

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARIANA DE ALMEIDA

**OBTENÇÃO DE CURCUMINA ENCAPSULADA EM NANOPARTÍCULAS DE  
POLI(VINIL PIRROLIDONA) E AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO**

Maringá  
2017

MARIANA DE ALMEIDA

**OBTENÇÃO DE CURCUMINA ENCAPSULADA EM NANOPARTÍCULAS DE  
POLI(VINIL PIRROLIDONA) E AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Orientadora: Ciomar Aparecida Bersani Amado  
Coorientador: Odinei Hess Gonçalves

Maringá  
2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

Almeida, Mariana de

A446o      Obtenção de curcumina encapsulada em nanopartículas de poli (vinil pirrolidona) e avaliação do efeito anti-inflamatório / Mariana de Almeida. -- Maringá, 2017.  
39 f.: Il.; color.; Tabs.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ciomar Aparecida Bersani Amado.

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Odinei Hess Gonçalves.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas.

1. Biotecnologia - Nanopartícula.  
2. Farmacologia - Inflamação aguda. I. Bersani-Amado, Ciomar Aparecida, orient. II. Gonçalves, Odinei Hess, co-orient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

21.ed. 6153239

Cicilia Conceição de Maria  
CRB9- 1066  
CC-003876

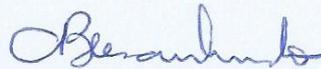
MARIANA DE ALMEIDA

**OBTENÇÃO DE CURCUMINA ENCAPSULADA EM NANOPARTÍCULAS DE  
POLI(VINIL PIRROLIDONA) E AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO**

Dissertação apresentada à Universidade  
Estadual de Maringá, como requisito  
parcial para a obtenção do título de mestre.

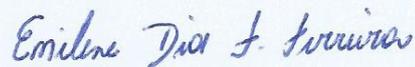
Aprovado em: 22/02/2017

**BANCA EXAMINADORA**



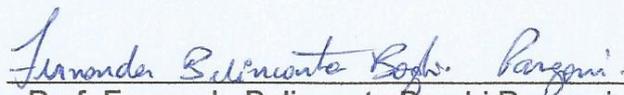
---

Prof. Ciomar Aparecida Bersani Amado  
Universidade Estadual de Maringá



---

Prof. Emilene Dias Fiuza Ferreira  
Universidade Paranaense



---

Prof. Fernanda Belincanta Borghi Parigoni  
Universidade Estadual de Maringá

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse, ao longo de minha vida não somente enquanto pós-graduanda. Ele é quem me fortaleceu quando muitos tentaram me enfraquecer, mostrando o caminho certo para eu dar continuidade.

À professora Dr<sup>a</sup> Ciomar Aparecida Bersani-Amado agradeço pela oportunidade a mim oferecida, pela paciência, sabedoria e dedicação, encaminhando-me pelo melhor caminho para obtenção deste trabalho. Pela compreensão e incentivo em momentos de dificuldades.

Ao professor Dr<sup>o</sup>. Odinei Hess Gonçalves, pela oportunidade de aprender e conhecer o novo, pela amizade, apoio, paciência e sabedoria ofertadas durante a realização deste trabalho.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Campo Mourão, em especial ao Departamento de Engenharia de Alimentos pela oportunidade do desenvolvimento das nanopartículas, juntamente com a professora Dr<sup>a</sup>. Fernanda Vitória Leimann pelo conhecimento ofertado e, ao aluno de iniciação científica Cristhian Rafael Lopes Francisco pela atenção, companheirismo e amizade na realização dos experimentos.

Aos técnicos Jailson Araújo Dantas e Célia Regina Miranda pela importante colaboração e pela amizade construída ao longo desse período.

À Universidade Federal de Santa Catarina, em especial ao Laboratório de Controle de Processos (LCP), pelos recursos disponibilizados para determinação dos tamanhos das partículas.

Aos amigos de laboratório pelo companheirismo, apoio e incentivo constante no dia-a-dia dentro e fora do laboratório.

Aos meus pais, Sebastião e Rozeli, e minhas irmãs Miriam e Marta, por não me deixarem desanimar, sempre me ofertando carinho e amor. Sem eles eu não poderia chegar onde estou.

E a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste sonho, meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

*Curcuma longa* L., conhecida como açafrão, vem sendo utilizada popularmente no tratamento de doenças. Particularmente, a atividade anti-inflamatória desta planta se deve a um grupo de pigmentos denominados curcuminóides o qual é composto pela curcumina, dimetoxicurcumina, bis-dimetoxicurcumina e a ciclocurcumina. A curcumina (Cur), o principal componente deste grupo, é utilizada na medicina tradicional por sua propriedade anti-inflamatória, antioxidante e anti-ulcerogênica. No entanto, possui baixa solubilidade em água e biodisponibilidade prejudicada em decorrência de má absorção, rápida metabolização hepática e intestinal e rápida eliminação sistêmica, justificando o desenvolvimento de novas formulações viabilizando sua utilização terapêutica. O objetivo deste trabalho foi a obtenção e caracterização de nanopartículas de poli(vinil pirrolidona) contendo curcumina (CurNano), e a avaliação da atividade anti-inflamatória desta formulação na resposta inflamatória aguda. Para isto, as nanopartículas PVP-curcumina obtidas por meio da técnica de complexação foram caracterizadas em relação à distribuição de tamanho das partículas, solubilidade em água e interação PVP-curcumina. Para a avaliação da atividade anti-inflamatória foram utilizados os modelos experimentais de edema de pata induzido por carragenina, determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) e da microcirculação *in situ*. O tratamento dos ratos foi realizado por via oral em dose única com Cur e CurNano, nas doses de 50, 200 e 400 mg/Kg e 12,5, 25 e 50 mg/Kg, respectivamente. As análises de caracterização mostraram que foram obtidas nanopartículas de poli(vinil pirrolidona) contendo curcumina de tamanhos manométricos, com formação de pontes de hidrogênio entre os dois compostos, o que resultou no aumento da solubilidade da curcumina em água. Também, foi observado que o processo de obtenção não alterou as propriedades biológicas da curcumina, uma vez que a atividade anti-inflamatória da CurNano foi a mesma quando comparada a da Cur. Uma vantagem deste processo foi que a CuNano em dose oito vezes menor causou efeito inibitório similar à Cur sobre o processo inflamatório.

**Palavras-chave:** Curcumina 1. Nanopartículas 2. Inflamação 3. Complexação 4.

## ABSTRACT

*Curcuma longa* L., known as saffron, has been popularly used in the treatment of diseases. Particularly, the anti-inflammatory activity of this plant is due to a group of pigments called curcuminoids which is composed of curcumin, dimethoxycurcumin, bis-dimethoxycurcumin and cyclocurcumin. Curcumin (Cur), the main component of this group, is used in traditional medicine for its anti-inflammatory, antioxidant and anti-ulcerogenic properties. However, it has low solubility in water and impaired bioavailability due to the low absorption, rapid hepatic and intestinal metabolization and rapid systemic elimination, justifying the development of new formulations, making possible its therapeutic use. The objective of this work was to obtain and characterize nanoparticles of poly (vinyl pyrrolidone containing curcumin (CurNano), and the evaluation of the anti-inflammatory activity of this formulation in the acute inflammatory response. For this, PVP-curcumin nanoparticles obtained by complexing technique were characterized for particle size distribution, solubility in water and PVP-curcumin interaction. The experimental models of carrageenan-induced paw edema, determination of myeloperoxidase activity (MPO) and microcirculation *in situ* were used to evaluate the anti-inflammatory activity. The treatment of rats was performed orally in a single dose with Cur and CurNano at the doses of 50, 200 and 400 mg / kg and 12.5, 25 and 50 mg / kg, respectively. The characterization analyzes showed that were obtained nanoparticles of poly (vinyl pyrrolidone) containing curcumin of nanometric sizes, with formation of hydrogen bonds between the two compounds, which resulted in increased solubility of curcumin in water. Also, it was observed that the preparation process did not alter the biological properties of curcumin, since the anti-inflammatory activity of CurNano was the same as that of cur. An advantage of this process was that CuNano at a dose eight times lower caused inhibitory effect similar to Cur on the inflammatory process.

**Keywords:** Curcumin 1. Nanoparticles 2. Inflammation 3. Complexation 4.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	- Estrutura química do PVP (a) e da curcumina (b).....	14
<b>Figura 2</b>	- Distribuição do tamanho da partícula após sonicação e durante evaporação do solvente.....	19
<b>Figura 3</b>	- Espectro d PVP e curcumina puros e solução em etanol de PVP:Cur na proporção mássica 10:1.....	21
<b>Figura 4</b>	- Fator de interação em relação a proporção de PVP:Cur.....	21
<b>Figura 5</b>	- Porcentagem de curcumina solúvel em função da proporção PVP:Cur.....	22
<b>Figura 6</b>	- Espectro de FTIR da nanopartículas PVP-Curcumina, curcumina puro e PVP puro.....	24
<b>Figura 7</b>	- Termograma de Calorimetria diferencial de varredura das nanopartículas PVP-Curcumina, da curcumina pura, do PVP puro e da mistura física entre PVP e a curcumina.....	24
<b>Figura 8</b>	- Difração de Raio-X de curcumina, mistura física entre PVP e curcumina e nanopartícula de curcumina.....	25
<b>Figura 9</b>	- Efeito da Cur e da CurNano sobre o desenvolvimento do edema de pata induzido por carragenina.....	28
<b>Figura 10</b>	- Efeito da Cur e da CurNano sobre a atividade da enzima mieloperoxidase no tecido plantar de ratos.....	30
<b>Figura 11</b>	- Leucócitos de <i>rolling</i> e adesão nos vasos da microcirculação da fáscia espermática de ratos.....	31

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Diâmetro médio e índice de polidispersão durante sonicação .....	19
<b>Tabela 2</b> – Entalpia de fusão e temperatura de fusão da curcumina pura, nanopartícula PVP-Cur e da mistura física entre PVP e curcumina na proporção 8:1 .....	25

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Cur	Curcumina <i>in natura</i>
PVP	Polivinilpirrolidone
CurNano	Nanopartícula de curcumina conjugada ao polivinilpirrolidona
IDP	Índice de polidispersão
FTIR	Espectroscopia no infravermelho
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
DRX	Difração de Raio-X
MPO	Mieloperoxidase
CG	Carragenina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
2.1	Síntese de nanopartículas PVP-Curcumina.....	14
2.2	Determinação de tamanho de partícula e índice de polidispersão.....	14
2.3	Avaliação das interações entre PVP e curcumina.....	15
2.4	Determinação da solubilidade em água.....	15
2.5	Avaliação de DSC, DRX e FTIR.....	16
2.6	Animais e tratamento.....	16
2.7	Indução de edema na pata dos ratos.....	17
2.8	Preparação do tecido plantar.....	17
2.9	Determinação da atividade da mieloperoxidase.....	18
2.10	Avaliação da migração de leucócitos in situ.....	18
2.11	Análise estatística.....	18
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>19</b>
3.1	Caracterização da curcumina nanoencapsulada.....	19
3.2	Interação PVP-curcumina.....	20
3.3	Solubilidade em água.....	22
3.4	FTIR, DSC e DRX.....	23
3.5	Efeito da Cur e da Cur Nano sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos.....	27
3.6	Efeito da Cur e da Cur Nano sobre a atividade da mieloperoxidase.....	29
3.7	Efeito da Cur e da Cur Nano sobre a migração de leucócitos in situ.....	31
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>33</b>
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>33</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>34</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta biológica de defesa do organismo à lesões teciduais, que envolve alterações vasculares e celulares, apresentando como sinais clínicos característicos vasodilatação, aumento de permeabilidade vascular e migração celular (Mesquita et al., 2008; Medzhitov e Horng, 2009).

Uma etapa importante da resposta inflamatória é o recrutamento de leucócitos, principalmente neutrófilos, para o sítio da lesão, uma vez que estes atuam como células de primeira linha de defesa do organismo, desde a fase inicial até a resolução do processo (Serhan et al., 2007; Favacho et al., 2011; Souto et al., 2011). Esta etapa representa um processo multifatorial com envolvimento de células endoteliais, moléculas de adesão e mediadores inflamatórios (Fattori, Amaral e Verri Jr, 2015). Tais mediadores podem iniciar e amplificar a resposta inflamatória ativando as células endoteliais e tornando-as susceptíveis à interação com leucócitos circulantes. Neste estágio os eventos sequenciais são: *rolling*, adesão, transmigração e recrutamento (Souto et al., 2011). Uma migração persistente e descontrolada de leucócitos pode danificar ainda mais o tecido pela liberação de enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Nathan, 2002).

As manifestações da resposta inflamatória são moduladas por diversos mediadores inflamatórios, tais como, citocinas, derivados do ácido araquidônico, óxido nítrico entre outros (Liu et al., 2013). Uma resposta inflamatória exacerbada e sem controle pode se tornar prejudicial ao hospedeiro, por isso a importância do uso de produtos e/ou fármacos que interferem na produção/liberação destes mediadores inflamatórios (Gris et al., 2010).

O uso de anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) e esteroidais (AIEs) tem se mostrado eficaz no tratamento de desordens inflamatórias, por inibir a síntese ou liberação de mediadores inflamatórios envolvidos no processo, sendo um dos fármacos mais utilizados clinicamente (Bogdan, 2001). No entanto, estes fármacos podem causar efeitos adversos, tais como desconforto gastrointestinal, inibição da agregação plaquetária e toxicidade renal (Batlouni, 2010). Assim, a busca de outros agentes, entre eles os produtos naturais, que apresentam efeitos terapêuticos favoráveis, porém com efeitos adversos menos intensos, vem ganhando atenção no

tratamento das doenças inflamatórias e necessitam ser investigados (Singh et al., 2011).

Neste contexto, a curcumina ou diferoluilmetano (Fig. 1a) tem sido amplamente estudada. Ela é um polifenol componente da *Curcuma longa* e conhecida popularmente como açafrão, uma planta nativa do sul e sudoeste da Ásia e membro da família Zingiberaceae (Sasikumar, 2005). A curcumina apresenta atividade biológica como a atividade antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória, antidiabética, antirreumática, cicatrizante, antiviral, anticancerígena e hepatoprotetora (Yen et al., 2010; Sun et al, 2012; Castillo et al, 2015; Facchi et al., 2016; Shah et al, 2016; Chen et al., 2016).

A atividade anti-inflamatória da curcumina pode ser atribuída à inibição da expressão da enzima ciclo-oxigenase 2 (COX<sub>2</sub>) (Goel et al., 2001), a liberação de algumas citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 (IL-1), interleucina-8 (IL-8), e da óxido nítrico sintase (NOS) (Singh et al., 2011; Rocha et al., 2014).

Apesar dos efeitos biológicos da curcumina serem promissores, ela apresenta baixa solubilidade em água. Estudos demonstram que quando administrada por via oral a biodisponibilidade da curcumina é baixa (Shao et al., 2011) em decorrência de má absorção, rápida metabolização hepática e intestinal, rápida eliminação sistêmica e ausência de atividade farmacológica de seus metabólitos (Zhongfa et al., 2012; Ahmed et al., 2015; Shao et al., 2011). Assim, várias estratégias têm sido utilizadas para melhorar a solubilidade e a biodisponibilidade da curcumina, tais como a utilização de adjuvantes como estabilizadores em nível químico, administração em forma de nanopartículas, encapsulação em lipossomas, associação com micelas e complexos de fosfolipídeos (Gressler et al., 2015) e complexação com polímeros hidrofílicos biocompatíveis, tais como dextrana, quitosana, o poli(álcool vinílico) e a poli(vinil pirrolidona) (PVP) (Manju e Sreenivasan, 2011).

O desenvolvimento de novos sistemas biotecnológicos de produção de fármacos, particularmente as nanopartículas poliméricas, tem sido relevante na área farmacêutica porque tais sistemas podem permitir alternativas terapêuticas modernas, farmacologicamente mais eficazes e com efeitos colaterais mais reduzidos (Oliveira et al., 2004). Dessa forma, a encapsulação da curcumina em

escala nanométrica pode ser empregada como tentativa de aumentar a sua solubilidade em água, sua dissolução, controle de sua liberação no organismo e aumentar sua biodisponibilidade (Castillo et al., 2015; Shah et al., 2016; Krausz et al., 2015; Facchi et al., 2016).

As nanopartículas constituem uma opção interessante para melhorar a biodisponibilidade da curcumina proporcionando maior penetração em membranas plasmáticas devido ao seu tamanho reduzido (Manju e Sreenivasan, 2010; Li et al. 2012). Desta maneira, os estudos que avaliam a atividade destas novas preparações contendo curcumina, no sentido de melhorar sua solubilidade e sua eficácia farmacológica, com perspectiva de uso em doenças inflamatórias são importantes e necessários (Bisht et al., 2007; Lertsutthiwong et al., 2008; Anand et al., 2007; Mathy-Hartert et al., 2009; Yallapu et al., 2010; YU et al., 2010).

Recentemente, alguns autores relatam que o tamanho de partícula, a química de superfície e a forma física podem influenciar o modo da interação das nanopartículas com as proteínas plasmáticas, a absorção pela membrana celular, a toxicidade e a resposta molecular (Huynh e Chen, 2011; Kavaras et al, 2007). Manju e Sreenivasan (2010) demonstram que a conjugação de compostos hidrofóbicos com polímeros pode promover aumento da meia-vida biológica de fármacos, evita à adsorção não específica de proteínas, e aumenta a eficácia terapêutica. Neste contexto, o PVP tem sido amplamente utilizado como um polímero sintético biocompatível nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentar (Torchilin et al., 2001).

O PVP é constituído essencialmente por grupo 1-vinil-2-pirrolidona linear, podendo ser encontrado em revestimentos e como aglutinante em muitas formas farmacêuticas, devido a sua alta solubilidade e ausência de toxicidade viabilizando sua utilização (Bhüler, 2005; Busselez et al.,2012). O PVP é solúvel em vários solventes orgânicos e também em água, devido à possibilidade de formação de ligações de hidrogênio entre o seu grupo carbonilo e os grupos hidroxilo dos solventes (Kavaras et al., 2006; Huang et al., 2011; Busselez,2012). Além disso, a sua estrutura química (Fig. 1b) permite a formação de complexos químicos com várias substâncias, incluindo aquelas farmacologicamente ativas (Bhüler, 2005).

O objetivo deste trabalho foi a obtenção e caracterização de nanopartículas de poli(vinil pirrolidona) contendo curcumina, e a avaliação da atividade anti-inflamatória desta formulação na resposta inflamatória aguda.

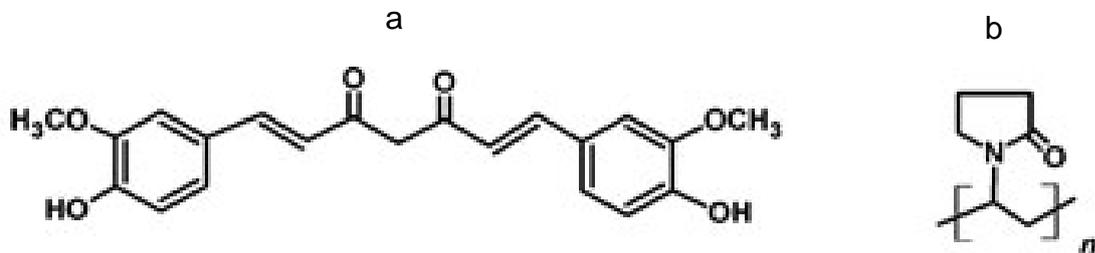


Figura 1. Estrutura química da curcumina (a) e do PVP (b)

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Síntese de nanopartículas PVP-Curcumina

Nanopartículas PVP-curcumina foram obtidas por meio da técnica de complexação descrita por Yen et al. (2010), com algumas modificações. Poli(vinil pirrolidona) (300 mg, Sigma-Aldrich, 99%) foi solubilizada em água destilada (75 mL) com auxílio de agitação magnética (300 rpm) durante 5 minutos. Separadamente, curcumina (50 mg, Sigma-Aldrich, 99,5%) foi solubilizada em álcool etílico (25 mL, Vetec, 99,5%). A fase orgânica foi vertida rapidamente no recipiente contendo a fase aquosa e então a mistura foi submetida a sonicação (Fisher Scientific, 120W, ponta de 1/8") por 3 minutos, com a configuração de 30 segundos de pulso e 10 segundos de pausa. Um banho de gelo foi utilizado para evitar aquecimento do recipiente. A dispersão obtida foi transferida para um balão de 500 mL e submetida à evaporação do etanol, sob vácuo, em evaporador rotativo (Buchi, Rotavapor R-3) para retirada do solvente. Após evaporação, a dispersão foi congelada, liofilizada e armazenada sob o abrigo da luz a 10°C.

### 2.2 Determinação do tamanho de partícula e Índice de Polidispersão

Durante a etapa de sonicação (processo de evaporação do solvente) foram retiradas alíquotas a cada minuto por 10 minutos, e a seguir a cada 10 minutos totalizando um período de 60 minutos (Kavaras et al, 2006). Todas as alíquotas

foram acondicionadas em eppendorfs até o momento da leitura. A distribuição dos diâmetros e o índice de polidispersão (IPD, Eq. 1) das partículas foram determinados por espalhamento dinâmico de luz (Malvern Instruments, Zetasizer Nano S) em triplicata.

$$\text{IPD}(-) = \frac{\text{DP}^2}{\text{Dz}^2} \quad \text{Equação 1}$$

Onde DP é desvio padrão da distribuição de tamanhos e Dz é o diâmetro médio das nanopartículas.

### 2.3 Avaliação das interações entre o PVP e a curcumina

A avaliação quantitativa da interação do polímero com a curcumina foi realizada através de sucessivas adições de pequenas quantidades de polímero a uma solução de curcumina em etanol de acordo com Karavas et al. (2006). Os espectros de ultravioleta-visível (OceanOptics, Red Tide USB 650 UV) foram obtidos utilizando cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Diferentes proporções mássicas de PVP e curcumina foram preparadas em triplicata e os espectros foram obtidos em 426 nm em duplicata. A intensidade da interação PVP-curcumina foi quantificada pelo fator de correlação normalizado F (Equação 2).

$$F = \frac{A - A_0}{A_0} \quad \text{Equação 2}$$

A e  $A_0$  correspondem às absorbâncias máximas (426 nm) das soluções PVP e curcumina e da solução de curcumina pura, respectivamente.

### 2.4 Determinação da solubilidade em água

Para uma massa constante de curcumina, foram adicionadas quantidades crescentes de PVP a fim de atingir as proporções mássicas de PVP:Cur 0:1, 2:1, 4:1, 6:1, 14:1, 16:1, 18:1 e 20:1 (m:m). Amostras de cada formulação correspondendo a 50 mg de curcumina foram adicionados a 5 mL de água destilada em tubos com tampa rosqueável e levados a um banho termostático a 25°C sob agitação e protegidos da luz. Após 48 horas, as amostras foram filtradas (0,45 µm),

congeladas e liofilizadas. Após liofilização, a amostra foi solubilizada em 2 mL de metanol e a absorbância foi determinada por espectroscopia UV-Vis (426 nm). A fração solúvel de curcumina foi considerada como aquela que estava presente no filtrado.

### **2.5 Avaliação por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), Difração de Raios-X (DRX) e Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)**

Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) foi empregada para avaliar o estado físico da curcumina após o procedimento de encapsulação (Perkin Elmer modelo 4000). As amostras liofilizadas (cerca de 3 mg) foram alocadas em porta-amostras de alumínio fechados e aquecidas de 20 a 390°C com taxa de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup> e fluxo de nitrogênio de 50 mL.min<sup>-1</sup>.

Os difratogramas de Raios-X da poli(vinil pirrolidona), curcumina, mistura física (PVP e curcumina misturados manualmente) e das nanopartículas PVP-curcumina foram obtidos utilizando um difratômetro de Raios-X (Shimadzu modelo LabX XRD-6000) e as amostras foram investigadas em ângulos 2θ de 2° a 60° a 6°·min<sup>-1</sup>.

Análises de Espectroscopia no Infravermelho por Transformação de Fourier (FTIR, Shimadzu) foram realizadas para identificar a existência de possíveis interações químicas entre os reagentes utilizados no processo de nanoencapsulação da curcumina. A análise foi realizada em triplicada para cada uma das amostras com resolução de 1 cm<sup>-1</sup>, intervalo de número de onda de 4000 a 600 cm<sup>-1</sup>, obtendo-se os valores de varredura médios e procedendo à normalização dos picos.

### **2.6 Animais e tratamento**

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar pesando de 200 a 220 g. Os animais foram mantidos sob temperatura controlada de 22°C num ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum* no biotério setorial do Departamento de Farmacologia e Terapêutica da Universidade Estadual de Maringá (DFT/UEM). O protocolo experimental foi aprovado pelo CEUA/UEM (parecer nº 5656300316).

O tratamento dos animais foi realizado com solução de curcumina *in natura*, nanopartículas de PVP-curcumina e indometacina (anti-inflamatório de referência), 1 h antes da indução da resposta inflamatória. As soluções foram administradas por via oral em dose única. Um grupo de animais (controle) recebeu, pela mesma via de administração, volume equivalente de água (veículo).

Os animais foram divididos em 8 grupos (n= 5-7): (I) controle (carragenina + veículo); (II) indometacina (carragenina + indometacina 5 mg/kg de peso corporal); (III, IV e V) curcumina (carragenina + curcumina *in natura* nas doses de 50, 200 e 400 mg/kg de peso corporal, respectivamente); (VI, VII e VIII) nano partículas de curcumina (carragenina + nano partículas de curcumina conjugada ao PVP nas doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg de peso corporal, respectivamente).

### **2.7 Indução do edema na pata de ratos**

Os animais receberam uma injeção intraplantar (via intradérmica) de 100 µL de solução de carragenina (200 µg/pata), dissolvida em salina 0,9%, na pata posterior esquerda, e o mesmo volume de salina na pata posterior direita. O volume de ambas as patas foi determinado por pletismografia, antes da indução do edema (inicial) e 1, 2 e 4 horas (final) após administração do agente flogístico ( Winter, Rislely e Nuss, 1962 ligeiramente modificada).

O aumento do volume da pata (edema) foi calculado subtraindo o volume da pata injetada com salina (pata controle) do volume da pata injetada com carragenina.

### **2.8 Preparação do tecido plantar**

Na quarta hora após a indução do edema de pata, os animais foram eutanasiados utilizando altas doses de ketamina/xilazina, e o tecido plantar foi retirado e colocado em tubo eppendorf contendo 0,6 mL de PBS 4 mM, pH 5,4. A seguir, a amostra foi homogeneizada em um homogeneizador de Potter e centrifugada à 6000xG, a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi imediatamente separado e armazenado a -70°C para análises posteriores.

## 2.9 Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A atividade da MPO foi avaliada no sobrenadante de homogenato do tecido plantar de acordo com a técnica descrita por Bani et al. (1998) com pequenas modificações. A amostra (0,1 ml) foi colocada em microplaca de 96 cavidades, em triplicada, sendo a seguir, adicionados uma solução 2,9 mL de PBS 50 mM, pH 6 contendo 0,19 mg/mL de cloridrato de O-dianidina e 0,0005% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A reação foi interrompida com solução de acetato de sódio 1,46 M (pH= 3,0) e a atividade da enzima foi determinada pela técnica de ponto final pela medida de absorbância em comprimento de onda de 460 nm.

## 2.10 Avaliação da migração de leucócitos *in situ*

Os processos de *rolling* e adesão de leucócitos no endotélio foram avaliados *in situ*, na fáscia espermática interna de ratos, após a injeção de carragenina (100 mg) na parede escrotal. Os ratos foram pré-tratados (uma hora antes) com curcumina *in natura* ou nanopartículas de PVP-curcumina. Duas horas após a aplicação de carragenina, os animais anestesiados com hidrato de cloral (500 mg/kg, via subcutânea), foram mantidos sobre uma placa aquecida a 37°C com orifício transparente possibilitando a transiluminação do tecido e observação dos vasos da microcirculação. Após posicionada, a fáscia espermática foi mantida úmida e aquecida usando solução de Ringer-Locke (pH 7.2-7,4) contendo 1% de gelatina. Os vasos selecionados para o estudo foram as vênulas pós-capilares com 15-25 µm de diâmetro. O número de leucócitos *rolling* e aderentes foram determinados em duas vênulas durante 10 min. Os leucócitos foram considerados aderentes quando permaneceram aderidos ao endotélio por um período superior a 30 segundos.

## 2.11 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média (E.P.M.). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey no Graph PadPrism 5.0®. P < 0,05 foi considerado como nível de significância.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização da curcumina nanoencapsulada

As nanopartículas de PVP contendo curcumina encapsulada foram preparadas pela técnica de complexação. A Tabela 1 apresenta os diâmetros médios (Dz) e o índice de polidispersão (IPD) das nanopartículas, no decorrer de 3 minutos de sonicação. A Figura 2 apresenta a distribuição do tamanho das nanopartículas (a) imediatamente após a sonicação e (b) durante a evaporação do etanol.

Tabela 1 – Diâmetro médio (Dz) e Índice de Polidispersão (IPD) das nano partículas de curcumina durante sonicação

Tempo de sonicação (min)	Dz (nm)	IPD (-)
1	349 ± 30	0,09 ± 0,04
2	372 ± 27	0,06 ± 0,04
3	380 ± 21	0,06 ± 0,02

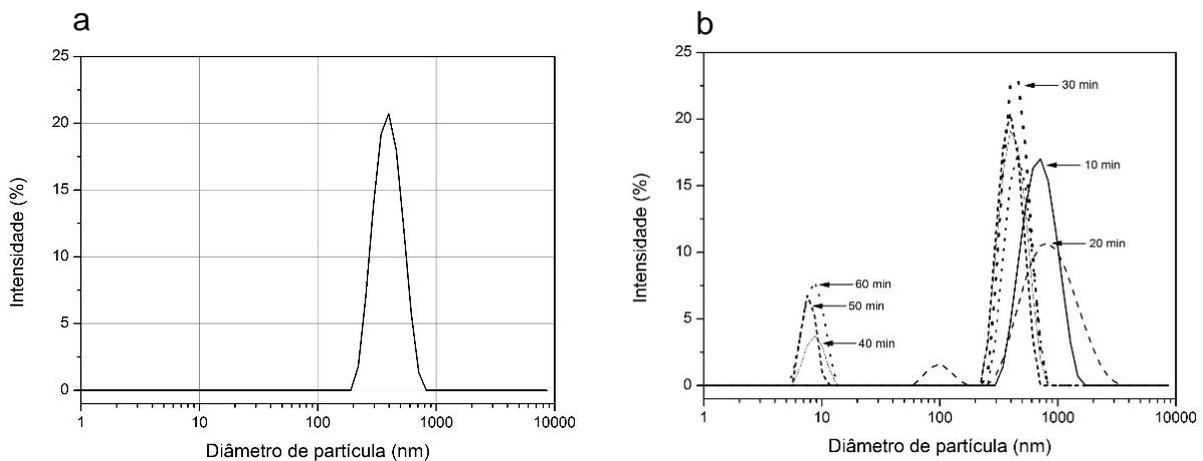


Figura 2. Distribuição do tamanho de partícula (a) após sonicação e (b) durante evaporação do solvente pela técnica de espalhamento dinâmico de luz

Os resultados demonstram que as nanopartículas PVP-curcumina foram formadas nos primeiros minutos de sonicação mantendo-se estáveis no decorrer do processo. É possível notar que durante a sonicação, houve pequeno aumento do tamanho das partículas, em relação ao primeiro e terceiro minuto de homogeneização, sugerindo que o terceiro minuto de homogeneização é tempo suficiente para a formação de nanopartículas estáveis e com diâmetro médio satisfatório.

Como observado, no processo de sonicação ocorreu a formação de nanopartícula de diâmetro médio de 200 a 700 nm (Fig. 2a). No processo de evaporação do etanol ocorreu a formação de nanopartículas com diâmetros cerca de 10 nm (Fig. 2b). Estudos utilizando a mesma técnica, obtiveram partículas de 143 nm de tamanho e índice de polidispersão de 0,19 (Yen et al., 2010), ou partículas de 180 a 220 nm de tamanho (Khan e Rathod, 2014). Uma explicação para esta diferença é que no nosso estudo a proporção etanol:água utilizada permitiu que parte da curcumina solubilizada não precipitasse na forma de nanopartículas. No entanto, após a evaporação do etanol e consequente aumento da concentração de água no meio, a curcumina pode ter sido precipitada na forma de nanopartículas, como indicadas na Figura 2b

### **3.2 Interação entre PVP e curcumina**

A Figura 3 mostra os espectros UV-Vis para a curcumina *in natura* e PVP puro e para a solução de curcumina e PVP em etanol na proporção mássica 10:1 (m:m). Na Figura 4 é apresentada a relação entre o fator F e a proporção mássica PVP:Cur em etanol.

Como o solvente usado na análise foi etanol absoluto, o mesmo utilizado para a síntese das nanopartículas, os resultados obtidos correspondem à intensidade de interações que ocorrem durante a formação das partículas. É possível notar que a adição de polímero ao sistema provocou aumento na absorbância referente a curcumina no comprimento de onda de 426 nm. Esse aumento não pode ser atribuído ao espectro do PVP já que este não apresenta resposta em tal comprimento de onda. O aumento da absorção no comprimento de onda de 426 nm, referente a curcumina, devido à adição de PVP pode ser atribuído a ligações de hidrogênio que ocorrem entre a carbonila do polímero e a hidroxila da curcumina.

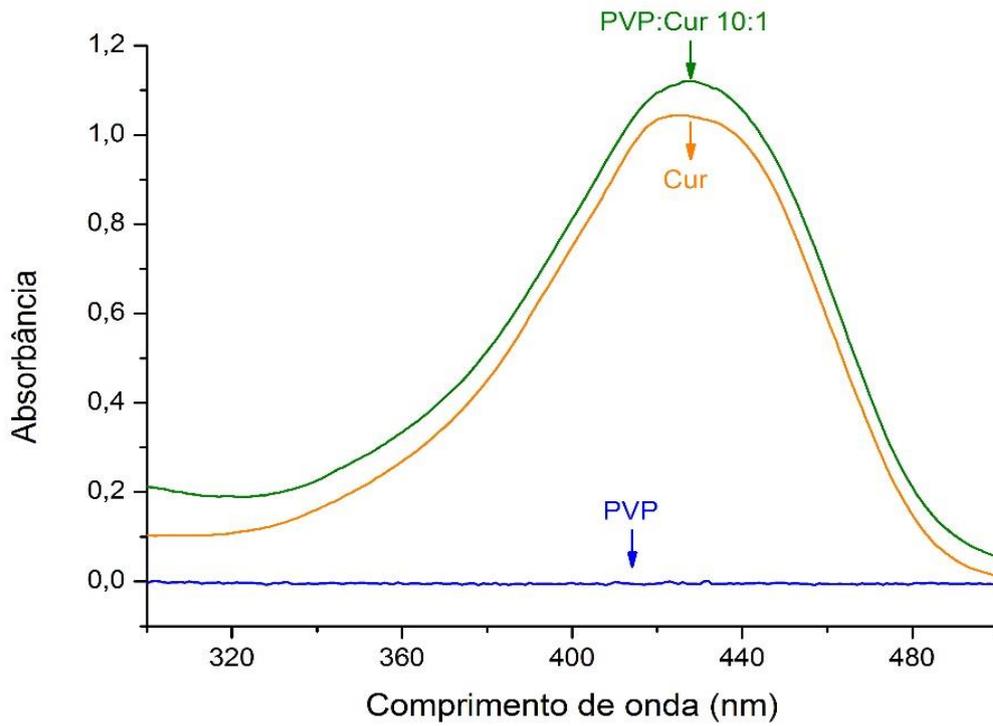


Figura 3. Espectros de PVP e CUR puros e solução em etanol de PVP:Cur na proporção mássica 10:1

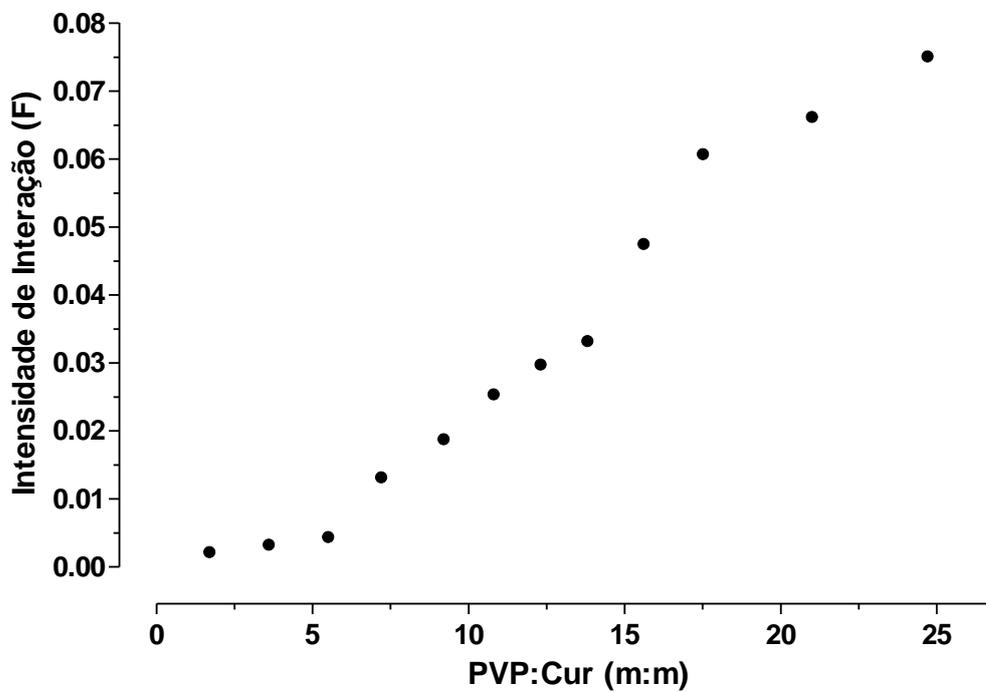


Figura 4. Fator de interação (F) em relação à proporção mássica PVP:Cur.

Karavas et al. (2006) observaram comportamento semelhante no estudo da interação PVP e felodipina, onde concentrações mais altas de polímero em solução de felodipina apresentaram maior absorbância no comprimento de onda referente à droga. Os autores também atribuíram tal ocorrido à formação de ligações de hidrogênio entre os compostos. Liu et al. (2016) investigaram a interação da curcumina com a proteína isolada do leite, e observaram pelo estudo de espectroscopia UV-Vis e fluorescência que ocorria um aumento na interação entre os compostos a medida que a quantidade de proteína em solução aumentava. Os autores atribuíram este comportamento à formação de complexos via interações moleculares. Valero et al. (2003) avaliaram por espectroscopia UV-Vis e fluorescência a interação entre naproxeno e PVP e concluíram a existência de uma interação íon-dipolo entre os compostos.

### 3.3 Solubilidade em água

A Figura 5 mostra a solubilidade da curcumina em relação à proporção mássica entre PVP e curcumina utilizada na preparação das nanopartículas.

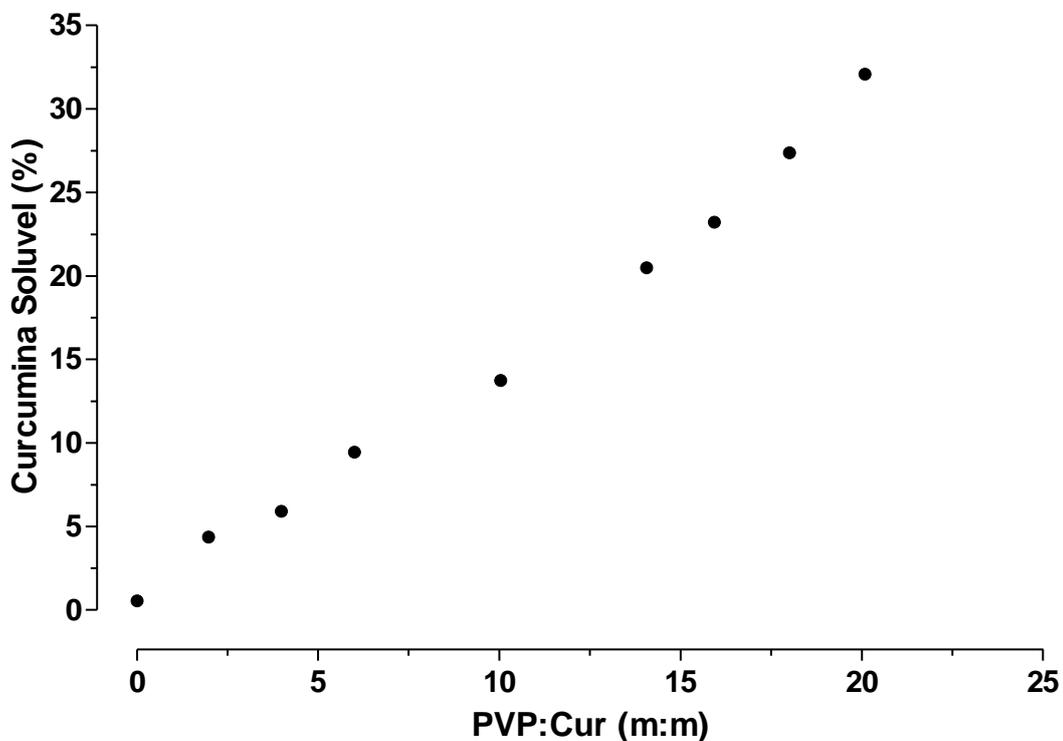


Figura 5. Porcentagem de curcumina solúvel em função da proporção PVP: Cur

O percentual da curcumina que se tornou solúvel em água, ou seja, que apresentou estabilidade coloidal no sistema aquoso, aumentou à medida que a concentração de PVP utilizado na produção das nanopartículas foi aumentada. Comparando com a Figura 4, observa-se que o comportamento da solubilidade foi semelhante ao da interação entre PVP e curcumina. Esta observação suporta a hipótese de formação de ligações de hidrogênio entre os grupamentos carbonila e hidroxila, resultando no aumento do caráter hidrofílico da curcumina (Karavas et al., 2006).

Mura et al. (2003) avaliaram a solubilidade do sistema naproxeno-quitosana-PVP e observaram que houve aumento na solubilidade em água do naproxeno, sendo atribuído à formação de forças intermoleculares fracas entre o polímero e o naproxeno. Sethia e Squillante (2004) também verificaram uma correlação linear entre a solubilidade de carbamazepina e a concentração de PVP. O mesmo comportamento foi verificado por Frizon et al. (2013) quando avaliaram a solubilidade de loratadina pela interação com PVP.

### **3.4 Espectroscopia no Infravermelho (FTIR), Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Difração de Raio-X (DRX)**

A Figura 6 apresenta os espectros obtidos por FTIR das nanopartículas PVP-Cur (proporção mássica 8:1 (m:m), da curcumina *in natura* e do PVP puro. Na Figura 7 são apresentados os termogramas de Calorimetria Diferencial de Varredura das nanopartículas PVP-Cur (proporção mássica 8:1 m:m), da curcumina *in natura* e do PVP puro e da mistura física entre o PVP e a curcumina na proporção mássica 8:1 (m:m). Na Tabela 2, as propriedades térmicas da curcumina *in natura*, nas nanopartículas e na mistura física são apresentadas. A Figura 8 apresenta os difratogramas de Raios-X da curcumina *in natura*, PVP, mistura física e das nanopartículas.

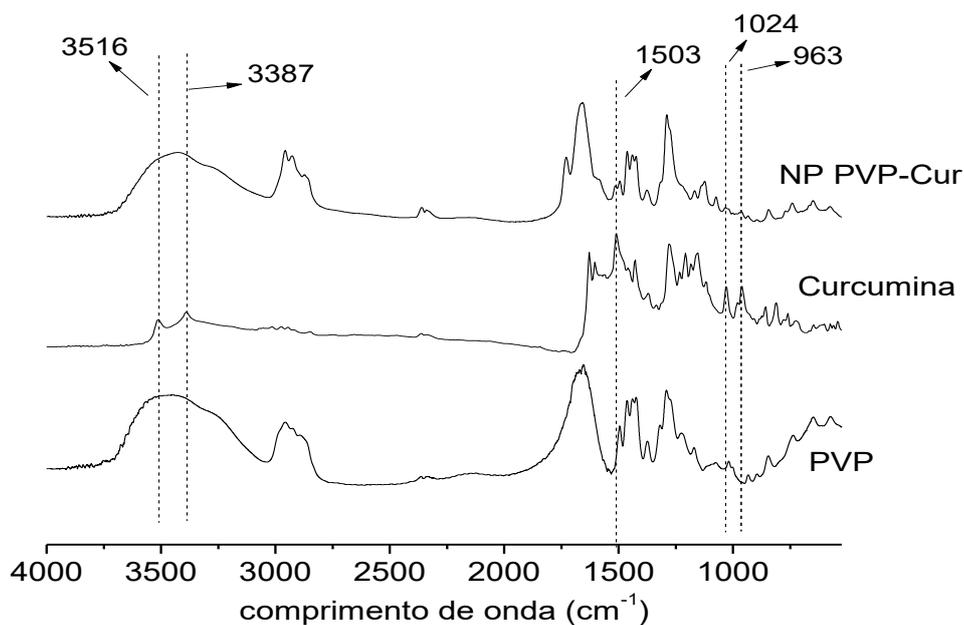


Figura 6. Espectros de FTIR das nanopartículas de PVP-curcumina (NP PVP-Cur), curcumina *in natura* e PVP puro.

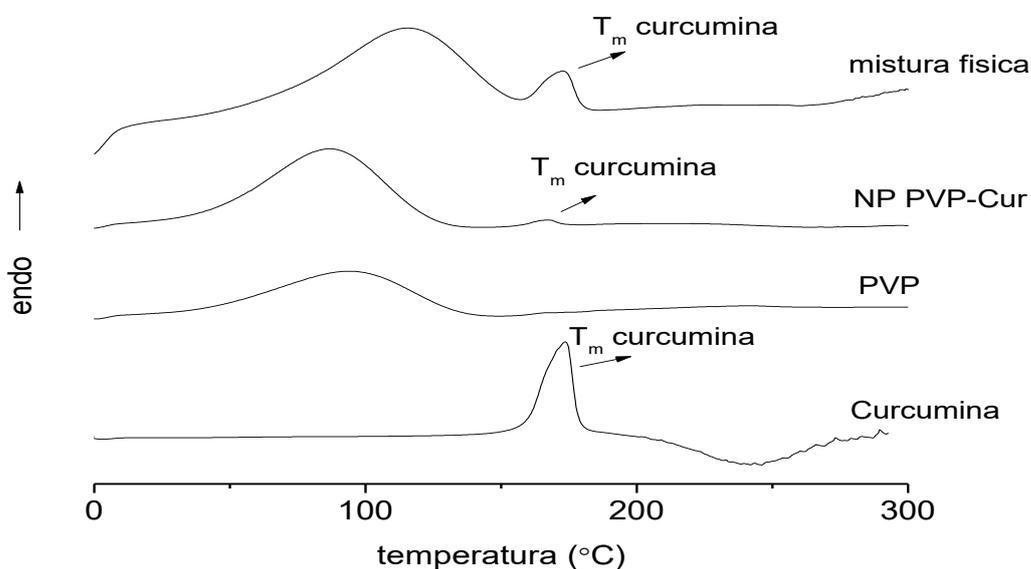


Figura 7. Termogramas de Calorimetria Diferencial de Varredura das nanopartículas PVP-Cur, da curcumina *in natura*, do PVP puro e da mistura física entre o PVP e a curcumina.  $T_m$ = temperatura média de fusão

Tabela 2: Entalpia de fusão e temperatura de fusão da curcumina *in natura*, das nanopartículas PVP-curcumina e da mistura física entre PVP e curcumina na proporção 8:1 (m:m).

Amostra	$\Delta H_{m_{cur}}$ (J.g <sup>-1</sup> )	T <sub>m<sub>cur</sub></sub> (°C)
Curcumina	103,1	167,4
Nanopartículas PVP-Cur (8:1 m:m)	40,2*	172,6
Mistura física PVP e curcumina (8:1 m:m)	98,0*	172,8

\* Considerando a proporção mássica entre PVP e curcumina nas nanopartículas.

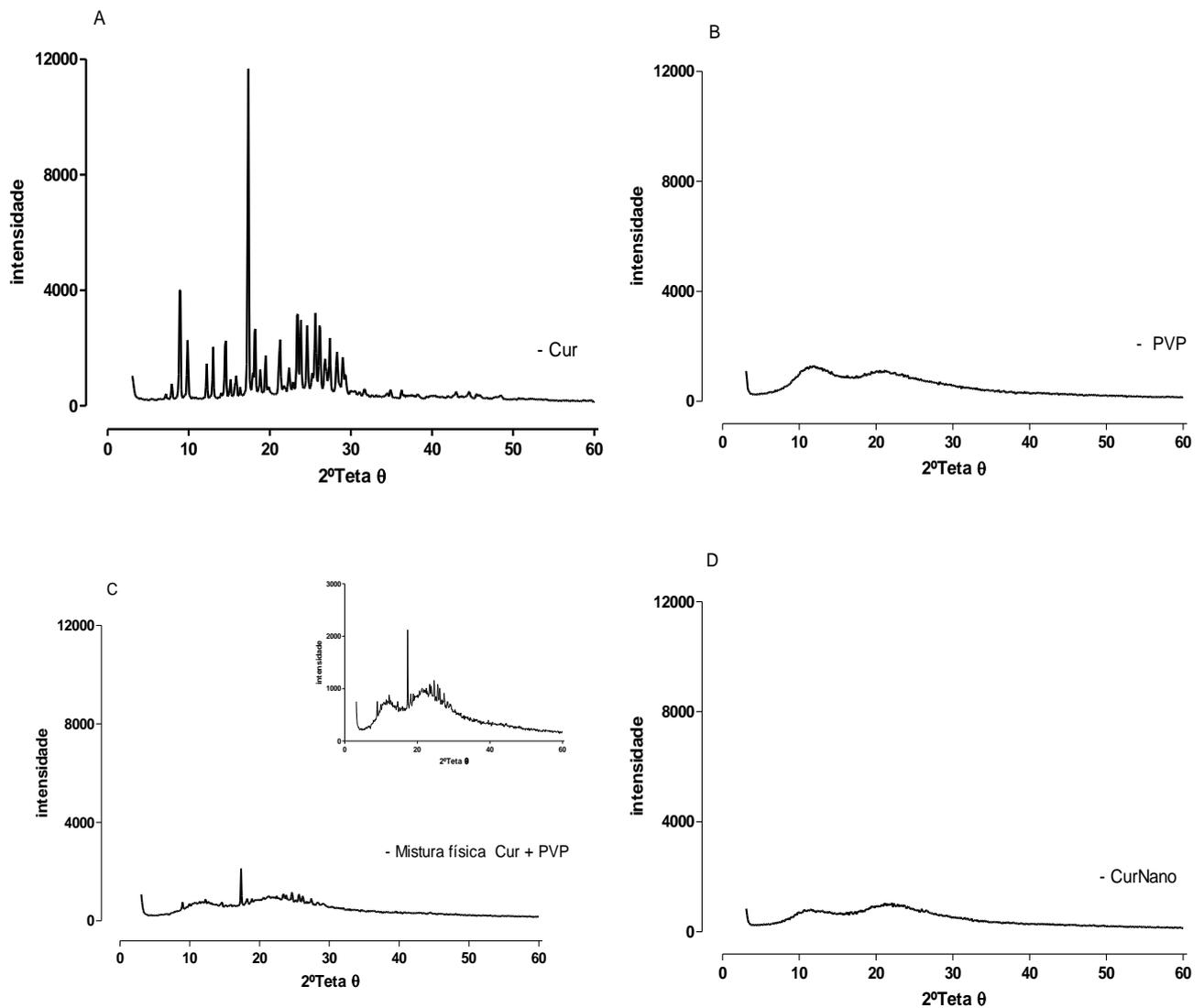


Figura 8. Difração de Raio-X de (A) Curcumina *in natura*, (B) PVP, (C) mistura física entre PVP e a curcumina e (D) nanopartículas de PVP-curcumina.

No espectro de FTIR da curcumina é possível identificar as bandas de absorção relativas à vibração de estiramento das hidroxilas da curcumina ( $3516$  e  $3387\text{ cm}^{-1}$ ), que são geralmente utilizados para identificar esse composto. Nas nanopartículas estas bandas não puderam ser visualizadas, provavelmente por um efeito de atenuação e pela presença da banda larga relativa à água adsorvida em cerca de  $3430\text{ cm}^{-1}$ . Também, foram visíveis no espectro da curcumina *in natura* o grupamento C-O ( $1024\text{ cm}^{-1}$ ), as bandas sobrepostas dos grupamentos C=O e C=C ( $1503\text{ cm}^{-1}$ ) e a banda relativa à vibração do C-H aromático da curcumina ( $963\text{ cm}^{-1}$ ), corroborando com estudos de outros pesquisadores (Yallapu et al., 2010; Paramera et al., 2011; Silva-Buzzanello et al., 2016). Estas bandas podem ser vistas nas nanopartículas, embora bastante atenuadas, mesmo considerando a sua menor proporção mássica na amostra das nanopartículas. A diminuição da intensidade das bandas do composto encapsulante é um indicativo da sua encapsulação (Yallapu et al., 2010; Silva-Buzzanello et al., 2016).

A Figura 7 mostra os picos endotérmicos das nanopartículas e do PVP em temperaturas em torno  $90$  a  $110^{\circ}\text{C}$ . Este pico pode ser atribuído à evaporação de água adsorvida, devido à natureza higroscópica deste composto, lembrando que nenhum dos componentes das partículas apresenta transição térmica nessa faixa de temperatura. Em temperatura em torno de  $170^{\circ}\text{C}$  a fusão da curcumina pode ser encontrada, e caracterizada pelo pico endotérmico (Yallapu et al., 2010). Este aparece na curcumina *in natura*, na mistura física e nas nanopartículas, contudo nesta última amostra em baixa intensidade, o que pode ser quantificado pela entalpia envolvida na fusão ( $\Delta H_m$ , Tabela 2). Vale lembrar que os valores de entalpia foram calculados em função da proporção mássica dos componentes das nanopartículas (PVP e curcumina). A entalpia de fusão da curcumina na mistura física (obtida pela simples mistura manual do PVP e da Cur) e da curcumina *in natura* apresentam valores muito semelhantes entre si. Contudo, nas nanopartículas a entalpia de fusão da curcumina foi menor e essa diferença pode ser atribuída à distribuição da curcumina na forma amorfa no interior das nanopartículas, evidenciando a sua encapsulação. Nas nanopartículas, a entalpia de fusão foi 41% menor quando comparada a da curcumina *in natura*, valor muito próximo ao do aumento de solubilidade em água (30%, Figura 5).

As análises de difração de Raios-X da curcumina pura (Figura 8) evidenciou picos em  $8,9^{\circ}$ ;  $9,7^{\circ}$ ;  $12,2^{\circ}$ ;  $13^{\circ}$ ;  $14,6^{\circ}$ ;  $17,3^{\circ}$  e  $19,5^{\circ}$ , evidenciando sua estrutura

cristalina (Kurmar et al., 2014; Mangolim et al., 2014; Villalobos-Hernández et al., 2005; Silva, Fideles e Fook, 2015). Tais bandas não puderam ser visualizadas para as nanopartículas contendo curcumina e no PVP puro sugerindo uma conversão da curcumina de uma condição altamente cristalina para um estado amorfo. Os picos da curcumina também apareceram na mistura física, entretanto, em intensidade reduzida, indicando que a mistura física apresenta o mesmo padrão de bandas que a curcumina *in natura* (Fig. 8 C).

### **3.5 Efeito da Cur e da CurNano sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos**

A injeção intraplantar de carragenina (Cg) provoca uma resposta inflamatória local, com pico máximo na 4<sup>a</sup> h após a aplicação. Esta resposta é manifestada pela formação de edema e aumento da migração celular, com consequente elevação do número de leucócitos no local da lesão (Martinez et al, 2015).

O tratamento com curcumina *in natura* (Cur) na dose de 200 mg/Kg, reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) a intensidade do edema na 4<sup>a</sup> hora após a injeção de Cg (24,39%), enquanto na dose de 400 mg/Kg reduziu significativamente a intensidade do edema, na 2<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> hora após a injeção de Cg (36,59% e 40,11% , respectivamente,  $P < 0,05$ ). O tratamento com Cur na dose de 50 mg/kg não modificou o desenvolvimento da resposta inflamatória quando comparado ao grupo controle (Fig. 9 A).

O tratamento dos ratos com a curcumina nanoencapsulada em PVP (CurNano) nas doses de 25 e 50 mg/Kg de peso corporal reduziu significativamente a intensidade do edema na 2<sup>a</sup> e na 4<sup>a</sup> hora após a injeção de carragenina (43,63 % e 43,65% na 2<sup>a</sup> hora e 34,98% e 37,78% na 4<sup>a</sup> hora, respectivamente). No entanto, o tratamento com CurNano na dose de 12,5 mg/kg só reduziu significativamente a intensidade do edema na 4<sup>a</sup> hora (23,71%). O tratamento com Indo, anti-inflamatório de referência, na dose de 5 mg/Kg causou uma redução significativa na intensidade da resposta, na 2<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> hora após a injeção de Cg (40,19%  $P < 0,05$  e 45,43%  $P < 0,05$ , respectivamente). A dose de 400 mg/Kg de Cur e as doses de 25 e 50 mg/Kg de CurNano reduziram o edema de maneira similar a Indo (Fig. 9).

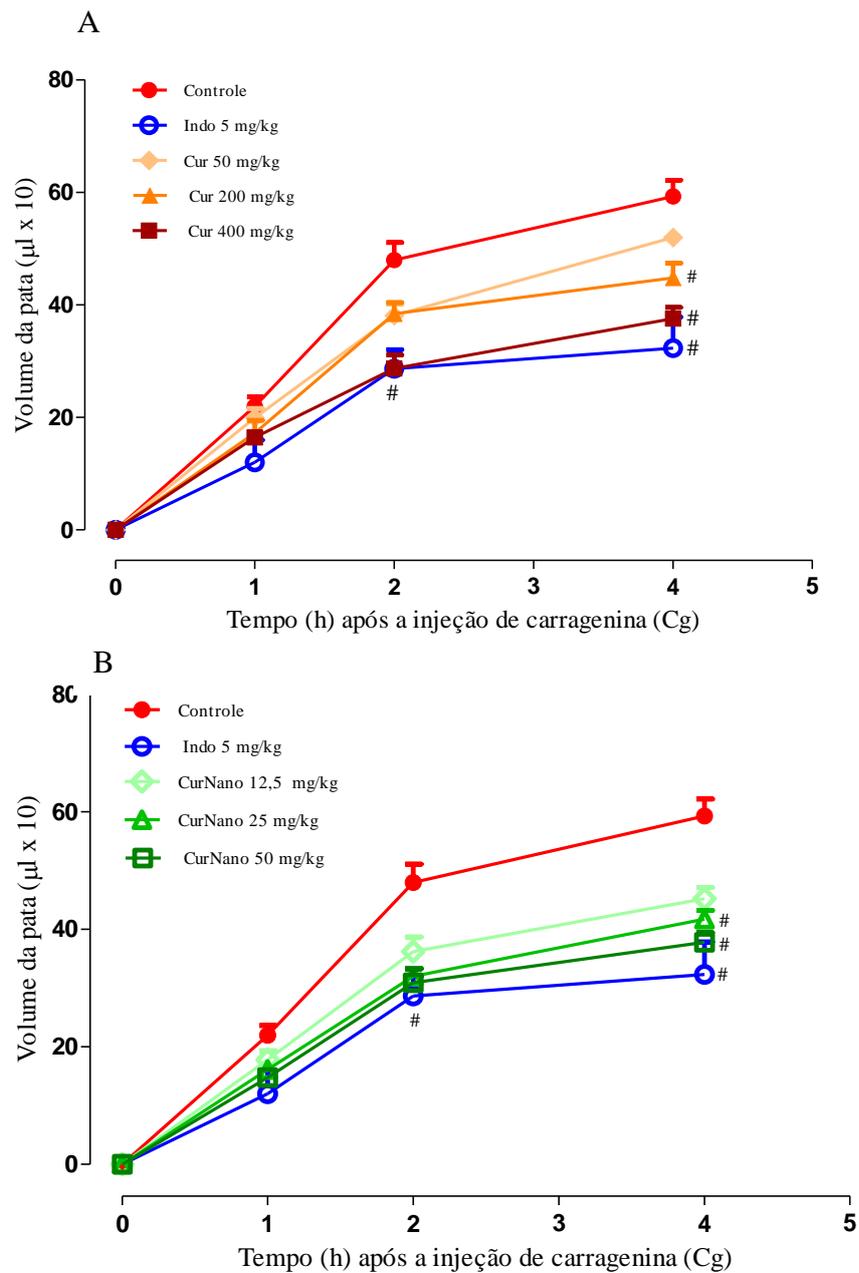


Figura 9. Efeito da Curcumina *in natura* (Cur) e da curcumina em nano partícula conjugada ao polivinilpirrolidone (CurNano) sobre o desenvolvimento de edema de pata induzido por carragenina (Cg 200 µg/pata) em ratos (200-220g). (A) animais tratados oralmente com Cur nas doses de 50, 100, 200 e 400mg/kg. (B) animais tratados oralmente com NanoCur nas doses de 25 e 50 mg/kg. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão da média do volume da pata 1,2, e 4 horas após a injeção de carragenina.  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle (ANOVA seguido teste Tukey)

O edema de pata induzido pela carragenina envolve a participação de vários mediadores inflamatórios, incluindo histamina, bradicinina, prostaglandina e óxido nítrico (Brito et al, 2013), sendo um dos modelos mais utilizados para investigar potenciais agentes com propriedade anti-inflamatória (Sitonio et al, 2013, Dias et al., 2014, Martinez et al, 2015).

Alguns estudos relatam que a atividade anti-inflamatória da curcumina pode ser atribuída à inibição da expressão da enzima ciclo-oxigenase 2 (COX2) (GOEL et al., 2001; Lev-Ari et al., 2006; Aggarwal et al., 2009). Estudos mais recentes demonstram que a curcumina reduz a produção de citocinas pró inflamatórias como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), a interleucina-1 (IL-1), a interleucina-8 (IL-8), e a óxido nítrico sintase (NOS) (Singh et al., 2011; Rocha et al., 2014). Assim, podemos sugerir que o efeito inibitório da Cur e da CurNano sobre o edema de pata induzido pela carragenina pode estar relacionado a uma ação sobre mediadores inflamatórios.

Os dados apresentados mostram maior eficácia da CurNano para reduzir a intensidade do edema de pata quando comparada à Cur, uma vez que a CurNano em dose oito vezes menor do que de Cur causou o mesmo efeito inibitório na resposta inflamatória.

### **3.6 Efeito da Cur e da CurNano sobre a atividade da Mieloperoxidase (MPO)**

A MPO é uma enzima encontrada em grânulos intracelulares de neutrófilos e sua atividade catalítica lhe confere habilidade de reagir com uma série de substratos podendo gerar intermediários como radicais livres que são capazes de oxidar estruturas celulares do hospedeiro e alterar respostas celulares, provocando dano tecidual (Klebanoff, 2005;Thong-Ngam et al., 2012).

A atividade da MPO no tecido plantar do animal se encontra aumentada na 4ª hora após a aplicação de carragenina, e sua determinação é utilizada como marcador indireto da migração de leucócitos para o local inflamado. O tratamento com Cur na dose de 400 mg/kg e CurNano nas doses de 25 e 50 mg/Kg, causou uma redução significativa na atividade da MPO (Cur400 = 30,63%; CurNano25= 26,88%; CurNano50= 38,13%). O tratamento com a Cur nas doses de 50 e 200 mg/Kg e, com a CurNano na dose de 12,5 mg/Kg, não alteraram significativamente a atividade da enzima. A Indo reduziu significativamente a atividade da MPO (Indo5 =

60%,  $P < 0,01$ ) (Figura 10).

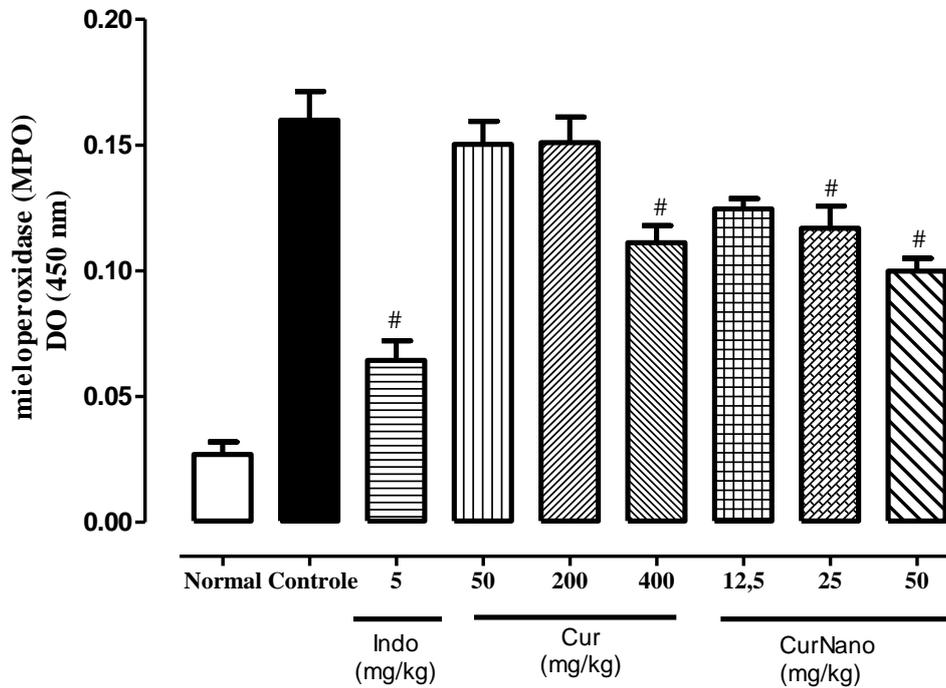


Figura 10. Efeito da Curcumina *in natura* (Cur) e de Nanopartículas de Curcumina conjugada ao PVP (CurNano) sobre a atividade da MPO no tecido plantar de ratos. Os animais ( $n = 6$  por grupo), foram tratados por via oral nas doses de 50, 200 e 400 mg/Kg de Cur e na dose de 12,5, 25 e 50 mg/Kg de CurNano. Ratos controles receberam água por via oral, 1 h antes da injeção de Cg (200 mg). Ratos controles foram tratados por via oral com indometacina (Indo), na dose de 5 mg/Kg. Cada coluna representa a média  $\pm$  E.P.M. da atividade da MPO, 4 horas após a injeção do agente flogístico.  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle (ANOVA seguido teste Tukey)

A migração de leucócitos e consequente recrutamento celular no sítio da lesão é uma etapa importante na evolução do processo inflamatório, tendo como finalidade a sua resolução. No entanto, na vigência de uma resposta inflamatória intensa pode ocorrer também uma migração leucocitária exacerbada, e consequente produção/liberação de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, enzimas proteolíticas, agentes quimiotáticos e metabólitos do ácido araquidônico, que provocam efeitos danosos no tecido (Klebanoff, 2005; Riccioni et al, 2009; Verri et al., 2010; Thong-Ngam et al., 2012; Yizengaw et al. 2016). Neste contexto, a

redução do infiltrado neutrofílico pode reduzir danos teciduais, contribuindo para o efeito anti-inflamatório da curcumina.

### 3.7 Efeito da Cur e da CurNano sobre a migração de Leucócitos *in situ*

Diante dos dados acima, achamos importante investigar o comportamento *rolling* e a adesão de leucócitos no endotélio. Estes parâmetros foram avaliados *in situ* na fáscia espermática interna de ratos utilizando as doses maiores de Cur e CurNano. Como observado tanto a Cur (400mg/kg) como a CurNano (50 mg/kg) reduziram significativamente o *rolling* (41,46% e 47,07%, respectivamente) e a adesão de leucócitos (63,44% e 46,15%, respectivamente). Os resultados estão apresentados na Fig. 11 A e B.

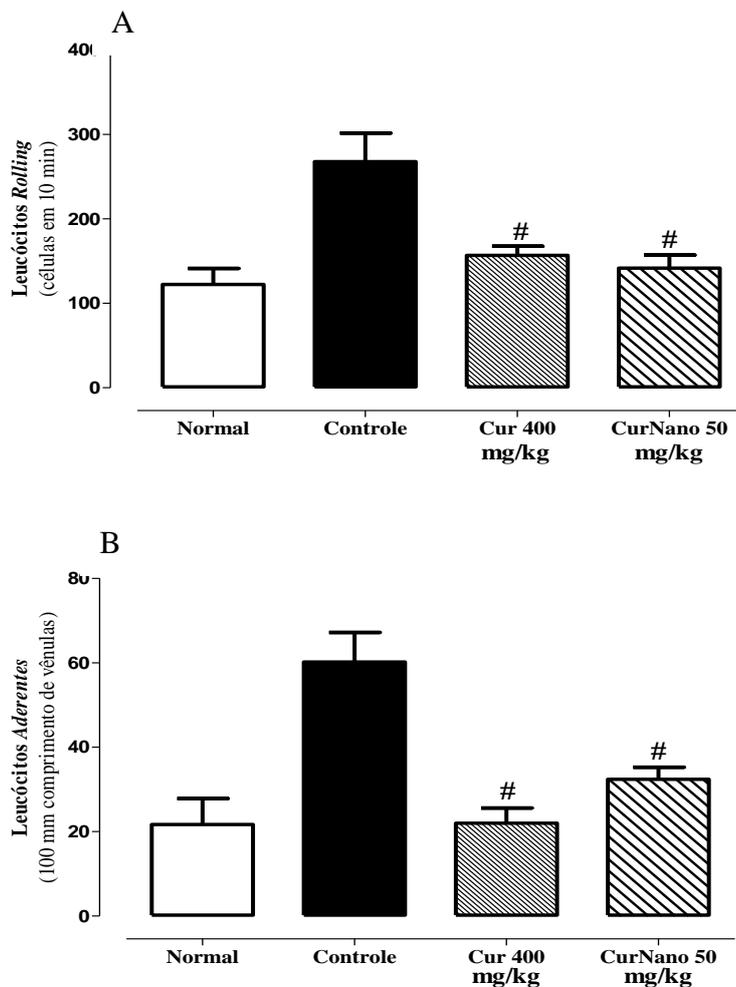


Figura 11. *Rolling* (A) e adesão leucocitária (B) nos vasos da microcirculação da fáscia espermática de ratos, avaliados pela técnica de microcirculação *in situ*. Os ratos foram tratados com Cur 400 mg/kg e NanoCur 50 mg/kg, em dose única por via oral. Os valores

representam a média  $\pm$  erro padrão da média de 5 - 7 animais por grupo.  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle (ANOVA seguido teste Tukey)

Os resultados mostraram que a Cur e CurNano são eficazes na redução do *rolling* e adesão de leucócitos atingindo valores próximos aos dos animais normais. Contudo, o tratamento com CurNano demonstrou ser mais eficaz, uma vez que provocou o mesmo efeito em doses menores.

Embora no presente estudo não foi investigado o mecanismo pelo qual a Cur e a CurNano inibem a migração de leucócitos, é possível sugerir que estes compostos apresentam uma atividade inibitória sobre mediadores inflamatórios com propriedade quimiotática ou sobre moléculas que participam do processo de migração. Existem estudos demonstrando que o efeito inibitório da curcumina sobre a migração celular pode ser devido a uma atividade inibitória sobre: a enzima lipoxigenase reduzindo a síntese de leucotrienos B4 (Huang et al., 1991) ou sobre as moléculas de adesão intercelular 1 (ICAM-1) (Thong-Ngam et al., 2012).

#### 4. CONCLUSÃO

As análises de caracterização mostraram que foram obtidas nanopartículas de poli(vinil pirrolidona) contendo curcumina de tamanhos nanométricos. Foi evidenciada a formação de pontes de hidrogênio entre os dois compostos, o que resultou no aumento da solubilidade da curcumina em água. O processo de obtenção não alterou as propriedades biológicas da curcumina, uma vez que a atividade anti-inflamatória da CurNano foi a mesma quando comparada a da Cur. Uma vantagem deste processo foi que a CuNano em dose oito vezes menor causou efeito inibitório similar à Cur no processo inflamatório.

#### 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados apresentados na presente Dissertação demonstraram que:

- As nanopartículas foram formadas nos primeiros instantes de sonificação sugerindo que o tempo de três minutos são suficientes para a sua formação;
- A interação entre PVP e a curcumina pode ser atribuída a ligações de hidrogênio que ocorrem entre a carbonila do polímero e a hidroxila da curcumina;
- O aumento da solubilidade ocorre com o aumento da concentração de PVP utilizado na produção das nanopartículas;
- As análises de Calorimetria Diferencial de Varredura, Espectroscopia do Infravermelho, difração de Raio-X demonstraram o nanoencapsulamento da curcumina na matriz de PVP;
- Tanto a curcumina encapsulada como a curcumina *in natura* causaram efeito inibitório sobre o desenvolvimento do edema de pata induzido pela carragenina;
- Tanto a curcumina encapsulada como a curcumina *in natura* reduziram a atividade da mieloperoxidase e reduziu o *rolling* e adesão de leucócitos;
- A curcumina nanencapsulada mostrou efeito inibitório similar ao da curcumina *in natura*, contudo em doses oito vezes menores;
- O processo de nanoencapsulamento melhorou a atividade biológica da curcumina, possivelmente pelo aumento da sua solubilidade.

## 6. REFERÊNCIAS

Aggarwal B.B., Harikumar K.B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 41(2009) 40-59.

Ahmed N., Allam A., Ibrahim A., Komeil B., Mohame D.A., Fouda C., Ossama Y. A. Preparation, characterization and in vivo evaluation of curcumin self-nano phospholipid dispersion as an approach to enhance oral bioavailability, *Int. JP.* 489 (2015) 117–123.

Anand P., Kunnumakkara A.B., Newman R.A., Aggarwal B.B. Bioavailability of curcumin: problems and promises, *Mol. Pharm.* 4 (2007) 807-18.

Bani D., Masini E., Bello M.G., Bigazzi M., Sacchi T.B. Relaxin protects against myocardial injury caused by ischemia and reperfusion in rat heart, *Am. J. Pathol.* 152 (1998) 1367-1376.

Batlouni M. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Cardiovascular, Cerebrovascular and Renal Effects, *Arq. Bras. Cardiol.* 94 (2010) 556-563.

Bhüler V. Polyvinylpyrrolidone Excipients for pharmaceutical:povidone, crospovidone and copovidone, *Spriger* 14(2005) 221-225.

Bisht S., Feldmann G., Sheetal S., Ravi R., Karikar C., Amarnath M., Anirban M. E. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin ("nanocurcumin"): a novel strategy for human cancer therapy. *J. Nanob.* 5:3 (2007) 3155-3163.

Bogdan C. Nitric oxide and the immune response, *NatImm.* 2 (2001) 907-916.

Brito T.V., Prudêncio R.S., Sales A.B., Vieira J.F.C., Candeira S.J.N., Franco A.X., Aragão K. S., Ribeiro R.A., Souza M.H.L.P., Chaves L.S., Freitas A.L.P., Medeiros J.V.R., Barbosa A.L.R. Anti-inflammatory effect of a sulphated polysaccharide fraction extracted from the red algae *Hypnea musciformis* via the suppression of neutrophil migration by the nitric oxide signalling pathway, *J. of Pharmacy and Pharm.* 65 (2013) 724–733.

Busselez R., Arbe A., Cervany S., Capponi S., Colmenero J., Frick B. Component dynamics in polyvinylpyrrolidone concentrated aqueous solution, *J.Chem. Phy.* 137 (2010) 1-17.

Castillo M.L.R.D, López-Tobar E., Sanchez-Cortes S., Flores G., Blanch G.P. Stabilization of curcumin against photodegradation by encapsulation in gamma-cyclodextrin: A study based on chromatographic and spectroscopic (Raman and UV-visible) data, *Vibrat. Spect.* 81 (2015) 106-111.

Chen J., He Z.M., Wang F.L., Zhang Z.S., Liu X., Zai D.D., Chen W.D. Curcumin and its promise as an anticancer drug an analysis of its anticancer and antifungal effects in cancer and associated complications from invasive fungal infections, *Euro. J. of Pharma.* 772 (2016) 33-42.

Dias J.M., Brito T.V., Magalhães D.A., Santos P.W.S., Batista J.A., Dias E.G.N., Fernandes H.B., Damasceno S.R.B., Silva R.O., Aragão K.S., Souza M.H.L.P., Medeiros J.V.R., Barbosa A.L.R. Gabapentin, a Synthetic Analogue of Gamma Aminobutyric Acid, Reverses Systemic Acute Inflammation and Oxidative Stress in Mice, *Inflamm.* 37 (2014) 1826-1836

Facchi S.P., Scariot D.B., Bueno P.V.A., Souza P.R., Figueiredo L.C., Follmann H.D.M., Nunes C.S., Monteiro J.P., Bonafé E.G., Nakamura C.V., Muniz E.C., Martins A.F. Preparation and cytotoxicity of N-modified chitosan nanoparticles applied in curcumin delivery, *Int. J. Biol. Macromol.* 87 (2016) 237-245.

Fattori V., Amaral F.A., Verri Jr W.A. Neutrophils and arthritis: Role in disease and pharmacological perspectives, *Pharma. Res.* 112 (2015) 84-98

Favacho H.A.S., Oliveira B.R., Kelem C.S., Medeiros B.J.L., Sousa P.J.C., Perazzo F.F., Carvalho J.C.T. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of Euterpe oleracea oil, *B.J. Phar.* 21(2011) 105-114.

Frizon F., Eloy J.D.O., Donaduzzi C.M., Mitsui M.L., Marchetti J.M. Dissolution rate enhancement of loratadine in polyvinylpyrrolidone K-30 solid dispersions by solvent methods, *Powder Techn.* 235 (2013) 532-539.

Gressler L.T., Oliveira C.B., Coradini K., Dalla R.L., Grando T.H., Baldissera M.D., Zimmermann C.E., Silva A.S., Almeida T.C., Hermes C.L., Wolkmer P., Silva C. B., Moreira K.L., Beck R.C., Moresco R.N., Veiga M.L., Stefani L.M., Monteiro S.G. Trypanocidal activity of free and nanoencapsulated curcumin on *Trypanosoma evansi*, *Parasitology.* 142 (2015) 439-448.

Gris P., Gauter J., Chen P., Gibson D.G., Gris D., Laur P., Wentworth L., Nackley A. G., Mainex W., Diatchenko L. A novel alternatively spliced isoform of mu-opioid receptor: functional antagonism, *MolP.* 6 (2010) 1-10.

Goel A., Boland C.R., Chauhan D.P. Specific inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by dietary curcumin in HT-29 human colon cancer cells, *C. Lett.* 172 (2001) 111-8.

Huang J., Bu L., Xie J., Chen K., Cheng Z., Li X., Chen X. Effects of nanoparticles size on cellular uptake and liver MRI with PVP-coated Iron Oxide nanoparticles, *ASc. Nano.* 4 (2010) 7151-7160

Huang M.T., Lysz T., Ferrara T., Abidi T.F., Laskin J.D., Conney A.H. Inhibitory Effects of Curcumin on in Vitro Lipoxygenase and Cyclooxygenase Activities in Mouse Epidermis, *Canc. research* 51 (1991) 813-819.

- Huynh K.A., Chen K.L., Agregation kinetics of citrate and polyvinylpyrrolidone coated silver nanoparticles in monovalente and divalent eletrolyte solution. *Environ Sci. Technol.* 45 (2011) 5564-5571
- Karavas E., Ktistis G., Xenakis A., Georgarakis E. Effect of hydrogen bonding interactions on the release mechanism of felodipine from nanodispersions with polyvinylpyrrolidone, *Euro. J of Pharma. Biopharm.* 63 (2006) 103-114.
- Kavaras E., Geogarakis M., Docoslis A., Bikiaris D. Combining SEM, TEM, and micro-raman tecniques to differentrate between the morphus molecular level dispersion and nanodispersions of a pooly water-soluble drug within a polymer matrix, *Int. J. Pharm.* 340 (2007) 76-83.
- Khan W.H., Rathod V.K. Process intensification approach for preparation of curcumin nanoparticles via solvente-nonsolvent nanoprecipitation using spinning disc reactor, *Chemical Engin. Proces: Process. Intensific.* . 80 (2014) 1-10.
- Klebanoff S.J. Myeloperoxidase: friend and foe. *J. of Leukocyte Biol.* 77 (2005) 587-598.
- Krausz A.E.K., Adler B.L., Cabral V., Navati M., Doerner J., Charafeddine R.A., Chandra D., Liang H., Gunther L., Clendaniel A., Harper S., Friedman J.M., Nosanchuk J.D., Friedman A.J. Curcumin-encapsulated nanoparticles as innovative antimicrobial and wound healing agente, *Nanomed: Nanotech, Biology, and Med.* 11 (2015) 195-206.
- Kumar, S. S. D., Mahesh, A., Mahadevan, S., Mandal, A. B. Synthesis and characterization of curcuminvloaded polymer/lipid based nanoparticles and evaluation of their antitumor effects on MCF-7 cells, *Biochim. et Biophy. Acta* 1840 (2014), 1913-1922.
- Letsutthiwong P., Hoomum K., Jonfaroomgamsang N., Rojsitthesak P. Preparation of alginate nanocapsuloscontaing turmeric oil, *CarbPolym.* 74 (2008) 209-214.
- Lev-Ari S., Strier L., Kazanov D., Elkayam O., Lichtenberg D., Caspi D., Arber N. Curcumin synergistically potentiates the growth-inhibitory and pro-apoptotic effects of celecoxib in osteoarthritis synovial adherent cells, *Rheumatology.* 45 (2006) 171–177.
- Li X., Nan K., Li L., Zhang Z., Chen H. In vivo evaluation of curcumin nanoformulation loaded methoxypoly(ethyleneglycol)-graft-chitosan compositefilm for wound healing application, *Carb. Poly.* 88 (2012) 84–90.
- Liu C., Chiu Y., Wu L., Kuo C., Peng W. Analgesic and anti-inflammatory activities of the ethanol extract of *Taxillus sutchuenensis* in mice, *A. J. PharmP.* 7 (2013) 1546-1553.

Liu W., Chen X.D., Cheng Z., Selomulya C. On enhancing the solubility of curcumin by microencapsulation in whey protein isolate via spray drying. *J. of Food Engine.* 169 (2016) 189-195.

Manju S., Sreenivasan K.. Synthesis and Characterization of a Cytotoxic Cationic Polyvinylpyrrolidone–Curcumin Conjugate, *J. pharm. Sci.* 100 (2011) 2. Oliveira M., Zanchet D., Zarbin A. Synthesis and characterization of silver nanoparticle/polyaniline nanobomposite, *Prog. Col. Polym. Sci.* 128 (2004) 126-130.

Mangolin C.S., Moriwarc C., Nogueira A.C., Souto F., Baesso M.L. Curcumin- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex: stability, solubility, characterization by FT-IR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and food application, *Food chem.* 153 (2014) 361-370.

Martinez R.M., Longhi-Balbinot D.T., Zarpelon A.C., Salrengo-Ferrari L., Baracat M.M., Georgetti S.R., Sasonia R.C., Verri Jr W.A., Casagrande R. Anti-inflammatory of betalain-rich dye of *Beta vulgaris*: effect on edema, leukocyte recruitment, superperoxide anion and cytokine production, *Arch. Pharm. Res.* 38 (2015) 494-504.

Mathy-Hartert M., Jacquemond-Collet I., Priem F., Sanchez C., Lambert C., Henrotin Y. Curcumin inhibits pro-inflammatory mediators and metalloproteinase-3 production by chondrocytes, *Inflamm. Res.: J. EHRS.* 58 (2009) 899–908.

Medzhitov R., Horng T. Transcriptional control of the inflammatory response, *Nat. reviews Immon.* 9(2009) 692-703.

Mesquita JR D., Araújo J.A.P., Catelan T.T.T, Souza A.W.S., Silva N.P., Andrade L.E.C., CRUVIEL W. M. Aspectos celulares e moleculares da inflamação, *Sin. Reu.* 1(2008) 66 – 81.

Mura P., Zerrouk N., Mennini N., Maestrelli F., Chemtob C. Development and characterization of naproxen–chitosan solid systems with improved drug dissolution properties, *Euro. J. of Pharma. Sci.* 19 (2003) 67-75.

Nathan C. Points of control in inflammation, *Nature.* 420 (2002) 846-852.

Oliveira M., Zanchet D., Zarbin A. Synthesis and characterization of silver nanoparticle/polyaniline nanobomposite, *Prog. Col. Polym. Sci.* 128 (2004) 126-130.

Paramera E.I., Konteles S.J., Karathanos V.T.. Microencapsulation of curcumin in cells of *Saccharomyces cerevisiae*, *Food Chemistry* 125 (2011) 892–902.

Riccioni G., Zanasi A., Vitulano N., Mancini B., D'Orazio N. Leukotrienes in atherosclerosis: new target insights and future therapy perspectives, *Mediators Inflammatory.* (2009) 1-6.

Rocha B.A., Gonçalves O.H., Leimann F.V., Rebecca E.S.W., Silva- Buzanello R.A., Filho L.C., Araújo P.H.H., Cuman R.K.N., Bersani-Amado C.A. Curcumin

encapsulated in poly-L-lactic acid improves its anti-inflammatory efficacy in vivo, *Adv. Med. Plant. Res.* 2 (2014) 62-73.

Sasikumar B. Genetic resources of Curcuma: diversity, characterization and utilization, *Pl. Gen.* 3 (2005), 230–251.

Serhan C.N., Brain S.D., Buckley C.D., Gilroy D.W., Haslett C., O’neill L.A., Perretti M., Rossi A.G., Wallace J.L. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms, *Faseb. J.* 21(2007) 325-332.

Sethia S., Squillante E. Solid dispersion of carbamazepine in PVP K30 by conventional solvent evaporation and supercritical methods, *Int. J of Pharma.* 272 (2004) 1-10.

Shah B.R., Li Y., Weiping J., Yaping N., Lei H.E., Zhenshun L.I., Wei X.U., Bin L. *Food Hydrocolloids.* 52 (2016) 369-377.

Shao J., Donghui Z., Zhifeng J., Huae X., Yong H., Xiaolin L., Xiaowei L. Curcumin delivery by methoxy polyethylene glycol poly(caprolactone) nanoparticles inhibits the growth of C6 glioma cells, *A. BioBiophS.* 11(2011) 1-8.

Silva-Buzanello R.A., Souza M.F., Oliveira D.A., Bona E., Leimann F.V., Filho L.C., Araújo P.H.H., Ferreira S.R.S., Gonçalves O.H. Preparation of curcumin-loaded nanoparticles and determination of the antioxidant potential of curcumin after encapsulation, *Pol.* 26 (2016) 207-214.

Silva M.C., Fideles T.B., Fook M.V.L. Esferas de quitosana e quitosana/curcumina pelo método de gelificação conotrópica: influência da incorporação do fármaco, *Rev. Eletro. Mat. Proces.* 10 (2015) 21-28.

Singh S., Basniwal R.K., Buttar H.S., Jain V. Curcumin nanoparticles: preparation, characterization, and antimicrobial study, *J. Agric. Food Chem.* 10 (2011) A-F.

Sitonio, M.M., Carvalho J.C.H., Campos A.I., Silva J.B., Lima C. M., Goes A.J., Maia M.B., Rolim P.J.N., Silva T.G. Anti-inflammatory and anti-arthritic activities of 3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol[1,2-b]pyran-5,6-dione (beta-lapachone), *Inflamm. Res.* 62 (2013) 107–113.

Souto E.B., Severino P., Santana M.H.A. Preparação de Nanopartículas Poliméricas a partir de Polímeros Pré-formados – Parte II, *Pol.* 22 (2011) 101-106.

Sun M., Su X., Ding B., He X., Liu X., Yu A., Lou H., Zhai G. Advances in nanotechnology-based delivery systems for curcumin, *J. Am. Chem. Soc.* 135 (2012) 9099–9110.

Thong-Ngam D., Choochuai S., Patumraj S., Chayanupatkul M., Klaikeaw N. Curcumin prevents indomethacin-induced gastropathy in Rats, *World J. Gastroent.* 18 (2012) 1479-1484.

Torchilin V.P., Levchenko T.S., Whitman K.R., Yaroslavov A.A., Tsatsaks A.M., Rizos A.K., Michaelova E.V., Shtilman M.I.. Amphiphilic poly-n-vinylpyrrolidones: synthesis, properties and liposome surface modification, *Biomaterials* 22 (2001) 3035-3044.

Valero M., Pérez-Revuelta B. I., Rodríguez L.J. Effect of PVP K-25 on the formation of the naproxen:  $\beta$ -cyclodextrin complex, *Int. J. of Pharma.* 253 (2003) 97-110.

Verri W.A.J., Souto F.O., Vieira S.M., Almeida S.C., Fukada S.Y., Alves-Filho J.C., Cunha T.M., Guerrero A.T., Mattos-Guimaraes R.B., Oliveira F.R., Teixeira M.M., Silva J.S., McInnes I.B., Ferreira S.H., Louzada-Junior P., Liew F.Y., Cunha F.Q. IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy, *Ann. Rheum. Dis.* 69 (2010) 1697-703.

Villalobos-Hernández J.R., Müller-Goymann C.C. Novel nanoparticulate carrier system based on carnauba wax and decyl oleate for the dispersion of inorganic sunscreens in aqueous media, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 60 (2005) 113–122

Winter C. A., Risley E.A., Nuss G.W. Carrageenan-induced oedema in hind paw on the rat as an assay for anti-inflammatory drugs, *P Soc. Exp. Biol. Med.* 111 (1962) 544-547.

Yallapu M.M., Gupta B.K., Jaggi M., Chauhan S.C. Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells, *J. Colloid Interf. Sci.* 351 (2010) 19-29.

Yen F.L., Wu T.H., Tzeng C.W., Lin L.T., Lin C.C. Curcumin Nanoparticles Improve the Physicochemical Properties of Curcumin and Effectively Enhance Its Antioxidant and Antihepatoma Activities, *J. of Agric. Food Chem.* 58 (2010) 7376-7382.

Yizengaw E., Getahun M., Tajebe F., Cervera E.C., Adem E., Mesfin G., Hailu A., Auwera G.V., Yardley V., Lemma M., Skhedy Z., Diro E., Yeshanew A., Melkamu R., Mengesha B., Modolell M., Munder M., Müller I., Takele Y., Kropf P. Visceral leishmaniasis Patients Display altered composition and Maturity of neutrophils as well as impaired neutrophil effector Functions, *Frontiers in Immun.* 7 (2016) 1-12.

Yu H., Huang Q. Enhanced in Vitro anti-cancer activity of curcumin encapsulated in hydrophobically modified starch, *Food Chem.* 119 (2010) 664-674.

Zhongfa L., Chiu M., Wang J., Chen W., Yen W., Fan-Havard P., Yee L.D., Chan K.K. Enhancement of curcumin oral absorption and pharmacokinetics of curcuminoids and curcumin metabolites in mice, *C. Chem. Pharm.* 69 (2012), 679-689.