

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MACROMOLÉCULAS PROFESSORA ELOISA MANO – IMA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
POLÍMEROS

LIZANDRA VIANA MAURAT DA ROCHA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS CARREADORAS DE CURCUMINOIDES: UM POTENCIAL
TERANÓSTICO PARA *ALZHEIMER***

Rio de Janeiro

2018

LIZANDRA VIANA MAURAT DA ROCHA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS CARREADORAS DE CURCUMINOIDES: UM POTENCIAL
TERANÓSTICO PARA *ALZHEIMER***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Polímeros do Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências, em Ciência e Tecnologia de Polímeros.

Orientadora: Professora Dra. Maria Inês Bruno Tavares

Coorientadora: Professora Dra. Priscilla Vanessa Finotelli

Rio de Janeiro

2018

CIP - Catalogação na Publicação

R672d Rocha, Lizandra Viana Maurat da
DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CARREADORAS DE
CURCUMINOIDES: UM POTENCIAL TERANÓSTICO PARA
ALZHEIMER / Lizandra Viana Maurat da Rocha. -- Rio
de Janeiro, 2018.
110 f.

Orientadora: Maria Inês Bruno Tavares.
Coorientadora: Priscilla Vanessa Finotelli.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do
Rio de Janeiro, Instituto de Macromoléculas
Professora Eloisa Mano, Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Polímeros, 2018.

1. Nanopartículas poliméricas. 2.
Nanoprecipitação. 3. Alzheimer. 4. Curcuminoides. 5.
Caracterização. I. Tavares, Maria Inês Bruno,
orient. II. Finotelli, Priscilla Vanessa, coorient.
III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

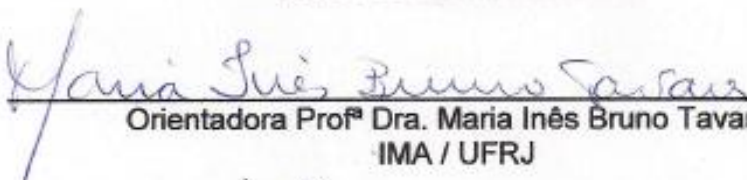
LIZANDRA VIANA MAURAT DA ROCHA

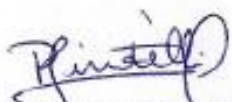
**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS CARREADORAS DE CURCUMINOIDES: UM POTENCIAL
TERANÓSTICO PARA ALZHEIMER**


Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Polímeros do Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano, Universidade Federal do Rio de Janeiro como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências, em Ciência e Tecnologia de Polímeros.

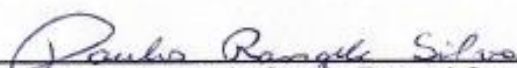
Aprovado em: 16/07/2018


BANCA EXAMINADORA


Orientadora Prof^a Dra. Maria Inês Bruno Tavares
IMA / UFRJ


Coorientadora Prof^a Dra. Priscilla Vanessa Finotelli
FF / UFRJ


Professor Dr. Marcos Lopes Dias
IMA/UFRJ


Professor Dr. Paulo Sergio Rangel Cruz da Silva
IMA/UFRJ


Professor Dr. Rafael Ramos Hospodar Felipe Valverde
IBCCF/UFRJ

Dedico esta dissertação àqueles que são meu alento, meu referencial e minha maior motivação - Deus, minha família, queridos mestres e amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder as condições materiais, saúde, habilidades e afincos necessários para concluir esta dissertação.

Aos meus pais, Paulo (em memória) e Jaira, pelo amor incondicional, por terem provido a melhor educação que eu poderia ter, sempre me incentivando a dar meu melhor em tudo que faço, me apoiando, e me sustentando nas vitórias e nos tropeços.

À minha “irmã-coruja”, minha maior “fã”, Andreza, por sua amizade, companheirismo, auxílio, admiração e motivação em todos os momentos.

Ao meu marido, Alex, que manifesta sua cumplicidade, respeito, lealdade e dedicação todos os dias enchendo nosso lar de amor, carinho e afeto para me receber da melhor forma possível, levando com muita paciência minha ausência, meu cansaço e minhas inquietações.

Ao meu bebezinho, Miguel, que, mesmo dentro da barriga já desperta em mim o maior amor do mundo e a vontade de crescer ainda mais profissionalmente, vencer na vida, lhe prover tudo que houver de melhor e me tornar seu exemplo.

Aos meus sogros, Alfredo e Rosa, por sempre torcerem por mim, sem medir esforços em me ajudar nas pequenas e grandes demandas da rotina turbulenta de pós-graduanda, esposa, filha, nora *etc.*

À minha orientadora, Maria Inês, por me ensinar tantas coisas, sempre com tanto carinho, zelo, paciência e entusiasmo.

À minha coorientadora, Priscilla, por me acompanhar desde a iniciação científica, contribuindo na medida certa como uma “professora-amiga” parceira e exigente, que cooperou com ótimas ideias e correções, além de todo suporte e parceria durante os trabalhos no CCS e no CBPF.

A todos os mestres que cruzaram o meu caminho e sobretudo aos que permaneceram na minha vida, formal ou informalmente, de alguma forma contribuindo para minha formação acadêmica e moral.

Ao produtor e entusiasta de alimentos orgânicos, Elpídio Venturini, que gentilmente cedeu os rizomas de cúrcuma utilizados nesta pesquisa.

À Laurinha, minha “IC nota 10”, super eficiente, competente e alto astral, por ter me ajudado em tudo que precisei durante a pesquisa, além de desenvolver seus próprios estudos de forma muito independente e dedicada, somando ótimos trabalhos à produção científica do grupo.

À Lili, minha “amiga-mentora”, que me recebeu no IMA e “pegou pela mão” desde o início, ensinando tudo que estava ao seu alcance com todo carinho e ajudando em cada ponto da minha vida pessoal e profissional.

Aos amigos do IMA, sobretudo aos mais que especiais “Metralhas”, que não só fazem parte da minha rotina acadêmica e representam para mim exemplos de profissionais, mas também encerram meu apreço e fazem parte dos meus momentos de descontração e lazer.

Aos colegas de laboratório (do IMA e do CCS) por compartilharem a rotina de trabalho tornando-a mais leve e sadia, constantemente agregando muitos conhecimentos e calorias em reuniões sempre fartas de guloseimas maravilhosas e memoráveis.

Aos meus amigos de longa e nova data, que, de algum modo, em algum momento, me impulsionaram e alegraram, me apoiando também nesta importante etapa.

Aos professores do IMA, pelos conhecimentos fornecidos.

Aos funcionários do IMA (em especial ao Dudu, técnico operador do NMR) por todo suporte operacional - análises realizadas e serviços prestados sempre com qualidade e boa vontade.

Aos técnicos da central analítica do Departamento de Produtos Naturais e Alimentos da Faculdade de Farmácia (FF/UFRJ), Jônatas e Aline, pelas análises realizadas sempre com muita qualidade e boa vontade.

Aos funcionários do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), pela disposição das instalações e instrumentos necessários para auxiliar e complementar minha pesquisa.

Ao Polo de Xistoquímica “Professor Claudio Costa Neto” (PXQ – IQ/UFRJ) e à Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP), pelas análises realizadas sempre com muita qualidade e boa vontade.

Ao CNPq e à FAPERJ pelo fomento.

RESUMO

A doença de *Alzheimer* causa um grande impacto socioeconômico em todo mundo. Entretanto, até o momento não foi desenvolvido um tratamento eficiente nem intervenções médicas capazes de curar esta doença. Justificam-se assim muitos estudos acerca de medicamentos alternativos, com destaque para os curcuminoides, que apresentam menor custo, maior disponibilidade, atoxicidade e efeitos adversos reduzidos. Contudo sua bioatividade e apreciável potencial como teranóstico são limitados por sua natureza hidrofóbica, que resulta em baixa biodisponibilidade. Neste contexto, o encapsulamento polimérico surge como uma poderosa ferramenta para viabilizar a aplicação destes polifenóis. Para tal, é indispensável um estudo criterioso da bioengenharia do sistema nanoparticulado bem como a compreensão do efeito do próprio extrato natural sobre os polímeros envolvidos. Neste estudo, os curcuminoides foram extraídos a partir do rizoma da cúrcuma e caracterizados por diferentes técnicas. As nanopartículas à base de policaprolactona e *Pluronic* F-68 foram produzidas por nanoprecipitação, com adição de diferentes proporções de extrato de curcuminoides, e caracterizadas física, química, estrutural e morfológicamente. Também foram realizados ensaios de alteração de cor, de solubilidade e eficiência de retenção de extrato nas nanopartículas. Os resultados de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, ressonância magnética nuclear de carbono-13, cromatografia líquida de alta eficiência e UV-visível demonstraram satisfatoriamente a extração dos curcuminoides de interesse, bem como seu carregamento, manutenção de suas essenciais características químicas e aumento da solubilidade em meio aquoso quando encapsulado. Também pôde ser observada - via espalhamento dinâmico de luz, potencial zeta, espectroscopia de infravermelho, difração de raios X, microscopia eletrônica de varredura, calorimetria diferencial de varredura, análise termogravimétrica e ressonância magnética nuclear no domínio do tempo - a influência das distintas quantidades de extrato de curcuminoides sobre a dinâmica molecular, propriedades morfológicas, estruturais e físico-químicas das nanopartículas obtidas.

Palavras-chave: Nanopartículas poliméricas. Nanoprecipitação. *Alzheimer*. Curcuminoides. Caracterização.

ABSTRACT

Alzheimer's disease has a worldwide socioeconomic impact. However, no efficient treatment or medical interventions capable of curing this disease have been developed so far. Thus, many studies on alternative medicines are justified, with emphasis on the research on curcuminoids, that present lower cost, greater availability, non-toxicity and reduced adverse effects. However, its bioactivity and its appreciable potential as theranostics are limited by its hydrophobic nature, which results in low bioavailability. In this context, the polymer encapsulation emerges as a powerful tool to make the application of these polyphenols viable. For this, a critical study of the bioengineering of the nanoparticulate system is indispensable as well as the understanding of the effect of the natural extract on the polymers used. In this study, curcuminoids were extracted from the rhizome of turmeric and characterized by different techniques. The nanoparticles based on polycaprolactone and Pluronic F-68 were produced by nanoprecipitation, with addition of different proportions of curcuminoids extract, and characterized physically, chemically, structurally and morphologically. The color change, solubility and extract retention on nanoparticle tests were also performed. The results of Fourier transform infrared spectroscopy, carbon-13 nuclear magnetic resonance, high-performance liquid chromatography and UV-visible showed satisfactorily the extraction of curcuminoids of interest, as well as their carrying, the maintenance of their essential chemical characteristics and the increase of their aqueous solubility when encapsulated. It could also be observed - via dynamic light scattering (DLS), zeta potential (ZP), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM), differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetric analysis (TGA) and nuclear magnetic resonance in the time domain (TD-NMR) - the influence of different amounts of extract of curcuminoids on the molecular dynamics, morphological, structural and physicochemical properties of the obtained nanoparticles.

Keywords: Polymeric nanoparticles. Nanoprecipitation. *Alzheimer*. Curcuminoids. Characterization.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1	DOENÇA DE ALZHEIMER (DA)	15
3.1.1	Bases bioquímicas da doença	16
3.1.2	Tratamento atual e suas limitações	17
3.1.3	Extratos naturais como alternativa para o tratamento da DA	18
3.1.3.1	Curcuminoides	19
3.1.3.2	Desafios na aplicação dos curcuminoides	21
3.2	ENCAPSULAMENTO DE ATIVOS HIDROFÓBICOS	22
3.2.1	Utilização de polímeros biodegradáveis como encapsulantes	24
3.2.2	Nanopartículas poliméricas	24
3.2.3	Nanoprecipitação	26
3.3	TRANSPOSIÇÃO DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA (BHE)	28
3.3.1	Constituição da barreira hematoencefálica	28
3.3.2	Transposição da BHE por nanopartículas poliméricas	29
3.4	ESCOLHA DOS BIOMATERIAIS POLIMÉRICOS ADEQUADOS	30
3.4.1	Policaprolactona	31
3.4.2	Poloxâmeros	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1	MATERIAIS	35
4.2	EQUIPAMENTOS	35
4.3	PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DE CURCUMINOIDES (CUR)	36
4.4	CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS DE CURCUMINOIDES	38
4.4.1	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	38
4.4.2	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (NMR)	38
4.4.3	Cromatografia Líquida de alta eficiência (HPLC)	39
4.5	PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	39
4.6	CARACTERIZAÇÃO DOS NANOSSISTEMAS POLIMÉRICOS	41

4.6.1	Espalhamento dinâmico de luz (DLS)	41
4.6.2	Microscopia eletrônica de varredura (SEM)	42
4.6.3	Potencial zeta (ZP)	42
4.6.4	Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	43
4.6.5	Análise Termogravimétrica (TGA)	43
4.6.6	Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	43
4.6.7	Difração de Raios X (XRD)	44
4.6.8	Ressonância Magnética Nuclear no domínio do tempo (TD-NMR)	44
4.6.9	Teste de alteração de cor	44
4.6.10	Eficiência de retenção de CUR nas partículas	45
4.6.11	Ensaio de solubilidade de CUR e das partículas	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	ANÁLISE DE FTIR DOS EXTRATOS	48
5.2	NMR DOS EXTRATOS	50
5.3	HPLC DOS EXTRATOS	56
5.4	ANÁLISE DE TAMANHO (DLS)	58
5.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (SEM)	62
5.6	POTENCIAL ZETA (ZP)	65
5.7	ANÁLISE DE FTIR DOS NANOSSISTEMAS	68
5.8	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)	70
5.9	CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)	75
5.10	DIFRAÇÃO DE RAIOS X (XRD)	76
5.11	NMR NO DOMÍNIO DO TEMPO (TD-NMR)	79
5.12	TESTE DE ALTERAÇÃO DE COR	82
5.13	EFICIÊNCIA DE RETENÇÃO DE CUR NAS PARTÍCULAS	83
5.14	ENSAIO DE SOLUBILIDADE DE CUR E DAS PARTÍCULAS	84
6	CONCLUSÕES	87
7	SUGESTÕES	90
	REFERÊNCIAS	91
	APÊNDICE A – TRABALHOS APRESENTADOS EM SEMINÁRIOS E CONGRESSOS	110

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer (DA) foi pela primeira vez identificada e descrita pelo psiquiatra e neuropatologista Alois Alzheimer em 1906. Embora muitos avanços tenham sido feitos em torno da etiologia e histopatologia desta doença desde então, ainda perduram questionamentos fundamentais que repercutem na dificuldade de se encontrar opções de diagnóstico, cura e tratamentos mais efetivos para a DA. Atualmente, a enfermidade é enfrentada com base na hipótese de formação de agregados da proteína β -amiloide, inflamação glial neurotóxica e consequente estresse oxidativo e degeneração cerebral (SMALL; CAPPAL, 2006).

Há muitos anos, uma gama de produtos naturais e substâncias deles derivadas são usados para fins medicinais devido ao seu potencial farmacológico associado ao fato de serem provenientes de fontes abundantes ou ao menos renováveis. Recentemente, alguns produtos naturais vêm ganhando ainda mais relevância por apresentarem baixo custo de produção e extração, além de efeitos adversos reduzidos, uma vez que já são testados, aprovados e usualmente utilizados integralmente ou como parte da formulação de cosméticos, alimentos, embalagens, entre outros (WATKINS et al., 2015).

Um bom exemplo de produto natural que desperta interesse popular, da indústria farmacêutica e do meio acadêmico são os curcuminoides - compostos polifenólicos extraídos do rizoma da Cúrcuma (*Curcuma longa* Linn, *Zingiberaceae*), como uma mistura de três substâncias básicas: curcumina, demetoxicurcumina e bisdemetoxicurcumina. Sobretudo a curcumina é hoje amplamente apreciada e apontada como uma esperança no tratamento e prevenção da DA por apresentar pertinentes propriedades farmacológicas já comprovadas *in vitro* e *in vivo* como: anti-inflamatória, antioxidante e anti-amiloide. Alguns estudos inclusive já demonstraram a atuação sinérgica dos curcuminoides no combate à DA e na atividade nematocida (ANDERSON; MITCHELL; MOHAN, 2000; AHMED; GILANI, 2014). Outra vantagem apresentada pelos nutracêuticos (alimentos ou nutrientes que associam funções nutricionais básicas e propriedades farmacêuticas) como os curcuminoides é sua atoxicidade, que confere maior segurança à aplicação biomédica e possibilita a administração oral de altas doses (ANAND et al., 2007; NAKSURIYA et al., 2014). Entretanto, sua baixíssima solubilidade em água, baixa biodisponibilidade, rápida metabolização e alta propensão à degradação oxidativa limitam sua aplicação como

agente terapêutico (ANAND *et al.*, 2007; BELKACEMI *et al.*, 2011; NAKSURIYA *et al.*, 2014; SUN *et al.*, 2014; LIU, Z. *et al.*, 2016).

Deste modo, a Nanomedicina mostra-se uma conveniente ferramenta para melhorar a biodisponibilidade dos curcuminoides, pois o encapsulamento de bioativos hidrofóbicos em nanopartículas de polímeros biodegradáveis favorece o aumento da sua solubilidade em água, do seu tempo de retenção na corrente sanguínea, da estabilidade, da tolerabilidade e, assim, da sua eficácia, permitindo ainda uma via de liberação controlada do ativo (MAITI *et al.*, 2016).

Neste trabalho, foram escolhidos polímeros biocompatíveis e biodegradáveis, a policaprolactona (PCL) e o *Pluronic* F-68, para a produção das nanocápsulas poliméricas carreadoras de curcuminoides visto sua finalidade de aplicação como teranóstico (agente com função terapêutica e diagnóstica) para *Alzheimer*. A PCL é um tipo de poliéster, classe de polímeros mais aplicada no desenvolvimento de nanopartículas poliméricas para sistemas de liberação de medicamentos e se destaca como um biomaterial promissor neste contexto, tendo seu uso em sistemas de liberação já aprovado pela *Food and Drug Administration* (LIECHTY *et al.*, 2010; DASH; KONKIMALLA, 2012; SHAIK; KORSAPATI; PANATI, 2012; PITTO-BARRY; BARRY, 2014; MALI; BATHE, 2015). A estrutura química da PCL resulta em propriedades ideais para o encapsulamento e liberação prolongada de ativos oleosos, especialmente no que tange o controle da sua biodegradabilidade no ambiente fisiológico, que pode ser adequada determinando o grau de cristalinidade e a massa molar do polímero convenientemente (ULERY; NAIR; LAURENCIN, 2011).

Apesar de todas as vantagens da PCL, sua característica hidrofóbica conduz à sua rápida remoção do corpo, bem como à baixa estabilidade das nanopartículas em meio aquoso. Assim, para aumentar a estabilidade e a viabilidade de nanopartículas de PCL em sistemas fisiológicos, o revestimento de poloxâmero anfifílico (*Pluronic* F-68) foi proposto para evitar a agregação e a depuração natural das nanopartículas pelo sistema imunológico (MONDAL; GRIFFITH; VENKATRAMAN, 2016).

A técnica escolhida para a produção dos nanossistemas foi a nanoprecipitação, por apresentar diversas vantagens como: ser um método rápido, simples, barato e de alta reprodutibilidade; formar instantaneamente suspensões de nanopartículas muito estáveis, de dispersão estreita (entre 50 e 300 nm) e já recobertas por polímero anfifílico; e permitir o encapsulamento de fármacos totalmente insolúveis em água (BECK-BROICHSITTER *et al.*, 2010; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal desta dissertação foi avaliar a influência da adição de diferentes proporções de extrato de curcuminoides em sistemas nanoparticulados obtidos via nanoprecipitação, utilizando diferentes ferramentas de análise (sobretudo química, estrutural e térmica), visando uma possível utilização dos curcuminoides na área farmacêutica, como agente diagnóstico e/ou terapêutico, no combate à doença de *Alzheimer*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar um extrato de curcuminoides a partir do rizoma da cúrcuma e verificar nele a presença dos componentes de interesse farmacológico através do estudo químico e cromatográfico do mesmo.
- Desenvolver, por nanoprecipitação, nanopartículas à base de PCL e *Pluronic* F-68 contendo diferentes proporções de curcuminoides, visando sobretudo confirmar a sua incorporação e entender o efeito do extrato de curcuminoides sobre o comportamento dinâmico e molecular de cada nanossistema polimérico.
- Caracterizar os sistemas nanoparticulados em relação ao tamanho, potencial zeta, morfologia, estrutura, cristalinidade, propriedades térmicas e dinâmica molecular.
- Determinar a eficiência de retenção do extrato nas nanopartículas bem como a capacidade de manutenção de propriedade fundamental como cor pela incorporação na matriz polimérica.
- Estudar o perfil de solubilidade aquosa dos curcuminoides e dos nanossistemas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 DOENÇA DE *ALZHEIMER* (DA)

Esta neuropatologia recebe o nome do médico alemão que pioneiramente a identificou e caracterizou, há 112 anos, como um padrão específico de demência senil ou precoce, causado por um distúrbio neurofisiológico degenerativo que acarreta em perda de memória, desorientação espaço-temporal e, a longo ou médio prazo prejudica as funções motoras, podendo levar até à morte (SMALL; CAPPAL, 2006).

Os crescentes estudos acerca da doença de *Alzheimer* (DA) justificam-se pelo nefasto impacto socioeconômico por ela causado. Segundo a *Alzheimer's Association* (2017), há quatro anos, os certificados oficiais de óbito dos Estados Unidos da América registraram 93.541 mortes decorrentes da DA, fazendo-a configurar como a sexta maior causa de morte no país. Outrossim, ainda que a DA não leve à morte, tem graves consequências sobre o doente, sua família e sobre a sociedade como um todo, visto que é uma das principais causas de demência e morbidade, gerando a necessidade de acompanhamento especializado, o que implica num alto custo. À medida que a doença progride, aumentam as demandas e o sofrimento causados pela enfermidade. Estima-se que os cuidados requeridos por um paciente diagnosticado com Alzheimer onerem o orçamento público e familiar chegando a triplicar seus gastos com medicação, acompanhamento médico e de enfermagem especializada, internações e intervenções recorrentes (ARRIGHI *et al.*, 2010).

O diagnóstico da DA frequentemente é feito de modo tardio porque seus sintomas (perda de memória recente, confusão mental, irritabilidade, súbitas mudanças de humor, alienação espaço-temporal, dificuldades com a linguagem, entre outros) confundem-se com ocorrências relacionadas à idade avançada, ao estresse ou mesmo ao desenvolvimento de algum outro tipo de demência. E, lamentavelmente, a maior probabilidade de efetividade no tratamento, com perspectiva de estagnação da evolução dos sintomas, está diretamente relacionada ao estágio de degeneração encefálica. Por isso, inúmeros critérios foram estabelecidos e são constantemente reformulados para facilitar e antecipar a identificação da doença de *Alzheimer* e seu imediato tratamento (DUBOIS *et al.*, 2014).

Segundo estimativas da ADI (*Alzheimer's Disease International*), em 2015, mais de 45 milhões de pessoas já sofriam de demência em todo o mundo. Somente

no Brasil, verificam-se cerca de 1,2 milhão de casos da DA e supõe-se que aproximadamente o dobro deste número configure em pacientes ainda sem o diagnóstico confirmado e reportado (ABRAZ, 2017). Com o aumento da longevidade, aumenta também, a cada ano, a representatividade da DA. Prevê-se que o número de casos diagnosticados de demência entre americanos dobre a cada 20 anos, podendo chegar a mais de 131 milhões em 2050. Em vista deste contexto, cresce exponencialmente o número de pesquisas sobre o tema a fim de não só estabelecer o diagnóstico precocemente, mas também elaborar tratamentos mais adequados, visando futuramente obter a cura da DA (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2017).

3.1.1 Bases bioquímicas da doença

Os sintomas da doença de *Alzheimer* são causados pelo dano ou destruição neuronal e perda sináptica em partes do cérebro envolvidas em funções cognitivas e motoras (NITRINI *et al.*, 2005). A DA atinge primeiro o hipocampo, afetando a aprendizagem e a memória, depois o pensamento e o planejamento das ações. Com o tempo, progride lentamente para outras áreas do cérebro, causando danos irreversíveis no funcionamento intelectual, afetivo, comportamental e físico do paciente (ERICKSON; BARNES, 2003).

Já existem evidências consideráveis de que o acúmulo da proteína β -amiloide ($A\beta$) seja o principal responsável pela neurodegeneração que ocorre na DA. A $A\beta$ é produzida a partir do precursor de proteína β -amiloide (APP), através de sua clivagem pela enzima β -secretase (BACE1). Uma vez que os agregados de $A\beta$ e os emaranhados neurofibrilares - constituídos por filamentos de proteína Tau hiperfosforilada - são o "ponto-chave" desta patogênese, levando ao quadro inflamatório da microglia e à atrofia tecidual, são também o mote central das pesquisas que visam desenvolver terapias baseadas na inibição da produção, agregação ou depuração amiloide, embora o mecanismo pelo qual estas proteínas contribuem entre si gerando toxicidade e gliose crônica ainda seja pouco compreendido (MASTERS; SELKOE, 2012). As pesquisas de Patrick McGeer e colaboradores (2016) confirmaram apenas que esta condição implica na produção de radicais livres e outras substâncias neurotóxicas que acabam por destruir o tecido neuronal. Assim, os tratamentos mais modernos que propõem uma vertente anti-inflamatória e antioxidante, seja por via farmacológica, seja por via nutricional.

3.1.2 Tratamento atual e suas limitações

Até o momento, as opções de tratamento farmacológico da DA atendem basicamente a dois propósitos distintos: inibição da colinesterase ou regulação da atividade de outros mensageiros químicos cerebrais importantes para a aprendizagem e memória. Nenhuma das abordagens até hoje aventada é capaz de cessar ou retardar o dano neuronal causado pela doença; elas apenas elevam a quantidade de neurotransmissores no cérebro, amenizando os sintomas e melhorando a qualidade de vida do paciente, a curto ou médio prazo (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2017).

Já a terapia não farmacológica é geralmente aplicada concomitantemente a alguma medicação, com o intuito de manter ou melhorar a cognição e a capacidade de realizar atividades cotidianas. Neste segmento, incluem-se atividades de estimulação cognitiva, social e física (STRÖHLE *et al.*, 2015).

Os fármacos disponíveis no mercado e aprovados pela FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) mais comumente usados no tratamento da DA são destacados no Quadro 1, acompanhados de seus respectivos modos de atuação, estágios em que são recomendados e efeitos colaterais.

Quadro 1 - Medicções utilizadas no tratamento da doença de *Alzheimer*

Nome Comercial	Princípio ativo	Classe	Atuação	Estágio aplicável	Efeitos colaterais
Aricept®	Donepezil	Inibidores da colinesterase	Evitam a quebra da acetilcolina e/ou butirilcolina, mensageiros químicos importantes para a aprendizagem e para a memória	Todos	Náuseas, vômitos, diarreia, câibras musculares, fadiga, perda de peso
Razadyne®	Galantamina			Leve a moderado	Náuseas, vômitos, diarreia, perda de peso, diminuição do apetite
Exelon®	Rivastigmina			Leve a moderado	Náuseas, vômitos, diarreia, fraqueza muscular, diminuição do apetite, perda de peso
Namenda®	Memantina	Antagonista da NMDA*	Regula a ativação do glutamato e bloqueia os efeitos tóxicos associados ao seu excesso	Moderado a severo	Tonturas, dor de cabeça, diarreia, constipação
Namzaric®	Memantina + Donepezil	Combinação das duas classes de medicamentos acima		Moderado a severo	Dor de cabeça, náuseas, vômitos, diarreia, tonturas, diminuição do apetite

*NMDA: N-metil D-Aspartato (aminoácido excitatório agonista do glutamato)

Fonte: Adaptado de *Alzheimer's Disease Education and Referral Center*, 2015

Observa-se que os efeitos adversos são bastante expressivos. Isto acarreta, muitas vezes, em uma situação de desconforto tão grande ao paciente, que a amenização dos demais sintomas não se torna profícua.

Alguns fatores dificultam o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes para a doença de *Alzheimer*: o elevado custo da pesquisa e produção dos medicamentos; o tempo relativamente longo necessário para análise da efetividade do tratamento, que

é afetado pelo quadro dinâmico de progressão da doença, modificando constantemente a estrutura cerebral; e a desafiadora questão da transposição da barreira hematoencefálica pelo medicamento. Não obstante, as pesquisas seguem no intuito de, ao menos, reduzir os efeitos adversos causados pelos medicamentos já consolidados na terapêutica sintomática (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2017).

3.1.3 Extratos naturais como alternativa para o tratamento da DA

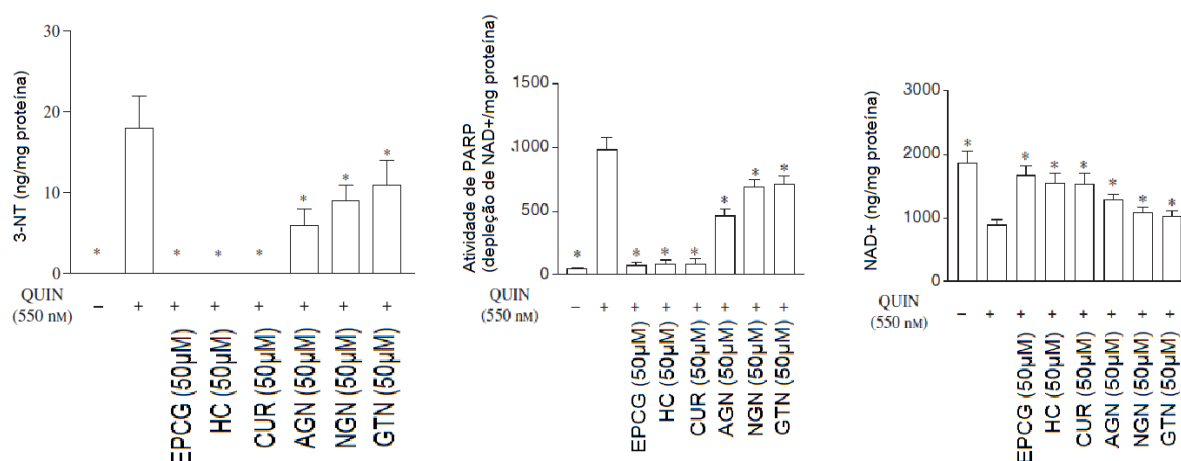
Ao redor do mundo, diversos produtos naturais como Ginkgo biloba, vitamina E, canela, ômega 3 e açafrão já são utilizados a fim de prevenir e retardar os danos causados pela DA. Embora a maioria deles não possua atividade farmacológica cientificamente comprovada, dados estatísticos evidenciam de algum modo sua eficácia. Na Índia, por exemplo, onde é expressivo o consumo de açafrão, as taxas de mortalidade em decorrência do *Alzheimer* são bem inferiores a de países americanos que não têm o açafrão em sua tradição culinária (AGGARWAL *et al.*, 2007). Por isso, ainda que de modo informal ou complementar aos tratamentos sintomáticos farmacológicos, tais produtos são comumente prescritos por médicos e nutricionistas (NEWMAN; CRAGG, 2007). A Ginkgo Biloba é mais um bom exemplo - mesmo não sendo aprovada pela FDA, é aprovada em vários países europeus e respaldada pela *European Medicines Agency* (MCCARNEY *et al.*, 2008, IHL; TRIBANEK; BACHINSKAYA, 2012).

Wang e colaboradores (2016) salientam que muitas das experiências acumuladas no tratamento da demência pela Medicina Tradicional Chinesa, utilizando ervas durante milhares de anos de prática, tiveram seus efeitos terapêuticos validados. E, já que infelizmente poucos foram os fármacos sintetizados que atingiram o efeito preventivo ou terapêutico esperado nas aplicações clínicas até agora, emerge uma necessidade urgente de se estudar e explorar ainda mais produtos naturais para o tratamento da DA. Tais produtos hoje são defendidos também por apresentarem atuação multialvo e acarretarem em menos efeitos colaterais, tornando-se apropriados até para o uso preventivo, a longo prazo.

Os efeitos antioxidantes e neuroprotetores de compostos polifenólicos de origem natural já são amplamente estudados por sua elevada bioatividade. Através da avaliação da excitotoxicidade induzida por ácido quinólico (QUIN) em culturas primárias de neurônios humanos (Figura 1), já foi possível, inclusive, confirmar que o

galato de epigalocatequina (EPCG), o hidrato de catequina (HC) e a curcumina (CUR) são capazes de reduzir consideravelmente os danos oxidativos. Apigenina (AGN), naringenina (NGN) e galotanina (GTN), compostos fenólicos similares, mesmo em menor grau, também são capazes de reduzir os efeitos oxidativos, com atuação neuroprotetora similar (BRAIDY *et al.*, 2010; ESSA *et al.*, 2012).

Figura 1 – Quantificação in vitro dos níveis de 3-NT, PARP e NAD⁺



Fonte: Adaptado de BRAIDY *et al.*, 2010

Segundo os autores do estudo apresentado na Figura 1, os resultados obtidos se deveram ao fato de a excitotoxicidade QUIN-induzida ser mediada por níveis intracelulares elevados de Ca²⁺ e pelo estresse oxidativo mediado por óxido nítrico, que resulta em dano do DNA, ativação de poli(ADP-ribose) polimerase (PARP), depleção de NAD⁺ e morte celular. Todos os polifenóis testados foram capazes de reduzir os efeitos oxidativos do aumento da produção de óxido nítrico, reduzindo assim a formação de 3-nitrotirosina (3-NT) e PARP e, portanto, impedindo a depleção de NAD⁺ e a morte celular. Contudo, tanto o EPCG quanto HC e CUR foram mais eficientes em comparação com a AGN, NGN e GTN, possivelmente em virtude dos mecanismos adicionais dos polifenóis primeiramente citados, que lhes permite atenuar bastante o influxo Ca²⁺ induzido por QUIN (BRAIDY *et al.*, 2010).

3.1.3.1 Curcuminoides

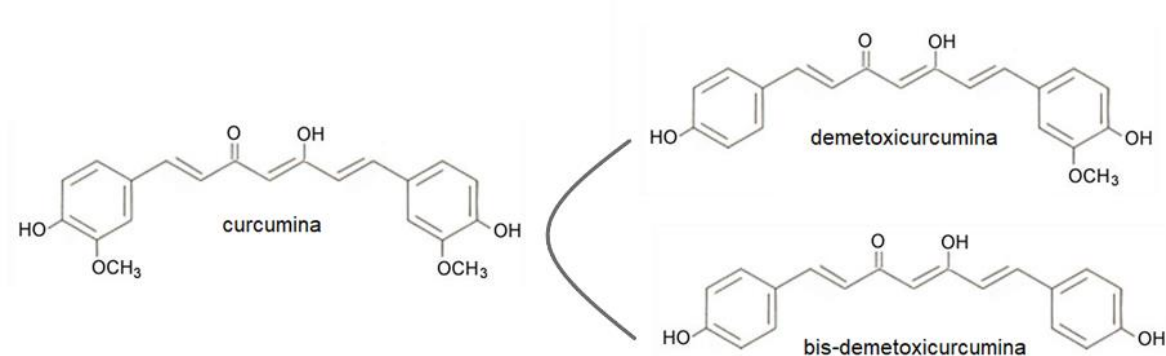
A *Curcuma longa* Linn, uma planta herbácea da família Zingiberaceae, destaca-se neste cenário visto que as substâncias extraídas de seu rizoma exercem ação anti-

inflamatória e antioxidante, além de atuar diretamente sobre as proteínas A β e Tau, protagonistas da patogênese do *Alzheimer* (WANG *et al.*, 2016). Estudos de Silva Filho e colaboradores (2009) afirmam que, apesar de a cúrcuma (também conhecida como açafrão, açafoa, açafrão-da-índia, açafrão-da-terra, turmérico, raiz-de-sol ou gengibre amarelo) ter origem asiática, já é amplamente cultivada há décadas em países tropicais como o Brasil para ser utilizada com finalidade medicinal e culinária.

Uma vantagem de se utilizar um nutracêutico (alimento ou ingrediente alimentar que possui ação farmacológica) como o açafrão é que ele proporciona benefícios para a saúde além da nutrição básica, oferecendo menos riscos, uma vez que já é aprovado como atóxico pelos órgãos de controle e largamente usado como conservante, aromatizante e corante natural em bebidas e alimentos (*curry*, mostarda, queijos, sorvetes, iogurtes e margarina). Achados epidemiológicos demonstraram que o consumo de açafrão pela população indiana pode estar associado a uma menor prevalência de *Alzheimer* (ZLOTOGORSKI *et al.*, 2013; PRASAD, S. *et al.*, 2014; AGGARWAL *et al.*, 2007).

Os principais compostos responsáveis pelas atividades da cúrcuma são os curcuminoides: a curcumina e seus derivados (demetoxi e bis-demetoxicurcumina), polifenóis representados na Figura 2 (PÉRET-ALMEIDA *et al.*, 2008).

Figura 2 - Estrutura química dos curcuminoides



Fonte: Adaptado de PÉRET-ALMEIDA *et al.*, 2008

De acordo com Zhao e colaboradores (2012), a curcumina é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e se ligar aos oligômeros de A β , inibindo sua aglomeração e reduzindo sua toxicidade, além de retardar a indução de hiperfosforilação da proteína Tau. Mesmo antes da elucidação de vários mecanismos

associados à efetividade da curcumina sobre a DA, já havia evidências da mesma. Em estudos *in vitro*, pesquisadores mediram os efeitos da curcumina sobre a formação de fibrilas de A β a partir de peptídeos e constataram que ela inibiu a formação e extensão das fibrilas além de desestabilizar estruturalmente as fibrilas pré-formadas, de forma dose-dependente, na faixa de concentração entre 0,1 e 1 micromolar (ONO *et al.*, 2004). Tal constatação foi ratificada por estudos em modelos animais de DA cujo perfil comportamental foi drasticamente beneficiado com a administração de curcumina (YANG *et al.*, 2005). A atividade antioxidante da curcumina também pode ajudar a explicar parcialmente os benefícios observados, uma vez que o estresse oxidativo aumenta o dano no tecido cerebral durante a DA, o que confirma os estudos *in vivo* realizados posteriormente por Essa e colaboradores (2012).

Muitos outros efeitos específicos da curcumina, além da redução da toxicidade e da fosforilação e da atividade antiamilóide, antioxidante e anti-inflamatória, podem ser relacionados aos mecanismos de neurodegeneração associado ao *Alzheimer*, bem como a ativação de uma via neuroprotetora (POTTER, 2013; REDDY *et al.*, 2016). Ainda, os curcuminóides são potenciais inibidores colinesterásicos e fluoróforos bons candidatos a marcadores diagnósticos (GOOZEE *et al.*, 2016).

3.1.3.2 Desafios na aplicação dos curcuminóides

Apesar de todos os seus efeitos benéficos, a aplicação dos curcuminóides impõe grandes desafios devido a sua natureza consideravelmente hidrofóbica, com alta taxa de degradação em pH neutro ou básico, alta susceptibilidade à degradação fotoquímica, metabolização rápida e baixa absorção intestinal, que conduzem, por sua vez, a reduzida biodisponibilidade e baixa absorção após administração, chegando a impedir a obtenção de soluções para administração oral (BELKACEMI *et al.*, 2011).

Assim, as pesquisas atuais buscam evoluir no sentido de elaborar formulações que lhes proporcione maior estabilidade em pH alcalino, menor propensão à oxidação e fotodegradação, melhor solubilidade em meio aquoso, maior tempo de retenção na corrente sanguínea e maior biodisponibilidade, o que aumentaria sua viabilidade farmacológica (LIU *et al.*, 2016).

3.2 ENCAPSULAMENTO DE ATIVOS HIDROFÓBICOS

De acordo com programas de rastreamento e identificação farmacêutica, aproximadamente 40% das substâncias naturais consideradas ativas possuem baixa solubilidade em água, sendo então identificadas dentro das classes II e IV na classificação biofarmacêutica. Tal fato dificulta bastante a obtenção de novas formulações farmacêuticas (THORAT & DALVI, 2012). Mesmo havendo uma boa atividade farmacológica, a hidrofobicidade confere desvantagens a esses ativos, tais como: reduzida biodisponibilidade e alta variação sérica em períodos de jejum/prandial, falta de proporcionalidade dose-resposta, necessidade do uso excessivo de excipientes e condições muito ácidas ou básicas para otimizar a solubilidade (MERISKO-LIVERSIDGE; LIVERSIDGE, 2008).

Uma forma promissora para contornar os dilemas relacionados ao aproveitamento farmacológico de ativos hidrofóbicos, melhorar as propriedades destas substâncias e preservar sua atividade farmacológica é associá-los a sistemas carreadores como nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanoemulsões, lipossomas, ciclodextrinas, estruturas micelares e complexos fosfolipídicos. Tais sistemas encapsulantes são relatados na literatura como de grande auxílio para prolongar seu tempo de circulação, melhorar a estabilidade durante o armazenamento e proteger o princípio ativo dos processos metabólicos, além de permitir a formação de sistemas aquosos facilmente dispersíveis nos fluidos biológicos (BISHT *et al.*, 2007; POLLETO *et al.*, 2011; ZLOTOGORSKI *et al.*, 2013).

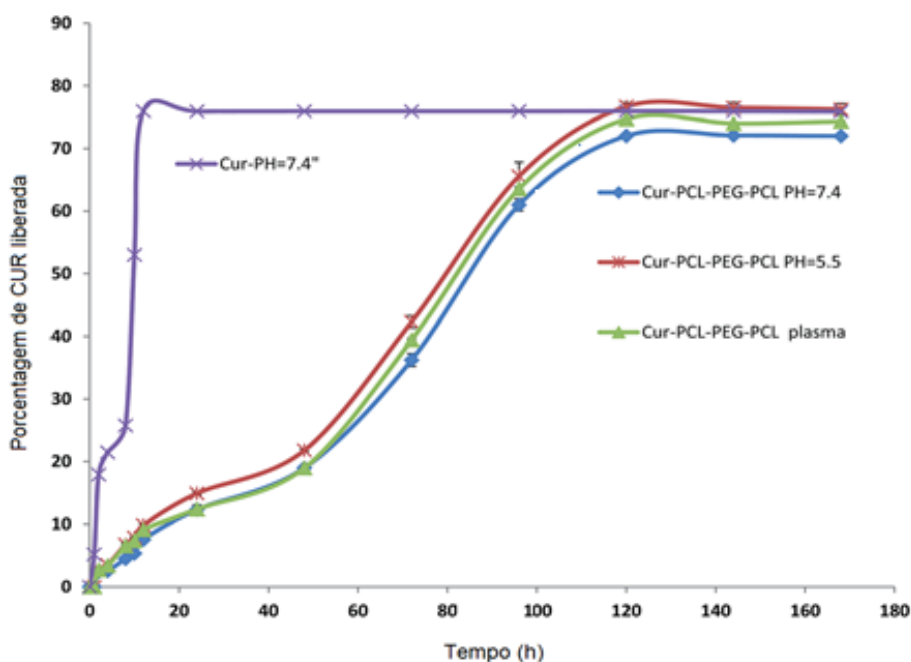
O encapsulamento de fármacos em partículas inferiores a 1µm de diâmetro vem recebendo muita atenção nos últimos anos, uma vez que apresenta inúmeras vantagens quando comparados aos sistemas microparticulados - o aumento da captação do fármaco pelas células e maior facilidade de penetração pelos órgãos e tecidos, entre outras, mostrando-se promissora também para o tratamento de doenças como o *Alzheimer*, cujo grande desafio está na transposição do ativo através da barreira hematoencefálica antes da sua eliminação metabólica ou captura pelo sistema imunológico (KAUR; SINGH, 2014).

Manjili e colaboradores (2016) conseguiram obter partículas poliméricas de PCL e PEG contendo curcumina, com alta eficiência de encapsulação (superior a 80%) e preciso controle da distribuição de tamanho (evidenciado pelo índice de polidispersividade de aproximadamente 0,18) e potencial zeta. Os sistemas se

mostraram eficientes tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Tal sucesso do material resultou de características fundamentais como: ser biodegradável, biocompatível, anfífilo, estável no sangue, não tóxico, não imunogênico, não inflamatório e de tamanho pequeno. O encapsulamento polimérico, além de aumentar a estabilidade físico-química da curcumina, melhorou drasticamente seu perfil de liberação e bioatividade no contexto estudado (câncer de mama).

Como pode ser observado na Figura 3, os sistemas carreadores poliméricos alcançaram o objetivo proposto, sendo capazes de liberar lentamente a curcumina (provavelmente por mecanismos de difusão, degradação e hidrólise das micelas). Com a redução do pH do meio, a liberação de curcumina das nanopartículas foi aumentada, em decorrência do aumento do processo de hidrólise das partículas. O perfil de liberação da CUR livre em pH 7,4 (pontos em cruz sobre curva lilás que se destaca das demais na Figura 3) mostrou-se sensivelmente diferente dos sistemas carreadores poliméricos, o que confirmou que a curcumina livre é liberada muito rapidamente, como não se deseja; mas quando ela é englobada nos sistemas poliméricos (três outras curvas), mesmo em diferentes pHs, atingiu-se a liberação prolongada do ativo. Assim, este trabalho evidencia que encapsular ativos hidrofóbicos para administração controlada de fármacos visando objetivos terapêuticos pode ser muito eficaz.

Figura 3 – Perfil de liberação *in vitro* da curcumina livre x encapsulada



Fonte: Adaptado de MANJILI *et al.*, 2016

3.2.1 Utilização de polímeros biodegradáveis como encapsulantes

Já foram relatados inúmeros métodos para encapsular fármacos em partículas poliméricas. Em específico, podem ser ressaltadas algumas técnicas utilizadas para a obtenção de nanopartículas poliméricas contendo ativos hidrofóbicos como os curcuminoides: nanoprecipitação, emulsificação e evaporação do solvente, relargagem, diálise, aspersão, tecnologia de fluido supercrítico, microemulsão, miniemulsão, emulsão sem surfactante e polimerização interfacial. A escolha do método depende de uma série de fatores, como rendimento, tamanho de partícula e distribuição de tamanhos desejados (RAO; GECKELER, 2011). A maioria destas metodologias dão-se à base de solventes, incluem processos de evaporação de solvente, dupla emulsificação, fusão ou precipitação e geralmente requerem a adição de agentes tensoativos para evitar a coalescência das partículas durante a sua formação (KUMARI; YADAV, S.K.; YADAV, S.C, 2010; BHAWANA *et al.*, 2011).

Vários estudos como os do grupo de Panchanan Maiti (2016) discutiram o desenvolvimento de nanopartículas, nanossuspensões e complexos de curcumina com objetivo de aumentar sua solubilidade e absorção celular e obtiveram sucesso, alcançando resultados que sugeriram que as formulações à base de nanopartículas poliméricas de curcumina apresentam potencial na terapêutica contra a DA. E, embora a utilização de polímeros como nanocarreadores de fármacos seja bastante investigada, a literatura ainda carece de mais estudos específicos sobre o encapsulamento de curcuminoides para aplicação no cérebro visando o tratamento do *Alzheimer* (JAIN, K. K., 2017).

3.2.2 Nanopartículas poliméricas

No contexto farmacêutico, dispersões de partículas ou partículas sólidas com tamanho na faixa de 10 a 1000 nm podem ser classificadas como “nanopartículas” (MOHANRAJ & CHEN, 2006). Estas nanopartículas podem interagir superficialmente com os fitoquímicos fenólicos possibilitando sua encapsulação, melhorando sua solubilidade aquosa, diminuindo possíveis efeitos adversos, prevenindo sua oxidação no trato gastrointestinal e aumentando significativamente a sua absorção e biodisponibilidade (SARI *et al.*, 2015).

Os tipos de nanopartículas diferem entre si pela organização estrutural. De acordo com a definição precisa de Codevilla *et al.* (2015), as nanocápsulas são compostas por um envoltório polimérico arranjado ao redor de um núcleo oleoso; nelas, o composto bioativo pode estar dissolvido no núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Já nas nanoesferas, não se forma uma cavidade central, e o composto bioativo pode ficar retido ou adsorvido por toda a matriz polimérica. Em termos de eficiência, as nanocápsulas destacam-se sobre as nanoesferas, pois apresentam a capacidade de encapsular maiores quantidades de fármacos hidrofóbicos, com reduzidas taxas da indesejável liberação imediata (COUVREUR *et al.*, 2002).

As nanopartículas poliméricas são atualmente as mais utilizadas em combinação com produtos naturais, havendo uma preferência pela utilização de polímeros biodegradáveis, em que se destacam: o poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), o polietileno glicol (PEG), o poli(álcool vinílico) (PVA), o ácido poli-(L ácido láctico) (PLA) e a policaprolactona (PCL), polímeros com alta biocompatibilidade e funcionalização relativamente simples (WATKINS *et al.*, 2015).

Os materiais poliméricos são de alta relevância neste contexto não só pela biocompatibilidade e biodegradabilidade, mas por conferirem aos nanossistemas diversas vantagens como maior estabilidade, maior eficiência de encapsulação do princípio ativo e melhor controle na cinética de liberação do fármaco (PATEL *et al.*, 2012; NICOLAS *et al.*, 2013).

Diversas vantagens podem ser obtidas com a utilização de nanopartículas poliméricas como sistemas de liberação de fármacos, a saber: a facilidade de controle do tamanho de partícula e das propriedades de superfície; a possibilidade de modulação das características de liberação do fármaco e de degradação do carreador, por meio da seleção dos materiais constituintes da partícula e da técnica de preparação; a possibilidade de vetorização do fármaco ao sítio de ação através da adição de ligantes específicos à superfície das partículas; possibilidade de administração por diferentes vias, incluindo oral, nasal, parenteral, intraocular, entre outras (MOHANRAJ & CHEN, 2006).

A abordagem nanotecnológica tornou-se um importante viés no desenvolvimento de novos materiais e estruturas, dentro de uma ampla gama de aplicações, incluindo a indústria de fármacos e alimentos, em virtudes das propriedades adicionadas pelo efeito da redução do tamanho. A escala nanométrica,

por si só, acarreta em uma série de ganhos em propriedades não observados fora do universo quântico (EZHILARASI, 2013).

Em virtude das dimensões reduzidas, de engenharia controlada, as propriedades físico-químicas de nanopartículas poliméricas são muito singulares - a ampla área superficial relativa, sobretudo, resulta numa elevada interação com proteínas, microrganismos e células do sistema imunológico além de facilitar a formação de estruturas muito versáteis (HUH & KWON, 2011; PARVEEN *et al.*, 2012). Por isso, as propriedades farmacocinéticas das nanopartículas são mais controladas quando comparadas à administração de fármacos em doses convencionais. E, segundo Merisko-liversidge & Liversidge (2008), quando comparadas às partículas de diâmetro superior a 1µm, apresentam a vantagem de interagir melhor com as células, ter uma maior taxa de dissolução e maior facilidade de penetração tecidual.

3.2.3 Nanoprecipitação

A nanoprecipitação, também conhecida como nanodeposição de polímero pré-formado, deposição interfacial ou deslocamento de solvente, foi descrita pela primeira vez por Fessi e colaboradores em 1989. Recentemente, tornou-se a técnica mais usada para produzir nanocápsulas poliméricas contendo ativos hidrofóbicos por apresentar diversas vantagens, que são destacadas na Figura 5 (FESSI *et al.*, 1989; BECK-BROICHSITTER *et al.*, 2010; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

Esta metodologia, esquematizada na Figura 4, baseia-se no fenômeno resultante da confluência de duas fases - uma chamada orgânica e a outra aquosa. A fase orgânica consiste basicamente no polímero escolhido como encapsulante dissolvido em um solvente orgânico parcialmente miscível com a água (acetona ou etanol, por exemplo). Nesta fase também são adicionados o fármaco (insolúvel ou bem pouco solúvel em água) e um estabilizante lipofílico. A fase aquosa contém, além de um não-solvente para o polímero (geralmente água deionizada), um surfactante ou tensoativo hidrofílico. Uma vez preparadas e estabilizadas à temperatura ambiente, a fase orgânica é vertida em fluxo laminar sobre a fase aquosa sob agitação magnética moderada e constante.

As nanocápsulas são formadas instantaneamente devido à rápida difusão do solvente orgânico na fase aquosa, que leva à formação de nanogotículas de óleo contendo o fármaco, onde o polímero insolúvel é depositado, formando uma parede

polimérica. É então obtida uma suspensão coloidal de nanopartículas. Após a conclusão do processo de nanoprecipitação, a acetona é removida por evaporação natural em capela de exaustão durante alguns dias e a suspensão coloidal é concentrada até o volume final desejado, sendo esta remoção do solvente orgânico de suma importância para qualquer tipo de aplicação biomédica (MONTASSER, 2000; LEPELTIER *et al.*, 2014).

Figura 4 - Ilustração do método da nanoprecipitação



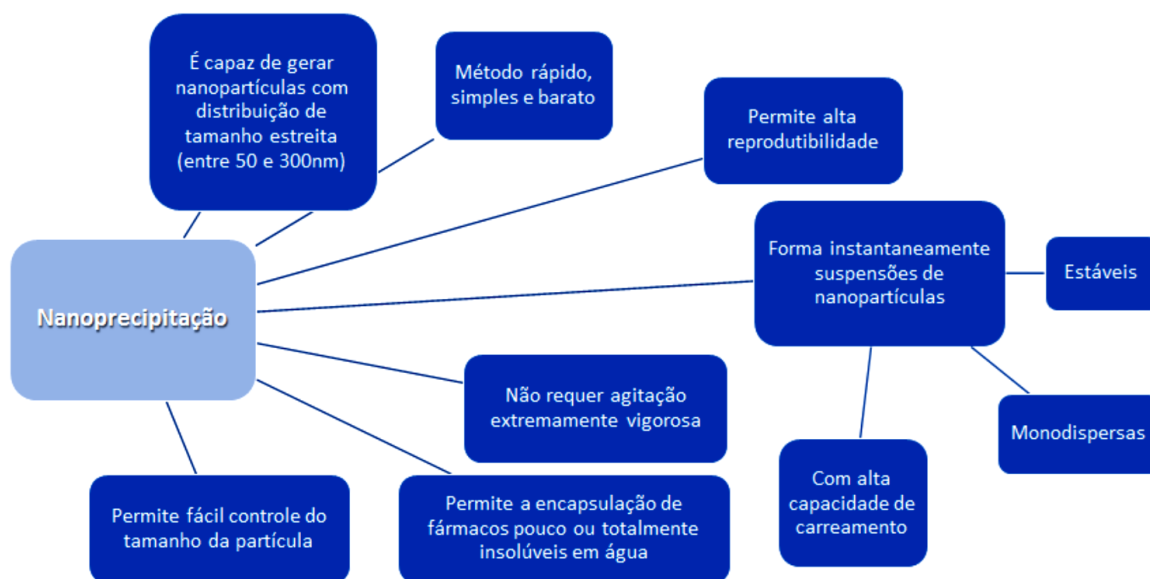
Fonte: TAVARES *et al.*, 2015

Segundo Mora-Huertas e colaboradores (2010), embora o método seja de simples realização, sua essência é complexa, pois o princípio da técnica envolve um sensível fenômeno hidrodinâmico interfacial: a água apresenta uma maior tensão superficial que o solvente orgânico, e, por isso, é gerado um desequilíbrio no sistema, refletido em turbulência contínua na interface dos líquidos, o que faz com que o solvente polimérico se desloque e, conseqüentemente, o polímero tenda a se agregar, formando a nanocápsula. Destarte, a nanoprecipitação é especialmente afetada pela velocidade de agitação, pela massa molar do polímero e pela composição de cada uma das suas fases (BECK-BROICHSITTER *et al.*, 2010).

Já foi observado que o diâmetro hidrodinâmico médio das partículas obtidas por esta técnica é diretamente proporcional à concentração do polímero na fase orgânica e a sua massa molar; bem como inversamente proporcional à velocidade de agitação do sistema (LEPELTIER *et al.*, 2014).

Uma coletânea de vantagens relatadas na literatura para esta técnica é ilustrada na Figura 5.

Figura 5 - Diagrama esquemático das vantagens da Nanoprecipitação



Fonte: FESSI *et al.*, 1989; MONTASSER, 2000; BECK-BROICHSITTER *et al.*, 2010; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010; GOU *et al.*, 2011; LEPELTIER *et al.*, 2014

3.3 TRANSPOSIÇÃO DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA (BHE)

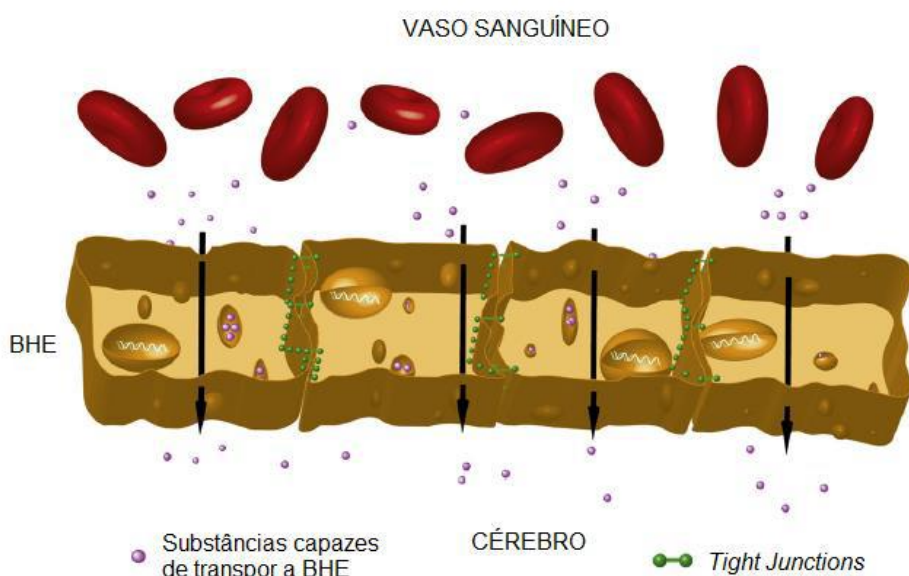
A barreira hematoencefálica (BHE), ilustrada na Figura 6, é um sistema muito especializado que regula que o fluxo de substâncias entre a corrente sanguínea e o cérebro. Sua função primordial é de proteção - através dela, somente moléculas muito pequenas e drogas específicas (não carregadas e lipofílicas) conseguem permear por difusão passiva (MAIESE *et al.*, 2014). Por este motivo, sua transposição acaba por configurar um fator limitante ao tratamento de doenças que envolvem o sistema nervoso central, como é o caso da doença de *Alzheimer*. (WOHLFART *et al.*, 2012; KROL *et al.*, 2013).

3.3.1 Constituição da barreira hematoencefálica

Entre muitas estruturas que compõem a BHE, as células endoteliais são as mais abundantes nos capilares cerebrais, as quais se encontram interpostas pelas chamadas *tight junctions*, estreitas ligações proteicas que “costuram as laterais” das membranas celulares (Figura 6), atuando como barreira física ao transporte paracelular de substâncias (DANHIER *et al.*, 2012; WONG *et al.*, 2012). Este tipo de

estrutura resulta na menor permeabilidade e maior resistência elétrica transendotelial, quando comparamos a BHE com outros tecidos (BRAMBILLA *et al.*, 2011; KROL *et al.*, 2013).

Figura 6 - Representação da transposição da barreira hematoencefálica - por substâncias especializadas – e das principais estruturas envolvidas



Fonte: Adaptado de BRAMBILLA *et al.*, 2011

3.3.2 Transposição da BHE por nanopartículas poliméricas

De acordo com Patel e colaboradores (2012), diversas enzimas expressas no meio intra e extracelular são capazes de se ligar aos compostos ali presentes e inativá-los. Outrossim, existem ainda mecanismos de efluxo capazes de restringir ainda mais o transporte de substâncias através da BHE.

Segundo Kreuter (2014), dentre as diversas alternativas de mecanismos já descritos para a transposição de substâncias pela BHE visando atingir o sistema nervoso central, destaca-se o uso de nanopartículas poliméricas. Acredita-se que a transposição da BHE por nanopartículas poliméricas ocorra principalmente através da endocitose mediada por receptores seguida pela transcitose, possibilitando o transporte e a liberação do princípio ativo encapsulado no parênquima cerebral. Observações categóricas destes processos também permitiram concluir que a endocitose seguida pela transcitose pode ocorrer por transporte mediado por

receptores ou por adsorção dependente das interações eletrostáticas, sendo este o alvo da engenharia de novos nanossistemas (WONG *et al.*, 2012).

Estudos apontam que os nanossistemas mais promissores para transposição da BHE são aqueles capazes de “se camuflar” do sistema imunológico fagocitário através do recobrimento com polietilenoglicol (PEG). Sobretudo nanopartículas de policaprolactona já tiveram sua eficiência demonstrada ao ter sua captação reduzida e seu tempo de circulação *in vivo* prolongado após recobrimento com PEG (D`ADDIO; PRUD`HOMME, 2011; SALMASO; CALICETI, 2013; DAWIDCZYK, 2014; BLANCO *et al.*, 2015).

Acredita-se também que a presença de cadeias de PEG adsorvidas aos nanocarreadores, além de prolongar seu tempo de circulação sistêmica, podem aumentar sua captação pelo cérebro (WOHLFART *et al.*, 2012). No âmbito farmacológico, é de extrema importância não apenas funcionalizar as nanopartículas poliméricas por peguilação (ato de revestir a partícula com PEG), mas também usar outras moléculas na sua superfície a fim de vetorizá-las ao órgão-alvo, para obter maior efeito terapêutico e reduzir seus efeitos adversos (FONTE *et al.*, 2016).

3.4 ESCOLHA DOS BIOMATERIAIS POLIMÉRICOS ADEQUADOS

Segundo a definição genérica, entende-se por biomaterial “qualquer material, que não fármaco, natural ou artificial, que compreende o todo ou uma parte de uma estrutura viva ou um dispositivo biomédico que executa, acrescenta ou substitui uma função natural”. Para tal, materiais desta classe devem ser, ao menos, biocompatíveis, biodegradáveis, não carcinogênicos, não-trombogênicos e facilmente reproduzidos mantendo suas propriedades químicas, físicas e mecânicas (WILLIAMS, 1999).

A escolha da matriz polimérica adequada para nanossistemas de liberação de ativos deve visar não só a biossegurança, mas também permitir a modificação da cinética de liberação do ativo, podendo ela ser controlada e até mesmo prolongada. Este tipo de modulação assegura também que o ativo seja liberado em doses pertencentes à faixa terapêutica, em que se alcançam os benefícios desejados, reduzindo os efeitos adversos e minimizando os riscos de toxicidade (LIECHTY *et al.*, 2010).

Outro ponto-chave na escolha dos biomateriais poliméricos adequados é que eles não apresentem interação com o ativo da formulação a fim de evitar o

comprometimento da função. Ainda, a biodegradabilidade do polímero deve ser avaliada no intuito de que, após cumprir sua função como biomaterial, ele seja eliminado do organismo de forma natural, dispensando intervenções médicas (DANHIER *et al.*, 2012).

Estudos realizados com nanopartículas de PLGA contendo curcumina constataram que a biodisponibilidade oral do ativo foi significativamente aumentada pelo encapsulamento. Entretanto, as nanoformulações constituídas de polímero com maior massa molar foram mais efetivas nos camundongos, provavelmente porque resultou em partículas quimicamente mais resistentes ao pH muito ácido do ambiente gástrico (TSAI *et al.*, 2012).

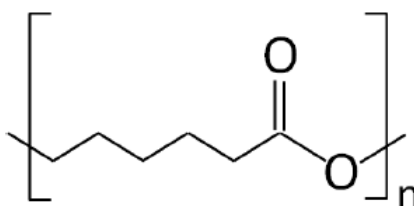
Além disso, foi concluído que a alteração da massa molar do PLGA também alterou os parâmetros farmacocinéticos da curcumina convencional após administração oral, o que leva a crer que o aumento da biodisponibilidade da curcumina no organismo pode ser atribuído a uma dissolução mais rápida após a administração, e não às características comuns aos sistemas de alta e baixa massa molar, como tamanho de partícula, índice de polidispersidade, potencial zeta e eficiência de encapsulação. Entretanto, pode-se apontar como uma das desvantagens do PLGA neste tipo de aplicação sua taxa de biodegradabilidade e incompatibilidade com diversos tipos de polímeros adequados ao revestimento das cápsulas para ativos hidrofóbicos (BELKACEMI *et al.*, 2011; TSAI *et al.*, 2012; WATKINS *et al.*, 2015).

3.4.1 Policaprolactona

Os poliésteres figuram a classe de polímeros mais aplicados no desenvolvimento de nanopartículas poliméricas para a liberação controlada de fármacos. A policaprolactona (PCL) destaca-se como promissor biomaterial neste contexto, tendo seu uso em sistemas de liberação já aprovado pela FDA (LIECHTY *et al.*, 2010; DASH; KONKIMALLA, 2012; SHAIK *et al.*, 2012; PITTO-BARRY; BARRY, 2014; MALI; BATHE, 2015).

A PCL é um poliéster alifático biodegradável de origem sintética cuja estrutura química - representada na Figura 7 - resulta na sua propriedade hidrofóbica ideal para encapsulamento de ativos oleosos.

Figura 7 - Estrutura química da policaprolactona



Fonte: Adaptado de LABET; THIELEMANS, 2009

Sua crescente aplicabilidade biomédica deve-se não somente ao fato de ser biocompatível e atóxico, mas, sobretudo, à sua biodegradabilidade em meio fisiológico ser relevantemente modulável. A taxa de degradação do mesmo *in vivo* é naturalmente baixa, podendo chegar a 2 ou 3 anos; mas pode ser modificada através da escolha da massa molar e do grau de cristalinidade do polímero mais adequados (ULERY *et al.*, 2011; MONDAL *et al.*, 2016).

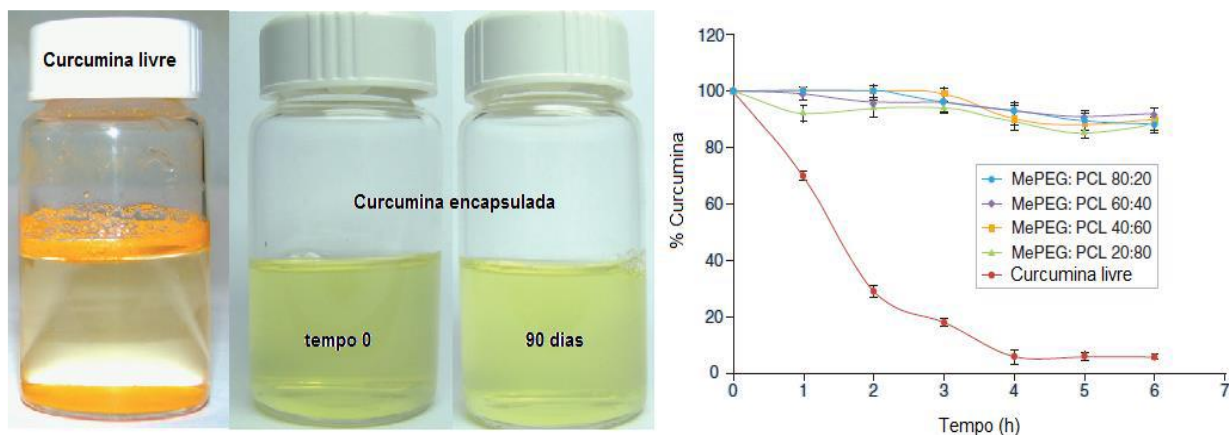
O mecanismo de degradação deste polímero e as propriedades do fármaco, as quais afetam sua distribuição na matriz polimérica, também alteram sensivelmente o perfil de liberação da formulação – ativos muito hidrofóbicos como os curcuminoides se distribuem de maneira uniforme na matriz hidrofóbica de PCL, sendo liberados mais facilmente por mecanismos de difusão, o que pode ou não ser desejável (TSAI *et al.*, 2012; SHUBHRA *et al.*, 2014; MONDAL *et al.*, 2016).

Na Figura 8, podem ser observados os resultados positivos de um estudo de nanoencapsulação de curcumina em suspensões coloidais de partículas de PCL e metoxi-PEG. Dentre muitos parâmetros importantes analisados, são destacadas a estabilidade coloidal das partículas suspensas em água e a estabilidade química da CUR em tampão fosfato-salino. Os sistemas poliméricos mostraram-se consideravelmente promissores em ambos os sentidos (MOHANTY, C. *et al.*, 2010).

Mesmo após 90 dias, as partículas de curcumina desenvolvidas por Mohanty e colaboradores mantiveram-se solubilizadas em tampão fosfato-salino (simulando meio fisiológico); já a curcumina livre, devido a sua hidrofobicidade, não se mostrou solúvel no mesmo meio. Ao quantificar o teor de curcumina no meio aquoso com o passar do tempo por cromatografia líquida de alta eficiência, pôde-se perceber que o composto livre se degradou em poucas horas, enquanto diferentes sistemas carreadores baseados em PCL e metoxi-PEG foram capazes de estabilizá-la por mais de 5 horas,

confirmando a eficiência do sistema proposto para a melhora da farmacocinética da substância de interesse.

Figura 8 – Estabilidade da curcumina em sistemas carreadores baseados em PCL



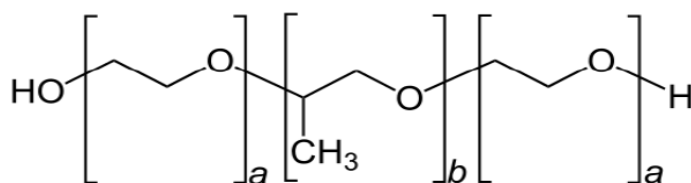
Fonte: Adaptado de MOHANTY, C. *et al.*, 2010

3.4.2 Poloxâmeros

Os poloxâmeros, também muito conhecidos como *Pluronic*s, são compostos anfifílicos comumente utilizados para revestir nanossistemas poliméricos para liberação de fármacos com características hidrofóbicas, cuja interação ao revestimento se dá por meio da adsorção (PITTO-BARRY, 2014). Eles consistem em cadeias não iônicas de copolímero tribloco, com centro hidrofóbico de poli(óxido de propileno) (PPO) e cadeias hidrofílicas de poli(óxido de etileno) (PEO) nas extremidades, como ilustra a Figura 9 (SALMASO; CALICETI, 2013; SHUBHRA *et al.*, 2014; ALAKHOVA; KABANOV, 2014).

Sua atuação como revestimento estabilizante de nanocápsulas de PCL é intrinsecamente dependente da sua configuração estrutural: a cadeia de PPO interage mais fortemente com a superfície hidrofóbica da partícula, atuando como um “sítio de ancoragem”; e a porção hidrofílica de PEO interage melhor com o meio aquoso da suspensão coloidal, permitindo a estabilização estérica e fácil ressuspensão das partículas em água. Embora a aplicação de poloxâmeros como revestimento seja de extremo proveito, cabem as devidas precauções em relação aos efeitos indiretos causados pela proporção de polímero no meio reacional, já que a viscosidade do meio reacional é um dos fatores determinantes nas suspensões coloidais obtidas (SALMASO; CALICETI, 2013; SHUBHRA *et al.*, 2014).

Figura 9 - Representação da estrutura química dos poloxâmeros

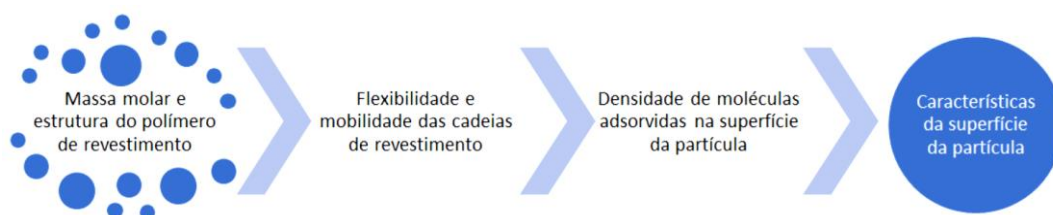


*a (PEO) = 2 a 130; b (PPO) = 15 a 67

Fonte: Adaptado de BARTRAKOVA; KABANOV, 2008

A composição do poloxâmero utilizado no revestimento também tem papel fundamental na engenharia do sistema desejado, uma vez que a espessura do revestimento é diretamente proporcional à quantidade de unidades hidrofílicas de óxido de etileno EO e à massa molar desta cadeia (SHUBHRA *et al.*, 2014; KOZAK; SADOWSKI, 2015). Outrossim, o tamanho das partículas também é diretamente afetado pelos *Pluronics*, pois, ao adsorvê-lo à superfície das nanopartículas, aumenta o diâmetro médio das mesmas, dependendo do tipo e da “espessura” da camada de copolímero adicionada. Quanto maior a concentração de poloxâmero, mais das suas moléculas são adsorvidas à superfície das partículas, reduzindo o espaço disponível para que elas se distribuam em direção às laterais, contribuindo para que os blocos de PEO se mantenham mais perpendiculares à superfície, resultando numa maior espessura de revestimento e, conseqüentemente, em um maior tamanho total de partícula (SHUBHRA *et al.*, 2014; SOBCZYŃSKI; KRISTENSENA; BERG, 2014). O efeito de proteção à opsonização obtido com este tipo de copolímero é muito similar ou ainda mais eficiente que o obtido por peguilação, já que esta capacidade de “camuflagem da nanopartícula” depende basicamente da organização das cadeias do polímero de revestimento e da habilidade do mesmo em atuar como barreira física para a adsorção das opsoninas (SALMASO; CALICETI, 2013). Os fatores mais críticos para a obtenção de um bom revestimento polimérico estão resumidamente ilustrados na Figura 10.

Figura 10 - Parâmetros decisivos para se obter um bom revestimento anfifílico



Fonte: Elaborado pelo autor

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Para o desenvolvimento desta dissertação, foram utilizados os seguintes materiais:

- Pluronic® F-68 (Mn 8.400 g/mol) na forma de *pellet*, oriundo da Sigma-Aldrich;
- Policaprolactona (Mn 10.000 g/mol) na forma de *pellet*, oriundo da Sigma-Aldrich;
- Acetona e etanol P.A. oriundos da ISO FAR;
- Padrão analítico de Curcumina (C₂₁H₂₀O₆) oriundo da Sigma-Aldrich;
- Rizomas de cúrcuma gentilmente cedidos pelo produtor de alimentos orgânicos Elpídio Antonio Venturini de Freitas, do Sítio Luar da Serra (Paty do Alferes, RJ, Brasil) devidamente certificado pela Associação dos Agricultores Orgânicos do Estado do Rio de Janeiro.

4.2 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados para esta dissertação estão listados a seguir em ordem alfabética.

- Analisador de potencial zeta BROOKHAVEN Instruments – Modelo: NanoBrook ZetaPALS (FF/UFRJ)
- Analisador de tamanho por espalhamento dinâmico de luz, DLS MALVERN Instruments – Modelo: Zetasizer Nano S90 (FF/UFRJ)
- Analisador termogravimétrico TA Instruments – Modelo: TGA Q500 (IMA/UFRJ)
- Banho ultrassônico UNIQUE MaxiClean – Modelo: USC-750A (FF/UFRJ)
- Calorímetro de Varredura Diferencial PERKIN ELMER – DSC 7 (IMA/UFRJ)
- Centrífuga CIENTEC – Modelo: CT-6000 (IMA/UFRJ)
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência THERMOFISHER SCIENTIFIC – Modelo: Dionex Ultimate 3000 (FF/UFRJ)
- Difrátômetro de raios X RIGAKU – Modelo: Miniflex (IMA/UFRJ)
- Espectrofotômetro FTIR PERKIN ELMER – Modelo: Frontier FT-IR/FIR Versão 10.4.2 (IMA/UFRJ)

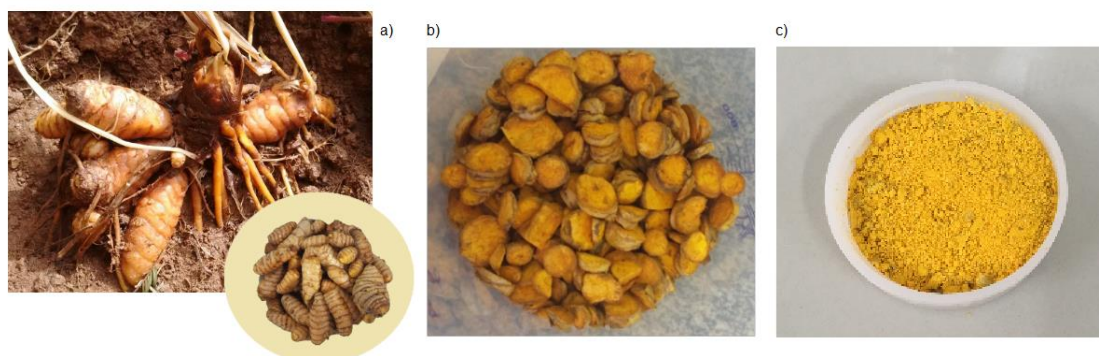
- Espectrofotômetro Uv-vís SHIMADZU – Modelo: UV Mini 1240 (FF/UFRJ)
- Espectrômetro de cor VITA – Modelo: Easyshade Advance (FOP/UNICAMP)
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear OXFORD INSTRUMENTS – Modelo: MARAN Ultra 23MHz (IMA/UFRJ)
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear VARIAN – Modelo: Mercury 300MHz (IMA/UFRJ)
- Liofilizador LABCONCO – Modelo: Benchtop FreeZone 2,5 litros (CBPF)
- Microscópio Eletrônico de Varredura de bancada PHENOM WORLD – Modelo: ProX (PXQ-IQ/UFRJ)
- Metalizador BAL-TEC – Modelo: SCD005 Sputter Coater (PXQ-IQ/UFRJ)
- Moedor microfino IKA – Modelo: MF 10 basic (CBPF)
- Phmetro AKSO – Modelo: K90 (FF/UFRJ)
- Spin Coater SPI SUPPLIES – Modelo: KW-4A (IMA/UFRJ)
- Ultrassonicador HIELSCHER – Modelo: UP100H (FF/UFRJ)

4.3 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DE CURCUMINOIDES (CUR)

A extração dos curcuminoides foi baseada em NASCIMENTO *et al.* (2006) e SILVA FILHO *et al.* (2009), com as devidas adaptações. O pó seco obtido a partir dos rizomas (DP) foi misturado à acetona na razão de 1:6 e submetido à agitação por dois diferentes processos: sonicação (SON) e banho ultrassônico (US), mantendo a temperatura das amostras em torno de 25°C, por imersão em banho de gelo.

Primeiramente, os rizomas da cúrcuma (Figura 11-a) foram lavados em água corrente, para remoção da terra e pedaços visivelmente danificados (com coloração mais escura ou morfologia diferenciada). Em seguida, foram cortadas fatias de aproximadamente 0,5cm e as mesmas foram liofilizadas até atingir umidade aproximada de 10% (Figura 11-b). Após secagem, a redução de massa foi de aproximadamente 73,2%; então as fatias secas foram trituradas num moedor, resultando num pó amarelo bem fino (Figura 11-c), que foi armazenado em frascos esterilizados hermeticamente fechados, dentro de torre dessecadora.

Figura 11 – Etapas do preparo da matriz natural para a extração



- a) Rizomas in natura, na terra e após lavagem respectivamente. b) Fatias de rizoma liofilizadas. c) Pó obtido após secagem e moagem dos rizomas de cúrcuma

Fonte: Elaborado pelo autor

Neste estudo, a acetona foi escolhida pela viabilidade de sua utilização no escalonamento da produção do extrato polifenólico e suas nanopartículas. Dentre os solventes orgânicos mais convenientes para extração de curcuminoides (acetona, etanol, metanol e dicloroetileno), acetona e etanol são os que apresentam menor toxicidade, aliada a bons resultados de produtividade, o que os levou a serem os mais utilizados na indústria alimentícia para esta finalidade específica há décadas (KRISHNAMURTHY *et al.*, 1976; GEORGE *et al.*, 1981). Ademais, a acetona também foi utilizada no processo de produção das nanopartículas, por isso, qualquer mínimo resíduo de solvente desta etapa de produção do extrato não acrescentaria mais um contaminante diferente ao sistema final, uma vez que, teoricamente, ocorre sua evaporação total na nanoprecipitação e na extração dos curcuminoides.

O pó seco de açafrão e o solvente, após agitação, foram filtrados à vácuo, com lavagem exaustiva de acetona (aproximadamente 150 ml) para remoção de partículas sólidas do extrato. Os dois extratos obtidos pelos dois tipos distintos de agitação (CURSON e CURUS) foram deixados em béqueres de mesmo diâmetro, em capela com fluxo laminar e exaustão, ao abrigo de luz e em temperatura controlada (em torno de 25°C) por aproximadamente 48h para total evaporação da acetona. Ao final do processo, foi obtido um extrato oleoso amarelo-alaranjado que também foi armazenado ao abrigo de luz, umidade e calor até o momento do encapsulamento.

Não foi realizado nenhum tipo de purificação nem isolamento da curcumina do extrato bruto (a partir daqui chamado CUR), uma vez que estes tipos de processos agregam custo à produção do extrato, mas não necessariamente acarretam em

melhorias do produto final. Estudos de Ahmed e Gilani (2014) inclusive demonstraram que a curcumina apresentou isoladamente menos efetividade contra a DA que a mistura dos curcuminoides, uma vez que a mistura de polifenóis apresentou efeito sinérgico, com cada um deles atuando de forma complementar, em diferentes vias terapêuticas.

Os extratos oleosos obtidos foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier, ressonância magnética nuclear de C^{13} e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para confirmar e avaliar a qualidade da extração dos curcuminoides. Eles também foram comparados em termos de pureza e quantidade de ativos extraídos antes de serem incorporados ao sistema de encapsulamento.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS DE CURCUMINOIDES

4.4.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho foram obtidos usando um espectrofotômetro PERKIN-ELMER Frontier FT-IR/FIR (versão 10.4.2, número de série 98737), com acessório de refletância total atenuada (ATR), 60 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} . Os extratos oleosos, livres de solventes orgânicos ou aquosos, foram colocados diretamente no suporte. Já o pó obtido pela liofilização e moagem dos rizomas foi colocado diretamente e pressionado sobre o suporte, em quantidade suficiente para cobrir na totalidade e promover o máximo contato.

4.4.2 Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (NMR)

A análise de ressonância magnética nuclear de carbono-13 em solução foi realizada para identificar os curcuminoides extraídos. Para obtenção desses dados, os extratos foram solubilizados em metanol deuterado na concentração de 2% (m/v) e analisados em equipamento de RMN VARIAN MERCURY VX, 300 MHz.

A técnica utilizada foi de pulso único. O núcleo de carbono-13 foi avaliado na frequência de 75,4MHz, com faixa espectral de 18867 Hz, pulso de 90° e tempo de recirculação de 1s. A sonda usada foi de 5 mm e a temperatura de análise foi em torno de $27\text{ }^\circ\text{C}$.

4.4.3 Cromatografia Líquida de alta eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência foi utilizada para verificar e quantificar a curcumina - o principal curcuminoide - nos extratos de curcuminoídeos. Para tal, a metodologia de Betbeder *et al.* (2015) foi utilizada na determinação da fase móvel (acetonitrila e água 1:1). As medidas foram realizadas com um cromatógrafo Dionex U3000, equipado com detector UV fixo, injetor automático, bomba binária e forno para colunas. A coluna cromatográfica usada foi a ReproSil Gold C18 (250 x 4,6 mm; 5µm; Dr Maisch GmbH, Alemanha). Um sistema de fase reversa foi aplicado em modo isocrático. O fluxo foi de 0,6 ml/min, o volume de injeção foi de 20µl e o comprimento de detecção UV-Vis foi de 429 nm. Após a determinação dos parâmetros utilizados na análise cromatográfica, foram realizados os seguintes passos para a construção da curva analítica:

- Foram preparadas três soluções estoque do padrão analítico de curcumina (5mg/ml do padrão em acetonitrila);
- A partir de cada solução estoque, foram preparadas cinco diluições (0,1; 0,2; 0,5; 1 e 2 mg/ml) diluindo-se alíquotas da solução estoque na fase móvel;
- A média aritmética entre os resultados em triplicata foi calculada e o gráfico de concentração *versus* área do pico foi obtido. A estimativa dos coeficientes da curva analítica (**a** e **b**) e do coeficiente de correlação (**R²**) foi feita pela regressão linear do gráfico.

Para análise dos extratos, todos os parâmetros foram mantidos fixos e as amostras obtidas por sonicação (CURSON) e por ultrassom (CURUS) foram diluídas em fase móvel a 2 mg/ml. A coinjeção do padrão analítico de curcumina no extrato também foi feita para certificar a coincidência do pico principal associado à curcumina.

4.5 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Dentre as muitas técnicas existentes para obtenção de nanopartículas baseadas em polímeros pré-formados, a nanoprecipitação, descrita pela primeira vez por Fessi *et al.* em 1989, foi escolhida. As suspensões coloidais de nanopartículas poliméricas foram obtidas por nanoprecipitação, adaptando a metodologia de Tavares *et al.* (2017), de tal forma que a fase aquosa consistiu em água ultrapura e *Pluronic F-*

68 em proporção constante; e a fase orgânica em acetona e PCL em proporção constante, com variação somente nas proporções de CUR (0, 5, 10, 15 e 20%).

Para a preparação da fase aquosa, o poloxâmero foi solubilizado em água ultrapura com o auxílio de agitação magnética, à temperatura de aproximadamente 25°C, na proporção de 0,2% (m/v). Para a preparação da fase orgânica, o PCL foi solubilizado em acetona, em sistema fechado, em volume constante, na proporção de 0,4% (m/v) com agitação magnética e aquecimento de aproximadamente 40 °C, 20 minutos. Os cinco sistemas diferentes, preparados mantendo todos os parâmetros inalterados, exceto a quantidade de CUR adicionado à fase orgânica, passam a ser identificados a partir daqui como, respectivamente, 0 (sem adição de CUR), 5, 10, 15 e 20 (5, 10, 15 e 20% CUR m/m, respectivamente, em relação ao PCL). As composições usadas nos sistemas de nanoprecipitação são resumidas na Tabela 1.

Tabela 1. Formulações dos sistemas de nanoprecipitação

Nome da amostra	CUR	PCL	Pluronic F-68
0	-		
5	5% (m/m)		
10	10% (m/m)	0,4% (m/v)	0,2% (m/v)
15	15% (m/m)		
20	20% (m/m)		

Fonte: Elaborado pelo autor

Após esta primeira etapa de preparação, cada uma das soluções orgânicas foi vertida em funil de fluxo laminar sobre cada uma das fases aquosas, em agitação magnética constante. Em seguida, as soluções coloidais foram mantidas em agitação magnética constante em capela com exaustão, para a evaporação total do solvente orgânico por aproximadamente 72 horas, a 25 °C. Subsequentemente, as suspensões finais foram filtradas à pressão atmosférica e o volume final dos nanossistemas foi completado para restaurar o volume inicial da fase aquosa. Assim, cinco suspensões coloidais de nanopartículas poliméricas revestidas com *pluronic* (NPs) foram obtidas.

As suspensões recém-preparadas foram analisadas em termos de potencial zeta e tamanho, via espalhamento dinâmico de luz (DLS); foi realizado um teste de alteração de cor para verificar a estabilidade do extrato; e as medidas de DLS foram monitoradas durante um período de 6 meses.

O armazenamento das nanopartículas em suspensão pode levar ao aumento do seu tamanho por fusão e agregação (FONTE; SARMENTO, 2016). Assim, para possibilitar uma caracterização completa e confiável dos sistemas nanoparticulados para fins industriais e farmacêuticos, torna-se necessário o processo de liofilização. Para liofilizar as amostras, estas foram pré-congeladas (entre -68°C e -72°C) durante cerca de duas horas e depois foram liofilizadas durante 96 horas (a -49°C e 72 mmHg). Em seguida, após a secagem das NPs, os estudos de TD-RMN e FTIR foram realizados. Além disso, uma nova medida de tamanho e potencial zeta foi realizada após a ressuspensão das NPs liofilizadas em água ultrapura.

Os materiais obtidos em suspensão coloidal, assim como as nanopartículas liofilizadas, foram avaliados e caracterizados pelas técnicas que estão aqui descritas de modo que todos os resultados foram reprodutíveis.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOSSISTEMAS POLIMÉRICOS

4.6.1 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

O diâmetro hidrodinâmico médio (MD) e a distribuição de tamanho de partícula (Pdl) em suspensão aquosa foram analisados por DLS usando um aparelho Nano S90 de zetasizer da Malvern Instruments. As suspensões coloidais recém-preparadas 0, 5, 10, 15 e 20 foram agitadas em vórtex durante 60 segundos para assegurar que fossem retiradas alíquotas confiáveis em vez de sobrenadantes com partículas pequenas suspensas, mascarando depósito de aglomerados no fundo dos tubos tipo *falcon*. As alíquotas retiradas foram diluídas em água ultrapura o suficiente para que o equipamento pudesse fazer a leitura corretamente. Três ciclos de cada medição foram realizados para calcular a média aritmética de MD e Pdl. As medições de DLS foram repetidas mensalmente, da mesma maneira durante seis meses de armazenamento das suspensões (em frascos âmbar estéreis, hermeticamente selados, num refrigerador doméstico a aproximadamente 8°C) para monitorar a estabilidade coloidal das mesmas. As medições também foram feitas com todas as partículas liofilizadas ressuspensas em água ultrapura para observar o efeito do processo de secagem sobre o tamanho dos sistemas. Para dialogar com estes e outros dados, foram aferidos os pHs de cada amostra, que não apresentaram variação significativa durante o período observado.

4.6.2 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada com o intuito de observar a morfologia e geometria das partículas obtidas.

Primeiramente, uma pequena quantidade de nanopartículas liofilizadas foi ressuspensa em água ultrapura na proporção 1:10 (m/m), com o auxílio de banho ultrassônico, durante 15 minutos, para melhor dispersão das mesmas. Após a espera de 10 minutos para a decantação de possíveis aglomerados, uma gota de cada uma das as suspensões foi diretamente depositada sobre lâmina de vidro e foi conduzida à formação de filme em Spin Coater KW-4A (115 VAC, 60 Hz, 1 Amp; estágio 1: 600 rpm, 18 segundos; estágio 2: 2200 rpm, 30 segundos). Formado o filme com as amostras, foi feita a metalização (em Sputter Coater BAL-TEC SCD005) para deposição de ouro em alvo em vácuo com argônio UP e corrente de 30mA por 150 segundos, para dar sequência à análise em microscópio eletrônico de varredura de bancada (PHENOM WORLD – ProX). As NPs foram visualizadas em aumentos variados e voltagem de 10kV.

4.6.3 Potencial zeta (ZP)

A carga superficial das partículas, em termos de potencial zeta (ZP), foi medida usando o Brookhaven Instruments NanoBrook ZetaPALS. Este dado é fundamental para a previsão da estabilidade coloidal das nanopartículas em suspensão, bem como para futuras elucidções dos mecanismos de vetorização e internalização celular das nanopartículas (WANG *et al.*, 2013).

As suspensões coloidais recém-preparadas 0, 5, 10, 15 e 20 foram submetidas à agitação em vórtex durante 60 segundos para assegurar que fossem retiradas alíquotas confiáveis em vez de sobrenadantes com partículas pequenas suspensas, mascarando depósito de aglomerados no fundo dos tubos tipo *falcon*. As alíquotas retiradas foram diluídas em água ultrapura o suficiente para que o equipamento pudesse fazer a leitura corretamente. Dez execuções de cada medição foram realizadas a 25 °C, com o pH da própria amostra sendo aferido nas medições em seu “estado natural”, sem que fosse realizada nenhuma alteração.

As medições foram repetidas mensalmente, da mesma maneira, após 6 meses de armazenamento das suspensões (em frascos âmbar estéreis, hermeticamente selados, num refrigerador doméstico a aproximadamente 8°C) para monitorar a estabilidade coloidal das mesmas. As medições também foram feitas com todas as partículas liofilizadas ressuspensas em água ultrapura para observar o efeito do processo de secagem na carga superficial dos sistemas.

4.6.4 Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros no infravermelho foram obtidos utilizando o espectrofotômetro PERKINELMER Frontier FT-IR/FIR (Spectrum - versão 10.4.2, número de série 98737), com acessório de refletância total atenuada (ATR), com 60 varreduras e resolução de 4 cm⁻¹, na faixa de 400 a 4000 cm⁻¹. As partículas liofilizadas, na forma de pó, foram colocadas diretamente sobre suporte, numa quantidade suficiente para cobri-lo na totalidade, e pressionadas para promover o contato máximo.

4.6.5 Análise Termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas foram executadas em um analisador termogravimétrico em atmosfera de N₂ e aquecidas na faixa de 30 a 400°C, à taxa de aquecimento de 5°C/min, para a avaliação da estabilidade térmica dos nanomateriais obtidos.

4.6.6 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As análises de DSC foram efetuadas na faixa de -30 a 200°C, sendo realizados aquecimentos na taxa de 10°C/min. O equipamento foi calibrado com Índio (In).

Para análise dos polímeros puros (PCL e *Pluronic* F-68), a extração de dados foi feita a partir da terceira corrida de aquecimento, a fim de “apagar” a influência da história térmica do material. Foi realizado um único aquecimento nas amostras de 0 a 20 pois, no caso deste tipo de nanopartícula, após o primeiro aquecimento já ocorre fusão dos polímeros e perda da sua arquitetura específica, o que conduz à observação de uma blenda polimérica que não mais representa de modo fidedigno a morfologia do material nanoestruturado que visa ser aplicado em meio biológico.

4.6.7 Difração de Raios X (XRD)

As amostras obtidas, após liofilização, foram avaliadas por difração de raios X na forma de pó em um difratômetro de raios X RIGAKU Miniflex. As análises foram realizadas com o ângulo 2θ variando de 2° a 40° e velocidade de varredura de $0,05^\circ/\text{min}$.

4.6.8 Ressonância Magnética Nuclear no domínio do tempo (TD-NMR)

As análises de RMN no domínio do tempo foram realizadas determinando-se o tempo de relaxação longitudinal ou tempo de relaxação spin-rede do núcleo de hidrogênio com constante de tempo T_{1H} , usando a sequência de pulsos inversão-recuperação.

As amostras em estado sólido (NPs liofilizadas) foram colocadas na sonda em um tubo de 18mm. O pulso utilizado foi de 90° , calibrado automaticamente para $4,1\mu\text{s}$. A frequência de observação do núcleo de ^1H foi de 23 MHz e o intervalo de τ variou de 0,01 a 10.000ms, com 4 pontos para cada medida de τ , com um intervalo de reciclo de 3 s.

4.6.9 Teste de alteração de cor

Para realizar o teste de alteração de cor dos sistemas, uma amostra do extrato (CUR) e de cada sistema (0, 5, 10, 15 e 20) foi analisada em um espectrofotômetro de cores nos eixos a^* , b^* e L^* do sistema CIELAB.

Este método consiste na avaliação de dois eixos a^* e b^* , que possuem ângulos retos que representam a dimensão de croma ou cor, respectivamente. O terceiro eixo, L^* , perpendicular aos outros, representa a luminosidade. Os eixos a^* e b^* são coordenadas de cromaticidade que vão de -80 a +80. A coordenada a^* indica o eixo vermelho. Quando o valor de a^* é positivo (+), mostra o desvio na direção da tonalidade vermelha; quando o valor a^* é negativo (-), indica o desvio em direção ao verde.

Depois de determinar os valores de cada eixo, a fórmula descrita na Equação 1 foi usada para determinar a mudança de cor total dos sistemas (ΔE).

Equação 1. Determinação da mudança total de cor dos sistemas (ΔE)

$$\Delta E = \frac{[(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]}{2}$$

Para avaliação da variação de cor, a medida inicial da cor de cada amostra (CUR, 5, 10, 15 e 20) foi definida como o padrão de cada amostra e a variação de cor foi calculada após ser submetida às condições descritas aqui:

- 24h e 48h sob luz - Os sistemas encapsulados e o extrato de curcuminoides sem proteção de polímero foram deixados sob luz artificial (lâmpada de 60W, a uma distância padrão de 1m do emissor de luz);
- 24h e 48h sob temperatura - Os sistemas encapsulados e o extrato de curcuminoides sem proteção de polímero foram submetidos a aquecimento a 60 °C, no interior do forno.

4.6.10 Eficiência de retenção de CUR nas partículas

A espectroscopia de absorção no ultravioleta-visível foi o método empregado para a quantificação da eficiência de retenção de CUR nas NPs. Tal método permite calcular a concentração de uma substância que absorve radiação na região do ultravioleta ou do visível, através de correlações baseadas na lei de Beer-Lambert, a qual relaciona direta e linearmente a concentração da substância em uma solução com sua absorbância de luz. Para tal, uma curva analítica com concentrações conhecidas de CUR previamente analisadas no espectrofotômetro UV-visível foi montada para o cálculo dos parâmetros de ajuste linear da reta. Foram realizados os seguintes passos para a construção da curva analítica:

- Foram preparadas três soluções estoque do extrato CURUS (20 µg/ml do extrato em etanol:água, 75:25 v/v);
- A partir de cada solução estoque, foram preparadas quatro diluições (15; 10; 5; e 1µg/ml) diluindo-se alíquotas da solução estoque no solvente etanol:água, 75:25 v/v;
- A média aritmética entre os resultados de absorbância em triplicata foi calculada e o gráfico de concentração *versus* absorbância foi obtido. A estimativa dos coeficientes da curva analítica (**a** e **b**) e do coeficiente de

correlação (R^2) foi feita pela regressão linear do gráfico ($y = ax + b$, sendo y a concentração e x a absorvância).

Em seguida, as amostras 5, 10, 15 e 20 foram, então, analisadas. Para quantificar a CUR retida nas partículas, tanto na camada interna de PCL quanto na camada de poloxâmoro, as NPs foram submetidas a um processo de “abertura” já protocolado e utilizado em estudos anteriores do grupo:

- 30 μ g de NPs liofilizadas foram pesados em triplicata e sonicados (ciclo 1, amplitude 80%) com 10ml de acetona PA por 2 minutos;
- A acetona foi evaporada em estufa, a 40°C, durante aproximadamente 24h, ao abrigo de luz;
- Cada amostra, após evaporação total da acetona, foi solubilizada em 20 mL de etanol PA e centrifugada durante 10 minutos a 3500 rpm;
- Foi retirada uma alíquota do sobrenadante de cada uma das amostras para ser analisada no espectrofotômetro.

A massa de CUR retida em cada amostra foi estimada relacionando, pela curva analítica, a absorvância aferida à concentração de CUR em cada alíquota. A porcentagem de CUR retida nas NPs, ou seja, uma estimativa da eficiência de retenção de CUR nas NPs foi calculada relacionando a massa inicial de CUR acrescida à nanoprecipitação com a massa aferida após o processo de “abertura” das partículas.

4.6.11 Ensaio de solubilidade de CUR e das partículas

O ensaio de solubilidade foi feito para verificar se os nanossistemas promoveram o aumento da solubilidade de CUR em meio aquoso.

Primeiramente, foi utilizada solução aquosa de tampão fosfato salino (PBS 0,2M, pH 7,2) com adição de diferentes concentrações - 0; 0,5; 1,0; 1,5 % (m/v) - de tensoativo (de *Pluronic* F-68) para a mimetização *in vitro* de condições fisiológicas genéricas de solubilização do extrato sem o sistema encapsulante. Neste caso, foram utilizados 5mg de CURUS em 10ml de meio de solubilização. Ademais, uma quantidade em excesso de açafraão em pó (moído e liofilizado), de CURUS (extrato) e de nanopartículas (amostra 10) foi adicionada à 10 ml de água ultrapura e de tampão fosfato salino (separadamente). As misturas foram submetidas à agitação constante

de 50Hz, a 37 ± 2 °C durante 24h. Em seguida, os sobrenadantes das amostras foram centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos, filtrados (com auxílio de seringa acoplada a filtro de $0,45\mu\text{m}$) e analisados em espectrofotômetro UV-visível a fim de correlacionar a absorvância aferida à quantidade de CUR solubilizada no meio.

O mesmo procedimento do item 4.6.10 foi adotado para a construção das curvas analíticas necessárias para análise e quantificação da CUR solubilizada no meio através do espectrofotômetro UV-vís.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

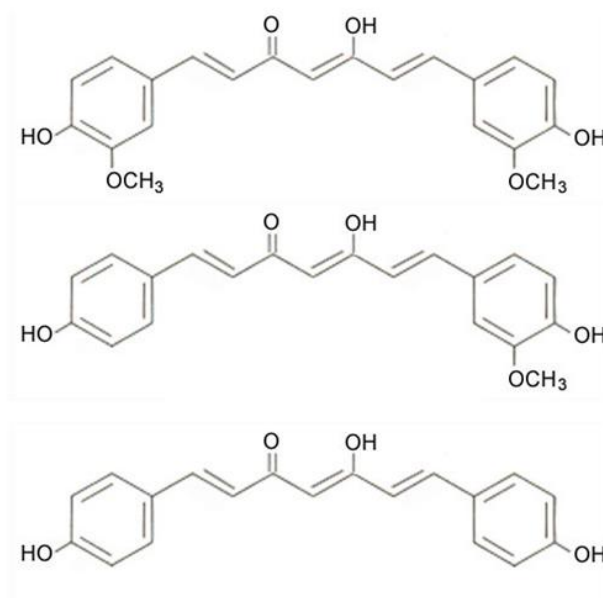
Nesta sessão serão apresentados os resultados e discussões da pesquisa realizada para a elaboração desta dissertação.

5.1 ANÁLISE DE FTIR DOS EXTRATOS

A espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foi utilizada para confirmar de antemão a extração dos curcuminoides (curcumina, demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina, respectivamente, cuja estrutura química está representada na Figura 12) em ambos os extratos - obtidos por extração com acetona em banho ultrassônico (CURUS) e com sonicação (CURSON).

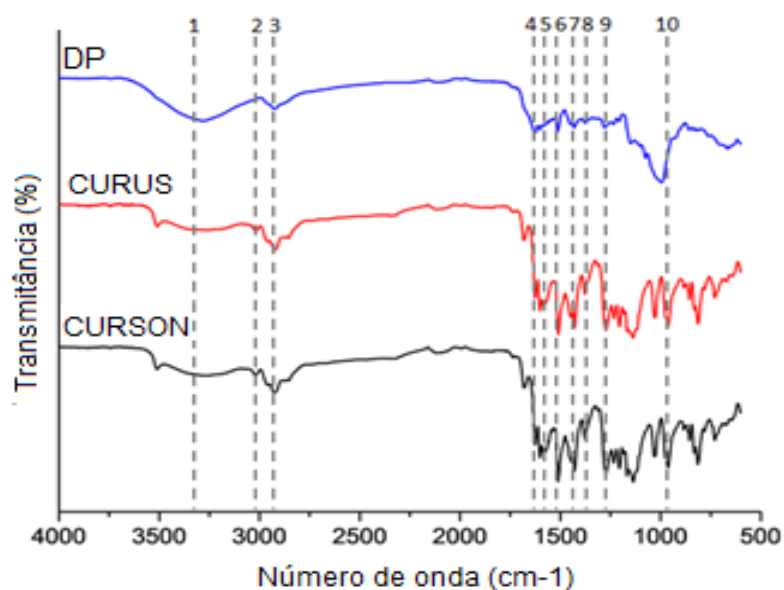
O pó seco de açafrão (DP) obtido pela secagem do rizoma de cúrcuma também foi analisado e seu espectro comparado aos dos extratos a título de verificação da manutenção do perfil das bandas características das estruturas de interesse, como pode ser observado na Figura 13.

Figura 12 - Estrutura química dos curcuminoides



Fonte: Adaptado de PÉRET-ALMEIDA *et al.*, 2008

Figura 13 - Espectros de infravermelho do pó seco de açafrão (DP) e seus extratos (CURUS e SON)



Fonte: Elaborado pelo autor

Os espectros de FTIR (Figura 13) evidenciaram bandas de estiramento e picos característicos, condizentes com os espectros de curcuminoides relatados na literatura científica (MOHAN *et al.*, 2012; KUNDU; NITHIYANANTHAM, 2013; ROHMAN *et al.*, 2015). Estes dados estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2. Características espectrais observadas

Assinalamento	Comprimento de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
1	3458	Banda de estiramento O-H
2	3014	Banda de estiramento aromática C-H
3	2916	Estiramento assimétrico CH ₂ e CH ₃
4	1665	Estiramento de anel aromático C=C
5	1508	Pico de estiramento C=O
6	1515	Vibração do anel benzênico
7	1422	Banda CH ₂
8	1376	Banda CH ₃
9	1284	Pico de estiramento C-O
10	962	Benzoato trans-C-H

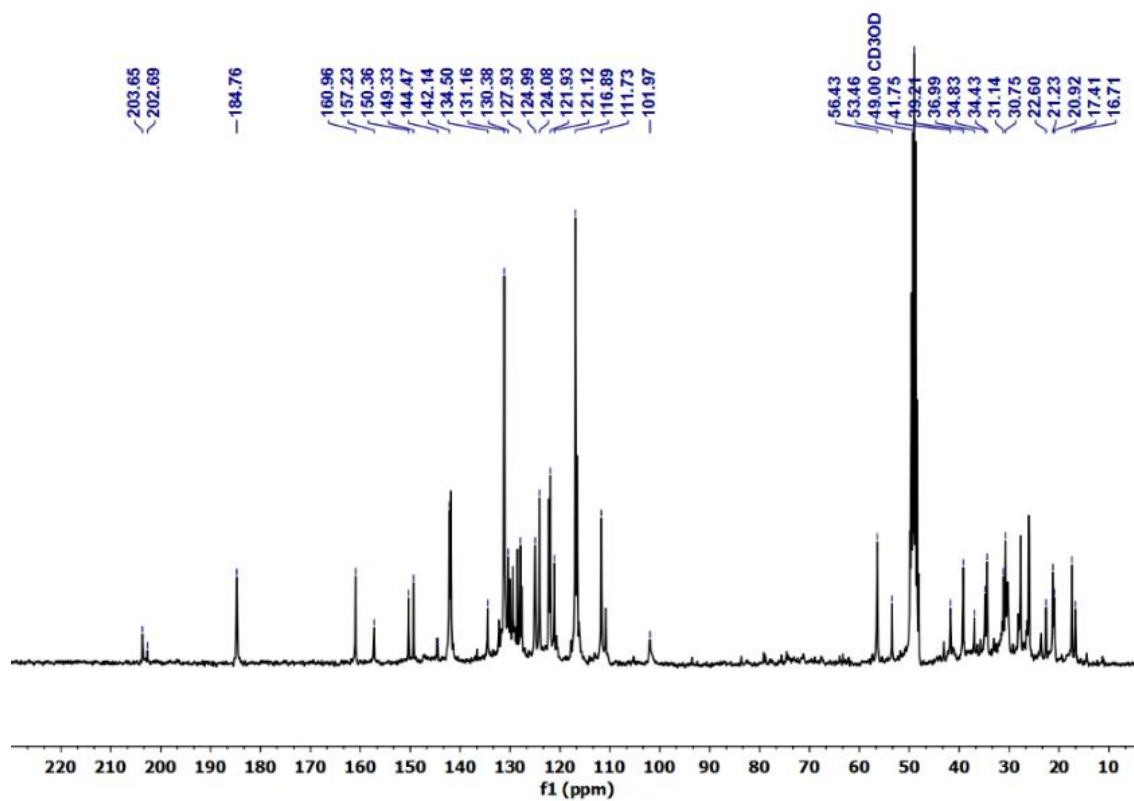
Fonte: Elaborado pelo autor

A partir destes dados, pôde-se inferir que os principais curcuminoides foram extraídos satisfatoriamente dos rizomas de cúrcuma, uma vez que sua estrutura química foi evidenciada nos espectros de infravermelho, mostrando que o tipo de extração (US ou SON) não afetou a essência química do extrato oleoso obtido. A metodologia de extração proposta mostrou-se, então, simples e eficiente, utilizando solvente não tóxico e de baixo custo, sendo pouco agressiva ao meio ambiente e fornecendo subprodutos naturais com grande potencial farmacológico. Acima de tudo, a fim de reduzir o consumo de energia e a necessidade de agitação intensa, que gera alto aquecimento e pode eventualmente degradar algum componente do sistema se esta elevação de temperatura não for cuidadosamente controlada, o método de extração CURUS despertou elevado interesse e curiosidade, levando a uma análise mais profunda de seu extrato, mesmo frente a técnicas mais modernas e sofisticadas.

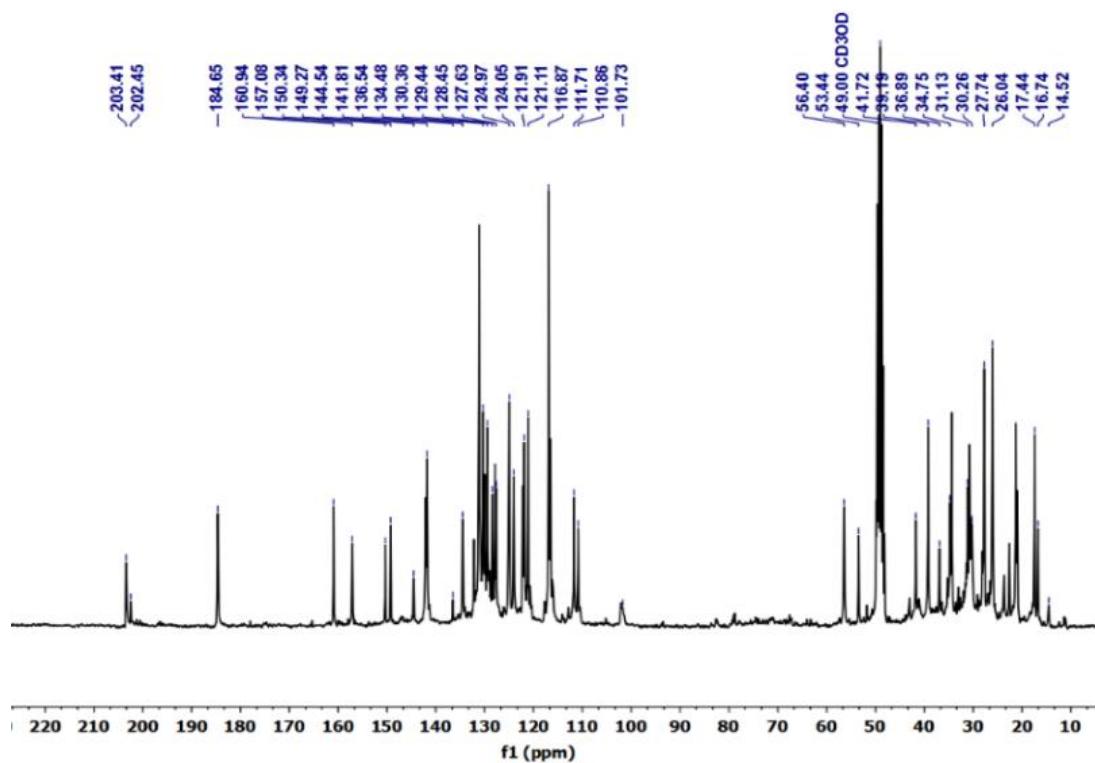
5.2 NMR DOS EXTRATOS

A ressonância magnética nuclear de carbono-13 foi utilizada para avaliar os extratos de curcuminoides e identificar o decaimento de indução livre dos principais compostos químicos, num ambiente químico específico. Neste tipo de estudo, diferentes sinais indicam os diferentes tipos de carbonos; suas respectivas localizações (deslocamentos químicos) indicam o tipo de grupo funcional em questão; a área do pico está diretamente relacionada ao número de carbonos e o padrão do desdobramento se associa ao número de hidrogênios ligados ao carbono. Os espectros obtidos são apresentados nas Figuras 14, 15, 17-19.

Duas regiões principais foram encontradas no espectro de carbono: uma delas referente aos componentes alifáticos, com sinais entre 15 e 60 ppm; e outra, na faixa de 110 a 205 ppm, associada à região de ligações duplas, aromáticas e carbonilas (como pode ser visto nas Figuras 14 e 15). Esses sinais foram gerados pelos curcuminoides e pelos triacilglicerídeos possivelmente presentes nos extratos, em conformidade com dados obtidos por RODRÍGUEZ e colaboradores (2014).

Figura 14 – Espectro total de ^{13}C do extrato CURSON

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 15 – Espectro total de ^{13}C do extrato CURUS

Fonte: Elaborado pelo autor

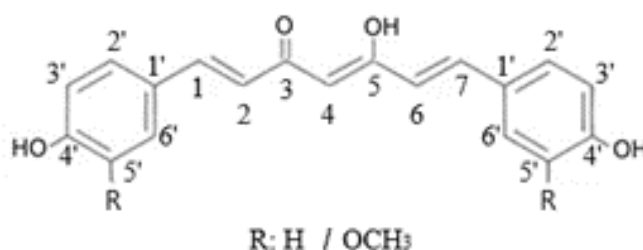
Uma caracterização química mais profunda pode ser feita analisando os espectros de expansão dos extratos. Nas Figuras 16, 17 e 18, respectivamente, foi possível fazer a associação entre os carbonos na estrutura química básica dos curcuminoides e os sinais correspondentes encontrados nos espectros de RMN de carbono-13.

Os espectros obtidos empregando a técnica APT (Figura 18) auxiliaram na identificação de grupos químicos, de acordo com a mudança química característica de sua posição na molécula e a quantidade (par ou ímpar) de hidrogênios associados ao carbono em análise.

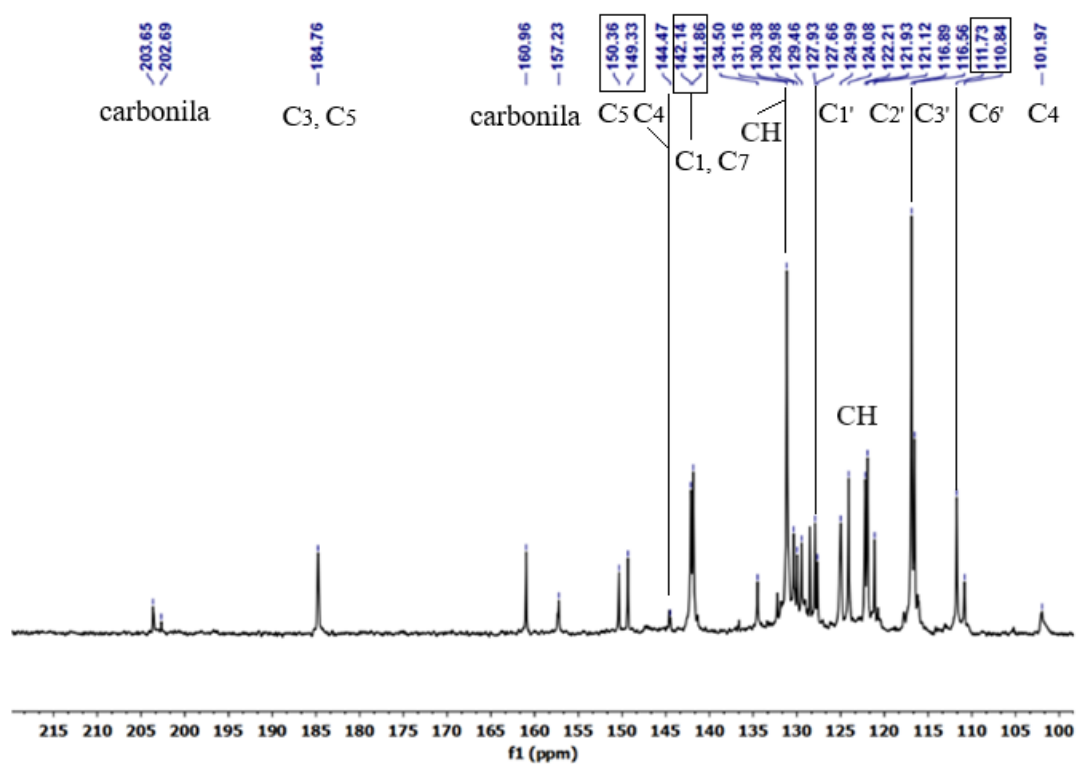
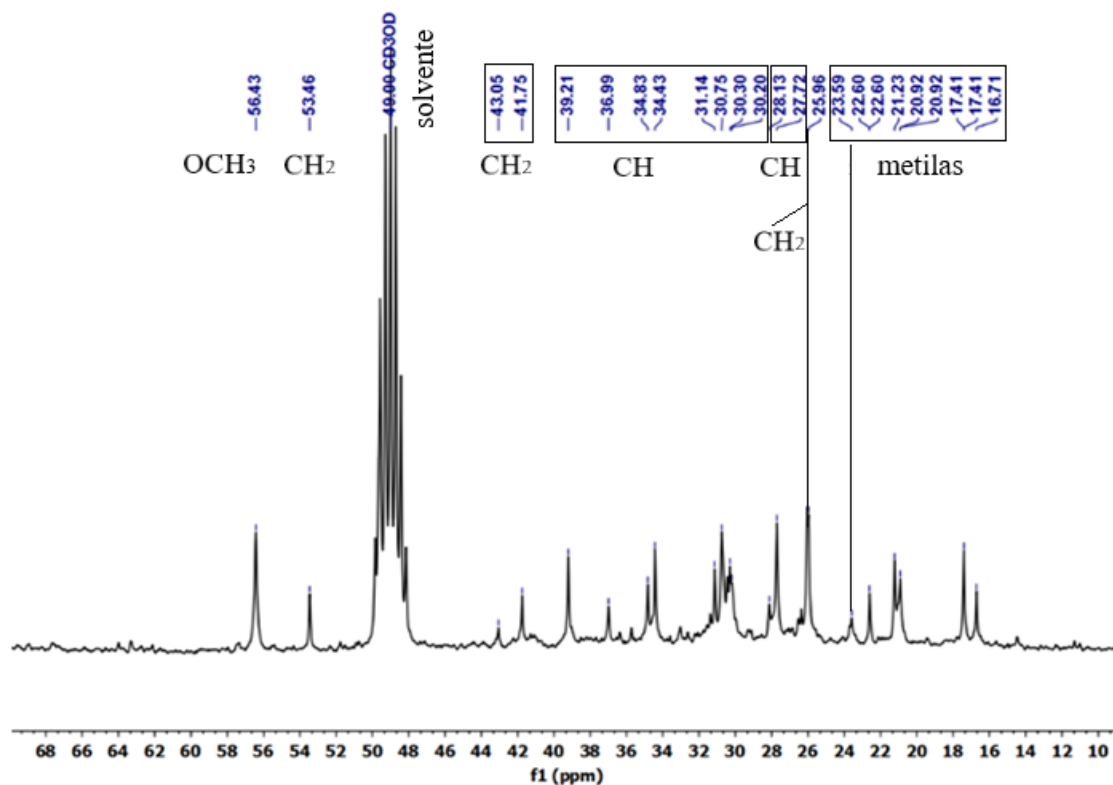
O número de sinais encontrados é basicamente o mesmo em ambos os tipos de extração (CURSON e CURUS). Portanto, não se pode dizer que um dos dois métodos é mais ou menos eficiente em termos de pureza e possível contaminação do extrato por substâncias indesejáveis, pois ambas técnicas resultam em extratos brutos, isentos de qualquer processo de purificação. No entanto, quanto ao conteúdo de curcuminoides, é possível inferir que o banho ultrassônico pode ser mais eficiente porque muitos de seus picos mostraram-se mais proeminentes, indicando maior intensidade de vários sinais de curcuminoides característicos (principalmente carbonila em torno de 205 ppm e metil próximo 14 ppm).

Além disso, foi observada uma resolução significativamente melhor em regiões das metilas em torno de 20 ppm, levando a supor que o CURUS poderia conter uma proporção maior desses componentes de interesse. Para complementar e ratificar esses achados, outra técnica, a cromatografia líquida de alta eficiência foi utilizada.

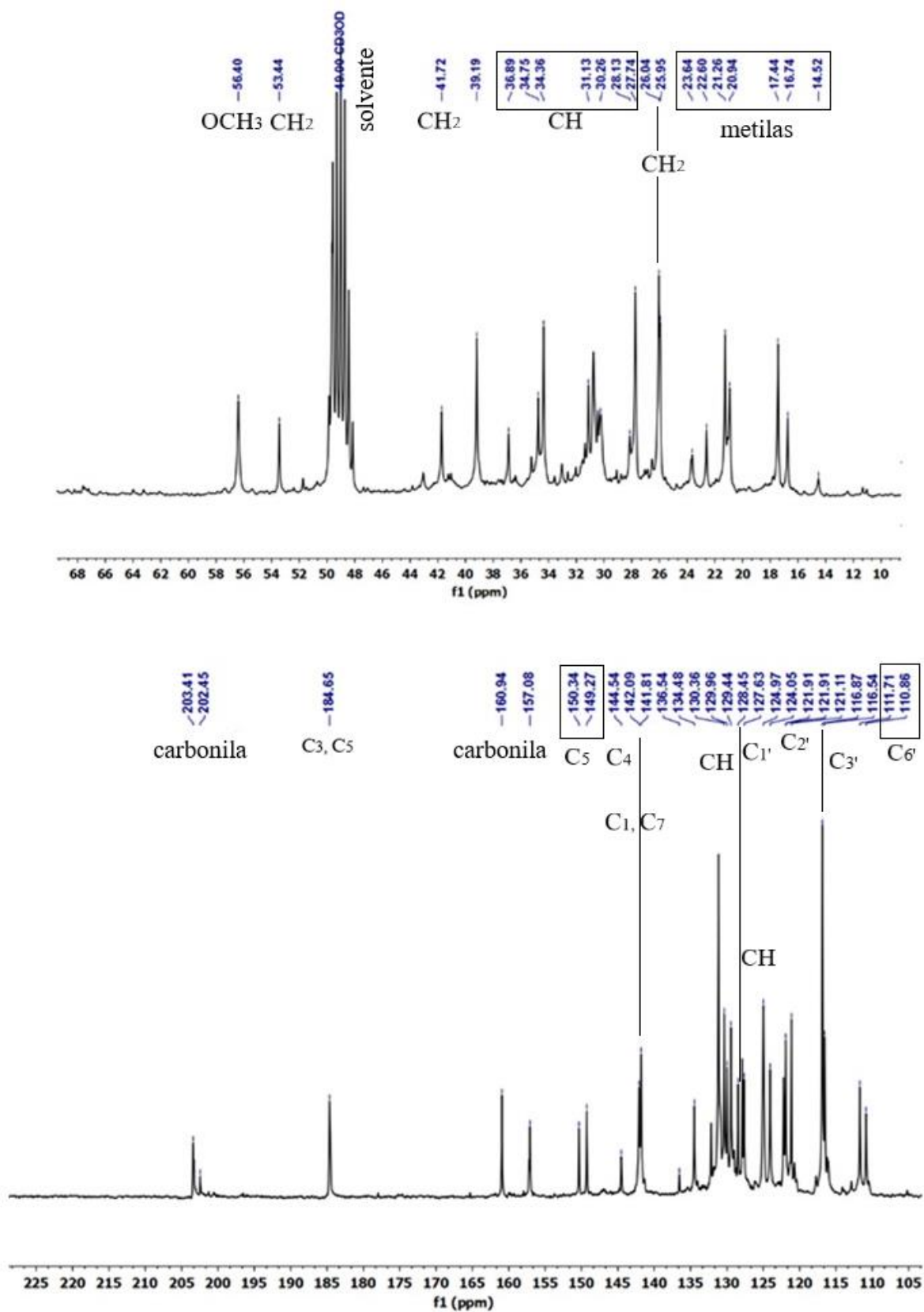
Figura 16 – Assinalamento dos carbonos da estrutura básica dos curcuminoides



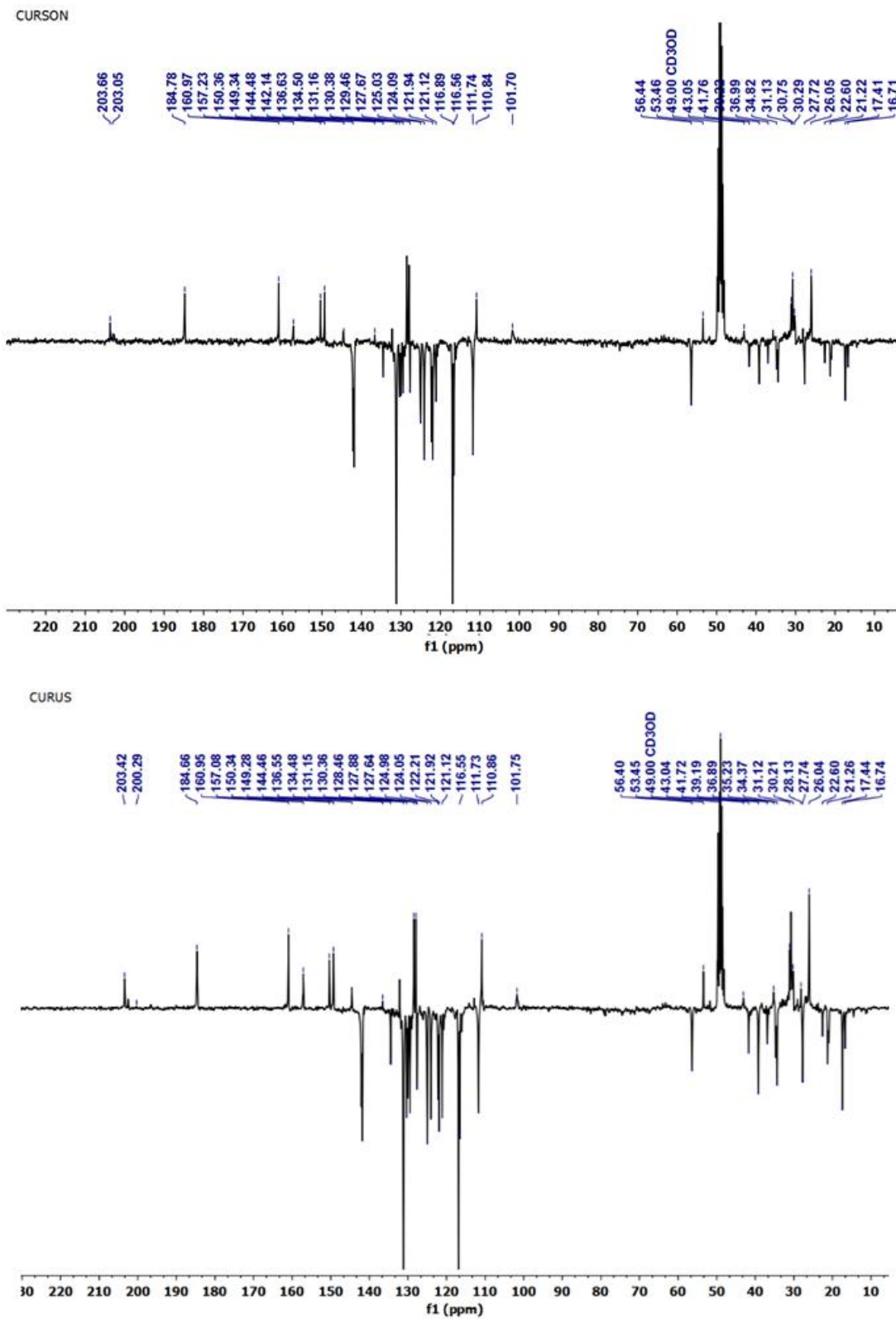
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 17 – Espectro de expansão de ^{13}C do extrato CURSON

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 18 – Espectro de expansão de ^{13}C do extrato CURUS

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 19 – Espectro de APT de ^{13}C dos extratos

Fonte: Elaborado pelo autor

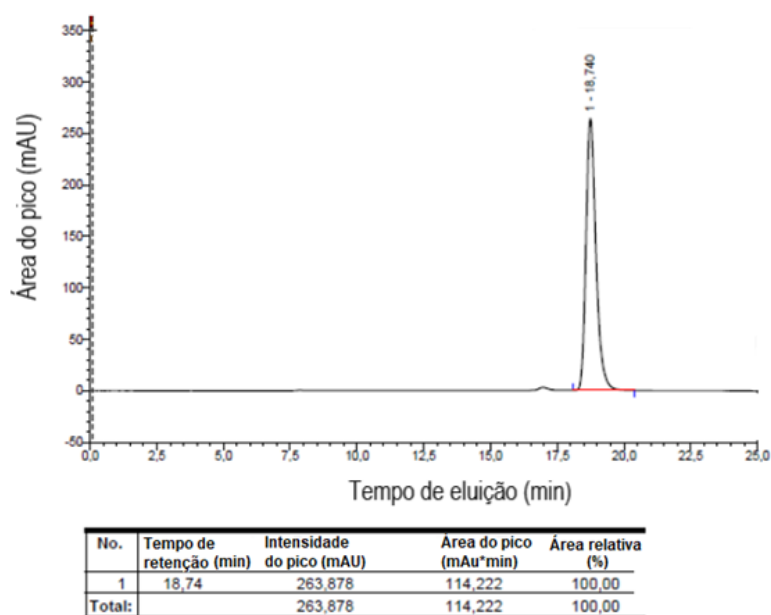
5.3 HPLC DOS EXTRATOS

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) permitiu identificar e quantificar a curcumina nos extratos naturais. O primeiro dos cromatogramas que deram origem à curva analítica construída a partir da análise de diferentes concentrações do padrão analítico de curcumina está representado na Figura 20.

A curva analítica foi construída utilizando diferentes valores conhecidos de concentração do padrão de curcumina *versus* suas respectivas respostas de área de pico medidas na HPLC. A equação de regressão linear obtida para o ajuste da reta foi $y = 0,0019 x - 0,1109$, onde y representa a concentração de curcumina e x , a área do pico. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,9993, indicando uma boa linearidade. Os cromatogramas dos extratos podem ser observados na Figura 21 (a – CURUS; b – CURUS com coinjeção do padrão analítico; c – CURSON; d - CURSON com coinjeção do padrão analítico).

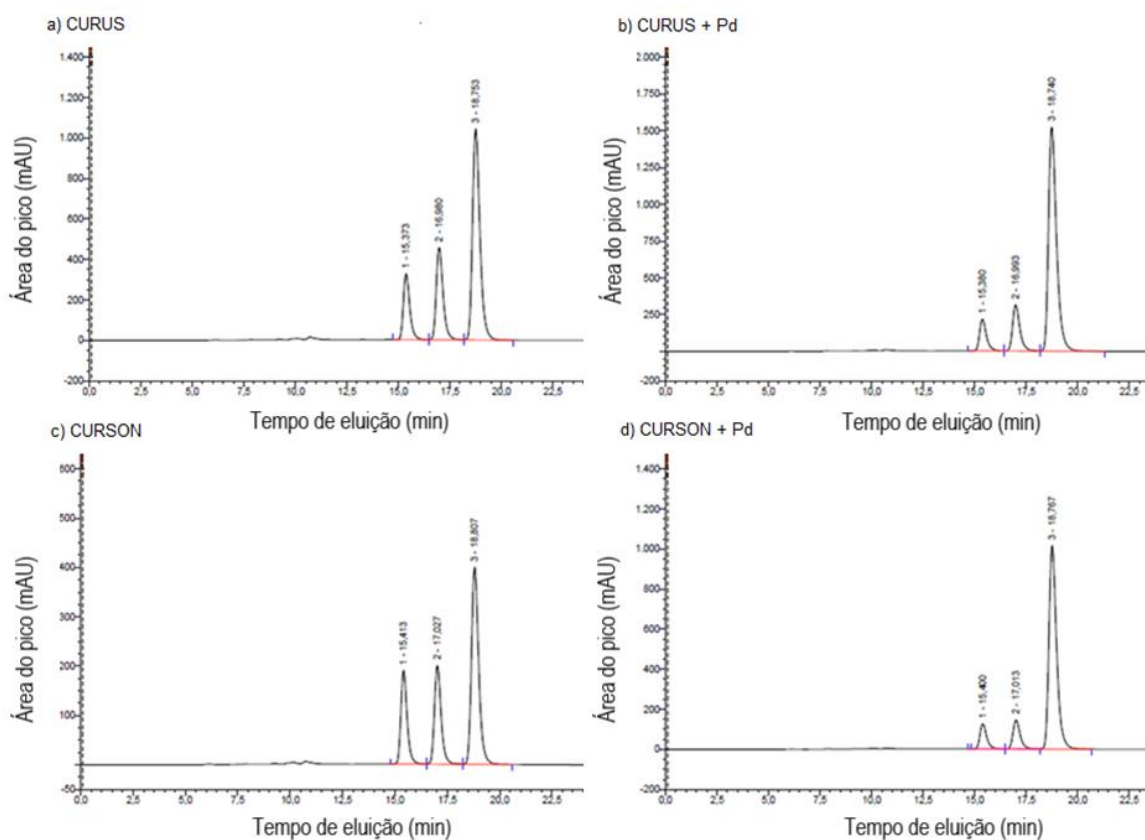
A coinjeção do padrão nas amostras confirmou que o pico principal foi corretamente associado à curcumina, uma vez que, com a coinjeção, sua área aumentava. E os outros picos, devido à similaridade dos tempos de eluição, provavelmente estão associados aos curcuminoides secundários, demetoxi e bis-demetoxicurcumina.

Figura 20 - Cromatograma de HPLC do padrão analítico de curcumina



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 21 – Cromatogramas de HPLC dos extratos naturais (a –CURUS; b –CURUS com coinjeção do padrão; c –CURSON; d –CURSON com coinjeção do padrão)



Fonte: Elaborado pelo autor

A Tabela 3 resume os resultados calculados a partir da correlação entre os dados cromatográficos e a curva analítica da curcumina.

Tabela 3. Quantificação da curcumina nos extratos

Extrato	Tempo de retenção (min)	Área do pico associado à curcumina	Área relativa do pico principal	[Curcumina] estimada (mg/ml)
CURUS	≈ 18,8	436,558	≈ 60 %	0,72
CURSON	≈ 18,8	159,823	≈ 50 %	0,19

Fonte: Elaborado pelo autor

Os dados de HPLC mostraram que o CURUS apresenta o composto principal, a curcumina, em maior quantidade e proporção (quase quatro vezes maior), confirmando a evidência preliminar do NMR em relação à superioridade desse método

de extração em relação à porção de curcuminoides que pode ser extraída. Portanto, o banho ultrassônico pôde ser escolhido como o método mais eficiente de extração entre os testados, uma vez que maiores quantidades de curcumina no extrato natural determinam não apenas sua cor e fluorescência, mas também sua qualidade nutricional, potencial terapêutico, utilidade como pigmento e valor financeiro agregado ao extrato. Assim, o extrato CURUS foi usado para todos os ensaios de encapsulamento em polímero.

5.4 ANÁLISE DE TAMANHO (DLS)

Todas as medidas foram tomadas com alíquotas de suspensões de nanopartículas preparadas recentemente e após um, dois, três, quatro, cinco e seis meses de armazenamento (em frascos hermeticamente selados deixados em repouso em um refrigerador doméstico a aproximadamente 8°C). O diâmetro hidrodinâmico médio (MD) e a distribuição de tamanhos de partícula ou (polidispersão ou Pdl) das amostras na forma líquida estão apresentados e sintetizados na Tabela 4. Tais propriedades são de grande importância na elaboração de formulações visando a aplicação farmacêutica, pois o controle do tamanho das partículas afeta a otimização do encapsulamento e liberação do fármaco, bem como a manutenção de suas propriedades através da estabilidade da suspensão coloidal obtida (PANYAM; LABHASETWAR, 2003; GAUMET *et al.*, 2008; VILANOVA *et al.*, 2010).

Tabela 4. Diâmetro hidrodinâmico médio (MD) e distribuição de tamanhos de partícula ou (Pdl) das amostras na forma líquida

Amostra (alíquota)	NPs recém-preparadas		1 mês de armazenamento		2 meses de armazenamento		3 meses de armazenamento	
	MD (nm)	Pdl	MD (nm)	Pdl	MD (nm)	Pdl	MD (nm)	Pdl
0	157 ± 3	0,11 ± 0,03	154 ± 3	0,10 ± 0,04	155 ± 2	0,12 ± 0,03	192 ± 2	0,15 ± 0,04
5	155 ± 3	0,14 ± 0,04	157 ± 2	0,15 ± 0,03	156 ± 4	0,15 ± 0,04	161 ± 5	0,14 ± 0,03
10	160 ± 2	0,13 ± 0,04	158 ± 2	0,12 ± 0,06	162 ± 3	0,11 ± 0,04	160 ± 3	0,12 ± 0,04
15	179 ± 4	0,12 ± 0,03	180 ± 3	0,14 ± 0,04	184 ± 4	0,15 ± 0,05	185 ± 4	0,14 ± 0,04
20	181 ± 2	0,18 ± 0,04	179 ± 2	0,16 ± 0,04	183 ± 4	0,16 ± 0,02	187 ± 3	0,16 ± 0,03

Continuação (Tabela 4)

Amostra (alíquota)	4 meses de armazenamento		5 meses de armazenamento		6 meses de armazenamento	
	MD (nm)	Pdl	MD (nm)	Pdl	MD (nm)	Pdl
0	193 ± 2	0,12 ± 0,04	215 ± 4	0,17 ± 0,04	245 ± 5	0,18 ± 0,03
5	166 ± 5	0,14 ± 0,03	178 ± 3	0,15 ± 0,03	184 ± 3	0,15 ± 0,04
10	162 ± 3	0,15 ± 0,04	180 ± 2	0,14 ± 0,06	185 ± 4	0,15 ± 0,04
15	185 ± 4	0,13 ± 0,04	223 ± 4	0,18 ± 0,04	261 ± 4	0,21 ± 0,05
20	189 ± 3	0,15 ± 0,03	234 ± 4	0,21 ± 0,04	276 ± 5	0,24 ± 0,02

Fonte: Elaborado pelo autor

O MD das nanopartículas é uma propriedade também relacionada a importantes efeitos *in vivo* como captação intracelular, penetração através de barreiras fisiológicas, entrega e vetorização de drogas, toxicidade e a via de administração adequada. Em geral, quanto maior a redução do tamanho da NP, maior será sua área superficial relativa e, assim, maior será sua atividade e eficiência terapêutica. No entanto, partículas de tamanhos entre 50 a 200 nm são mais propensas a se manterem localizadas num dado alvo terapêutico (PANYAM; LABHASETWAR, 2003; GAUMET *et al.*, 2008; VILANOVA *et al.*, 2010; AI, J *et al.*, 2011).

O Pdl está relacionado à distribuição de tamanhos das NPs. Quanto menor o módulo de polidispersividade observado, entende-se que o sistema de NPs é mais homogêneo, menos polidisperso. Valores de Pdl muito próximos a zero também estão associados a sistemas monomodais, com apenas uma população de partículas, em apenas uma dada faixa de tamanho (LEE, J.; HWANG; LEE, D., 2009).

Observou-se que as nanopartículas obtidas sem a adição de extrato oleoso (amostra 0) somente a partir de três meses de armazenamento apresentaram um considerável aumento de tamanho, de aproximadamente 22%, enquanto as demais amostras não apresentaram aumento percentual de tamanho significativo, dentro do erro estatístico, no mesmo período observado. Isto leva a crer que a CUR, na faixa de concentração de 5 a 20%, pode ser capaz de estabilizar o tamanho do sistema polimérico, tornando-o mais adequado para aplicações farmacêuticas. Comparando as amostras 0 e 5 recém-preparadas, não houve aumento do tamanho das partículas dentro do erro estatístico. Possivelmente, isso se deve ao fato de a CUR ter sido

incorporada à matriz PCL, sem significativa interação e adesão à camada externa de *pluronic*, que seria capaz de aumentar o tamanho das partículas. Ao comparar as amostras recém-preparadas 5, 10 e 15, observou-se um aumento mais relevante do MD, diretamente proporcional à quantidade de CUR acrescida, e provavelmente associado à saturação de CUR na matriz de policaprolactona e sua agregação na superfície das NPs, espessando a camada de poloxâmero. A amostra 20, contendo a maior quantidade de CUR no sistema de nanoprecipitação, não apresentou um aumento de tamanho significativo em relação à concentração anterior, amostra 15, sugerindo que o extrato não foi mais incorporado ao sistema de polímeros acima desta concentração, dentro nem superficialmente, permanecendo livre na suspensão, sem afetar o tamanho das NPs recém-preparadas.

O Pdl aumentou ligeiramente à medida que a quantidade de extrato natural adicionado ao sistema de nanoprecipitação aumentou e, também, durante todo o tempo de armazenamento. Este fato é consistente com duas circunstâncias: o óleo interfere na viscosidade da fase orgânica da nanoprecipitação, alterando a sistemática do fenômeno hidrodinâmico da precipitação e as características morfológicas das NPs; e inerente envelhecimento da suspensão coloidal e conseqüente formação de agregados particulados um tanto maiores.

No período mais avançado, de quatro a seis meses, o aumento do tamanho de partícula mais pronunciado pode ser relacionado à maturação de Ostwald, a qual descreve que partículas de tamanhos reduzidos, mesmo que pouco polidispersas e com solubilidade limitada no meio dispersante tendem a se aglomerar, devido à alta tensão interfacial resultante do aumento da área de superfície (VERMA et al, 2011). Ainda assim, todos os sistemas preparados apresentaram características favoráveis à aplicação farmacêutica no período de armazenamento observado: uma população única de NPs, faixa de tamanho nanométrico, com baixa polidispersividade e manutenção da estabilidade observada durante o tempo de armazenamento de 6 meses, sob condições controladas.

O tamanho médio de partícula obtido pode ser considerado satisfatório, visto que estudos de Gao e colaboradores (2006) com partículas poliméricas semelhantes (NPs de 70 a 345nm com matriz de polibutílicoacrilato carregadas com metotrexato e revestidas com polissorbato 80) já demonstraram a capacidade das mesmas de atravessar a BHE, com destaque para as partículas menores, em torno de 100nm, que, além de atravessar a BHE com relativa facilidade, apresentaram potencial para

entregar mais fármaco ao cérebro dos ratos via injeção intravenosa que as demais gamas de tamanho de partícula. Ademais, diversos outros estudos também demonstraram resultados similares e satisfatórios em termos de difusão e entrega de fármacos por NPs entre 100 e 200nm pela BHE, com carga superficial e recobrimento adequados (GABATHULER, 2010; WOHLFART *et al.*, 2012; GOYAL *et al.*, 2014; SARAIVA *et al.*, 2016)

O processo de liofilização pode levar ao aumento do diâmetro hidrodinâmico médio das partículas como resultado de seu colapso durante o processo de congelamento que o precede (SILVEIRA, 2012). Assim, para avaliar este efeito, foram comparadas as medidas de DLS das amostras de NPS recém-preparadas, na forma líquida, e da NPs liofilizadas logo após sua síntese ressuspensas em água ultrapura (Tabela 5).

Tabela 5. Efeito da liofilização sobre o tamanho das nanopartículas

Amostra	NPs recém-preparadas		NPs liofilizadas ressuspensas	
	MD (nm)	Pdl	MD (nm)	Pdl
0	157 ± 3	0,11 ± 0,03	392 ± 3	0,21 ± 0,05
5	155 ± 3	0,14 ± 0,04	361 ± 4	0,19 ± 0,04
10	160 ± 2	0,13 ± 0,04	362 ± 4	0,22 ± 0,03
15	179 ± 4	0,12 ± 0,03	388 ± 5	0,17 ± 0,05
20	181 ± 2	0,18 ± 0,04	387 ± 3	0,20 ± 0,04

Fonte: Elaborado pelo autor

Mesmo após a liofilização, o MD das amostras permaneceu dentro da nanoescala, apesar de seu tamanho aproximadamente dobrar. Em conformidade com o aumento no tamanho resultante da agregação das partículas, também houve um aumento proporcional do Pdl, evidenciando uma maior heterogeneidade dos sistemas nanoparticulados quando liofilizados. Como no processo de liofilização as amostras não foram sequer protegidas por um crioprotetor adicional, que minimizaria a sua agregação, os dados podem ser considerados muito promissores, mostrando que apenas o revestimento das partículas com poloxâmero já foi capaz de conter significativamente o efeito de agregação e colapso do sistema nanoparticulado.

5.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (SEM)

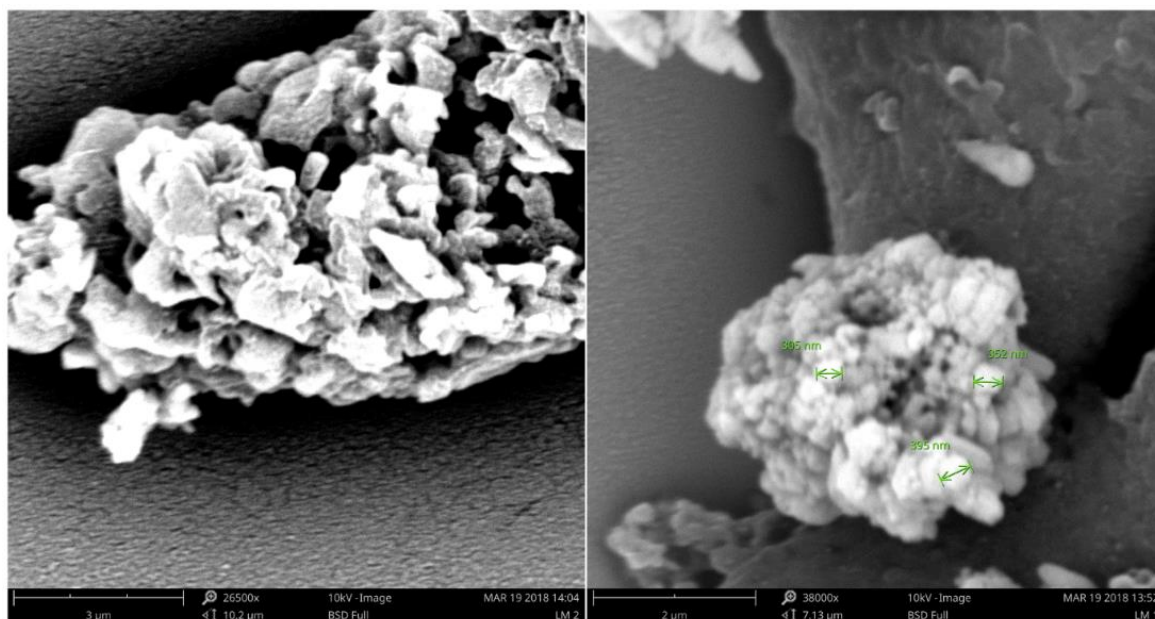
A morfologia das partículas influencia a forma como as mesmas interagem com as células. A atuação das NPs tanto em células fagocíticas quanto não fagocíticas depende da sua morfologia, que pode até mesmo apresentar maior influência na internalização das NPs que o próprio tamanho e carga superficial. Deseja-se, para este tipo de aplicação do nanossistema, que as partículas apresentem a morfologia esférica (CHAMPION & MITRAGOTRI, 2006; ALMERÍA *et al.*, 2010), evitando a depuração das nanopartículas pelo sistema imunológico e também possibilitando e facilitando sua vetorização e localização na região cerebral, mas sem implicar necessariamente na internalização das partículas pelas células neuronais, uma vez que a liberação da CUR na própria microglia já seria suficiente para o desempenho de seu potencial antioxidante, anti-amiloide, anti-inflamatório e marcador fluorescente.

Portanto, para a sondagem e análise da morfologia dos sistemas obtidos, foi realizada a microscopia eletrônica de varredura das NPs liofilizadas, cujos resultados estão abaixo representados, nas Figuras 22, 23, 24, 25 e 26. As micrografias com menor ampliação, à esquerda de cada figura, auxiliam na visualização geral da amostra, evidenciando a formação de agregados micrométricos cuja análise demandou maior magnificação para visualização das nanopartículas em si.

Em todas as amostras, foi verificada morfologia esférica, como era esperado para a síntese de partículas por nanoprecipitação (BECK-BROICHSITTER *et al.*, 2010; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Ademais, os tamanhos médios de partícula estimados em microscopia mostraram-se condizentes com os aferidos por DLS, apresentando-se numa faixa entre 350 e 400nm, evidenciando novamente o efeito da liofilização sobre o aumento do diâmetro da partícula, em decorrência da aglomeração inerente a este processo de secagem.

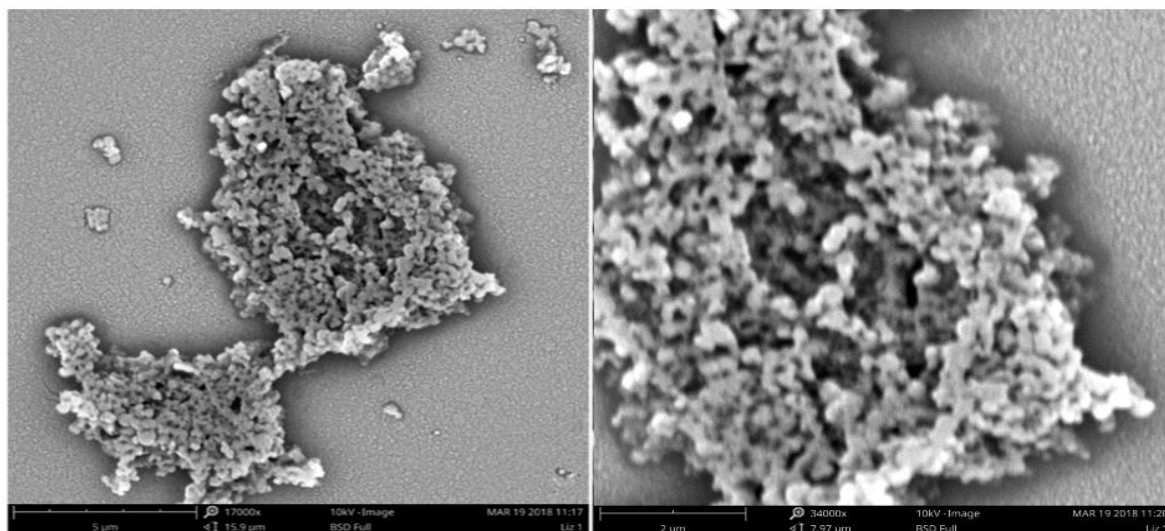
Nas amostras 10, 15 e 20 (Figuras 24, 25 e 26, respectivamente), foi observado um aspecto menos homogêneo na totalidade das micrografias, o que pode ser associado ao aumento de CUR presente nos sistemas possivelmente acarretando na simples presença de extrato oleoso fora das NPs e/ou na desestabilização do processo de deposição interfacial, com consequente formação de micelas de poloxâmero durante a nanoprecipitação e, portanto, culminando na visualização das esferas de modo menos uniforme, com perfil menos delineado e contorno menos sobressaltado, sobretudo na amostra 10.

Figura 22 – Micrografia da amostra 0 com aumento de 26500 e 38000 vezes, respectivamente



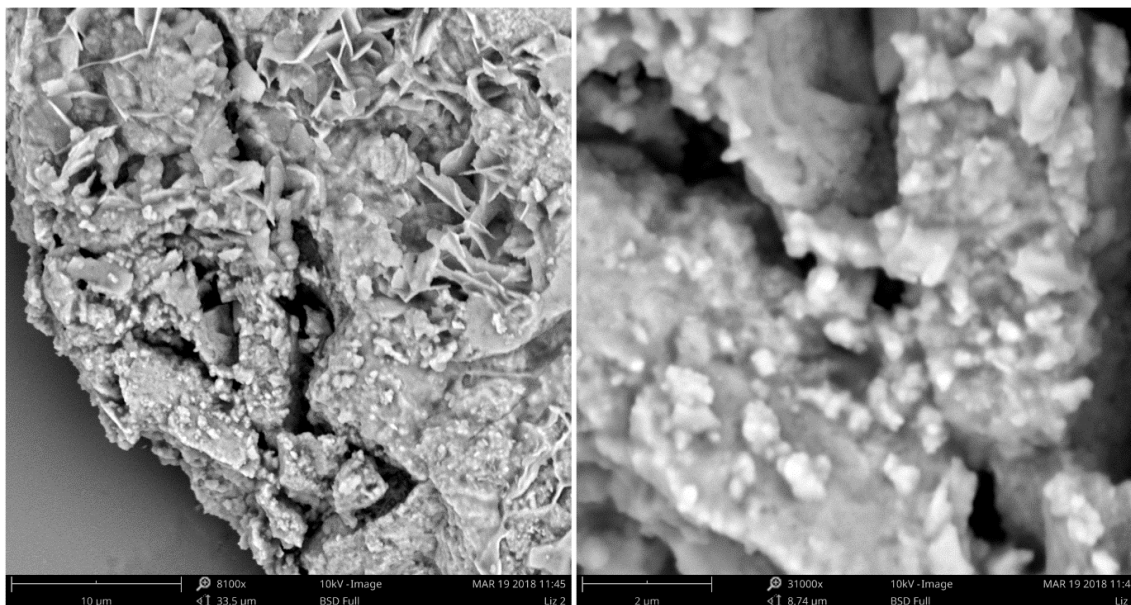
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 23 – Micrografia da amostra 5 com aumento de 17000 e 34000 vezes, respectivamente



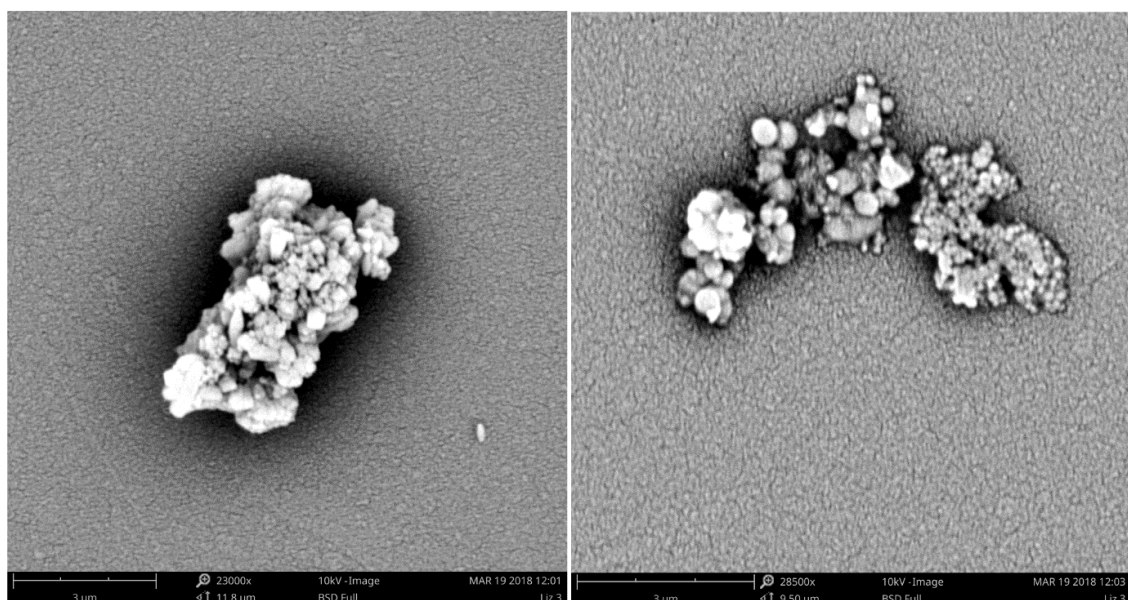
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 24 – Micrografia da amostra 10 com aumento de 8100 e 31000 vezes, respectivamente



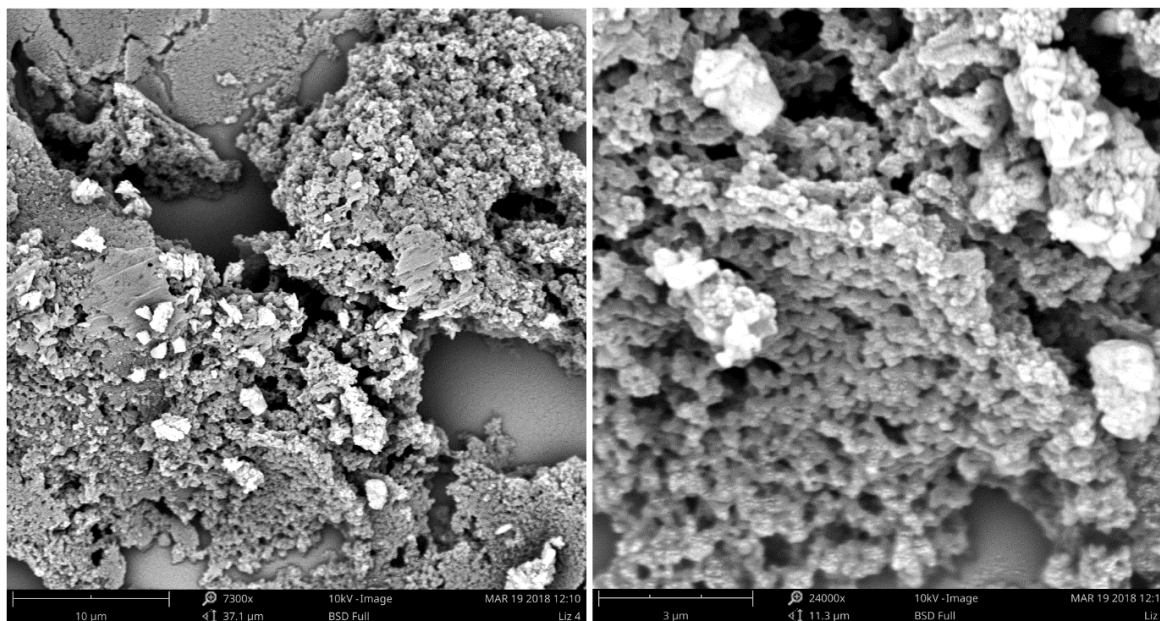
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 25 – Micrografia da amostra 15 com aumento de 23000 e 28500 vezes, respectivamente



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 26 – Micrografia da amostra 20 com aumento de 7300 e 24000 vezes, respectivamente



Fonte: Elaborado pelo autor

5.6 POTENCIAL ZETA (ZP)

A estabilidade das nanossuspensões também foi avaliada em termos de potencial zeta (ZP). Com base em estudos anteriores, esperava-se obter nanopartículas carregadas negativamente por causa dos terminais carboxílicos de poliéster, o que foi possível observar. Quanto mais negativo o ZP encontrado, menor a tendência de agregação das nanopartículas, o que pressupõe melhor estabilidade coloidal. Entretanto, enquanto as partículas obtidas por nanoprecipitação com apenas PCL usualmente apresentam módulos ZP em torno de 50mV, as nanopartículas de PCL recobertas por polímero anfifílico tendem a apresentar menor módulo de carga superficial (LEE,J.; HWANG; LEE,D., 2009; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SHUBHRA *et al.*, 2014; KUMAR; SAWANT, 2013; LEUNG *et al.*, 2015; XIONG; PENG; CHEN, 2015). No caso de estabilizantes de peso molecular mais alto, como o *pluronic*, que atua sobretudo por estabilização estérica, mesmo módulos de ZP de 20 mV ou inferiores podem fornecer estabilização suficiente.

Apesar do baixo módulo de ZP, as nanossuspensões podem ser consideradas estáveis, porque um ZP relativamente baixo pode ser medido devido ao revestimento do poloxâmero, mesmo no caso de superfícies de partículas altamente carregadas,

visto que o recobrimento pode deslocar o plano de cisalhamento para uma distância maior da superfície da partícula (QUAGLIA *et al.*, 2009).

Os dados de ZP das amostras na forma líquida são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Potencial Zeta (ZP) das suspensões coloidais de nanopartículas

Amostra (alíquota)	ZP das NPs recém-preparadas (mV)	ZP - 1 mês de armazenamento (mV)	ZP - 2 meses de armazenamento (mV)	ZP - 3 meses de armazenamento (mV)
0	-14± 1	-14 ± 1	-14 ± 1	-12 ± 1
5	-15± 1	-15 ± 1	-15 ± 1	-15 ± 1
10	-15 ± 1	-14 ± 1	-15 ± 1	-14 ± 1
15	-14 ± 1	-13 ± 1	-13 ± 1	-13 ± 1
20	-13 ± 1	-12 ± 1	-11 ± 1	-11 ± 1

Continuação (Tabela 6)

Amostra (alíquota)	ZP - 4 meses de armazenamento (mV)	ZP - 5 meses de armazenamento (mV)	ZP - 6 meses de armazenamento (mV)
0	-10 ± 1	-8 ± 1	-10 ± 1
5	-13 ± 1	-12 ± 1	-12 ± 1
10	-14 ± 1	-12 ± 1	-14 ± 1
15	-10 ± 1	-9 ± 1	-13 ± 1
20	-9 ± 1	-8 ± 1	-11 ± 1

Fonte: Elaborado pelo autor

Na amostra 0, o ZP apresentou uma redução considerável somente a partir de três meses de armazenamento, concordando com o aumento abrupto do tamanho observado para esta amostra após este período. Nas amostras 5, 10 e 15, a flutuação do ZP observada não foi estatisticamente relevante, confirmando a manutenção da estabilidade dos sistemas durante o período de armazenamento em questão. A amostra 20, além de apresentar menor ZP que todas as demais amostras em todos os períodos de armazenamento, também apresentou maior redução de ZP com os tempos de armazenamento mais prolongados. Isso provavelmente está relacionado ao excesso de CUR livre no nanossistema, que pode ser capaz de desestabilizá-lo

em termos de carga superficial, embora nenhum aumento tão considerável no tamanho tenha sido observado para esta amostra, talvez porque a CUR associada à camada de poloxâmero tenha evitado o processo de colapso e agregação.

Na Tabela 7, estão expressos os dados aferidos de pH, importantes para compreensão dos dados de ZP, uma vez que a carga superficial da partícula está intrinsecamente relacionada a fatores como pH, temperatura e concentração dos componentes do meio (PANYAM; LABHASETWAR, 2003). Como a carga da superfície das partículas depende da dissociação dos seus grupos funcionais, a taxa de dissociação do mesmo será influenciada pelo pH da suspensão (KECK, 2006). E, como não houve alteração significativa de pH durante o período de armazenamento observado (vide Tabela 7), pode-se afirmar que todas as medidas foram realizadas mantendo-se os parâmetros de análise e as mesmas características fundamentais do meio, inclusive a condutividade intrínseca do sistema.

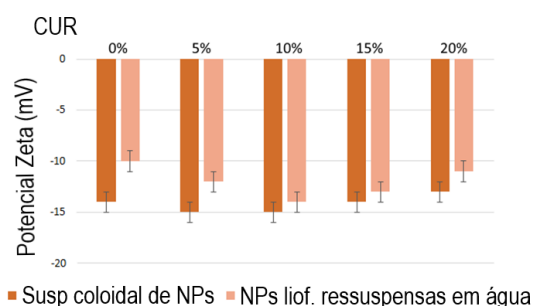
Tabela 7. pH das suspensões coloidais de nanopartículas

Amostra (alíquota)	pH
0	6,6 ± 0,1
5	6,4 ± 0,1
10	6,4 ± 0,1
15	6,1 ± 0,1
20	5,5 ± 0,1

Fonte: Elaborado pelo autor

Os dados do potencial zeta das amostras liofilizadas ressuspensas em água ultrapura estão ilustrados na Figura 27.

Figura 27 – Efeito da liofilização sobre os dados de ZP das nanopartículas



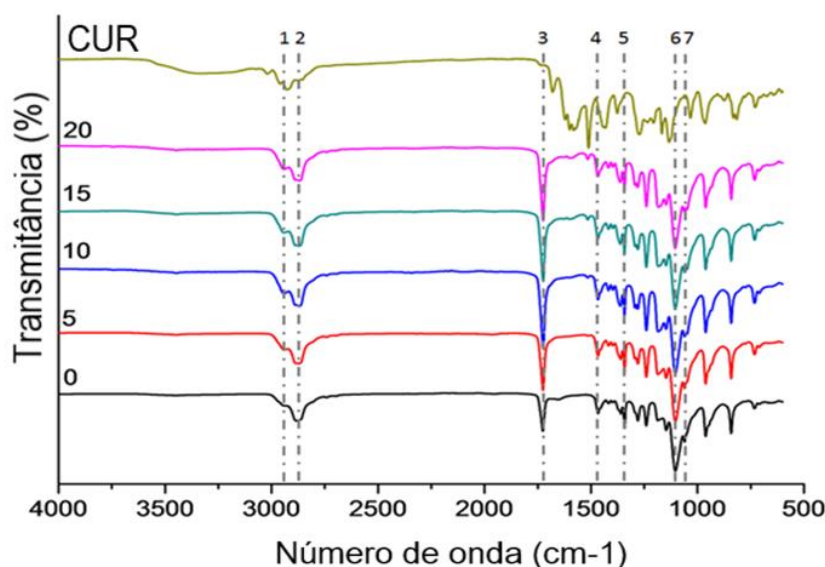
Fonte: Elaborado pelo autor

Os dados de ZP das amostras liofilizadas (Figura 27) confirmam as expectativas da análise de estabilidade através do MD, mostrando que a CUR provavelmente estabiliza e protege o sistema da agregação, contribuindo junto ao poloxâmero com módulos ZP suficientes para evitar agregação, mesmo observando-se uma ligeira redução de ZP após liofilização, marcadamente mais expressiva na amostra 0, sem a adição de CUR. Quão maior o acréscimo de CUR ao sistema, menor foi a redução percentual relativa de ZP (em módulo) observada, mesmo após a realização da liofilização.

5.7 ANÁLISE DE FTIR DOS NANOSSISTEMAS

Os espectros de FTIR de todas as NPs sintetizadas (0, 5, 10, 15 e 20) mostraram os picos característicos da matriz polimérica, confirmando a presença e integridade de ambos os componentes poliméricos nos nanossistemas obtidos. As principais bandas características dos polímeros constituintes da matriz são destacadas na Figura 28: para PCL, 2943 cm^{-1} (1) e 2866 cm^{-1} (2); 1721 cm^{-1} (3); 1470 cm^{-1} (4), 1365 cm^{-1} (5) e 1168 cm^{-1} (6); e para *Pluronic*, 2863 cm^{-1} (2) e 1103 cm^{-1} (7).

Figura 28 – Espectros de FTIR do extrato de açafrão (CUR) e das NPs carregadas com diferentes proporções de CUR



Fonte: Elaborado pelo autor

Os dados obtidos confirmaram a total remoção do solvente orgânico durante o processo de evaporação, visto que suas bandas características não foram evidenciadas. Também não foi observada interação química entre os polímeros e o ativo da formulação, o que é fundamental para que esta matriz seja considerada aplicável em um nanossistema de liberação, assim evitando o comprometimento da função farmacêutica do encapsulado. Ademais, bandas de absorção observadas mostraram-se de acordo com as bandas características de PCL e *Pluronic* relatadas na literatura (SHAH *et al.*, 2007; XIE *et al.*, 2009; MA *et al.*, 2011; PANDITA *et al.*, 2011; HERNÁNDEZ *et al.*, 2012; KUMAR; SAWANT, 2013; LIAU *et al.*, 2014; GOVENDER *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015; PARRA *et al.*, 2015), conforme resumido na Tabela 8.

Tabela 8. Características espectrais da matriz polimérica

Assinalamento	Comprimento de onda (cm⁻¹)	Atribuição
1	2943	Estiramento assimétrico do CH ₂
2	2866	Estiramento simétrico do CH ₂
3	1721	Estiramento C=O do éster
4	1470	Vibração de C-H
5	1365	Vibração do CH ₃
6	1168	Ligação C-O-H
7	1103	Estiramento C-O

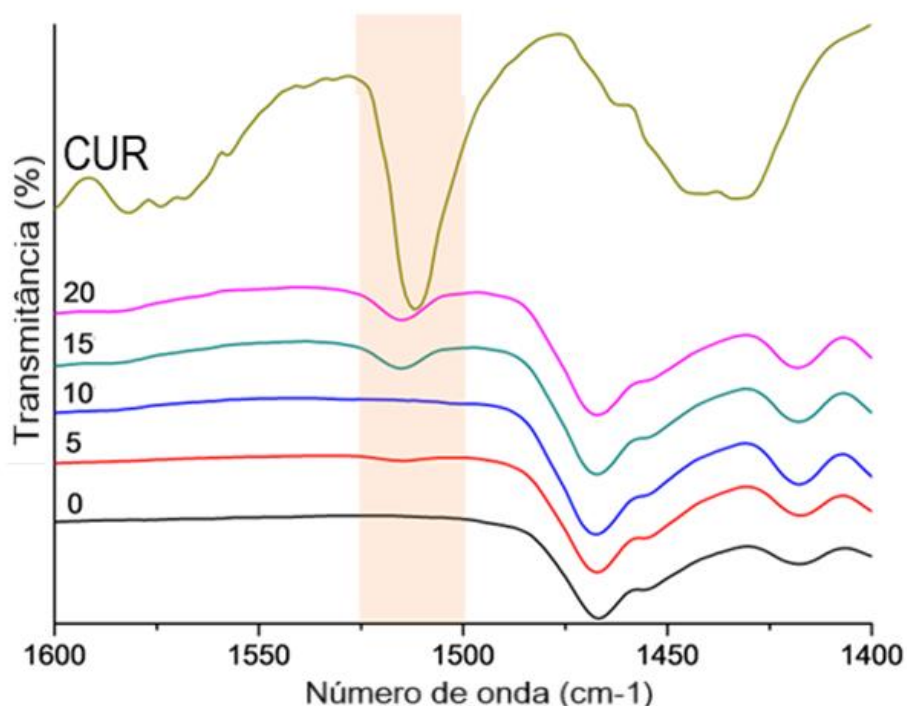
Fonte: Elaborado pelo autor

Comparando todos os espectros, não se observa deslocamento, alargamento ou alteração da posição das bandas, indicando que não houve interação química entre os componentes do sistema de nanoprecipitação, o que é satisfatório, pois uma interação química poderia comprometer as propriedades desejáveis, uma vez que a ação antioxidante, antiamilóide e anti-inflamatória da molécula são frutos de seus grupos químicos característicos. Assim, pode-se inferir que, mesmo após o processo de nanodimensionamento do polímero, as NPs mantêm o conteúdo de curcuminoides com características químicas e estruturais intactas.

A expansão de 1600 a 1400cm⁻¹ (Figura 29) demonstra o aparecimento de bandas em torno de 1515 cm⁻¹ muito proeminentes nas amostras 15 e 20,

provavelmente associadas aos curcuminoides. Seu aparecimento provavelmente está associado à maior concentração de CUR na superfície das NPs ou à presença de CUR livre nesses sistemas.

Figura 29 – Expansão dos espectros de FTIR do extrato de açafrão (CUR) e das NPs carregadas com diferentes proporções de CUR

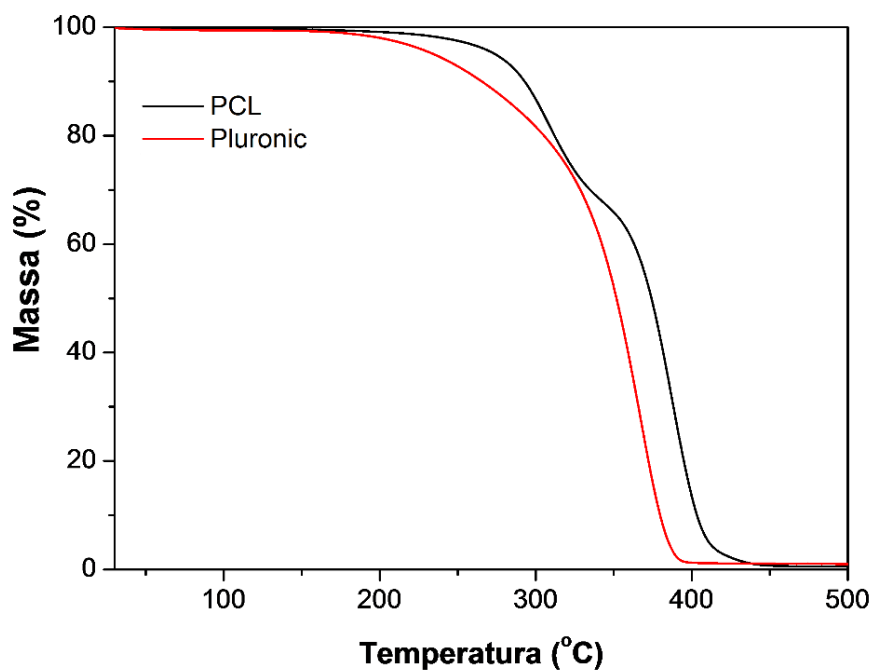


Fonte: Elaborado pelo autor

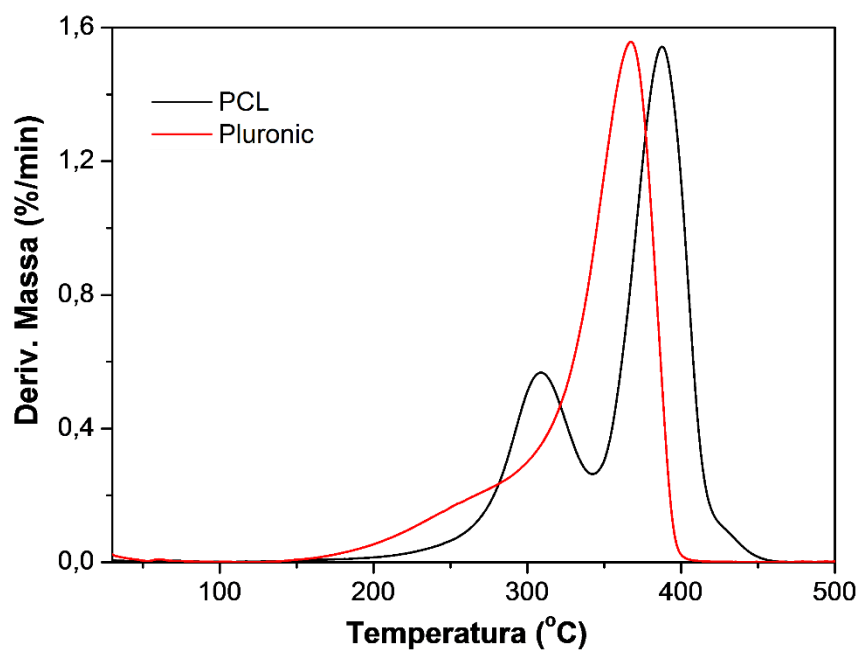
5.8 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada com o propósito de avaliar a estabilidade térmica dos nanossistemas através da determinação da temperatura e velocidade de degradação dos nanomateriais obtidos. Os resultados da análise termogravimétrica (TGA) bem como da primeira derivada das curvas (DTG) para os polímeros puros são apresentados nas Figuras 30 e 31, respectivamente.

A visualização total dos perfis observados na TGA corresponderam aos dados apresentados na literatura tanto para PCL (HUANG *et al.*, 2003; HERNÁNDEZ *et al.*, 2012; ZHONG *et al.*, 2015) quanto para o *Pluronic* F-68 (WANG *et al.*, 2010; CHUA *et al.*, 2013). E, para ambos os polímeros, foi observada a decomposição total (100%), não restando nenhuma marca de resíduos poliméricos após a análise.

Figura 30 – Análise termogravimétrica (TGA) da PCL e do *Pluronic* F-68 puros

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 31 – Primeira derivada da curva termogravimétrica (DTG) da PCL e do *Pluronic* F-68 puros

Fonte: Elaborado pelo autor

O *Pluronic* F-68 apresentou comportamento de degradação térmica uniforme, com apenas um evento de perda (Figura 30, em vermelho). Observando a primeira derivada desta curva (Figura 31, em vermelho), verifica-se apenas um pico, bem alargado, referente à temperatura em que a máxima velocidade de degradação do polímero é alcançada. O alargamento inicial na base do pico do *Pluronic* F-68 (próximo a 250°C) pode estar associado a perdas de massa referentes a porções dos blocos PPO do copolímero, que são menos resistentes termicamente que os blocos de PEO (XIONG; TAM; GAN, 2004; WANG, R. *et al.*, 2012).

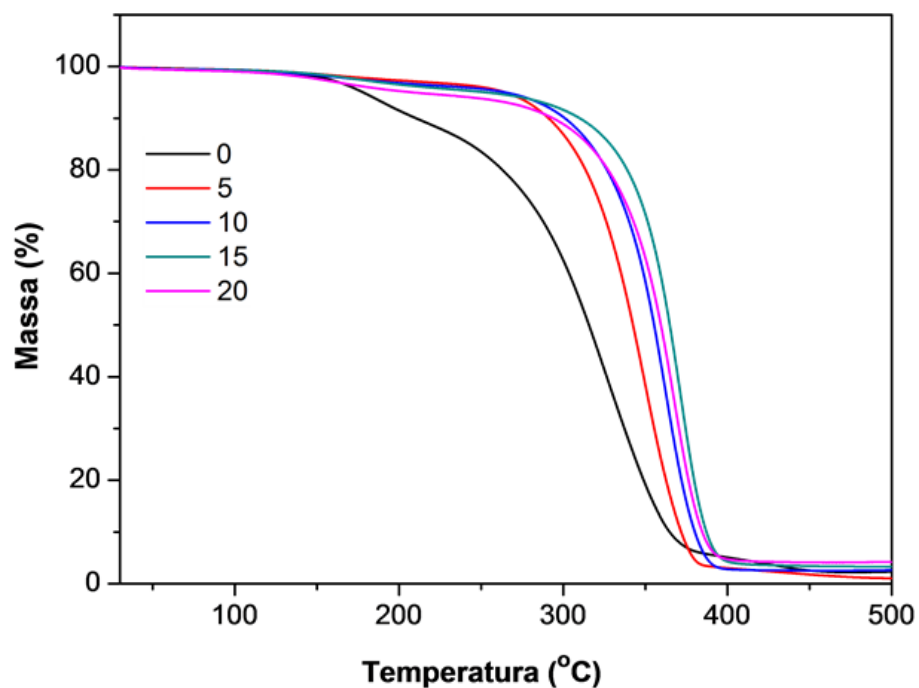
A TGA da PCL (Figura 30, em preto) mostra um comportamento de degradação térmica não uniforme, com dois eventos de perda. O primeiro destes eventos pode ser associado à degradação das cadeias de poliéster, que desencadeia a liberação de ácido carboxílico e outros grupos terminais (PERSENAIRE *et al.*, 2001). Já a segunda etapa de degradação, mais expressiva, provavelmente se associa ao evento térmico da degradação das cadeias poliméricas. Pela primeira derivada da curva desta curva (Figura 31, em preto), há dois picos referentes à temperatura em que a máxima velocidade de degradação é alcançada, confirmando os dois eventos de perda observados na TGA. O PCL, com seu pico principal mais deslocado para direita (temperaturas maiores), parece apresentar maior estabilidade térmica que o *Pluronic* puro, o que é condizente com o fato de o PCL apresentar-se como um material de estrutura mais rígida. Por ser um sistema com menor rigidez e maior mobilidade, o poloxâmero por sua vez, apresenta seu início de degradação antecipado (WANG, R. *et al.*, 2012).

Os resultados da análise termogravimétrica (TGA) bem como da primeira derivada das curvas (DTG) para as amostras liofilizadas são apresentados nas Figuras 32 e 33, respectivamente.

O TGA das amostras 5 a 20 (Figura 32) indica que as mesmas apresentaram um comportamento de degradação térmica uniforme, com apenas um evento de perda bem delimitado. E, ao observar sua derivada (Figura 33), há apenas um pico referente à temperatura em que a velocidade de degradação é máxima. Já o TGA da amostra 0 indica mais de uma perda, porém não se observa outro pico na sua DTG. Entretanto, pode-se observar um nítido alargamento do pico da amostra 0, indicando uma perda de massa mais heterogênea, provavelmente resultante da degradação não uniforme, não homogênea do material. Comparando-se o sistema na ausência e presença de

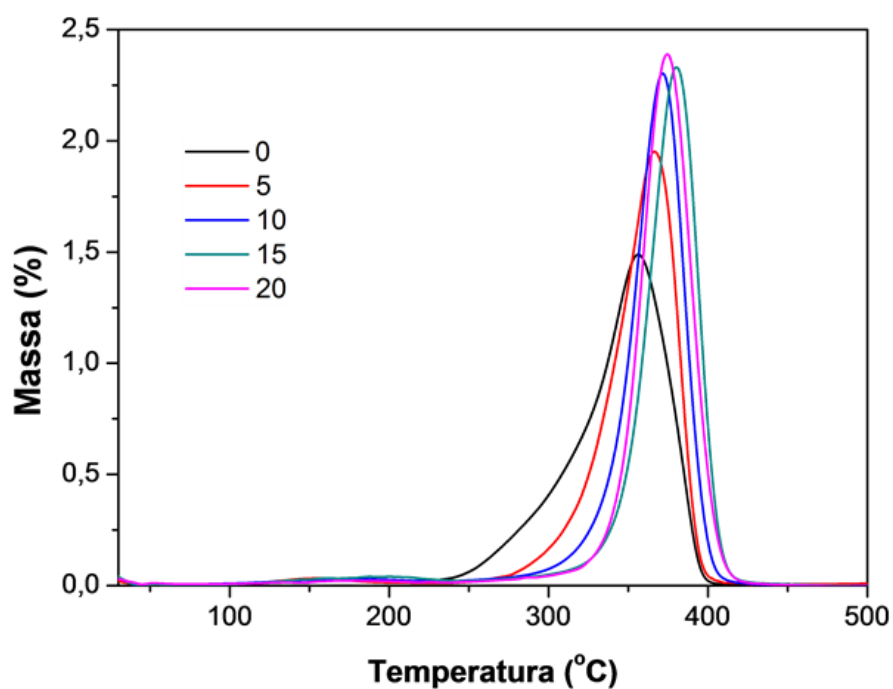
CUR observa-se que a presença do mesmo contribui para uma cinética de degradação mais homogênea que o nanossistema puro.

Figura 32 – Análise termogravimétrica (TGA) das amostras obtidas



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 33 – Primeira derivada da curva termogravimétrica (DTG) das amostras obtidas



Fonte: Elaborado pelo autor

Para melhor compreensão destes dados, os valores da temperatura de início da degradação (T_{onset}), início da inflexão da curva da DTG (T_{peak}) e resíduo da PCL, do *Pluronic* F-68 e das amostras foram avaliados e estão aqui resumidos na Tabela 9. Os valores de T_{onset} e T_{peak} (Tabela 9) confirmam que a PCL exibe maior estabilidade térmica que o *Pluronic* puro, visto que a PCL apresenta maiores valores associados à temperatura de início da degradação e início da inflexão da curva da DTG.

Tabela 9. Valores da temperatura de início da degradação (T_{onset}), início da inflexão da curva da DTG (T_{peak}) e resíduo da PCL, do *Pluronic* F-68 puros e das amostras

Amostra	$T_{\text{onset}} (\pm 1^\circ\text{C})$	$T_{\text{peak}} (\pm 1^\circ\text{C})$	Resíduo (%)
PCL	281/335	309/387	0
<i>Pluronic</i> F-68	278	362	0
0	181/275	356	0
5	305	366	0
10	318	372	1
15	328	381	1
20	317	375	3

Fonte: Elaborado pelo autor

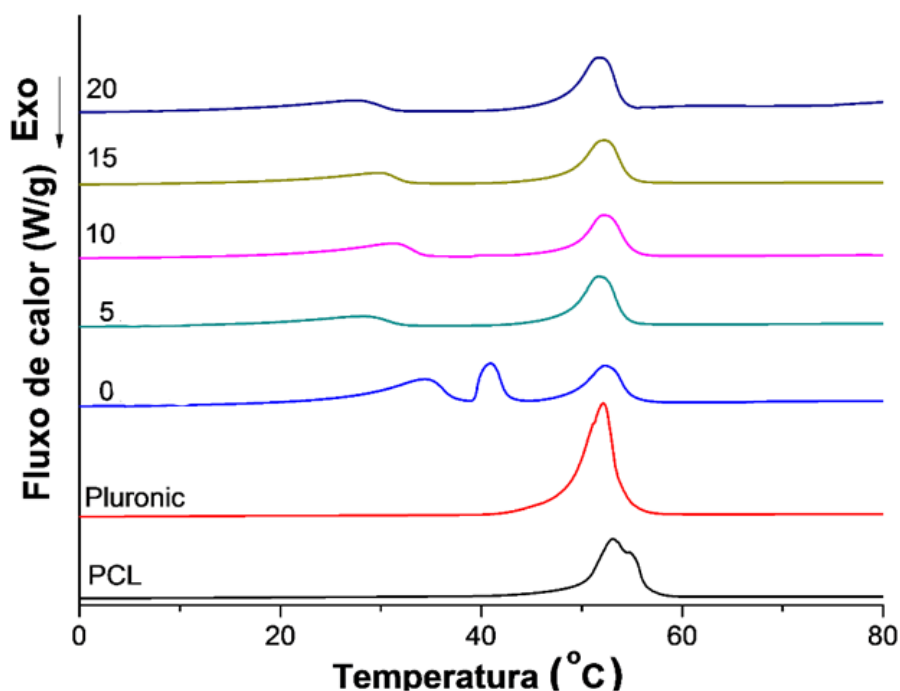
Na amostra 0, observa-se uma faixa de temperatura de degradação menor que dos polímeros puros. Este dado é coerente, pois formação de partículas na escala nanométrica acarreta em uma maior área superficial e, conseqüentemente, maior reatividade das NPs, fazendo com que degradação se inicie mais rapidamente devido à maior facilidade de transmissão do fluxo de calor ao longo da amostra (MAINARDES; GREMIÃO; EVANGELISTA, 2006). Nas amostras de 0 a 15 foi verificado um aumento progressivo da estabilidade térmica, provavelmente associado à adição de CUR ao sistema de nanoprecipitação. Logo, pressupõe-se que o extrato pode atuar como um estabilizante nessa faixa de concentração. Ademais, comparando as amostras 5, 10 e 15 em termos de tamanho, há correlação com os dados da TGA, já que as amostras 10 e 15 apresentam tamanho ligeiramente maior e, conseqüentemente, menor área superficial relativa e, assim, maior estabilidade térmica (MAINARDES; GREMIÃO; EVANGELISTA, 2006). Entre as amostras 15 e 20, ocorre a estagnação dos valores de T_{onset} e T_{peak} (com sutil queda, retornando para os

valores encontrados na amostra 10), o que sugere que quantidades consideravelmente maiores de CUR acarretam em excesso e saturação do extrato no sistema, não implicando em melhorias de propriedades de fato. O resíduo observado da amostra 10 em diante provavelmente está associado ao excesso de CUR no sistema.

5.9 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

Os termogramas obtidos por DSC para os polímeros puros e para as amostras são apresentados na Figura 34. Os valores das temperaturas de fusão, T_m , estão descritos na Tabela 10.

Figura 34 - Termogramas dos polímeros puros bem como das nanopartículas obtidas após liofilização (amostras 0, 5, 10, 15 e 20, respectivamente)



Fonte: Elaborado pelo autor

Observa-se por meio dos termogramas que a PCL e o *Pluronic* apresentam picos de fusão cristalina em temperaturas muito próximas. Logo, na mistura destes materiais nas nanopartículas, era esperado que ocorresse a sobreposição dos mesmos. Entretanto, há uma multiplicidade de picos nas amostras, com o aparecimento de picos de fusão bem alargados em regiões de temperaturas menores,

que não existiam nas matrizes originais. Assim, pode-se inferir que a interação dos polímeros com o solvente orgânico, a nanoprecipitação em si ou ainda a liofilização, separada ou conjuntamente, podem ter alterado a forma de cristalização dos polímeros, dando origem a um sistema com maior heterogeneidade cristalina, visto o surgimento de novas populações de picos de fusão. Também devido à sobreposição da PCL e do poloxâmero, não há como discernir onde ocorre o rearranjo, se no domínio de PCL ou de *Pluronic*. Na amostra 0, são observados três picos de fusão, indicando três domínios cristalinos ao longo da amostra, com diferentes perfeições e tamanhos cristalinos. Com a adição de CUR, o extrato aparentemente provoca homogeneização da perfeição cristalina do sistema, fazendo despontar apenas dois picos de fusão para as amostras de 5 a 20. Não é possível observar o aumento da homogeneização cristalina a partir do acréscimo de 15% de CUR, o que corrobora os demais dados de TGA e DLS, apontando para a saturação da CUR no sistema a partir da amostra 15 ou mesmo da 10, já que o perfil de DSC das amostras 15 e 20 também não diferem significativamente da 10.

Tabela 10. Temperatura de fusão (T_m) dos polímeros puros e das amostras 0, 5, 10, 15 e 20

Amostra	T_{m1} (°C)	T_{m2} (°C)	T_{m3} (°C)
PCL	-	-	55
<i>Pluronic</i> F-68	-	-	52
0	35	43	54
5	27	-	52
10	31	-	54
15	30	-	53
20	27	-	52

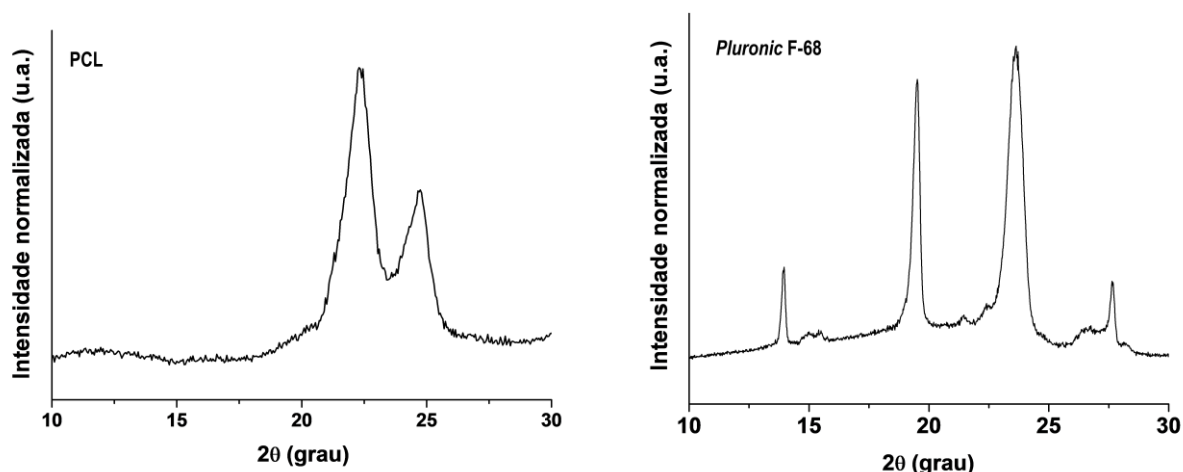
Fonte: Elaborado pelo autor

5.10 DIFRAÇÃO DE RAIOS X (XRD)

A análise por difração de raios X foi executada para: analisar a estrutura cristalina dos polímeros; determinar o grau de cristalinidade total dos sistemas; averiguar possíveis mudanças na estrutura cristalina dos polímeros da matriz após o processo de obtenção das partículas por nanoprecipitação bem como a influência da

adição do extrato sobre as propriedades estruturais. Os difratogramas de raios X dos polímeros puros e das amostras obtidas por nanoprecipitação são apresentados, respectivamente, na Figura 35 e na Figura 36. As posições angulares dos respectivos picos e o grau de cristalinidade dos polímeros puros e das amostras obtidas por nanoprecipitação são apresentados, respectivamente, na Tabela 11 e a Tabela 12.

Figura 35 - Difratogramas de raios X dos polímeros puros



Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 11. Ângulos dos picos de difração dos polímeros puros

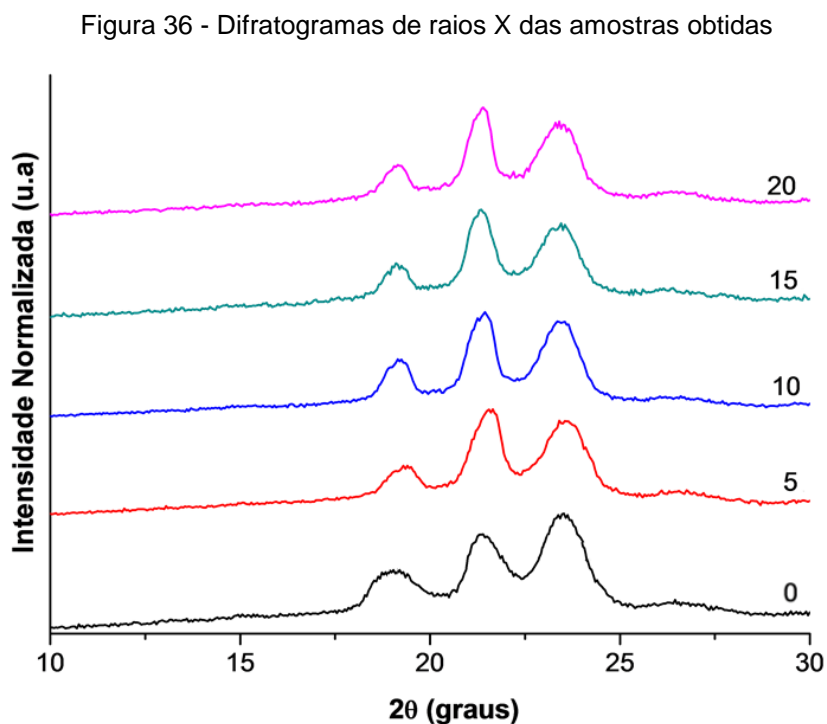
Material	Ângulos dos picos (°)				Grau de cristalinidade (%)
PCL	22,1		24,8		42 ± 2
Pluronic F-68	13,9	19,5	23,7	27,6	39 ± 2

Fonte: Elaborado pelo autor

O perfil do difratograma obtido para a PCL (Figura 35) evidencia a presença de dois picos cristalinos centrados em $2\theta = 22,1^\circ$ e $24,8^\circ$ (Tabela 11), os quais correspondem aos planos cristalinos (110) e (200), respectivamente, característicos da célula unitária cristalina do tipo ortorrômbica. Tais dados corroboram os estudos anteriores de Christensen *et al.* (2008), Hernández *et al.* (2012), Monteiro *et al.* (2013), Tshweu *et al.* (2013) e PEÑA *et al.* (2016). O relativo alargamento da base do pico pode estar associado ao fato da PCL usada (de menor massa molar que as dos estudos mencionados) apresentar maior índice de polidispersão e, portanto, maior heterogeneidade dos seus cristais. Optou-se por uma PCL de massa molar menor

para o tipo de aplicação almejada neste estudo porque, em testes anteriores realizados dentro do próprio instituto, foi possível associar massas molares maiores a maiores tamanhos de NPs e, conseqüentemente, desvantagens como inadequação do tamanho para travessia da BHE e um grau de cristalinidade muito mais elevado e um perfil de degradação da PCL muito mais lento, o que seria mais adequado para liberação de fármacos em implantes, por exemplo, não para administração de doses terapêuticas em taxas maiores ao cérebro de pacientes (SALMASO;CALICETI, 2013).

O difratograma do *Pluronic* F-68 (Figura 35) apresentou 2 picos cristalinos principais e dois outros picos de difração de menor intensidade, com respectivos valores descritos na Tabela 11, corroborando difratogramas publicados em estudos anteriores (BAJGAI *et al.*, 2009; XIE *et al.*, 2009; PARRA *et al.*, 2015).



Fonte: Elaborado pelo autor

Na Figura 36, observa-se nos difratogramas obtidos para as amostras a presença de três picos cristalinos. O primeiro deles coincide com o pico do *pluronic*, com um sutil deslocamento para ângulos menores, indicando um possível aumento da distância lamelar. Este primeiro pico sofre achatamento e alargamento em relação ao *pluronic* puro, o que indica, respectivamente, uma redução da cristalinidade da fase de recobrimento de *pluronic* e mudança no arranjo cristalino da mesma. Tais fatos são

condizentes com este tipo de técnica de nanodimensionamento, que envolve solubilização, moldagem em esfera, evaporação do solvente, secagem etc. O segundo pico, pelo ângulo que apresenta, pode ser associado à PCL, sem rearranjos e deslocamentos evidentes para esta fase, ao comparar o difratograma das amostras (Figura 36) com o dos polímeros puros (Figura 35). Já o terceiro pico, pode ser associado à contribuição conjunta de policaprolactona e *pluronic*, observando-se assim um alargamento provavelmente devido a junção, sobreposição dos dois picos, com deslocamento para a esquerda indicando o aumento da distância interlamelar dos cristais poliméricos.

Dentre os nanossistemas, a amostra 0 é a única a apresentar um perfil realmente destoante (como ocorreu também no DSC): o 1º pico apresenta-se menos achatado e sutilmente mais alargado; e inverte-se a intensidade relativa entre o 2º e 3º picos, o que indica a modificação dos cristais do sistema na ausência de CUR, confirmando uma heterogeneidade cristalina diferenciada nesta amostra, corroborando o valor superior do grau de cristalinidade total calculado em relação às demais amostras (Tabela 12). Nas amostras de 5 a 20 não se observa alteração significativa do perfil de arranjo cristalino nem do grau de cristalinidade total do sistema.

Tabela 12. Ângulos dos picos de difração das amostras obtidas

Amostra	Ângulos dos picos (°)			Grau de cristalinidade (%)
0	17,6	21,3	23,8	45 ± 2
5	18,1	22,1	23,5	41 ± 2
10	18,2	21,6	23,2	40 ± 2
15	18,2	21,6	23,1	39 ± 2
20	18,2	21,8	23,1	38 ± 2

Fonte: Elaborado pelo autor

5.11 ANÁLISE DE NMR NO DOMÍNIO DO TEMPO (TD-NMR)

A ressonância magnética nuclear no domínio do tempo é uma técnica utilizada para avaliar a dinâmica molecular do material observado. Neste estudo, foi abordado o relaxamento longitudinal ou tempo de relaxação spin-rede do núcleo de hidrogênio (T_1H), que está envolvido com o retorno da magnetização ao equilíbrio térmico.

Geralmente, no estado sólido, quanto maior o tempo de relaxação observado, menor a mobilidade molecular do sistema. A análise dos dados foi feita não só através do tempo de relaxação do hidrogênio (T_{1H}) das amostras como a partir da avaliação das modificações nas curvas de domínio dos materiais.

A Tabela 13 mostra os valores de T_{1H} medidos para as amostras em estado sólido (obtidas após a liofilização), determinados a partir de 1 exponencial, usando a técnica de inversão-recuperação.

Tabela 13. Tempos de relaxação do hidrogênio determinados com 1 exponencial

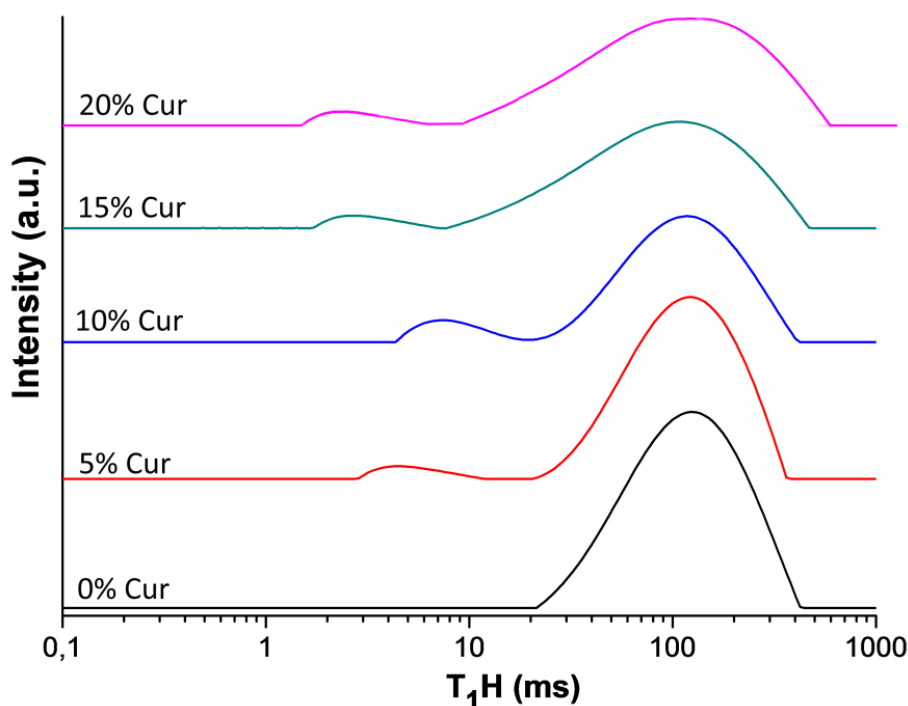
Amostra/Material	T_{1H} (ms)
PCL	138
<i>Pluronic F-68</i>	130
0	112
5	103
10	94
15	83
20	83

Fonte: Elaborado pelo autor

Observando os dados gerais do T_{1H} , observou-se que a adição de CUR aumentou progressivamente a mobilidade molecular dos sistemas, uma vez que as amostras 5, 10 e 15 apresentaram tempos progressivamente menores em relação à amostra 0, na qual nenhum extrato natural foi adicionado. Provavelmente, com 15% de extrato CUR, a saturação do sistema polimérico transportador é alcançada, uma vez que a mobilidade molecular do sistema não muda mais, indicando uma possível saturação e existência de CUR livre, o que corrobora os dados de DLS, TGA e DSC, além do FTIR e SEM, que sugeriram a presença de CUR livre nos sistemas mais concentrados. A observação da maior rigidez da PCL em relação ao *Pluronic* (T_{1H} aproximadamente 6% maior) também corrobora os dados de TGA, que evidenciam maior estabilidade térmica deste material em relação ao *Pluronic*, cuja degradação é antecipada. Ao comparar os valores de T_{1H} das NPs obtidas mesmo sem adição de CUR (amostra 0) com valores de T_{1H} dos polímeros puros, observa-se uma redução no tempo de relaxação dos componentes, provavelmente relacionada à reorganização estrutural da matriz pela influência do revestimento polimérico resultante do processo

de nanoprecipitação. Essa diminuição no tempo de relaxação da amostra 0 aponta para uma boa interação entre os componentes poliméricos, PCL e *Pluronic*. Além da determinação dos tempos de relaxação, também analisadas as informações contidas nas curvas de domínio ou de distribuição dos T_1H (Figura 37).

Figura 37. Curvas de distribuição dos tempos de relaxação dos nanossistemas



Fonte: Elaborado pelo autor

As amostras 5, 10, 15 e 20 apresentaram duas curvas de domínio, sugerindo que a menor delas (entre 1 e 10ms) está associada à CUR. O deslocamento destes domínios para tempos menores em 15 e 20 confirma os dados anteriores, indicando uma maior mobilidade destes sistemas, provavelmente associada à presença do extrato natural na sua forma livre ou aderido à camada externa de poloxâmero. No entanto, não se deve excluir a possibilidade de que esse domínio mais móvel esteja associado à umidade intrinsecamente associada à CUR incorporada às NPs, que deve ser maior à medida que a proporção de CUR aumenta e, talvez por isso, resultaria em domínios mais deslocados para a esquerda, em tempos menores.

O alargamento progressivo do domínio menos rígido, sobretudo, evidenciado nos sistemas 15 e 20, indica uma maior heterogeneidade, possivelmente associada à maior proporção de CUR adicionada no Sistema de nanoprecipitação. Este dado era esperado, pois, mesmo que pequenas, alterações na viscosidade do meio reacional

de nanoprecipitação podem conduzir à formação de diferentes mecanismos de recristalização da estrutura da matriz polimérica, com internalização ou agregação de CUR à camada de poloxâmero, adesão de CUR do lado de fora da NP e até mesmo em micelas livres de poloxâmero (BROICHSITTER *et al.*, 2010).

5.12 TESTE DE ALTERAÇÃO DE COR

Os resultados obtidos dos testes de alteração de cor, baseados na Equação 1, estão resumidos na Tabela 14.

Tabela 14. Alteração total de cor dos sistemas (ΔE)

Amostra	24h - Luz	48h - Luz	24h - Temp	48h - Temp
CUR	3,6	4,4	2,3	3,1
5	0,8	1,1	0,9	1,4
10	0,7	1,2	1,0	1,4
15	1,0	1,5	1,2	1,6
20	1,8	2,3	1,5	1,9

Fonte: Elaborado pelo autor

Os resultados mostraram que a CUR livre, não encapsulada, sofre grandes mudanças de cor - provavelmente relacionadas à oxidação do composto, que muda de amarelo para laranja escuro e subsequentemente para marrom, conforme é oxidado. Além disso, o resultado mostrou que o fator de luz é mais prejudicial à estabilidade do composto do que a temperatura, em conformidade com os achados de Belkacemi e colaboradores (2011).

Quando se observa a CUR encapsulada, as amostras 5 e 10 apresentam maior estabilidade de cor que as amostras 15 e 20, o que corrobora os dados de TD-NMR, DLS, TGA e DSC. Isto indica que nesses sistemas há CUR associada à PCL, mas possivelmente também existe CUR na camada externa de *Pluronic* e até mesmo livre, o que deixa parte dela menos protegida da luz e mais suscetível à degradação por fotooxidação.

5.13 EFICIÊNCIA DE RETENÇÃO DE CUR NAS PARTÍCULAS

Na Tabela 15, está representada a porcentagem de CUR retida nas NPs, calculada relacionando a massa inicial de CUR acrescida à nanoprecipitação com a massa aferida após o processo de “abertura” das partículas. Mesmo com a realização de triplicatas de preparo e de amostra, esta análise não pode ser observada individualmente, uma vez que, durante processo de “abertura” das partículas, a CUR pode ser sofrido degradação dada sua instabilidade química (NAKSURIYA *et al.*, 2014; SUN *et al.*, 2014; LIU, Z. *et al.*, 2016).

Tabela 15. Eficiência de retenção de CUR nas nanopartículas

Amostra	Eficiência de retenção (%)
5	27 ± 3
10	24 ± 2
15	27 ± 3
20	23 ± 2

Fonte: Elaborado pelo autor

Considerando o erro intrínseco da análise – preparo, operação e medida ($\pm 10\%$), a eficiência de retenção de CUR nas partículas não se altera e não supera 30%, sugerindo que a adição de mais CUR no sistema não acarreta necessariamente em ganho com ativo associado à nanopartícula, mas sim ativo livre no meio, o que poderia também ser útil no sentido de estabilização estérica de tamanho e potencial zeta da suspensão coloidal de nanopartículas. Entretanto, cabe novamente ressaltar que esta análise por si só não traduz a capacidade de carreamento de CUR nas NPs, visto também que a dupla natureza (PCL e *Pluronic*) da partícula implica numa interação física e internalização diferenciada dentro e fora (em meio às camadas de *pluronic*) para cada quantia de CUR, à medida que sua proporção pode alterar parâmetros físico-químicos do processo de nanoprecipitação como viscosidade, tempo de escape do solvente orgânico *etc* (BADRI *et al.*, 2017).

Os resultados de eficiência de retenção corroboram o aspecto visual dos nanossistemas obtidos (Figura 38): à medida que aumenta proporção de CUR,

observa-se uma cor amarelada mais evidenciada, provavelmente associada a mais CUR livre em suspensão ou na camada externa das nanopartículas.

Figura 38. Aspecto visual das suspensões coloidais de nanopartículas de 5 a 20, nesta ordem



Fonte: Elaborado pelo autor

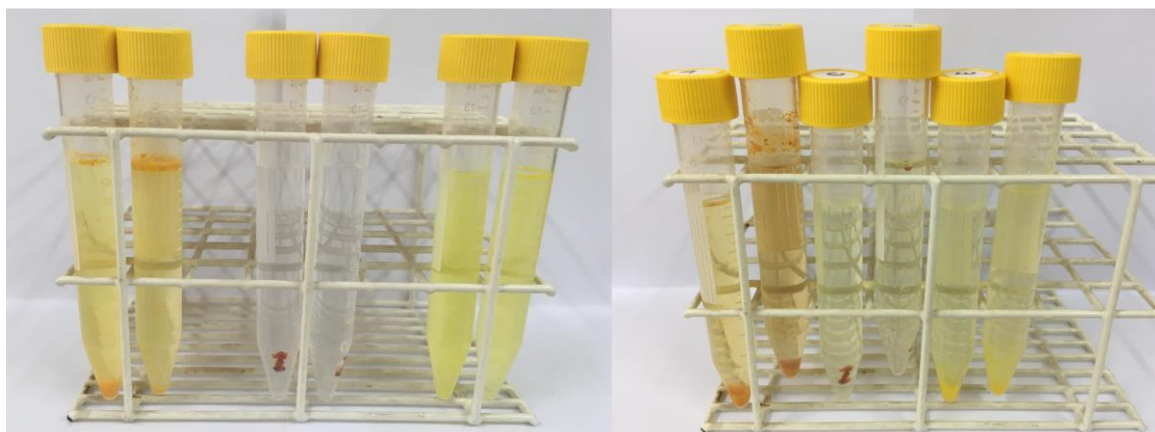
5.14 ENSAIO DE SOLUBILIDADE DE CUR E DAS PARTÍCULAS

O ensaio de solubilidade foi feito para verificar se os nanossistemas promoveram o aumento da solubilidade de CUR. Após 24h, sob agitação e temperatura controladas, as misturas de cúrcuma em pó, extrato e nanopartículas com água e PBS foram analisadas para comparar a quantidade de ativo solubilizado. Na Figura 39 pode ser observado o aspecto destes sistemas no início e no fim do ensaio.

As nanopartículas contendo CUR apresetaram-se aparentemente muito mais solúveis tanto em água ultrapura quanto em solução aquosa de PBS, decorrendo num tom amarelado mais pronunciado na solução, com um pequeno depósito do excesso de NPs no fundo dos frascos. Já os frascos contendo o pó seco de açafrão não mostraram uma boa solubilização do pó no meio, com formação de corpo de fundo e pó em suspensão aquosa (Figura 39).

Ademais, sem a proteção do sistema polimérico, ao fim do ensaio, o pó de açafrão adotou um aspecto laranja escuro, levando a crer que houve oxidação do ativo. O extrato de curcuminoides (CURUS) ficou totalmente aderido na parede do frasco até o fim do ensaio, ocasionando apenas uma leve alteração da cor da solução aquosa (quase imperceptível), possivelmente devido ao caráter extremamente oleoso do mesmo.

Figura 39. Fotografia dos sistemas no início e no fim do ensaio de solubilidade



Fonte: Elaborado pelo autor

Os resultados obtidos nesta análise via espectrofotômetro UV-vísivel estão dispostos na Tabela 16, cuja apresentação dos resultados segue a mesma ordem das fotos.

Tabela 16. Análise da solubilidade dos sistemas em água e PBS (tampão fosfato salino)

Amostra	Meio	Absorbância
Pó seco de açafião	Água ultrapura	0,2
Pó seco de açafião	PBS	0,2
CURUS	Água ultrapura	-
CURUS	PBS	-
NPs (10)	Água ultrapura	0,8
NPs (10)	PBS	0,7

Fonte: Elaborado pelo autor

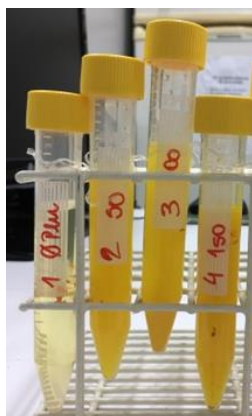
Confirmando as observações macroscópicas e sensoriais, as medidas de absorbância (Tabela 16) revelaram que, de fato, o encapsulamento polimérico promoveu um aumento considerável na solubilidade de CUR em meio aquoso, como era desejado.

Estudos indicam que a adição de tensoativos pode auxiliar a solubilização de ativos hidrofóbicos em meio aquoso (MA *et al.*, 2011) devido ao seu caráter anfifílico. Assim, para avaliar mais profundamente a questão da solubilidade da CUR e a possibilidade da sua liberação em meio simulando o fisiológico, foram feitos testes de adicionais com o extrato (CURUS) em meio de PBS com variadas concentrações de

tensoativo (*Pluronic* F-68, o mesmo presente no recobrimento das partículas), nos mesmos moldes do teste anterior.

A Figura 40 apresenta a fotografia das soluções aquosas de PBS com variadas concentrações de tensoativo (0; 0,5; 1,0 e 1,5%, respectivamente) após 24 horas de ensaio. Nota-se que foi indispensável o uso do *pluronic* na solubilização do extrato de curcuminoides nesse meio, visto a característica hidrofóbica do ativo. Pela cor da solução, não foi possível identificar visualmente CUR solubilizada no meio sem adição de *Pluronic*. Percebeu-se também, pela “intensificação crescente do amarelo” e pela menor quantidade de CUR depositada na parede dos frascos que o aumento da concentração de tensoativo favoreceu a solubilização da CUR. Entretanto, somente com o resultado das leituras no espectrofotômetro UV-visível (Tabela 17) foi possível obter uma análise mais conclusiva, confirmando as suposições. Como esperado, não foi possível detectar (Tabela 16) quantidades significantes de CUR solubilizada no meio sem adição de *Pluronic*; e o aumento da quantidade de tensoativo no meio aumentou a solubilidade de CUR, o que está de acordo com o fato de NPs recobertas com este mesmo tensoativo promoverem o aumento da solubilidade de CUR em meio aquoso e serem potencialmente aplicáveis em sistemas de liberação.

Figura 40. Aspecto visual das soluções de CUR em PBS com variadas concentrações de tensoativo



Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 17. Análise da solubilidade de CUR em meio simulando o fisiológico

Meio	Absorbância
PBS + 0,5% tensoativo	0,3
PBS + 1,0% tensoativo	0,5
PBS + 1,5% tensoativo	0,6

Fonte: Elaborado pelo autor

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nas análises dos extratos por FTIR conclui-se que os curcuminoides principais foram de fato extraídos com ambos os métodos de agitação (CURSON e CURUS), o que foi corroborado pelo NMR de ^{13}C . Ainda, o NMR revelou a preeminência do extrato CURUS através da apresentação de espectros com melhor resolução e maior intensidade dos picos característicos dos curcuminoides. Arrematando a investigação sobre o extrato, o HPLC confirmou a presença do curcuminóide principal (curcumina) nos extratos e o quantificou em maiores proporções em CURUS, corroborando o NMR e levando à sua escolha como material a ser encapsulado.

A análise de tamanho via DLS permitiu intuir que a presença de extrato de curcuminoides (CUR) nos nanossistemas 5, 10, 15 e 20 promoveu considerável estabilização de tamanho e índice de polidispersão no período de armazenamento (relativamente longo, de seis meses), o que confere uma boa característica às nanopartículas (NPs) no contexto farmacológico; e, mesmo após a liofilização, as NPs agregaram, mas não chegaram nem a triplicar de tamanho e mantiveram-se na escala nanométrica. Ademais, as diferentes proporções de CUR nos sistemas afetou de formas diferentes o diâmetro hidrodinâmico médio e sua distribuição, provavelmente porque a CUR interfere por diferentes vias nesse tipo de propriedade (internalização na PCL, interação física e espessamento da camada externa de *Pluronic*, alteração dos parâmetros reacionais da nanoprecipitação *etc*). Entretanto, pôde-se destacar o fato de que não houve diferença razoável entre as amostras 15 e 20, o que sinalizou para uma possível saturação de CUR no sistema.

A microscopia eletrônica de varredura (SEM) revelou, em termos gerais, a morfologia predominantemente esférica de todos os sistemas, com sensível redução da homogeneidade de 10, 15 e 20 possivelmente decorrente do excesso de CUR e formação de micelas de poloxâmero durante a nanoprecipitação ou simplesmente do excesso de extrato no exterior das NPs.

Os valores de potencial zeta (ZP) aferidos foram condizentes com o tipo de NP produzida e suficientemente negativos para promover a estabilização da suspensão coloidal de nanopartículas no período de armazenamento observado. Também, o aumento da proporção de CUR nos sistemas mostrou-se diretamente proporcional ao aumento da estabilização do ZP.

A análise de FTIR das amostras possibilitou a confirmação da remoção da acetona e a manutenção das bandas características tanto da PCL e do *Pluronic* quanto do extrato após a nanoprecipitação, indicando que, como era desejado, não houve interação química matriz polimérica-CUR (dado roborado pelo TD-NMR). Além disto, a expansão dos espectros concordou com as suspeitas geradas por DLS e SEM através do surgimento de bandas associadas à CUR em 15 e 20, acusando a presença de CUR livre nos sistemas ou aderida na superfície das NPs.

A amostra 0 exibiu um perfil de degradação não uniforme na TGA, evidenciando maior heterogeneidade em relação às demais, enquanto as amostras de 5 a 20 demonstraram uma cinética de degradação mais homogênea, provavelmente associada à adição de CUR. Observando as amostras de 5 a 15, verificou-se o aumento da estabilidade térmica diretamente proporcional à adição de CUR, corroborando os dados de tamanho. A comparação da estabilidade térmica das amostras 15 e 20 corroborou os demais resultados, indicando que o excesso de CUR realmente não acarretou em benefício em termos de propriedade térmica.

A análise de DSC reforçou os dados de TGA em relação à saturação de CUR nas amostras 15 e 20; e ao aumento da homogeneidade cristalina da amostra 5 em relação à 0, com a adição de CUR. Em conformidade com o DSC, na análise de XRD a amostra 0 apresenta um perfil diferente no tocante à homogeneidade cristalina; e, com a adição de CUR, menor o grau de cristalinidade total do sistema observado.

O estudo dos sistemas via TD-NMR revelou que a adição de CUR promoveu o aumento da mobilidade molecular dos mesmos. A partir da amostra 15, os tempos de relaxação não mais se alteram, corroborando a saturação de CUR evidenciada anteriormente; e o deslocamento para tempos menores do domínio que surge na presença de CUR provavelmente está confirmando o excesso de CUR em 15 e 20.

O teste de alteração de cor e a análise da eficiência de retenção concertaram visto que, superada a quantidade suportada avaliada na eficiência de retenção (inferior a 30% de CUR adicionada à nanoprecipitação), a adição de CUR só acarreta em excesso de extrato livre, não associado à partícula. Assim, as amostras 15 e 20 apresentam maior susceptibilidade à fotodegradação e menor estabilidade em termos de cor. O sistema encapsulante promoveu de fato a proteção do ativo contra a degradação. Reunindo todos os dados, é possível considerar a amostra 10 como a de melhor relação “custo-benefício” levando em conta a quantidade de CUR adicionada no sistema de nanoprecipitação e a propriedade por ela agregada.

E, por fim, o resultado do ensaio de solubilidade permitiu concluir que, com efeito, a inclusão da CUR no nanossistema foi capaz de aumentar sua solubilidade em meio aquoso, como era desejado; e, em conjunto com a solubilização da CUR na presença de tensoativo no meio de tampão fosfato representou um indício de que as partículas têm potencial para liberação de CUR em meio fisiológico.

Em virtude de tudo que foi mencionado, pode-se inferir que os objetivos propostos na presente dissertação foram alcançados; que a alteração na concentração de CUR em formulações obtidas por nanoprecipitação resultou em diferentes comportamentos e propriedades das nanopartículas; que os sistemas poliméricos nanométricos encapsulando curcuminoides representam um potencial terapêutico para *Alzheimer*.

7 SUGESTÕES

- Avaliar o perfil de liberação do fármaco incorporado e, a partir do mesmo, determinar o mecanismo de liberação das nanopartículas produzidas associando-o a um dos modelos matemáticos conhecidos como o de ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Hixson-Crowell ou Korsmeyer-Peppas, que geralmente é aplicado para formas farmacêuticas poliméricas, nas quais o mecanismo de liberação não é conhecido ou quando possa estar envolvido mais de um tipo de liberação;
- Realizar uma investigação mais aprofundada quanto à bioatividade, degradação, citotoxicidade e biocompatibilidade das NPs produzidas;
- Caracterizar novamente as nanopartículas via TD-NMR, aprofundando o estudo da dinâmica molecular através da análise do tempo de relaxação spin-spin (T_2H);
- Realizar novamente a microscopia das nanopartículas, porém via microscopia eletrônica de transmissão a fim de se obter melhor resolução;
- Caracterizar novamente as nanopartículas liofilizadas (ressuspendendo-as em diferentes meios) via DLS a fim de observar o efeito da variação do pH sobre a distribuição de tamanho, potencial zeta e estabilidade coloidal;
- Realizar o teste de atividade das nanopartículas e da CUR livre em modelo celular de *Alzheimer* a fim de identificar o comportamento e as propriedades fluorescentes dos nanossistema, bem como a manutenção e possível potencialização das atividades anti-inflamatória, antioxidante e anti-amiloide;
- Evoluir para os ensaios *in vitro* de bioatividade, farmacocinética e biocompatibilidade das NPs; e, posteriormente, para ensaios *in vivo* com modelos murinos de *Alzheimer*.

REFERÊNCIAS

ABRAZ, Associação Brasileira de Alzheimer. Dados epidemiológicos. Disponível em: <<http://www.abraz.org.br>>. Acesso em: 15 jun. 2017.

AGGARWAL, B. B.; SUNDARAM, C.; AGGARWAL, Bh.; SURH, Y.; SHISHODIA, S. Curcumin: the indian solid gold. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, Boston, v. 595, p. 1–75, 2007. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-0-387-46401-5_1>. Acesso em: 05 jun. 2018.

AHMED, T.; GILANI, A.H. Therapeutic potential of turmeric in Alzheimer's disease: curcumin or curcuminoids?. **Phytotherapy Research**, [S.l.], v.28, n.4, p.517-525, 2014. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ptr.5030>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

AI, J.; BIAZAR, E.; JAFARPOUR, M.; MONTAZERI, M.; MAJDI, A.; AMINIFARD, S.; ZAFARI, M.; AKBARI, H. R.; RAD, H. G. Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs. **International Journal of Nanomedicine**, [S.l.], v. 6, p. 1117-1127, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3118686/?report=reader>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

ALAKHOVA, D. Y.; KABANOV, A. V. Pluronics and MDR Reversal: An Update. **Molecular Pharmaceutics**, [S.l.], v. 11, n. 8, p. 2566–2578, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4122590/>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

ALMERÍA, B.; DENG, W.; FAHMY, T. M.; GOMEZ, A. Controlling the morphology of electrospray-generated PLGA microparticles for drug delivery. **Journal of Colloid and Interface Science**, [S.l.], v. 343, n. 1, p. 125-133, 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979709012855?via%3Dihub>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. Alzheimer's Association report: 2017 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & Dementia**, v. 13, p. 325–373, 2017. Disponível em: <<https://www.alz.org/alzheimers-dementia/facts-figures>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

Alzheimer's Disease Education and Referral Center. Alzheimer's Disease Medications - FACT SHEET. **NIH Publication**, v. 15, p. 3431, 2015. Disponível em: <<https://order.nia.nih.gov/publication/alzheimers-disease-medications-fact-sheet>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

Alzheimer's Disease International. World Alzheimer Report 2016. Disponível em: <<https://www.alz.co.uk/research/world-report-2016>>. Acesso em: 10 jun. 2017.

ANAND, P.; KUNNUMAKKARA, A.B.; NEWMAN, R.A.; AGGARWAL, B.B. Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. **Molecular Pharmaceutics**, [S.l.], v. 4, n. 6, p. 807-818, 2007. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/mp700113r>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

ANDERSON, A.M.; MITCHELL, M.S.; MOHAN, R.S. Isolation of curcumin from turmeric. **Journal of Chemical Education**, [S.l.], v. 77, n. 3, p.359-360, 2000. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed077p359>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

ARRIGHI, H. M.; NEUMANN, P. J.; LIEBERBURG, I. M.; TOWNSEND, R. J. Lethality of Alzheimer Disease and its Impact on Nursing Home Placement. **Alzheimer Disease & Associated Disorders**, [S.l.], v. 24, n.1, 2010. Disponível em: <<https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=19568155>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

BADRI, W.; MILADI, K.; NAZARI, Q.A.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Effect of process and formulation parameters on polycaprolactone nanoparticles prepared by solvent displacement. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [S.l.], v. 516, p. 238-244, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092777571631072X>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

BAJGAI, M. P.; ARYAL, S.; PARAJULI, D. C.; KHIL, M-S.; LEE, D. R.; KIM, H. Y. Synthesis and Characterization of Brush Copolymers Based on Methoxy Poly(ethylene glycol) and Poly(ε-caprolactone). **Journal of Applied Polymer Science**, [S.l.], v. 111, p. 1540-1548, 2009. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/app.29168>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

BARTRAKOVA, E. V.; KABANOV, A.V. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. **Journal of Controlled Release**, [S.l.], v. 130, n. 2, p. 98-106, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2678942/>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

BECK-BROICHSITTER, M.; RYTTING, E.; LEBHARDT, T.; WANG, X.; KISSEL, T. Preparation of nanoparticles by solvent displacement for drug delivery: A shift in the “ouzo region” upon drug loading. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 41, p. 244-253, 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092809871000240X?via%3Dihub>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

BELKACEMI, A.; DOGGUI, S.; DAO, L.; RAMASSAMY, C. Challenges associated with curcumin therapy in Alzheimer disease. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, [S.l.], v.13, p. 34, 2011. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/journals/expert-reviews-in-molecular-medicine/article/challenges-associated-with-curcumin-therapy-in-alzheimer-disease/0D89090DE324CD15369828321D7C151F#>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

BETBEDER, D.; LIPKA, E.; HOWSAM, M.; CARPENTIER, R. Evolution of availability of curcumin inside poly-lactic-co-glycolic acid nanoparticles: impact on antioxidant and antinitrosant properties. **International Journal of Nanomedicine**, [S.l.], v. 10, p. 5355-5366, 2015. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4554401/>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

BHAWANA; BASNIWAL, R. K.; BUTTAR, H. S.; JAIN, V. K.; JAIN, N. Curcumin Nanoparticles: Preparation, Characterization, and Antimicrobial Study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.l.], v. 59, p. 2056-2061, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21322563>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

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

<<https://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-3155-5-3>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

BLANCO, E.; SHEN, H.; FERRARI, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. **Nature: biotechnology**, [S.l.], v. 33, n. 9, p. 941-951, 2015. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26348965>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

BRAIDY, N.; GRANT, R.; ADAMS, S.; GUILLEMIN, G. J. Neuroprotective effects of naturally occurring polyphenols on quinolinic acid-induced excitotoxicity in human neurons. **FEBS Journal**, [S.l.], v. 277, p. 368–382, 2010. Disponível em:

<<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1742-4658.2009.07487.x>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

BRAMBILLA, D.; DROUMAGUET, B.; NICOLAS, J. S.; HASHEMI, H.; WU, L. S.; MOGHIMI, M.; COUVREUR, P.; ANDRIEUX, K. Nanotechnologies for Alzheimer's disease: diagnosis, therapy, and safety issues. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, [S.l.], v. 7, p. 521–540, 2011. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1549963411001055?via%3Dihub>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

CHAMPION, J. A.; MITRAGOTRI, S. Role of target geometry in phagocytosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S.l.], v. 103, n.13, p. 4930-4934, 2006. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1458772/>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

CHRISTENSEN, P. A.; EGERTON, T. A.; MARTINS-FRANCHETTI, S. M.; JIN, C.; WHITE, J. R. Photodegradation of polycaprolactone/poly(vinyl chloride) blend. **Polymer Degradation and Stability**, [S.l.], v. 93, p. 305-309, 2008. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141391007002662>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

CHUA, Y. T.; LIN, C. X. C.; KLEITZ, F.; ZHAO, X. S.; SMART, S. Nanoporous Organosilica Membrane for Water Desalination. **Chemical Communications**, [S.l.], v. 49, n. 40, p. 4534-4536, 2013. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/cc/c3cc40434j#!divAbstract>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

CODEVILLA, C. F.; BARIN, J. S.; SILVA, C. B.; SILVA, T. M.; MENEZES, C. R. Incorporação da curcumina em sistemas nanoestruturados: Revisão. **Ciência e Natura**, Ed. Especial-Nano e Microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos, [S.l.], v.37, p. 152-163, 2015. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/305292322_Incorporacao_da_curcumina_em_sistemas_nanoestruturados_Revisao>. Acesso em: 05 jun. 2018.

COSTA, P. J. C. Avaliação *in vitro* da bioequivalência de formulações farmacêuticas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [S.l.], v. 38, p. 141-153, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-93322002000200003&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 05 jun. 2018.

COUVREUR, P.; BARRAT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. **Therapeutic drug carrier systems**, [S.l.], v. 19, n. 2, p. 99-134, 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12197610>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

D'ADDIO, S. M.; PRUD'HOMME, R. K. Controlling drug nanoparticle formation by rapid precipitation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.l.], v. 63, n. 6, p. 417-426, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X1100072X>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

DANHIER, F.; ANSORENA, E.; SILVA, J. M.; COCO, R.; LE BRETON, A.; PRÉAT, V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. **Journal of Controlled Release**, [S.l.], v. 161, n. 2, p. 505-522, 2012. Disponível em: <>. Acesso em: 05 jun. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22353619>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

DASH, T. K.; KONKIMALLA, V. B. Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. **Journal of Controlled Release**, [S.l.], v. 158, n.1, p. 15-33, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21963774>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

DAWIDCZYK, C. M.; KIM, C.; PARK, J. H.; RUSSELL, L. M.; LEE, K. H.; POMPER, M. G.; SEARSON, P. C. State-of-the-art in design rules for drug delivery platforms: Lessons learned from FDA-approved nanomedicines. **Journal of Controlled Release**, [S.l.], v. 187, p. 133-144, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24874289>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

DUBOIS, B.; FELDMAN, H.; JACOVA, C.; HAMPEL, H.; MOLINUEVO, J. L.; BLENNOW, K.; DEKOSKY, S. T.; GAUTHIER, S.; SELKOE, D.; BATEMAN, R.; CAPPAS, S.; CRUTCH, S.; ENGELBORGHS, S.; FRISONI, G.; FOX, N. C.; GALASKO, D.; HABERT, M.; JICHA, G. A.; Nordberg, A.; PASQUIER, F.; RABINOVICI, G.; ROBERT, P.; ROWE, C.; SALLOWAY, S.; SARAZIN, M.; EPELBAUM, S.; SOUZA, L. C.; VELLAS, B.; VISSER, P. J.; SCHNEIDER, L.; STERN, Y.; SCHELTENS, P.; CUMMINGS, J. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. **Lancet Neurol**, [S.l.], v. 13, p. 614–29, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24849862>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

DURÁN, N.; OLIVEIRA, A. F.; DE AZEVEDO, M. M. M. *In vitro* Studies on the Release of Isoniazid Incorporated in Poly(ϵ -Caprolactone). **Journal of Chemotherapy**, [S.l.], v. 18, n. 5, p. 473-479, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17127222>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

ERICKSON, C. A.; BARNES, C. A. The neurobiology of memory changes in normal aging. **Experimental Gerontology**, [S.l.], v. 38, p. 61-69, 2003. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0531556502001602?via%3Dihub>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

ESSA, M. M.; VIJAYAN, R. K.; CASTELLANO-GONZALEZ, G.; MEMON, M. A.; BRAIDY, N.; GUILLEMIN, G. J. Neuroprotective effect of natural products against Alzheimer's disease. **Neurochemistry Research**, [S.l.], v. 37, n. 9, p.1829–1842, 2012. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11064-012-0799-9>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

EZHILARASI, P. N., KARTHIK, P., CHHANWAL, N., ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review. **Food and Bioprocess Technology**, [S.l.], v. 6, n.3, p. 628–647, 2013. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11947-012-0944-0>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. Ph.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 55, n.1,1989. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378517389902810>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

FONTE, P.; REIS, S.; SARMENTO, B. Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, [S.l.], v. 225, p. 75-86, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365916300311?via%3Dihub>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

GABATHULER, R.; Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases; **Neurobiology of Disease**, [S.l.], v. 37, p. 48-57, 2010. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969996109002071?via%3Dihub>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

GAO, K.; JIANG, X. Influence of particle size on transport of methotrexate across blood brain barrier by polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 310, p. 213–219, 2006.

Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517305008112?via%3Dihub>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GUMY, R.; DELIE, F. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.l.], v. 55, p. 329-347, 2003. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X02002284?via%3Dihub>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

GEORGE, K. M.; BALAKRISHNAN, C. V.; CHANDRAN, O. G.; NARAYANA, P.; VERGHESE J. On the Extraction of Oleoresin from Turmeric. **Indian Spices**, [S.l.], v.18, n. 2-4, p. 7-9, 1981. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000136&pid=S0104-6632200000030000700013&lng=en>. Acesso em: 05 jun. 2018.

GOOZEE, K. G.; SHAH, T. M.; SOHRABI, H. R.; RAINEY-SMITH, S. R.; BROWN, B.; VERDILE, G.; MARTINS, R. N. Examining the potential clinical value of curcumin in the prevention and diagnosis of Alzheimer's disease. **British Journal of Nutrition**, [S.l.], v. 115, p. 449–465, 2016. Disponível em:

<<https://www.cambridge.org/core/journals/british-journal-of-nutrition/article/examining-the-potential-clinical-value-of-curcumin-in-the-prevention-and-diagnosis-of-alzheimers-disease/A2DB953BAA57C30E080D030AF0C225D9>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

GOU, M.; WEI, X.; MEN, K.; WANG, B.; LUO, F.; ZHAO, X.; WEI, Y.; QIAN, Z. PCL/PEG copolymeric nanoparticles: potential nanoplatfoms for anticancer agent delivery. **Current Drug Targets**, [S.l.], v. 12, n. 8, p. 1131-1150, 2011. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/74277/article>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

GOVENDER, T.; CHOONARA, Y. E.; KUMAR, P.; DU TOIT, L. C.; MODI, G.; NAIDOO, D.; PILLAY, V. A Novel Melt-Dispersion Technique for Simplistic Preparation of Chlorpromazine-Loaded Polycaprolactone Nanocapsules. **Polymers**, [S.l.], v. 7, n. 6, p. 1145-1176, 2015. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2073-4360/7/6/1145>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

GOYAL, K.; Koul, V.; Singh, Y.; Anand, A. Targeted Drug Delivery to Central Nervous System (CNS) for the Treatment of Neurodegenerative Disorders: Trends and Advances. **Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 14, n. 1, p. 43-59, 2014. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/125799/article>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

HERNÁNDEZ, J. H. M.; OTERO, S. A.; ARBELAEZ, C. A. B.; PEREA, E. F. T. Preparación y caracterización físico-química y térmica de mezclas binarias de resina mopa-mopa (*elaegia pastoensis mora*) y policaprolactona (pcl). **Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales**, [S. I.], v. 32, n. 2, p. 176-184, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0255-69522012000200003>. Acesso em: 05 jun. 2018.

HUANG, M-H.; LI, S.; COUDANE, J.; VERT, M. Synthesis and Characterization of Block Copolymers of ϵ -Caprolactone and DL-Lactide Initiated by Ethylene Glycol or Poly(ethylene glycol). **Macromolecular Chemistry and Physics**, [S.I.], v. 204, p. 1994-2001, 2003. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/macp.200350054>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

HUH, A. J.; KWON, Y. J. "Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using. **Journal of Controlled Release**, [S.I.], v.156, n. 2, p. 128-145, 2011. Disponível em: <>. Acesso em: 05 jun. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365911004792?via%3Dihub>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

IHL, R.; TRIBANEK, M.; BACHINSKAYA, N. Efficacy and Tolerability of a Once Daily Formulation of Ginkgo biloba Extract EGb 761 (R) in Alzheimer's Disease and Vascular Dementia: Results from a Randomised Controlled Trial. **Pharmacopsychiatry**, [S.I.], v. 45, n. 2, p. 41-46, 2012. Disponível em: <<https://www.thieme-connect.com/DOI/DOI?10.1055/s-0031-1291217>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

JAIN, K. K. Nanobiotechnology-Based Drug Delivery to the Central Nervous System. **Neurodegenerative Disorders**, [S.I.], v. 4, p.287–291, 2007. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/Abstract/101884>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

KAUR, I. P.; SINGH, H. Nanostructured drug delivery for better management of tuberculosis. **Journal of Controlled Release**, [S.I.], v.184, p. 36-50, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365914002132?via%3Dihub>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

KECK, C. M. Cyclosporine nanosuspensions: Optimised size characterisation & oral formulations. Tese - Departamento de Biologia, Química e Farmácia, Freie Universität Berlin, Berlin. p. 321, 2006.

KOZAK, A; SADOWSKI, Z. Effect of Pluronic and surfactant adsorption onto dolomite suspension zeta potential and stability. In: **Annales- Universitatis Mariae Curie-skłodowska**, Lublin – Polonia, v. 70, n. 1, 2015. Disponível em: <<https://journals.umcs.pl/aa/article/view/2461>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

KREUTER, J. Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: What do we know? **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.I.], v. 71, p. 2-14, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X13001919?via%3Dihub>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

KRISHNAMURTHY, N.; MATHEW, A. G.; NAMBUDIRI, E. S.; SHIVASHANKAR, S.; LEWIS Y. S.; NATARAJAN C. P. Oil and Oleoresin of Turmeric, **Tropical Science**, [S.I.], v. 18, n. 1, p. 37-45, 1976. Disponível em: <<http://ir.cftri.com/7078/>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

KROL, S.; MACREZ, R.; DOCAGNE, F.; DEFER, G.; LAURENT, S.; RAHMAN, M.; HAJIPOUR, M. J.; KEHOE, P. G.; MAHMOUDI, M. Therapeutic Benefits from Nanoparticles: The Potential Significance of Nanoscience in Diseases with Compromise to the Blood Brain Barrier. **Chemical Reviews**, [S.I.], v. 113, p. 1877-1903, 2013. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/cr200472g>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

KUMAR, A.; SAWANT, K. Encapsulation of exemestane in polycaprolactone nanoparticles: Optimization, characterization, and release kinetics, **Cancer Nanotechnol**, [S.I.], v. 4, n. 4-5, p. 57–71, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4451633/>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, [S.I.], v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776509004111?via%3Dihub>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

KUNDU, S.; NITHIYANANTHAM, U. In-situ formation of Curcumin Stabilized Shape selective Ag Nanostructures in aqueous Solution and their pronounced SERS Activit. **RSC Advances**, [S.I.], v. 3, p. 25278-25290, 2013. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/ra/c3ra44471f/unauth#!divAbstract>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

LABET, M.; THIELEMANS, W. Synthesis of polycaprolactone: a review. **Chemical Society Reviews**, [S.I.], v. 38, p. 3484–3504, 2009. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2009/CS/b820162p#!divAbstract>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

LEE, J.S.; HWANG, S.J.; LEE, D.S. Formation of Poly (ethylene glycol)- Poly(ϵ -caprolactone) Nanoparticles via Nanoprecipitation, **Macromolecular Research**, [S.I.], v. 17, p. 72-78, 2009. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF03218657>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

- LEPELTIER, E.; BOURGAUX, C.; COUVREUR, P. Nanoprecipitation and the “Ouzo effect”: Application to drug delivery devices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.l.], v. 71, p. 86-97, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X13002950>>. Acesso em: 05 jun. 2018.
- LEUNG, M.H.M.; HARADA, T.; DAI, S.; KEE, T.W. Nanoprecipitation and Spectroscopic Characterization of Curcumin-Encapsulated Polyester Nanoparticles, **Langmuir**, [S.l.], v. 31, n. 42, p. 11419–11427, 2015. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.langmuir.5b02773>>. Acesso em: 05 jun. 2018.
- LIAU, C. P.; AHMAD, M. B.; SHAMELI, K.; YUNUS, W. Z. W. IBRAHIM, N. A.; ZAINUDDIN, N.; THEN, Y. Y. Preparation and Characterization of Polyhydroxybutyrate/Polycaprolactone Nanocomposites. **The Scientific World Journal**, [S.l.], 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/572726>. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/572726/abs/>>. Acesso em: 05 jun. 2018.
- LIECHTY, W. B.; KRYSCIO, D. R.; SLAUGHTER, B. V.; PEPPAS, N. A. Polymers for Drug Delivery Systems. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, [S.l.], v. 1, p. 149-173, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3438887/>>. Acesso em: 05 jun. 2018.
- LIU, Z.; LI, Z.; LIU, L.; TANG, W.; WANG, Y.; DONG, M.; XIAO, C. Curcumin Attenuates Beta-Amyloid-Induced Neuroinflammation via Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Function in a Rat Model of Alzheimer's Disease. **Frontiers in Pharmacology**, [S.l.], v. 7, p. 261, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4990744/>>. Acesso em: 05 jun. 2018.
- MA, Y.; ZHENG, Y.; ZENG, X.; JIANG, L.; CHEN, H.; LIU, R.; HUANG, L.; MEI, L. Novel docetaxel-loaded nanoparticles based on PCL-Tween 80 copolymer for cancer treatment. **International Journal of Nanomedicine**, [S.l.], v. 6, p. 2679-2688, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3218581/>>. Acesso em: 05 jun. 2018.
- MAIESE, K. “Connecting the Dots” from Blood Brain Barrier Dysfunction to Neuroinflammation and Alzheimer’s Disease. **Current Neurovascular Research**, [S.l.], v. 11, n. 3, p. 187-189, 2014. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/122659/article>>. Acesso em: 05 jun. 2018.
- MAINARDES, R. M.; GREMIÃO, M. P. D.; EVANGELISTA, R. C. Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [S.l.], v. 42, n. 4, p. 523-530, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322006000400007>. Acesso em: 05 jun. 2018.

MAITI, P.; HALL, T. C.; PALADUGU, L.; KOLLI, N.; LEARMAN, C.; ROSSIGNOL, J.; DUNBAR, G. L. A comparative study of dietary curcumin, nanocurcumin, and other classical amyloid-binding dyes for labeling and imaging of amyloid plaques in brain tissue of 5x-familial Alzheimer's disease mice. **Histochemistry and Cell Biology**, [S.l.], v. 146, n. 5, p. 609–625, 2016. Disponível em:

<<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00418-016-1464-1>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

MALI, A. D.; BATHE, R. S. A Review on Sustained Release Drug Delivery System. **GCC Journal of Science and Technology**, [S.l.], v. 4, p. 107-123, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24384372>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

MANJILI, H. K.; SHARAFI, A.; DANAFAR, B. H.; HOSSEINI, M.; RAMAZANIC, F. A.; GHASEMIE, M. H. Poly(caprolactone)- poly(ethylene glycol)-poly(caprolactone) (PCL–PEG–PCL) nanoparticles: a valuable and efficient system for in vitro and in vivo delivery of curcumin. **RSC Advances**, [S.l.], v. 6, p. 14403–14415, 2016.

Disponível em:

<<http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/ra/c5ra24942b#!divAbstract>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

MASTERS, C. L.; SELKOE, D. J. Biochemistry of Amyloid β -Protein and Amyloid Deposits in Alzheimer Disease. **Cold Spring Harb Perspect Med**, [S.l.], v. 2, n. 6, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3367542/>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

MCCARNEY, R.; FISHER, P.; ILIFFE, S.; HASELEN, R.; GRIFFIN, M.; MEULEN, J.; WARNER, J. Ginkgo biloba for mild to moderate dementia in a community setting: a pragmatic, randomised, parallel-group, double-blind, placebo-controlled trial. **International Journal Of Geriatric Psychiatry**, [S.l.], v. 23, p. 1222–1230, 2008.

Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18537221>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

MCGEER, P. L.; ROGERS, J.; MCGEER, E. G. Inflammation, Antiinflammatory Agents, and Alzheimer's Disease: The Last 22 Years. **Journal of Alzheimer's Disease**, [S.l.], v. 54, n.3, p. 853–857, 2016. Disponível em:

<<https://content.iospress.com/articles/journal-of-alzheimers-disease/jad160488>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

MERISKO-LIVERSIDGE, E. M.; LIVERSIDGE, G. G. Drug Nanoparticles: Formulating Poorly Water-Soluble Compounds. **Toxicology Pathology**, [S.l.], v. 36, p. 43-48, 2008. Disponível em:

<http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0192623307310946?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&>. Acesso em: 05 jun. 2018.

MOHAN, P.R.K.; SREELAKSHMI, G.; MURALEEDHARAN, C.V.; JOSEPH, MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, [S.l.], v. 5, n.1, p. 561-573, 2006. Disponível em:

<<https://www.ajol.info/index.php/tjpr/article/view/14634/2739>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

MOHANTY, C.; ACHARYA, S.; MOHANTY, A. K.; DILNAWAZ, F.; SAHOO, S. K. Curcumin-encapsulated MePEG/PCL diblock copolymeric micelles: a novel controlled delivery vehicle for cancer therapy. **Nanomedicine**, [S.l.], v. 5, n. 3, p. 433–449, 2010. Disponível em:

<https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/nnm.10.9?rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&journalCode=nnm>. Acesso em: 05 jun. 2018.

MONDAL, D.; GRIFFITH, M.; VENKATRAMAN, S. S. Polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery: Current scenario and challenges. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, [S.l.], v. 65, n. 5, p. 255-265, 2016. Disponível em:

<<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00914037.2015.1103241?journalCode=gpom20>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

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

<https://www.researchgate.net/publication/12132630_Obtaining_methods_and_formation_mechanisms_of_polymeric_nanoparticles>. Acesso em: 05 jun. 2018.

MONTEIRO, M. S.S.B.; CHÁVEZ, F. V.; SEBASTIÃO, P. J.; TAVARES, M. I. B. T. ¹H NMR relaxometry and X-ray study of PCL/nevirapine hybrids. **Polymer Testing**, [S.l.], v. 32, n. 3, p. 553-566, 2013. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142941813000329>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 385, p. 113-142, 2010. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517309007273?via%3Dihub>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

NAKSURIYA, O.; OKONOGI, S.; SCHIFFELERS R.M.; HENNINK W.E. Curcumin nanoformulations: a review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment. **Biomaterials**, [S.l.], v. 35, n. 10, p. 3365-83, 2014. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014296121301586X?via%3Dihub>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

NASCIMENTO, C.B.; MOURA, C.J.M.; CRUVINEL, F.W.O.; DE PAULA, Y.O. Extração Com Solventes e Quantificação Dos Curcuminoides a Partir do Pó de Rizomas Do Açafrão (Curcuma Longa L.) De Mara Rosa, **SBPC Annual Meeting**, 58 (2006) Florianópolis, SC. Disponível em:

<http://www.sbpnet.org.br/livro/58ra/JNIC/RESUMOS/resumo_506.html>. Acesso em: 05 jun. 2018.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**, [S.l.], v. 70, n. 3, 2007. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np068054v>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

NICOLAS, J.; MURA, S.; BRAMBILLA, D.; MACKIEWICZ, N.; COUVREUR, P. Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery. **Chemical Society reviews**, [S.l.], v. 42, p. 1147-1235, 2013. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2013/CS/C2CS35265F#!divAbstract>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

NITRINI, R.; CAMELLI, P.; BOTTINO, C. M.; DAMASCENO, B. P.; BRUCKI, S. M.; ANGHINAH, R. DIAGNÓSTICO DE DOENÇA DE ALZHEIMER NO BRASIL. AVALIAÇÃO COGNITIVA E FUNCIONAL - Recomendações do Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia. **Arq Neuropsiquiatr**, [S.l.], v. 63, n. 3a, p.720-727, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0004-282X2005000400034&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 05 jun. 2018.

ONO, K.; HASEGAWA, K.; NAIKI, H.; YAMADA, M. Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. **Journal of Neuroscience Research**, [S.l.], v. 75, n. 6, p. 742-750, 2004. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jnr.20025>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

PANDITA, D.; AHUJA, A.; LATHER, V.; BENJAMIN, B.; DUTTA, T.; VELPANDIAN, T.; KHAR, R. K. Development of Lipid-Based Nanoparticles for Enhancing the Oral Bioavailability of Paclitaxel. **American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech**, [S.l.], v. 12, n. 2, p. 712-722, 2011. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1208%2Fs12249-011-9636-8>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

PANYAM, J.; LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.l.], v. 55, p. 329-347, 2003. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X02002284?via%3Dihub>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

PARRA, A.; MALLANDRICH, M.; CLARES, B.; EGEA, M. A.; ESPINA, M.; GARCÍA, M. L.; CALPENA, A. C. Design and elaboration of freeze-dried PLGA nanoparticles for the transcorneal permeation of carprofen: Ocular anti-inflammatory applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S.l.], v. 136, p. 935-943, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776515302575?via%3Dihub>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S. K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, [S.l.], v. 8, n. 2, p. 147-166, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1549963411001882?via%3Dihub>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

PATEL, T.; ZHOU, J.; PIEPMEIER, J. M., SALTZMAN, W. M. Polymeric nanoparticles for drug delivery to the central nervous system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.l.], v. 64, n. 7, p. 701-705, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3323692/>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

PEÑA, J. A.; GUTIÉRREZ, S. J.; VILLAMIL, J. C.; AGUDELO, N. A.; PÉREZ, L. D. Policaprolactone/polyvinylpyrrolidone/siloxane hybrid materials: Synthesis and in vitro delivery of diclofenac and biocompatibility with periodontal ligament fibroblasts. **Materials Science and Engineering C**, [S.l.], v. 58, p. 60-69, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493115302629?via%3Dihub>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

PÉRET-ALMEIDA, L.; NAGHETINI, C.; NUNAN, E.; JUNQUEIRA, R.; GLÓRIA, M. Atividade antimicrobiana in vitro do rizoma em pó, dos pigmentos curcuminóides e dos óleos e dos essenciais da *Curcuma longa* L. **Ciência e Agrotecnologia**, [S.l.], v.32, n. 3, p. 875-881, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-70542008000300026&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 05 jun. 2018.

PERSENAIRE, O.; ALEXANDRE, M.; DEGÉE, P.; DUBOIS, P. Mechanisms and Kinetics of Thermal Degradation of Poly(ϵ -caprolactone). **Biomacromolecules**, [S.l.], 2001, 2, n. 1, pp 288–294. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm0056310>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

PITTO-BARRY, A.; BARRY, N. P. E. Pluronic® block-copolymers in medicine: from chemical and biological versatility to rationalisation and clinical advances. **Polymer Chemistry**, [S.l.], v. 5, n. 10, p. 3291-3297, 2014. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/py/c4py00039k#!divAbstract>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

POLLETO, F.S.; BECK, R.C.R.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Polymeric Nanocapsules: Concepts and Applications. **Nanocosmetics and Nanomedicines**, [S.l.], p. 49-68, 2011. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-19792-5_3>. Acesso em: 05 jun. 2018.

POTTER, P. E. Curcumin: a natural substance with potential efficacy in Alzheimer's disease. **Journal of Experimental Pharmacology**, [S.l.], v. 5, p. 23–31, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4863538/>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

PRASAD, S.; GUPTA, S. C.; TYAGI, A. K.; AGGARWAL, B. B. Curcumin, a component of golden spice: From bedside to bench and back. **Biotechnology Advances**, [S.l.], v. 32, n. 6, p. 1053-1064, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975014000512?via%3Dihub>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, [S.l.], v. 36, n. 7, p. 887–913, 2011. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670011000232>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

REDDY, P.; MANCZAK, M.; YIN, X.; GRADY, M. C.; MITCHELL, A.; KANDIMALLA, R.; KURUVA, C. S. Protective effects of a natural product, curcumin, against amyloid β induced mitochondrial and synaptic toxicities in Alzheimer's disease. **Journal of Investigative Medicine**, [S.l.], v. 64, n. 8, p.1220–1234, 2016. Disponível em:

<<https://jim.bmj.com/content/64/8/1220.long>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

RODRÍGUEZ, E.T.; GONZÁLEZ, Z.G.; ESPINOSA, R.H.; CEDEÑO, C.Q.A.; VOGEL, C.; SAAVEDRA, M.A. Use of ultrasound in the extraction of curcumin from its natural source. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, [S.l.], v. 19, n. 1, p. 14-20, 2014. Disponível em:

<<http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenl.cgi?IDARTICULO=49941>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

ROHMAN, A.; SUDJADI; DEVI; RAMADHANI, D.; NUGROHO, A. Analysis of Curcumin in Curcuma longa and Curcuma xanthorrhiza Using FTIR Spectroscopy and Chemometrics. **Research Journal of Medicinal Plant**, [S.l.], v. 9, n. 4, p. 179-186, 2015. Disponível em: <<https://scialert.net/abstract/?doi=rjmp.2015.179.186>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

SALMASO, S.; CALICETI, P. Stealth Properties to Improve Therapeutic Efficacy of Drug Nanocarriers. **Journal of Drug Delivery**, [S.l.], v. 20, p. 1-19, 2013. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/jdd/2013/374252/>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

SARAIVA, C.; PRAÇA, C.; FERREIRA, R.; SANTOS, T.; FERREIRA, L.; BERNARDINO, L. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood–brain barrier to treat neurodegenerative diseases. **Journal of Controlled Release**, [S.l.], v. 235, p. 34–47, 2016. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365916303236?via%3Dihub>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

SARI, T. P.; MANN, B.; KUMAR, R.; SINGH, R. R. B.; SHARMA, R.; BHARDWAJ, M.; ATHIRA, S. Preparation and characterization of nanoemulsion encapsulating curcumin. **Food Hydrocolloids**, [S.l.], v. 43, p. 540-546, 2015. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X14002549>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

SHAH, T. J.; AMIN, A. F.; PARIKH, J. R.; PARIKH, R. H. Process Optimization and Characterization of Poloxamer Solid Dispersions of a Poorly Water-soluble Drug. **American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech**, [S.l.], v. 8, n. 2, p. E18-E24, 2007. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2750369/>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

SHAIK, M. R.; KORSAPATI, M.; PANATI, D. Polymers in Controlled Drug Delivery Systems. **International Journal of Pharma Sciences**, [S.l.], v. 2, n.4, p. 112-116, 2012. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/f0e5/ff7364ff27550f0529d06afe13cf82fecd0e.pdf>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

SHAIKH, J.; ANKOLA D.D.; BENIWAL, V.; SINGH, D.; KUMAR M.N. Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 37, n. 3-4, p. 223–230, 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098709000621?via%3Dihub>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

SHUBHRA, Q. T. H.; TÓTH, J.; GYENIS, J.; FECZKÓ, T. Poloxamers for Surface Modification of Hydrophobic Drug Carriers and Their Effects on Drug Delivery. **Polymer Reviews**, [S.l.], v. 54, n. 1, p. 112-138, 2014. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15583724.2013.862544?journalCode=lmsc20>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

SILVA FILHO, C.; SOUZA, A.; CONCEIÇÃO, M.; SILVA, T. G.; SILVA, T. M. S.; RIBEIRO, A. Avaliação da bioatividade dos extratos de cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [S.l.], v. 19, n. 4, p. 919-923, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2009000600022>. Acesso em: 05 jun. 2018.

SMALL, D. H.; CAPPAL, R. Alois Alzheimer and Alzheimer's disease: a centennial perspective. **Journal of Neurochemistry**, [S.l.], v. 99, n. 3, p. 708–710, 2006. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1471-4159.2006.04212.x>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

SOBCZYŃSKI, J.; KRISTENSENA, S.; BERGA, K. The influence of Pluronic nanovehicles on dark cytotoxicity, photocytotoxicity and localization of four model photosensitizers in cancer cells. **Photochemical & Photobiological Sciences**, [S.l.], v. 13, n. 8, 2014. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2014/PP/C3PP50181G#!divAbstract>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

STRÖHLE, A.; SCHMIDT, D. K.; SCHULTZ, F.; FRICKE, N.; STADEN, T.; HELLWEG, R.; PRILLER, J.; RAPP, M.; RIECKMANN, N. Drug and exercise treatment of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a systematic review and meta-analysis of effects on cognition in randomized controlled trials. **The American Journal of Geriatric Psychiatry**, [S.l.], v. 23, n. 12, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1064748115002134?via%3Dihub>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

SUN, M.; SU, X.; DING, B.; HE, X.; LIU, X.; YU, A.; LOU, H.; ZHAI, G. Advances in nanotechnology-based delivery systems for curcumin. **Nanomedicine**, [S.l.], v. 7, n. 7, 2012. Disponível em:
<https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/nnm.12.80?rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&journalCode=nnm>. Acesso em: 05 jun. 2018.

TAVARES, M. R.; MENEZES, L. R.; SABOYA, D. H.; TAVARES, M. I. B. Efeito da nanoprecipitação e da emulsão em matrizes poliméricas de policaprolactona para aplicações farmacêuticas (Pôster). In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS**, [S.l.], 13, Natal, RN, 2015.

TAVARES, M.R.; MENEZES, L.R.; DUTRA FILHO, J.C.; CABRAL, L.M.; TAVARES, M.I.B. Surface-coated polycaprolactone nanoparticles with pharmaceutical application: Structural and molecular mobility evaluation by TD-NMR. **Polymer Testing**, [S.l.], v. 60, p. 39-48, 2017. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142941817300314>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

THORAT, A. A.; DALVI, S. V. Liquid antisolvent precipitation and stabilization of nanoparticles of poorly water soluble drugs in aqueous suspensions: Recent developments and future perspective. **Chemical Engineering Journal**, [S.l.], v. 181-182, p. 1-34, 2012. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894711015944>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

TSAI, Y.; CHANG-LIAO, W.; CHIEN, C.; LIN, L.; TSAI, T. Effects of polymer molecular weight on relative oral bioavailability of curcumin. **International Journal of Nanomedicine**, [S.l.], v. 7, p. 2957–2966, 2012. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3384366/>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

TSHWEU, L.; KATATA, L.; KALOMBO, L.; SWAI, H. Nanoencapsulation of water-soluble drug, lamivudine, using a double emulsion spray-drying technique for improving HIV treatment. **Journal of Nanoparticle Research**, [S.l.], v. 15, 2013. DOI: 10.1007/s11051-013-2040-4. Disponível em:
<<https://link.springer.com/article/10.1007/s11051-013-2040-4>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

ULERY, B. D.; NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biomedical Applications of Biodegradable Polymers. **Journal of Polymer Science**, [S.l.], Part B: Polymer Physics, v. 49, n. 12, p. 832-864, 2011. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3136871/?report=reader>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

VERMA, S.; KUMAR, S.; GOKHALE, R.; BURGESS, D. J. Physical stability of nanosuspensions: Investigation of the role of stabilizers on Ostwald ripening. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 406, n. 1-2, p. 145-152, 2011. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517310009683?via%3Dihub>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

VILANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, [S.l.], v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-14282010000100012&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 05 jun. 2018.

WANG, T.; WU, Y.; ZENG, A. J. Synthesis and Characterization of Amphiphilic Pluronic (F68)-1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine Copolymers and Their Micelles as a Drug Carrier. **Journal of Applied Polymer Science**, [S.l.], v. 117, n. 1, p. 604-613, 2010. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/app.31231>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

Wang, R; Hughes, T; Beck, S; Vakil, S; Li, S; Pantano, P; Draper, RK. Generation of toxic degradation products by sonication of Pluronic® dispersants: implications for nanotoxicity testing. **Nanotoxicology**, [S.l.], v. 7, p. 1272-1281. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3657567/>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

WANG, Z.; LIU, J.; LI, H.; YANG, H. Pharmacological Effects of Active Components of Chinese Herbal Medicine in the Treatment of Alzheimer's Disease: A Review. **The American Journal of Chinese Medicine**, [S.l.], v. 44, n. 8, p. 1525-1541, 2016.

Disponível em:

<https://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/S0192415X16500853?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&>. Acesso em: 05 jun. 2018.

WATKINS, R.; WU, L.; ZHANG, C.; DAVIS R. M.; XU, B. Natural product-based nanomedicine: recent advances and issues. **International Journal of Nanomedicine**, [S.l.], v. 10, p. 6055–6074, 2015. Disponível em:

<<https://www.dovepress.com/natural-product-based-nanomedicine-recent-advances-and-issues-peer-reviewed-fulltext-article-IJN#>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

WILLIAMS, D. **The Williams Dictionary of Biomaterials**. Liverpool University Press, Liverpool, 1999. DOI: 10.5949/UPO9781846314438 Disponível em:

<<https://www.cambridge.org/core/books/williams-dictionary-of-biomaterials/FFBBD9AB24857D1325171AB9E3F4827E>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

WOHLFART, S.; GELPERINA, S.; KREUTER, J. Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, [S.l.], v. 161, n. 2, p. 264-273, 2012. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365911005852?via%3Dihub>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

WONG, H. L.; WU, X. Y.; BENDAYAN, R. Nanotechnological advances for the delivery of CNS therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.l.], v. 64, n. 7, p. 686-700, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X11002766?via%3Dihub>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

XIE, Y.; LI, G.; YUAN, X.; CAI, Z.; RONG, R. Preparation and In Vitro Evaluation of Solid Dispersions of Total Flavones of Hippophae rhamnoides L. **American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech**, [S.l.], v. 10, n. 2, p. 631-640, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2690809/>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

XIONG, W.; PENG, L.; CHEN, H.; LI, Q. Surface modification of MPEG-b-PCL-based nanoparticles via oxidative self-polymerization of dopamine for malignant melanoma therapy. **International Journal of Nanomedicine**, [S.l.], v. 10, p. 2985–2996, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4406261/>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

XIONG, X.Y.; TAM, K.C.; GAN, L.H. Hydrolytic Degradation of Pluronic F127/Poly(lactic acid) Block Copolymer Nanoparticles. **Macromolecules**, [S.l.], v. 37, n.9, p. 3425–3430, 2004. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/ma049662p>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

YANG, F.; LIM, G. P.; BEGUM, A. N.; UBEDA, O. J.; SIMMONS, M. R.; AMBEGAOKAR, S. S.; CHEN, P. P.; KAYED, R.; GLABE, C. G.; FRAUTSCHY, S. A.; COLE, G. M. Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, [S.l.], v. 280, p. 5892–5901, 2005. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/280/7/5892.long>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

ZHANG, H.; LIU, G.; ZENG, X.; WU, Y.; YANG, C.; MEI, L.; WANG, Z.; HUANG, L. Fabrication of genistein-loaded biodegradable TPGS-*b*-PCL nanoparticles for improved therapeutic effects in cervical cancer cells. **International Journal of Nanomedicine**, [S.l.], v. 10, p. 2461-2473, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4383221/>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

ZHAO, L. N.; CHIU, S. W.; BENOIT, J.; CHEW, L. Y.; MU, Y. The effect of curcumin on the stability of Abeta dimers. **Journal of Physical Chemistry**, [S.l.], v. 116, n. 25, p. 7428-7435, 2012. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jp3034209>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

ZHONG, Y.; LEUNG, V.; WAN, L. Y.; DUTZ, S.; KO, F. K.; HAFELI, U. O. Electrospun magnetic nanofibre mats – A new bondable biomaterial using remotely activated magnetic heating. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, [S.l.], v. 380, p. 330-334, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304885314008919>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

ZLOTOGORSKI, A.; DAYAN, A.; DAYAN, D.; CHAUSHU, G.; SALO, T.; VERED, M. Nutraceuticals as new treatment approaches for oral cancer – I: Curcumin. **Oral Oncology**, [S.l.], v. 49, n. 3, p. 187-191, 2013. Disponível em: <[https://www.oraloncology.com/article/S1368-8375\(12\)00318-1/fulltext](https://www.oraloncology.com/article/S1368-8375(12)00318-1/fulltext)>. Acesso em: 05 jun. 2018.

APÊNDICE A – TRABALHOS APRESENTADOS EM SEMINÁRIOS E CONGRESSOS

ROCHA, L.V.M.; MERAT, L.C.; MENEZES, L.R.; FINOTELLI, P.V.; TAVARES, M.I.B.. Chemical Characterization of Curcuminoids' Nanoparticles. In: 8th International Symposium on Natural Polymers and Composites (ISNaPol), 2018, São Pedro, SP. Pôster.

ROCHA, L.V.M.; MERAT, L.C.; MENEZES, L.R.; FINOTELLI, P.V.; TAVARES, M.I.B.. Synthesis and Characterization of Polycaprolactone Nanoparticles Containing Curcuminoids Extracted from Turmeric: a Promise in the Treatment of Alzheimer's Disease. In: XVI Brazilian MRS meeting (SBPMat), 2017, Gramado, RS. Oral.

ROCHA, L.V.M.; MERAT, L.C.; TIBURCIO, B.V.; MENEZES, L.R.; TAVARES, M.I.B.; FINOTELLI, P.V. Estudo do Tamanho de Nanossistemas Baseados em Policaprolactona para Melhor Aproveitamento das Propriedades dos Óleos de Mamona e Laranja. In: 14^o Congresso Brasileiro de Polímeros (CBPol), 2017, Águas de Lindóia, SP. Pôster.

MERAT, L.C.; CARVALHO, T.C.; GAMA, J. P.; ROCHA, L.V.M.; MENEZES, L. R.; TAVARES, M.I.B.; FINOTELLI, P.V.. Observação dos Efeitos de Diferentes Óleos Essenciais sobre a Deposição Interfacial de Nanopartículas Poliméricas. In: 9^o Encontro Técnico de Materiais e Química (ETMQ), 2017, Rio de Janeiro, RJ. Pôster.