

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL, ANTIOXIDANTE E ANTI-  
EDEMATOGENICA DE NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO CONTENDO  
RESVERATROL E/OU CURCUMINA

KARINE CORADINI

PORTO ALEGRE, 2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação da atividade antitumoral, antioxidante e anti-edematogênica de  
nanocápsulas de núcleo lipídico contendo resveratrol e/ou curcumina

Tese apresentada por **Karine Coradini** para  
obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências  
Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck

Porto Alegre, 2014

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 11.04.2014, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Christianne Gazzana Salbego  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Letícia Scherer Koester  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Marilise Escobar Burguer  
Universidade Federal de Santa Maria

Coradini, Karine

Avaliação da atividade antitumoral, antioxidante e anti-edematogênica de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo resveratrol e/ou curcumina / Karine Coradini. -- 2014.

192 f.

Orientador: Ruy Carlos Ruver Beck.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Nanocápsulas de núcleo lipídico. 2. resveratrol. 3. curcumina. 4. antioxidante. 5. gliomas. I. Ruver Beck, Ruy Carlos, orient. II. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Ruy Beck pela oportunidade concedida de trabalhar ao seu lado desde a iniciação científica até o doutorado. Pela confiança em mim depositada, excelente orientação, pelo exemplo de profissional e pela amizade.

À Profa. Dra. Sílvia S. Guterres e Profa. Dra. Adriana R. Pohlmann pelas oportunidades concedidas ao longo do doutorado, pelos valiosos ensinamentos e por toda atenção disponibilizada.

À Dra. Maike Windbergs, pela supervisão durante meu doutorado sanduíche na Universität des Saarlandes e pela atenção disponibilizada.

Ao Prof. Dr. José Cláudio F. Moreira e ao Dr. Alfeu Zanotto-Filho pela importante colaboração científica.

Ao Prof. Dr. Leandro M. Carvalho e à Dra. Fernanda Lima por terem me recebido tão bem em seu laboratório, pela colaboração, pela atenção e disponibilidade.

À Profa. Margarete L. Athayde pelo empréstimo do HPLC e por ter me recebido de portas abertas em seu laboratório.

À Profa. Maria Izabel U.M. da Rocha e à aluna Marina Vencato pelas avaliações histológicas e por toda dedicação ao meu trabalho.

À UFRGS e ao PPGCF pela oportunidade de realização deste doutorado.

Ao corpo docente do PPGCF pela dedicação e conhecimento transmitido.

À CAPES, pela bolsa de estudos e ao Probral/CAPES pela bolsa de doutorado sanduíche.

Aos amigos e colegas do laboratório 405 e K204 pelos agradáveis momentos e pelas trocas de experiências. Foi muito bom e gratificante conviver com todos.

Em especial às minhas queridas amigas Aline F. Ourique e Rossana Friedrich pelo apoio, pelas conversas, pela ajuda e por estarem sempre presentes quando precisei. Pelas pessoas maravilhosas que vocês são.

À Cássia B. Detoni, Karina Paese, Noé e Diego, pela oportunidade de ter trabalhado com vocês. Pela generosidade, por estarem sempre disponíveis para ajudar, pelos ensinamentos e, em especial, pela amizade que construímos. Vocês foram responsáveis por grande parte do meu aprendizado durante estes 4 anos. Foi uma oportunidade única ter convivido com vocês.

Às queridas bolsistas, Cláudia Melo e Ana Paula Battistel, pela amizade e pela responsabilidade e dedicação com que me auxiliaram nos experimentos.

Ao Manoel, Gabi e Denise pelos momentos de descontração, de risadas, de apoio, de ajuda e principalmente, pela amizade.

Ao Lucas Rigo e à Cristiane Carvalho, pela amizade e suporte dado durante meu doutorado sanduíche.

Ao meu noivo Marcos, que esteve sempre presente e foi capaz de compreender meus momentos de ausência. Obrigada pelo apoio, incentivo, carinho, ajuda e amizade.

À minha irmã, Cristina, pelo apoio, amizade e moradia neste último ano.

Aos meus queridos pais, Nilza e Edgar, por todo exemplo, tanto profissional como pessoal, pelo incentivo constante, pelo apoio incondicional, por serem quem são.

## APRESENTAÇÃO

Esta tese encontra-se dividida em quatro capítulos, visando uma melhor organização e apresentação dos resultados obtidos, dividindo-se da seguinte maneira:

- ❖ Introdução;
- ❖ Objetivos;
- ❖ Capítulo 1: Capítulo de livro a ser publicado que aborda as principais aplicações *in vivo* da curcumina associada a diferentes sistemas nanoestruturados;
- ❖ Capítulo 2: Artigo publicado em periódico científico referente à avaliação da atividade antitumoral da curcumina associada à nanocápsulas de núcleo lipídico em modelo animal de gliomas;
- ❖ Capítulo 3: Artigo aceito para publicação em periódico científico relativo ao desenvolvimento de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo a associação de resveratrol e curcumina, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e fotoestabilidade;
- ❖ Capítulo 4: Artigo a ser enviado a periódico científico, que aborda a avaliação da atividade anti-edematogênica do resveratrol e da curcumina co-encapsulados em nanocápsulas de núcleo lipídico empregando modelo animal de artrite induzida por adjuvante;
- ❖ Discussão geral;
- ❖ Conclusões;
- ❖ Referências bibliográficas;





## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	17
OBJETIVOS .....	23
CAPÍTULO 1: Nanoencapsulated curcumin: <i>in vivo</i> findings of its implications for human health.....	27
CAPÍTULO 2: Associação da curcumina à nanocápsulas de núcleo lipídico como uma estratégia para aumentar a eficácia farmacológica da curcumina no tratamento de gliomas .....	71
Revisão bibliográfica .....	73
Publicação 1: Curcumin-loaded lipid-core nanocapsules as a strategy to improve pharmacological efficacy of curcumin in glioma treatment .....	79
CAPÍTULO 3: Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> do resveratrol e da curcumina co-encapsulados em nanocápsulas de núcleo lipídico .....	97
Revisão bibliográfica .....	99
Publicação 2: Co-encapsulation of resveratrol and curcumin in lipid-core nanocapsules improves their <i>in vitro</i> antioxidant effects .....	103
CAPÍTULO 4: Avaliação da atividade anti-edematogênica de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo resveratrol e/ou curcumina.....	129
Revisão bibliográfica .....	131
Publicação 3: Resveratrol and curcumin co-encapsulated in lipid-core nanocapsules: <i>in vivo</i> anti-edematogenic effect on CFA-induced arthritis in rats.....	137
DISCUSSÃO GERAL .....	163
CONCLUSÕES .....	175
REFERÊNCIAS.....	179



## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

Figura 1. Número de publicações envolvendo o resveratrol e a curcumina nos últimos 20 anos.....	19
---	----

### CAPÍTULO 1

Figure 1. a) Increasing number of scientific publications available in the Web of Science database, b) Countries where most research has been conducted.....	32
--	----

Figure 2. a) Types of carriers used to design curcumin nanoformulations; b) Illustrative figures of the main nanocarriers employed to encapsulate curcumin.....	33
---	----

### CAPÍTULO 2

#### *Revisão bibliográfica*

Figura 1. Representação esquemática da nanocápsula de núcleo lipídico e das principais relevâncias físico-químicas e biológicas de seus constituintes...	75
--	----

Figura 2. Estrutura molecular da curcumina.....	76
---	----

Figura 3. Representação esquemática dos principais alvos moleculares da curcumina nos diferentes estágios da carcinogênese.....	77
---	----

#### *Publicação 1*

Figure 1. Profile of curcumin release from lipid-core nanocapsules (square) and from ethanolic solution (triangle) <i>in vitro</i> using the dialysis bag method.....	85
---	----

Figure 2. Curcumin uptake by glioma cells.....	86
--	----

Figure 3. Representative fluorescence microphotographs showing fluorescence of intracellular curcumin in non-encapsulated curcumin (C60, 60 $\mu$ M) and C-LNC (60 $\mu$ M) treatments after 6 h incubation in C6 cells.....	86
--	----

Figure 4. Comparative cytotoxicity of curcumin in solution and C-LNC against C6 and U251MG glioma cells.....	87
--	----

Figure 5. Cell cycle distribution and formation of acidic vacuoles in C6 cells.....	88
---	----

Figure 6: Antiglioma activity of C-LNC against C6 gliomas <i>in vivo</i> .....	89
--	----

Figure 7. Representative H&E analysis of brain.....	90
---	----

Figure 8. Hemolysis in red blood cells, and interaction with plasma proteins....	90
Supplementary Figure 1. A) Size distribution profiles obtained by laser diffraction. B) Transmission electron microscopy image. C) Particle size distribution profile and a frame of the video used to determine the particle size of C-LNC measured by Nanosight.....	93
Supplementary Figure 2. Delta backscattering (%) profiles.....	93
Supplementary Figure 3. Representative H&E analysis of liver, heart, kidney and lung tissues in saline and C-LNC treatments.....	94

### CAPÍTULO 3

#### *Revisão bibliográfica*

Figura 1. Representação esquemática dos principais efeitos biológicos do resveratrol e seus mecanismos de ação.....	100
---	-----

#### *Publicação 2*

Figure 1. Particle size distribution obtained by laser diffraction.....	113
Figure 2. Transmission electron image.....	115
Figure 3. Kinetic constants ( $k$ ) obtained from the <i>in vitro</i> antioxidant activity study.....	117
Figure 4. <i>In vitro</i> release profile of resveratrol (RC-LNC <sub>RESV</sub> ) and curcumin (RC-LNC <sub>CURC</sub> ) from lipid-core nanocapsules containing the association of both polyphenols.....	120
Figure 5. (a) Particle size distribution obtained by laser diffraction after 1, 2 and 3 months of storage (b) Turbiscan backscattering profile of lipid-core nanocapsules containing the association of resveratrol and curcumin.....	122

### CAPÍTULO 4

#### *Publicação 3*

Figure 1. Protocol schedule of the evaluation of antiedematogenic activity of resveratrol and/or curcumin, loaded or not in lipid-core nanocapsules, in CFA-induced arthritis in Wistar rats.....	144
Figure 2. Stability of curcumin-loaded lipid-core nanocapsules and curcumin co-encapsulated with resveratrol in physiological pH.....	147
Figure 3. Influence of polyphenols in solution on rat paw oedema at different time intervals after CFA-induced arthritis.....	148

Figure 4. Influence of nanoencapsulated polyphenols on rat paw oedema at different time intervals after CFA-induced arthritis.....	149
Figure 5. Histological scoring of right paw.....	151
Figure 6. Representative histological images of right hind paw.....	152
Figure 7. Total leucocyte count of control and arthritic rat.....	153

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Table 1. Influence of nanoencapsulation on curcumin pharmacokinetics.....	38
Table 2. Influence of nanoencapsulation on curcumin anti-inflammatory activity.....	43
Table 3. Nanoencapsulated curcumin exhibits antitumor effects against different cancer models.....	46
Table 4. Brain delivery by curcumin nanoencapsulation.....	53
Table 5. Nanoencapsulated curcumin for treatment of neurodegenerative diseases.....	56
Table 6. Nanoencapsulated curcumin: other applications.....	60

### CAPÍTULO 2

#### *Publicação 1*

Table 1: Physicochemical characteristics of C-LNC and B-LNC after preparation.....	85
Table 2. Histopathological parameters in C-LNC and curcumin treated C6-implanted rats.....	89
Table S1: Serum markers in C-LNC and curcumin treated C6-implanted rats...	95

### CAPÍTULO 3

#### *Publicação 2*

Table 1. Physicochemical properties of R-LNC, C-LNC, RC-LNC and B-LNC after preparation.....	114
Table 2. Photodegradation rate constants ( $k$ ) and half-lives ( $t_{1/2}$ ) of formulations exposed to UV irradiation.....	118

### CAPÍTULO 4

#### *Publicação 3*

Table 1. Physicochemical characteristics of lipid-core nanocapsules.....	147
Table 2. Differential leucocytes count.....	153
Table 3. Effect of the lipid-core nanocapsules containing the association of resveratrol and curcumin on marker enzymes in serum of CFA-induced arthritic rats.....	154

## RESUMO

A busca por tratamentos mais efetivos é um dos principais estímulos para novas pesquisas na área farmacêutica, dando suporte ao emprego da nanotecnologia. Além disso, a utilização de substâncias presentes em plantas, frutas e especiarias para o tratamento de doenças como câncer, associadas à inflamação e ao estresse oxidativo, têm despertado grande interesse da comunidade científica. No presente estudo, nanocápsulas de núcleo lipídico contendo resveratrol e/ou curcumina, dois fitoquímicos com inúmeros benefícios à saúde, foram desenvolvidas com o intuito de contornar as suas limitações e aumentar a sua eficácia terapêutica. Primeiramente, uma avaliação dos principais benefícios da nanoencapsulação da curcumina, tanto em sistemas lipídicos como poliméricos, foi realizada. Uma criteriosa revisão da literatura acerca das aplicações *in vivo* da curcumina nanoencapsulada demonstrou que os sistemas carreadores nanoestruturados são uma excelente ferramenta para aumentar a sua biodisponibilidade, a sua vetorização ao sistema nervoso central, bem como, seus efeitos terapêuticos. Na primeira etapa experimental deste estudo, o efeito antitumoral da curcumina associada à nanocápsulas de núcleo lipídico foi avaliado em modelo experimental de gliomas. Após ensaios *in vitro*, a maior citotoxicidade da curcumina nanoencapsulada com relação à curcumina em solução foi dependente da linhagem celular utilizada. No modelo *in vivo* de gliomas foi observado uma redução no tamanho e na malignidade do tumor, e um aumento da sobrevivência dos animais tratados com a curcumina associada às nanocápsulas. Em um segundo momento, nanocápsulas de núcleo lipídico contendo resveratrol e/ou curcumina com adequadas propriedades nanotecnológicas foram desenvolvidas. A associação dos polifenóis não influenciou nas características físico-químicas das suspensões. A nanoencapsulação foi capaz de diminuir a fotodegradação dos polifenóis e a co-encapsulação aumentou a fotoestabilidade do resveratrol. Ainda, a nanoencapsulação aumentou a atividade antioxidante dos polifenóis e um efeito mais pronunciado foi observado devido à co-encapsulação. Os resultados promissores obtidos *in vitro* estimularam a avaliação dos efeitos *in vivo* das nanocápsulas de núcleo lipídico contendo os polifenóis individualmente ou co-encapsulados. Para tal, utilizou-se o modelo animal de artrite induzida pelo Adjuvante Completo de Freund (CFA). Neste modelo, apenas os polifenóis nanoencapsulados foram capazes de reduzir o edema causado pela administração

do CFA. Uma maior atividade anti-edematogênica foi observada após a administração das nanocápsulas contendo a associação dos polifenóis, estando esta atividade acompanhada de uma redução do dano à cartilagem e ao osso e reduzida infiltração linfocitária no soro dos animais. Os resultados nesta tese demonstraram a viabilidade tecnológica da preparação de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo resveratrol e/ou curcumina, com potencial aplicação para o tratamento de tumores cerebrais e de doenças relacionadas ao estresse oxidativo e processos inflamatórios.

**Palavras-chave:** Nanocápsulas de núcleo lipídico, resveratrol, curcumina, gliomas, fotodegradação, atividade antioxidante e artrite reumatóide.



## ABSTRACT

The search for more effective treatments is one of the main stimuli for new researches in the pharmaceutical area, supporting the use of nanotechnology. Furthermore, the utilization of substances found in plants, fruits and spices to treat diseases like cancer, associated with inflammation and oxidative stress, have attracted great interest from the scientific community. In the present study, lipid-core nanocapsules containing resveratrol and/or curcumin, two phytochemicals with innumerable health benefits, were developed in order to circumvent its limitations and enhance their therapeutic efficacy. First, a review of the main benefits of curcumin-loaded to nanostructured systems, whether lipidic, polymeric or other type, were performed. A discerning review concerning *in vivo* applications of curcumin nanoencapsulated demonstrated that nanostructured carrier systems are an excellent tool to increase their bioavailability, the targeting to the central nervous system as well as its therapeutic effects. In the first experimental phase of this study, the antitumor effect of curcumin loaded in lipid-core nanocapsules was evaluated in experimental model of gliomas. After *in vitro* assays, the highest cytotoxicity of nanoencapsulated curcumin compared with solution of curcumin was dependent on the cell line used. In the *in vivo* model of gliomas, a reduction in the size and malignancy of the tumor and an increase in the survival rate were observed after treatments with curcumin-loaded nanocapsules. In a second step, lipid-core nanocapsules containing the association of resveratrol and curcumin with adequate nanotechnological properties were developed. The association of polyphenols did not influence the physicochemical characteristics of the suspensions. The nanoencapsulation was able to decrease the photodegradation of polyphenols and the co-encapsulation improved resveratrol photostability. Moreover, the nanoencapsulation increased the antioxidant activity of polyphenols and a more pronounced effect was observed due to the co-encapsulation. The promising *in vitro* results which were obtained stimulated the evaluation of *in vivo* effects of polyphenols encapsulated individually or associated in lipid-core nanocapsules. To that, a Complete Freund's Adjuvant (CFA)-induced arthritis model was used. In this model, only nanoencapsulated polyphenols were able to reduce the swelling caused by the administration of CFA. A higher anti-edematogenic activity was observed after administration of nanocapsules containing the combination of polyphenols, which

was accompanied by a reduction of the damage to the cartilage and bone and reduced lymphocyte infiltration in the serum of animals. The results of this thesis demonstrated the technical feasibility of preparation lipid-core nanocapsules containing resveratrol and/or curcumin, with a potential application for the treatment of brain tumors and diseases related with oxidative stress and inflammation process.

**Keywords:** Lipid-core nanocapsules, resveratrol, curcumin, gliomas, photodegradation, antioxidant activity and rheumatoid arthritis.





A utilização de substâncias naturais encontradas na dieta tem demonstrado inúmeros efeitos benéficos para a saúde humana (Gupta *et al.*, 2010). Destaca-se o uso do resveratrol e da curcumina, que devido as suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e antitumorais, vêm atraindo considerável atenção da comunidade científica (Bisht *et al.*, 2010). Através da Figura 1, podemos verificar o crescimento no número de publicações envolvendo estes polifenóis nas últimas duas décadas.

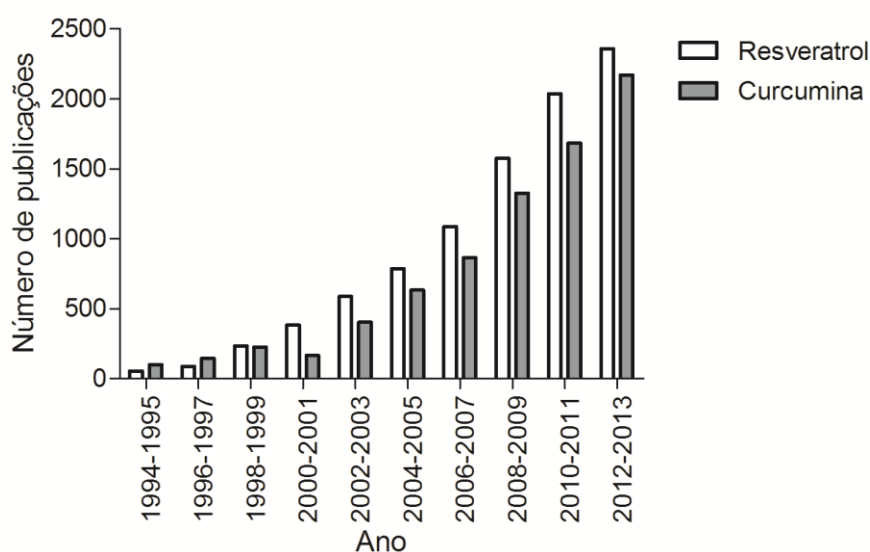


Figura 1. Número de publicações envolvendo o resveratrol e a curcumina nos últimos 20 anos. Os termos “resveratrol” e “curcumin” foram pesquisados na Web of Science (janeiro de 2014).

A curcumina é conhecida como o mais ativo constituinte da planta *Curcuma longa* (conhecida como turmerico). Como uma especiaria é a responsável pela cor e sabor do *curry*, tempero tradicionalmente utilizado na culinária indiana. Ainda, é utilizada como agente de coloração para diversos alimentos, como queijos, manteigas e mostardas (Goel *et al.*, 2008). Na medicina, vem sendo amplamente estudada para o tratamento de doenças inflamatórias, neurológicas e para a prevenção e tratamento dos mais diversos tipos de câncer (Gupta *et al.*, 2013). A curcumina é capaz de interagir com uma grande variedade de alvos moleculares, podendo afetar inúmeras cascatas bioquímicas e moleculares. Sabe-se que o câncer resulta da desregulação de múltiplas vias de sinalização celular e, acredita-se, que a habilidade da curcumina de interagir com diferentes alvos moleculares seja a chave para o seu potencial terapêutico contra o câncer (Anand *et al.*, 2008).

O resveratrol, assim como a curcumina, é um polifenol não flavonóide, que apresenta uma ampla gama de efeitos biológicos desejáveis (Smoliga *et al.*, 2011). O resveratrol é encontrado em uvas, frutas vermelhas, amendoim e outros alimentos que são comumente consumidos como parte da dieta humana. Ganhou destaque pelo fato conhecido como “Paradoxo Francês”, relação positiva entre o consumo de vinho tinto pelos franceses e a baixa incidência de doenças cardiovasculares, apesar de uma dieta rica em gorduras saturadas (Anekonda *et al.*, 2006). Atualmente, suas atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e antitumorais vêm sendo bastante exploradas (Aggarwal *et al.*, 2004; Reuter *et al.*, 2010; Schmatz *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, os efeitos positivos da combinação do resveratrol e da curcumina sobre marcadores do estresse oxidativo, da inflamação e na quimioprevenção vêm sendo observados (Csaki *et al.*, 2009; Aftab *et al.*, 2010; Malhotra *et al.*, 2010; Iwuchukwu *et al.*, 2011; Shakibaei *et al.*, 2011). Apesar dos inúmeros benefícios que o uso destes polifenóis fazem à saúde, a aplicação terapêutica é limitada, devido principalmente, a baixa solubilidade aquosa, instabilidade química e baixa biodisponibilidade. Entretanto, estas limitações podem ser superadas através da nanotecnologia.

Em paralelo, nanopartículas poliméricas vêm sendo extensamente estudadas como sistemas carreadores de fármacos no campo farmacêutico. Nanocápsulas de núcleo lipídico são uma classe de nanopartículas poliméricas formadas por um núcleo lipídico, constituído por um lipídio sólido (monoestearato de sorbitano) disperso em um lipídio líquido, e uma parede polimérica revestida com polissorbato 80 (Jager *et al.*, 2009, Fiel *et al.*, 2011). Estudos recentes demonstraram que estas partículas são promissoras carreadores de agentes terapêuticos devido à capacidade de proteger substâncias fotolábeis da degradação (Fontana *et al.*, 2009; Ourique *et al.*, 2010), controlar a liberação de fármacos lipofílicos (Fontana *et al.*, 2010) e diminuir os efeitos adversos (Benvegnú *et al.*, 2012; Dimer *et al.*, 2014). As nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas com polissorbato 80 apresentam uma liberação eficiente de diferentes substâncias no cérebro (Frezza *et al.*, 2010), demonstrando um aumento da eficácia farmacológica em modelos de glioma (Bernardi *et al.*, 2009b; Figueiró *et al.*, 2013) e doença neurológicas (Benvegnú *et al.*, 2011; Bernardi *et al.*, 2013, Frezza *et al.*, 2013; Hoppe *et al.*, 2013; Dimer *et al.*, 2014).

Os gliomas são o tipo mais comum de tumor cerebral primário e constituem uma forma frequente de morte por câncer (Ohgaki *et al.*, 2009). Os pacientes acometidos por essa doença apresentam diferentes sintomas que frequentemente alteram a qualidade de vida do paciente (Holland *et al.*, 2001). O tratamento convencional desses tumores tem surtido pouco efeito, com alta taxa de recorrência e progressão da doença (Hashem *et al.*, 2012). Da mesma forma, a artrite reumatóide, uma doença inflamatória crônica e debilitante, apresenta limitações no tratamento, uma vez que nem todos os pacientes respondem adequadamente e frequentemente efeitos adversos são observados. Devido às dificuldades no tratamento destas doenças destacamos a importância do estudo de novas substâncias e de estratégias terapêuticas para o tratamento de gliomas e artrite reumatóide. Ainda, salientamos a relevância no desenvolvimento de novas formulações contendo substâncias antioxidantes, uma vez que o estresse oxidativo está diretamente relacionado com a patogênese de diversas doenças, tais como, diabetes, doenças cardiovasculares, artrite reumatóide, doenças neurodegenerativas e câncer (Duracková *et al.*, 2010; Reuter *et al.*, 2010).

Considerando o exposto, este estudo tem como proposta geral o desenvolvimento de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo resveratrol e/ou curcumina, visando o aumento da eficácia antitumoral, antioxidante e anti-edematogênica destes compostos encapsulados individualmente ou co-encapsulados. Estes polifenóis foram selecionados para esse trabalho devido a sua baixa solubilidade aquosa, baixa biodisponibilidade e principalmente, devido às suas potencialidades terapêuticas.





**OBJETIVOS**

---

---



## **Objetivo geral**

Desenvolver nanocápsulas de núcleo lipídico contendo resveratrol e/ou curcumina, investigando a atividade antitumoral, antioxidante e anti-edematogênica destes compostos encapsulados individualmente ou co-encapsulados.

## **Objetivos específicos**

❖ Avaliar os benefícios da associação da curcumina a sistemas carreadores nanoestruturados em diferentes modelos *in vivo*, a partir de relatos científicos publicados nas duas últimas décadas;

❖ Produzir nanocápsulas de núcleo lipídico contendo curcumina, bem como avaliar *in vitro* a sua citotoxicidade em linhagens celulares de gliomas (C6 e U251MG) e principalmente, investigar o potencial antitumoral da curcumina nanoencapsulada em modelo animal de tumor cerebral;

❖ Produzir nanocápsulas de núcleo lipídico contendo resveratrol, curcumina ou resveratrol + curcumina, avaliando a influência da co-encapsulação nas características físico-químicas da formulação e investigando os seus benefícios na fotoproteção e na atividade antioxidante *in vitro* destes compostos;

❖ Avaliar o efeito anti-edematogênico *in vivo* do resveratrol e da curcumina encapsulados individualmente ou co-encapsulados em modelo animal de artrite induzida por CFA.



**CAPÍTULO 1:** Nanoencapsulated curcumin: *in vivo* findings for its health implication  
Capítulo de livro a ser publicado pela editora Nova Science Publisher, Inc. USA

---



O conteúdo presente no Capítulo 1 desta tese de doutorado refere-se a um capítulo de livro ainda não publicado, motivo pelo qual foi excluído da versão digital disponibilizada para a Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da UFRGS.































































































**CAPÍTULO 2:** Associação da curcumina à nanocápsulas de núcleo lipídico como uma estratégia para aumentar a eficácia farmacológica da curcumina no tratamento de gliomas

---



## Revisão bibliográfica

O câncer é a segunda maior causa de morte nos EUA, sendo superado somente pelas doenças cardíacas. Os tumores cerebrais não são o tipo de câncer de maior incidência, mas constituem uma forma frequente de morte por câncer. Os gliomas são o tipo mais comum de tumor cerebral primário, representando mais de 70% dos casos (Ohgaki *et al.*, 2009). Baseado nas características histopatológicas e no prognóstico desta doença, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou os tumores cerebrais de acordo com uma escala de malignidade (I-IV). O glioblastoma multiforme, classificado como grau IV, é o mais frequente e mais agressivo tipo de tumor cerebral (Louis *et al.*, 2007). Este é histologicamente caracterizado por uma massa intraparenquimal heterogênea, pela elevada hipercelularidade, pleomorfismo celular, necrose, hemorragia e excessiva vascularização (Wolburg *et al.*, 2012). Alterações na expressão de genes e anormalidades cromossômicas são frequentemente observadas em gliomas. As principais vias de controle e proliferação celular que se encontram alteradas no glioblastoma são a via PI3k/AKT, via da proteína p53 e via da proteína do retinoblastoma (Bleeker *et al.*, 2012). Ainda, a ativação anormal do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (Raychaudhuri *et al.*, 2007) e JAK/STAT3 (Senft *et al.*, 2011) estão envolvidos na malignidade do tumor.

Devido à elevada proliferação e invasividade, o tecido nervoso periférico ao tumor encontra-se comprometido e geralmente os pacientes apresentam dores de cabeça causadas pelo aumento da pressão intracraniana, convulsões, perda de memória e mudanças na personalidade (Holland *et al.*, 2001). Estes sintomas, frequentemente alteram a qualidade de vida do paciente.

A terapia padrão consiste na remoção cirúrgica associada à radioterapia e/ou quimioterapia. No entanto, o tratamento cirúrgico é comprometido devido à alta invasividade das células tumorais, o que dificulta a remoção completa do tumor e aumenta as chances de recorrência (Hashem *et al.*, 2012). Ainda, muitas das terapias oncológicas utilizadas para outros tipos de câncer não podem ser usadas para o tratamento dos gliomas devido, principalmente, a dificuldade dos fármacos penetrarem a barreira hematoencefálica (Allhenn *et al.*, 2012). A temozolamida, um agente alquilante de uso oral, é o quimioterápico de escolha utilizado no tratamento de gliomas. Seus efeitos adversos são menos proeminentes que os de quimioterápicos clássicos, mas mielossupressão, náuseas, vômitos, dores de

cabeça, fadiga e alopecia podem ser observados (Villano *et al.*, 2009). Apesar dos benefícios do tratamento, o prognóstico da doença é bastante desfavorável e o tempo de sobrevivência do paciente é em torno de 14 meses (Whestphal *et al.*, 2011). Devido às dificuldades no tratamento destacamos a importância do estudo de novas substâncias e de estratégias terapêuticas mais eficazes para o tratamento dos gliomas.

O uso de nanopartículas poliméricas como sistemas carreadores de fármacos vem sendo utilizado como uma abordagem para melhorar o desempenho terapêutico de substâncias no sistema nervoso central (Patel *et al.*, 2012). Nanopartículas poliméricas é um termo coletivo utilizado para diferentes tipos de nanopartículas formadas por polímeros, sendo especialmente empregado para nanoesferas e nanocápsulas. As nanoesferas possuem uma estrutura do tipo monolítica (matricial), ou seja, partículas onde a massa inteira é sólida e o fármaco pode estar disperso ou dissolvido na superfície ou encapsulado no interior das mesmas. Por outro lado, as nanocápsulas são sistemas vesiculares constituídas por um núcleo líquido oleoso cercado por uma parede polimérica. Geralmente a substância ativa encontra-se dissolvida no núcleo, mas também pode estar adsorvida na parede polimérica (Vauthier & Bouchemal, 2008; Mora-Huertas *et al.*, 2010).

Recentemente, outro tipo de nanopartículas poliméricas, denominada de nanocápsulas de núcleo lipídico, vem sendo utilizada por proporcionar a vetorização sustentada de fármacos a sítios alvo específicos, aumentando a eficácia terapêutica, característica fundamental para o tratamento de inúmeras doenças, incluindo neoplasias (Bernardi *et al.*, 2009a; Figueiró *et al.*, 2013), doenças inflamatórias (Bernardi *et al.*, 2009b) e neurológicas (Benvegnú *et al.*, 2011; Bernardi *et al.*, 2012; Frozza *et al.*, 2013; Hoppe *et al.*, 2013; Dimer *et al.*, 2014).

As nanocápsulas de núcleo lipídico diferem das nanocápsulas “convencionais” devido à presença de um lipídio sólido (monoestearato de sorbitano) disperso em um lipídio líquido no núcleo. Esta estrutura supramolecular está baseada em análises de calorimetria diferencial de varredura (DSC), espalhamento de raios x a baixos ângulos (SAXS) e estudos de liberação *in vitro* (Cruz *et al.*, 2006; Jäger *et al.*, 2009; Pohlmann *et al.*, 2013). A presença do monoestearato de sorbitano aumenta a viscosidade do núcleo, influenciando o perfil de liberação de fármacos (Jäger *et al.*, 2009).

As nanocápsulas de núcleo lipídico são preparadas utilizando poli(epsilon-caprolactona) como polímero biodegradável e biocompatível e revestidas com polissorbato 80. Através de estudos de toxicidade aguda e subcrônica, a segurança *in vivo* destas partículas foi demonstrada após administração intraperitoneal em ratos (Bulcão *et al.*, 2012).

A Figura 1 é uma representação esquemática da composição das nanocápsulas de núcleo lipídico e suas principais influências no comportamento físico-químico e biológico destas nanoestruturas.

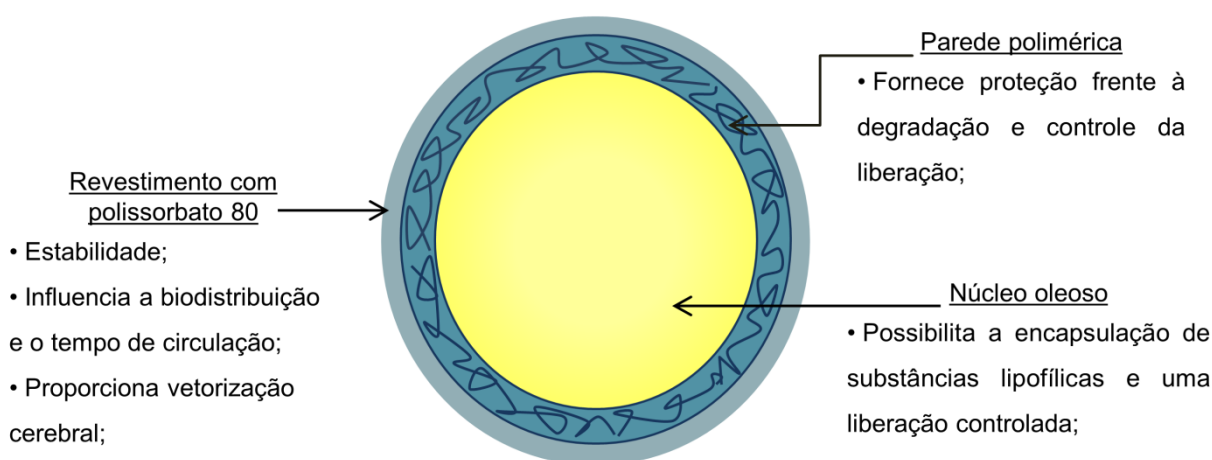


Figura 1. Representação esquemática da nanocápsula de núcleo lipídico e das principais relevâncias físico-químicas e biológicas de seus constituintes.

Através da encapsulação de fármacos ou substâncias ativas lipossolúveis em nanocápsulas de núcleo lipídico é possível obter uma melhora na solubilidade e estabilidade (Ourique *et al.*, 2010), bem como uma liberação controlada em função do tempo (Jäger *et al.*, 2009). Estudos recentes demonstram que estas partículas têm a habilidade de aumentar a biodistribuição dos agentes terapêuticos no sítio alvo específico, resultando numa melhor eficácia terapêutica (Bernardi *et al.*, 2012, Frozza *et al.*, 2013). Ainda, a vetorização e o controle da liberação levam a uma diminuição de efeitos adversos, uma vez que baixas concentrações do fármaco atingem os tecidos saudáveis (Bernardi *et al.*, 2009a; Frozza *et al.*, 2010; Benvegnú *et al.*, 2012). Possivelmente devido ao aumento da estabilidade e da biodistribuição no local de ação, baixas concentrações são requeridas para obtenção da eficácia terapêutica (Hoppe *et al.*, 2013; Jaques *et al.*, 2013).

O uso de carreadores coloidais, principalmente os revestidos com polissorbato 80, vem sendo associado a uma importante vantagem como a possibilidade de carrear fármacos através da barreira hematoencefálica, constituindo uma estratégia promissora para o tratamento de doenças neurodegenerativas e tumores cerebrais (Garcia-Garcia *et al.*, 2005, Patel *et al.*, 2012). Utilizando nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas com polissorbato 80, Bernardi e colaboradores (2009a, 2012) verificaram um aumento nos níveis de indometacina no cérebro de ratos em modelo animal de gliomas e Alzheimer. O mesmo foi observado por Frozza e colaboradores (2010, 2013) após administração oral e intraperitoneal de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo resveratrol em ratos saudáveis e em modelo de Alzheimer.

A curcumina, um composto amarelo-laranja extraído do rizoma da cúrcuma (*Curcuma longa*), é tradicionalmente utilizada na culinária e na medicina indiana (Ayurveda) (Figura 2). Em alimentos é comumente encontrada em *curries* e mostardas (Hatcher *et al.*, 2008). Este polifenol vem sendo intensamente pesquisado para o tratamento de diferentes doenças devido, principalmente, às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Goel *et al.*, 2008). Devido ao seu potencial neuroprotetor, diversos estudos experimentais sugerem o uso da curcumina para a prevenção e tratamento de doenças neurodegenerativas associadas à idade, como Alzheimer e Parkinson (Ishrat *et al.*, 2009; Awasthi *et al.*, 2010).

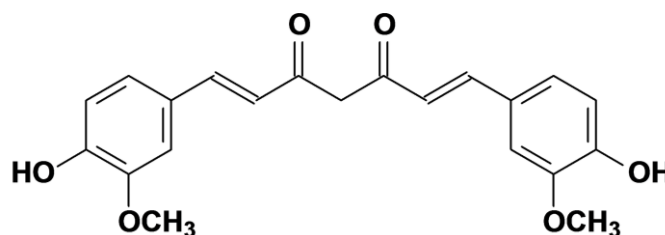


Figura 2. Estrutura molecular da curcumina.

Ainda, a curcumina inibe a etapa de iniciação do câncer, prevenindo a ativação da carcinogênese, e inibe a proliferação de células malignas durante a promoção e progressão do tumor (Goel *et al.*, 2008). A Figura 3 mostra, de forma simplificada e esquemática, os principais alvos moleculares da curcumina nos diferentes estágios da carcinogênese. Pela capacidade de modular diversas vias de sinalização envolvidas na carcinogênese, este polifenol é considerado uma grande promessa

como agente terapêutico na prevenção e no tratamento dos mais diversos tipos de câncer (Anand *et al.*, 2008). Recentemente um estudo demonstrou o efeito citotóxico potente e seletivo da curcumina em linhagens celulares de glioblastomas e implantes de gliomas *in vivo*. Este trabalho foi o segundo a avaliar o efeito antiglioma *in vivo* da curcumina e o primeiro a avaliar em animais imunocompetentes, utilizando células C6 (Zanotto-Filho *et al.*, 2012).

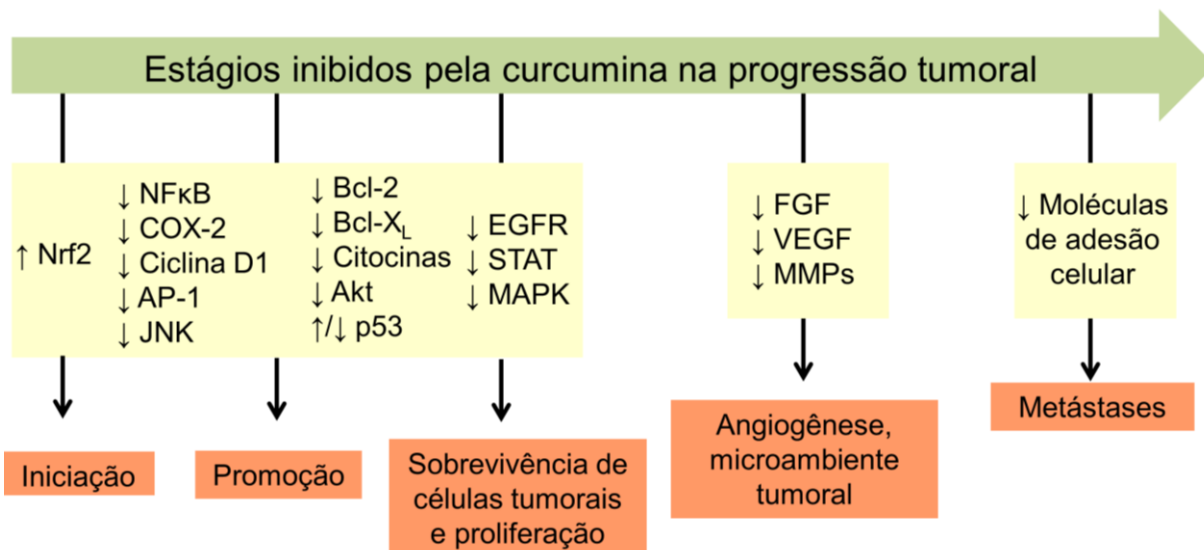


Figura 3. Representação esquemática dos principais alvos moleculares da curcumina nos diferentes estágios da carcinogênese. Estes incluem, Nrf2, fator nuclear relacionado ao fator-2; NFκB, fator nuclear κB; COX-2, ciclooxigenase-2; ciclina D1; AP-1, proteína ativadora 1; JNK, proteína cinase c-Jun N-terminal; Akt, proteína cinase B; EGFR, receptor de fator de crescimento endotelial; STAT, transdutor de sinal e ativador de transcrição; MAPK, proteína cinase ativada por mitógenos; FGF, fator de crescimento de fibroblasto; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular; MMPs, metaloproteinases. Adaptado de Hatcher *et al.*, 2008.

A curcumina é insolúvel em água, em pH ácido ou neutro. Sua solubilidade aumenta em pH elevado, no entanto, em pH neutro a alcalino ocorre a sua degradação hidrolítica. Logo, o preparo de formulações que possuam uma solubilidade adequada para a curcumina e estabilidade em pH fisiológico é um desafio (Tonnesen *et al.*, 2002). Apesar da baixa solubilidade aquosa, a curcumina é solúvel em acetona, etanol e DMSO. Seu ponto de fusão é de 183 °C, peso molecular de 368,37 g/mol e log P de aproximadamente 2,5 (Fujisawa *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2005). Devido a sua fotossensibilidade, amostras contendo curcumina devem ser protegidas da luz (Tonnesen *et al.*, 2002). Com relação à farmacocinética, a absorção da curcumina é baixa, possui um extenso metabolismo hepático e intestinal e é rapidamente eliminada, fatores estes, que contribuem para

sua baixa biodisponibilidade (Anand *et al.*, 2007). Para superar as limitações referentes à baixa solubilidade aquosa, instabilidade química, baixa biodisponibilidade e assim, aumentar a eficácia da curcumina, algumas estratégias vêm sendo abordadas, como, por exemplo, a associação da curcumina a sistemas nanocarreadores de fármacos (Wang *et al.*, 2011).

Baseada nas potencialidades da curcumina para o tratamento de tumores cerebrais e na capacidade que as nanopartículas possuem em aumentar a biodistribuição cerebral de fármacos, o objetivo deste capítulo foi desenvolver nanocápsulas de núcleo lipídico contendo curcumina, caracterizá-las quanto as suas características nanotecnológicas, avaliar *in vitro* a captação e a citotoxicidade desta formulação em células de glioma C6 e U251MG e, principalmente, avaliar os efeitos da curcumina nanoencapsulada em modelo *in vivo* de gliomas.



**PUBLICAÇÃO 1:** Curcumin-loaded lipid-core nanocapsules as a strategy to improve pharmacological efficacy of curcumin in glioma treatment

Artigo publicado no periódico European Journal of Pharmaceutics and

Biopharmaceutics

---



O conteúdo presente na *Publicação 1* desta tese de doutorado encontra-se publicado no periódico científico *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (Zanotto-Filho, A.; Coradini, K.; Braganhol, E. et al. Curcumin-loaded lipid-core nanocapsules as a strategy to improve pharmacological efficacy of curcumin in glioma treatment. *European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics*, v. 83, p. 156-167, 2013), motivo pelo qual foi excluído da versão digital disponibilizada para a Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da UFRGS.



































**CAPÍTULO 3:** Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do resveratrol e da curcumina co-encapsulados em nanocápsulas de núcleo lipídico

---



## Revisão bibliográfica

Estudos epidemiológicos sugerem que uma dieta rica em frutas, vegetais e especiarias está relacionada com a prevenção do desenvolvimento de doenças crônicas, como doenças neurológicas, cardiovasculares, diabetes e alguns tipos de câncer (Pandey *et al.*, 2009). Em particular, dois polifenóis não-flavonóides, o resveratrol e a curcumina, são foco de pesquisas devido aos seus inúmeros efeitos benéficos à saúde humana.

O resveratrol (3,5,4'-triidroxiestilbeno) é encontrado em alimentos e bebidas. Sua fonte mais conhecida é a uva e o vinho tinto, mas também pode ser encontrado no amendoim e na amora. Esta fitoalexina é produzida nas plantas em resposta a estímulos ambientais, como radiação UV e infecções fúngicas (Frémont *et al.*, 2000). O resveratrol existe sob duas formas isômeras, *cis*- (*Z*) e *trans*- (*E*), sendo a forma *trans*- a mais estudada provavelmente por se tratar da forma comercialmente disponível (Amri *et al.*, 2012). Além disso, estudos comparativos entre os isômeros demonstraram que a presença da conformação *trans*- é fundamental para a inibição da proliferação celular (Stivala *et al.*, 2001) e para a diminuição da adesão leucocitária no endotélio induzida pela angiotensina-II (Rius *et al.*, 2010). No entanto, o *trans*-resveratrol é uma substância fotossensível e após exposição à radiação UV é rapidamente convertido em *cis*-resveratrol (Detoni *et al.*, 2012). Levando em consideração que o *trans*-resveratrol é responsável pelos efeitos biológicos, torna-se importante o desenvolvimento de formulações capazes de protegê-lo da fotodegradação.

Este polifenol apresenta ponto de fusão entre 253 e 255 °C, peso molecular de 228,25 g/mol e seu log P é 3,1. Apresenta solubilidade em etanol e DMSO, no entanto, é praticamente insolúvel em água (Amri *et al.*, 2012). A absorção do resveratrol após administração oral é alta (cerca de 70%). Seu tempo de meia-vida na circulação sanguínea é curto, aproximadamente 30 minutos. Ainda, sua biodisponibilidade é quase nula, devido principalmente ao rápido metabolismo nos enterócitos e rápida eliminação (Walle *et al.*, 2004). De acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica é considerado um composto de classe-II uma vez que apresenta baixa solubilidade e elevada permeabilidade (Amri *et al.*, 2012).

O resveratrol possui uma variedade de propriedades biológicas que contribuem para seus efeitos benéficos na prevenção e tratamento de diversas patologias como,

por exemplo, doenças cardiovasculares (Rius *et al.*, 2010), neurodegenerativas (Sharma *et al.*, 2002; Simão *et al.*, 2011), diabetes (Bhatt *et al.*, 2012; Ramar *et al.*, 2012), obesidade (Rayalam *et al.*, 2008) e câncer (Lee *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2012). Algumas das potenciais aplicações do resveratrol e os mecanismos de ação propostos podem ser visualizadas na Figura 1. Uma das propriedades mais relevantes é a sua atividade antioxidante uma vez que o estresse oxidativo está associado a inúmeras patologias (Reuter *et al.*, 2010; Schmatz *et al.*, 2012). Seu potencial antioxidante se deve à presença dos grupos hidroxilas na sua estrutura, sendo o grupo 4'-OH o mais reativo e indispensável para seu efeito (Stivala *et al.*, 2001).

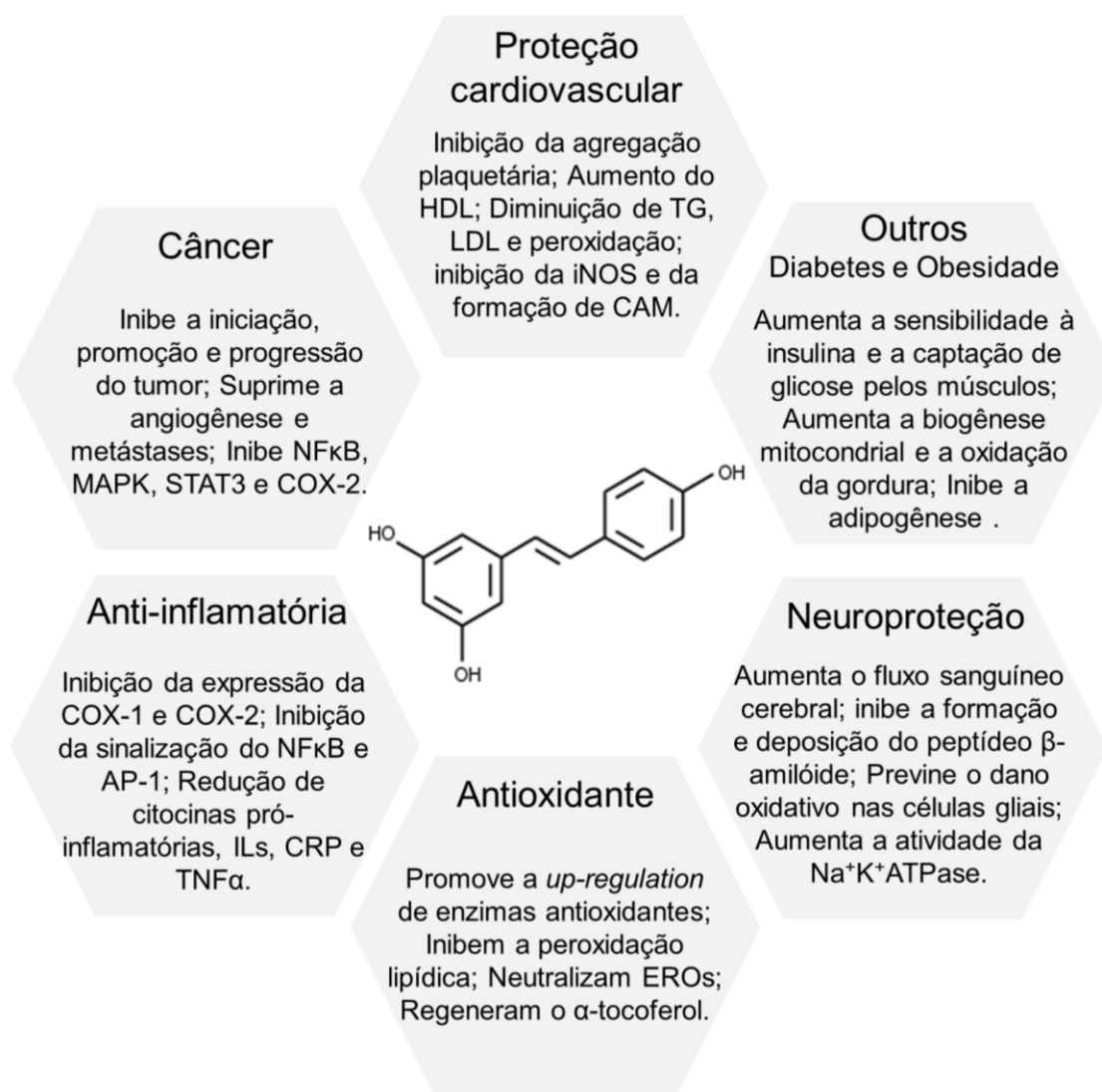


Figura 1. Representação esquemática dos principais efeitos biológicos do resveratrol e seus mecanismos de ação. Adaptado de Chachay *et al.*, 2011.

Carreadores coloidais constituem uma estratégia promissora para contornar os problemas de degradação e de farmacocinética que o resveratrol apresenta (Frezza *et al.*, 2010; Teskac *et al.*, 2010; Coimbra *et al.*, 2011; Amri *et al.*, 2012; Detoni *et al.*, 2012). A fim de aumentar a solubilidade, a fotoestabilidade e a biodisponibilidade do resveratrol, este polifenol vem sendo associado a diferentes sistemas nanoestruturados, como lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, ciclodextrinas, nanoesferas e nanocápsulas de núcleo lipídico (Amri *et al.*, 2012).

Recentemente foi demonstrado que nanocápsulas de núcleo lipídico são capazes de proteger o resveratrol da degradação após exposição à radiação UVA (Detoni *et al.*, 2012). Ainda, após administração oral e intraperitoneal de resveratrol associado à nanocápsulas de núcleo lipídico em ratos saudáveis, maiores quantidades deste polifenol foram encontradas no cérebro, rim e fígado, órgãos frequentemente associados a doenças crônico degenerativas. Neste mesmo estudo verificou-se que a sua associação às nanocápsulas diminuiu o dano gastrointestinal causado pelo resveratrol na forma livre (Frezza *et al.*, 2010). Em 2013, o mesmo grupo de pesquisa demonstrou um aumento no efeito neuroprotetor do resveratrol nanoencapsulado, acompanhado de maiores níveis no cérebro, em modelo animal de doença de Alzheimer quando comparado com o resveratrol em solução (Frezza *et al.*, 2013). Em modelo animal de glioma, um maior efeito antitumoral foi observado devido à nanoencapsulação (Figueiró *et al.*, 2013).

Assim como o resveratrol, a curcumina é uma grande promessa como agente terapêutico. A curcumina constitui um dos principais temperos utilizados na culinária indiana (Hatcher *et al.*, 2008). Estudos pré-clínicos realizados nas últimas três décadas demonstraram a eficácia da curcumina para diferentes doenças e formaram uma base sólida para a avaliação da eficácia da curcumina em humanos. Diversas pesquisas clínicas foram concluídas e outras vêm sendo conduzidas para avaliar a eficácia da curcumina principalmente para o câncer, condições inflamatórias e neurológicas, artrite e diabetes. A curcumina vem sendo usada como suplemento alimentar em diferentes países e é comercializada na forma de cápsulas, comprimidos, sopas, drinques energéticos e cosméticos (Gupta *et al.*, 2013).

Muitas das atividades biológicas da curcumina podem ser atribuídas às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Menon *et al.*, 2007). Devido à capacidade de neutralizar os radicais livres e aumentar a atividade de enzimas antioxidantes no cérebro, o uso da curcumina vêm sendo associado à prevenção e

tratamento de doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson (Bala *et al.*, 2006; Ishrat *et al.*, 2009; Ataie *et al.*, 2010). Recentemente foi demonstrado que os grupos fenólicos OH são os principais responsáveis pela atividade antioxidante da curcumina (Barzegar *et al.*, 2012). No entanto, a sua estrutura  $\beta$ -dicetônica também contribui para esta atividade (Sharma *et al.*, 2005).

Recentemente, os efeitos positivos da combinação do resveratrol e da curcumina sobre marcadores do estresse oxidativo e na quimioprevenção vêm sendo estudados (Aftab *et al.*, 2010; Malhotra *et al.*, 2010; Iwuchukwu *et al.*, 2011). Em 2009, Narayanan e colaboradores demonstraram que após a combinação lipossomal do resveratrol e da curcumina ocorre uma melhora no efeito quimiopreventivo destes compostos sobre o câncer de próstata. Nos estudos realizados *in vitro*, a associação dos compostos inibiu efetivamente o crescimento tumoral, promoveu a apoptose e induziu um efeito inibitório sobre as proteínas envolvidas na progressão do tumor. A combinação lipossomal destes compostos diminuiu o adenocarcinoma prostático *in vivo*. Ainda, um aumento na biodisponibilidade da curcumina após a co-administração de lipossomas de curcumina e lipossomas de resveratrol foi observado. Este é o único estudo envolvendo o uso de nanocarreadores e a combinação destes polifenóis. Ainda, cabe ressaltar que neste último estudo foi realizado a co-administração e não a co-encapsulação do resveratrol e da curcumina.

Considerando a relação do estresse oxidativo com diversas doenças e o potencial antioxidante do resveratrol e da curcumina, o objetivo deste capítulo foi de estudar a co-encapsulação destes polifenóis em nanocápsulas de núcleo lipídico a fim de se obter um sistema de liberação efetivo, buscando um aumento da estabilidade química e da atividade antioxidante.



**PUBLICAÇÃO 2: Co-encapsulation of resveratrol and curcumin in lipid-core nanocapsules improves their *in vitro* antioxidant effects**

Artigo aceito para publicação no European Journal of Pharmaceutics and  
Biopharmaceutics

---



O conteúdo presente na *Publicação 2* desta tese de doutorado encontra-se aceito para publicação no periódico científico *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (Coradini, K., Lima, F.O., Oliveira, C.M., *et al.* Co-encapsulation of resveratrol and curcumin in lipid-core nanocapsules improves their in vitro antioxidant effects. *European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics*, 2014, *in press*), motivo pelo qual foi excluído da versão digital disponibilizada para a Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da UFRGS.





















































**Capítulo 4:** Avaliação da atividade anti-edematogênica de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo resveratrol e/ou curcumina

---



## Revisão bibliográfica

A artrite reumatóide é uma doença sistêmica autoimune caracterizada pela inflamação crônica das articulações sinoviais. Acomete aproximadamente 1% da população, preferencialmente do sexo feminino, entre os 30 e 50 anos de vida (Gaffo *et al.*, 2006). Geralmente afeta pequenas articulações como a dos pulsos, mãos e pés. A inflamação da membrana sinovial resulta em dor, rigidez matinal prolongada, inchaço e deformidade. O quadro clínico com a progressão da doença se manifesta potencialmente incapacitante devido aos danos à cartilagem e aos ossos, podendo levar até mesmo a morte. Trata-se de uma doença bastante heterogênea onde a gravidade, progressão, manifestações extra articulares e resposta ao tratamento variam entre os indivíduos (Worthington, 2005).

A liberação de mediadores químicos originados nos tecidos lesionados e pelas células migratórias induz a inflamação sinovial e o dano às articulações. O tecido inflamado é caracterizado pela infiltração de linfócitos (células T CD4+), citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1), prostaglandinas (COX-2), expressão de moléculas de adesão, metaloproteinases de matriz e hiperproliferação de fibroblastos sinoviais. Todos esses fatores são regulados pela ativação do fator nuclear  $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\text{B}$ ). A produção de linfócitos T (Th17), produtores de IL-17, também possui papel importante no desenvolvimento da doença (Choy *et al.*, 2001; McInnes *et al.*, 2007). Conseqüentemente, estes mediadores químicos são potenciais alvos terapêuticos para a artrite reumatóide.

As terapias atuais para o tratamento da artrite reumatóide consistem na utilização de anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), glicocorticóides, anti-reumatóides modificadores da doença (ARMDs) e, atualmente têm-se também os modificadores da resposta biológica. Os AINEs e os glicocorticóides são utilizados para fins paliativos, minimizando a dor e a inflamação, mas não impedem a progressão da doença. Os glicocorticóides são mais potentes que os AINEs em inibir a inflamação articular, no entanto, não podem ser utilizados por longos períodos devido aos seus efeitos adversos. Após o diagnóstico, a terapia com ARMDs deve ser instalada. O metotrexato, um potente imunossupressor, faz parte desta classe de medicamentos e é reconhecido como o fármaco de referência para o tratamento da artrite reumatóide (Gaffo *et al.*, 2006). No entanto, alguns pacientes não respondem ao

tratamento e continuam a apresentar sintomas clínicos e destruição progressiva das articulações, além da terapia causar efeitos adversos graves (Agarwal, 2011). Aprovados pelo FDA para o tratamento da artrite, os agentes biológicos (exemplo, inibidores da IL-1 e TNF- $\alpha$ ) constituem uma nova estratégia terapêutica. Os inibidores do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) são os mais utilizados, uma vez que esta é a citocina chave do processo inflamatório da artrite reumatóide (Feldmann, 2002). A inibição da TNF- $\alpha$ , uma importante citocina na regulação do sistema imunológico, diminui a resistência às infecções. Devido a isso, pacientes que fazem uso desses agentes devem ser anualmente examinados quanto à tuberculose e vacinados contra pneumonia, influenza e hepatite B (Agarwal, 2011). Uma melhor compreensão da patogenia da artrite reumatóide levou a importantes descobertas de novas terapias, como é o caso dos inibidores da TNF- $\alpha$ . No entanto, a AR é uma doença heterogênea, e muitas questões a respeito de sua patogenia ainda estão sem resposta, logo, a remissão completa é alcançada somente por uma minoria de pacientes. Somado aos efeitos adversos e ao custo elevado das terapias atuais, o desenvolvimento de novas terapias para a artrite reumatóide é necessário (Bevaart *et al.*, 2010).

Modelos animais de artrite reumatóide constituem uma ferramenta importante para o desenvolvimento e avaliação de novas terapias. Os três modelos mais utilizados são o de artrite induzida por adjuvante (AIA) em ratos e artrite induzida por colágeno (CIA) em ratos e camundongos (Hegen *et al.*, 2008). Outros modelos incluem artrite induzida por fragmentos da parede celular de estreptococos (SCW), induzida por proteoglicanos (PGIA) e o uso de animais transgênicos. Cada modelo animal exhibe similaridades e diferenças em relação à artrite reumatóide em humanos. Revisões sobre o tema vêm abordando a relação entre os dados de eficácia pré-clínica utilizando estes modelos com os resultados dos estudos clínicos e chegaram à conclusão de que não existe uma orientação definitiva do modelo que melhor prediz os resultados clínicos (Bevaart *et al.*, 2010).

O modelo animal de artrite induzida por adjuvante foi o primeiro modelo descrito e destaca-se pela facilidade de realização, reprodutibilidade dos dados e duração razoável do período de teste (Bendele *et al.*, 2001). A administração intraplantar do Adjuvante Completo de Freund (CFA) na pata dos ratos induz rapidamente o processo inflamatório, onde os sinais clínicos geralmente aparecem 10 dias após a

administração na pata. Inflamação poliarticular, infiltração linfocitária, degradação da cartilagem e destruição óssea podem ser observados (Hegen *et al.*, 2008). Ocorre a expressão de citocinas inflamatórias como IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 nas articulações (Bevaart *et al.*, 2010).

Sistemas nanocarreadores de fármacos vêm sendo investigados como uma maneira de melhorar o efeito terapêutico e diminuir os efeitos adversos de fármacos para o tratamento da artrite reumatóide (Tarner *et al.*, 2008). Os possíveis mecanismos para obtenção de um sistema terapêutico mais eficaz são relacionados, principalmente, com três principais vantagens dos sistemas nanoestruturados. Primeiramente, um aumento na estabilidade e na biodisponibilidade de fármacos pode ser obtido devido à nanoencapsulação, sendo este aumento relacionado, principalmente, com as características físico-químicas das nanopartículas, como tamanho, superfície e morfologia (Duan *et al.*, 2013). Em segundo lugar, estudos na literatura demonstram a vetorização de substâncias encapsuladas ao sítio de inflamação, levando a um aumento na especificidade e na eficácia do fármaco (Metselaar *et al.*, 2003; Ishihara *et al.*, 2009). O tecido inflamado apresenta uma elevada permeabilidade microvascular, semelhante à observada nos tumores sólidos, e as nanopartículas tendem a se acumular nestes tecidos. Esse fenômeno é conhecido como efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR) (van den Hoven *et al.*, 2011; Maeda *et al.*, 2013). Utilizando nanocápsulas de núcleo lipídico, Bernardi e colaboradores (2009a) verificaram um aumento na concentração de indometacina no cérebro de animais com gliomas, um tumor sólido, quando comparado ao fármaco em solução. Maiores concentrações foram observadas no hemisfério onde o tumor foi induzido quando comparado com o hemisfério contralateral ("saudável"). Os mesmos autores verificaram um aumento dos efeitos terapêuticos e uma diminuição dos efeitos adversos gastrointestinais da indometacina associada à nanocápsulas de núcleo lipídico em modelo animal de artrite reumatóide induzida por CFA (Bernardi *et al.*, 2009b). Em terceiro lugar, a liberação do fármaco a partir do nanocarreador deve ser de maneira eficiente e controlada no local de ação, possibilitando desta forma, a redução dos efeitos adversos. Resumidamente, estas vantagens acarretam num aumento da eficácia terapêutica, com redução da frequência e da dose administrada, e conseqüentemente, dos efeitos adversos.

Associado às potencialidades dos sistemas nanocarreadores de fármacos, a utilização do resveratrol e da curcumina, dois compostos naturais com propriedades anti-inflamatórias, constituem uma importante alternativa para o tratamento da artrite reumatóide (Khanna *et al.*, 2007).

O resveratrol é um potente inibidor de moléculas inflamatórias. O resveratrol inibe a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e suprime a expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ . Além disso, inibe a expressão da enzima COX-2 e de metaloproteinases de matriz (Aggarwal *et al.*, 2004, Shakibaei *et al.*, 2008). Estudos recentes sugerem que este fitoquímico desempenha um papel importante na prevenção e no tratamento da artrite reumatóide. Nakayama e colaboradores (2012) demonstraram que o resveratrol é capaz de prevenir a hiperplasia de células sinoviais, um fator crítico na artrite reumatóide, através da redução da viabilidade de células MH7A (linhagem celular de artrite reumatóide humana). Recentemente, o efeito preventivo e terapêutico do resveratrol foi demonstrado em modelo de artrite induzida por colágeno em camundongos. Duas doses (15 e 20 mg/Kg), administradas intraperitonealmente, foram testadas mas somente a maior dose foi capaz de atenuar os parâmetros clínicos e a erosão óssea. O efeito protetor foi associado à diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1, IL-4 e IL-17), supressão de IgG colágeno-específica e redução no número de células T-helper 17 (Th17) (Xuzhu *et al.*, 2012). Em 2013, Chen e colaboradores demonstraram a ação terapêutica do resveratrol em modelo animal de artrite induzida por CFA. Sua ação foi associada com o balanço na secreção de citocinas (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) pelos sinoviócitos e com a modulação do sistema imune.

Além do importante efeito anti-inflamatório demonstrado pelo resveratrol, também foi verificado que esta substância é capaz de apresentar efeitos antinociceptivos após insulto inflamatório com carragenina em ratos. A administração intraperitoneal de 2 mg/Kg de resveratrol foi capaz de atenuar a dor durante 48 horas e este efeito foi relacionado com a capacidade do resveratrol prevenir o aumento dos níveis de COX-2 induzido pela carragenina (Pham-Marcou *et al.*, 2008). Considerando que a dor é um dos sintomas clínicos da artrite reumatóide, é importante que a terapêutica utilizada para o tratamento também seja capaz de aliviar esse sintoma.



A curcumina, um polifenol extraído do turmérico (também chamado de açafrão-da-terra), tem uma longa história na medicina Ayurveda para o tratamento de condições inflamatórias (Jurenka, 2009). É considerada uma molécula pleiotrópica, pois é capaz de modular a expressão de diversas citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12) e quimiocinas, provavelmente pela inibição do NF- $\kappa$ B. Ainda, diminui a atividade das enzimas COX-2, lipoxigenase e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Bisht *et al.*, 2010; Basnet *et al.*, 2011).

Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que a curcumina constitui um potencial tratamento para a artrite. Em 2009, MUN e colaboradores demonstraram que após administração oral de curcumina (4-100 mg/Kg) ela foi capaz de suprimir a artrite induzida por colágeno em camundongos, sendo seu efeito comparável a administração da indometacina, um anti-inflamatório comumente utilizado para o tratamento da artrite reumatóide. MOON e colaboradores (2010) demonstraram, utilizando testes *in vivo* e *in vitro*, que a administração de 25  $\mu$ g de curcumina em 25  $\mu$ L de DMSO, i.p, durante duas semanas, é capaz de suprimir a resposta inflamatória através da inibição de mediadores pró-inflamatórios (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) e regulação da resposta imune humoral e celular. Quando administrada em combinação com o metotrexato, a curcumina (30 e 100 mg/Kg) foi capaz de potencializar o efeito anti-artrítico do imunossupressor e minimizar a hepatotoxicidade causada por ele em modelo de artrite induzida por CFA (Banji *et al.*, 2011). Em 2012, foi publicado um estudo clínico piloto que demonstrou a segurança e a eficácia da curcumina em pacientes com artrite reumatóide. Ainda, é importante salientar que a curcumina foi mais eficaz na diminuição da dor dos pacientes comparado ao diclofenaco sódico (Chandran *et al.*, 2012).

Estudos *in vitro* sugerem a combinação destes dois compostos para o tratamento de doenças inflamatórias devido à obtenção de um efeito anti-inflamatório sinérgico (Csaki *et al.*, 2009; Shakibaei *et al.*, 2011). No entanto, ambos polifenóis apresentam baixa solubilidade aquosa, instabilidade química e baixa biodisponibilidade, características estas que limitam o uso clínico destes polifenóis (Bisht *et al.*, 2010). Neste cenário, a associação do resveratrol e da curcumina a nanopartículas poliméricas pode ser uma excelente alternativa para contornar estas limitações, e assim, aumentar a eficácia terapêutica destes compostos.

Até o momento, não há estudos na literatura que contemplem a associação de resveratrol e curcumina a nanocápsulas de núcleo lipídico almejando um aumento do efeito farmacológico e uma terapia mais efetiva para o tratamento da artrite reumatóide. Considerando as limitações da terapia atual, o estudo de novas substâncias e/ou de novas estratégias terapêuticas com maior eficácia e segurança para o tratamento da artrite reumatóide é um assunto de grande interesse. Deste modo, o objetivo deste capítulo foi investigar a atividade anti-edematogênica de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo resveratrol e/ou curcumina em modelo animal de artrite reumatóide induzida por CFA.

**PUBLICAÇÃO 3:** Resveratrol and curcumin co-encapsulated in lipid-core nanocapsules: *in vivo* antiedematogenic effect on CFA-induced arthritis model

Artigo a ser submetido a periódico científico

---



O conteúdo presente na *Publicação 3* desta tese de doutorado refere-se a resultados ainda não publicados, motivo pelo qual foi excluído da versão digital disponibilizada para a Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da UFRGS.

























































A busca por tratamentos mais efetivos é um dos principais estímulos para novas pesquisas na área farmacêutica. Com este propósito a nanotecnologia tem sido empregada, possibilitando a proteção do fármaco contra a degradação (Ourique *et al.*, 2008), o controle da liberação (Fontana *et al.*, 2009), o aumento da biodisponibilidade, a vetorização ao local de ação, bem como a diminuição da dose e um aumento da eficácia farmacológica (Bernardi *et al.*, 2009a; Hass *et al.*, 2009; Frozza *et al.*, 2010). Somado a isto, o interesse na utilização de substâncias com baixa toxicidade e elevada atividade terapêutica é crescente, uma vez que muitas doenças permanecem sem cura.

O resveratrol e a curcumina, dois compostos naturais encontrados na dieta humana, atuam em diversas vias de sinalização, sendo atualmente considerados promessas como agentes terapêuticos. Estes polifenóis apresentam atividade antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral. Apesar dos inúmeros benefícios à saúde humana, o uso destes polifenóis na terapêutica é limitado devido à baixa solubilidade aquosa, instabilidade química e reduzida biodisponibilidade. Devido às potencialidades e, ao mesmo tempo as suas limitações, o resveratrol e a curcumina foram selecionados neste estudo para incorporação em nanocápsulas de núcleo lipídico.

A primeira etapa deste trabalho (Capítulo 1) foi dedicada a revisar os principais benefícios *in vivo* da nanoencapsulação da curcumina. Diferentes sistemas nanoestruturados como lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanoemulsões, micelas e nanopartículas poliméricas vêm sendo usados para aumentar a estabilidade, a biodisponibilidade e a eficácia terapêutica da curcumina. Ficou claro a partir dos dados da literatura que a nanoencapsulação é capaz de aumentar a biodisponibilidade oral da curcumina, bem como sua eficácia terapêutica. Foi observado um aumento da atividade antitumoral da curcumina frente a diferentes tipos de tumores que incluem câncer de cólon, pâncreas, fígado, pele, mama e próstata. Ainda, uma maior eficácia frente a doenças inflamatórias, neurodegenerativas (ex.: doença de Alzheimer) e doenças negligenciadas como a malária, tem sido observada devido à associação da curcumina à nanocarreadores. Adicionalmente, a nanoencapsulação tem demonstrado uma estratégia eficaz para promover um maior acúmulo de curcumina no sistema nervoso central. Os

benefícios da encapsulação da curcumina aos sistemas nanocarreadores são suportados pelos mais diferentes tipos de estudos *in vivo*.

No Capítulo 2 desta tese, a curcumina foi encapsulada a nanocápsulas de núcleo lipídico almejando o aumento do seu potencial antitumoral em modelo animal de glioma. As principais razões que levaram à realização este estudo foram: a) a habilidade das nanocápsulas de núcleo lipídico em vetorizar fármacos às células tumorais, o que torna essa formulação mais eficaz em reduzir o crescimento de gliomas (Bernardi *et al.*, 2009a); b) a importância do estudo de novas estratégias terapêuticas para gliomas; c) as propriedades antitumorais da curcumina (Aggarwall *et al.*, 2003); e d) a inexistência de trabalhos prévios avaliando o efeito *in vivo* da curcumina associada à nanopartículas poliméricas para o tratamento de gliomas.

Após uma detalhada caracterização físico-química da formulação os resultados mostraram a viabilidade tecnológica da obtenção de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo curcumina (C-LNC). Através do estudo da liberação *in vitro*, utilizando membranas de diálise, pôde-se observar uma liberação controlada da curcumina a partir das nanocápsulas. Para avaliação da atividade antitumoral *in vitro* da curcumina nanoencapsulada, foram utilizadas duas linhagens celulares de glioma, a U251MG (linhagem de glioblastoma humano) e a C6 (linhagem de glioblastoma de rato). Independente do tipo de célula, o acúmulo intracelular da curcumina nanoencapsulada ocorreu através de um mecanismo bifásico, com um rápido pico entre 1-3 horas seguido de uma liberação sustentada observada após 48 horas. Esta captação inicial rápida (1-3h) pode ser atribuída à internalização/endocitose das nanocápsulas pelas células e a segunda fase devida, pelo menos em parte, à liberação gradual da curcumina a partir das LNC. Para avaliação do efeito da curcumina nanoencapsulada na viabilidade mitocondrial foi utilizado o método colorimétrico do MTT, nos tempos 24, 48 e 96 horas. Na linhagem C6, nos tempos 24 e 48 horas, a curcumina em solução foi mais citotóxica quando comparado a C-LNC. Após 96 horas, a citotoxicidade foi similar para ambos os tratamentos. No entanto, para a linhagem U251MG, a curcumina nanoencapsulada foi mais citotóxica que a curcumina livre em todos os tempos avaliados. As diferentes respostas de cada linhagem frente ao mesmo tratamento podem ser explicadas pelas diferentes características que cada uma apresenta como, por exemplo, a linhagem U251MG



possui a proteína PTEN e TP53 mutada, já a C6 possui ambas as proteínas funcionais.

A inespecificidade dos quimioterápicos é responsável pelos seus efeitos adversos. Logo, cabe ressaltar, que nas doses utilizadas neste trabalho, os efeitos citotóxicos da curcumina são seletivos para glioblastomas, não sendo capazes de causar alterações na viabilidade de células normais da glia, como demonstrado em um trabalho anterior por Zanotto-Filho e colaboradores (2012). Ainda, é importante salientar que as LNC brancas não causaram efeito citotóxico, demonstrando que os efeitos na funcionalidade das células se devem à curcumina e não aos componentes da formulação.

Alguns dos mecanismos pelos quais a curcumina induz a morte celular já estão descritos na literatura (Weissenberger *et al.*, 2010; Zanotto-Filho *et al.*, 2012; Zhuang *et al.*, 2012). Neste estudo verificamos que a nanoencapsulação não interferiu nos mecanismos pelos quais a curcumina exerce a citotoxicidade nas células C6. Ambos os tratamentos (C-LNC e em solução) induziram autofagia e apresentaram um aumento na porcentagem de células na fase G2/M, sugerindo uma parada do ciclo celular nesta fase (G2/M).

Após os experimentos *in vitro*, foi avaliado o efeito do tratamento com curcumina associada à nanocápsulas de núcleo lipídico em modelo *in vivo* de gliomas implantados no cérebro de ratos. Os animais foram tratados durante 14 dias pela via intraperitoneal com 1,5 mg/kg de curcumina nanoencapsulada ou em solução.

A administração intraperitoneal é a via parenteral mais utilizada em experimentos *in vivo* com ratos. A elevada área de superfície da cavidade abdominal e o abundante suprimento sanguíneo facilitam a rápida absorção que ocorre primeiramente pela circulação porta hepática, podendo ocorrer biotransformação no fígado antes de atingir a circulação sistêmica (Nebendhal *et al.*, 2011). Recentemente, Tosi e colaboradores (2013) avaliaram a influência da via de administração na vetorização de nanopartículas para o sistema nervoso central. Utilizando nanopartículas poliméricas com superfície modificada com glicopeptídeos, os autores verificaram através de microscopia confocal, que as nanopartículas têm a capacidade de atingir o cérebro após administração intraperitoneal, oral e nasal.

A partir de análises histopatológicas das lâminas de H&E foi observado, após 14 dias de tratamento, que a curcumina nanoencapsulada, mesmo em baixas

concentrações, diminuiu significativamente o tamanho do tumor e a sua malignidade quando comparado a curcumina livre e aos controles. Ainda, a curcumina associada às nanocápsulas de núcleo lipídico aumentou a sobrevivência dos animais com glioma. Este é um efeito a ser alcançado pelas novas terapias, levando em consideração que não existe cura para esse tipo de tumor. Os efeitos antiglioma da curcumina livre somente foram comparáveis ao da curcumina nanoencapsulada quando se administrou uma dose ~33 vezes maior (50 mg/Kg/dia). Neste estudo, foi possível observar um efeito antitumoral da curcumina administrada em uma dose muito inferior às relatadas na literatura devido à nanoencapsulação.

Durante o desenvolvimento desta tese, trabalhos em paralelo com outros grupos de pesquisa utilizando esta mesma formulação demonstraram que a curcumina encapsulada em nanocápsulas de núcleo lipídico apresenta atividade neuroprotetora em modelo animal de dano cognitivo induzido pela fumaça de cigarros (Jaques *et al.*, 2013) e pelo peptídeo A $\beta$ (1-42) (Hoppe *et al.*, 2013). Em ambos os estudos, baixas doses da curcumina nanoencapsulada foram suficientes para exercer atividade neuroprotetora semelhante à curcumina livre administrada em doses mais elevadas. Estes resultados devem-se, provavelmente, a um aumento da biodisponibilidade da curcumina e a um direcionamento das partículas ao sistema nervoso central (Bernardi *et al.*, 2009a; Benvegnú *et al.*, 2011; Frozza *et al.*, 2013; Dimer *et al.*, 2014).

Para provar essa hipótese, ao final dos tratamentos, estudos de biodistribuição foram conduzidos no presente trabalho, mas infelizmente, devido a limitações no método analítico, foram descontinuados. Assim, optamos por deixar como perspectiva de um próximo estudo, a realização de experimentos farmacocinéticos da curcumina nanoencapsulada em animais saudáveis e com gliomas.

Os mecanismos pelos quais as nanopartículas aumentam os níveis de fármacos no cérebro não são completamente compreendidos. Sabe-se que a biodistribuição das nanopartículas é influenciada pelas características físico-químicas das partículas como tamanho, morfologia, carga de superfície, solubilidade e modificações de superfície (Duan *et al.*, 2013). Atualmente, a vetorização das nanopartículas ao sistema nervoso central está sendo relacionada com o revestimento das partículas com polissorbato 80. Sabe-se que esse revestimento acarreta numa diminuição do *clearance* das nanopartículas pelo sistema retículo-endotelial aumentando o tempo

de circulação sanguínea (Kulkarni *et al.*, 2011). Ainda, o polissorbato 80 possibilita a interação das partículas com receptores endoteliais na barreira hematoencefálica de maneira semelhante às lipoproteínas de baixa densidade, sendo transferido via endocitose receptor-mediada. Acredita-se também que o polissorbato possa inibir a bomba de efluxo P-gp e modular as *tight junctions* (Sun *et al.*, 2010; Kulkarni *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2012).

No caso dos tumores sólidos, outro fator a ser levado em consideração é que as nanopartículas, através do efeito de retenção e permeabilidade aumentado (EPR), tendem a se acumular nesses tecidos. Diferentemente dos tecidos saudáveis, a parede endotelial dos vasos sanguíneos nos tumores sólidos apresenta fenestrações que permitem o extravasamento e o acúmulo das nanopartículas na região, levando a um aumento na concentração do fármaco (Torchilin, 2010). Devido à elevada neovascularização e angiogênese, a permeabilidade vascular encontra-se elevada, o que facilita o acesso das nanopartículas ao tecido tumoral. Ainda, uma drenagem linfática defeituosa permite a retenção das nanopartículas no tumor (Maeda *et al.*, 2013).

Paralelo à atividade antitumoral observada, os tratamentos não afetaram órgãos saudáveis como se pôde observar através das análises bioquímicas e histopatológicas, indicando ausência de toxicidade das formulações. Este é um importante resultado tendo em vista que a maioria das terapias disponíveis não atua exclusivamente nas células malignas, comprometendo tecidos que não estão envolvidos no processo patológico, diminuindo a qualidade de vida dos pacientes (Torchilin, 2010).

Apesar do grande potencial, a segurança na aplicação das nanocápsulas é uma preocupação crescente e, considerando que maioria destas novas tecnologias destina-se ao uso sistêmico, a avaliação da sua biocompatibilidade é importante. Neste sentido, o potencial hemolítico das nanocápsulas de núcleo lipídico contendo curcumina foi avaliado. Os eritrócitos incubados com diferentes concentrações das nanocápsulas contendo curcumina não apresentaram nenhum sinal de hemólise, assim como os incubados com a suspensão de nanocápsulas brancas. Estes resultados sugerem uma possível aplicação desta formulação (C-LNC) para uso sistêmico. No entanto, mais estudos são necessários para garantir a segurança na sua aplicação. Recentemente, resultados obtidos através da avaliação toxicológica

realizadas em ratos tratados com uma dose ou multidoses (durante 28 dias) de nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas com polissorbato 80 indicaram a segurança *in vivo* desta formulação (Bulcão *et al.*, 2013).

A ligação das nanopartículas às proteínas do soro/plasma exerce uma importante influência na biodistribuição, uma vez que essa ligação/adsorção pode mudar o tamanho e a carga de superfície das partículas modificando, desta forma, o processo de internalização pelos macrófagos e a distribuição pelo corpo (Aggarwal *et al.*, 2009). Neste estudo, foi observada uma fraca interação entre as nanocápsulas de núcleo lipídico (C-LNC e B-LNC) e as proteínas plasmáticas (ex., albumina, alfa e beta globulinas). Isso se deve, provavelmente, pelo revestimento das nanocápsulas com polissorbato 80, que confere uma superfície hidrofílica às partículas. Nanopartículas hidrofóbicas possuem uma maior capacidade de interação com as proteínas plasmáticas, logo, são opsonizadas mais rapidamente que partículas hidrofílicas (Aggarwal *et al.*, 2009). No entanto, foi observada uma interação significativa entre as nanocápsulas e as proteínas com peso molecular entre 20-30 KDa (região típica da  $\gamma$ -globulinas de cadeia leve).

A combinação de fitoquímicos pode oferecer uma maior vantagem que a terapia individual no tratamento de doenças. Recentemente os efeitos positivos da combinação do resveratrol e da curcumina sobre marcadores do estresse oxidativo e na quimioprevenção vêm sendo estudados (Aftab *et al.*, 2010; Malhotra *et al.*, 2010; Iwuchukwu *et al.*, 2011). Baseados na hipótese de se obter um aumento dos efeitos benéficos destes dois compostos através da sua combinação, no Capítulo 3 desta tese foram desenvolvidas nanocápsulas de núcleo lipídico contendo a associação do resveratrol e da curcumina.

Para garantir as propriedades nanotecnológicas das suspensões e verificar se a co-encapsulação iria influenciar as características das formulações, uma aprofundada caracterização físico-química das formulações contendo os polifenóis encapsulados individualmente ou co-encapsulados foi realizada. A partir destas avaliações foi possível verificar que os principais parâmetros nanotecnológicos, como tamanho médio de partícula e índice de polidispersão não foram afetados, assim como as demais propriedades avaliadas, demonstrando pela primeira vez a possibilidade de obtenção de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo a associação de resveratrol e curcumina.

O resveratrol e a curcumina apresentam instabilidade quando expostos a luz. Assim, neste trabalho também foi observado um aumento na fotoestabilidade destes compostos devido à nanoencapsulação. Ainda, a co-encapsulação aumentou a estabilidade do resveratrol, sendo o  $t_{1/2}$  do resveratrol 3,41 vezes maior quando associado à curcumina. O mesmo não foi observado para a curcumina, uma vez que a solução contendo a associação dos polifenóis foi mais estável quando comparado às nanocápsulas contendo a associação. No entanto, a proteção da curcumina co-encapsulada com o resveratrol foi semelhante à observada para a formulação contendo curcumina encapsulada individualmente.

Levando-se em consideração que o estresse oxidativo está relacionado com a patogenia de diversas doenças, incluindo inflamações crônicas e câncer, na sequencia foi estudado o potencial das nanocápsulas de núcleo lipídico em melhorar a atividade antioxidante dos polifenóis, individualmente ou co-encapsulados, frente ao radical hidroxila. Através de um método cromatográfico livre de substrato, demonstrou-se que a nanoencapsulação aumentou a atividade antioxidante *in vitro* do resveratrol e da curcumina e os resultados obtidos devido à co-encapsulação foram ainda mais promissores. A co-encapsulação foi capaz de aumentar a atividade antioxidante de ambos os compostos quando comparada às formulações contendo os polifenóis encapsulados individualmente, demonstrando as potencialidades desta formulação.

Os estudos de liberação *in vitro* demonstraram que a nanoencapsulação controlou a liberação do resveratrol e da curcumina a partir das nanocápsulas e diferentes comportamentos entre os polifenóis foram observados em função do tempo. O resveratrol foi liberado mais rapidamente que a curcumina. Estendendo esses resultados para a terapêutica, essa diferença pode ser considerada interessante, uma vez que o resveratrol poderia atuar de maneira controlada, mas mais imediata, e os efeitos benéficos desta formulação serem sustentados pela liberação controlada da curcumina. Além das vantagens apresentadas até o momento, estudos conduzidos durante 3 meses demonstraram a estabilidade da formulação contendo os polifenóis co-encapsulados.

Em conjunto com os resultados de caracterização e fotoestabilidade, os resultados obtidos no estudo da atividade antioxidante indicaram a promissora aplicação da formulação contendo a associação do resveratrol e curcumina para a

prevenção ou tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo encorajando a continuidade dos estudos com uma avaliação *in vivo*.

Neste sentido, o Capítulo 4 abordou a avaliação dos efeitos *in vivo* das nanocápsulas de núcleo lipídico contendo resveratrol e/ou curcumina em modelo animal de artrite reumatóide induzida por CFA.

Após a indução da artrite, os animais foram tratados com resveratrol e/ou curcumina, associados ou não a nanocápsulas de núcleo lipídico. A dose utilizada foi de 1,75 mg/kg, administrada intraperitonealmente duas vezes ao dia, totalizando 3,5 mg/kg/dia. Essa dose representa um volume máximo de 1,2 mL de formulação administrada nos animais pela via intraperitoneal.

Os polifenóis em solução não foram capazes de diminuir o edema causado pela administração intraplantar do CFA. Este resultado está relacionado, provavelmente, com a dose utilizada neste estudo. Apesar do modelo de artrite induzida por adjuvante ser bem estabelecido e amplamente utilizado para avaliar a eficácia de novos tratamentos (Bevaart *et al.*, 2010), este estudo foi o segundo a utilizar este modelo animal para avaliar os efeitos do resveratrol (Chen *et al.*, 2013) e da curcumina (Kuncha *et al.*, 2013). Nestes trabalhos, os efeitos benéficos dos tratamentos foram demonstrados utilizando doses a partir de 10 mg/kg. No entanto, baseados em estudos que demonstraram que a encapsulação de diferentes substâncias ou fármacos à sistemas nanoestruturados leva a um aumento da eficácia farmacológica (Bernardi *et al.*, 2009b; Fontana *et al.*, 2010; Hoppe *et al.*, 2013; Figueiró *et al.*, 2013), o efeito anti-edematogênico dos polifenóis encapsulados individualmente ou co-encapsulados em nanocápsulas de núcleo lipídico foi avaliado.

Neste estudo, verificou-se que a nanoencapsulação foi capaz de aumentar a atividade anti-edematogênica dos polifenóis, demonstrando que é possível obter um efeito farmacológico significativo com diminuição da dose total administrada. É importante destacar que os animais tratados com os polifenóis co-encapsulados apresentaram uma melhora pronunciada quando comparado aos demais tratamentos (resveratrol e curcumina individualmente nanoencapsulados). Durante o período de tratamento, uma redução entre 24 e 55% no edema foi observada. Este estudo foi o primeiro a demonstrar o efeito anti-edematogênico *in vivo* do resveratrol e da curcumina co-encapsulados em sistemas nanoestruturados.

Para melhor avaliar os efeitos destes polifenóis no tratamento da artrite reumatóide, avaliações histopatológicas foram realizadas. Estudos histológicos demonstram elevada inflamação e hiperplasia sinovial, angiogênese, formação de *pannus* e progressiva degradação da cartilagem e do osso na artrite reumatóide (Helyes *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2008). A elevada produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , tem papel fundamental no desenvolvimento do edema e na destruição da cartilagem e do tecido ósseo nas articulações afetadas. A concentração destas citocinas encontra-se elevada no soro e no tecido sinovial de pacientes com artrite reumatóide (Choy *et al.*, 2001). Diversos estudos demonstram que o resveratrol e a curcumina inibem a produção destas citocinas sendo, desta forma, estes polifenóis considerados novas oportunidades para o tratamento da artrite reumatóide (Khanna *et al.*, 2007). As análises histopatológicas corroboraram com os resultados obtidos na avaliação do edema das patas, uma vez que a formulação contendo os polifenóis co-encapsulados resultaram nos melhores efeitos, sendo esta formulação capaz de atenuar a fibrose na membrana sinovial, assim como, o dano à cartilagem e ao tecido ósseo.

O aumento da atividade anti-edematogênica dos polifenóis nanoencapsulados pode ser decorrente dos seguintes fatores: a) diminuição da captação das nanopartículas pelo sistema fagocitário mononuclear devido ao revestimento com polissorbato 80, permitindo que essas partículas permaneçam por mais tempo na circulação; b) aumento da biodisponibilidade do resveratrol e da curcumina devido à nanoencapsulação e; c) maior acúmulo no tecido inflamado. Semelhante ao observado nos tumores sólidos, os tecidos inflamados apresentam uma elevada permeabilidade vascular que permite o extravasamento das nanopartículas nesses sítios (Maeda *et al.*, 2013).

Tendo em vista o efeito antiedematogênico pronunciado, a redução da severidade da histologia articular, assim como, uma melhora na fotoestabilidade e atividade antioxidante demonstrados no capítulo anterior, a contagem total de leucócitos e a avaliação dos biomarcadores hepáticos foram realizadas somente para o grupo de animais tratados com as nanocápsulas contendo a associação do resveratrol e da curcumina.

Os leucócitos são células do sistema imune inato do organismo. Seu aumento está relacionado com condições infecciosas e inflamatórias. Em pacientes com

artrite reumatóide e em modelos animais de artrite é observado um aumento na contagem total de leucócitos (Rindfleisch *et al.*, 2005; Mythilypriya *et al.*, 2008). Esse aumento é relacionado com a superprodução de IL-1 $\beta$  (Kuncha *et al.*, 2013). Neste estudo, o tratamento dos animais com a formulação contendo a associação dos polifenóis suprimiu a infiltração leucocitária, sendo a contagem total de leucócitos semelhante à dos animais saudáveis.

O metotrexato é o fármaco mais utilizado para o tratamento da artrite reumatóide (Gaffo *et al.*, 2006). A severa toxicidade hepática causada pelo tratamento é um dos fatores que estimula a busca por novas estratégias terapêuticas para a artrite reumatóide. Neste sentido, avaliações dos níveis sorológicos de AST, ALT e ALP foram realizadas. O tratamento dos animais com as nanocápsulas contendo resveratrol e curcumina não influenciou nos níveis dos biomarcadores hepáticos, demonstrando a possível aplicação dessa formulação para o tratamento da artrite, uma vez que a mesma apresentou eficácia farmacológica sem causar dano hepático.

O conjunto de resultados obtidos no presente estudo demonstrou a relevância da associação da curcumina e/ou do resveratrol à nanocápsulas de núcleo lipídico, tendo em vista às vantagens destes sistemas nanocarreadores e as diversas aplicações terapêuticas destes polifenóis.



**CONCLUSÕES**

---



- ❖ Os benefícios da associação da curcumina a nanocarreadores lipídicos ou poliméricos foi demonstrado através da apresentação dos principais estudos encontrados na literatura que abordaram as aplicações *in vivo* deste sistema para o aumento da biodisponibilidade e da eficácia terapêutica deste polifenol;
- ❖ A potencialidade antitumoral, antioxidante e anti-edematogênica de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo resveratrol e/ou curcumina, preparadas com adequadas características nanotecnológicas pelo método de nanoprecipitação, foi demonstrada;
- ❖ As nanocápsulas de núcleo lipídico contendo curcumina apresentaram efeito antitumoral superior em modelo animal de glioma, diminuíram a malignidade do tumor e aumentaram a sobrevivência dos animais em relação à curcumina livre administrada intraperitonealmente na mesma dose (1,5 mg/kg/dia). Os efeitos benéficos da curcumina nanoencapsulada só foram comparáveis com os efeitos da curcumina livre quando esta foi administrada na dose de 50 mg/kg/dia;
- ❖ A co-encapsulação do resveratrol e da curcumina não influenciou as características físico-químicas das partículas e o perfil de liberação dos polifenóis a partir das nanocápsulas. A nanoencapsulação foi capaz de diminuir a fotodegradação dos polifenóis e a co-encapsulação aumentou a fotoestabilidade do resveratrol. Ainda, a nanoencapsulação aumentou a atividade antioxidante *in vitro* dos polifenóis e um efeito mais pronunciado foi observado com a co-encapsulação;
- ❖ O resveratrol e a curcumina, encapsulados individualmente ou co-encapsulados, exerceram uma significativa atividade anti-edematogênica em animais com artrite induzida por CFA, o que não foi observado para os polifenóis em solução. O tratamento dos animais com as nanocápsulas contendo a associação do resveratrol e da curcumina foi capaz de diminuir o dano ao tecido cartilaginoso e ao osso e prevenir o aumento linfocitário no soro dos animais.



## REFERÊNCIAS

---



Aftab, N.; Vieira, A. Antioxidant activities of curcumin and combinations of this curcuminoid with other phytochemicals. **Phytotherapy Research**, v.24, p.500-502, 2010.

Agarwal, S.K. Biologic agents in rheumatoid arthritis: an update for managed care professionals. **Supplement to Journal of Managed Care Pharmacy**, v. 17, S14-S18, 2011.

Aggarwal, B.B.; Kumar, A.; Bharti, A.C. Anticancer potential of curcumin: Preclinical and clinical studies. **Anticancer Research**, v. 23, p. 363-398, 2003.

Aggarwal, B. B.; Bhardwaj, A.; Aggarwal, R. S. et al. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. **Anticancer Research**, v. 24, p. 2783–2840, 2004.

Aggarwal, P.; Hall, J.B.; Mcleland, C.B. et al. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 428-437, 2009.

Allhenn, D.; Boushehri, M.A.S.; Lamprecht, A. Drug delivery strategies for the treatment of malignant gliomas. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, p. 299-310, 2012.

Almeida, J. S.; Lima, F.; Da Ros, S. et al. Nanostructured systems containing rutin: in vitro antioxidant activity and photostability studies. **Nanoscale Research Letters**, v.5, p.1603-1610, 2010.

Amri, A.; Chaumeil, J.C.; Sfar, S. et al. Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? **Journal of Controlled Release**, v.158, p.182-193, 2012.

Anand, P.; Kunnumakkara, A.B.; Newman, R.A. et al. Bioavailability of curcumin: problems and promises. **Molecular Pharmaceutics**, v.4, p. 807-818, 2007.

Anand, P.; Sundaram, C.; Jhurani, S.; Kunnumakkara, A.B. Aggarwal, B.B. Curcumin and cancer: an "old-age" disease with an "age-old" solution. **Cancer Letters**, v. 267, p. 133-164, 2008.

Ataie, A.; Sabetkasaei, M.; Haghparast, A. et al. Neuroprotective effects of the polyphenolic antioxidant agent, Curcumin, against homocysteine-induced cognitive impairment and oxidative stress in the rat. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 96, p. 378-385, 2010.

Awasthi, H.; Tota, S.; Hanif, K. et al. Protective effect of curcumin against intracerebral streptozotocin induced impairment in memory and cerebral blood flow. **Life Sciences**, v. 86, p. 87-94, 2010.

Bala, K.; Tripathy, B. C.; Sharma, D. Neuroprotective and anti-ageing effects of curcumin in aged rat brain regions. **Biogerontology**, v. 7, p. 81-89, 2006.

Banji, D.; Pinnapureddy, J.; Banji, O.J.F. et al. Synergistic activity of curcumin with methotrexate in ameliorating Freund's Complete Adjuvant induced arthritis with reduced hepatotoxicity in experimental animals. **European Journal of Pharmacology**, v. 668, p. 293-298, 2011.

Basnet, P.; Skalko-Basnet, N. Curcumin: An anti-Inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. **Molecules**, v. 16, p. 4567-4598, 2011.

Barzegar, A. The role of electron-transfer and H-atom donation on the superb antioxidant activity and free radical reaction of curcumin. **Food chemistry**, v.135, p.1369-1376, 2012.

Bendele, A.M. Animal models of rheumatoid arthritis. **Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions**, v. 1, p. 377-385, 2001.

Benvegnú, D.M., Barcelos, R.C.S., Bouffleur, N. et al. Haloperidol-loaded polysorbate-coated polymeric nanocapsules increase its efficacy in the antipsychotic treatment in rats. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, p. 332–336, 2011.

Benvegnú, D.M.; Barcelos, R.C.S.; Bonffleur, N. et al. Haloperidol-loaded polysorbate-coated polymeric nanocapsules decrease its adverse motor side effects and oxidative stress markers. **Neurochemistry International**, v. 61, p. 623-631, 2012.

Bernardi, A.; Braganhol, E.; Jäger, E. et al. Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces in vivo glioblastoma growth in a rat glioma model. **Cancer Letters**, v. 281, p. 53-63, 2009a.

Bernardi, A.; Zilberstein, A.C.C.V.; Jäger, E. et al. Effects of indomethacin-loaded nanocapsules in experimental models of inflammation in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, p. 1104-1111, 2009b.

Bernardi, A.; Frozza, R.L.; Meneghetti, A. et al. Indomethacin-loaded lipid-core nanocapsules reduce the damage triggered by A $\beta$ 1-42 in Alzheimer's disease models. **International Journal of Nanomedicine**, v.7 p.4927–4942, 2012.



Bevaart, L., Vervoordeldonk, M.J.; Tak, P.P. Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 62, p. 2192-2205, 2010.

Bhatt, J.K.; Thomas, S.; Nanjan, M.J. Resveratrol supplementation improves glycemic control in type 2 diabetes mellitus. **Nutrition Research**, v. 32, p. 537-541, 2012.

Bisht, K.; Wagner K-H.; Bulmer, A.C. Curcumin, resveratrol and flavonoids as anti-inflammatory, cyto- and DNA-protective dietary compounds. **Toxicology**, v.278, p.88-100, 2010.

Bleeker, F.E.; Molenaar, R.J.; Leenstra, S. Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 108, p. 11-27, 2012.

Bulcão, R.P.; Freitas, F.A.; Venturini, C.G. et al. Acute and subchronic toxicity evaluation of poly(epsilon-caprolactone) lipid-core nanocapsules in rats. **Toxicological Sciences**, v. 132, p. 162-176, 2013.

Chachay, V.S.; Kirkpatrick, C.M.J.; Hickman, I.J. et al. Resveratrol – pills to replace a healthy diet? **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 72, p. 27-38, 2011.

Chandran, B.; Goel, A. A randomized, pilot study to assess the efficacy and safety of curcumin in patients with active rheumatoid arthritis. **Phytotherapy Research**, v. 26, p. 1719-1725, 2012.

Chen, X.Y.; Wang, Z.C.; Li, J. et al. Regulation of synoviocyte activity by resveratrol in rats with adjuvant arthritis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 6, p. 172-176, 2013.

Choy, E.H.S.; Panayi, G.S. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, p. 907-916, 2001.

Coimbra, M.; Isacchi, B.; Bloois, L. et al. Improving solubility and chemical stability of natural compounds for medicinal use by incorporation into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 416, p. 433-442, 2011.

Cruz, L.; Soares, L.U.; Dalla Costa, T. et al. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 313, p. 198-205, 2006.

Csaki, C.; Mobasher, A.; Shakibaei, M. Synergistic chondroprotective effects of curcumin and resveratrol in human articular chondrocytes: inhibition of IL-1 $\beta$ -induced

NF- $\kappa$ B-mediated inflammation and apoptosis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 11, 2009, doi:10.1186/ar2850.

Detoni, C.B.; Souto, G.D.; Silva, A.L.M. et al. Photostability and skin penetration of different E-resveratrol-loaded supramolecular structures. **Photochemistry and Photobiology**, v.88, p.913-921, 2012.

Dimer, F.A.; Ortiz, M.; Pase, C.S. et al. Nanoencapsulation of olanzapine increases its efficacy in antipsychotic treatment and reduces adverse effects. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, p. 1137-1145, 2014.

Duan, X.; Li, Y. Physicochemical characteristics of nanoparticles affect circulation, biodistribution, cellular internalization, and trafficking. **Small**, v. 9, p. 1521-1532, 2013.

Feldmann, M. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nature Reviews*. **Immunology**, v. 2, p. 364-371, 2002.

Fiel, L.A.; Rebêlo, L.M.; Santiago, T.M. et al. Diverse deformation properties of polymeric nanocapsules and lipid-core nanocapsules. **Soft Matter**, v. 7, p. 7240-7247, 2011.

Figueiró, F.; Bernardi, A.; Frozza, R.L. et al. Resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules treatment reduces in vitro and in vivo glioma growth. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 9, p. 516-526, 2013.

Fontana, M. C.; Coradini, K.; Guterres, S. S. et al. Nanoencapsulation as a way to control the release and to increase the photostability of clobetasol propionate: influence of the nanostructured system. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.5, p.254-263, 2009.

Fontana, M.C.; Coradini, K.; Pohlmann, A.R. et al. Nanocapsules prepared from amorphous polyesters: Effect on the physicochemical characteristics, drug release, and photostability. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.10, p.3091-3099, 2010.

Fontana, M.C.; Rezer, J.F.P.; Coradini, K. et al. Improved efficacy in the treatment of contact dermatitis in rats by a dermatological nanomedicine containing clobetasol propionate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.79, p.241-249, 2011.

Frémont, L. Biological effects of resveratrol. **Life Sciences**, v. 66, p. 663-673, 2000.

Frozza, R.; Bernardi, A.; Paese, K. et al. Characterization of trans-resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules and tissue distribution studies in rats. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 6, p. 694-703, 2010.

Frozza, R.L.; Bernardi, A.; Hoppe, J.B. et al. Neuroprotective effects of resveratrol against A $\beta$  administration in rats are improved by lipid-core nanocapsules. **Molecular Neurobiology**, v. 47, p. 1066-1080, 2013.

Fujisawa, S.; Atsumi, T.; Ishihara, M. et al. Cytotoxicity, ROS-generation activity and radical-scavenging activity of curcumin and related compounds. **Anticancer research**, v. 24, p. 563-570, 2004.

Gaffo, A.; Saag, K.G.; Curtis, J.R. Treatment of rheumatoid arthritis. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 63, p. 2451-2465, 2006.

Garcia-Garcia, E.; Andrieux, K.; Gil, S. et al. Colloidal carriers and blood–brain barrier (BBB) translocation: A way to deliver drugs to the brain? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 298, p. 274-292, 2005.

Goel, A.; Kunnumakkara, A. B.; Aggarwal, B. B. Curcumin as “Curecumin”: From kitchen to clinic. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, p. 787-809, 2008.

Gupta, S.C.; Kim, J.H.; Prasad, S. et al. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 29, p. 405-434, 2010.

Gupta, S.C.; Patchva, S.; Aggarwal, B.B. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. **The AAPS Journal**, v. 15, p. 195-218, 2013.

Hass, S.E.; Bettoni, C.C.; Oliveira, L.K. et al. Nanoencapsulation increases quinine antimalarial efficacy against *Plasmodium berghei* in vivo. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, p. 156-161, 2009.

Hashem, S.A.; Salem, A.; Al-Rashdan, A. et al. Radiotherapy with concurrent or sequential temozolomide in elderly patients with glioblastoma multiforme. **Journal of Medical Imaging and Radiation Oncology**, v. 56, p. 204–210, 2012.

Hatcher, H.; Planalp, R.; Cho, J. et al. Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, p. 1631-1652, 2008.

Hegen, M.; Keith Jr. J.C.; Nickerson-Nutter, C.L. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 67, p. 1505-1515, 2008.

Helyes, Z., Szabó, A.; Németh, J., et al. Antiinflammatory and analgesic effects of somatostatin released from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in a Freund's Adjuvant-induced chronic arthritis model in the rat. **Arthritis & Rheumatism**, v. 50, p. 1677-1685, 2004.

Holland, E.C. Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. **Nature reviews**, v.2, p. 120-129, 2001.

Hoppe, J.B.; Coradini, K.; Frozza, R.L. et al. Free and nanoencapsulated curcumin suppress  $\beta$ -amyloid-induced cognitive impairments in rats: involvement of BDNF and Akt/GSK-3 $\beta$  signaling pathway. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 106, p. 134-144, 2013.

Iwuchukwu, O.F.; Tallarida, R.J.; Nagar, S. Resveratrol in combination with other dietary polyphenols concomitantly enhances antiproliferation and UGT1A1 induction in Caco-2 cells. **Life Sciences**, v.88, p.1047-1054, 2011.

Ishihara, T.; Kubota, T.; Choi, T. et al. Treatment of experimental arthritis with stealth-type polymeric nanoparticle encapsulating betamethasone phosphate. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 329, p. 412-417, 2009.

Ishrat, T.; Hoda, M.N.; Khan, M.B. et al. Amelioration of cognitive deficits and neurodegeneration by curcumin in rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type (SDAT). **European Neuropsychopharmacology**, v. 19, p. 636-647, 2009.

Jäger, E.; Venturini, C.G.; Polleto, F.S. et al. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 130-140, 2009.

Jaques, J.A.S.; Doleski, P.H.; Castilhos, L.G. et al. Free and nanoencapsulated curcumin prevents cigarette smoke-induced cognitive impairment and redox imbalance. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 100, p. 98-107, 2013.

Jurenka, J.S. anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. **Alternative Medicine Review**, v. 14, p. 141-153, 2009.

Khanna, D.; Sethi, G.; Ahn, K.S. et al. Natural products as a gold mine for arthritis treatment. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 7, p. 344-351, 2007.

Kuncha, M.; Naidu, V.G.M.; Sahu, B.D. et al. Curcumin potentiates the anti-arthritic effect of prednisolone in Freund's complete adjuvant-induced arthritic rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, p. 133-144, 2013.

Nebendahl, K.; Hauff, P. Drug administration. In.: Kiessling, F.; Pichler, B.J. Small animal imaging. **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, p. 93-116, 2011.

Külkamp, I.C.; Rabelo, B.D.; Berlitz, S.J. et al. Nanoencapsulation improves the *in vitro* antioxidant activity of lipoic acid. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 7, p. 598-607, 2011.

Kulkarni, S.A.; Feng, S.S. Effects of surface modification on delivery efficiency of biodegradable nanoparticles across the blood-brain barrier. **Nanomedicine**, v. 6, p. 377-394, 2011.

Lee, H.S.; Ha, A.W.; Kim, W.K. Effect of resveratrol on the metastasis of 4T1 mouse breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. **Nutrition Research and Practice**, v. 6, p. 294-300, 2012.

Lin, C-J.; Lee, C-C.; Shih, Y-L. et al. Resveratrol enhances the therapeutic effect of temozolomide against malignant glioma *in vitro* and *in vivo* by inhibiting autophagy. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 52, p. 377-391, 2012.

Louis, D.N.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D. et al. The 2007 WHO Classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neurophatologica**, v. 114, p. 97-109, 2007.

Maeda, H.; Nakamura, H.; Fang, J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging *in vivo*. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 71-79, 2013.

Malhorta, A.; Nair, P.; Dhawan, D.K. Modulatory effects of curcumin and resveratrol on lung carcinogenesis in mice. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 1271-1277, 2010.

McInnes, I.B.; Schett, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Nature Reviews. Immunology**, v. 7, p. 429-442, 2007.

Menon, V.P.; Sudheer, A.R. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 595, p. 105-125, 2007.

Metselaar, J.M.; Wauben, M.H.M.; Wagenaar-Hilbers, J.P.A. et al. Complete remission of experimental arthritis by joint targeting of glucocorticoids with long-circulating liposomes. **Arthritis & Rheumatism**, v. 48, p. 2059-2066, 2003.

Mohanty, C.; Sahoo, S.K. The in vitro stability and in vivo pharmacokinetics of curcumin prepared as an aqueous nanoparticulate formulation. **Biomaterials**, v. 31, p. 6597-6611, 2010.

Moon, D.O.; Kim, M.O.; Choi, Y.H. et al. Curcumin attenuates inflammatory response in IL-1 $\beta$ -induced human synovial fibroblasts and collagen-induced arthritis in mouse model. **International Immunopharmacology**, v. 10, p. 605-610, 2010.

Mora-Huertas, C.E.; Fessi, H.; Elaissari, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113-142, 2010.

Mun, S.H.; Kim, H.S.; Kim, J.W. et al. Oral administration of curcumin suppresses production of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 to ameliorate collagen-induced arthritis: Inhibition of the PKC $\delta$ /JNK/c-Jun pathway. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 111, p. 13-21, 2009.

Mythilypriya, R.; Shanthi, P.; Sachdanandam, P. Salubrious effect of Kalpaamruthaa, a modified indigenous preparation in adjuvant-induced arthritis in rats-a biochemical approach. **Chemico-Biological Interactions**, v. 173, p. 148-158, 2008.

Nakayama, H.; Yaguchi, T.; Yoshiya, S. et al. Resveratrol induces apoptosis MH7A human rheumatoid arthritis synovial cells in a sirtuin 1-dependent manner. **Rheumatology International**, v. 32, p. 151-157, 2012.

Narayanan, N. K.; Nargi, D.; Randolph, C. et al. Liposome encapsulation of curcumin and resveratrol in combination reduces prostate cancer incidence in PTEN knockout mice. **International Journal of Cancer**, v. 125, p. 1-8, 2009.

Ohgaki, H. Epidemiology of brain tumors. **Methods in Molecular Biology**, v. 472, p. 323-342, 2009.

Oliveira, P.G.; Brenol, C.V.; Edelweiss, M.I. et al. Effects of na antagonist of the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor on complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. **Peptides**, v. 29, p. 1726-1731, 2008.

Ourique, A. F.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S. et al. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, p.1-4, 2008.

Ourique, A.F.; Azoubel, S.; Ferreira, C.V. et al. Lipid-core nanocapsules as a nanomedicine for parenteral administration of tretinoin: development and in vitro antitumor activity on human myeloid leukaemia cells. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 6, p. 214-223, 2010.

Palumbo, M.; Russo, A.; Cardile, V. et al. Improved antioxidant effect of Idebenone-loaded polyethyl-2-cyanoacrylate nanocapsules Tested on Human Fibroblasts. **Pharmaceutical Research**, v. 19, p. 71-78, 2002.

Pandey, K.B.; Rizvi, S.I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, p. 270-278, 2009.

Patel, T.; Zhou, J.; Piepmeier, J.M. et al. Polymeric nanoparticles for drug delivery to the central nervous system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 701-705, 2012.

Pham-Marcou, T.A.; Beloeil, H.; Sun, X. et al. Antinociceptive effect of resveratrol in carrageenan-evoked hyperalgesia in rats: Prolonged effect related to COX-2 expression impairment. **Pain**, v. 140, p. 274-283, 2008.

Pohlmann, A.R.; Fonseca, F.N.; Paese, K. et al. Poly( $\epsilon$ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. **Expert Opinion in Drug Delivery**, v. 10, p. 623-638, 2013.

Ramar, M.; Manikandan, B.; Raman, T. et al. Protective effect of ferulic acid and resveratrol against alloxan-induced diabetes in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 690, p. 226-235, 2012.

Rayalam, S.; Yang, J-Y.; Ambati, S. et al. Resveratrol induces apoptosis and inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 1367-1371, 2008.

Raychaudhuri, B.; Han, Y.; Lu, T. et al. Aberrant constitutive activation of nuclear factor  $\kappa$ B in glioblastoma multiforme drives invasive phenotype. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 85, p. 39-47, 2007.

Reuter, S.; Gupta, S.C.; Chaturvedi, M.M. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 1603-1616, 2010.

Rindfleisch, J.A.; Muller, D. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis. **American Family Physician**, v. 72, p. 1037-1047, 2005.

Rius, C.; Abu-Taha, M.; Hermenegildo, C. et al. *Trans-* but not *cis*-resveratrol impairs angiotensin-II-mediated vascular inflammation through inhibition of NF- $\kappa$ B activation and peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  upregulation. **The Journal of Immunology**, v. 185, p. 3718-3727, 2010.

Schaffazick, S. R.; Freitas, L. L.; Pohlmann, A. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 726-737, 2003.

Schmatz, R.; Perreira, L.B.; Stefanello, N. et al. Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. **Biochimie**, v. 94, p. 374-383, 2012.

Senft, C.; Priester, M.; Polacin, M. et al. Inhibition of the JAK-2/STAT3 signaling pathway impedes the migratory and invasive potential of human glioblastoma cells. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 101, p. 393-403, 2011.

Shakibaei, M.; Mobasheri, A.; Buhrmann, C. Curcumin synergizes with resveratrol to stimulate the MAPK signaling pathway in human articular chondrocytes in vitro. **Genes e Nutrition**, v. 6, p. 171-179, 2011.

Sharma, M.; Gupta, Y. K. Chronic treatment with trans resveratrol prevents intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. **Life Sciences**, v. 71, p. 2489-2498, 2002.

Sharma, R.A.; Gescher, A.J.; Steward, W.P. Curcumin: The story so far. **European Journal of Cancer**, v. 41, p. 1955-1968, 2005.

Siegel, R., DeSantis, C., Virgo, K. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. **Cancer Treatment and Survivorship Statistics**, v. 62, p. 220-241, 2012.

Simão, F.; Matté, A.; Matté, C. et al. Resveratrol prevents oxidative stress and inhibition of Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase activity induced by transient global cerebral ischemia in rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, p. 921-928, 2011.

Stivala, L.A.; Savio, M.; Carafoli, F. et al. Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 22586-94, 2001.

Sun, M.; Gao, Y.; Guo, C. et al. Enhancement of transport of curcumin to brain in mice by poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticle. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 12, p. 3111-3122, 2010.



Tarner, I.H.; Müller-Ladner, U. Drug delivery systems for the treatment of rheumatoid arthritis. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 5, p. 1027-1037, 2008.

Teskac, K.; Kristl, J. The evidence for solid lipid nanoparticles mediated cell uptake of resveratrol. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 390, p. 61-69, 2010.

Tønnesen, H. H.; Másson, M.; Loftsson, T. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 244, p. 127-135, 2002.

Torchilin, V.P. Passive and active drug targeting: drug delivery to tumors as an example. In: Schäfer-Korting, M. (ed.), Drug delivery. **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, p. 3-53, 2010.

Tosi, G.; Ruozi, B.; Belletti, D. et al. Brain-targeted polymeric nanoparticles: in vivo evidence of different routes of administration in rodents. **Nanomedicine**, v. 8, p. 1373-1383, 2013.

Tsai, Y-M.; Chien, C-F.; Lin, L-C. et al. Curcumin and its nano-formulation: The kinetics of tissue distribution and blood–brain barrier penetration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 416, p. 331-338, 2011.

Van den Hoven, J.M.; Van Tomme, S.R.; Metselaar, J.M. et al. Liposomal drug formulations in the treatment of rheumatoid arthritis. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, p. 1002-1015, 2011.

Vautier, C.; Bouchemal, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 26, p. 1025-1057, 2009.

Villano, J.L.; Seery, T.E.; Bressler, L.R. Temozolomide in malignant gliomas: current use and future targets. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 64, p. 647-655, 2009.

Walle, T.; Hsieh, F.; Delegge, M.H. et al. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 32, p. 1377-1382, 2004.

Wang, S.; Tan, M.; Zhong, Z. et al. Nanotechnologies for Curcumin: An Ancient Puzzler Meets Modern Solutions. **Journal of Nanomaterials**, v. 2011, p. 1-8, 2011.

Weissenberger, J.; Priester, M.; Bemreuther, C. et al. Dietary curcumin attenuates glioma growth in a syngeneic mouse model by inhibition of the JAK1,2/STAT3 signaling pathway. **Clinical Cancer Research**, v. 16, p. 5781-5795, 2010.

Westphal, M.; Lamszus, K. The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches. **Nature reviews**, v. 12, p. 495-508, 2011.

Wolburg, H.; Noell, S.; Fallier-Becker, P. et al. The disturbed blood–brain barrier in human glioblastoma. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 33, p. 579-589, 2012.

Worthington, J. Investigating the genetic basis of susceptibility the rheumatoid arthritis. **Journal of Autoimmunity**, v 25, p. 16-20, 2005.

Xuzhu, G.; Komai-Koma, M.; Leung, B.P. et al. Resveratrol modulates murine collagen-induced arthritis by inhibiting Th17 and B-cell function. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 71, p. 129-135, 2012.

Zanotto-Filho, A.; Braganhol, E.; Edelweiss, M.I. et al. The curry spice curcumin selectively inhibits cancer cells growth in vitro and in preclinical model of glioblastoma. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, p. 591-601, 2012.

Zanotto-Filho, A.; Coradini, K.; Braganhol, E. et al. Curcumin-loaded lipid-core nanocapsules as a strategy to improve pharmacological efficacy of curcumin in glioma treatment. **European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics**, v. 83, p. 156-167, 2013.

Zhuang, W.; Long, L.; Zheng, B. et al. Curcumin promotes differentiation of glioma-initiating cells by inducing autophagy. **Cancer Science**, v. 103, p. 684-690, 2012.