

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
ASSOCIAÇÃO AMPLA UEPG/UNICENTRO**

**LOANDA APARECIDA CABRAL RUDNIK**

**PÓ INALÁVEL MICROPARTICULADO COM NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS  
CONTENDO CURCUMINA E PIPERINA: DESENVOLVIMENTO,  
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E CITOTOXICIDADE EM LINHAGENS  
TUMORAIS DE PULMÃO**

**PONTA GROSSA  
2022**

**LOANDA APARECIDA CABRAL RUDNIK**

**PÓ INALÁVEL MICROPARTICULADO COM NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS  
CONTENDO CURCUMINA E PIPERINA: DESENVOLVIMENTO,  
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E CITOTOXICIDADE EM LINHAGENS  
TUMORAIS DE PULMÃO**

Tese apresentada como requisito para à obtenção do título de Doutora 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<sup>a</sup>. Dra. Carla Cristine Kanunfre

**PONTA GROSSA**

**2022**

R916 Rudnik, Loanda Aparecida Cabral  
Pó inalável microparticulado com nanopartículas poliméricas contendo curcumina e piperina: Desenvolvimento, caracterização físico-química e citotoxicidade em linhagens tumorais de pulmão / Loanda Aparecida Cabral Rudnik. PONTA GROSSA, 2022.  
88 f.

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago.

Coorientadora: Profa. Dra. Carla Cristine Kanunfre.

1. Hplc. 2. Manitol. 3. Diâmetro aerodinâmico. 4. Nanoemulsão. 5. Validação analítica. I. Farago, Paulo Vitor. II. Kanunfre, Carla Cristine. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. IV.T.

CDD: 615.321

**Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

Associação Ampla entre a  
Universidade Estadual do Centro-Oeste e a Universidade Estadual de Ponta Grossa

ATA DE EXAME DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO **05/2022** DA DOUTORANDA **LOANDA APARECIDA CABRAL RUDNIK**, REALIZADA NO DIA 20 DE SETEMBRO DE 2022, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos vinte dias do mês de setembro de dois mil e vinte e dois, às 14h, na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), em sessão aberta, por videoconferência, sob a presidência do Professor Doutor PAULO VITOR FARAGO, reuniu-se a Banca Examinadora de defesa de tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas da doutoranda **LOANDA APARECIDA CABRAL RUDNIK**, na linha de pesquisa: Desenvolvimento e Controle de Fármacos, Medicamentos e Correlatos, constituída pelo Professor Doutor (Presidente) PAULO VITOR FARAGO (UEPG/PR), demais Doutores (membros titulares): JESSICA MENDES NADAL (UEPG/PR); PATRICIA MATHIAS DOLL BOSCARDIN (UEPG/PR); YASMINE MENDES PUPO (UFPR/PR); e DANIELA FLORENCIO MALUF (UFPR/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e à candidata das normas que regem o exame de defesa de tese de Doutorado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores, para arguição. O título do trabalho foi: **“DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO EM CÉLULAS TUMORAIS DE PULMÃO DE UM PÓ MICROPARTICULADO CONTENDO NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE CURCUMINA E PIPERINA”**. Encerrada a defesa, a banca considerou APROVADO a Tese, considerada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. A aluna deverá entregar, no prazo de até 30 (trinta) dias, a versão definitiva da Tese de Doutorado, com as modificações sugeridas pelos membros da Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): \_\_\_\_\_

Alteração de título: sim (X) não ( )

Novo título: Pó inalável microparticulado com nanopartículas poliméricas contendo curcumina e piperina: desenvolvimento, caracterização físico-química e citotoxicidade em linhagens tumorais de pulmão

PAULO VITOR FARAGO (UEPG/PR)

Presidente

JESSICA MENDES NADAL

(UEPG/PR)

Titular

YASMINE MENDES PUPO (UFPR/PR)

Titular

PATRICIA MATHIAS DOLL BOSCARDIN

(UEPG/PR)

Titular

DANIELA FLORENCIO MALUF

(UFPR)

Titular

Ponta Grossa, 20 de setembro de 2022.

Dedico este trabalho aos meus filhos Miguel e Mateus, ao meu esposo Marcio, meus pais Lucélia e Erivaldo, minha irmã Luana, meu cunhado Joelmir, professores e amigos. Pessoas que sempre me incentivaram em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

Gratidão a Deus inicialmente, por tudo que sou e tudo que tenho. Sempre derramando sobre mim e sobre os meus, bênçãos e graças. Glórias e louvores a Ele hoje e sempre!

Gratidão ao meu esposo Marcio, por todo amor, apoio, paciência e ajuda em todos os momentos. Essa conquista é nossa e sem sua presença isso não seria possível. Amo você!

Gratidão aos meus filhos Miguel e Mateus, que me deram o melhor título da vida, ser mãe! São minha alegria de viver, meus amores, meus meninos abençoados. Amo vocês!

Gratidão aos meus pais Lucélia e Erivaldo, que são também os responsáveis por essa conquista. Com todo amor e dedicação sempre estiveram ao meu lado, dando apoio, incentivos e orações. Sempre acreditaram que eu chegaria até aqui. Amo vocês!

Gratidão à minha irmã Luana, sempre ao meu lado, sempre presente, com todo amor e cuidado. Obrigada querida irmã pelos incentivos e por sempre acreditar em mim. Obrigada meu querido cunhado Joelmir, sempre presente em todos os momentos. Amo vocês!

Agradecimentos a todos da minha família que em algum momento se preocuparam comigo e me deram uma palavra de apoio e carinho, me incentivando a chegar ao topo.

Obrigada aos amigos que se fizeram presentes nessa importante etapa da minha vida. Em especial às minhas grandes amigas Geisamara e Maria Luiza. Gratidão pela amizade, apoio e carinho de todos. Amo vocês!

Gratidão ao meu professor orientador, Dr. Paulo Vitor Farago, pelas oportunidades, ensinamentos e amizade construída desde a graduação.

À minha coorientadora professora Dra. Carla Cristine Kanunfre, pela amizade, carinho e atenção nos momentos que me coorientou no decorrer do trabalho.

À professora Dra. Jessica Mendes Nadal, que sempre esteve presente em meus trabalhos e momentos importantes da minha vida. Muita gratidão pela amizade, apoio, carinho, atenção e disponibilidade.

À professora Dra. Jane Manfron Budel, pela oportunidade e disponibilidade de uma vaga para o ingresso no doutorado. Agradeço o carinho e atenção que sempre

se dirigiu a mim.

Gratidão às professoras Dra. Fernanda Malaquias Barboza, Dra. Traudi Klein, Dra. Patrícia Mathias Doll-Böscardin e Dra. Mona Lisa Simionatto, que me ajudaram em importantes etapas do desenvolvimento do trabalho.

Gratidão aos colegas e amigos Dra. Amanda Martinez Lyra, Dra. Mackelly Simionatto, Me. Guilherme Camargo, Dra. Luiza Stolz Cruz pela grande ajuda nas etapas de desenvolvimento do método analítico, desenvolvimento das nanopartículas e avaliação celular.

Aos funcionários e técnicos dos laboratórios, pela atenção e ajuda.

À coordenação do curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

A todos que em algum momento me ajudaram com ações, palavras e orações.

Gratidão e emoção são palavras que resumem esse momento!

## RESUMO

RUDNIK, Loanda A.C. **Pó inalável microparticulado com nanopartículas poliméricas contendo curcumina e piperina: desenvolvimento, caracterização físico-química e citotoxicidade em linhagens tumorais de pulmão.** 2022. 88f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2022.

Curcumina (CUR) é um polifenol proveniente da planta *Curcuma longa* L. e dentre os vários efeitos biológicos, tem-se a ação antitumoral. Piperina (PIP) é um alcaloide presente na planta *Piper nigrum* L. tendo também atividade antitumoral. Sua co-administração com CUR é interessante pois possui capacidade de reduzir a depuração dessa substância ativa. No sistema microparticulado carregado com nanopartículas, as micropartículas funcionam como transportador intermediário para a deposição eficiente das nanopartículas com fármacos nos pulmões. O objetivo do trabalho foi desenvolver e caracterizar um pó microparticulado contendo nanopartículas poliméricas de CUR e PIP e avaliar as nanopartículas frente à 3 linhagens celulares (tumorais: A549, NCI-H292 e controle: MRC-5). Foram desenvolvidas duas formulações de nanopartículas contendo CUR e PIP e os polímeros PCL e PEG a partir do método de nanoemulsão utilizando sonicação. Posteriormente, essas nanopartículas foram transformadas em um pó seco utilizando secagem por aspersão e manitol como excipiente. Foram obtidas nanopartículas com tamanhos ( $244,50 \pm 23,00$  e  $223,70 \pm 21,00$  nm), potenciais zeta ( $-11,30 \pm 1,6$  a  $-14,60 \pm 2,2$  mV) e índices de polidispersão ( $0,135 \pm 0,18$  e  $0,117 \pm 0,15$ ) adequados. As micropartículas apresentaram valores de diâmetro aerodinâmico ( $3,63 \pm 0,90$  e  $2,56 \pm 0,63$   $\mu\text{m}$ ) 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 25 a 45  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  para a CUR e PIP, sendo capaz de quantificar simultaneamente essas duas substâncias. A eficiência de incorporação para ambos os fármacos foi superior a 90%. NCP-0 e NCP-1 apresentaram formato esférico e escala nanométrica. MNCP-0 e MNCP-1 apresentaram formato esférico, dimensões micrométricas com pouca rugosidade e presença de estruturas nanométricas na superfície além de aglomerados de cristais de manitol. Não foi observado alteração dos grupos funcionais dos fármacos nos espectros de infravermelho (FTIR). As análises de difração de raios X (DRX) indicaram que a incorporação das nanopartículas poliméricas de CUR e PIP às micropartículas com manitol levou a amorfização dos fármacos. Os estudos *in vitro* mostraram que a formulação NCP-1 reduziu significativamente a viabilidade celular das linhagens A549 e NCI-H292, mostrando-se seletiva para essas células ( $IS > 2$ ), quando comparadas às células MRC-5. As análises morfológicas mostraram presença do processo de morte por apoptose para as células A549 e NCI-H292. A formulação NCP-1 apresentou efeito citotóxico seletivo pela associação de CUR e PIP para as células tumorais em estudo.

**Palavras-chave:** HPLC, manitol, diâmetro aerodinâmico, nanoemulsão, validação analítica.



## ABSTRACT

RUDNIK, Loanda A.C. **Microparticulate inhalable powder with polymeric nanoparticles containing curcumin and piperine: development, physicochemical characterization and cytotoxicity in lung tumor cell lines.** 2022. 88f. Thesis (Doctorate in Pharmaceutical Sciences) – State University of Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2022.

Curcumin (CUR) is a polyphenol from the plant *Curcuma longa* L. and among the various biological effects, there is antitumor action. Piperine (PIP) is an alkaloid present in the plant *Piper nigrum* L. also having antitumor activity. Its co-administration with CUR is interesting because it has the ability to reduce the clearance of this active substance. In the microparticulate system loaded with nanoparticles, the microparticles function as an intermediate carrier for the efficient deposition of nanoparticles with drugs in the lungs. The objective of this work was to develop and characterize a microparticle powder containing polymeric nanoparticles of CUR and PIP and to evaluate the nanoparticles against 3 cell lines (tumor: A549, NCI-H292 and control: MRC-5). Two nanoparticle formulations containing CUR and PIP and PCL and PEG polymers were developed from the nanoemulsion method using sonication. Subsequently, these nanoparticles were transformed into a dry powder using spray drying and mannitol as an excipient. Nanoparticles with sizes ( $244.50 \pm 23.00$  and  $223.70 \pm 21.00$  nm), zeta potentials ( $-11.30 \pm 1.6$  to  $-14.60 \pm 2.2$  mV) and polydispersion indices were obtained. ( $0.135 \pm 0.18$  and  $0.117 \pm 0.15$ ) are suitable. The microparticles showed adequate aerodynamic diameter values ( $3.63 \pm 0.90$  and  $2.56 \pm 0.63$   $\mu\text{m}$ ). An analytical method by high performance liquid chromatography (HPLC) was developed and validated for quantification of drugs in nanocarriers. The method proved to be specific, linear, precise, accurate and robust, in the range of 25 to 45  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  for CUR and PIP, being able to quantify these two substances simultaneously. The incorporation efficiency for both drugs was greater than 90%. NCP-0 and NCP-1 presented spherical shape and nanometric scale. MNCP-0 and MNCP-1 showed a spherical shape, micrometric dimensions with little roughness and the presence of nanometric structures on the surface in addition to agglomerates of mannitol crystals. No changes were observed in the functional groups of the drugs in the infrared spectra (FTIR). X-ray diffraction (XRD) analyzes indicated that the incorporation of polymeric nanoparticles of CUR and PIP to microparticles with mannitol led to amorphization of the drugs. In vitro studies showed that the NCP-1 formulation significantly reduced the cell viability of the A549 and NCI-H292 strains, being selective for these cells ( $IS > 2$ ), when compared to MRC-5 cells. The morphological analyzes showed the presence of the process of death by apoptosis for A549 and NCI-H292 cells. The NCP-1 formulation showed a selective cytotoxic effect by the association of CUR and PIP for the tumor cells under study.

**Keywords:** HPLC, mannitol, aerodynamic diameter, nanoemulsion, analytical validation

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	12
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	12
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>13</b>
3.1	CÂNCER DE PULMÃO .....	13
3.1.1	Liberação pulmonar.....	15
3.2	MICRO E NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE FÁRMACOS .....	17
3.3	ASPECTOS BIOFARMACÊUTICOS DA CURCUMINA.....	19
3.4	ASPECTOS BIOFARMACÊUTICOS DA PIPERINA.....	21
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
4.1	EQUIPAMENTOS .....	23
4.2	SUBSTÂNCIAS E REAGENTES.....	23
4.2.1	Fármacos .....	23
4.2.2	Produção das nanopartículas .....	24
4.2.3	Produção do pó microparticulado .....	24
4.2.4	Demais Reagentes.....	24
4.2.5	Cultivo celular.....	24
4.3	DESENHO EXPERIMENTAL .....	25
4.4	OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS CONTENDO CURCUMINA E PIPERINA.....	25
4.4.1	Mistura física .....	26
4.5	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS .....	26
4.5.1	Análises morfológicas e de superfície .....	26
4.5.1.1	Determinação do diâmetro médio e do potencial zeta.....	26
4.5.1.2	Microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão por efeito de campo (MEV-FEG) .....	27
4.5.2	Avaliação por espectroscopia no infravermelho .....	27
4.6	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC.....	27
4.6.1	Equipamentos e condições cromatográficas .....	27
4.6.2	Preparo das soluções padrão .....	28
4.6.3	Desenvolvimento e Validação do Método para Quantificação de curcumina e piperina .....	28

4.7	OBTENÇÃO DO PÓ MICROPARTICULADO CONTENDO NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE CUR E PIP .....	30
4.7.1	Mistura Física .....	30
4.7.2	Rendimento .....	30
4.7.3	Determinação da umidade .....	30
4.8	CARACTERIZAÇÃO DO PÓ MICROPARTICULADO CONTENDO NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE CUR E PIP .....	31
4.8.1	Análise morfológica e de superfície .....	31
4.8.1.1	Microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão por efeito de campo (MEV-FEG) .....	31
4.8.1.2	Determinação do diâmetro médio das micropartículas .....	31
4.8.1.3	Análise por difração de raios X (DRX) .....	32
4.8.1.4	Determinação do diâmetro aerodinâmico das micropartículas .....	32
4.9	ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>IN VITRO</i> – CULTIVO CELULAR .....	32
4.9.1	Cultura das linhagens A549, NCI-H292 e MRC-5 .....	32
4.9.2	Determinação da citotoxicidade das nanopartículas contendo CUR e PIP – Formulação NCP-1 .....	33
4.9.2.1	Ensaio de redução de MTT .....	34
4.9.2.2	Ensaio de coloração de proteínas .....	34
4.9.2.3	Determinação do IC <sub>50</sub> .....	35
4.9.2.4	Índice de seletividade .....	35
4.9.3	Avaliação morfológica das células tratadas com as nanopartículas contendo CUR e PIP – Formulação NCP-1 por microscopia óptica de luz .....	35
4.9.4	Determinação da ativação de caspase 3 e 7 das células tratadas com As nanopartículas contendo CUR e PIP – Formulação NCP-1 .....	36
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	37
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
5.1	OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS CONTENDO CURCUMINA E PIPERINA .....	38
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS .....	38
5.2.1	Análises morfológicas e de superfície .....	38
5.2.1.1	Determinação do diâmetro médio e do potencial zeta .....	38
5.2.1.2	Análise por microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão por efeito de campo (MEV-FEG) .....	40
5.3	ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA RIGIÃO DO INFRAVERMELHO .....	42
5.4	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS NAS NANOPARTÍCULAS .....	46
5.4.1	Linearidade .....	46

5.4.2	Especificidade .....	48
5.4.3	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) .....	49
5.4.4	Precisão .....	49
5.4.5	Exatidão .....	50
5.4.6	Robustez .....	50
5.5	DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO (%EI) DOS FÁRMACOS NAS NANOPARTÍCULAS .....	50
5.6	OBTENÇÃO DO PÓ MICROPARTICULADO CONTENDO NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE CUR E PIP .....	52
5.6.1	Rendimento .....	53
5.6.2	Determinação da umidade .....	53
5.7	CARACTERIZAÇÃO DO PÓ MICROPARTICULADO CONTENDO NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE CUR E PIP .....	53
5.7.1	Análise morfológica e de superfície... ..	53
5.7.1.1	Análise por microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão por efeito de campo (MEV-FEG).....	53
5.7.1.2	Determinação do diâmetro médio das micropartículas.....	56
5.7.1.3	Determinação do diâmetro aerodinâmico das micropartículas. ....	56
5.7.1.4	Análise por difração de raios-x (DRX).....	58
5.8	ENSAIOS BIOLÓGICOS – ESTUDO <i>IN VITRO</i> .....	61
5.8.1	Toxicidade da formulação NCP-1 nas linhagens A549, NCI-h292 E MRC-5.....	61
5.8.2	Avaliação de citotoxicidade por cálculo de IC <sub>50</sub> e índice de seletividade (IS).....	67
5.8.3	Ensaio morfológico. ....	69
5.8.4	Análise da atividade de caspase 3 e 7.....	72
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO. ....</b>	<b>76</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>78</b>
	<b>APÊNDICE A – ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO. ....</b>	<b>86</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Absorção de fármacos por via pulmonar tem recebido grande atenção nas últimas duas décadas. Grande área de superfície alveolar, barreira epitelial de baixa espessura, extensa vascularização, baixa atividade proteolítica e ausência do efeito de primeira passagem são vantagens que tornam a distribuição pulmonar de substâncias bioativas interessante, principalmente quando fala-se em câncer de pulmão (GRENHA et al., 2005).

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, incluindo estudos com sistemas nanoestruturados.

Nanopartículas poliméricas são considerados ótimos veículos para o transporte eficiente de fármacos até o epitélio pulmonar, evitando a eliminação mucociliar indesejada e mecanismos fagocíticos. Porém, apenas o uso desses nanocarreadores até os pulmões é prejudicado devido a sua baixa inércia, favorecendo que sejam exaladas na respiração. Além disso, seu pequeno tamanho pode levar a uma instabilidade físico-química (GRENHA et al., 2005).

Para resolver essas limitações, o desenvolvimento de micropartículas na forma de pó seco contendo nanopartículas que se dissolvem nos pulmões liberando as estruturas nanométricas com fármaco, tem sido objeto de muito estudo e interesse por parte dos pesquisadores, pois demonstraram ser um promissor carreador de fármacos, promovendo maior deposição da substância ativa nos pulmões (BAGHDAN et al., 2019). Esse sistema consiste em nanopartículas e um excipiente que tem função de incorporar as partículas nanométricas para estabilizá-las durante o processo de secagem por atomização. (BAGHDAN et al., 2019).

Curcumina (CUR) é um composto fenólico 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).

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).

Piperina (PIP) é um alcaloide presente na pimenta-do-reino ou pimenta preta (*Piper nigrum* L.) e também é muito usada na culinária como condimento. Apresenta importantes atividades biológicas como anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, antiparasitária e antitumoral (OLIVEIRA; ALENCAR-FILHO; VASCONCELLOS, 2014) além de possuir capacidade de inibir o metabolismo enzimático, reduzir a depuração de nanopartículas e substâncias ativas e de fornecer proteção contra danos oxidativos. Desta forma se torna interessante sua co-administração com outros compostos como a curcumina a fim de melhorar a biodisponibilidade dessa substância bioativa (GÜLSEREN; GURI; CORREDIG, 2014).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma formulação de micropartículas carregadas com nanopartículas poliméricas de CUR e PIP na forma de um pó seco para inalação, visando uma estratégia de tratamento eficaz contra o câncer de pulmão. Neste estudo, nanopartículas poliméricas contendo CUR e PIP foram preparadas por meio de técnica de nanoemulsão utilizando sonicação e submetidas à caracterização para determinar seu tamanho, carga superficial e morfologia. A avaliação da citotoxicidade dessas nanopartículas foi investigada nas linhagens A549, NCI-H292 e MRC-5. Morfologia celular e mecanismo de morte também foram avaliados. Posteriormente, essas nanopartículas foram transformadas em um pó seco utilizando secagem por aspersão e manitol como excipiente. Sua morfologia e propriedade aerodinâmica foram investigadas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Obter e caracterizar um pó inalável microparticulado contendo nanopartículas poliméricas de CUR e PIP e avaliar a citotoxicidade das nanopartículas em linhagens tumorais de pulmão.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter nanopartículas poliméricas contendo CUR e PIP, a partir dos polímeros poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) e polietilenoglicol 6000 (PEG 6000) pelo método de nanoemulsão;
- Desenvolver e validar um método por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para a quantificação simultânea de CUR e PIP incorporados nas nanopartículas poliméricas;
- Caracterizar as nanopartículas poliméricas por meio de estudos morfológicos (MEV-FEG) e espectroscópicos (FTIR);
- Obter um pó microparticulado contendo nanopartículas poliméricas de CUR e PIP por meio de secagem por aspersão (spray-drying);
- Caracterizar o pó microparticulado contendo nanopartículas poliméricas de CUR e PIP por meio de estudos morfológicos;
- Investigar a citotoxicidade das nanopartículas poliméricas contendo CUR e PIP, sobre a viabilidade celular das linhagens tumorais (A549, NCI-H292) e controle (MCR-5);
- Avaliar morfologia utilizando corante de MayGrunwald e Giemsa e os mecanismos envolvidos na morte celular através de técnica de caspase.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 CÂNCER DE PULMÃO

Câncer de pulmão é o principal tipo de câncer responsável por levar à morte muitos homens e mulheres em todo mundo (LOK; RUDIN, 2019), sendo o segundo tipo de tumor maligno mais comum. É caracterizada por ser uma doença altamente fatal com alta taxa de mortalidade por incidência. Até o final do século XX, tornou-se a principal causa de morte associada ao câncer em todo o mundo e em 2012, cerca de 1,8 milhão de novos casos foram registrados. Há uma estimativa de que, em 2035 o número de mortes relacionadas ao câncer de pulmão deve aumentar em até 3 milhões em todo o mundo (ABDELAZIZ et al., 2018).

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

Os pulmões são órgãos que possuem alto grau de exposição interna, pela circulação pulmonar e externa por meio do fluxo de ar, tornando-o vulnerável ao desenvolvimento de doenças. Quando o paciente possui câncer metastático, têm células cancerígenas provenientes do tumor primário em circulação. Pelos 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 (ANABOUSI, 2006).

O câncer de pulmão é frequentemente uma doença com risco à vida, pois tende a metastatase. Seu aparecimento se dá com primeiras alterações no DNA que 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 (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014).



Histologicamente, o câncer de pulmão é dividido em câncer de pulmão de células pequenas (CPPCs) e câncer de pulmão de células não pequenas (CPNPCs) sendo que o carcinoma de células pequenas 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 três subtipos: câncer de pulmão de grandes células, carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma (ABDELAZIZ et al., 2018, MOTTAGHITALAB et al., 2019).

Aproximadamente 16% dos casos são diagnosticados antes da malignidade e a grande maioria, em estágios avançados metastáticos localmente, mostrando um prognóstico ruim, com sobrevida em 5 anos de 15%. Embora existam esforços no campo da oncologia, a taxa de sobrevida dos pacientes portadores de câncer de pulmão é de 6 a 18%, conforme relatado pelos EUA em 2016. A detecção e a terapia do câncer de pulmão geralmente são complicadas, o que pode ser a principal razão para a baixa taxa de sobrevida dos pacientes (ABDELAZIZ et al., 2018, MOTTAGHITALAB et al., 2019).

A seleção do tratamento deve ser adequada ao estadiamento clínico da doença, capacidade funcional, condições clínicas e preferência do doente, podendo ser realizado quimioterapias, radioterapias, terapias direcionadas e/ou cirurgias. No entanto, em pacientes nos estágios avançados da doença, a cirurgia é geralmente considerada inelegível (ABDELAZIZ et al., 2018).

.Para pacientes portadores de CPCNP, com doença localmente avançada envolvendo linfonodos mediastinais, o tratamento é baseado principalmente em radioterapia e quimioterapia concomitantes seguidas de imunoterapia. Apesar da multimodalidade da terapia, recorrência da doença é comum. Novas estratégias que modulam as vias de reparo de danos ao DNA em resposta à quimioterapia citotóxica e à radiação no câncer de pulmão podem fornecer um caminho a seguir (LOK; RUDIN, 2019).

O FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou alguns biomarcadores e medicamentos para a detecção de câncer de pulmão, como o antígeno carcinoembrionário (CEA), considerado um biomarcador de diagnóstico limitado sendo de melhor eficácia sua combinação com outros biomarcadores, como o fragmento 21 de citoqueratina (CYFRA21-1). Várias tecnologias de imagem, como

raio X, tomografia computadorizada (TC), tomografia de emissão positiva (PET), ressonância magnética (RM) e varredura óssea também são muito utilizadas na detecção de câncer de pulmão (MOTTAGHITALAB et al., 2019).

Para o tratamento clínico do câncer de pulmão, os principais medicamentos aprovados pelo FDA são o Crizotinibe, Gefitinibe e Atezolimumab sendo os de primeira linha para adenocarcinoma de pulmão. Esses medicamentos têm como mecanismo inibir a função do linfoma quinase anaplásico (ALK), receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e ligante de morte programado 1 (PDL1), respectivamente. Certinib, Erlotinib e Ramucirumab compreendem a segunda linha para adenocarcinoma de pulmão (MOTTAGHITALAB et al., 2019).

### 3.1.1 Liberação pulmonar

Os pulmões são considerados órgãos interessantes para administração de medicamentos, pois permitem uma distribuição rápida de moléculas do fármaco pela sua grande área superficial, alta vascularização e epitélio pulmonar fino e assim proporciona uma diminuição da exposição sistêmica melhorando o efeito terapêutico da droga (WAHEED; GUPTA; PATEL, 2015).

Na terapia contra o câncer, a administração sistêmica de medicamentos apresenta desvantagens como baixa acumulação nas regiões tumorais, má distribuição nos pulmões acompanhada de resistência e metástase das células cancerígenas, baixa eficiência de inibição tumoral e respostas inconvenientes ao paciente como efeitos colaterais graves ao organismo (XU et al., 2019, ABDELRAHY et al., 2019). No entanto, para utilização de agentes quimioterápicos, a via intravenosa ainda é de primeira escolha.

Em relação ao câncer de pulmão, há possibilidade de explorar as inúmeras vantagens que a via inalatória oferece, como ser uma via não invasiva (BAGHDAN et al., 2019).

Essa via mostra-se promissora no tratamento de várias doenças, como asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), tuberculose, câncer de pulmão e diabetes. Contrário à administração sistêmica de antitumorais, a liberação pulmonar fornece o fármaco de maneira direta e eficiente aos pulmões, evitando o metabolismo de primeira passagem ao fígado, oferecendo altas concentrações da substância ativa no órgão, possibilidade de utilização de baixas doses, redução de

efeitos colaterais e facilidade de administração (XU et al., 2019).

A administração pulmonar de pequenas partículas 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).

No entanto, para serem administradas por via inalatória, as partículas devem possuir propriedades físico-químicas adequadas, como diâmetro aerodinâmico apropriado para superar as barreiras biológicas do pulmão e conseguir atingir níveis profundos das vias aéreas (BAGHDAN et al., 2019).

A utilização de nanopartículas é muito estudada e oferece inúmeras vantagens, pois tendem a aumentar o tempo de circulação do agente quimioterápico nos pulmões, aumentar o acúmulo seletivo de substâncias nos tumores pulmonares, acompanhado por uma liberação prolongada de medicamentos com atividade antitumoral eficiente, redução da toxicidade nas células pulmonares saudáveis, redução da frequência de administração e melhora da adesão do paciente (ABDELRADY et al., 2019, XU et al., 2019)

Porém, para o tratamento do câncer de pulmão, algumas barreiras pulmonares precisam ser ultrapassadas para que a terapia inalatória seja eficaz. O primeiro desafio é passar através das vias aéreas superiores, pois lá existem células epiteliais colunares produtoras de muco que removem por meio da depuração mucociliar qualquer partícula que se deposita. Depois, mais profundamente nos pulmões, os macrófagos fazem a eliminação de partículas insolúveis que se depositam nos alvéolos (ABDELAZIZ et al., 2018).

A propriedade física mais importante para a deposição de partículas a partir de um sistema aerossol para inalação é o seu tamanho. Partículas com tamanho menor que 2  $\mu\text{m}$  são eficientemente liberadas e depositadas nos alvéolos pulmonares. Menores que 1  $\mu\text{m}$  podem ser exaladas na expiração e tendem a sofrer a ação dos macrófagos alveolares e partículas muito grandes são rapidamente removidas dos pulmões através do processo de depuração mucociliar (AULTON; TAYLOR, 2016).

A fim de avançar sobre os desafios oferecidos pela via pulmonar, novas alternativas de tratamento com grande segurança e eficácia estão sendo desenvolvidas na busca em aumentar a dose citotóxica de agente quimioterápico

diretamente nas células tumorais para uma melhor resposta e redução da toxicidade sistêmica (ABDELRADY et al., 2019).

As estratégias para administração dessas partículas diretamente aos pulmões podem ser por meio de inaladores de pó seco, inaladores dosimetrados ou nebulizadores.

### 3.2 MICRO E NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE FÁRMACOS

A utilização de nanopartículas na medicina tem chamado muita atenção, principalmente nos avanços da terapia quimioterápica. Através de vários estudos, provam ser promissoras como sistemas antitumorais diretos, carreadores de substâncias ativas e também no diagnóstico *in vivo* de doenças (NIKEZIĆ et al., 2020).

Nanopartículas poliméricas são partículas com tamanho inferior a 1µm preparadas a partir de polímeros de origem natural ou sintética, lipídios ou fosfolipídios e até mesmo metais. O termo nanopartícula 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 (SCHAFFAZICK; GUTERRES, 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).

Dentre os polímeros mais utilizados para desenvolvimento de nanopartículas

poliméricas estão os sintéticos como a poli ( $\epsilon$ -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), mucoadesividade e favorece o acúmulo do fármaco na área do tumor, 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 da substância quimioterápica (FENG; SONG; ZHAI, 2012).

Apesar dos constantes avanços, estudos e investimentos nas ferramentas para diagnóstico e tratamento do câncer, as desvantagens dos sistemas convencionais, como alta invasividade e baixa resposta à terapia exigem da medicina novas estratégias a fim de driblar essas circunstâncias.

Na terapia contra o câncer de pulmão, muitos estudos com nanopartículas têm se mostrado promissor.

Para o diagnóstico, ferramentas de imagens baseadas em nanopartículas já são usadas para a detecção de tumores pulmonares. Um exemplo são as nanopartículas de poliestireno dopado por pontos quânticos, usados para detectar CEA e CYFRA21-1 no soro de pacientes com câncer de pulmão. E no campo de terapias, muitos resultados positivos foram alcançados a partir de sistemas nanoparticulados baseados em metais, semicondutores e polímeros para o tratamento de câncer de pulmão *in vitro* e *in vivo* (MOTTAGHITALAB et al., 2019).

Uma das principais exigências para a utilização de sistemas nanoparticulados é sua biossegurança. Por meio de análises, é preciso comprovar que seu uso é eficaz.

As substâncias antitumorais podem estar ligadas à superfície da partícula ou integradas à sua matriz. Dessa forma é alcançada uma melhor entrega do ativo diretamente às células alvo, assim há uma redução da toxicidade, liberação da

substância no alvo de maneira controlada e preservação dos outros órgãos frente a ação do fármaco, resultando em uma melhor eficácia terapêutica (NIKEZIĆ et al., 2020).

Micropartículas têm tamanho de cerca de 1 µm a até alguns milímetros, possuem formato esférico em sua maioria, podendo o ou os fármacos estarem incorporados em seu interior ou adsorvidos em sua superfície. Devido a sua área de superfície, micropartículas são consideradas mais adequadas pois tendem a favorecer a liberação por mais tempo, quando comparadas com nanopartículas (DOMINGUES et al., 2008).

Apesar das inúmeras vantagens oferecidas pelas nanopartículas, o desenvolvimento de micropartículas a partir dessas estruturas nanométricas tem demonstrado grandes benefícios, principalmente para administração pulmonar de fármacos. Para transpor a limitada estabilidade físico-química das nanopartículas, a secagem por apersão para obtenção de micropartículas secas é muito utilizada (DOMINGUES et al., 2008; GARCIA, 2014).

### 3.3 ASPECTOS BIOFARMACÊUTICOS DA CURCUMINA

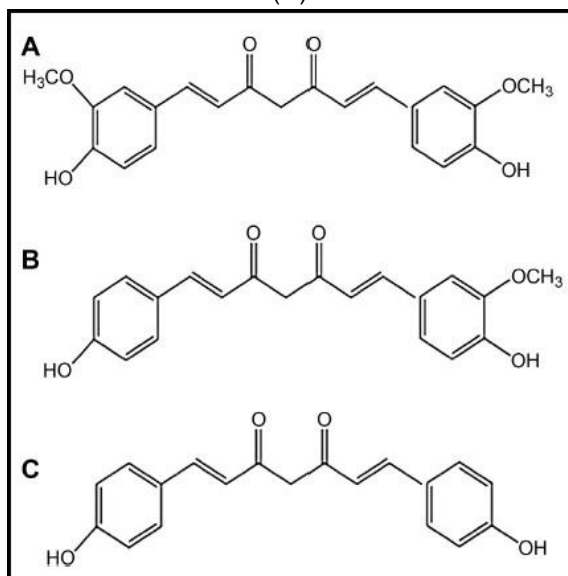
Curcumina (CUR) é um flavonoide polifenólico, de cor amarela, obtido dos rizomas de *Curcuma longa* L., planta característica das regiões tropicais e subtropicais da Índia e da China (NASCIMENTO et al., 2012; NAKSURIYA, et al., 2014; MARQUES et al., 2020).

Foi isolada 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. Seu uso como remédio caseiro surgiu há séculos na medicina indiana para uma variedade de doenças (RAMSEWAK; WITT; NAIR, 2000; ARAÚJO; LEON, 2001; JARDIM, 2013; MARQUES et al., 2020).

O rizoma desidratado e moído de *Curcuma longa* L. gera um pó de coloração dourada denominada turmérico que possui em sua composição, como componentes majoritários, os curcuminoides, com destaque para curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina (Figura 1) que são insolúveis em água e éter, solúveis em etanol, acetona, dimetilsulfóxido e em outros solventes orgânicos (JARDIM, 2013; SANTIAGO et al., 2015). Atualmente a CUR pode ser obtida comercialmente como

uma mistura dos três componentes: curcumina (~77%), desmetoxicurcumina (~ 17%) e bisdesmetoxicurcumina (~3%).

FIGURA 1: Estrutura química de curcuminoides extraídos de *Curcuma longa* L.: Curcumina (A), Desmetoxicurcumina (B) e Bisdesmetoxicurcumina (C)



Fonte: NAKSURIYA, et al., 2014

Várias pesquisas evidenciam que os grupos fenóis e metoxila presentes na estrutura da CUR são os responsáveis pelas suas várias atividades biológicas.

Alguns estudos, como o de Sandur et al. (2007), mostram as vantagens da CUR frente aos outros curcuminoides. Nesse trabalho, os autores informaram que para a supressão do fator de necrose tumoral (TNF) induzida por ativação do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ 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 humanos, a CUR tem uma alta tolerabilidade com toxicidade mínima nos níveis necessários para apresentar seus efeitos benéficos. Por razões de seus múltiplos benefícios terapêuticos e segurança superior, esse fármaco foi estudado para aplicações generalizadas (PAN et al., 2020).

Foi demonstrado que a CUR possui uma vasta gama de atividades farmacológicas incluindo ação anti-inflamatória, antitumoral, antioxidante, cicatrizante, antimicrobiana, imunomoduladora, anti-isquêmica, hepatoprotetora,

nefroprotetora, hipoglicêmica e atividades antirreumáticas (MARQUES et al., 2020; PAN et al., 2020).

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).

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, incluindo o de pulmão (NAKSURIYA, et al., 2014).

Os benefícios da CUR para a saúde são impedidos por vários problemas práticos. Um dos maiores é referente à sua baixa biodisponibilidade decorrente de sua limitada solubilidade aquosa em pH fisiológico e a presença de sítios lábeis ao metabolismo, fazendo com que a mesma sofra metabolismo hepático de primeira passagem, impedindo seu uso como agente funcional. Também apresenta fotossensibilidade e baixa estabilidade (SANTIAGO et al., 2015; PAN et al., 2020).

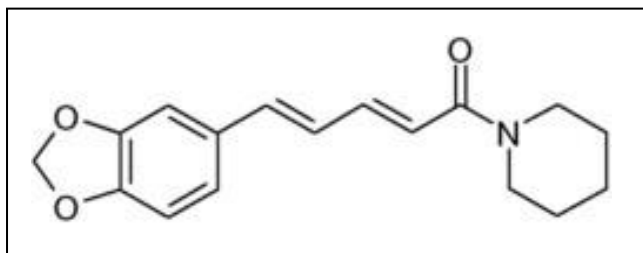
Várias estratégias para melhorar a biodisponibilidade da CUR foram testadas, como dispersões sólidas, complexação com ciclodextrinas, formação de nanopartículas lipídicas e poliméricas (MARQUES et al., 2020; PAN et al., 2020). Essas alternativas melhoram as propriedades desfavoráveis do fármaco e apresentam vantagens, incluindo 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 DA PIPERINA

Piperina (Figura 2) é o principal alcaloide extraído da *Piper nigrum* L. e *Piper longum* L., conhecida como pimenta-do-reino ou pimenta preta e pimenta longa, respectivamente. Há muitos anos, foi aceita como umas das especiarias mais comuns usadas na culinária e medicina popular no mundo todo (OLIVEIRA; ALENCAR-FILHO; VASCONCELLOS, 2014, CHAUHAN et al., 2018, ESPOSITO et al., 2019).



FIGURA 2: Estrutura química da piperina



Fonte: SCHMIDT ey al., 2020

É caracterizada como uma substância sólida, insolúvel em água e com estrutura molecular  $C_{17}H_{19}NO_3$  (BIDARISUGMA et al., 2011).

Apresenta muitas atividades biológicas importantes, como antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante e antiproliferativa (OLIVEIRA; ALENCAR-FILHO; VASCONCELLOS, 2014, CHAUHAN et al., 2018, SCHMIDT ey al., 2020). É conhecida por prevenir o desenvolvimento de vários tipos de câncer, como o de mama, pulmão, próstata, estômago, câncer retal e outros (ESPOSITO et al., 2019). Sua atividade antitumoral se deve à inibição da proliferação, migração, promoção à apoptose, potencialização da ação citotóxica de quimioterápicos e por reverter a resistência a múltiplas drogas (SCHMIDT ey al., 2020).

A co-administração da piperina promove um efeito sinérgico, pois melhora a biodisponibilidade de outras substâncias bioativas aumentando a eficácia terapêutica dessas substâncias, como a curcumina. Essa sinergia se dá por meio da modulação do metabolismo enzimático em nível de citocromo P450 (BIDARISUGMA et al., 2011, OLIVEIRA; ALENCAR-FILHO; VASCONCELLOS, 2014, CHAUHAN et al., 2018).

Em investigações anteriores, a co-administração de piperina e curcumina aumentou a biodisponibilidade da curcumina em 200% em humanos e 154% em animais, sendo esse aumento resultado da absorção e redução do metabolismo da curcumina (CHAUHAN et al., 2018).

## 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);
- 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 Zeta sizer Nanoseries 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<sup>®</sup>, MILLIPORE, Bedford, Estados Unidos);
- Sonicador de ponteira (SONICS VIBRA-CELL, modelo VC 505, Connecticut, Estados Unidos)

### 4.2 SUBSTÂNCIAS E REAGENTES

#### 4.2.1 Fármacos

- Curcumina (CUR ≥ 98,0% de pureza, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- Piperina (PIP ≥ 95,0% de pureza, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)

#### 4.2.2 Produção das Nanopartículas

- Poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL,  $\overline{Mw}$  10.000-14000 g.mol<sup>-1</sup>, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, Estados Unidos);
- Polietilenoglicol 6000 (PEG,  $\overline{Mw}$  5.400-6.600 g.mol<sup>-1</sup>, CROMATO PRODUTOS QUÍMICOS, Diadema, Brasil);
- Poli(álcool vinílico)
- Diclorometano P.A (VETEC QUÍMICA FINA, Rio de Janeiro, Brasil);
- Água ultrapura – Sistema Milli-Q<sup>®</sup> (MILLIPORE, Bedford, Estados Unidos).

#### 4.2.3 Produção do pó microparticulado

- Manitol

#### 4.2.4 Demais reagentes

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

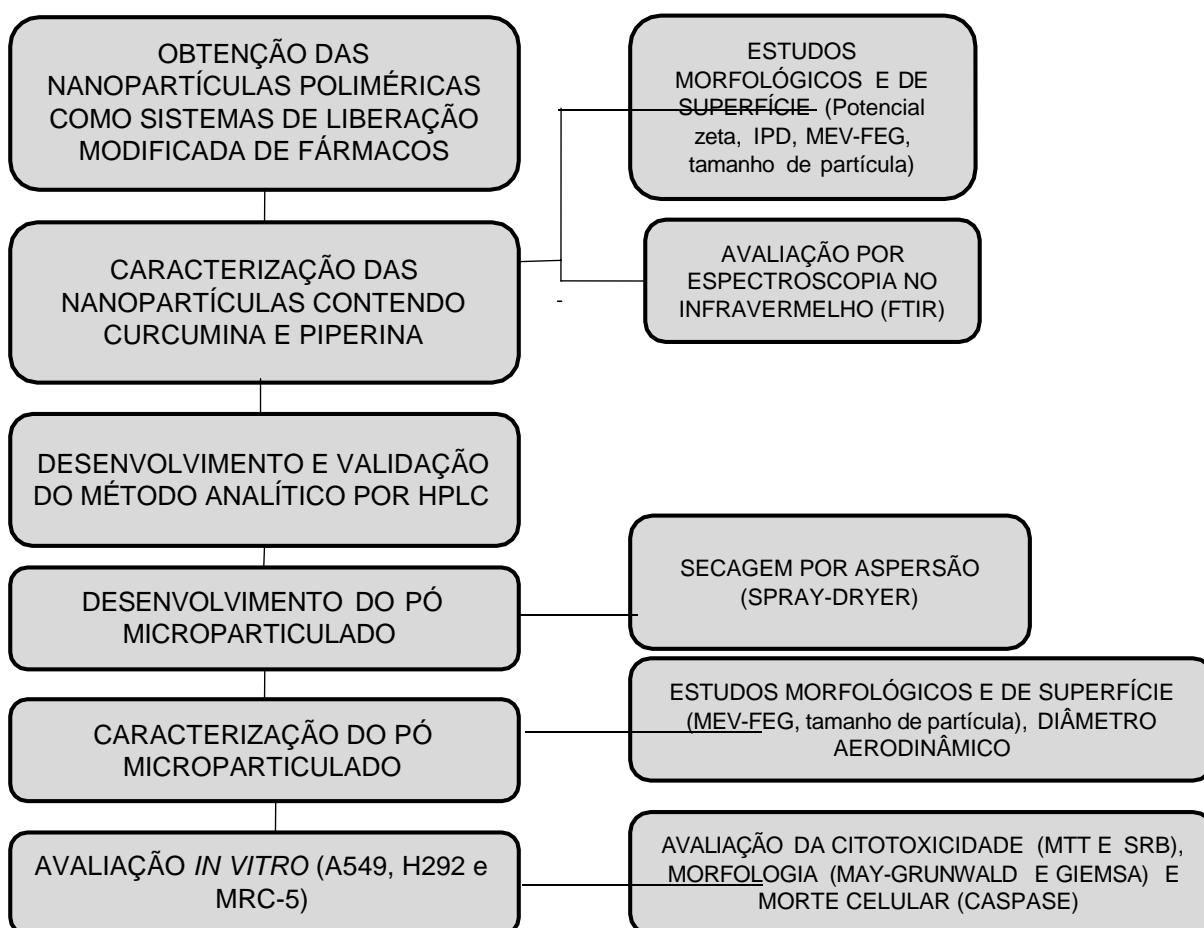
#### 4.2.5 Cultivo celular

- Meio RPMI1640 (Vitrocel);
- Meio DMEM (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).

### 4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

As etapas da pesquisa estão descritas no fluxograma da Figura 3.

FIGURA 3 – Fluxograma das etapas da pesquisa



Fonte: A autora

### 4.4 OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS CONTENDO CURCUMINA E PIPERINA

Nanopartículas obtidas a partir dos polímeros PCL e PEG contendo CUR e PIP foram preparadas pelo procedimento de nanoemulsão. Inicialmente, a fase orgânica (FO) foi preparada deixando os polímeros PCL (0,09 g) e PEG (0,01 g) e os fármacos CUR (0,015 g) e PIP (0,015 g) em agitação magnética com 10 mL de diclorometano até completa solubilização. A fase aquosa (FA) foi preparada a partir de uma solução de poli(álcool vinílico) (PVA) a 0,5% em água destilada. Após, a FO foi lentamente vertida em 40 mL de FA sob sonicação utilizando um sonicador de

ponteira em banho de gelo operando nas seguintes condições: amplitude 80%, 3 ciclos de 1 minuto com 30 segundos de repouso. A nanoemulsão foi submetida à rotaevaporação (30 minutos) para completa retirada do solvente orgânico. O volume foi completado para 50 mL com água destilada. Foram feitas duas formulações, NCP-1 com concentração final de CUR e PIP a 0,3 mg/mL e NCP-0, sem adição dos fármacos, como controle negativo. Todas as formulações foram preparadas em triplicata e protegidas da luz.

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

Tabela 1 – Composição das formulações de nanopartículas contendo CUR e PIP

Formulação	FASE ORGÂNICA				FASE AQUOSA	
	CUR (g)	PIP (g)	PCL (g)	PEG (g)	Diclorometano (mL)	Sol. PVA 0,5% (mL)
NCP-1	0,015	0,015	0,09	0,01	10	40
NCP-0	---	---	0,09	0,01	10	40

Fonte: A autora

#### 4.4.1 Mistura física

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

### 4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

#### 4.5.1 Análises morfológicas e de superfície

##### 4.5.1.1 Determinação do diâmetro médio 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 da nanoemulsão em água purificada (1:500). 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).

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

A caracterização morfológica das nanoemulsões contendo CUR e PIP 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 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 10 mA.

#### 4.5.2 Avaliação por espectroscopia no infravermelho

As nanopartículas poliméricas contendo CUR e PIP, foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho, em pastilha com KBr. As amostras foram gotejadas na pastilha de KBr grau espectroscópico (2% m/m), no equipamento IR Prestige-21 (Shimadzu), 32 scans.min<sup>-1</sup>, resolução de 4 cm<sup>-1</sup>. 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.

### 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 C<sub>18</sub> (PHENOMENEX, modelo Synergi 4 µ Polar – RP 80Å, |Lc Column 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula 4

$\mu\text{m}$ , Torrance, EUA) com pré-coluna cromatográfica (PHENOMENEX, 4  $\mu$  Polar – RP 80 Å, 10 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula 4  $\mu\text{m}$ , Torrance, EUA). 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 262 nm.

As análises foram realizadas em modo isocrático de concentração utilizando como fase móvel acetonitrila:água acidificados com 2% de ácido fórmico (55:45 v/v), com fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup> e tempo de corrida de 12 minutos.

#### 4.6.2 Preparo das Soluções Padrão

A solução padrão estoque de CUR e PIP foi preparada em metanol, 500,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Diluições usando fase móvel acetonitrila:água acidificados com 2% de ácido fórmico (55:45 v/v), foram realizadas com objetivo de obter soluções com concentração de 25, 30, 35, 40 e 45  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , onde a concentração de 35  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (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  $\mu\text{m}$  x 22 mm, Macherey-Nagel GNBH & Co. KG, Düren, Alemanha).

#### 4.6.3 Desenvolvimento e Validação do Método para Quantificação de CUR e PIP

Para avaliar a melhor condição para a corrida cromatográfica, foi realizado um experimento em gradiente exploratório, variando a concentração de acetonitrila acidificado com 2% de ácido fórmico de 5 a 100% em 60 minutos. Após isso, as condições cromatográficas foram otimizadas para se obter melhor resolução dos picos para CUR e PIP.

A validação do método analítico por HPLC foi realizada segundo os critérios propostos pelo *International Conference on Harmonisation* (ICH, 2005) e pela Resolução 166 de 24 de julho de 2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 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 e PIP (25, 30, 35, 40, 45  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). 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 1 e 2.

$$LD = \frac{3,3xDP}{B} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{10xDP}{B} \quad (2)$$

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, a concentração considerada ponto médio da curva (35  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) foi analisada em sextuplicata para a CUR e PIP, 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 e PIP (35  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), 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 (2mg) à solução-estoque (200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Alíquotas da solução-estoque de ambos os fármacos (CUR e PIP) foram diluídas resultando nas concentrações 26  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 36  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 44  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . As soluções foram elaboradas em triplicata e os resultados foram expressos como porcentagem de recuperação.

Para a avaliação da robustez, a concentração de 35  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de CUR e PIP foi submetida a diferentes condições de fluxo da fase móvel e concentração da fase móvel e avaliadas em triplicata. O fluxo foi modificado de 1,000  $\text{mL.min}^{-1}$  para 0,995  $\text{mL.min}^{-1}$  e para 1,005  $\text{mL.min}^{-1}$ . A concentração da fase móvel acetonitrila:água acidificadas com 2% de ácido fórmico foi modificada de 55:45 (v/v) para 54:46 (v/v) e 56:44 (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 OBTENÇÃO DO PÓ MICROPARTICULADO CONTENDO NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE CURCUMINA E PIPERINA

Para obter o pó microparticulado contendo nanopartículas poliméricas de CUR e PIP foi deixado em agitação 50 mL de nanoemulsão com 10% de manitol (5 g) por 12 horas. A secagem por aspensão ocorreu em equipamento Spray Dryer operando nas seguintes condições: temperatura de entrada de 60°C; temperatura de saída de 60°C; taxa de alimentação de 0,15 mL; fluxo do ar de secagem 2 m<sup>3</sup>/min (DOMINGUES et al., 2008). Após, o pó foi passado em tamis malha 50 e armazenado em dessecador a temperatura ambiente, em recipiente hermeticamente fechado e ao abrigo da luz.

##### 4.7.1 Mistura física

Misturas físicas entre o manitol, os polímeros utilizados (PCL de PEG) e os fármacos (CUR e PIP) foram preparadas para a caracterização comparativa entre os pós. Foram elaboradas misturas físicas na proporção, em massa de 1:1:1 (Manitol:PCL:PEG) e 1:1:1:1:1 (Manitol:CUR: PIP:PEG:PCL).

##### 4.7.2 Rendimento

O rendimento foi calculado por meio da massa inicial da mistura entre os sólidos presentes da formulação de nanopartícula com o manitol e a massa final após passar pelo processo de secagem por aspensão.

##### 4.7.3 Determinação de umidade

O conteúdo de água presente nas formulação NCP-0 e NCP-1 foi avaliado na balança de umidade por infravermelho (SHIMADZU, modelo MOC63u, Quioto,

Japão). Previamente, a termobalança foi calibrada, conforme as indicações do fabricante. Para cada amostra, uma massa de aproximadamente 1 g, foi colocada em um prato de alumínio e mantida em aquecimento a 130°C, durante um período de tempo variável, até massa constante. O valor em porcentagem referente à perda de massa foi calculado como sendo o teor de umidade da amostra.

#### 4.8 CARACTERIZAÇÃO DO PÓ MICROPARTICULADO CONTENDO NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE CURCUMINA E PIPERINA

##### 4.8.1 Análise morfológica e de superfície

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

A caracterização morfológica do pó microparticulado contendo nanopartículas poliméricas de CUR e PIP foi realizada usando microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão por efeito de campo, com aumento de 2 a 8 kx (MEV-FEG-TESCAN, modelo MIRA 3, Brno, República Checa). As amostras foram depositadas sobre o *stub* polido 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.

###### 4.8.1.2 Determinação do diâmetro médio das micropartículas

O diâmetro médio das micropartículas foi determinado usando o Image J software (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), a partir da medição de 100 partículas, de formato esférico, encontradas numa área escolhida em micrografias. O cálculo do valor de Span foi realizado de acordo com a Equação 3 para verificar a dispersão granulométrica das micropartículas.

$$= (d(v,90) - d(v,10)) / d(v,50) \quad (3)$$

Onde  $d(v,10)$ ,  $d(v,50)$  e  $d(v,90)$  correspondem, respectivamente, ao diâmetro das partículas a 10%, 50% e 90% da distribuição acumulada para a amostra.

#### 4.8.1.3 Análise por difração de raios X (DRX)

O pó microparticulado, 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  $2\theta$  de  $5^\circ$  a  $80^\circ$ , 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.

#### 4.8.1.4 Determinação do diâmetro aerodinâmico das micropartículas

Para calcular o diâmetro aerodinâmico das partículas, a densidade aparente foi determinada usando uma proveta graduada de 25 mL. Uma quantidade de pó foi pesada e adicionada na proveta, em seguida foram deferidas batidas até a completa compactação do pó, sem a variação de volume. As medições foram realizadas em triplicata. Para calcular a densidade a equação 4 foi usada:

$$d = m/v \quad (4)$$

Onde  $d$  é a densidade calculada,  $m$  é a massa pesada e  $v$  é o volume.

O diâmetro aerodinâmico teórico ( $d_{\text{aero}}$ ) das micropartículas foi calculado a partir do tamanho geométrico das partículas ( $d_{\text{geo}}$ ) obtidas pelo Image J software e a densidade compactada ( $\rho$ ) usando a equação 5:

$$d_{\text{aero}} = d_{\text{geo}} \sqrt{\left(\frac{\rho}{\rho_0}\right)} \quad (5)$$

Onde  $\rho_0 = 1\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$

### 4.9 ENSAIO BIOLÓGICO *IN VITRO* - CULTIVO CELULAR

#### 4.9.1 Cultura das linhagens A549, NCI-H292 e MRC-5

As células A549 foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro/RJ e as células NHI-H292 e MRC-5 foram adquiridas do Instituto Adolfo Lutz/SP.

A linhagem celular A549, são células de adenocarcinoma pulmonar humano.

As células NCI-H292 são provenientes de carcinoma mucoepidermoide pulmonar humano e a linhagem MRC-5 são consideradas células fibroblastos com características de célula normal, ou seja, não tumoral, que originalmente foram obtidas de tecido pulmonar humano.

A linhagem NCI-H292 foi cultivada em meio RPMI pH 7,4, contendo soro fetal bovino (SFB) a 10%, suplementado com  $24 \text{ mmol.L}^{-1}$  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 linhagens A549 e MRC-5, foram cultivadas em meio DMEM pH 7,4, contendo soro fetal bovino (SFB) a 15%, suplementado com 3,5 mg/mL de glicose, 2 mg/mL de bicarbonato de sódio e 10.000 U de penicilina e 10 mg de estreptomicina por litro. As culturas foram mantidas em estufa umidificada a  $37^{\circ}\text{C}$  com atmosfera de  $\text{CO}_2$  a 5%.

#### 4.9.2 Determinação da citotoxicidade das nanopartículas contendo curcumina e piperina – Formulação NCP-1

Para avaliar a citotoxicidade da formulação NCP-1, as células A549, NCI-H292 e MRC-5 ( $5 \times 10^4$  células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h para completa adesão celular. Após este período as células foram tratadas pelo período de 72 horas com diferentes concentrações da formulação NCP-1 (Tabela 2), sendo a viabilidade celular determinada por meio dos ensaios de redução de MTT e SBR. Para obtenção das concentrações a formulação NCP-1 foi diluída nos respectivos meios de cultivos das diferentes linhagens.

Optou-se por trabalhar na unidade  $\mu\text{g/poço}$  para melhor compreensão da concentração aplicada nas células. Para fim de comparação, a Tabela 3 apresenta as mesmas concentrações convertidas para a unidade  $\mu\text{g/mL}$ .

Tabela 2 – Concentrações de NCP-1 em  $\mu\text{g/poço}$  utilizadas nos ensaios de citotoxicidade

<b>Linhagem</b>	<b>Concentração <math>\mu\text{g/poço}</math> NCP-1</b>			
A549	0,5	0,75	1,0	2,0
NCI-H292	0,5	0,75	1,0	2,0
MRC-5	0,5	1,0	2,0	4,0

Fonte: A autora

Tabela 3 – Concentrações de NCP-1 em µg/mL utilizadas nos ensaios de citotoxicidade

Linhagem	Concentração µg/mL NCP-1			
	2,5	3,75	5,0	10,0
A549	2,5	3,75	5,0	10,0
NCI-H292	2,5	3,75	5,0	10,0
MRC-5	2,5	5,0	10,0	20,0

Fonte: A autora

#### 4.9.2.1. Ensaio de redução de MTT

O ensaio de redução do reagente MTT [3-(4,5 dimetiliazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo] permite determinar de maneira indireta a viabilidade celular por meio da avaliação do metabolismo celular. Este ensaio foi realizado conforme descrito por Mosmann (1983).

Após o período de tratamento de 72 horas, 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. 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.

$$\% = \frac{A_{\text{é s}}}{A_{\text{s}}} \times 100$$

#### 4.9.2.2 Ensaio de coloração de proteínas

O ensaio colorimétrico empregando-se a sulforodamina B (SRB) foi realizado conforme descrito por Papazisis et al. (1997), neste ensaio a viabilidade celular é determinada pela coloração das proteínas celulares com o corante SRB, após fixação com ácido tricloacético (TCA) 10%.

Decorrido o tempo de incubação do 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 adicionados 200 µL de TCA 10% gelado e as placas foram colocadas na geladeira por 30 minutos, para fixação das células nos poços das placas de cultivo. Após, os poços foram lavados três vezes com 200 µL de água destilada e colocadas para secar por 24 horas em temperatura ambiente. Na sequência, foram adicionados 200 µL de uma solução de SRB 0,2% e aguardado 30 minutos.

Para retirar o excesso do corante as placas foram lavadas (5x) com 200 µL de ácido acético 1% e colocadas para secar por 30 minutos. As proteínas coradas foram solubilizadas em 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.

$$\% = \frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \times 100$$

#### 4.9.2.3 Determinação de IC<sub>50</sub>

A concentração da formulação contendo CUR e PIP (NCP-1) necessária para produzir 50% de redução na viabilidade celular (IC<sub>50</sub>) foi calculada utilizando o software StatPlus (versão 5.9.8), empregando-se a análise de sobrevivência pela regressão de Probit, método de Finney (FINNEY, 1971). Os resultados foram expressos em IC<sub>50</sub> ± erro padrão da média.

#### 4.9.2.4 Índice de seletividade (IS)

IS é um valor obtido como a razão entre o IC<sub>50</sub> obtido para linhagens não tumorais (MRC-5) e as linhagens tumorais (A549 e NCI-H292).

O IS foi calculado para as 2 linhagens tumorais em estudo no período de 72 horas de tratamento, a partir do teste de citotoxicidade de redução do MTT.

#### 4.9.3 Avaliação morfológica das células tratadas com as nanopartículas contendo curcumina e piperina – Formulação NCP-1 por microscopia óptica de luz.

Para análise morfológica das linhagens A549 e NCI-H292 tratadas com a formulação NCP-1 foi utilizado a coloração de May-Grunwald e Giemsa. Para tanto as células foram semeadas em placas de 24 poços sobre a lamínula circular na densidade de  $3 \times 10^4$ /poço/500  $\mu$ L de meio de cultura RPMI para NCI-H292 e DMEM para A549. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas para completa adesão celular.

Após, as células foram tratadas com a formulação NCP-0, NCP-1 nas concentrações do valor encontrado de IC<sub>50</sub> para cada célula, ou seja, de 2,8  $\mu$ g para células A549 e 1,6  $\mu$ g para células NCI-H292 e também com o fármaco metotrexato (MTX), como controle positivo. As células cultivadas apenas com meio de cultivo constituíram o controle negativo. As células foram incubadas pelo período de 18 horas. Após esse tempo, foi retirado o meio de cultura, as células foram lavadas com PBS e em seguida foram fixadas com formaldeído por 10 min.

Na sequência as células foram lavadas com PBS e, deixadas por 6 min para a adequada coloração com o corante May-Grunwald. Após esse tempo, o corante foi retirado com água para lavagem das lamínulas. Depois dessa etapa, o corante Giemsa diluído 1/10 foi adicionado sobre as lamínulas cobrindo-as por 15 min. Após, realizou-se lavagem e secagem em temperatura ambiente para posterior avaliação em microsópio óptico.

As lamínulas foram colocadas sobre lâminas e vedadas com esmalte e a visualização foi feita em microscópio óptico.

#### 4.9.4 Determinação da ativação de caspase 3 e 7 das células tratadas com as nanopartículas contendo curcumina e piperina – Formulação NCP-1

A determinação da atividade das caspases 3 e 7 foi realizada empregando-se o kit reagente CellEvent™ Caspase 3 e 7 (ThermoScientific) seguindo procedimento instruído pelo fornecedor.

As linhagens A549 e NCI-H292 foram plaqueadas a uma concentração de  $3 \times 10^4$  células/poço e tratadas com a concentração do CI<sub>50</sub> encontrada para cada célula (2,8  $\mu$ g para A549 e 1,6  $\mu$ g para NCI-H292). Após 1h 30 min, o meio foi substituído pelo reagente CellEvent Caspase 3 e 7 (2  $\mu$ M em PBS) e incubado por 1h e 30min em condições de cultivo. Meio de cultivo RPMI e DMEM foram utilizados

como controle. A análise foi realizada em microscópio de fluorescência.

#### 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Software estatístico GraphPadPrism versão 5.03 (San Diego, CA, EUA). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) ou média  $\pm$  desvio padrão (DP). Por meio da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste POST-HOC de Tukey, 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 NANOPARTÍCULAS CONTENDO CURCUMINA E PIPERINA

Pela análise macroscópica, as nanoemulsões apresentaram um aspecto leitoso e opalescente. A formulação que continha CUR, devido à sua forte coloração amarela (SANTIAGO, et al., 2015), apresentou um aspecto amarelo intenso com formação de espuma durante o processo de sonicação.

### 5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

#### 5.2.1 Análises morfológicas e de superfície

##### 5.2.1.1 Determinação do diâmetro médio e do potencial zeta

Os resultados obtidos de tamanho de partícula, índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta (PZ) podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4: Tamanho de partícula, índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta (PZ) das formulações

Formulação	Tamanho de partícula±DP (nm)	IPD±DP	PZ±DP (mV)
NCP-0**	244,50±23,00	0,135±0,18	-11,30±1,6
NCP-1	223,70±21,00	0,117±0,15	-14,6±2,2

Fonte: A autora

\*\*Controle negativo das nanocápsulas poliméricas

O tamanho apresentado para as formulações (223,70 e 244,50 nm) ficou dentro do considerado adequado para nanopartículas que carregam fármacos. De acordo com os autores Gupta & Kompella (2006), as nanopartículas devem possuir diâmetros menores que 300 nm para que aconteça de maneira eficiente o transporte de substâncias ativas.

Valores próximos foram encontrados em alguns estudos com o mesmo polímero (PCL) e fármacos (CUR e PIP).

Domingues et al (2008) obtiveram valores de diâmetro médio de partícula de 374 nm. No referido trabalho, os autores prepararam nanopartículas a partir do polímero PCL, para posterior incorporação do fármaco indometacina.

Moorthi et al (2012) prepararam nanopartículas de curcumina e piperina utilizando diferentes métodos. Obtiveram valores de diâmetro médio de partícula de 321 nm para a formulação a partir do método de hidratação de película fina, utilizando também o sonicador.

Chassot et al (2014) relataram valores de 242 e 260 nm para nanopartículas com PCL e dipropionato de beclometasona para liberação pulmonar.

Determinados trabalhos publicados com o desenvolvimento de nanopartículas para liberação pulmonar (BAGHDAN et al., 2019; NOZOHOURI et al., 2019), mostraram valores de partículas menores de 200 nm, porém valores maiores também foram reportados em algumas publicações, e essa diferença pode ser explicada pela quantidade de polímero utilizada em sua formação. A resposta mais coerente seria em relação às unidades das cadeias poliméricas que se agregam e permanecem associadas durante o processo de difusão com o aumento da concentração do polímero, levando à formação de partículas maiores (SOUZA et.al., 2012).

Em adição à justificativa do tamanho, a presença do polímero PEG na composição das nanopartículas torna a fase orgânica mais viscosa interferindo em sua dispersão na fase aquosa durante o processo de formação da partícula, gerando assim nanopartículas com diâmetros maiores (MAINARDES, 2007).

Para liberação pulmonar, a absorção passiva de nanopartículas é um processo que depende do tamanho. Partículas com diâmetro próximo a 200 nm podem internalizar-se nas células tumorais de pulmão por endocitose (ABDELRAHY et al., 2019).

Baseado nessa informação pode-se inferir que os valores obtidos para tamanho médio de partícula estão satisfatórios para a liberação pulmonar.

As formulações apresentaram característica monodispersa (AVADI et al., 2010), pois os valores de IPD ficaram próximos a 0 (NPC-0 0,135 e NCP-1 0,117).

NCP-0 e NCP-1 mostraram valores para potencial zeta de -11,30 e -14,60 mV, respectivamente. Esses valores negativos são devido à presença de grupos carboxílicos, revelando uma natureza aniônica dos polímeros (SCHAFFAZICK et al., 2003).

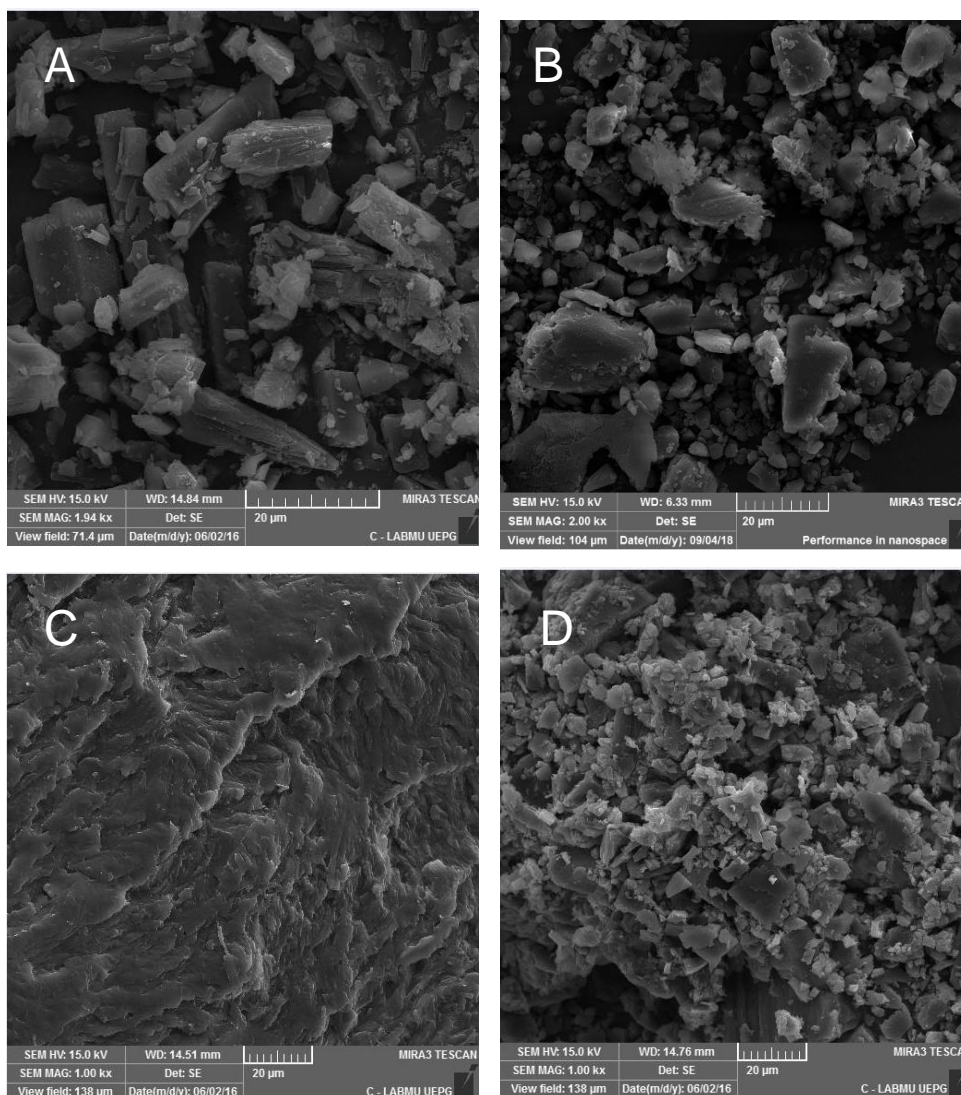
A análise de potencial zeta permite identificar as cargas elétricas que se encontram na superfície das nanopartículas. Partículas são consideradas estáveis quando o valor do potencial zeta for próximo a 30 mV (NEVES et al., 2013).

Como o produto final desse trabalho são as nanopartículas em um sistema microparticulado na forma de pó, a estabilidade delas em suspensão não é um fator de importância.

#### 5.2.1.2 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 4. A CUR pura (A) apresentou-se com uma morfologia cristalina. A PIP pura (B) também apresentou estrutura cristalina, com distribuição de tamanho não uniforme. Os péletes de PCL (C) apresentaram superfície irregular e o PEG 6000 (D) apresentou aglomerados cristalinos.

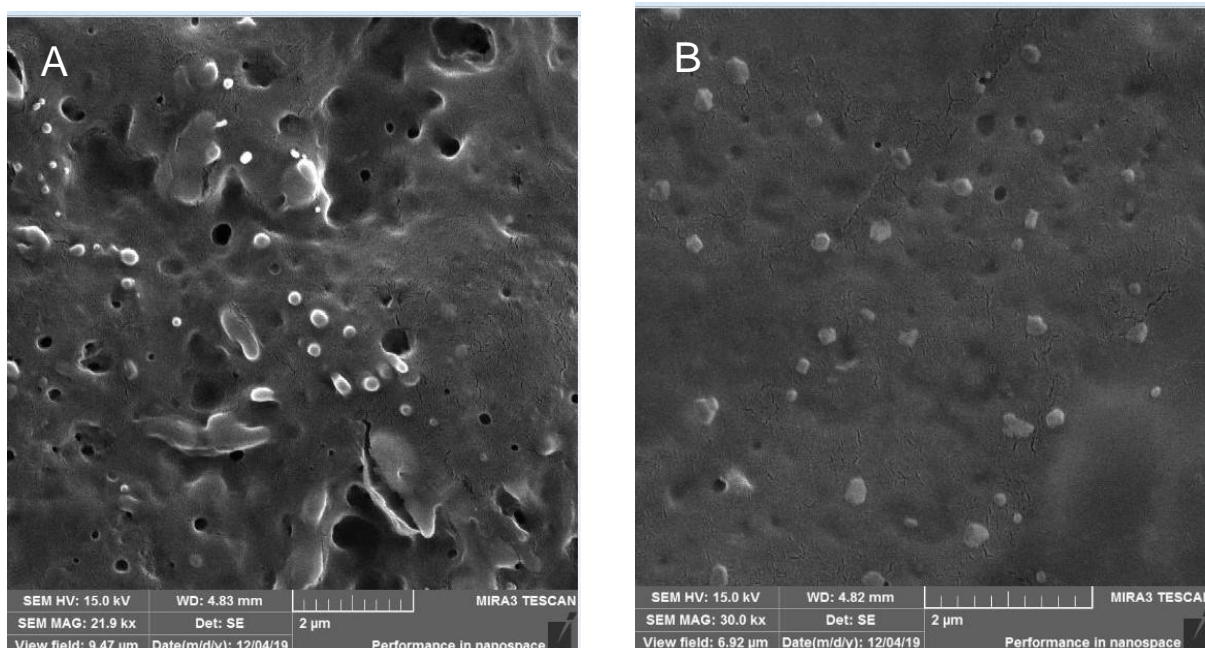
FIGURA 4- Aspectos morfológicos dos materiais de partida obtidos por MEV-FEG.: A) curcumina pura (aumento de 1.94 kX); B) metotrexato puro (aumento de 1.90 kX); C) PCL (aumento de 1.00 kX) e D) PEG 6000 (aumento de 1.00 kX)



Fonte: A autora

Por meio das fotomicrografias das nanopartículas representadas na Figura 5, as dimensões nanométricas foram comprovadas. Mesmo com a presença dos fármacos (CUR e PIP 0,3 mg/mL) na formulação NCP-1 (B), a morfologia das partículas mostrou-se similar à formulação NCP-0 (A). Ambas apresentaram nanopartículas esféricas, porém algumas com superfície irregular. Não houve presença de cristais livres dos fármacos (B) nem polímeros (A e B). Os tamanhos correspondem aos encontrados no método de espectroscopia de correlação de fótons para o tamanho de partícula.

FIGURA 5 - Fotomicrografias das nanopartículas obtidas por MEV-FEG: A) NCP-0 (aumento de 21.9kX) e B) NCP-1 (aumento de 30.0kX)



Fonte: A autora

### 5.3 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FTIR)

O estudo de FTIR é útil para identificar estruturalmente substâncias orgânicas por meio de suas ligações e grupos funcionais. Também é considerada uma ferramenta de grande importância em estudos de nanotecnologia farmacêutica, pois permite demonstrar possíveis interações moleculares entre fármacos e polímeros no processo de formação da nanopartícula quando comparado com as substâncias puras (LOPES; FASCIO, 2004).

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  $400\text{ cm}^{-1}$  (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

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

Os espectros FTIR obtidos a partir da análise do CUR, PIP, PEG de PCL estão representados na Figura 6.

A CUR apresentou banda intensa em  $3508\text{ cm}^{-1}$  indicando vibração do

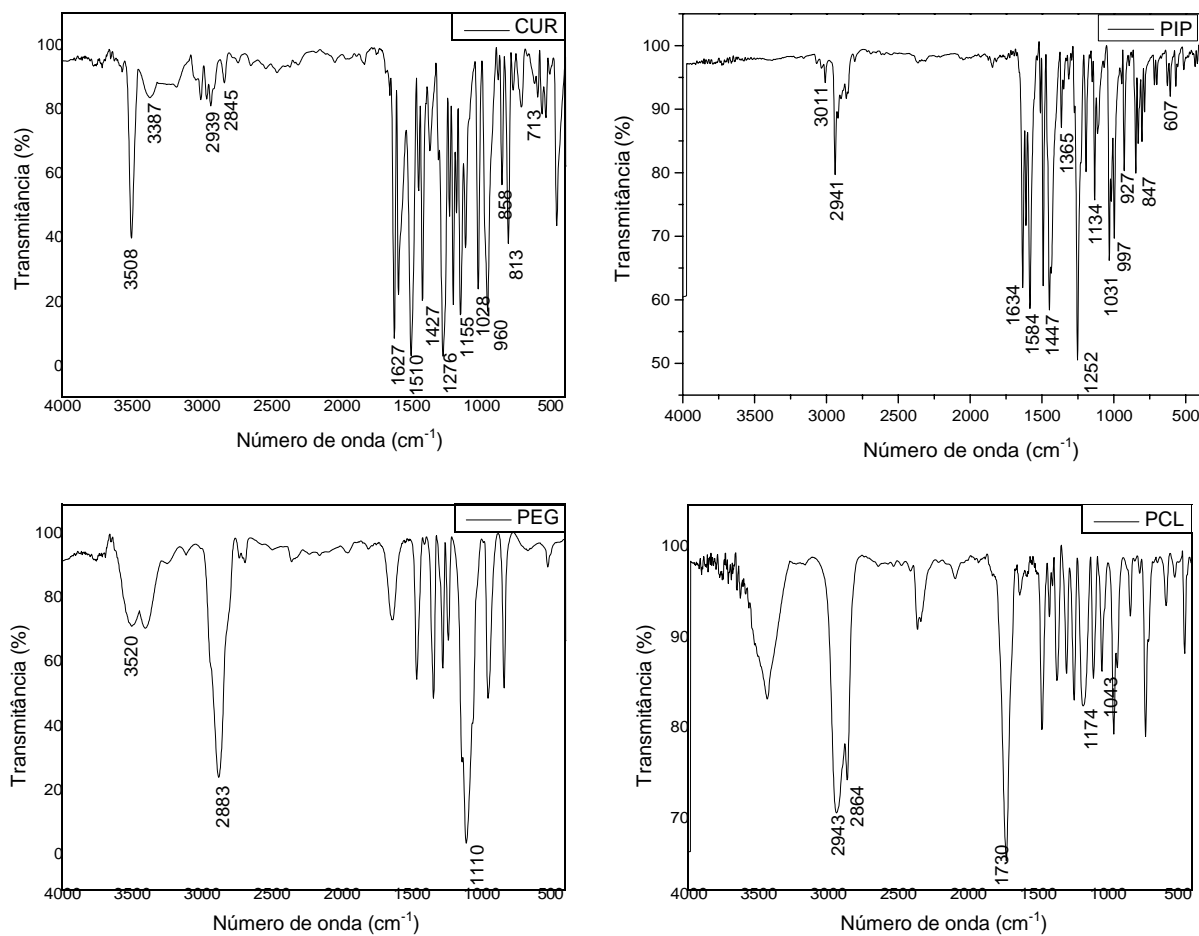
alongamento do grupo –OH. Em  $3387\text{ cm}^{-1}$  indica vibração do grupo OH livre do fenol. Vibrações do grupo carbonila e do estiramento da ligação C-C do anel de benzeno foi observado em  $1627\text{ cm}^{-1}$  e  $1510\text{ cm}^{-1}$  respectivamente. Em  $1427\text{ cm}^{-1}$  a CUR apresentou flexão da vibração do grupo CH ligado ao anel benzênico. Em  $1276\text{ cm}^{-1}$  indica vibração de C-O em  $1155\text{ cm}^{-1}$  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  $713\text{ cm}^{-1}$  indicam vibrações de flexão da ligação CH de grupos alcenos ( $\text{RCH}=\text{CH}_2$ ). 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 a PIP, foi observada uma banda em  $3011\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento aromático –CH. Em  $2941\text{ cm}^{-1}$ , banda de vibração de estiramento alifático assimétrico  $\text{CH}_2$ . A banda em  $1634\text{ cm}^{-1}$  é referente à vibração do estiramento simétrico C=C. Em  $1584\text{ cm}^{-1}$  foi encontrada uma banda de vibração aromática C=C. Vibrações de estiramento assimétrico e simétrico =C-O-C foram observados nas banda  $1252\text{ cm}^{-1}$  e  $1031\text{ cm}^{-1}$  respectivamente. Vibração de estiramento C-O foi observado em uma banda em  $927\text{ cm}^{-1}$  e vibração angular C-H em  $845\text{ cm}^{-1}$ . Esse espectro está em concordância com os autores Swapna et al. (2012), Saha et al. (2013), Pengpong et al. (2014) e Dahiya et al. (2018) que também reportaram dados próximos à esses.

O espectro do polímero PEG exibiu absorções características em  $3520\text{ cm}^{-1}$  referente aos grupos hidroxilas terminais –OH associados por pontes de hidrogênio, banda em  $2883\text{ cm}^{-1}$  referente ao grupamento C–H da cadeia alifática e vibração de estiramento assimétrico C-O-C de éteres dialquílicos em  $1110\text{ cm}^{-1}$ . 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  $1730\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde à vibração de deformação axial do grupamento C=O de ésteres alifáticos simples, as bandas em  $2943$  e  $2864\text{ cm}^{-1}$  correspondentes às vibrações simétricas e assimétricas do grupamento – $\text{CH}_2$ , respectivamente e bandas em  $1174$  e  $1043\text{ cm}^{-1}$  indicando estiramento C – O (PAIVA et al., 2012; HOIDY et al., 2010).

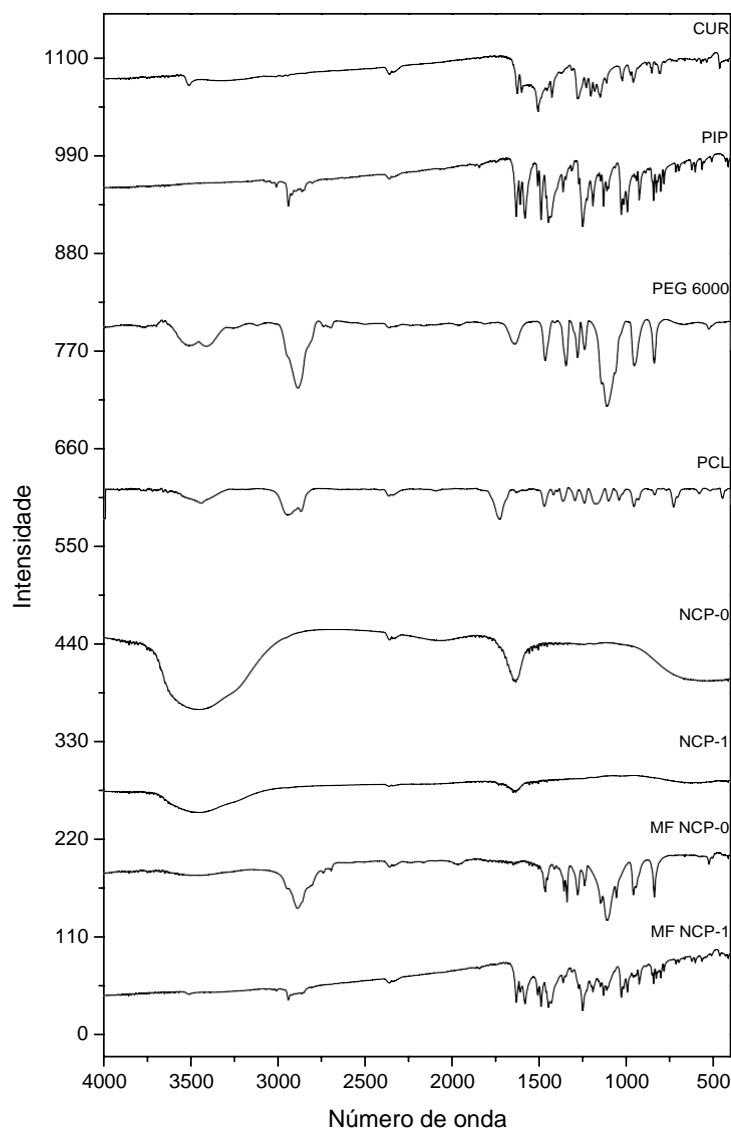
FIGURA 6: Espectro FTIR da CUR, PIP, PEG e PCL



Fonte: A autora

Os espectros comparativos de FTIR para os fármacos puros (CUR e PIP), polímeros puros (PEG e PCL), misturas físicas (MF NCP-0 e NCP-1) e formulações (NCP-0 e NCP-1) estão demonstrados na Figura 7.

FIGURA 7 - Espectro FTIR comparativo entre os fármacos puros (CUR e PIP), polímeros puros (PEG e PCL), misturas físicas (MF NCP-0 e MF NCP-1) e as formulações (NCP-0 e NCP-1)



Fonte: A autora

Os espectros das misturas físicas mostraram uma junção das principais bandas dos fármacos e polímeros puros. Nas formulações, uma banda alargada na região de  $3500\text{ cm}^{-1}$  apareceu, sendo resultado da presença de água da composição. Os picos referentes aos grupos funcionais dos fármacos apareceram com menor intensidade em razão do processo de formação das nanopartículas, sugerindo que, provavelmente, os fármacos estão em maior quantidade no interior das partículas (matriz polimérica) do que em sua superfície.

Como nenhuma banda, diferente das dos fármacos e polímeros puros surgiu, sugere-se que nenhuma ligação química entre os componentes da formulação foi



formada. Dessa forma a estrutura química dos fármacos foi preservada, garantindo inalteração à nível molecular.

#### 5.4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS NAS NANOPARTÍCULAS

Após corrida em gradiente exploratório, o modo mais adequado foi o isocrático e a fase móvel definida foi acetonitrila:água acidificados com 2% de ácido fórmico (55:45 v/v) e o fluxo de 1,000 mL.min<sup>-1</sup> 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.

##### 5.4.1 Linearidade

As curvas analíticas foram lineares nas concentrações de 25, 30, 35, 40, 45 µg.mL<sup>-1</sup> para CUR e PIP. A equação da reta representativa da linearidade para a CUR foi  $y = 28040x - 77201$  ( $n = 3$ ,  $r = 0,9995$ ) (Figura 8) e para a PIP foi  $y = 47309x - 10164$  ( $n = 3$ ,  $r = 0,9995$ ) (Figura 9).

FIGURA 8 - Representação gráfica da curva analítica média para a determinação da CUR obtida em HPLC ( $\lambda = 262$  nm) em fase móvel acetonitrila:água acidificados com 2% de ácido fórmico (55:45 v/v)

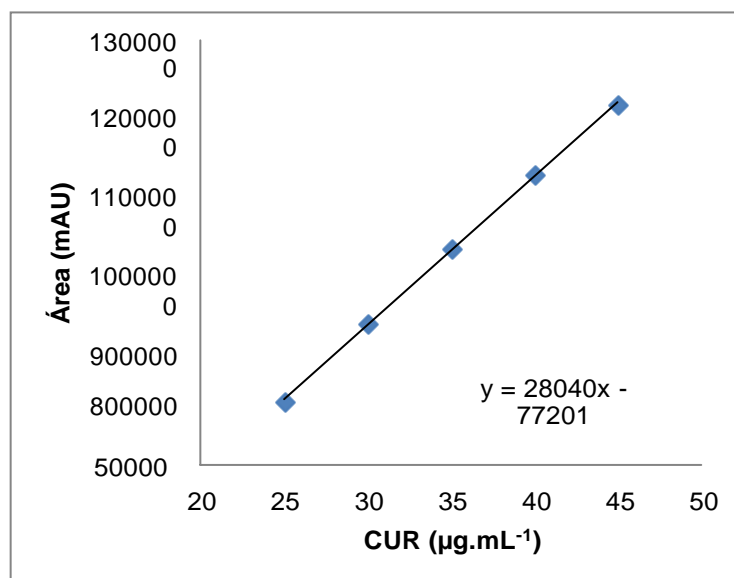
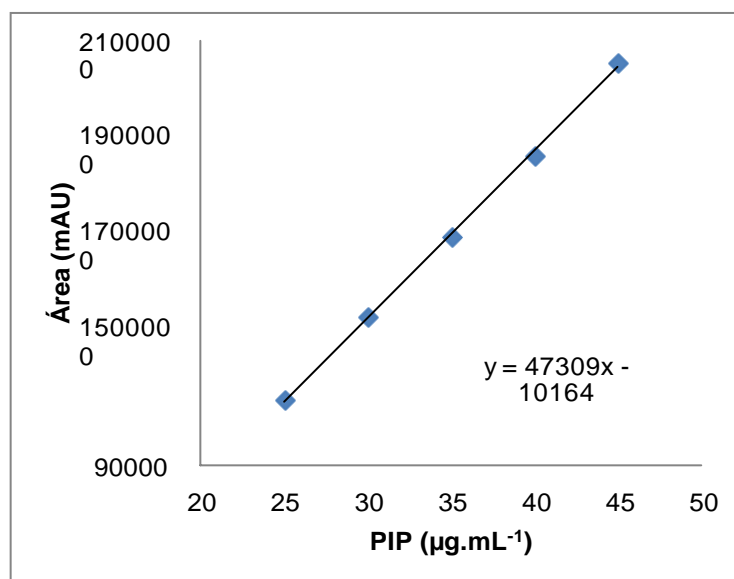


FIGURA 9 - Representação gráfica da curva analítica média para a determinação da PIP obtida em HPLC ( $\lambda = 262 \text{ nm}$ ) em fase móvel acetonitrila:água acidificados com 2% de ácido fórmico (55:45 v/v)



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 a CUR, os resultados da análise de variância (ANOVA) para a linearidade do método estão apresentados na Tabela 5 e para a PIP na Tabela 6.

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

	SS	DF	MS	F	F <sub>tab</sub>
Modelo	5,896983E+11	1	5,896983E+11	2584,028	3,136
Resíduo	2,966716E+09	13	2,282089E+08		Linear
Falta de ajuste	206658298	3	68886099	0,249582	2,728
Erro puro	2,760058E+09	10	276005772		Não há falta de ajuste

Fonte: A autora

Onde: SS: soma dos quadrados; DF: graus de liberdade; MS: média dos quadrados, F: valor F do teste; F<sub>tab</sub>: valor do F tabelado

TABELA 6: Resultados obtidos por ANOVA para linearidade do método analítico para a PIP

	SS	DF	MS	F	F <sub>tab</sub>
Modelo	1,678571E+12	1	1,678571E+12	1412,779	3,136
Resíduo	1,544575E+10	13	1,188134E+09		Linear
Falta de ajuste	1,246783E+09	3	415594480	0,292694	2,728
Erro puro	1,419896E+10	10	1,419896E+09		Não há falta de ajuste

Fonte: A autora

Onde: SS: soma dos quadrados; DF: graus de liberdade; MS: média dos quadrados, F: valor F do teste; F<sub>tab</sub>: valor do F tabelado

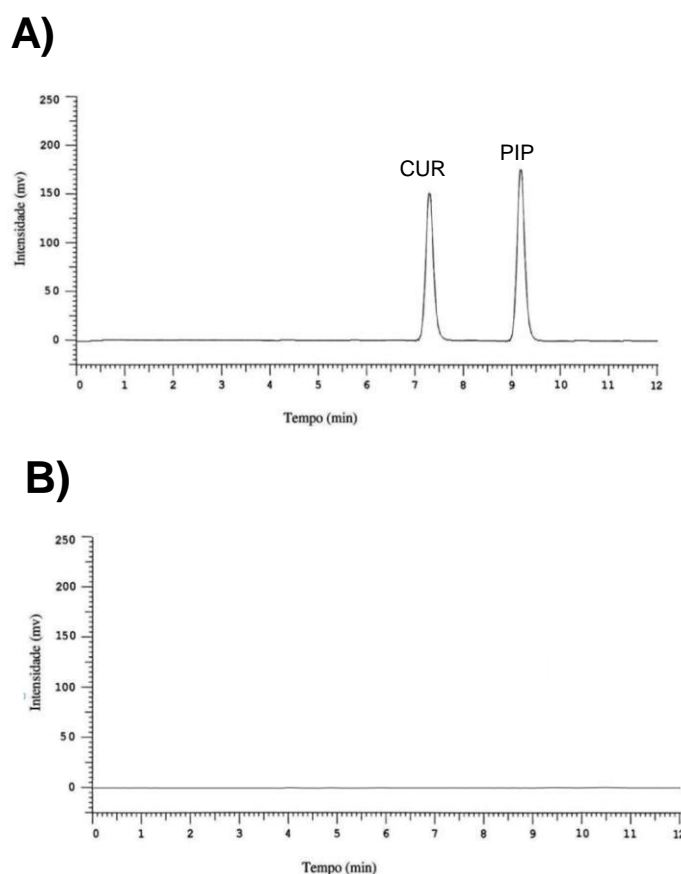
Para ser linear, o F do modelo precisa ser maior que o F tabelado e para não

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.

#### 5.4.2 Especificidade

Foi avaliada por meio de análises comparativas entre o cromatograma da formulação de nanopartículas sem CUR e PIP (NCP-0) e com CUR e PIP (NCP-1), como ilustrado na Figura 10.

FIGURA 10 - Cromatogramas ( $\lambda = 262 \text{ nm}$ ) comparativos das formulações (A) NCP-1 (CUR e PIP  $35,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e (B) NCP-0 em fase móvel acetonitrila:água acidificados com 2% de ácido fórmico (55:45 v/v).



Fonte: A autora

Quando comparados os cromatogramas obtidos, o método demonstrou-se específico e de acordo com as especificações da ANVISA (ANVISA, 2017) e do ICH (ICH, 2005).

### 5.4.3 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 1 e 2, os valores obtidos para o LD e LQ, foram 0,043 e 0,129  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente, para o CUR e 0,042 e 0,126  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente, para a PIP, indicando uma boa sensibilidade do método para a determinação dos analitos.

### 5.4.4 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 CUR estão demonstrados na Tabela 7. O desvio padrão relativo (DPR) da repetibilidade para a concentração média (n=6) foi inferior a 5% e para a precisão intermediária foi de 1,84%, 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** (%)
<b>Repetibilidade (n = 6)</b>	35	34,18 $\pm$ 0,35	1,03
<b>Precisão intermediária</b>			
<b>Intradia (n = 3)</b>	35	33,68 $\pm$ 0,69	2,06
<b>Interdia (n = 3)</b>	35	33,91 $\pm$ 0,46	1,35
<b>Diferentes analistas (n = 3)</b>	35	33,73 $\pm$ 0,82	2,44
<b>Média <math>\pm</math> DP* (n = 9)</b>	35	33,77 $\pm$ 0,62	1,84

Fonte: A autora

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

Para a PIP, os resultados estão apresentados na Tabela 8. O desvio padrão

relativo (DPR) para repetibilidade para as três concentrações foi inferior a 5% e para a precisão intermediária foi de 1,35%, indicando que o método desenvolvido é preciso dentro da faixa de concentração e das condições adotadas.

TABELA 8: Resultados obtidos para os ensaios de precisão na análise da PIP

	Concentração Teórica ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Concentração Experimental ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , Média $\pm$ DP*)	DPR** (%)
<b>Repetibilidade (n = 6)</b>	35	34,65 $\pm$ 0,34	0,98
<b>Precisão intermediária</b>			
<b>Intradia (n = 3)</b>	35	34,06 $\pm$ 0,27	0,78
<b>Interdia (n = 3)</b>	35	34,50 $\pm$ 0,33	0,95
<b>Diferentes analistas (n = 3)</b>	35	33,77 $\pm$ 0,21	0,64
<b>Média <math>\pm</math> DP* (n = 9)</b>	35	34,11 $\pm$ 0,46	1,35

Fonte: A autora

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

#### 5.4.5 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 PIP a uma solução de concentração conhecida dos mesmos. Os resultados de DPR para a CUR foi 2,43% e para PIP foi 1,90%. Os dois valores menores que 5% indicam que o método proposto é considerado exato.

#### 5.4.6 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  $1,000 \text{ mL.min}^{-1}$  e a concentração inicial da fase móvel acetonitrila:água acidificados com 2% de ácido fórmico (55:45 v/v) foram consideradas condições padrão. As alterações que o método sofreu estão demonstradas na Tabela 9.

TABELA 9 – Variações do método para avaliação da robustez para a CUR e para a PIP

VARIAÇÕES	CUR	PIP
	(DPR)	(DPR)
Fluxo de 1,000 mL.min <sup>-1</sup> para 0,995 mL.min <sup>-1</sup>	0,13%	0,30%
Fluxo de 1,000 mL.min <sup>-1</sup> para 1,005 mL.min <sup>-1</sup>	3,65%	1,91%
Fase móvel acetonitrila:água de 55:45 (v/v) para 54:46 (v/v)	3,65%	1,37%
Fase móvel acetonitrila:água de 55:45 (v/v) para 56:44 (v/v)	1,06%	1,06%

Fonte: A autora

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 da CUR e da PIP quando o método sofreu as alterações, portanto o método provou ser robusto para os fármacos analisados, sob as condições avaliadas.

## 5.5 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO (%EI) DOS FÁRMACOS NAS NANOPARTÍCULAS

A quantidade de CUR e PIP incorporada nas nanopartículas foi determinada por meio do método indireto. Após ultracentrifugação de 500 µL de formulação (NCP-1) a 6.000 rpm por 30 min, o sobrenadante foi lido no método previamente desenvolvido e validado. A eficiência de incorporação dos fármacos foi determinada após cálculo da diferença de concentração inicial menos a final e realizada em triplicata. Os resultados estão expressos na Tabela 10.

Tabela 10 – Eficiência de incorporação (%EI) de CUR e PIP nas nanopartículas

Formulação	Conc.teórica (µg.mL <sup>-1</sup> )		Conc. incorporada (µg.mL <sup>-1</sup> ) ± DP		%EI	
	CUR	PIP	CUR	PIP	CUR	PIP
	NCP-1	150	150	144,62±0,18	148,51±0,15	96,41

Fonte: A autora

## 5.6 OBTENÇÃO DO PÓ MICROPARTICULADO CONTENDO NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE CURCUMINA E PIPERINA

Após a secagem por aspersão da formulação de nanopartículas (NCP-0 ou NCP-1) com o manitol, obteve-se um produto com características de pó fino, solto, seco, de coloração branca quando utilizada a formulação NCP-0 e amarela para a NCP-1, devido à presença dos fármacos, principalmente a CUR.

A formulação do pó microparticulado contendo a formulação de nanopartículas poliméricas NCP-0 foi denominada MNCP-0 e a que continha a formulação NCP-1, denominada MNCP-1.

A formação de micropartículas a partir de nanopartículas é um sistema interessante e promissor dentro da área de tecnologia farmacêutica. Assim como as nanopartículas, micropartículas também apresentam vantagens frente aos sistemas convencionais de administração de fármacos (DOMINGUES et al.,2008; GARCIA, 2014)

Oferecem pronta distribuição em uma grande área de superfície mantendo níveis plasmáticos de fármaco mais constantes, melhora da biodisponibilidade com redução de toxicidade e proteção de substâncias ativas lábeis (BECK et al., 2008).

A utilização da técnica de secagem por aspersão com spray-drier é de boa escolha, pois é considerado um processo rápido e de etapa única, tendo possibilidade de transposição de escala (BECK et al., 2008).

Muitos trabalhos relataram os benefícios de preparar micropartículas carregadas com nanopartículas por meio de secagem por aspersão para produzir um pó seco para inalação e preservar as características físico-químicas das nanopartículas originais (BAGHDAN et al.,2019).

Uma das justificativas para o desenvolvimento de micropartículas a partir de estruturas nanométricas é que, apesar das inúmeras vantagens dos sistemas nanoparticulados, essas nanosuspensões aquosas demonstram alguns problemas durante o armazenamento, como maior possibilidade de contaminação microbiológica, hidrólise de polímero e aglomeração ou sedimentação das partículas, levando a uma instabilidade físico-química (BECK et al., 2008).

A utilização do manitol como formador do pó se dá pela justificativa desse carboidrato ser aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) e outros órgãos reguladores como excipiente para fins inalatórios, apresentar propriedades atóxicas

e ser facilmente dissolvido no ambiente pulmonar após a administração, liberando assim as nanopartículas que carregam substâncias ativas (GRENHA et al., 2005).

#### 5.6.1 Rendimenro

O rendimento médio ( $n=3$ ) obtido foi de 40,2%. Esse valor baixo é considerado habitual para o procedimento, uma vez que há muitas perdas durante o processo de secagem por aspersão (*spray-drying*).

#### 5.6.2 Determinação da umidade

O valor de umidade obtido para a formulação MNCP-0 foi 0,68% em 1min e 8 s de análise e de 0,78% para para a formulação MNCP-1 em 1min e 1 s. Esses resultados indicam que o processo de secagem foi efetivo na remoção do solvente empregado no processo de secagem por aspersão, deixando o pó com uma umidade relativamente baixa.

### 5.7 CARACTERIZAÇÃO DO PÓ MICROPARTICULADO CONTENDO NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE CURCUMINA E PIPERINA

#### 5.7.1 Análise morfológica e de superfície

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

As fotomicrografias do pó microparticulado contendo nanopartículas poliméricas de CUR e PIP estão demonstradas na Figura 11.

As imagens revelam a presença de estruturas micrométricas dispersas. Nos maiores aumentos (A e C), é possível ver a presença de cristais aglomerados. Esses cristais são de manitol e aparecem em grande quantidade, pois é o componente em maior concentração na formulação em relação ao total de sólidos.

A grande quantidade de manitol é importante para a formação do pó, pois assim há volume suficiente para passar no *spray-drier* e obter um produto com características satisfatórias.

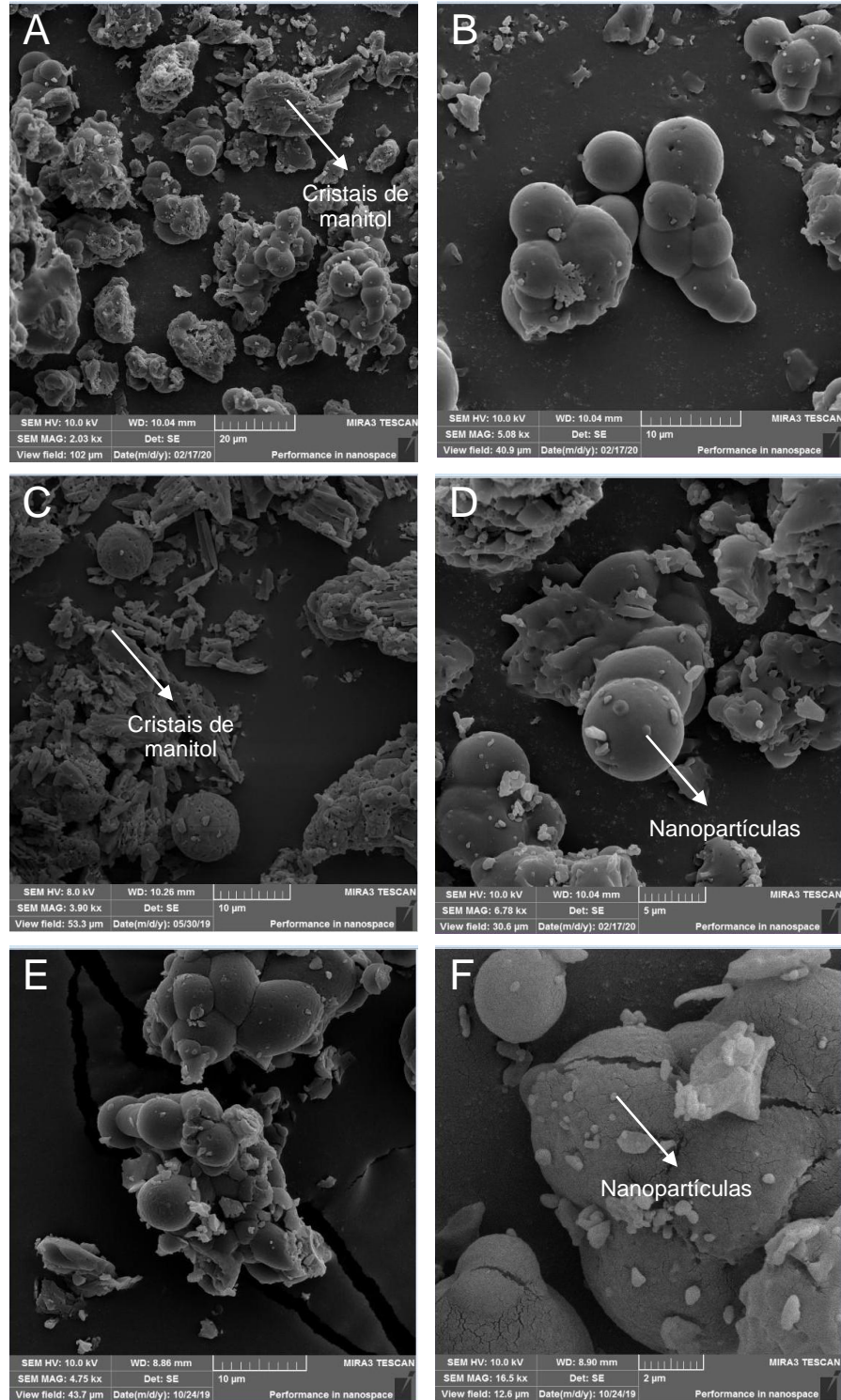


Em todas as imagens observa-se presença de micropartículas de formato esférico, sendo que algumas acabaram se fundindo. Provavelmente isso se deve ao método de secagem por aspersão, pois a suspensão ao passar através do bico atomizador pode não ter formado com eficiência as gotículas que são secas em seguida, gerando assim alguns aglomerados.

Em algumas fotomicrografias (C,E e F) é possível ver pequenas rugosidades na superfície das partículas. Foi demonstrado que essa característica é favorável, uma vez que reduz a coesão entre as partículas melhorando as propriedades de aerossolização do pó (CRUZ et al., 2011).

Também é possível observar que, na superfície das micropartículas esféricas, há estruturas de tamanho reduzido, em escala nanométrica, comprovando a presença das nanopartículas poliméricas com CUR e PIP.

FIGURA 11 – Fotomicrografias do pó microparticulado contendo nanopartículas poliméricas de CUR e PIP MEV-FEG: A) MNCP-0 (aumento de 2.03 kx); B) MNCP0 (aumento de 5.08 kx); C) MNCP-1 (aumento de 3.90 kx); D) MNCP-1 (aumento de 6.78 kx); E) MNCP-0 (aumento de 4,75 kx) e F) MNCP-1 (aumento de 16,05 kx).



Fonte: A autora

### 5.7.1.2 Determinação do diâmetro médio das micropartículas

Os valores de tamanho médio para as micropartículas estão demonstrados na tabela 10.

Tabela 11: Tamanho de partícula e valores de *span* para as formulações MNCP-0 e MNCP-1

<b>Formulação</b>	<b>Tamanho (<math>\mu\text{m}</math>)<math>\pm</math>DP</b>	<b>Span</b>
MNCP-0	5,95 $\pm$ 1,17	0,50
MNCP-1	4,84 $\pm$ 1,51	0,76

Fonte: A autora

Ambas formulações apresentaram tamanho micrométrico, confirmando os achados nas imagens por MEV-FEG. Os valores de *span* para as duas formulações foram menores que 2, indicando polidispersidade estreita em torno da média dos valores de tamanho.

Vários fatores relacionados ao processo de secagem e à formulação podem influenciar no tamanho das partículas. Diâmetro do bico atomizador do spray, temperatura de entrada, taxa de fluxo de ar, taxa de alimentação, concentração dos componentes na formulação, presença de solvente não aquoso e excipientes (CRUZ et. al., 2011)

Para formulações destinadas à inalação, o valor do diâmetro geométrico, juntamente com valores de densidade aparente é importante para calcular o diâmetro aerodinâmico da partícula.

### 5.7.1.3 Determinação do diâmetro aerodinâmico das micropartículas

Para um sistema microparticulado ser administrado por via inalatória, as partículas devem possuir propriedades físico-químicas adequadas, como diâmetro aerodinâmico apropriado para superar as barreiras biológicas do pulmão e conseguir atingir níveis profundos das vias aéreas (BAGHDAN et al., 2019).

Diâmetro aerodinâmico é uma propriedade da partícula inalatória que afeta e regula diretamente sua deposição nas vias aéreas, determinada pela impactação, sedimentação e movimento Browniano (LIMA, PEREIRA, FERNANDES, 2012).

Dados da literatura demonstram que, partículas com diâmetro acima de 5  $\mu\text{m}$  se depositam na região da orofaringe por impactação e são deglutidas a seguir (GRENHA et al., 2005).

Micropartículas com tamanho menor que 5  $\mu\text{m}$  são denominadas fração de partículas finas sendo que as de tamanho entre 4-5  $\mu\text{m}$  sofrem deposição primariamente nos brônquios e região de via aérea superior, já as menores que 4  $\mu\text{m}$  se depositam por sedimentação nas vias aéreas periféricas e alvéolos, onde o fluxo é mais lento. As que possuem tamanho em torno de 1  $\mu\text{m}$  se difundem por movimento Browniano e depositam-se quando colidem com a parede da via aérea.

Quanto maior o tempo de permanência nas pequenas vias aéreas, maior será a deposição por sedimentação e movimento Browniano (LIMA, PEREIRA, FERNANDES, 2012).

Sabe-se que partículas muito pequenas tendem a sofrer a ação de macrófagos alveolares, porém não há um consenso sobre a faixa de tamanho ideal para evitar ou retardar a fagocitose dos macrófagos. Alguns autores relataram que a atividade fagocítica é máxima para partículas entre 1 e 2  $\mu\text{m}$ , diminuindo para partículas menores e maiores que esses valores. Na grande maioria dos estudos com partículas inalatórias, os autores concordam que para partículas na faixa do micrômetro, quanto menor o tamanho da partícula, maior é a probabilidade de serem capturadas (GRENHA et al., 2005).

Os valores da densidade aparente e diâmetro aerodinâmico calculado estão demonstrados na tabela 12.

Tabela 12: Valores de densidade aparente e diâmetro aerodinâmico para as formulações MNCP-0 e MNCP-1

<b>Formulação</b>	<b>Densidade aparente<math>\pm</math>DP (g/cm<sup>3</sup>)</b>	<b>Diâmetro aerodinâmico<math>\pm</math>DP (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
MNCP-0	0,37 $\pm$ 0,09	3,63 $\pm$ 0,90
MNCP-1	0,28 $\pm$ 0,10	2,56 $\pm$ 0,63

Fonte: A autora

Os valores para diâmetro aerodinâmico da formulação MNCP-0 foi 3,63  $\mu\text{m}$  e

para MNCP-1 foi 2,56  $\mu\text{m}$ . Um diâmetro aerodinâmico entre 1 e 5  $\mu\text{m}$  possibilita às partículas alcançarem maior deposição nos pulmões, especialmente à nível alveolar (BAGHDAN et al., 2019).

Os valores encontrados para diâmetro aerodinâmico estão adequados para um sistema inalatório de acordo com a literatura (GRENHA et al., 2005; ORTIZ et al., 2015; ZATTA et al., 2018; BAGHDAN et al., 2019; NOZOHOURI et al., 2019).

Para atingir níveis profundos pulmonares, as partículas devem ser pequenas o suficiente para passar pela via aérea superior (boca, garganta e vias aéreas condutoras) e atingir níveis alveolares, porém o tamanho não pode ser muito reduzido, pois podem deixar de se depositar e serem exaladas na respiração novamente. Mesmo dentro da faixa considerada adequada para deposição pulmonar, certo número de partículas acaba sendo transportado para fora do pulmão por depuração mucociliar (GRENHA et al., 2005).

A escolha do excipiente para a formação do pó inalatório é de extrema importância. O manitol foi escolhido devido às suas vantagens para aplicações pulmonares e por já ter sido usado em vários produtos farmacêuticos inalatórios, como nos medicamentos Aridol® e Bronchitol® (Pharmaxis Ltd, Sydney, Austrália).

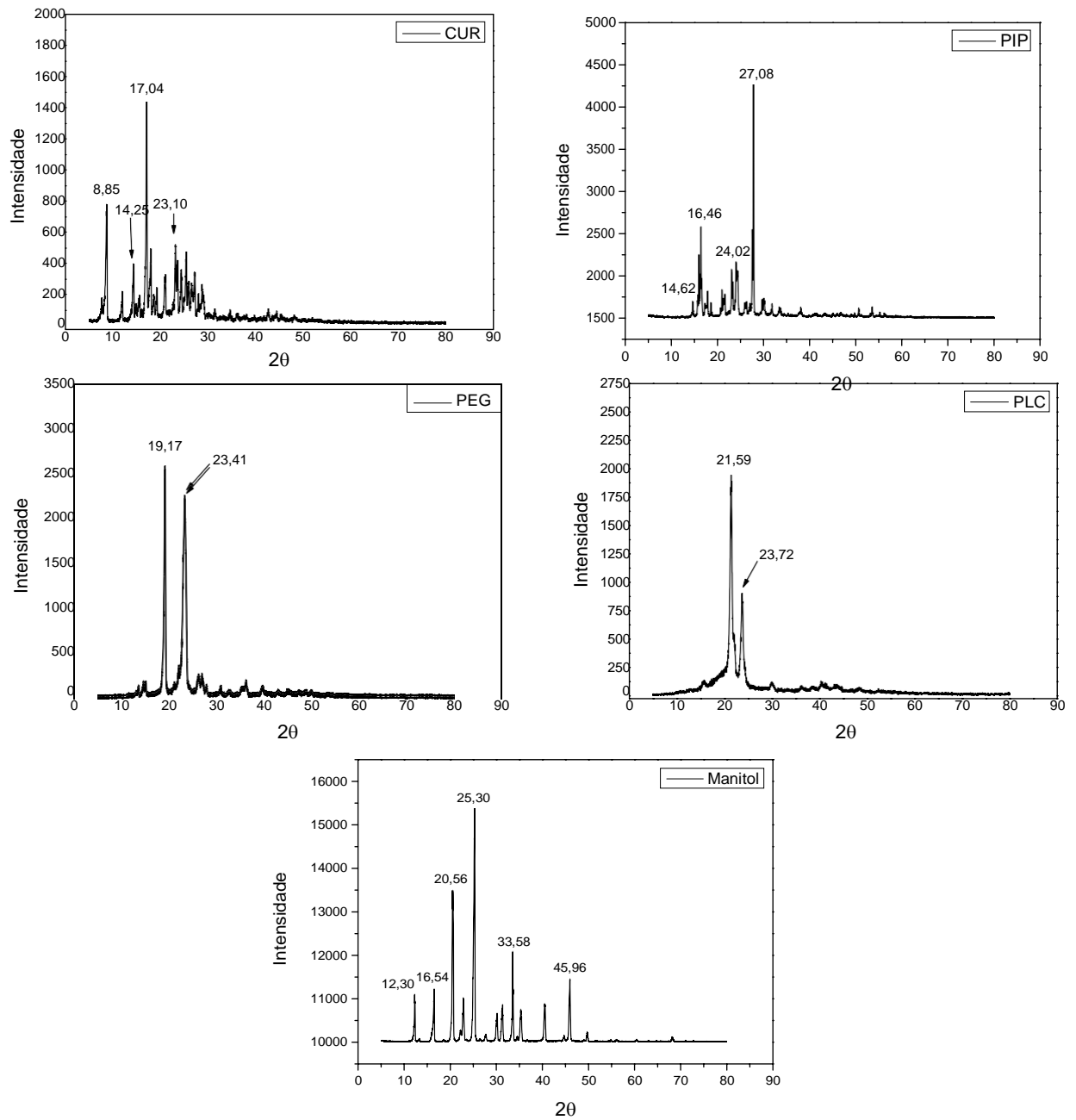
Além do uso já relatado em produtos comercializados para inalação, o manitol tem alta solubilidade aquosa, característica essencial para a desintegração das micropartículas na liberação das nanopartículas quando depositadas nos pulmões (BAGHDAN et al., 2019).

#### 5.7.1.4 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 12 sumariza os resultados obtidos por difração de raios X para os fármacos CUR e PIP, os polímeros PEG e PCL e o excipiente manitol.

FIGURA 12 – Difratomogramas dos fármacos puros (CUR e PIP), polímeros puros (PCL e PEG) e excipiente (manitol)



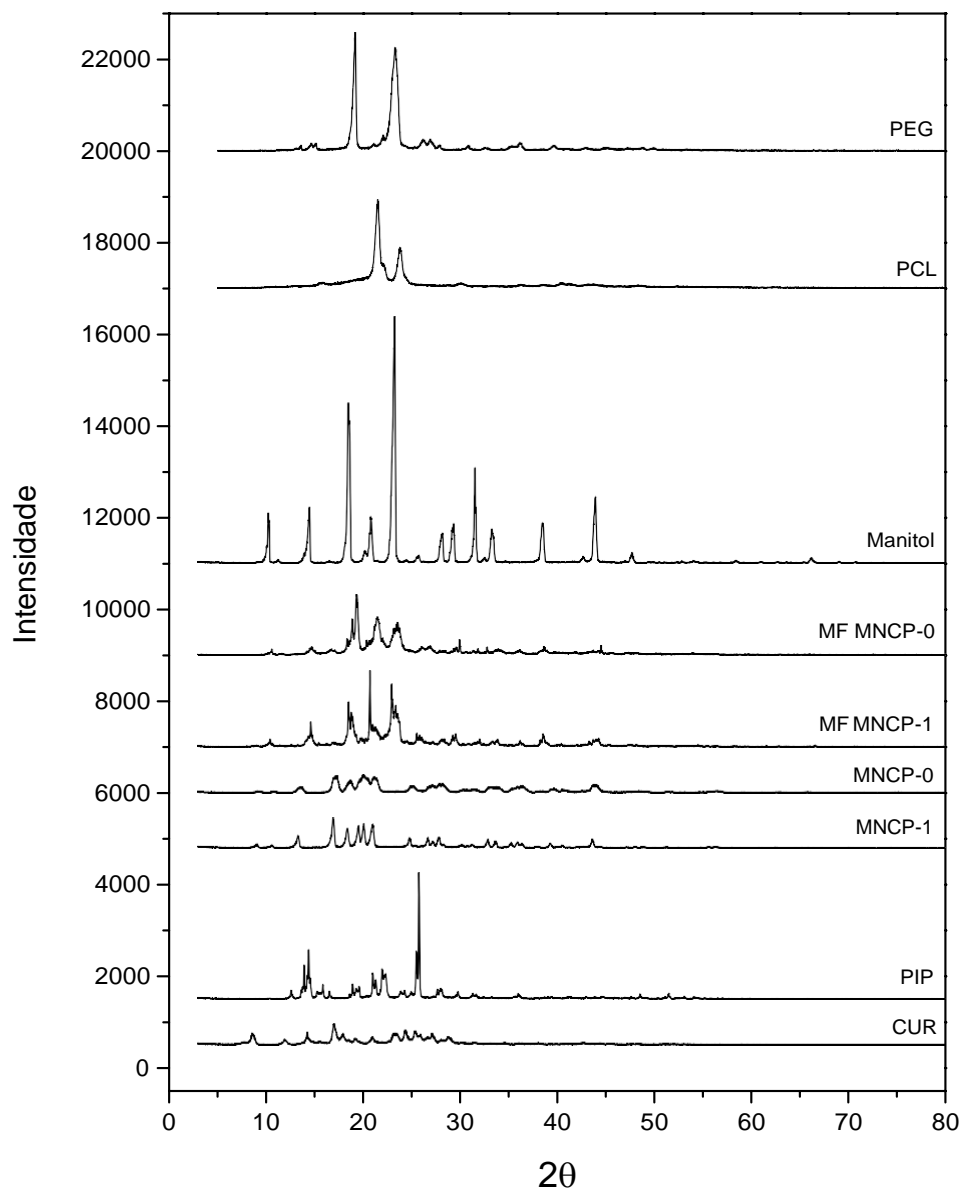
Fonte: A autora

A CUR apresentou picos bem característicos em aproximadamente  $2\theta = 8,85^\circ$ ,  $14,25^\circ$ ,  $17,04^\circ$ ,  $23,10^\circ$  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). A PIP apresentou picos em aproximadamente  $2\theta = 14,62^\circ$ ,  $16,46^\circ$ ,  $24,02^\circ$  e  $27,08^\circ$  entre outros de menor intensidade, mostrando sua cristalinidade. Os resultados estão de acordo com os resultados encontrados

por Vinod et al. (2011) e Ezawa et al. (2016). O polímero PEG apresentou valores para os picos de aproximadamente  $2\theta= 19,17^\circ$  e  $23,41^\circ$  e para a PCL de  $2\theta= 21,59^\circ$  e  $23,72^\circ$  estando em concordância com resultados obtidos por Silva (2008). O excipiente manitol apresentou picos em  $2\theta=$  de 12 a  $50^\circ$  e picos menores em  $2\theta=$  50 a  $80^\circ$ .

A Figura 13 apresenta os difratogramas comparativos entre os fármacos puros (CUR e PIP), os polímeros de partida (PCL, PEG), misturas físicas (MF MNCP-0, MF MNCP-1), excipiente manitol e as formulações MNCP-0 e MNCP-1.

FIGURA 13 – Difratogramas comparativos entre fármacos puros, polímeros, misturas físicas e nanossuspensões



Quando avaliadas as formulações MNCP-0 e MNCP-1, observa-se que os difratogramas apresentaram redução dos picos de cristalinidade principalmente dos 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 pela matriz polimérica resultando em uma liberação controlada dos fármacos (SONG et. al., 2014 citado por SILVA, FIDELES e FOOK, 2015)

## 5.8 ENSAIOS BIOLÓGICOS - ESTUDO *IN VITRO*

Com a finalidade de avaliar a toxicidade das nanopartículas contendo CUR e PIP sobre as linhagens de células A549, NCI-H292 e MRC-5, foram realizados testes de viabilidade celular nos tempos de tratamento de 72 horas. Pelo fato de os ensaios de citotoxicidade responderem de forma diferente às substâncias testadas, há a recomendação de utilização de mais de um teste, portanto nesse estudo foram utilizados os ensaios de redução do MTT e da SRB.

Ensaio de MTT 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) e 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).

### 5.8.1 Citotoxicidade da formulação NCP-1 nas linhagens A549, NCI-H292 e MRC-5

A citotoxicidade da formulação NCP-1 foi determinada para as três linhagens no período de tempo de tratamento de 72 horas, sendo a viabilidade avaliada pelos ensaios de redução de MTT e SRB. A formulação NCP-0 foi utilizada como controle, a fim de comparar seu efeito sobre as células em comparação com a formulação NCP-1.

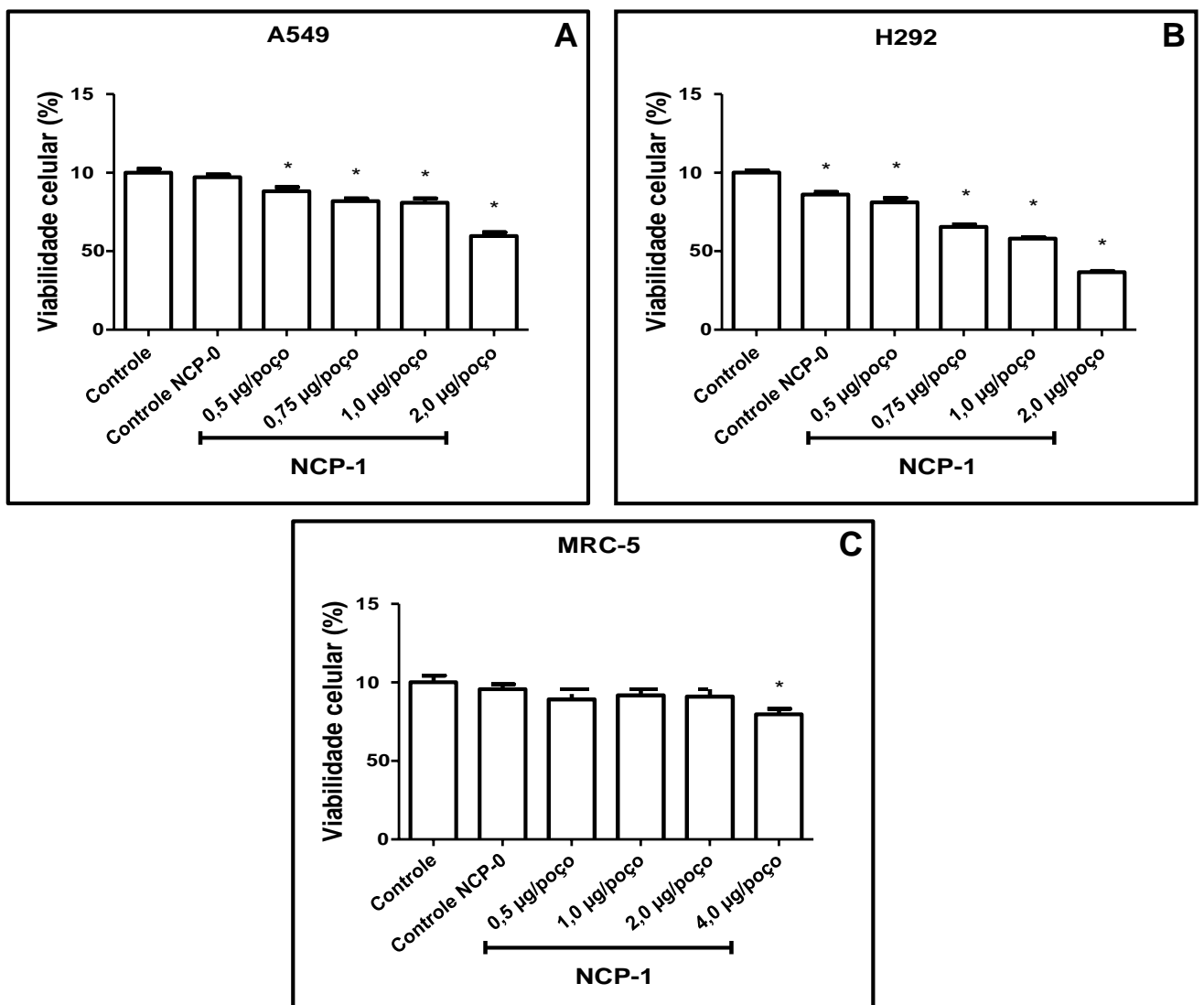
Somados ao fato de que a atividade antitumoral da curcumina e da piperina já



foram relatados na literatura (ESPOSITO et al., 2019; MARQUES et al., 2020; PAN et al., 2020; SCHMIDT et al., 2020) e também por suas limitações de uso na forma livre, principalmente relacionado às suas solubilidades (BIDARISUGMA et al., 2011; JARDIM, 2013; SANTIAGO et al., 2015), esses fármacos não foram testados puros nas células. Sendo que, o objetivo do proposto trabalho foi avaliar o efeito da formulação de nanopartículas com duas substâncias de origem natural associadas.

Na Figura 14 estão apresentados os resultados da responsividade das células A549 (A), NCI-H292 (B) e MRC-5 (C) expressas em porcentagem da viabilidade celular obtidas pelo ensaio de redução de MTT com diferentes concentrações de NCP-1.

FIGURA 14 - Efeito da formulação NCP-1 sobre as células A549 (72h), NCI-H292 (72h) e MRC-5 (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 ensaios independentes, com n=8 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) A: A549; B: H292; C: MRC-5



Os resultados referentes a linhagem A549 (A) mostram a redução significativa (\* $p < 0,5$ ) da viabilidade celular para todas as concentrações testadas. Para a linhagem NCI-H292, uma notável atividade citotóxica concentração-dependente foi revelada para a formulação NCP-1, conforme demonstrado pelo aumento da citotoxicidade diretamente proporcional a aumento da concentração da formulação de forma significativa (\* $p < 0,5$ ). A formulação sem fármaco (NCP-0) também promoveu redução da viabilidade celular da NCI-H292, podendo ser decorrente de resíduo do solvente orgânico utilizado ou ação dos polímeros sobre as células. Para justificar esse efeito, se faz necessária uma avaliação dos compostos isolados utilizados na formulação a fim de esclarecer qual ou quais seriam responsáveis pela morte celular dessa linhagem.

Vários autores previamente comprovaram a atividade antitumoral da CUR e PIP frente a diferentes linhagens de células tumorais, como os citados abaixo.

Em 2013, Dhanasekaran et al., avaliaram o efeito da CUR na viabilidade de células leucêmicas KG-1 empregando o ensaio de redução de MTT. Obtiveram o resultado de redução de 43% da viabilidade celular utilizando concentrações de 50  $\mu\text{M}$  e de 80% quando usado 100  $\mu\text{M}$  em 24h e 48h de teste, respectivamente. Nesse mesmo ano, Wang et al. (2013) apresentaram um efeito benéfico da nanoencapsulação de curcumina quando desenvolveram nanopartículas lipídicas sólidas e testaram em células NCL-41299 e A549. O  $\text{IC}_{50}$  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  $\mu\text{M}$ .

Abbas et. al. (2014), pelo ensaio de MTT relataram redução na viabilidade de células CALU-1 quando expostas a 5  $\mu\text{mol/L}$  de CUR por 24 horas de tratamento.

Em um estudo com piperina, Tiwari et al., (2021) investigaram a ação antitumoral dessa substância utilizando células-tronco cancerígenas e os resultados mostraram que a piperina não apenas foi ativa contra essas células, mas também gerou parada do ciclo celular em  $G_0/G_1$  e aumento da porcentagem das células na fase sub $G_0$ .

Guo et al., (2021) avaliaram o efeito da PIP frente às células tumorais de câncer gástrico (HGC-27). A PIP induziu a formação de EROs e promoveu ativação de apoptose via mitocondrial, portanto apresentando efeitos antitumorais.

Observando os resultados para as células A549 e NCI-H292, sugere-se que a

formulação NCP-1 nas concentrações testadas, foi tóxica e capaz de levar a morte celular, o que era esperado, visto que há presença de dois compostos sabidamente capazes de exercer ação antitumoral, podendo inferir que houve sinergia no efeito obtido.

O efeito sinérgico de agentes antineoplásicos frente a diferentes linhagens de células tumorais também é relatado nos seguintes trabalhos. Rudnik, et.al., (2020) desenvolveram nanopartículas poliméricas contendo curcumina e metotrexato e testaram essa formulação frente à linhagem de câncer de pulmão Calu-3. Os resultados de MTT e SRB mostraram uma diminuição significativa na viabilidade celular e a análise morfológica apresentou predominância de apoptose como principal mecanismo de morte.

Em 2020, Bolat, et. al., desenvolveram nanoformulações de emulsões contendo CUR e PIP e testaram esse sistema em células de câncer colorretal (HCT116). Quando avaliaram a piperina livre e emulsionada sozinhas, não obtiveram inibição na proliferação das células, mas combinada com a curcumina, observaram uma eficaz inibição da proliferação celular de cerca de 50% de viabilidade. A parada do ciclo celular na fase G2/M e a indução de apoptose comprovaram a resposta antitumoral mais efetiva da terapia combinada.

Recentemente, Javed et. al., (2021), desenvolveram um nanogel de ouro de lignina-g-p, contendo CUR e PIP para tratar o glioblastoma multiforme (GBM). Utilizaram células U-251 MG GBM para avaliar o efeito da formulação. Após análise para avaliar citotoxicidade, os nanogéis carregados com CUR e PIP apresentaram propriedades anticancerígenas e valores de IC<sub>50</sub> de 30 µM e 35 µM para formulação carregada com CUR e PIP, respectivamente.

O efeito sinérgico na quimioterapia combinada, administrando dois quimioterápicos concomitantemente, 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, pois a heterogeneidade ou o nível da doença exige uma ação colaborativa. (DEY et al., 2016; BOLAT, et.al., 2020).

Para a linhagem de células normais MRC-5 (C), foi escolhido trabalhar com uma faixa de concentração diferente à das células tumorais. Adicionamos uma concentração de 4,0 µg/poço para avaliarmos a resposta da célula frente a uma concentração maior. A formulação contendo CUR e PIP (NCP-1) mostrou

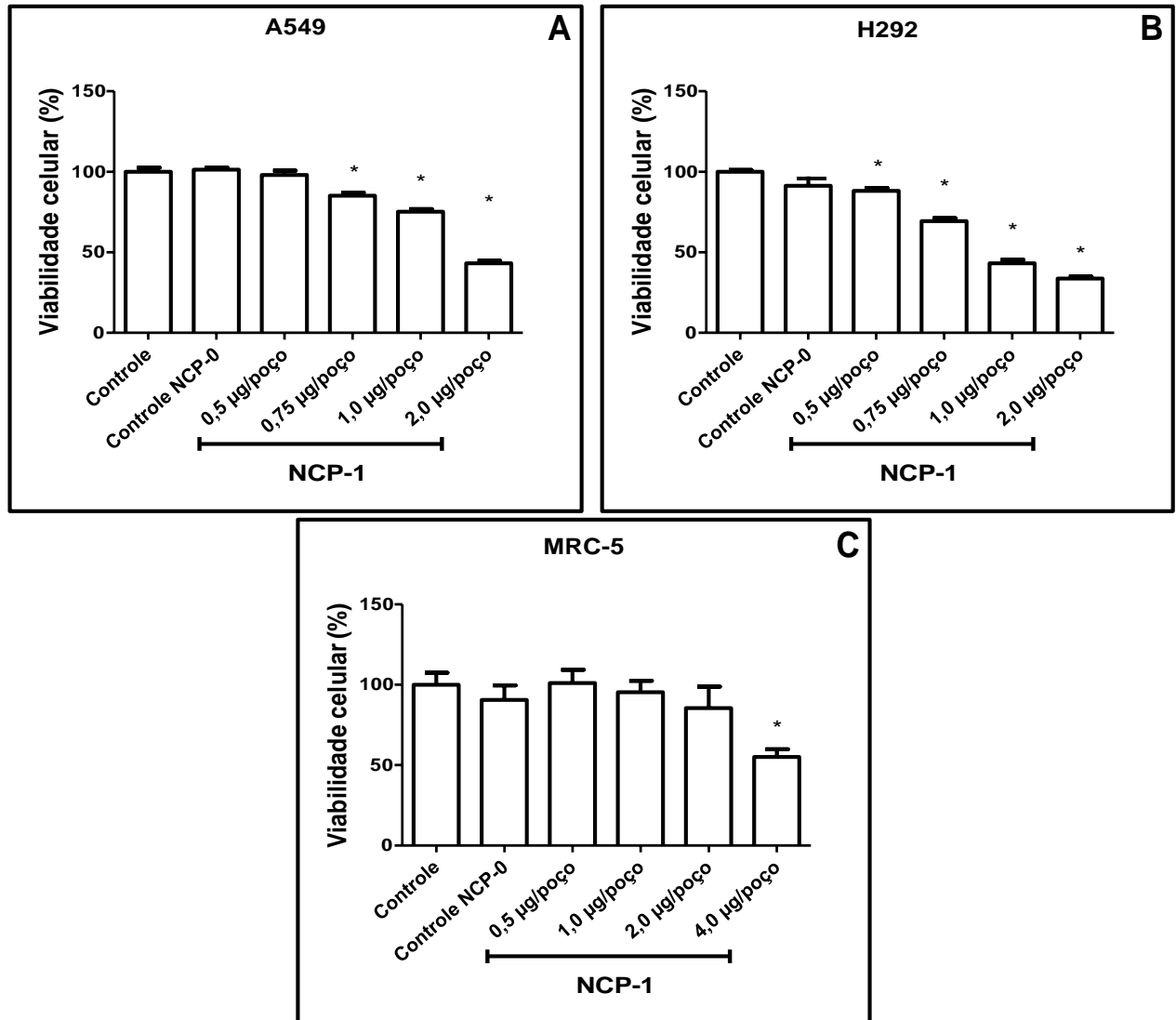
citotoxicidade apenas na maior concentração (4,0 µg/poço) e dentro das concentrações testadas para as células tumorais (de 0,5 a 2,0 µg/poço), NCP-1 não demonstrou ser tóxica.

No trabalho de Addala (2014), a CUR foi testada em células de câncer de cólon HCT-116 e células normais de epitélio de cólon CRL1790, para avaliar a viabilidade celular através do ensaio de SRB. A CUR mostrou-se seletiva para as células tumorais, com um valor de índice de seletividade de 16,75.

Sendo a formulação NCP-1 tóxica nas concentrações de 0,5 a 2,0 µg/poço para as duas linhagens celulares tumorais e não apresentando toxicidade na mesma concentração para as células normais, é notória a seletividade das nanopartículas para as células A549 e NCI-H292, comprovadas pelo teste de seletividade.

Como recomendado, para corroborar o teste de MTT, SRB foi realizado. A viabilidade celular das linhagens A549, NCI-H292 e MRC-5 está apresentada na Figura 15. O ensaio empregando SRB foi realizado seguindo as mesmas condições experimentais e de concentrações do ensaio de MTT.

FIGURA 15 - Efeito da formulação NCP-1 sobre as células A549 (72h), NCI-H292 (72h) e MRC-5 (72h). A viabilidade celular (%) foi avaliada pelo ensaio de SRB. Os resultados são expressos com média e erro padrão da média, obtidos de 3 ensaios independentes, com n=8 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) A: A549; B: H292; C: MRC-5



Os resultados do teste de SRB apresentaram o mesmo perfil de resposta observado no ensaio de MTT. Para avaliar a viabilidade celular, o ensaio de SRB mostra-se mais sensível, por isso é possível observar uma redução maior da viabilidade das células com o aumento da concentração. As três linhagens em estudo têm a característica de crescerem em adesão e a técnica de SRB cora as proteínas das células que ficam aderidas aos poços na placa de cultivo. Esse motivo explica sua maior sensibilidade em comparação ao ensaio de MTT, que se baseia na atividade mitocondrial.

Na literatura encontram-se menções de que as atividades de enzimas mitocondriais podem aumentar durante o processo de indução de morte celular. Mas cabe também levar em consideração que as nanopartículas podem ter interferido no mecanismo de adesão celular, hipótese que necessita ser melhor investigada.

### 5.8.2 Avaliação de citotoxicidade por cálculo de $IC_{50}$ e índice de seletividade (IS)

O valor calculado para  $IC_{50}$  permite comparar a citotoxicidade de um composto entre as linhagens celulares estudadas.  $IC_{50}$  é definida como a concentração capaz de reduzir em 50% o número de células viáveis, representando 50% de morte celular em uma cultura. Como já mostrado anteriormente, a formulação NCP-1 foi citotóxica apresentando  $IC_{50}$  em ordem crescente para as células NCI-H292, A549 e MRC-5, portanto com menor toxicidade para as células normais (MRC-5). Os valores  $IC_{50}$  calculados pela análise de Probit estão apresentados na tabela 12.

Tabela 13: Valores de  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g}+\text{EP}$ ) da formulação NCP-1 para as células A549, NCI-H292 e MRC-5 pelo ensaio de MTT

	<b>A549</b>	<b>NCI-H292</b>	<b>MRC-5</b>
Valor $IC_{50}$ ( $\mu\text{g}$ )	2,8 $\pm$ 0,15	1,6 $\pm$ 0,1	6,1 $\pm$ 2,5

Fonte: A autora

A concentração necessária de CUR e PIP na formulação NCP-1 para provocar morte em 50% das células tumorais A549 foi de 2,8  $\mu\text{g}/\text{poço}$ . Já para a linhagem NCI-H292 foi de 1,6  $\mu\text{g}/\text{poço}$  e para MRC-5 de 6,1  $\mu\text{g}/\text{poço}$ , valor expressivamente maior que os indicados para as células tumorais.

O valor encontrado de  $IC_{50}$  para as células NCI-H292 foi menor em relação ao encontrado para as células A549, mostrando que essa linhagem se mostrou mais sensível à formulação contendo CUR e PIP, sendo que uma menor concentração da formulação foi necessária para provocar a morte das células tumorais em 50%.

Vale salientar que a linhagem NCI-H292 é proveniente do carcinoma mucoepidermoide, sendo um tipo de tumor maligno não frequente da árvore traqueobrônquica. É caracterizado por um tumor de crescimento lento, mas com

comportamento agressivo, apresentando invasão local e metástase. Representa em torno de 0,1% a 0,5% das neoplasias primárias de pulmão (ANDRADE, et. al., 2002).

O tratamento de escolha para casos de carcinoma mucoepidermoide é a remoção cirúrgica, ou seja, é um tipo de câncer que exige um tratamento terapêutico com maior dificuldade.

Embora seja notável a ação dos ativos sobre as duas linhagens de células tumorais, os valores de  $IC_{50}$  são superiores ao estabelecido pelo programa de triagem do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos. Esse órgão normatiza que para uma substância ser considerada citotóxica *in vitro*, é necessário que apresente valor de  $IC_{50}$  menor que  $4\mu\text{g/mL}$  ( $14\mu\text{g/mL}$  para A549 e  $8\mu\text{g/mL}$  para NCI-H292) (ASSAF et al., 2013). Todavia o valor do IS reflete que o composto é seletivo para as linhagens tumorais, conforme mostrado a seguir.

Calculando o IS por meio da razão do  $IC_{50}$  das células normais e  $IC_{50}$  das células tumorais, obtivemos valores de 2,18 para a linhagem A549 e 3,8 para a linhagem NCI-H292.

Baseando-se na literatura (AYESH; ABED; FARIS, 2014), uma substância apresenta toxicidade geral não específica quando o valor de IS é inferior a 2. Os valores obtidos para a formulação NCP-1 para ambas células tumorais, foram superiores a esse valor, inferindo mais uma vez, uma seletividade da formulação pelas células cancerosas em estudo, evidenciando o interessante e importante efeito antitumoral da formulação de nanopartículas contendo curcumina e piperina (NCP-1).

De fato, durante a pesquisa por novos compostos ou substâncias citotóxicas além da avaliação inicial, *in vitro*, é necessário determinar a seletividade desses em células não neoplásicas.

Wang et. al. (2017), desenvolveram um carreador lipídico nanoestruturado carregado com curcumina e avaliaram esse sistema *in vivo* e *in vitro*, com células A549. Após ensaio de MTT, o valor de  $IC_{50}$  para a formulação nanolipídica foi de 5,66 mg/L, valor menor comparado ao  $IC_{50}$  de curcumina livre (9,81 mg/L).

Zhang et. al., (2010) avaliaram a curcumina em células A549 e células A549/DDP multirresistentes. Obtiveram valores de  $IC_{50}$  de 16,28  $\mu\text{mol/L}$  para as células A549 em 48h e de 18,06  $\mu\text{mol/L}$  para A549/DDP, também em 48 horas.

LIN et. al., (2014) avaliaram a citotoxicidade e o potencial de indução de

apoptose da piperina em células A549 e WI38. Após 48h de teste pelo ensaio de MTT, obtiveram um valor de  $IC_{50}$  para as células A549 de 122  $\mu\text{g/mL}$ .

Mesmo com a mesma linhagem celular em estudo, diferentes valores de  $IC_{50}$  podem ser encontrados. Isso se dá por diferentes fatores, principalmente em relação às características de proliferação celular (HE et al., 2016).

### 5.8.3 Ensaio morfológicos

Os ensaios morfológicos são utilizados para avaliação das alterações morfológicas nas células após tratamento, bem como pode dar indícios dos mecanismos envolvidos na morte celular.

Entre os mecanismos envolvidos na morte celular, temos a necrose e apoptose, que se distinguem entre si nos aspectos molecular, bioquímico e morfológico, sendo dependente da duração e/ou intensidade do estresse que a célula sofre (VAN DER MEER et al., 2010; MARTIN; HENRY, 2013; OLIVEIRA, 2019).

A apoptose consiste num mecanismo de morte celular ordenado, regular e menos agressivo, provocando mínimos efeitos nas células ao redor, não perturbando a homeostase do tecido ou o desenvolvimento do órgão. É caracterizada por uma série de eventos intracelulares, que levam à fragmentação do DNA e à degradação internucleossômica do DNA genômico em decorrência da ativação de endonucleases endógenas (ZAKERI, LOCKSHIN, 2002; RUDNIK et. al., 2020; OLIVEIRA, 2019). Apresenta como característica também o encolhimento celular, citoplasma denso mostrando organelas compactadas, picnose (redução do volume celular e nuclear) e fragmentação da cromatina com prolongamentos (blebs) (ELMORE, 2007).

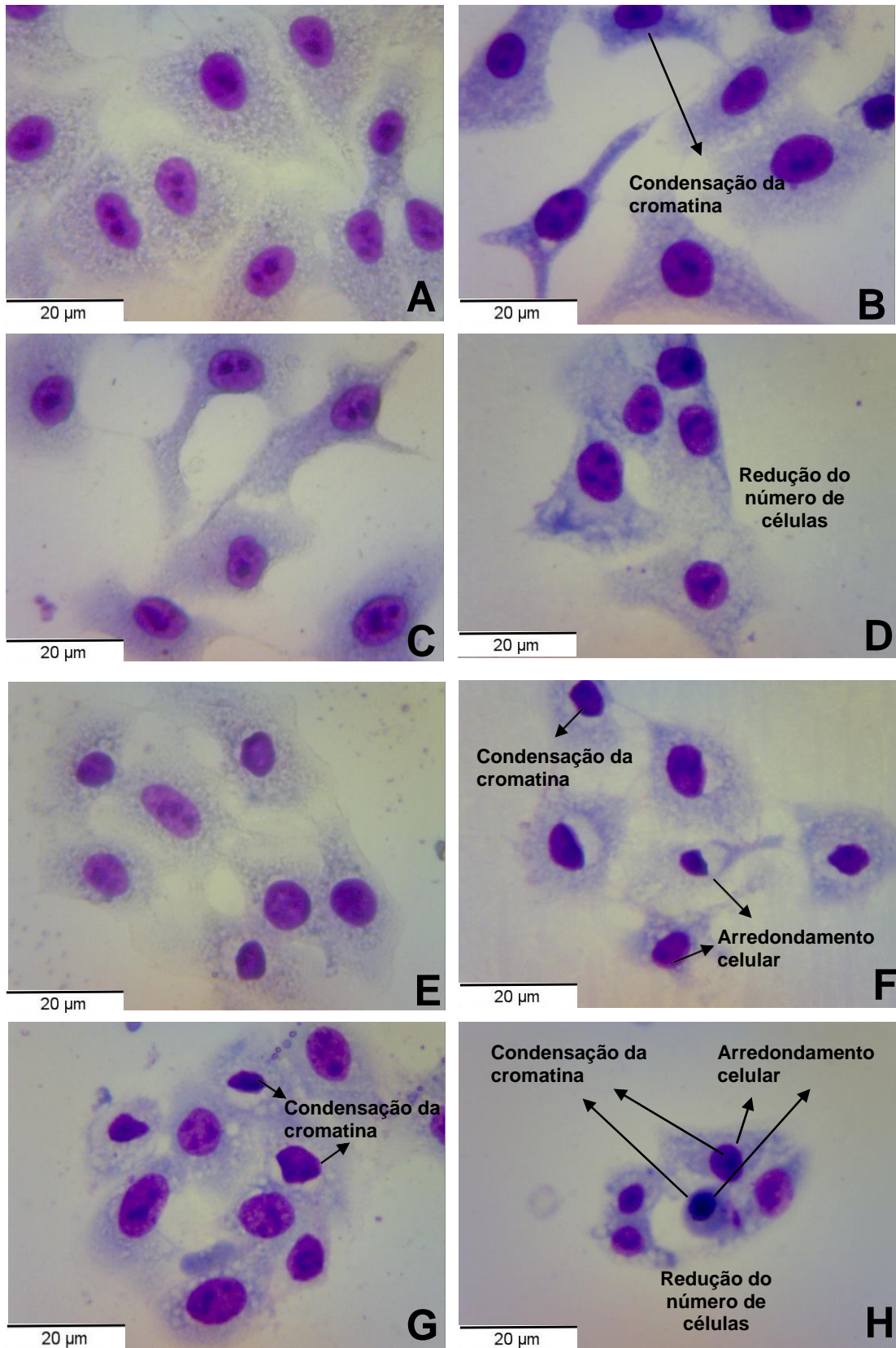
Por outro lado, a necrose provoca o inchaço celular e seu rompimento com desorganização do citoplasma e liberação de material citoplasmático com indução de reação inflamatória local (VAN DER MEER et al., 2010, RUDNIK, et. al., 2020, OLIVEIRA, 2019). Nesse processo, a lesão se dá em um grupo de células e não de maneira individual. Também ocorre rompimento de organelas, dilatação acentuada das mitocôndrias com surgimento de grandes densidades amorfas, representadas pelas proteínas desnaturadas. O núcleo pode encolher, sofrer fragmentação ou até mesmo desaparecer totalmente por fragmentação inespecífica de DNA (FESSI, et.



al., 1989).

Nesse trabalho, a morfologia das células A549 e NCI-H292 foi observada utilizando microscópio óptico com auxílio de corantes hematológicos May Grunwald e Giemsa e pode ser visualizada na Figura 16.

Figura 16: Morfologia celular da linhagem A549 após incubação com meio (A), MTX 4,36 $\mu$ M (B), NCP-0 (C) e NCP-1 2,8  $\mu$ g (D). Morfologia celular da linhagem NCI-H292 após incubação com meio (E), MTX 1,39  $\mu$ M (F), NCP-0 (G) e NCP-1 1,6  $\mu$ g (H). Todas as imagens estão em aumento de 400x.



Os resultados morfológicos mostraram que em 72 horas de tratamento houve arredondamento celular principalmente para a linhagem NCI-H292 tratada com NCP-1 1,6 µg (H) e com o MTX 1,39 µM (F), condensação de cromatina nas células A549 tratadas com MTX 4,36 µM (B), NCP-1 2,8 µg (D) e nas células NCI-H292 tratadas com MTX 1,39 µM (F), NCP-0 (G) e NCP-1 1,6 µg (H). Foi observado também uma redução do número de células NCI-H292 tratadas com MTX 1,39 µM (F), NCP-0 (G) e NCP-1 1,6 µg (H). Não foram encontradas formações de blebs nas células analisadas.

Esses resultados comprovam os encontrados nos ensaios de determinação de viabilidade celular por MTT e SRB, onde observou-se que a formulação NCP-1 é capaz de induzir morte celular nas duas linhagens em estudo, promovendo eventos compatíveis com a apoptose.

Pensando além de nível celular e partindo para as intervenções terapêuticas viáveis, a apoptose é um mecanismo de morte almejado em se tratando de fisiopatologia do câncer de pulmão.

#### 5.8.4 Análise da atividade de caspase 3 e 7

O processo de apoptose compreende as fases de iniciação, efetora e de degradação. A iniciação depende do estímulo apoptótico recebido; na fase efetora há a ativação da cascata de caspases e a de degradação representa a fase onde a célula adquire as características morfológicas e bioquímicas do processo (DUARTE, 2010).

As caspases são responsáveis pela maioria das alterações morfológicas nas células em apoptose, independente do agente indutor do processo (MARTIN; HENRY, 2013)

As vias de regulação da apoptose são a extrínseca, onde a apoptose é mediada por receptores de morte presentes na membrana plasmática e a intrínseca, mediada pela mitocôndria. Ambas possuem caspases iniciadoras que direcionam sinais para o grupo de caspases efetoras com o objetivo de desencadear eventos intracelulares para provocar a morte celular programada (DUARTE, 2010).

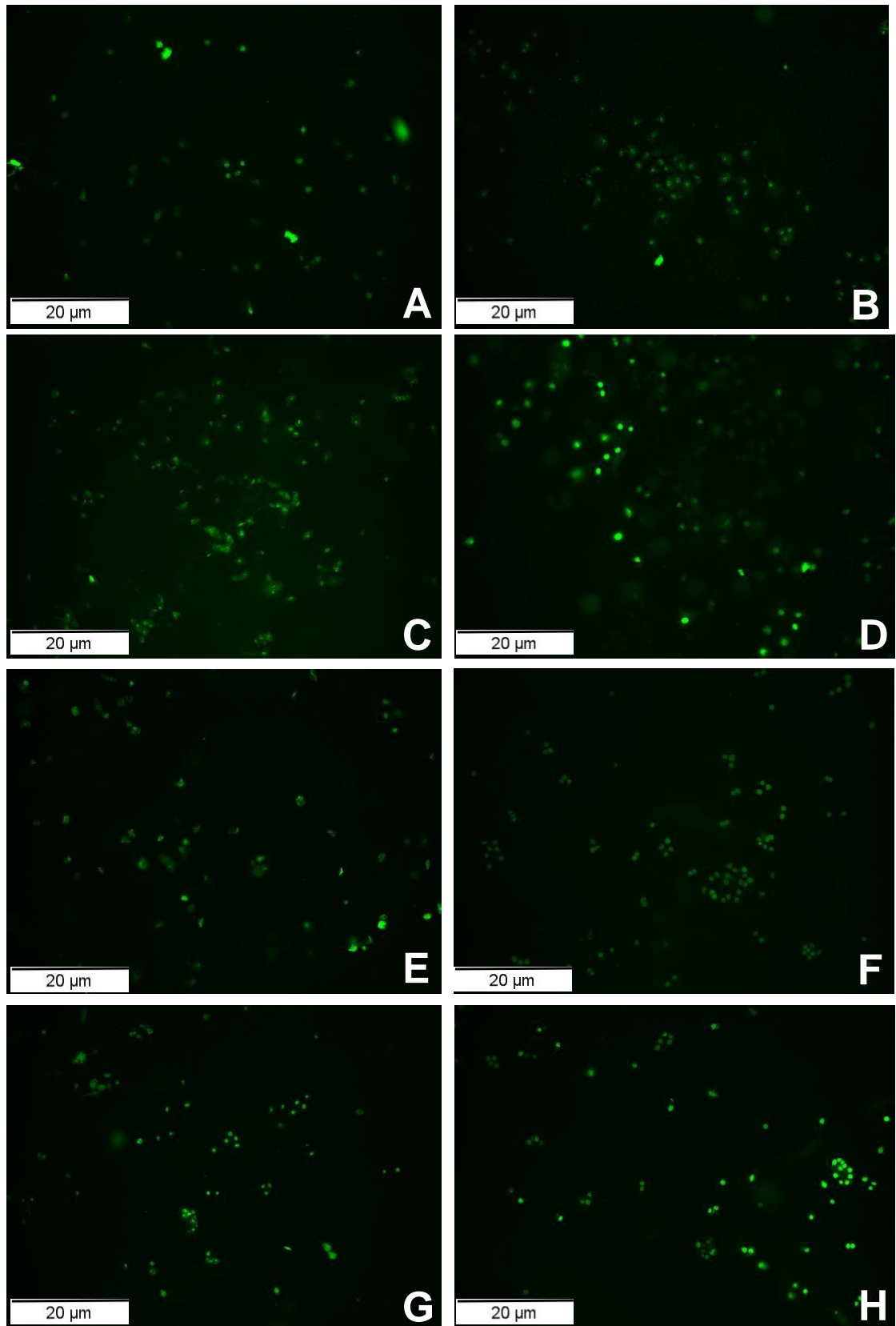
A resposta gerada pelos sinais mitocondriais e a ação das caspases ativadas a partir da via extrínseca são sinais responsáveis pela ativação das caspases efetoras 3 e 7. (HAIL et al., 2006).

Para avaliação do efeito das nanopartículas contendo curcumina e piperina sobre a atividade de caspases 3 e 7, células A549 e NCI-H292 foram tratadas por 1h 30 min. O ensaio foi realizado usando o reagente de detecção CellEvent™ Caspase-3/7 o qual é um substrato fluorogênico para caspases 3 e 7 ativadas.

Após ativação de caspase-3 ou caspase-7 nas células apoptóticas, o reagente (peptídeo DEVD) é clivado, permitindo que o corante se ligue ao DNA e produza uma resposta fluorogênica com um máximo de absorção / emissão de aproximadamente 502/530 nm (LIFE TECHNOLOGIES, 2017; CRUZ, 2021).

As imagens obtidas utilizando microscópio de fluorescência estão na Figura 17.

Figura 17 - Análise de ativação de caspases das células A549 e NCI-H292 após 1h30min de tratamento com as formulações NCP-0 e NCP-1. Meio de cultivo e MTX foram utilizados como controles negativos e positivos, respectivamente. Aumento de 100x para todas as imagens.



Na Figura 17, em A temos as células A549 apenas com o meio. Alguns pontos de fluorescência são observados pelo processo normal de apoptose que a célula pode apresentar em culturas, já que nesse ponto nenhum tratamento foi adicionado. Em B, a imagem é da célula A549 tratada com o antitumoral MTX na concentração de 4,36 $\mu$ M, valor encontrado de IC<sub>50</sub> para essa linhagem. O MTX é sabidamente um agente citotóxico, por isso foi usado como controle positivo. A justificativa de não estar tão intensa a fluorescência nesse ponto, se deve ao fato de provável morte celular após o tempo de tratamento, dessa forma a célula morta já não emite mais fluorescência. Em C, as células A549 tratadas com NCP-0 revelaram uma fluorescência, o que já era esperado, pois no teste de avaliação de citotoxicidade essa formulação se mostrou tóxica para a célula. Em D, temos a formulação NCP-1 a 2,8 $\mu$ g nas células A549 mostrando uma intensidade de fluorescência maior que o controle, comprovando que a formulação levou a morte celular por meio do processo de apoptose.

Em E, a imagem mostra a célula NCI-H292 apenas no meio de cultivo, como controle negativo, com baixa intensidade de brilho. Em F, as células NCI-H292 foram tratadas com o controle positivo MTX na concentração 1,39 $\mu$ M, também o valor de IC<sub>50</sub> para essa célula. Em G, a mesma linhagem celular foi tratada com a formulação NCP-0 e apenas comprovou a toxicidade dessas nanopartículas sobre as células e finalmente em H, as células NCI-H292 tratadas com a formulação NCP-1 a 1,6 $\mu$ g exibiu uma maior intensidade de fluorescência, comparada ao controle.

Esse resultado corrobora os encontrados nos testes de MTT e SRB, onde observou-se a morte da célula quando tratada com essa formulação.

As imagens obtidas, indicam a ativação de caspases 3 e/ou 7, e a baixa intensidade de fluorescência pode ser devido ao curto período de tratamento ou à morte celular após a ativação das caspases.

Os resultados aqui exibidos respaldam a utilização da formulação de nanopartículas associando curcumina e piperina com efeitos interessantes e viáveis para as células A549 e NCI-H292, tendo em vista que, para o tratamento do câncer a característica de seletividade em relação às células cancerosas e ineficiência frente às células normais é um dos principais desafios da quimioterapia atual.

## 6 CONCLUSÃO

- As nanopartículas contendo CUR e PIP foram obtidas com sucesso, utilizando os polímeros PCL e PEG 6000, pelo método de nanoemulsão utilizando sonicação;
- O método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência desenvolvido foi válido para quantificação da CUR e PIP, sendo um método específico, linear, preciso, exato e robusto para quantificação simultânea das duas substâncias;
- As nanopartículas avaliadas por MEV-FEG apresentaram boa morfologia, com formato esférico, escala nanométrica e sem presença de cristais dos fármacos livres;
- As formulações geraram nanopartículas de 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;
- As micropartículas foram obtidas com sucesso pelo método de secagem por aspersão utilizando o manitol como excipiente;
- Os valores de rendimento, umidade, diâmetro geométrico e diâmetro aerodinâmico estão de acordo com os relatados na literatura e adequados para a finalidade pretendida;
- A morfologia das micropartículas avaliada através de MEV-FEG comprovou a presença de estruturas nanométricas em sua superfície;
- A redução significativa da viabilidade celular das linhagens A549 e NCI-H292 pelos testes de MTT e SRB mostraram uma ação eficiente e sinérgica dos dois fármacos (CUR e PIP) da formulação NCP-1;
- A formulação NCP-1 não se apresentou tóxica para a linhagem de células normais MRC-5 nas mesmas concentrações testadas para as células tumorais A549 e NCI-H292;
- A formulação NCP-1 se mostrou seletiva ( $IS > 2$ ) para as linhagens de células cancerosas;

- A análise morfológica utilizando o corante May-Grunwal e Giemsa e a análise por fluorescência no teste de caspase, evidenciaram a presença do processo de morte por apoptose nas células A549 e NCI-H292 quando tratadas com a formulação NCP-1.



## REFERÊNCIAS

ABDELAZIZ, H.M., et al. Inhalable particulate drug delivery systems for lung cancer therapy: Nanoparticles, microparticles, nanocomposites and nanoaggregates. **Journal of Controlled Release**, v.269, 374-392, 2018.

ABDELRAHY, H., et al. Exploiting gelatin nanocarriers in the pulmonary delivery of methotrexate for lung cancer therapy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Egito, 133, p.115-126, 2019.

ADDALA, E. **In vitro studies using curcumin and curcumin analogues as candidate mitochondria-targeting anticancer agents affecting colon cancer cells**. 2014 (Tese de doutorado) - College of Pharmacy and Nutrition, University of Saskatchewan Saskatoon, Saskatchewan, Canada, 2014.

**AMERICAN CANCER SOCIETY**, Lung Cancer (Non-Small Cell), 2014.

ANABOUSI, V.S. **Liposomal Drug Carrier Systems for Inhalation Treatment of Lung Cancer**. 2006 (Tese de doutorado) - Universidade de Saarland, Saarbrücken, 2006;

ANDRADE, C.F., et al. Carcinoma mucoepidermóide. **Jornal de Pneumologia**, Relatos de Casos, Brasil, 28 (6), 2002.

ARAÚJO, C.A.C.; LEON, L.L. Biological Activities of Curcuma longa L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Brasil, v. 96(5), p. 723-728, July 2001.

ASSAF, A. M., et al. Anti-cancer, anti-inflammatory and anti-microbial activities of plant extracts used against hematological tumors in traditional medicine of Jordan. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 3, p. 728–736, 2013.

AULTON, M.E.; TAYLOR, K.M.G. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 4ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. P.614.

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.

AYESH, B. M.; ABED, A. A.; FARIS, D. M. In vitro inhibition of human leukemia THP-1 cells by *Origanum syriacum* L. and *Thymus vulgaris* L. extracts. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 612, p. 1–6, 2014.

BAGHDAN, E., et al. Development of inhalable curcumin loaded Nano-in-Microparticles for bronchoscopic photodynamic therapy. **European Journal of Pharmaceuticas Sciences**, Alemanha, 132, p.63-71, 2019.

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, v. 43, nº 2, abr/jun, 2007.

BECK, R.C.R., et al. Surface Morphology of Spray-Dried Nanoparticle-coated Microparticles designed As An Oral Drug Delivery System. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, Brasil, 25, p. 389-398, 2008.

BIDARISUGMA, B. et al. **Piperin** and piperlongumine as natural oral anticancer drug. **Dental Journal**. V. 44, nº 4, 2011.

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, v. 1, nº 15, p. 42-51, 2016.

BOLAT, Z.B., et al. Curcumin- and Piperine-Loaded Emulsomes as Combinational Treatment Approach Enhance the Anticancer Activity of Curcumin on HCT116 Colorectal Cancer Model. **Frontiers Bioengineering and Biotechnology**, Turquia, 8 (50), 2020.

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

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

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, v. 14, p. 1-10, 2014.

CHAUHAN, P.S., et al. Combination Therapy with Curcumin Alone Plus Piperine Ameliorates Ovalbumin-Induced Chronic Asthma in Mice. **Inflammation**, 41, 2018.

CRUZ, L., et al. Formulation and in vivo evaluation of sodium alendronate spray-dried microparticles intended for lung delivery. **Journal of Controlled Release**, Brasil, 152, p. 370-375, 2011.

CRUZ, L.S. **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE EXTRATOS DE Euphorbia umbellata (Pax) Bruyns**. 2021 (Tese de doutorado) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Brasil, 2021.

DAHIYA, S. et al. Conjugation of epigallocatechin gallate and piperine into a zein nanocarrier: implication on antioxidant and anticancer potential. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 9, n. 3, p. 035011, 2018.

DEY, S., et al. Alginate stabilized gold nanoparticle as multidrug Carrier:

Evaluation of cellular interactions and hemolytic potencial. **Carbohydrate Polymers**, India, 136, p.71-80, 2016.

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

DIAS, J.A.C. **Nanopartículas poliméricas com aplicação na administração pulmonar de proteínas**. 2013 (Dissertação de mestyrado) - Universidade do Algarve, Faro, 2013;

DOMINGUES, G.S., et al. Micropartículas nanorrevestidas contend um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. **Química Nova**, Brasil, 31, p. 1966-1972, 2008.

DUARTE, R. A. **Sinalização celular para apoptose em linhagem celular de adenocarcinoma (MCF-7) e carcinoma ductal invasivo de mama (ZR 7531) tratadas com alcaloides isolados de Pterogyne nitens**. 2013 (Tese de doutorado) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, Brasil, 2010.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 4, n. 35, p. 495–516, 2007.

ESPOSITO, T., et al. Effects of curcumin and its adjuvant on TPC1 thyroid cell line. **Chemico-Biological Interactions**, Itália, 305, p.112-118, 2019.

EZAWA, T. et al. Changes in the Physicochemical Properties of Piperine/beta-Cyclodextrin due to the Formation of Inclusion Complexes. **International journal of medicinal chemistry**, v. 2016, p. 8723139, 2016.

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., et. al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **Int. J. Pharm**, 55, R1–R4, 1989.

FINNEY, D.J. **Probit analysis**. 3. ed. Cambridge University Press, 1971.

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

GRENHA, A.; SEIJO, B.; LÓPEZ, C.R. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. **European Journal od Pharmaceutical Sciences**. 25, 427-437, 2005.

GÜLSEREN, I.; GURI, A.; CORREDIG, M. Effect of interfacial co,position on uptake of curcumin-piperin mixtures in oil water emulsions by Caco-2 cells. **Royal Society of Chemistry**. 5, 1218, 2014.

GUO, Li., et al. Mechanism of piperine in affecting apoptosis and proliferation of gastric cancer cells via ROS-mitochondria-associated signalling pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, China, 25, p.9513–9522, 2021.

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

HAIL J. R, N. et. al., Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in different keys. **Apoptosis**, v. 11 p. 889–904, 2006.

HE, Y., et al. The changing 50 % inhibitory concentration (IC 50) of cisplatin : a pilot study on the artifacts of the MTT assay and the precise measurement of density-dependent chemoresistance in ovarian cancer. **Oncotarget** v. 7, n. 43, 2016.

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.

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.

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.

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

JAVED, B., et al. Enhanced Anticancer Response of Curcumin- and Piperine-Loaded Lignin-g-p (NIPAM-co-DMAEMA) Gold Nanogels against U-251 MG Glioblastoma Multiforme. **Biomedicines**, Irlanda, 9 (11), 1516, 2021.

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.

LIMA, M.A., PEREIRA, L.F.F., FERNANDES, A.L.G. Equivalência farmacêutica da formulação combinada de budesonida e formoterol em cápsula única com dispositivo inalador de pó. **J Bras Pneumol**, 38(6), p.748-756, 2012.

LIN, Y., et al. Piperine induces apoptosis of lung cancer A549 cells via p53-dependent mitochondrial signaling pathway. **Tumor Biology**, China, 35, 3305- 3310, 2014.

LIFE TECHNOLOGIES. **CellEvent™ Caspase-3 / 7 Green Detection Reagent**, 2017.

LOK, B., RUDIN, C.M., **Epigenetic** targeting of DNA repair in lung cancer. **PNAS**, Toronto, 116, p.22429-11431, 2019.

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

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

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

MARQUES, M.S., et al. Curcumin-loaded nanoemulsion improves haemorrhagic stroke recovery in wistar rats. **Brain Research**, Brasil, 1746, p.147007, 2020.

MARTIN, S. J.; HENRY, C. M. Distinguishing between apoptosis, necrosis, necroptosis and other cell death modalities. **Methods**, v. 61, n. 2, p. 87–89, 2013.

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.

MOORTHI, C., et al. Preparation and characterization of curcumin-piperine dual drug loaded nanoparticles. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Índia, 11, p.841-848, 2012.

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

MOTTAGHITALAB, F., et al. New insights into designing hybrid nanoparticles for lung cancer: Diagnosis and treatment. **Journal of Controlled Release**, Iran, 295, p.250-267, 2019.

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., 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.

NIKEZIĆ, A.V.V., BONDŽIĆ, A.M., VASIĆ, V.M., Drug delivery systems based on nanoparticles and related nanostructures. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Serbia, 151, p.105412, 2020.

NOZOHOURI, S., et al. A multilayer hollow nanocarrier for pulmonary co-drug delivery of methotrexate and doxorubicin in the form of dry power inhalation. **Materials Science and Engineering C**, Iran, 99, p. 752-761, 2019.

OLIVEIRA, R.G.; ALENCAR-FILHO, E.B.; VASCONCELLOS, M.L.A.A. A Influência da Piperina na Biodisponibilidade de Fármacos: Uma Abordagem Molecular. **Química Nova**, v. 37, nº 1, 69-73, 2014.

OLIVEIRA, T.L. **Avaliação dos efeitos biológicos das frações do látex de *Euphorbia umbellata* pax bruyns e do triterpeno eufol: no sistema complemento, quimiotaxia de neutrófilos e toxicidade celular.** 2019 (Tese de doutorado), Universidade Federal do Paraná, 2019.

ORTIZ, M., et al. Development of Novel Chitosan Microcapsules for Pulmonary Delivery of Dapsone: Characterization, Aerosol Performance, and *In Vivo* Toxicity Evaluation. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, Brasil, 16, 2015.

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

PAN, H., et al. Fabrication of Polydopamine-Based Curcumin Nanoparticles for Chemical Stability and pH-Responsive Delivery. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 68, p.2795-2802, 2020.

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

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

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

RUDNIK, L.A.C. et al. Co-Loaded Curcumin and Methotrexate Nanocapsules Enhance Cytotoxicity against Non-Small-Cell Lung Cancer Cells. **Molecules**, Brasil, v. 25, 1913, 2020.

SAHA, K.C.; SEAL, H.P.; NOOR, M.A. Isolation and characterization of piperine from the fruits of black pepper (*Piper nigrum*). **J. Bangladesh Agril. Univ.**, 11(1): 11–16, 2013.

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, v. 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, v. 38, nº 4, p.538-552, 2015;

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

SCHMIDT, B. Resveratrol, Curcumin and Piperine Alter Human Glyoxalase 1 in MCF-7 Breast Cancer Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, Brasil, 21, p.5244, 2020.

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

SILVA, A.A. **Preparação e caracterização de granulados contendo dispersão sólida de praziquantel obtidos por fusão/solidificação em leite fluidizado**. 2008 (Dissertação de mestrado) - 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, v. 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

SWAPNA, D.P.R. Isolation, identification and antimycobacterial evaluation of piperine from *Piper longum*. **Der Pharmacia Lettre**, v.4 (3), p. 863-868, 2012.

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.

TIWARI, A., et al. Evaluation of piperine against cancer stem cells (CSCs) of hepatocellular carcinoma: Insights into epithelial-mesenchymal transition (EMT). **Bioorganic Chemistry**, India, 110, 2021.

VAN DER MEER, F. J., et al. Apoptosis- and necrosis-induced changes in light attenuation measured by optical coherence tomography. **Lasers in Medical Science**, v. 25, n. 2, p. 259–267, 2010.

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

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

WANG, F., et al. Pharmacokinetic studies and anticancer activity of curcumin- loaded nanostructured lipid carriers. **Acta Pharmaceutica**, China, 67, 357-371, 2017.

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

XU, C., et al. Pulmonary delivery by exploiting doxorubicin and cisplatin co- loaded nanoparticles for metastatic lung cancer therapy. **Journal of Controlled Release**, China, 295, p.153-163, 2019.

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;

ZAKERI, Z., LOCKSHIN, R.A. Cell death during development. **J. Immunol. Methods** 265, 3–20, 2002.

ZATTA, K.C., et al. An Inhalable Power Formulation Based on Micro-and Nanoparticles Containing 5-Fluorouracil for the Treatment of Metastatic Melanoma. **Nanomaterials**, Brasil, 75, 2018.

ZHANG, J., et al. Curcumin promotes apoptosis in A549/DDP multidrug-resistant human lung adenocarcinoma cells through an miRNA signaling pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.399,1,China, 2010.



**APÊNDICE A – ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO**

Article

## Co-Loaded Curcumin and Methotrexate Nanocapsules Enhance Cytotoxicity against Non-Small-Cell Lung Cancer Cells

Loanda Aparecida Cabral Rudnik <sup>1</sup>, Paulo Vitor Farago <sup>1,2</sup>, Jane Manfron Budel <sup>1,\*</sup>, Amanda Lyra <sup>1</sup>, Fernanda Malaquias Barboza <sup>1</sup>, Traudi Klein <sup>1</sup>, Carla Cristine Kanunfre <sup>3</sup>, Jessica Mendes Nadal <sup>1</sup>, Matheus Coelho Bandéca <sup>4</sup>, Vijayasankar Raman <sup>5</sup>, Andressa Novatski <sup>1</sup>, Alessandro Dourado Loguercio <sup>1</sup> and Sandra Maria Warumby Zanin <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, 84030-900 Ponta Grossa, Brazil; loandacabral@hotmail.com (L.A.C.R.); pvsfarago@gmail.com (P.V.F.); amandinhamlyra@gmail.com (A.L.); fer\_barboza@hotmail.com (F.M.B.); traudiklein@gmail.com (T.K.); jessicabem@hotmail.com (J.M.N.); anovatski2@gmail.com (A.N.); aloguercio@hotmail.com (A.D.L.)

<sup>2</sup> Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmacy, Federal University of Paraná, 81020-430 Curitiba, Brazil; sandrazanin@ufpr.br

<sup>3</sup> Postgraduate Program in Biomedical Science, Department of General Biology, State University of Ponta Grossa, 84030-900 Ponta Grossa, Brazil; cckanunfre@gmail.com

<sup>4</sup> Postgraduate Program in Dentistry, Ceuma University, 65065-470 São Luís, Brazil; mbandeca@gmail.com

<sup>5</sup> National Center for Natural Products Research, School of Pharmacy, University of Mississippi, University, MS 38677, USA; vraman@olemiss.edu

\* Correspondence: janemanfron@hotmail.com; Tel.: +55-42-3220-3124

Vol. 63: e20200234, 2020  
<http://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2020200234>  
 ISSN 1678-4324 Online Edition



Article - Human and Animal Health

## PEG-PCL Nanocapsules Containing Curcumin: Validation of HPLC Method for Analyzing Drug-loading Efficiency, Stability Testing and Cytotoxicity on NIH-3T3 Cell Line

Loanda Aparecida Cabral Rudnik<sup>1</sup>  
<https://orcid.org/0000-0002-5512-9659>

Amanda Martinez Lyra<sup>1</sup>  
<https://orcid.org/0000-0002-5849-669X>

Fernanda Malaquias Barboza<sup>1</sup>  
<https://orcid.org/0000-0001-7187-7430>

Traudi Klein<sup>1</sup>  
<https://orcid.org/0000-0002-5569-6426>

Carla Cristine Kanunfre<sup>2</sup>  
<https://orcid.org/0000-0002-2865-3084>

Paulo Vitor Farago<sup>1,3</sup>  
<https://orcid.org/0000-0002-9934-4027>

Sandra Maria Warumby Zanin<sup>3</sup>  
<https://orcid.org/0000-0003-1978-4653>

Jessica Mendes Nadal<sup>1\*</sup>  
<https://orcid.org/0000-0002-2419-2110>