramento assimétrico C-O-C de éteres dialquílicos em 1110 cm^{-1} . Estes resultados estão em concordância com os autores Paiva et. al. (2012) e Biswal et al. (2008).

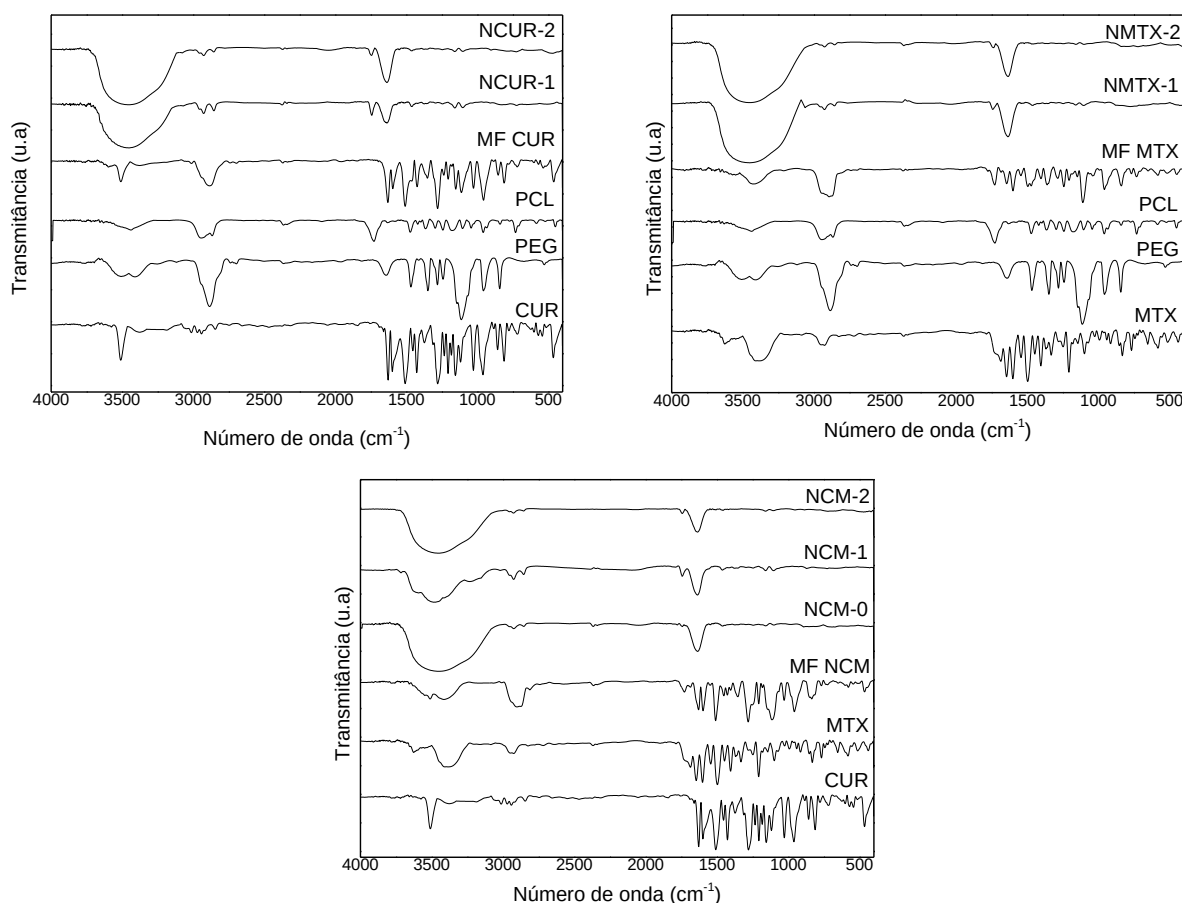
O polímero PCL demonstrou uma banda intensa em 1730 cm^{-1} , que corresponde à vibração de deformação axial do grupamento C=O de ésteres alifáticos simples, as bandas em 2943 e 2864 cm^{-1} correspondentes às vibrações simétricas e assimétricas do grupamento -CH_2 , respectivamente e bandas em 1174 e 1043 cm^{-1} indicando estiramento C – O (PAIVA et al., 2012; HOIDY et al., 2010).

FIGURA 16: Espectro FTIR da CUR, MTX, PEG e PCL



Os espectros comparativos de FTIR para os fármacos puros (CUR e MTX), polímeros puros (PEG e PCL), misturas físicas (MF CUR, MF MTX e MF NCM) e as formulações de nanocápsulas (NCUR-1, NCUR-2, NMTX-1, NMTX-2, NCM-1 e NCM-2) estão demonstrados na Figura 17.

FIGURA 17 - Espectro FTIR comparativo entre os fármacos puros (CUR e MTX), polímeros puros (PEG e PCL), misturas físicas (MF CUR, MF MTX e MF NCM) e as formulações das nanocápsulas (NCUR-1, NCUR-2, NMTX-1, NMTX-2, NCM-1 e NCM-2)

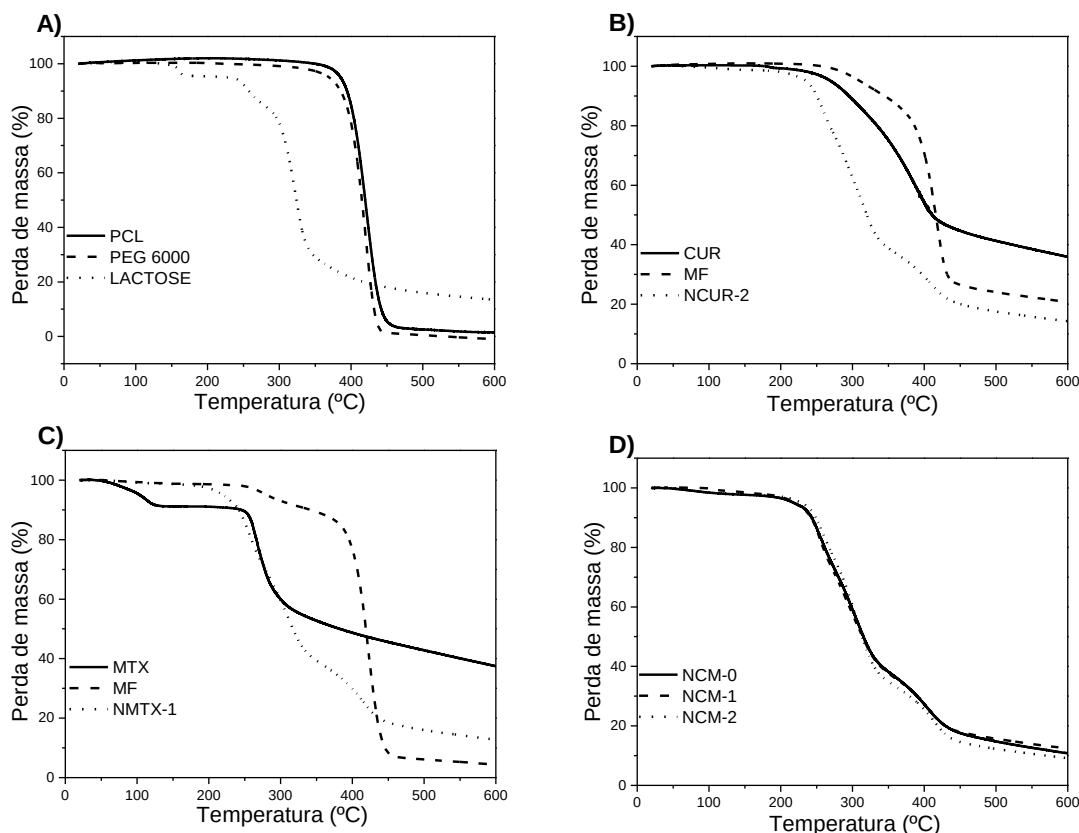


Os espectros das misturas físicas e das formulações de nanocápsulas indicam que não houve alteração dos grupos funcionais dos componentes das formulações. Uma banda alargada na região de 3500 cm^{-1} apareceu para as formulações e é resultado da presença de água. Os picos referentes aos grupos funcionais dos fármacos apareceram com menor intensidade em razão da nanoencapsulação dos fármacos. Esses resultados sugerem que não houve ligação química entre os componentes. Para as misturas físicas, as bandas correspondem à soma das bandas dos polímeros e fármacos individuais (LOPES; FASCIO, 2004).

5.7 ANÁLISE TÉRMICA

As curvas de TGA obtidas para a CUR, para o MTX, para os polímeros de partida, para as misturas físicas respectivas e para as nanocápsulas liofilizadas com 10% de lactose estão representadas na Figura 18.

FIGURA 18 – Curvas de ATG: A) PCL, PEG 6000 e lactose; B) CUR, MF e NCUR-2; C) MTX, MF e NMTX-1 e D) NCM-0, NCM-1 e NCM-2.



A decomposição térmica da CUR pura ocorre em duas etapas consecutivas, entre 205 e 441°C e de 441 a 530°C.

O MTX puro apresentou um primeiro evento característico de perda de água de cristalização entre 30,6 °C e 138,0 °C. Dois eventos de perda de massa foram observados, sendo o primeiro entre 186,4 °C e 285,7 °C e o segundo compreendido entre 285,7 °C e 340,0 °C.

As curvas de TGA dos polímeros de partida apresentam um único evento de perda de massa, nas faixas de temperatura entre 360°C e 450°C, tanto para a PCL quanto para o PEG 6000.

A lactose mostrou um primeiro estágio de degradação térmica em 150 °C relacionado à perda de água de cristalização e o segundo e terceiro estágios de perda de massa relacionados ao seu processo de degradação que começou em 225 e 279 °C, respectivamente.

Os padrões de degradação térmica das nanocápsulas demonstraram etapas de perda de massa em temperaturas intermediárias para as observadas para os

fármacos puros (CUR e MTX), para os polímeros utilizados (PCL e PEG 6000) e a lactose.

Os termogramas da CUR, do MTX, da PCL, do PEG 6000, das misturas físicas e das nanocápsulas liofilizadas com 10% de lactose, avaliados por DSC, estão mostrados na Figura 19.

Para a CUR pura, foi observado um único evento térmico de fusão em 190 °C, resultado condizente com o especificado na literatura para este fármaco. Fugita (2011) ao avaliar a CUR pura através de curvas de DSC observou um único pico endotérmico relacionado à fusão do composto em 180,19°C.

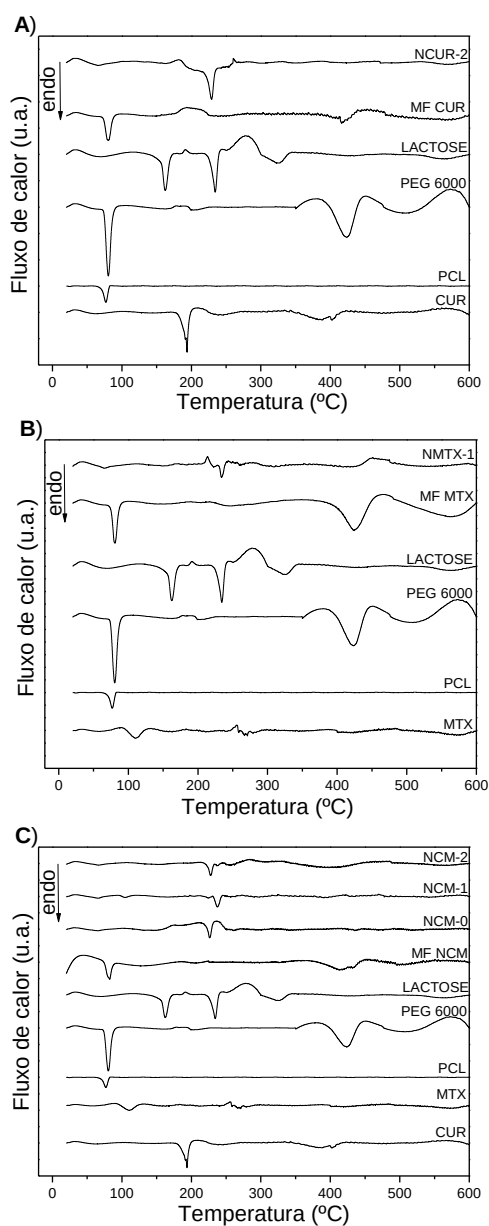
O MTX apresentou um pico de baixa intensidade em 110°C, resultado condizente com a literatura (TAHERI et al., 2010, YOUSEFI et al., 2010, ZHAO et al., 2016).

A curva de DSC da PCL possui apenas um evento de fusão em 60 °C. O PEG 6000 apresentou um pico de fusão em aproximadamente 70°C.

A lactose revelou dois eventos endotérmicos a 148 a 220 °C.

Como esperado, as misturas físicas apresentaram os eventos térmicos atribuídos ao polímero e o fármaco correspondente. No entanto, para todas as nanopartículas preparadas foi observado o desaparecimento do evento térmico de fusão característico do fármaco.

FIGURA 19 – Termogramas obtidos por DSC: A) CUR, PCL, PEG 6000, lactose, MF CUR e NCUR-2; B) MTX, PCL, PEG 6000, lactose, MF MTX e NMTX-1 e C) CUR, MTX, PCL, PEG 6000, lactose, MF NCM, NCM-0, NCM-1 e NCM-2.



Esses resultados sugerem que o método de nanoencapsulação foi responsável por tornar os fármacos em dispersão molecular no interior das nanopartículas. Esses dados estão de acordo com os verificados anteriormente por difração de raio X.

5.8 ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

Após 60 dias de armazenamento, à temperatura ambiente e protegido da luz, as formulações apresentaram a mesma aparência, sem alteração de cor e com pequena formação de sedimento na formulação NCUR-2 e NCM-1.

Nanossuspensões geralmente não possuem tendência à separação de fases em um curto período de tempo, pois devido ao tamanho, a sedimentação é lenta e minimizada pelo movimento Browniano, no entanto, com um tempo maior de armazenamento, pode acontecer aglomeração das partículas seguido de sedimentação (CODEVILLA et.al., 2015).

Os parâmetros de pH, tamanho médio de partícula (nm), potencial zeta (mV) e índice de polidispersão foram avaliados para todas as formulações e foram esquematizados nas Figuras 20, 21, 22 e 23, respectivamente.

Todas as formulações analisadas apresentaram uma redução no valor de pH após o período de 60 dias (Figura 20). Para as formulações NCM-0, NCUR-1, NMTX-1, NMTX-2 e NCM-1 o decréscimo foi significativo ($p < 0,05$). Estes dados corroboram com os encontrados na literatura.

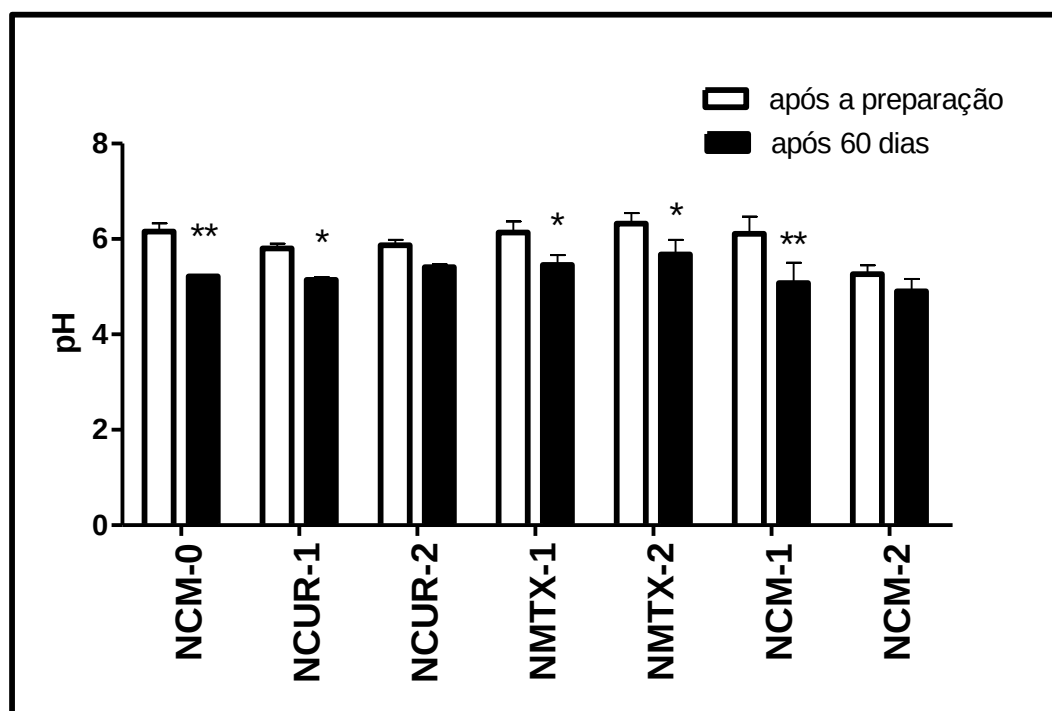
A redução do pH das nanossuspensões pode indicar degradação do polímero sendo atribuído tanto à ionização de grupos carboxílicos do polímero quanto à hidrólise. Redução de pH de nanopartículas contendo PCL é indicativo de exposição de um maior número de grupos ácidos carboxílicos terminais promovido pelo relaxamento das cadeias poliméricas em decorrência do tempo (SCHAFFAZICK et. al., 2003).

Em 1996, Calvo e colaboradores relataram redução no pH das formulações de nanopartículas contendo PCL em um período de 6 meses e atribuíram à isso a produção de ácido ϵ -hidroxicapróico livre proveniente da degradação do polímero. Weiss (2001) também atribuiu ao decréscimo de pH de formulações preparadas com PCL e benzoato de benzila à formação de ácido ϵ -hidroxicapróico após 90 dias de armazenamento. Em um estudo realizado por Mezzalana (2005), após 45 dias, também foi verificada redução significativa ($p < 0,05$) do pH das nanopartículas contendo PCL.

FIGURA 20 - Valores de pH, após a preparação e após 60 dias para as formulações NCM-0, NCUR-1, NCUR-2, NMTX-1, NMTX-2, NCM-1 e NCM-2.

Controle negativo (NCM-0); Nanocápsulas de CUR 1 mg.mL⁻¹ (NCUR-1); Nanocápsulas de CUR 3 mg.mL⁻¹ (NCUR-2); Nanocápsulas de MTX 0,1 mg.mL⁻¹ (NMTX-1); Nanocápsulas de MTX 0,3 mg.mL⁻¹ (NMTX-2); Nanocápsulas de CUR:MTX 3 mg.mL⁻¹: 0,1mg.mL⁻¹ (NCM-1); Nanocápsulas de CUR:MTX 0,5 mg.mL⁻¹: 0,3 mg.mL⁻¹ (NCM-2)

* p<0,05; ** p<0,001;



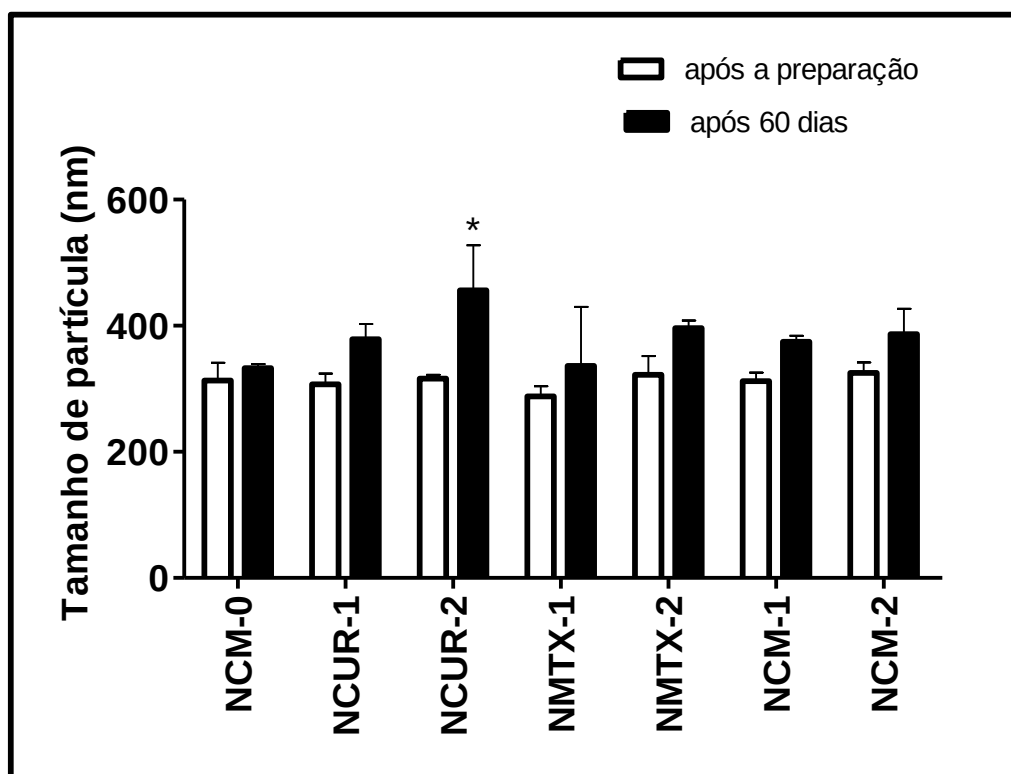
O monitoramento de mudanças na distribuição de tamanho das partículas é um importante fator na estabilidade de nanossuspensões, pois em função do tempo as nanopartículas dispersas podem ter tendência à agregação e sedimentação (SCHAFFAZICK et. al., 2003).

Aumento do tamanho das nanopartículas (Figura 21) foi observado para todas as formulações, sendo que a diferença foi estatisticamente significativa (p<0,05) apenas para a formulação NCUR-2, indicativo de processo de sedimentação.

FIGURA 21 – Tamanho das nanopartículas, após a preparação e após 60 dias para as formulações NCM-0, NCUR-1, NCUR-2, NMTX-1, NMTX-2, NCM-1 e NCM-2.

Controle negativo (NCM-0); Nanocápsulas de CUR 1 mg.mL⁻¹ (NCUR-1); Nanocápsulas de CUR 3 mg.mL⁻¹ (NCUR-2); Nanocápsulas de MTX 0,1 mg.mL⁻¹ (NMTX-1); Nanocápsulas de MTX 0,3 mg.mL⁻¹ (NMTX-2); Nanocápsulas de CUR:MTX 3 mg.mL⁻¹: 0,1mg.mL⁻¹ (NCM-1); Nanocápsulas de CUR:MTX 0,5 mg.mL⁻¹: 0,3 mg.mL⁻¹ (NCM-2)

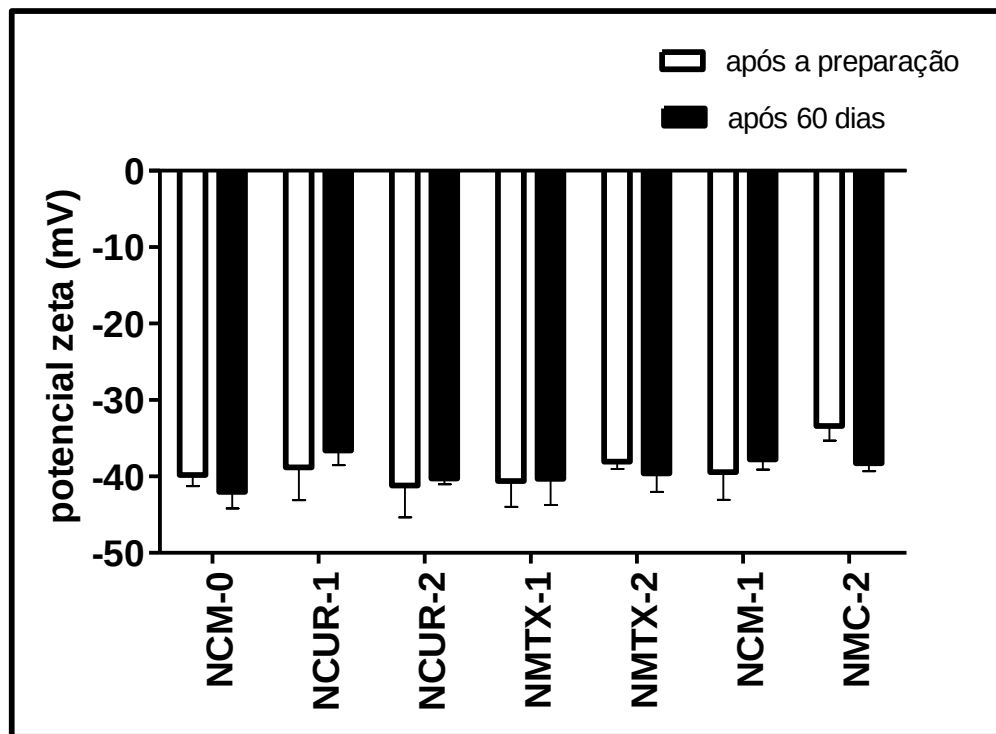
* p<0,05



Os valores de potencial zeta (Figura 22) não mostraram diferença estatística ($p>0,05$) em nenhuma das formulações após o armazenamento. Estes resultados permitem prever uma boa estabilidade físico-química das nanossuspensões, pois as forças repulsivas tendem a evitar a agregação das partículas (SCHAFFAZICK et. al., 2003).

FIGURA 22 – Potencial zeta das nanopartículas, após a preparação e após 60 dias para as formulações NCM-0, NCUR-1, NCUR-2, NMTX-1, NMTX-2, NCM-1 e NCM-2.

Controle negativo (NCM-0); Nanocápsulas de CUR 1 mg.mL⁻¹ (NCUR-1); Nanocápsulas de CUR 3 mg.mL⁻¹ (NCUR-2); Nanocápsulas de MTX 0,1 mg.mL⁻¹ (NMTX-1); Nanocápsulas de MTX 0,3 mg.mL⁻¹ (NMTX-2); Nanocápsulas de CUR:MTX 3 mg.mL⁻¹: 0,1mg.mL⁻¹ (NCM-1); Nanocápsulas de CUR:MTX 0,5 mg.mL⁻¹: 0,3 mg.mL⁻¹ (NCM-2)



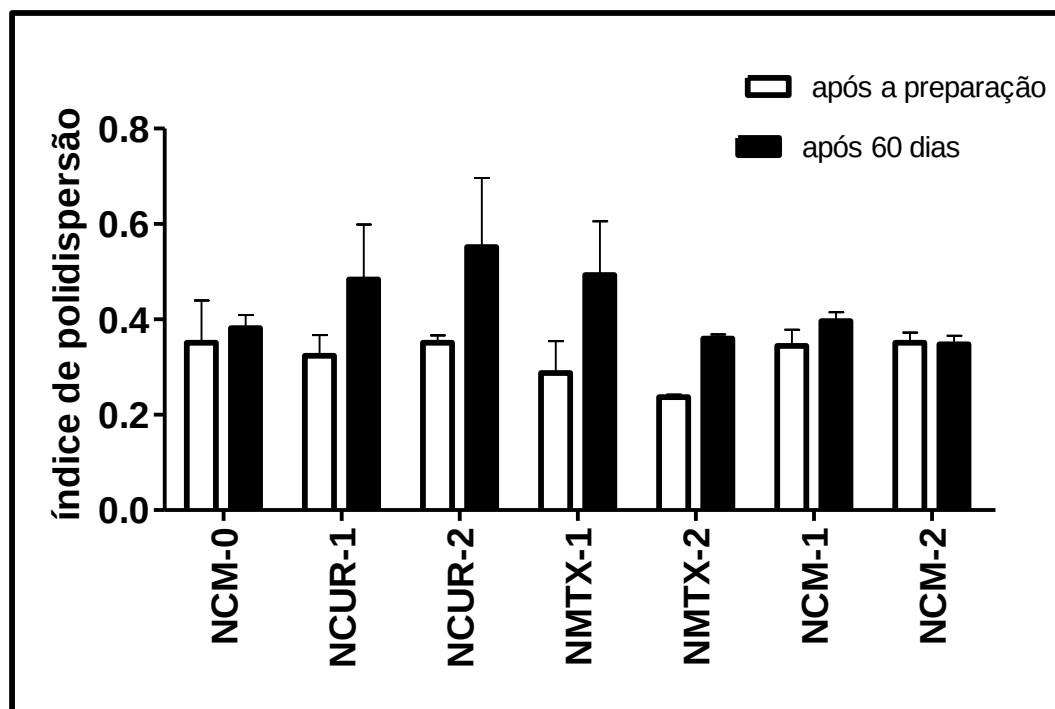
Apesar dos resultados não terem sido estatisticamente diferentes, para as formulações NCM-0, NMTX-2 e NCM-2 os valores tornaram-se mais negativos após o período de 60 dias. Para as formulações NCUR-2 e NMTX-1 houve pequena mudança nos valores e para as formulações NCUR-1 e NCM-1 os valores acabaram sendo menos negativos após os 60 dias.

O aumento do valor do potencial zeta para mais negativo pode estar associado à ionização de grupos ácidos da parede polimérica (KÜLKAMP et. al., 2009).

Em relação aos valores de índice de polidispersão, não foi verificada variação estatística ($p > 0,05$) para as formulações, após 60 dias de armazenamento (Figura 23), porém para a maioria das formulações houve um aumento dos valores, indicando heterogeneidade nos diâmetros das partículas, pois foram observados valores próximos ou maiores que 0,5 (AVADI et al., 2010).

FIGURA 23 – Índice de polidispersão das nanopartículas, após a preparação e após 60 dias para as formulações NCM-0, NCUR-1, NCUR-2, NMTX-1, NMTX-2, NCM-1 e NCM-2.

Controle negativo (NCM-0); Nanocápsulas de CUR 1 mg.mL⁻¹ (NCUR-1); Nanocápsulas de CUR 3 mg.mL⁻¹ (NCUR-2); Nanocápsulas de MTX 0,1 mg.mL⁻¹ (NMTX-1); Nanocápsulas de MTX 0,3 mg.mL⁻¹ (NMTX-2); Nanocápsulas de CUR:MTX 3 mg.mL⁻¹: 0,1mg.mL⁻¹ (NCM-1); Nanocápsulas de CUR:MTX 0,5 mg.mL⁻¹: 0,3 mg.mL⁻¹ (NCM-2)



Os resultados apresentados para a estabilidade mostram que apesar das formulações de nanocápsulas terem apresentado certa variação significativa de tamanho, mantiveram uma boa estabilidade garantida pelo potencia zeta.

5.9 ENSAIOS BIOLÓGICOS - ESTUDO *IN VITRO*

5.9.1 Avaliação da viabilidade celular

Com a finalidade de avaliar a toxicidade dos polímeros utilizados nas formulações, bem como dos fármacos puros e das nanocápsulas sobre a linhagem de células tumorais de pulmão CALU-3 e células normais (fibroblastos) NHI-3T3, foram realizados testes de viabilidade celular pelos ensaios de MTT e SRB nos tempos de 72 horas após a incubação com as amostras.

Ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) comprova a citotoxicidade induzida por compostos através da avaliação de função mitocondrial. Este teste avalia a atividade de enzimas desidrogenases mitocondriais

e do seu respectivo potencial redox. A avaliação da viabilidade é feita através da quantificação da redução do MTT a formazan (sal de coloração roxa) (BOCHNIE, GREGÓRIO e MACIEL, 2016).

O ensaio de Sulforrodamina B (SRB) avalia a viabilidade através da habilidade do corante em se ligar a componentes protéicos das células (HOUGHTON et al., 2007).

5.9.1.1 Toxicidade dos polímeros na linhagem CALU-3

Os resultados de viabilidade celular determinados por meio do ensaio de MTT e SRB para a linhagem CALU-3 após os tratamentos de 72 horas com os polímeros PCL e PEG bem como com a formulação sem fármaco (NCM-0) estão demonstrados nas Figuras 24 e 25 respectivamente.

FIGURA 24 - Efeito dos polímeros PCL e PEG e da formulação NCM-0 sobre células Calu-3 (72h). A viabilidade celular (%) foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT. A concentração da PCL e do PEG na formulação NCM-0 é equivalente à concentração dos polímeros puros. Os resultados são expressos com média e erro padrão da média, obtidos de 3-5 ensaios independentes, com $n=4$ por ensaio. Os símbolos * representam diferença significativa em relação ao controle obtida por análise de ANOVA uma via, seguida pelo teste POST-HOC de TUKEY (** $p < 0,0001$)

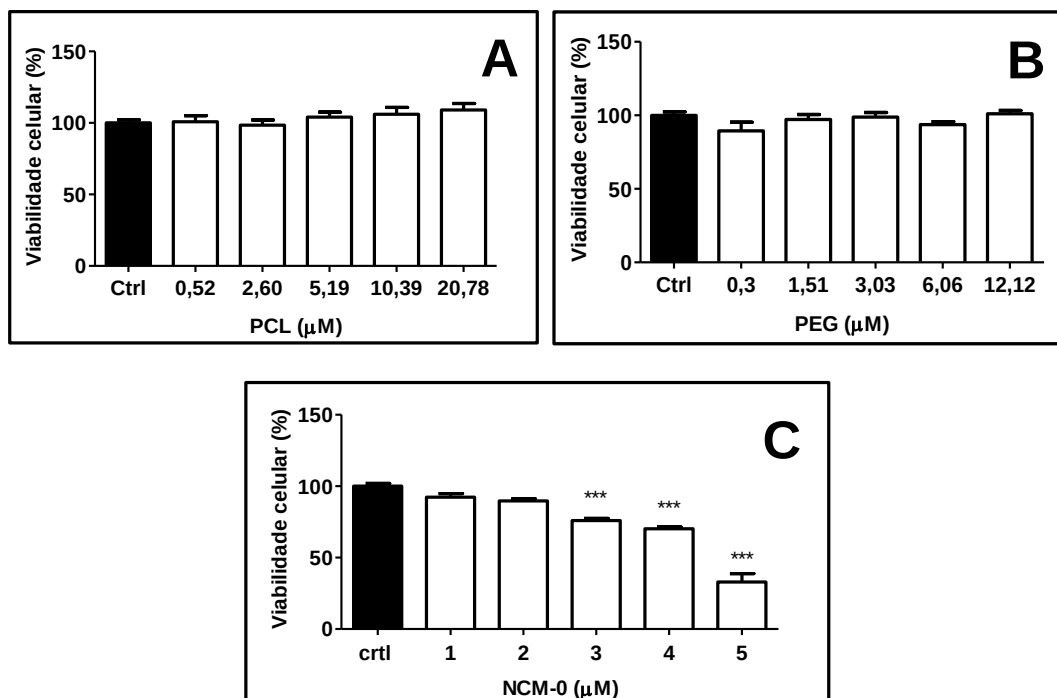
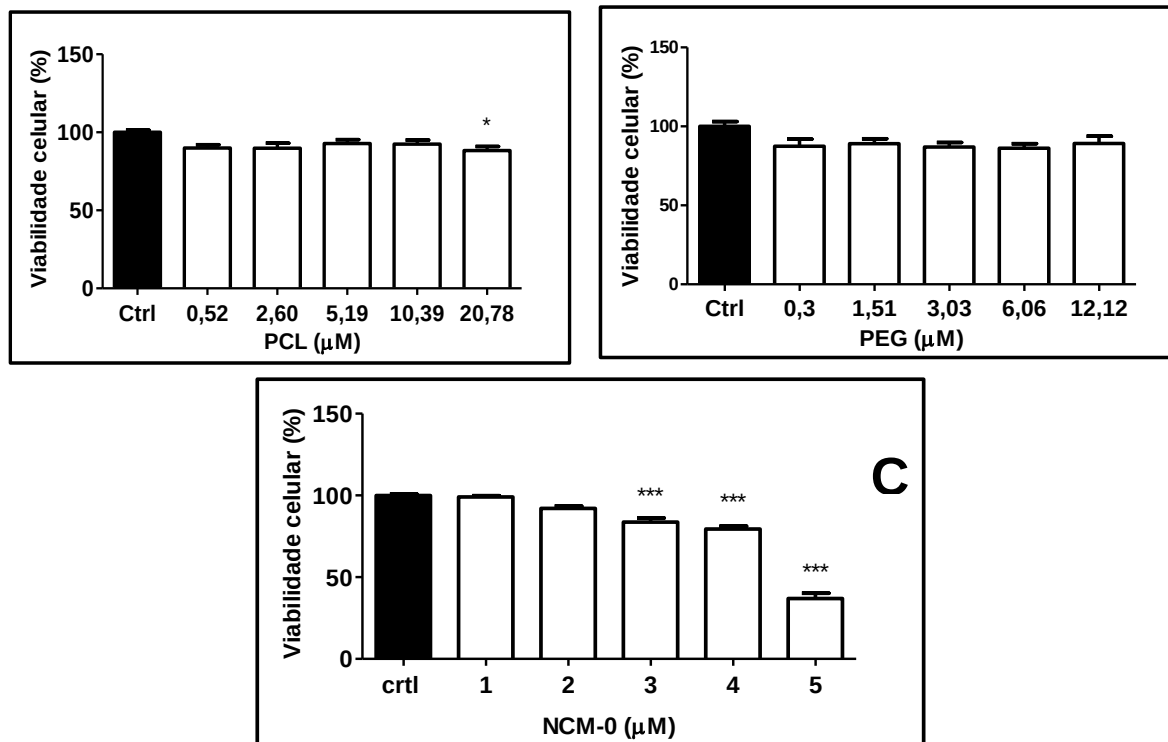


FIGURA 25 - Efeito dos polímeros PCL e PEG e da formulação NCM-0 sobre células Calu-3 (72h). A viabilidade celular (%) foi avaliada pelo ensaio de SRB. A concentração da PCL e do PEG na formulação NCM-0 é equivalente à concentração dos polímeros puros. Os resultados são expressos com média e erro padrão da média, obtidos de 3-5 ensaios independentes, com n=4 por ensaio. Os símbolos * representam diferença significativa em relação ao controle obtida por análise de ANOVA uma via, seguida pelo teste POST-HOC de TUKEY (* $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$)



Os polímeros puros, tanto PCL quanto PEG, não reduziram significativamente ($p > 0,05$) a viabilidade celular das células CALU-3 no período de 72 horas avaliadas por meio do ensaio de MTT. No entanto no ensaio de SRB, observou-se que o polímero PCL reduziu significativamente a viabilidade ($p < 0,05$) na concentração 20,78 μM . Quando os polímeros foram avaliados na formulação NCM-0 em concentrações equimolares aos puros houve diminuição significativa ($p < 0,0001$) da viabilidade celular nas concentrações 3,4 e 5, referente a 5,19:3,03 μM (PCL:PEG), 10,39:6,06 μM (PCL:PEG) e 20,78:12,12 μM (PCL:PEG), respectivamente, observadas em ambos os ensaios de viabilidade, ou seja, MTT e SRB.

Em um estudo realizado por Costa (2013) foi testada a citotoxicidade de nanoesferas e nanocápsulas poliméricas de PCL sem substância ativa. O trabalho foi realizado por meio da avaliação da viabilidade pelo teste de MTT em linfócitos humanos. Apenas quando uma grande concentração de nanopartículas (densidade populacional de $2,1 \times 10^{11}$ part/mL) é aplicada nas células é que se verifica uma porcentagem de viabilidade celular abaixo de 100% apresentando uma leve

toxicidade.

Em alguns estudos foi observado que quando nanopartículas de PCL sem substância ativa foram aplicadas aos fibroblastos, a viabilidade teve um aumento significativo ($p < 0,005$). Esse evento seria consequência da indução pela PCL, de uma estimulação da atividade mitocondrial (COSTA, 2013; SERRANO et. al., 2004). A PCL é considerada um polímero biodegradável, biocompatível e não tóxico (COSTA, 2013).

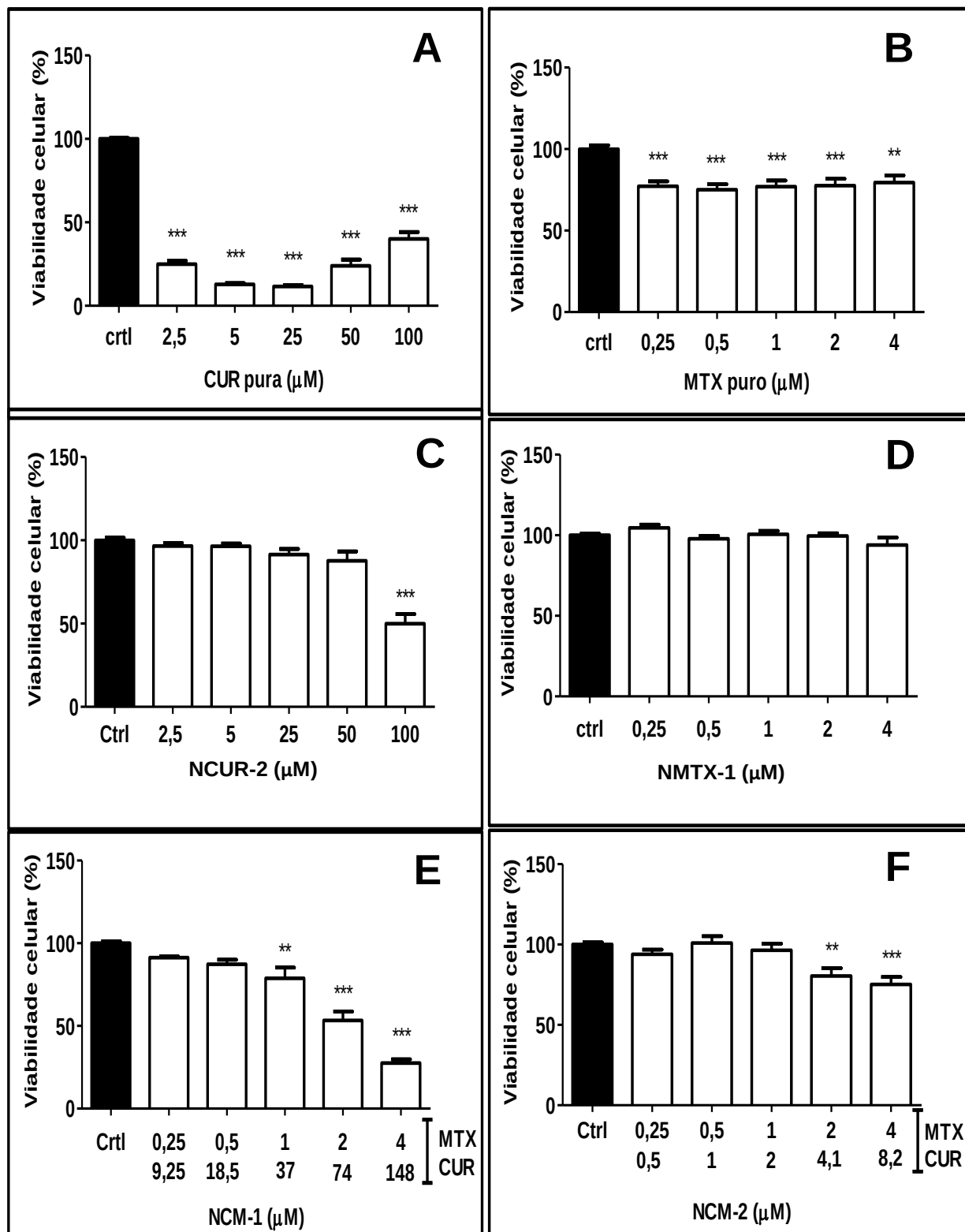
Mattos (2013) realizou um estudo de nanopartículas de PLA-PEG com 5-fluorouracil e não observou redução na viabilidade de células Hep-2 quando nanopartículas brancas (sem fármaco) foram avaliadas.

5.9.1.2 Toxicidade dos fármacos puros e formulações na linhagem CALU-3

A citotoxicidade dos fármacos puros e as formulações de nanocápsulas foram determinadas para a linhagem de células tumorais CALU-3 em tratamentos de 72 horas, sendo que a viabilidade foi avaliada pelos ensaios de redução MTT e SRB.

Os resultados de viabilidade celular obtidos pelo ensaio de redução de MTT com os fármacos puros e as nanocápsulas em diferentes concentrações estão representados na Figura 26.

FIGURA 26 - Efeito dos fármacos puros e nanocápsulas sobre células Calu-3 (72h). A viabilidade celular (%) foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT. Os resultados são expressos com média e erro padrão da média, obtidos de 3-7 ensaios independentes, com n=4 por ensaio. Os símbolos * representam diferença significativa em relação ao controle obtida por análise de ANOVA uma via, seguida pelo teste POST-HOC de TUKEY (*p<0,05, ** p<0,001, ***p<0,0001) A: CUR pura; B: MTX puro; C: NCUR-2; D: NMTX-1; E: NCM-1; F: NCM-2



Em todas as concentrações testadas a CUR pura (Figura 26 A) mostrou-se tóxica para a linhagem CALU-3 ($p < 0,0001$), porém em sua forma nanoencapsulada (Figura 26 C), nas mesmas concentrações, observou-se uma redução significativa na viabilidade ($p < 0,0001$) apenas para a maior concentração (100 μ M). Essa diferença pode se dar pelo fato do fármaco não estar em sua forma livre para agir nas células e sim nanoencapsulado.

Embora os resultados para a CUR pura se apresentem mais atraentes, a sua utilização na forma livre não caracteriza uma boa opção para sua utilização.

De fato, a CUR apresenta vários problemas referentes à sua utilização clínica devido às suas características de baixa solubilidade aquosa, baixa biodisponibilidade, rápido metabolismo hepático (SANTIAGO et. al., 2015), alta taxa de decomposição em pH neutro ou básico e susceptibilidade à degradação fotoquímica (NASCIMENTO, 2011). Quando administrada por via oral, via intraperitoneal ou intravenosa a CUR gera metabólitos inativos, ao que se refere à grande maioria das atividades biológicas (SANTIAGO et. al., 2015), desta forma inviabiliza seu uso em sua forma livre.

Assim, a CUR na forma nanoencapsulada se apresenta como uma estratégia viável e interessante ao ponto de vista terapêutico, uma vez que a nanoencapsulação pode minimizar estas características negativas decorrentes de sua estrutura, com propósito de aumentar sua atividade biológica, oferecer melhor permeabilidade, resistência aos processos metabólicos, melhorar sua absorção e biodisponibilidade (JARDIM, 2013).

Vários trabalhos comprovam a ação antitumoral da CUR frente a diferentes linhagens de células tumorais.

Dhanasekaran et al. (2013) avaliaram o efeito da CUR na viabilidade de células leucêmicas KG-1 empregando o ensaio de redução de MTT, onde a CUR gerou redução dose-dependente na viabilidade celular em diferentes tempos de exposição. Na concentração de 50 μ M em 24 horas a viabilidade (100%) foi reduzida para 57% e quando avaliada uma concentração de 100 μ M pelo período de 48 horas a viabilidade celular foi de apenas 20%.

Dey et al. (2016) avaliaram a citotoxicidade de nanocápsulas contendo CUR e MTX em células C6 e MCF-7 empregando o ensaio de redução do MTT. Os ensaios revelaram que ambas as células quando expostas a concentrações da CUR pura de 42 μ M pelo período de 24 horas, apresentaram redução da viabilidade de 30%.

Abbas et. al. (2014), observaram uma redução significativa ($p < 0,05$) na viabilidade de células CALU-1 quando expostas a uma concentração de $5 \mu\text{mol/L}$ de curcumina em um período de 24 horas de tratamento, quando avaliadas pelo ensaio de MTS.

Wang et. al. (2013) desenvolveram nanopartículas lipídicas sólidas com CUR e testaram em células NCL-41299 e A549. O IC_{50} para a linhagem NCL-41299 reduziu de $185 \mu\text{M}$ para $9 \mu\text{M}$ depois que a CUR foi nanoencapsulada, sendo observado o mesmo perfil de resposta para a linhagem A549, com uma redução de $78 \mu\text{M}$ para $4 \mu\text{M}$.

Resultados semelhantes foram descritos por Yallapu et. al. (2010) quando utilizaram as linhagens A2780CP e MDA-MB-231 frente às nanopartículas poliméricas contendo CUR, ou seja, observou-se redução do IC_{50} para as duas linhagens quando comparado ao fármaco puro.

Quando as células foram tratadas com MTX puro (Figura 26 B), observou-se uma redução significativa ($p < 0,0001$) na viabilidade celular da linhagem CALU-3, porém essa redução não foi dose-dependente, sendo mantido um perfil de morte com o aumento da concentração do fármaco. Para a formulação NMTX-1 (Figura 26 D) com concentrações equimolares ao fármaco puro, não foi observado redução significativa da viabilidade.

Relacionando o dado que o MTX é um substrato da gp P (CHOI, 2005, ZHU et al., 2014) e que a linhagem celular CALU-3 expressa baixos níveis dessa glicoproteína (HAMILTON et. al., 2001), pode-se considerar que o fármaco está sofrendo a ação da bomba de efluxo, apresentando baixo acúmulo intracelular sendo incapaz de levar a uma grande redução da viabilidade.

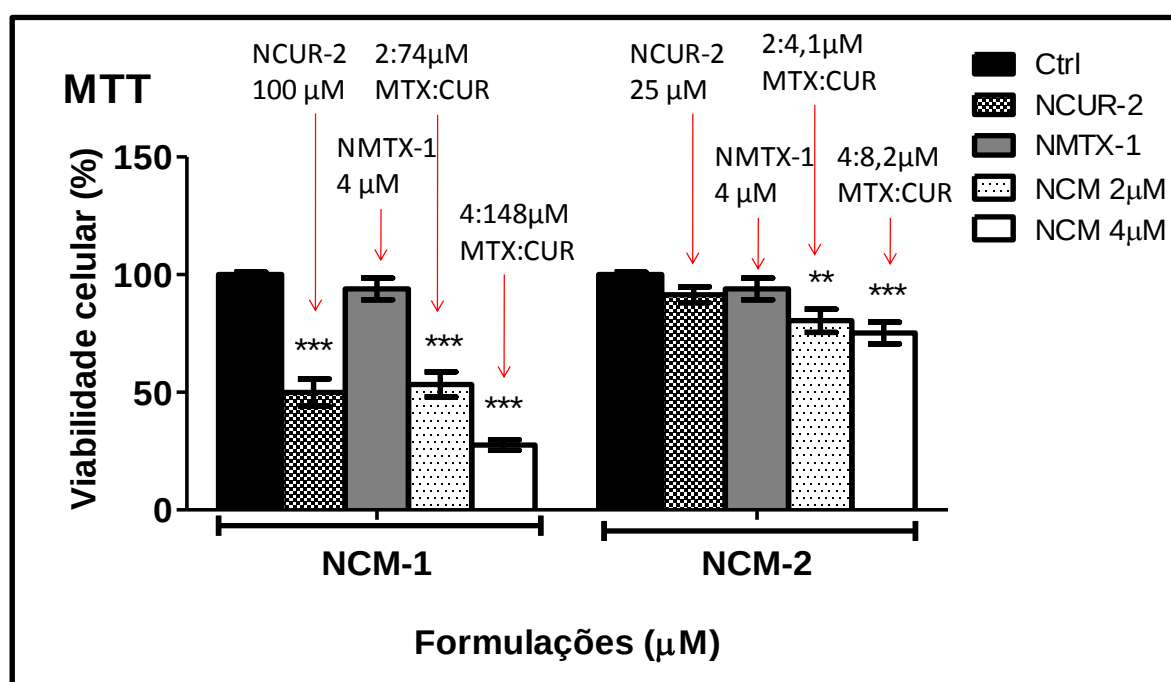
Semelhante à NCUR-2, o MTX na forma nanoencapsulada, tem reduzido, quando comparado com a forma livre, a sua capacidade de ação direta sobre as células após a exposição.

A Figura 26 (E e F) mostra o efeito de duas nanocápsulas contendo MTX e CUR em diferentes concentrações (NCM-1 e NCM-2) sobre células CALU-3. Quando avaliado o gráfico da formulação NCM-1 (Figura 26 E) nanocápsula contendo CUR e MTX, observa-se uma redução significativa nas concentrações 1, 2 e $4 \mu\text{M}$. Essas concentrações se referem ao MTX, sendo que a concentração de CUR nessa nanocápsula é de 37, 74, $148 \mu\text{M}$, respectivamente. Quando avaliado o gráfico da formulação NCM-2 (Figura 26 F), a viabilidade reduz significativamente nas

concentrações 2 ($p < 0,001$) e 4 ($p < 0,0001$). Nessa formulação as concentrações de MTX e CUR respectivamente são 2: 4,1 μM , e 4: 8,2 μM .

A figura 27 apresenta um gráfico comparativo das formulações de nanocápsulas contendo CUR e MTX (NCM-1 e NCM-2) com os respectivos controles NCUR-2 e NMTX-1.

FIGURA 27 - Gráfico comparativo das formulações NCUR-2, NMTX-1, NCM-1 e NCM-2 para o ensaio de redução do MTT para as células CALU-3. Os resultados são expressos com média e erro padrão da média, obtidos de 3-7 ensaios independentes, com $n=4$ por ensaio. Os símbolos * representam diferença significativa em relação ao controle obtida por análise de ANOVA uma via, seguida pelo teste POST-HOC de TUKEY (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$)



Ao comparar a formulação NCM-1 nas concentrações 2:74 μM MTX:CUR e 4:148 μM MTX:CUR com os controles NMTX-1 na concentração de 4 μM e NCUR-2 na concentração 100 μM nota-se que o MTX na forma nanoencapsulada, mesmo na maior concentração, não reduz a viabilidade celular. Desta forma, infere-se que a morte celular se dá pela alta concentração da CUR presente nas formulações, uma vez que o controle NCUR-2 na concentração de 100 μM *per se* gera uma redução da viabilidade em aproximadamente 50%.

No entanto, quando comparada a formulação NCM-2 nas concentrações 2:4,1 μM MTX:CUR e 4:8,2 μM MTX:CUR com os controles NCUR-2 na concentração de 25 μM e NMTX-1 de 4 μM observa-se que, a nanocápsula de MTX na concentração de 4 μM não reduz a viabilidade celular e a nanocápsula de CUR

25 μM também não se apresenta tóxica para a célula porém quando avaliados na nanocápsula contendo os dois fármacos (CUR e MTX) NCM-2 a viabilidade reduz significativamente ($p < 0,001$). Desta forma infere-se que a baixa concentração de CUR na formulação NCM-2 desempenha a função de inibidor da glicoproteína P permitindo que o MTX permaneça dentro da célula (sem efluxo) e desempenhe sua função antimetabólica/antitumoral.

Dey et.al. (2016) estudaram também nanopartículas combinando CUR e MTX. Os pesquisadores desenvolveram nanopartículas de ouro para o carreamento de CUR e MTX e utilizando as células C6 e MCF-7 para a avaliação destes nanocarreadores, relataram aumento da citotoxicidade quando comparadas aos fármacos puros. A maior redução da viabilidade celular para as duas linhagens foi observada com nanopartícula contendo 41 e 42 μM de MTX e CUR respectivamente.

Outro mecanismo que pode ser o responsável pelo aumento da citotoxicidade do MTX pela CUR é o aumento da expressão de receptores de folato (FR- do inglês *folate receptors*). FRs é um sistema de transporte que tem alta afinidade pelo folato e que é expresso em grande quantidade por células cancerígenas, importante para internalizar ácido fólico para o metabolismo e divisão celular. No entanto, MTX pode levar à resistência da célula para esse fármaco pela redução desse transportador (DHANASEKARAN et. al., 2013)

Um dos primeiros relatos de que a CUR aumenta a citotoxicidade do MTX através do aumento dos FRs se deu em 2013 por Dhanasekaran e colaboradores. Nesse estudo a linhagem leucêmica KG-1 foi utilizada para avaliar o efeito da CUR no aumento da expressão dos FRs e maior internalização do MTX. Tratando previamente as células com concentrações não tóxicas de CUR (10 e 25 μM) observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) da entrada de MTX. Baseado nessa informação, os autores comprovaram que a combinação da administração de CUR com baixas doses de MTX (50 nM) pode ser uma estratégia promissora para o tratamento da leucemia, reduzindo os efeitos tóxicos associados ao uso do MTX (DHANASEKARAN, et. al., 2013).

O efeito sinérgico de dois agentes antineoplásicos apresenta uma estratégia viável para o tratamento de pacientes com câncer visando uma melhor resposta terapêutica em associação à redução de efeitos colaterais implicados pelas altas concentrações dos fármacos (DEY et al., 2016).

Os resultados de citotoxicidade obtidos pelo ensaio de redução do MTT foram corroborados pelo ensaio por SRB. A viabilidade celular de CALU-3 para os fármacos puros e formulações, bem como o gráfico comparativo das formulações estão apresentados nas Figuras 28 e 29 respectivamente. O ensaio empregando SRB foi realizado seguindo as mesmas formulações e concentrações do ensaio de MTT.

FIGURA 28 - Efeito dos fármacos puros e nanocápsulas sobre células Calu-3 (72h). A viabilidade celular (%) foi avaliada pelo ensaio de SRB. Os resultados são expressos com média e erro padrão da média, obtidos de 3-7 ensaios independentes, com n=4 por ensaio. Os símbolos * representam diferença significativa em relação ao controle obtida por análise de ANOVA uma via, seguida pelo teste POST-HOC de TUKEY (*p<0,05, ** p<0,001, ***p<0,0001) A: CUR pura; B: MTX puro; C: NCUR-2; D: NMTX-1; E: NCM-1; F: NCM-2

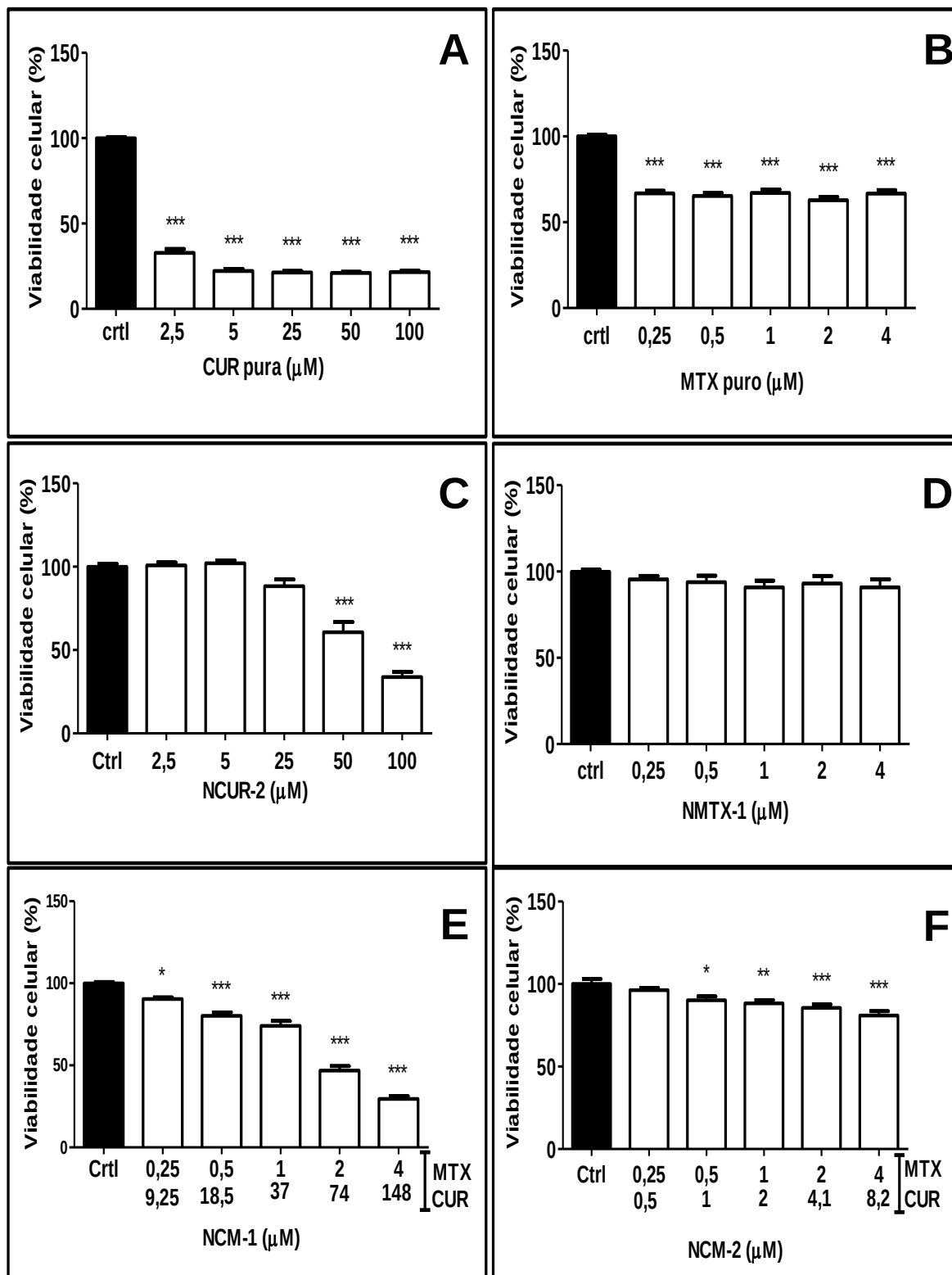
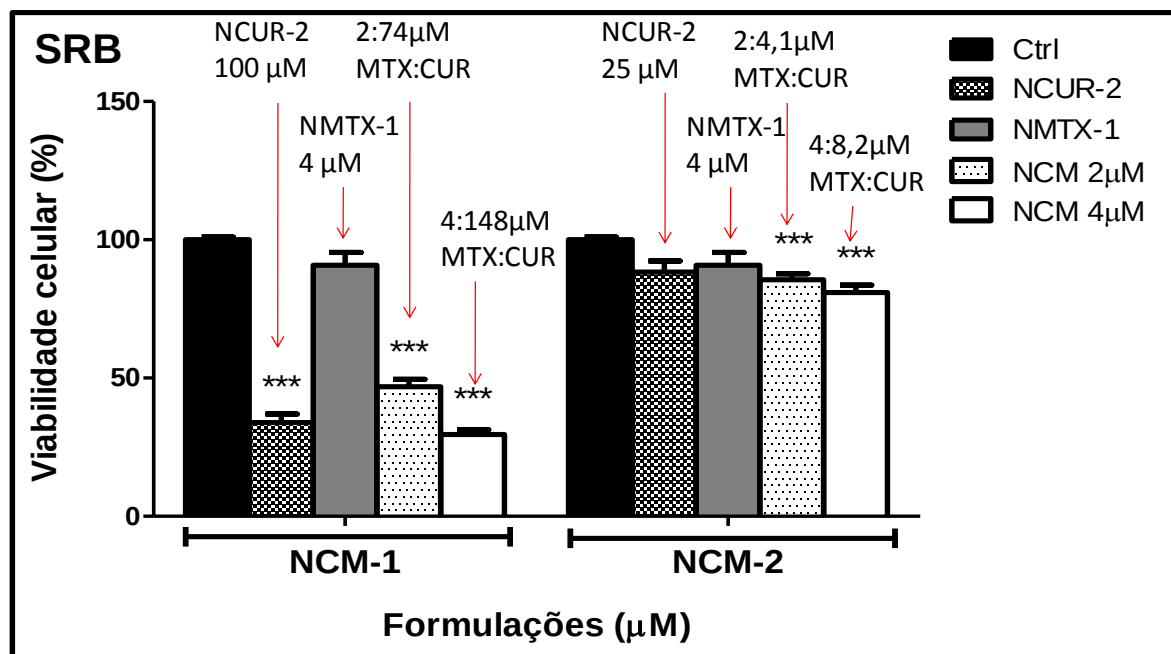


FIGURA 29 - Gráfico comparativo das formulações NCUR-2, NMTX-1, NCM-1 e NCM-2 para o ensaio de SRB para as células CALU-3. Os resultados são expressos com média e erro padrão da média, obtidos de 3-7 ensaios independentes, com n=4 por ensaio. Os símbolos * representam diferença significativa em relação ao controle obtida por análise de ANOVA uma via, seguida pelo teste POST-HOC de TUKEY (*p<0,05, ** p<0,001, ***p<0,0001)



Como mencionado os resultados da SRB corroboram com os resultados do MTT, com o mesmo perfil de resposta. As diferenças observadas, em especial concernentes às diferenças estatísticas serem observadas em menores concentrações quando comparadas ao ensaio de redução do MTT, se dão em decorrência da técnica de SRB apresentar-se mais sensível ao parâmetro avaliado para relatar a viabilidade celular.

A linhagem em estudo é uma célula que cresce em adesão e o ensaio de SRB cora apenas proteínas de células que permanecem aderidas ao poço na placa de cultivo. Por essa razão a técnica acaba tendo uma maior sensibilidade em comparação ao ensaio de redução de MTT, que se baseia na atividade mitocondrial da célula, que poderiam estar exacerbadas em face da indução do processo de morte celular.

5.9.1.3 Toxicidade das formulações na linhagem 3T3

As formulações NCUR-2, NMTX-1 e NCM-2 foram testadas na linhagem de fibroblastos 3T3, a fim de verificar e estabelecer a citotoxicidade dessas

nanopartículas sobre a viabilidade de células normais. Cumpre salientar que como a formulação NCM-2 mostrou-se mais interessante pelo efeito sinérgico dos dois fármacos, optou-se por avaliar somente essa formulação contendo CUR e MTX na linhagem de células normais e, por conseguinte seus respectivos controles NCUR-2, NMTX-1.

Os resultados para os ensaios de redução de MTT e SRB estão mostrados nas figuras 30 e 31 respectivamente.

FIGURA 30 - Efeito das formulações NCUR-2, NMTX-1 e NCM-2 na viabilidade celular de 3T3 avaliadas no período de 72 horas pelo ensaio de redução do MTT. Os resultados são expressos com média e erro padrão da média, obtidos de 4 ensaios independentes, com $n=4$ por ensaio. Os símbolos * representam diferença significativa em relação ao controle obtida por análise de ANOVA uma via, seguida pelo teste POST-HOC de TUKEY (* $p<0,05$, ** $p<0,001$, *** $p<0,0001$)

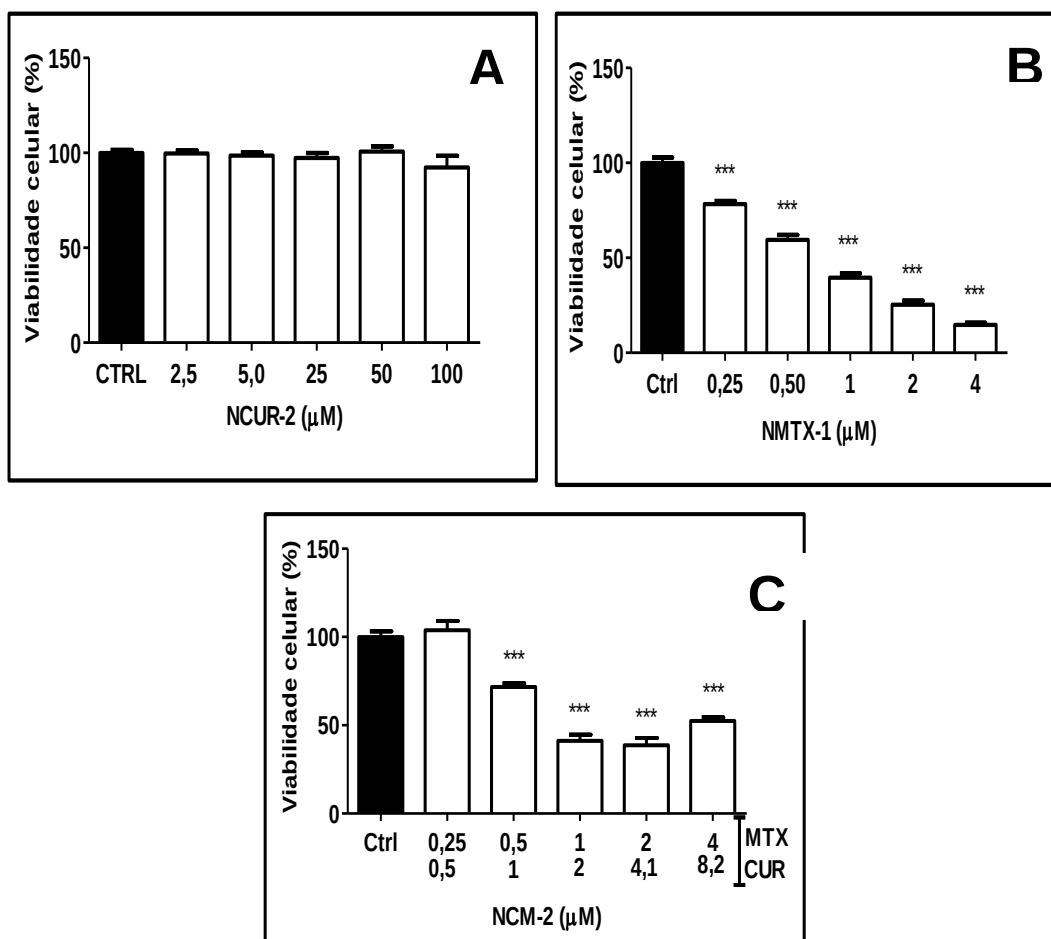
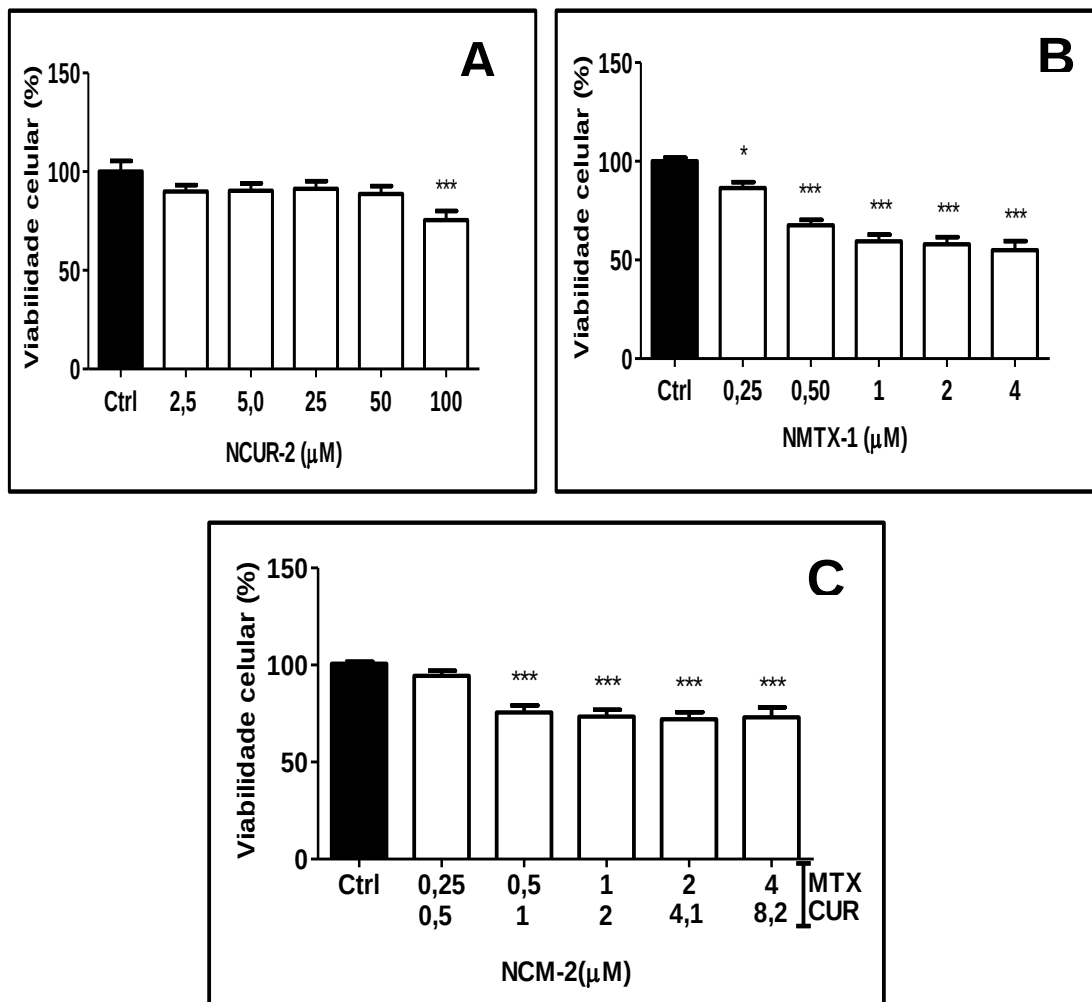


FIGURA 31 - Efeito das formulações NCUR-2, NMTX-1 e NCM-2 na viabilidade celular de 3T3 avaliadas no período de 72 horas pelo ensaio de SRB. Os resultados são expressos com média e erro padrão da média, obtidos de 4 ensaios independentes, com $n=4$ por ensaio. Os símbolos * representam diferença significativa em relação ao controle obtida por análise de ANOVA uma via, seguida pelo teste POST-HOC de TUKEY (* $p<0,05$, ** $p<0,001$, *** $p<0,0001$)



No ensaio em que se avaliou a viabilidade celular por redução do MTT a NCUR-2 (Figura 30 A) não apresentou nenhuma toxicidade às células 3T3, porém a mesma formulação mostrou uma redução significativa ($p<0,0001$) na viabilidade celular na maior concentração ($100\mu\text{M}$) quando avaliada pelo ensaio de SRB (Figura 31 A).

A redução da viabilidade celular observada no ensaio de SRB, técnica que se demonstra ser mais sensível, pode ser explicada pela presença de algum produto tóxico da degradação da CUR, uma vez que ela apresenta susceptibilidade à degradação fotoquímica e foi empregada em alta concentração (NASCIMENTO, 2011).

A viabilidade celular de 3T3 avaliadas após tratamentos com as

concentrações 2,5; 5; 25 e 50 μM da NCUR-2 não se alteraram, conforme mostrado tanto para o ensaio de redução de MTT quanto para o SRB, sugerindo que nessas concentrações testadas o composto não foi tóxico para a célula.

Cheng et. al. (2001) relataram em uma revisão que, em 25 estudos, nenhuma toxicidade para a CUR foi reportada, quando administrada oralmente em animais e humanos, com uma dose de até 8 gramas por dia durante 3 meses.

Em um estudo realizado por Addala (2014) a CUR foi testada nas linhagens de células de câncer de cólon HCT-116 e células normais de epitélio de cólon CRL-1790 quanto à efeitos na viabilidade celular, empregando-se o ensaio de SRB, bem como o índice de seletividade calculado. A CUR apresentou um índice de seletividade de 16,75, mostrando-se mais seletiva para as células tumorais. Cabe comentar que o índice de seletividade consiste na razão entre a concentração citotóxica 50% (CC_{50}) para células normais e IC_{50} para células tumorais.

A partir dos resultados apresentados pode-se inferir que a CUR apresentou-se mais seletiva às células tumorais CALU-3 às normais 3T3, porém esse resultado só pode ser confirmado com o teste de seletividade.

Os resultados para a formulação NMTX-1 para o ensaio de MTT (Figura 30 B) e para o ensaio de SRB (Figura 31 B) mostram que houve uma redução significativa ($p < 0,0001$) para todas as concentrações testadas de MTX na forma nanoencapsulada.

Os resultados corroboram com a literatura, pois o MTX é um fármaco citotóxico e antimetabólito. Como não é um fármaco seletivo para células tumorais, acaba atingindo as células normais e então provoca os efeitos colaterais associados ao seu uso no tratamento quimioterápico, e como células normais não expressam a gp P não dobre o efluxo pela bomba e exibe um perfil de morte dose-dependente.

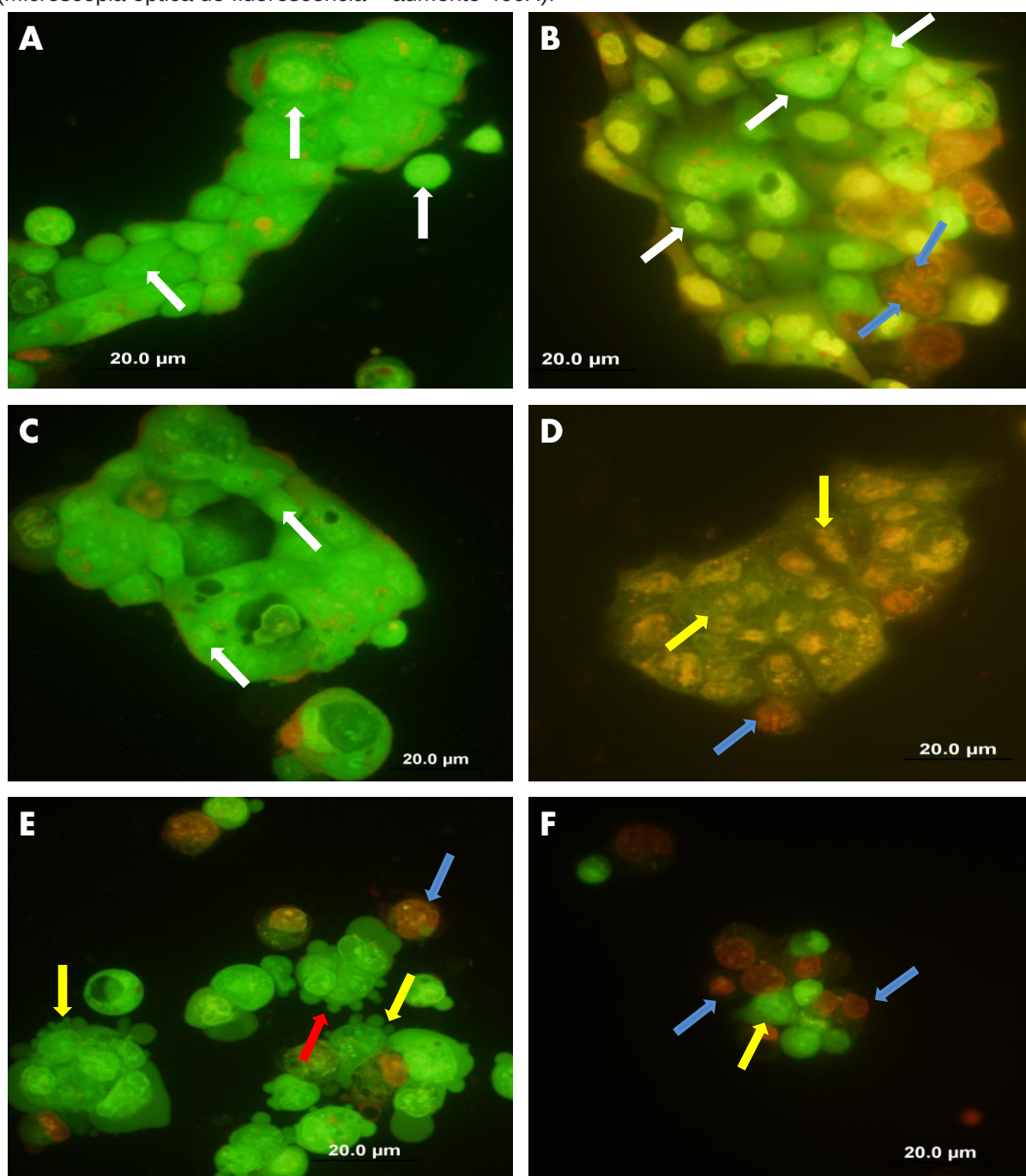
Resultados semelhantes foram observados para a formulação NCM-2 (Figuras 30 C e 31 C) onde houve redução significativa da viabilidade ($p < 0,0001$) sendo atribuída à concentração de MTX na formulação, uma vez que a concentração de CUR presente não é tóxica para a célula testada.

5.9.2 Avaliação morfológica celular de CALU-3 por meio do emprego dos corantes alaranjado de acridina e brometo de etídio (AO/BE)

Após o tratamento de 24 horas com as formulações NCM-0 (20,78: 12,12 μM

PCL:PEG), NCUR-2 (25 μ M), NMTX-1 (4 μ M), NCM-2 (4:8,2 μ M e 8:16,4 μ M MTX:CUR) as células foram coradas com AO e BE e observadas por microscopia óptica de fluorescência. O efeito citotóxico referente ao mecanismo de ação das formulações pode ser observado na Figura 32.

FIGURA 32: Efeito das nanopartículas sobre a morfologia das células CALU-3 coradas com alaranjado de acridina e brometo de etídio. O controle apenas com meio está demonstrado em (A) e em (B) o controle NCM-0 (20,76: 12,12 μ M PCL:PEG). Células tratadas por 24 horas com a formulação NCUR-2 25 μ M (C), NMTX-1 4 μ M (D), NCM-2 4:8,2 μ M MTX:CUR (E) e NMC-2 8:16,4 μ M MTX:CUR (F). As setas brancas indicam células viáveis, as setas de cor amarela indicam apoptose inicial, de cor azul indicam células em apoptose tardia e setas vermelha indicam os *blebs*. (Microscopia óptica de fluorescência – aumento 400X).



Segundo Ribble e colaboradores (2005) juntamente com os autores Navanesan et al. (2015) a condensação da cromatina e fragmentação nuclear são as principais características de células em apoptose. Segundo os autores com o ensaio de AO/BE, o índice apoptótico e a integridade da membrana celular podem ser avaliados ao mesmo tempo. Em células normais AO permeia todas as células e faz com que os núcleos apareçam em verde. O BE é permeável a membrana celular quando as células perderam a integridade e, portanto cora o núcleo de vermelho. Assim, as células vivas têm um núcleo verde normal; células nos primeiros estágios apoptóticos têm núcleo verde-claro com cromatina condensada ou fragmentada; células apoptóticas tardias exibem cromatina condensada e fragmentada na coloração laranja; células que morreram de necrose direta apresentam um núcleo laranja estruturalmente normal.

Na Figura 32, no aumento de 400X, observamos em A, células controle viáveis com coloração verde e núcleos normais, que apresentam cromatina com estruturas organizadas. Em B células controle tratadas com a formulação NCM-0 (20, 78: 12,12 μ M PCL:PEG) com presença de células viáveis e baixa proporção de células em apoptose tardia. Em C células tratadas com a formulação NCUR-2 25 μ M, com predomínio de células viáveis. Em D células tratadas com a formulação NMTX-1 4 μ M, com células viáveis e em apoptose inicial, em E células tratadas com a formulação NCM-10 com 4:8,2 μ M MTX:CUR com predominância de células em apoptose inicial com a presença de *blebs* e em F células tratadas com 8:16,4 μ M MTX:CUR onde observa-se menor número de células predominando apoptose inicial e tardia.

Tais resultados respaldam a utilização da formulação contendo os dois fármacos (CUR e MTX) com efetividade para células CALU-3. De fato, em relação ao tratamento do câncer, duas características são relevantes para efetividade de um fármaco: primeiramente este deve ser altamente seletivo em relação às células cancerosas e ineficazes em relação às células normais e devem possuir a capacidade de agir contra células resistentes aos fármacos.

6 CONCLUSÃO

- As nanopartículas contendo CUR e MTX foram obtidas com sucesso, utilizando os polímeros PCL e PEG 6000, por deposição interfacial do polímero pré-formado;
- O método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência desenvolvido foi válido para quantificação da CUR e MTX, sendo um método específico, linear, preciso, exato e robusto;
- As nanopartículas avaliadas por MEV-FEG apresentaram boa morfologia, com formato esférico, escala nanométrica e sem presença de cristais dos fármacos livres;
- Todas as formulações geraram nanopartículas de pH, tamanho, potencial zeta e índice de polidispersão adequados;
- A formação das nanopartículas não alterou quimicamente as estruturas dos componentes iniciais verificados na análise dos espectros de FTIR;
- O processo de obtenção das nanopartículas promoveu a amorfização dos fármacos, comprovado pelas análises de DRX e DSC;
- Os ensaios efetuados por DSC demonstraram que os fármacos (CUR e MTX) estão fisicamente dispersos nos materiais poliméricos;
- Os valores de potencial zeta demonstraram boa estabilidade das formulações após 60 dias do preparo;
- A redução significativa da viabilidade celular da linhagem CALU-3 pelos testes de MTT e SRB, mostram uma sinergia dos dois fármacos na formulação NCM-2, quando comparada com as formulações de nanopartículas contendo apenas MTX ou apenas CUR em concentrações próximas;
- A análise morfológica por fluorescência para evidenciar o padrão de morte celular, empregando-se os corantes alaranjado de acridina e brometo de etídeo mostraram predominância de apoptose inicial e tardia para a formulação NCM-2, contendo CUR e MTX.

REFERÊNCIAS

- ADDALA, E. ***In vitro* studies using curcumin and curcumin analogues as candidate mitochondria-targeting anticancer agents affecting colon cancer cells.** College of Pharmacy and Nutrition University of Saskatchewan Saskatoon, Saskatchewan, Canada, Tese de doutorado, 2014.
- AJMAL, M., et al. **Synthesis, characterization and *in vitro* evaluation of methotrexate conjugated fluorescent carbon nanoparticles as drug delivery system for human lung cancer targeting.** Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology, Paquistão, 153, p.111-120, 2015.
- AMERICAN CANCER SOCIETY, **Lung Cancer (Non-Small Cell)**, 2014.
- ANABOUSI, V.S. **Liposomal Drug Carrier Systems for Inhalation Treatment of Lung Cancer.** Tese de doutorado. Universidade de Saarland, Saarbrücken, 2006.
- ANATOLE, P. C. et al. **Ethyl acetate fraction of *Garcinia epunctata* induces apoptosis in human promyelocytic cells (HL-60) through the ROS generation and G0/G1 cell cycle arrest: A bioassay-guided approach.** Environmental Toxicology and Pharmacology, 2013.
- ARAÚJO, C.A.C.; LEON, L.L. **Biological Activities of *Curcuma longa* L.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Brasil, vol. 96(5), p. 723-728, July 2001.
- ATCC. **CALU-3.** Disponível em: <http://www.atcc.org/Products/All/HTB-55.aspx>. Acesso em 02 jul 2015.
- ATCC. **NCI- H292.** Disponível em: <http://www.atcc.org/Products/All/CRL-1848.aspx>. Acesso em 02 jul 2015.
- AVADI, M. R. et al. **Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method.** Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. v. 6. p. 58–63. 2010.
- AZEREDO, F.J.; UCHÔA, F.D.T.; COSTA, T.D. **Papel da Glicoproteína-P na Farmacocinética e nas Interações Medicamentosas.** Revista Brasileira de Farmácia, Porto Alegre, 90(4), p. 321-326, 2009.
- BAGULEY, B.C. **Multiple Drug Resistance Mechanisms in Cancer.** Mol. Biotechnol, Auckland, New Zealand, 2010.
- BATISTA, C.M.; CARVALHO, C.M.B.; MAGALHÃES, N.S.S. **Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, Pernambuco, Brasil, vol. 43, nº 2, abr/jun, 2007.
- BISWAL, S., et al. **Enhancement of Dissolution Rate of Gliclazide Using Solid Dispersions with Polyethylene Glycol 6000.** AAPS PharmSciTech; v.9 n.2, p. 563–570. Jun., 2008.

BOCHNIE, K.A.; GREGÓRIO, P.C.; MACIEL, R.A.P. **Análise da viabilidade celular por MTT em células tratadas com toxinas urêmicas – Revisão**. Unibrasil Centro Universitário, Cadernos da Escola de Saúde, Curitiba, vol. 1, nº 15, p. 42-51, 2016.

BRASIL, Ministério da Saúde, **Secretaria de Atenção à Saúde**, portaria 600 de 26 de junho de 2012.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Atlas de Mortalidade por Câncer**, Instituto Nacional de Câncer, 2014.

BRITO, N.M., et al. **Validação de métodos analíticos: Estratégia e Discussão**. Pesticidas: R. Ecotoxicol e Meio Ambiente, Curitiba, Brasil, vol. 13, p. 129-146, jan/dez 2003.

BUONANNO, G., et al. **Do air quality targets really represent safe limits for lung cancer risk?** Science of the Total Environment, 2017.

CALVO, P.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. **Comparative *in vitro* evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules and nanoemulsions, as ocular drug carriers**. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1996.

CHAN, L.M.S.; LOWES, S., HIRST, B.H. **The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability**. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v.21, p. 25– 51, 2004.

CHASSOT, J. M., et al. **Beclomethasone Dipropionate-Loaded Polymeric Nanocapsules: Development, In Vitro Cytotoxicity, and *In Vivo* Evaluation of Acute Lung Injury**. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, Brasil, vol. 14, p. 1-10, 2014.

CHEARWAE, W., et al. **Biochemical mechanism of modulation of human P-glycoprotein (ABCB1) by curcumin I, II and III purified from Turmeric powder**. Biochemical Pharmacology, 68, p. 2043-2052, 2004.

CHEREDDY, K. K., et al. **Combined effect of PLGA and curcumin on wound healing activity**. Journal of Controlled Release, 171, p. 208-2215, 2013.

CHENG, A. L., et al. **Phase-I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions**. Anticancer Res., 21, 2895 – 2900, 2001.

CHOI, C.H. **ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal**. Cancer Cell International, vol. 5: 30, 2005.

CODEVILLA, F., et al. **Incorporação da curcumina em sistemas nanoestruturados: Revisão**. Ciência e Natura, Brasil, 2015.

COSTA, A. D. A da. **Avaliação da citotoxicidade de diferentes nanotransportadores sem substância ativa em função da sua densidade**

populacional. Instituto Politécnico de Bragança, Dissertação de mestrado, 2013.

CRISSMAN H.A., STEINKAMP J.A. **Rapid simultaneous measurement of DNA, protein and cell volume in single cells from large mammalian cell populations.** Journal Cell Biology, 1973.

DHANASEKARAN, S., et al. **Augmented sensitivity to methotrexate bu curcumin induced overexpression of folate receptor in KG-1 cells.** Biochimie, Índia, 95, p. 1567-1573, 2013.

DANHIER, F., et al. **PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications.** Journal of Controlled Release, 2012.

DEY, S., et al. **Alginate stabilized gold nanoparticle as multidrug Carrier: Evaluation of cellular interactions and hemolytic potencial.** Carbohydrate Polymers, Índia, 136, p.71-80, 2016.

DIAS, J.A.C. **Nanopartículas poliméricas com aplicação na administração pulmonar de proteínas.** Dissertação de mestrado. Universidade do Algarve, Faro, 2013.

DURÁN, N.; MATOSSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. **Nanotecnologia, introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**, 1.ed. São Paulo: Artliber, 2006, p. 161-164.

FENG, R.; SONG, Z.; ZHAI, G. **Preparation and in vivo pharmacokinetics of curcumin-loaded PCL-PEG-PCL triblock copolymeric nanoparticle.** International Journal of Nanomedicine, China, 7, p. 4089-4098, 2012.

FESSI, H.; PUISIEUX, J.P Devissaguet. **European Patent.** 0274961 A1. 1988.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia.** São Paulo, Pharmabooks, edição 2, cap. 8, p.438-439, 2011.

FUGITA, R.A. **Estudo e caracterização térmica da curcumina e de uma forma polimórfica.** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Bauru, Brasil, Trabalho de conclusão de curso, 2011.

GARCIA, M.C. **Micropartículas de metotrexato e ácido poli lático-co-glicólico obtidas por “Spray-drying”.** Universidade Estadual Paulista, Araraquara, Dissertação de mestrado, 2014.

GENNARO, A.R. **Remington: a ciência e a prática da farmácia.** Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, vol. 3, edição 20, p. 1559, 2012.

GUPTA, R. B.; KOMPELLA, U. B. **Nanoparticles Technology for Drug Delivery.** Taylor & Francis Group. New York, v. 159, 2006.

HAMILTON, K. O., et al. **P-Glycoprotein Eflux Pump Expression and Activity in Calu-3 Cells.** Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 90, nº5, p. 647-658, 2001.

HOIDY, W.H., et al. **Preparation and Characterization of Polylactic Acid/Polycaprolactone Clay Nanocomposites**. Journal of Applied Sciences. v. 10, nº 2, p. 97-106, 2010.

HOOFT VAN HUIJSDUIJNEN, R., et al. **Anticancer Properties of Distinct Antimalarial Drug Classes**, 2013.

HOUGHTON P., et al. **The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity**. Methods, 42 (4), p. 377-87, 2007.

HU, L., et. al. **Evaluation of High-Performance Curcumin Nanocrystals for Pulmonary Drug Delivery Both *In Vitro* and *In Vivo***. Nanoscale Research Letters, 10:381, 2015.

HUBER, P. C; MARUIAMA,H; ALMEIDA, W.P. **Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores**. Química Nova, Campinas, Brasil, vol. 33, nº 10, p. 2148-2154, 2010.

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

INCA. **Carcinoma de pequenas células de pulmão**. Revista Brasileira de Cancerologia, Brasil, 2003.

INCA. **Carcinoma de Pulmão de Células não Pequenas**. Revista Brasileira de Cancerologia, Brasil, 2002.

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**. Universidade de Brasília, Brasília, Dissertação de mestrado, 2013.

KANUNFRE,C.C.**Efeitos dos agonistas dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma alfa e gama em células jurkat (linfócito t) e raji (linfócito b)**. Tese de Doutorado – Curso de Ciências Biológicas – Fisiologia Humana, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

KHALIL, N.M., et. al. **Pharmacokinetics of curcumin-loaded PLGA and PLGA-PEG blend nanoparticles after oral administration in rats**. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Guarapuava, Brasil, 101, p. 353-360, 2013.

KRISHAN A. **Rapid flow cytofluorometric analysis of cell cycle by propidium iodide staining**. Journal Cell Biology, 1975.

KÜLKAMP, I., et al. **Estabilização do ácido lipoico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea**. Quím. Nova, São Paulo, v. 32, n. 8, 2009.

KUMARI, A.; YADAV, S.K.; YADAV, S.C. **Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems**. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, India, 2010.

LOPES, W.A.; FASCIO, M. **Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho**. Química Nova, Salvador, vol. 27, nº 4, p. 670-673, 2004.

MAINARDES, R.B. **Desenvolvimento de nanopartículas de PLA e PLA-PEG para administração intranasal de zidovudina**. Universidade Estadual Paulista, Araraquara, Brasil, Tese de doutorado, 2007.

MARCATO, P.D. **Preparação, Caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas**. Revista Eletrônica de Farmácia, vol. 6, nº 2, 2009.

MARCHETTI, S., et al. **Clinical relevance of drug–drug and herb–drug interactions mediated by the ABC transporter ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein)**. The Oncologist, v.12, p. 927- 941, 2007.

MASSIMINO, L.C.; YOSHIOKA, S.A. **Nanopartículas de curcumina para liberação controlada**. 13º Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Órgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos-SLABO, Foz do Iguaçu, Brasil, 2016.

MATTOS, A.C.de. **Desenvolvimento tecnológico de nanopartículas de pla e pla-peg contendo 5-fluorouracil, avaliação da citotoxicidade sobre células tumorais e farmacocinética pré-clínica**. Unicentro, Guarapuava, Dissertação de mestrado, 2013.

MENDES, L.P. **Sistemas nanoestruturados multicompartimentais para coencapsulação e liberação controlada de paclitaxel e genisteína: desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade antitumoral *in vivo***. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

MEZZALIRA, G. **Caracterização de suspensões de nanopartículas poliméricas estudadas como carreadores de fármacos através de técnicas de espalhamento de luz e de raios-X a baixo ângulo**. Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCR. COORDENAÇÃO NACIONAL DE CONTROLE DE TABAGISMO-CONTAPP. **Falando sobre câncer e seus fatores de risco**. Rio de Janeiro, 1996.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays**. Journal Immunology, 1983.

NAGAMINE, M.K. **Efeitos dos extratos etanólico, butanólico ou aquoso de *pfaffia paniculata* sobre a proliferação de linhagens tumorais de células mamárias**. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

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

NASCIMENTO, T. C. F. **Desenvolvimento e avaliação farmacocinética de nanopartículas de plga e plga-peg contendo curcumina.** Dissertação de mestrado. UNICENTRO, Brasil, 2011.

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, Brasil, 8, p. 324-333, 2012.

NEVES, A. R., et al. **Novel resveratrol nanodelivery systems based on lipid nanoparticles to enhance its oral bioavailability.** International Journal of Nanomedicine, v. 8, p. 177-187, 2013.

NOGUEIRA, D. R., et al. ***In vitro* antitumor activity of methotrexate via pH sensitive chitosan Nanoparticles.** Biomaterials, 34, p. 2758-2772, 2013.

OLIVEIRA, A.R.de. **Micropartículas de poli(ácido láctico co-ácido glicólico) obtidas por “Spray Drying” para a liberação prolongada de metotrexato.** Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2011.

PAIVA, D.L. et al. **Introdução à Espectroscopia.** 4º ed. Cengage Learning, São Paulo, 2012.

PAPAZISIS, K.T. et al. **Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay.** Journal Immunology Methods v. 1997.

RAMSEWAK, R. S.; WITT, D.L.DE.; NAIR, M.G. **Cytotoxicity, antioxidant and antiinflammatory activities of Curcumins I-III from Curcuma longa.** Phytomedicine, USA, vol 7(4), p. 303-308, 2000.

REIS, A.C.B.P. **Encapsulação de Fármacos Peptídicos pelo método de emulsificação/gelificação interna.** Tese de Doutorado, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2007.

RESTANI, R.B., et al. **Development of functional mesoporus microparticles for controlled drug delivery.** Journal of Supercritical Fluids, Portugal, 55, p. 333-339, 2010.

RUBINO, F.M. **Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites.** Journal of Chromatography B, Milão, Itália, 764, p. 217-254, 2001.

SANDUR, S. K., et al. **Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism.** Carcinogenesis, USA, vol. 28, nº 8, p. 1765-1773, 2007.

SANTIAGO, V.S., et al. **Curcumina, o Pó Dourado do Açafrão-Da-Terra: Introspecções Sobre Química e Atividades Biológicas**. Química Nova, Brasil, vol. 38, nº 4, p.538-552, 2015.

SARTORI, T. **Preparação e caracterização de nanopartículas contendo metotrexato. Avaliação da estabilidade e viabilidade do tecido corneal após administração tópica ocular**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2007.

SCHAFFAZICK, S.R; GUTERRES, S.S. **Caracterização e Estabilidade Físico-Química de Sistemas Poliméricos Nanoparticulados para Administração de Fármacos**. Química Nova, Brasil, vol. 26, nº 5, p. 726-737, 2003.

SEGALLA, J.G.M., et al. **Quimioterapia no Câncer de Pulmão não de Pequenas Células**. Revista Brasileira de Oncologia Clínica, Brasil, vol.1, nº 4, jan/abril, 2005.

SERRANO M.C., et al. **In vitro biocompatibility assessment of poly(ϵ -caprolactone) films using L 929 mouse fibroblast.**, Biomaterials, Espanha, 2004.

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

SHEHZAD, A., et al. **Curcumin Induces Apoptosis in Human Colorectal Carcinoma (HCT-15) Cells by Regulating Expression of Prp4 and p53**. Molecules and Cells, Korea, 35, p. 526-532, June 30, 2013.

SILVA, A.A. **Preparação e caracterização de granulados contendo dispersão sólida de praziquantel obtidos por fusão/solidificação em leito fluidizado**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, Brasil, 2008.

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, Campina Grande, Brasil, vol. 10, nº 1, p. 21-28, 2015.

SILVA, M.C., et al. **Avaliação do método de obtenção de scaffolds quitosana/curcumina sobre a estrutura, morfologia e propriedades térmicas**. Revista Matéria, Paraíba, 2016.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. LTC- Livros Técnicos e Científicos Editora S.A, Rio de Janeiro, 2000.

SONG, Z., et al. **Linolenic acid-modified PEG-PCL micelles for curcumin delivery**. International Journal of Pharmaceutics, 471, 312–321, 2014.

STORPIRTIS, S., et al. **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 79, 2009.

TAHERI, A. et al. **Nanoparticles of Conjugated Methotrexate-Human Serum Albumin: Preparation and Cytotoxicity Evaluations.** Journal of Nanomaterial, Iran, vol. 2011, 2010.

TAKANO, M.; YUMOTO, R., MURAKAMI, T. **Expression and function of efflux drug transporters in the intestine.** Pharmacology and Therapeutics, v. 109, p. 137–161, 2006.

TARATULA, O., et al. **Innovative strategy for treatment of lung cancer: targeted nanotechnology-based inhalation co-delivery of anticancer drugs and siRNA.** Journal of Drug Targeting, USA, 2011.

TENG, Z.; LUO, Y.; WANG, Q. **Nanoparticles Synthesized from Soy Protein: Preparation, Characterization, and Application for Nutraceutical Encapsulation.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, USA, 60, p. 2712-2720, 2012.

TENG, Y.N., et al. **Demethoxycurcumin Modulates Human P- Glycoprotein Function via Uncompetitive Inhibition of ATPase Hydrolysis Activity.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, Taiwan, 63, p. 847-855, 2015.

WAHEED, A.;GUPTA, A.;PATEL, P.; **Targeted Drug Delivery Systems for Lung Cancer,** Pharmatutor, vol.3 (2), p. 38-42, 2015.

WANG, Y., et al. **Self-assembled nanoparticles of methotrexate conjugated O-carboxymethyl chitosan: Preparation, characterization and drug release behavior *in vitro*.** Carbohydrate Polymer, China, 86, p. 1665-1670, 2011.

WANG, P.,et al. **The formulation and delivery of curcumin with lipid nanoparticles for the treatment of non-small cell lung câncer both in vitro and in vivo.** Materials Science and Engineering C, China, 33, p. 4802-4808, 2013.

YALLAPU, M.M., et al. **Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells.** Journal of Colloid and Interface Science, USA, 351, p. 19-29, 2010.

YIN, H., et al. **Synergistic antitumor efficiency of docetaxel and curcumin against lung câncer.**Acta Biochimica et Biophysica Sinica, China, 2012.

YOUSEFI, G. et al. **Synthesis and characterization of methotrexate polyethylene glycol esters as a drug delivery system.** Chemical & Pharmaceutical bulletin, 58 (2), p. 147-153, 2010.

ZHAO, Y. et al. **Methotrexate Nanoparticles Prepared with Codendrimer from Polyamidoamine (PAMAM) and Oligoethylene Glycols (OEG) Dendrons: Antitumor Efficacy in Vitro and in Vivo.** Scientific Reports, China, 2016.

ZHOU, X. et al. **Clinicopathological significance of CXCR 4 in non-small cell lung câncer,** Drug Design, Development and Therapy , China, 9, p. 1349-1358, 2015.

ZHU, Y., et al. **Methotrexate-bestatin interaction: Involvement of P-glycoprotein and organic anion transporters in rats.** International Journal of Pharmaceutics, China, 465, p. 368-377, 2014.