UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados como sistema de carregamento de extrato de *Curcuma longa* e avaliação biológica *in vitro* em células de câncer de bexiga

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientada: Jacqueline Campos Silva

Orientadora: Profa. Dra. Priscylla Daniely Marcato Gaspari

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 30/11/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2017

RESUMO

SILVA, J. C. **Desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados como sistema de carregamento de extrato de *Curcuma longa* e avaliação biológica *in vitro* em células de câncer de bexiga**. 2017. 114f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

O câncer de bexiga (CB) destaca-se como o segundo tipo de doença mais comum do trato geniturinário e o décimo com maior incidência no Brasil, sendo responsável por cerca de 4020 óbitos por ano. Os dados refletem a baixa eficácia dos tratamentos disponíveis. Assim, novas moléculas e sistemas de liberação estão sendo investigados para terapia intravesical do CB. Nesta linha, as oleorresinas de *Copaifera* e compostos fenólicos como a curcumina (CM) e demetoxicurcumina (DCM) presentes no extrato de *Curcuma longa*, têm sido alvo de pesquisas por apresentarem propriedades antitumoral, antiproliferativa e proapoptótica. Contudo, a administração desses compostos em sua forma livre torna-se inviável devido à sua alta lipossolubilidade e instabilidade. Dessa forma, o uso de oleorresina de *Copaifera duckei* (O-Cd) no preparo de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) para a encapsulação do extrato de *C. longa* (ECL) poderia ser uma estratégia terapêutica eficaz, além de transpor algumas barreiras da terapia intravesical como a baixa permeação de moléculas no urotélio e seu baixo tempo de residência na bexiga. Assim, os objetivos do presente estudo foram preparar e caracterizar CLN (com O-Cd) e CLN imperfeito (sem O-Cd, CLN_{imp}) para a encapsulação de ECL, e avaliar a citotoxicidade desses sistemas carreadores em células de CB. Os CLN e CLN_{imp}, preparados pelo método de emulsão à quente e sonicação, foram caracterizados quanto ao seu diâmetro, índice de polidispersão (Pdl), potencial zeta (PZ), cristalinidade, eficiência de encapsulação (EE) por CLAE, capacidade de encapsulação (CE), e morfologia. Além disso, avaliou-se a citotoxicidade dos CLNs com e sem ECL em células RT4 e foram conduzidos estudos de *uptake* celular. Obteve-se carreadores com diâmetro ao redor de 200 nm, baixo Pdl (<0,3) e PZ negativo (~-20 mV). O ECL foi caracterizado e quantificado por CLAE, sendo verificado uma pureza de 97,90% para CM e 99,29% para DCM. Ambas moléculas foram encapsuladas nos dois CLNs com alta EE (~70%). A encapsulação do ECL não alterou de forma significativa as propriedades físicas dos CLNs. Os dois tipos de CLNs apresentaram baixo índice de recristalização (~60%), forma esférica e superfície lisa. Os CLN e CLN_{imp} foram estáveis no período de 420 e 270 dias, respectivamente. Já os CLN-ECL e CLN_{imp}-ECL foram estáveis por 90 dias. O IC₅₀ dos CLN sem ECL ($0,019 \times 10^{12}$ partículas/mL) foi menor que o IC₅₀ dos CLN_{imp} sem ECL ($>0,061 \times 10^{12}$ partículas/mL). O encapsulamento do ECL pelos CLNs não alterou significativamente seu IC₅₀ nos períodos de incubação avaliados. Já o encapsulamento do ECL pelos CLN_{imp} diminuiu o IC₅₀ (19,15 µg/mL) ($0,047 \times 10^{12}$ partículas/mL) em relação ao CLN_{imp} vazio. Observou-se maior *uptake* celular dos carreadores com ECL em relação ao ECL livre. Além disso, foi observada fragmentação do núcleo das células que internalizaram CLN-ECL. As interessantes propriedades físicas e biológicas apresentadas pelos sistemas CLN vazio e CLN_{imp}-ECL indicam seu potencial terapêutico e os tornam promissores para futura terapia do câncer de bexiga.

Palavras-chave: câncer de bexiga, oleorresina de *C. duckei*, extrato de *C. longa*, carreadores lipídicos nanoestruturados, citotoxicidade.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma de bexiga urinária (CB)

Diagnosticado como o quarto tipo de câncer mais comum em homens e o oitavo em mulheres, o carcinoma de bexiga urinária (CB) causa preocupação devido à sua prevalência e tendência a progredir e recorrer após tratamento (1). No Brasil, estima-se 9670 novos casos de câncer de bexiga entre 2016 e 2017, sendo 7200 em homens e 2470 em mulheres (2). Pesquisas indicam que aproximadamente 4021 óbitos/ano decorrem desse tipo de câncer (3). O CB pode ocorrer em qualquer idade, porém com o avanço desta, sua incidência também aumenta proporcionalmente, sendo seu diagnóstico frequentemente realizado na 6ª e 7ª décadas de vida. A maioria dos casos classifica-se como carcinoma de células de transição, sendo que grande parte de incidência de CB é diagnosticada como doença superficial (pTa e pT1), tumor não-invasivo, ou seja, limita-se ao tecido de revestimento da bexiga (2). Devido à alta probabilidade de recorrência do CB, é importante e necessário realizar seguimento contínuo e prolongado para detectar recidiva e evitar progressão (4). Estudos apontam que em 4 anos após o tratamento dos tumores superficiais, há recorrência de 50% dos mesmos, sendo que 11% evoluem para o fenótipo invasivo. Neste último, o câncer dissemina-se através do revestimento da bexiga, invade a parede muscular e atinge os órgãos próximos ou os gânglios linfáticos. Em geral, após a terapia com ressecção transuretral (RTU), a recorrência é de 70% (5)(2).

Atualmente são utilizados quatro tipos de tratamentos de CB, sendo que a escolha do mesmo depende do estágio em que se encontra a doença. As terapias usadas são a cirurgia, a qual engloba a ressecção transuretral (RTU), a cistectomia e o desvio urinário; a terapia com radiação; a quimioterapia intravesical ou sistêmica; e a terapia biológica com bacilo Calmette-Guérin (BCG) (6). Neste último, o tratamento é realizado pela instilação intravesical de BCG, sendo este uma variante atenuada do *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) (7). Essa imunoterapia e seus benefícios foram primeiramente descritos em 1976 por Morales e colaboradores (8) e, nos últimos 30 anos, tem sido amplamente utilizada (9)(10)(11). Apesar desta terapia ser a mais utilizada, há diversos efeitos colaterais que podem ser específicos (relacionados ao próprio BCG, sendo locais ou sistêmicos) ou inespecíficos (relacionados à cateterização uretral que precede a instilação de BCG). A cistite,

associada à disúria e à hematúria, enquadra-se como o efeito colateral mais comum. Podem surgir outras complicações como prostatite granulomatosa, epididimite, obstrução do ureter e o envolvimento do parênquima renal (12). Raramente ocorrem complicações sistêmicas graves, sendo que nestas há o envolvimento de órgãos e/ou sistemas e a infecção disseminada por BCG, o que explica o tratamento precoce com tuberculostáticos (9). Em estudos clínicos realizados por Nakamura e colaboradores (13), a incidência de efeitos colaterais foi de 78,3%, o que levou apenas 20% dos pacientes a terminarem o tratamento com BCG.

Quando há a ineficácia da imunoterapia, pode-se optar pela quimioterapia utilizando-se quimioterápicos como doxorrubicina, cisplatina, tiotepa, mitomicina C e adriamicina por via sistêmica ou intravesical (4). A quimioterapia intravesical tem sido empregada para tratar pacientes de baixo a médio risco, enquanto que o tratamento com BCG permanece como o de primeira linha para pacientes de alto risco e outros que apresentam problemas com a quimioterapia (14). Por outro lado, a administração sistêmica de quimioterápicos destina-se a tratar estágios mais avançados da doença (15). Para os tumores superficiais, os quais se localizam em local pouco vascularizado do urotélio, opta-se pela quimioterapia intravesical. Esta terapia tem a vantagem de apresentar toxicidade sistêmica bem pequena quando comparada com aplicações sistêmicas dos mesmos fármacos e dosagens, e melhora a eficácia e segurança da terapia por ser administrada diretamente no local (16). Nesse sentido, os CBs não-invasivos (estágio 0) ou minimamente invasivos (estágio 1) têm sido tratados com a administração de quimioterápicos pela via intravesical, na qual um líquido com o fármaco é administrado diretamente dentro da bexiga com o uso de um catéter. Dessa forma, a quantidade de fármaco que entra em contato com a área lesionada (bexiga/tumores) pode ser facilmente controlada, sendo que o mesmo atinge principalmente as linhagens celulares no interior do urotélio, com pouco ou nenhum efeito em células de outros tecidos (17)(18). No entanto, algumas barreiras são encontradas na terapia intravesical. Devido ao constante esvaziamento e preenchimento de urina na bexiga, os fármacos administrados por esta via permanecem por pouco tempo em contato com a área a ser tratada. Assim, há a necessidade de se realizar várias administrações, o que pode ocasionar desconforto ao paciente, dor local e infecções. Atualmente, as formulações convencionais administradas pela via intravesical são mantidas na bexiga urinária durante 2 horas e a exposição urotelial ao fármaco perdura até a

primeira micção após a instalação. Além disso, a baixa permeabilidade do urotélio o torna altamente impermeável a todas as substâncias presentes na urina e a muitos fármacos, o que afeta a efetividade destes. Esta baixa permeabilidade deve-se as células guarda-chuva superficiais (altamente diferenciadas) que são caracterizadas pela sua alta resistência transepitelial (10000 a $75000 \Omega \text{ cm}^2$), sendo que a permeabilidade do urotélio não se altera significativamente, mesmo em caso em que há câncer na bexiga ou cistite intersticial (19). Com o objetivo de superar os obstáculos mencionados, novas estratégias têm sido desenvolvidas para otimizar o tratamento do CB e garantir sua maior eficácia. Para isso, o encapsulamento de fármacos em nanopartículas é amplamente pesquisado. Estas são capazes de aprimorar a segurança, perfis farmacocinéticos e biodisponibilidade do fármaco administrado, possibilitando sua acumulação de forma específica no estroma tumoral e sua internalização pelas células cancerosas (20)(21). Os nanocarreadores podem aumentar a penetração do fármaco no urotélio, seu tempo de permanência na bexiga e apresentar uma liberação sustentada, o que possibilita diminuir o número de administrações (22).

1.2 Potencial biológico das oleorresinas de *Copaifera* sp.

O gênero *Copaifera*, o qual pertence à família botânica *Leguminosae*, recebe inúmeras designações por todo o mundo, e no Brasil é conhecido como copaíba. Suas espécies podem ser encontradas na América Central e do Sul, bem como na África ocidental. No território brasileiro, a quantidade de espécies encontradas chega a ser superior a vinte (23).

55 a 60% da oleorresina de *Copaifera* são formados por ácidos diterpênicos, os quais compõe sua parte sólida resinosa não volátil. Essa porção da oleorresina é diluída em um óleo essencial composto de sesquiterpenos, os quais podem ser divididos em sesquiterpenos oxigenados (álcoois) e hidrocarbonetos sesquiterpênicos (24). Podem ocorrer variações tanto na concentração como na natureza dos diterpenos e sesquiterpenos presentes no óleo extraído devido à influência de alguns fatores como biológicos, abióticos e variações de espécie (25)(26). Contudo, não há diferença significativa na composição de óleos extraídos de árvores de *Copaifera duckei* em diferentes épocas sazonais (27).

A porção resinosa da oleorresina de *Copaifera* é composta pelos diterpenos: ácido copaívico, ácido hardwíckido, colavenol, ácido copaiférico ou copaífero, ácido copaiferólico, ácido calavênico, ácido patagônico, ácido copálico, ácido caurenóico, ácido poliáltico, entre outros. Já os principais sesquiterpenos são β -cariophileno, β -bisaboleno, α -humuleno, α e β -selineno, α -bisabolol, β -elemeno, γ -cadineno, α -cadinol, entre muitos outros (24). Inúmeros trabalhos atribuem grande parte das propriedades farmacológicas das oleorresinas de *Copaifera* aos diterpenos presente neste óleo (24)(28).

A utilização da medicina popular para o óleo de copaíba é vasta e indica uma grande variedade de propriedades farmacológicas (29)(30)(31)(32)(33)(34). De todas as indicações medicinais, suas propriedades anti-inflamatória, cicatrizante, antimicrobiana e antitumoral são as mais relatadas (32)(35). No Quadro 1 são apresentadas as principais indicações etnofarmacológicas dos óleos de copaíba.

Quadro 1. Principais indicações etnofarmacológicas das oleorresinas de *Copaifera* (32).

Indicações etnofarmacológicas		
Antiblenorrágico	Expectorante	Antireumático
Anti-inflamatório	Inflamações de garganta	Anti-herpético
Antigonorréico	Hemoptise	Anticancerígeno
Antisséptico	Pneumonia	Antitumoral (tumor de próstata)
Cistite	Sinusite	Leishmaniose
Estimulante	Dermatite	Leucorréia
Incontinência urinária	Eczema	Contra paralisia
Sífilis	Psoríase	Dores de cabeça
Antiasmático	Afrodisíaco	Picada de cobra
Bronquite	Antitetânico	

Estudos científicos desenvolvidos por diversos grupos de pesquisa têm comprovado a eficácia farmacológica destes bálsamos. A propriedade antitumoral *in vitro* e *in vivo* é claramente evidenciada para diversas espécies de *Copaifera* (36)(37)(38). Em estudos realizados com o carcinoma induzido pela linhagem

epidermóide bucal, obteve-se resultados marcantes com os grupos tratados com o óleo de copaíba. Os resultados indicam que houve a indução de apoptose e inibição da proliferação celular devido à diminuição da expressão da proteína NF- κ B, responsável pela regulação de genes envolvidos no crescimento celular e supressão da apoptose (23). Lima e colaboradores (37) demonstraram que a administração oral da oleorresina de *C. multijuga* e de frações obtidas por processos cromatográficos reduziram significativamente o crescimento de tumor sólido induzido por células de melanoma (B16/F10). Estudos *in vivo* realizados também com a oleorresina de *C. multijuga* e suas respectivas frações n-hexânica e clorofórmica, nas concentrações variando entre 100 e 200 mg Kg⁻¹, demonstraram que este material vegetal apresenta um grande potencial antineoplásico frente a linhagem tumoral ascítica de Ehrlich (38). O ácido caurenóico, isolado da oleorresina de *C. langsdorffii* inibiu o crescimento de células tumorais, indicando seu potencial citotóxico (39)(40). Maistro e colaboradores (40), ao avaliarem as atividades citotóxica e mutagênica da oleorresina de *C. duckei* em reticulócitos de sangue periférico e medula óssea em aplicação cutânea em rato, puderam provar que ela foi citotóxica em doses elevadas. A oleorresina de *C. duckei* demonstrou uma notável atividade antiproliferativa por meio do desacoplamento da fosforilação oxidativa mitocondrial sobre o fígado de ratos Wistar submetidos à hepatectomia (41). Nestes trabalhos, os autores enfatizam estas fontes naturais como promissoras para a descoberta e o desenvolvimento de novos fitofármacos antineoplásicos. Os dados na literatura a respeito do potencial biológico de *C. duckei* são escassos, mas além da atividade antineoplásica, já relatam atividade antimicrobiana (42), anti-inflamatória (43), esquistossomicida (44) e anti-helmíntica (45). Existem poucas informações sobre os efeitos tóxicos do óleo de copaíba, porém sabe-se que quando administrado em altas doses pode causar irritação gastrointestinal, diarreia, sialorréia e depressão do sistema nervoso central (28). Sachetti e colaboradores (46) ao avaliarem a toxicidade aguda e o potencial neurotóxico da oleorresina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae), demonstraram que a administração da mesma não causou mortalidade e/ou morbidade até a dose de 2000 mg/Kg de peso corpóreo, apresentando da mesma forma ausência de efeitos neurotóxicos nas doses testadas.

Ressalta-se que o presente estudo é inédito uma vez que não há trabalhos prévios na literatura com a incorporação de oleorresina de *C. duckei* em carreadores

lipídicos nanoestruturados ou em qualquer outro sistema de liberação nanoparticulado.

1.3 Extrato de *Curcuma longa* Linnaeus (ECL)

Curcuma longa Linn. ou Açafrão-da-Índia é uma espécie vegetal encontrada abundantemente em países asiáticos que se destaca por suas inúmeras propriedades medicinais e seu potencial em tratar doenças crônicas como diabetes, inflamação, câncer e Alzheimer (47). O extrato de *C. longa* é composto por curcuminóides como a curcumina, demetoxicurcumina e bisdemetoxicurcumina, os quais estão presentes em 70-77%, 18-20% e 5-10%, respectivamente, sendo que os três apresentam atividades biológicas descritas na literatura (48). Em estudo realizado por Chang e Chen (47), tanto o extrato de *C. longa* livre quanto encapsulado em nanoemulsão foi capaz de retardar o ciclo celular, induzir apoptose e inibir o crescimento de células de câncer de pulmão. Alibakhshi e colaboradores (49) mostraram que o extrato de *C. longa* foi capaz de reduzir a atividade de telomerase em células de câncer de mama e câncer de pulmão em diferentes graus de inibição.

Destacando-se como o principal e mais abundante constituinte da cúrcuma (*Curcuma longa* Linn.), a curcumina (CM) [1,7-bis(4-hidroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione] (Figura 1), é um composto polifenólico hidrofóbico de baixo peso molecular e de cor amarela encontrada no rizoma da planta. Sua molécula é composta de dois anéis metoxifenol unidos por uma β -dicetona, estruturas estas fundamentais para sua atividade antioxidante. A substância é capaz de inibir a peroxidação lipídica em diferentes tecidos, além de regular as concentrações intracelulares de enzimas antioxidantes como a catalase, a superóxido dismutase e a glutathione peroxidase, e sequestrar espécies reativas como o radical superóxido e o radical hidroxila (50)(51).

Figura 1: Estrutura molecular da curcumina, demetoxicurcumina e bisdemetoxicurcumina (52).

Curcumina: $R_1=R_2=OCH_3$

Demetoxicurcumina: $R_1=H$; $R_2=OCH_3$

Bisdemetoxicurcumina: $R_1=R_2=H$

Estudos pré-clínicos e clínicos indicam inúmeros outros efeitos biológicos atribuídos à curcumina como anti-inflamatório, antitumoral e antígeno-tóxico, antimicrobiano, antiprotzoário e antiviral, além de demonstrarem sua potencial aplicação em doenças cardiovasculares, diabetes e em doenças neurodegenerativas como esclerose múltipla, Parkinson e Alzheimer (53)(54). As propriedades terapêuticas da substância devem-se à capacidade da mesma em interferir nas diversas vias de sinalização celular a fim de parar o ciclo e inibir a proliferação celular, induzir a apoptose e modular a expressão gênica. Possui vários alvos moleculares, inibindo a atividade de importantes fatores de transcrição como a do fator nuclear κB (NF- κB) induzida por estímulo inflamatório, a c-Jun N-terminal quinase (jnk), a ciclooxigenase-2 (COX-2), a proteína kinase C, a glutathione-S-transferase e o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (54).

A CM tem demonstrado um potencial efeito inibitório no crescimento de células tumorais tanto *in vitro* como *in vivo* em vários tipos de tecidos, incluindo sangue, cérebro, mama, estômago, intestino, cabeça, pescoço, fígado, pâncreas, cólon, próstata, ovário e pele (51). Tanto estudos em modelos *in vivo* como clínicos de fase I revelam que a substância é extremamente segura quando administrada em doses elevadas. Segundo Peng & Qian (55), a CM administrada por via oral é segura em doses que chegam a 32,6 $\mu M/L$ /dia em humanos. Já Leite e colaboradores (56), demonstraram que a CM por via intravesical é segura em doses de 200 $\mu M/L$ /semana em modelo *in vivo*. Embora a substância demonstre extrema segurança e eficácia em altas doses, sua aplicação clínica é limitada devido à sua elevada lipofilicidade, sua rápida eliminação sistêmica, assim como da bexiga,

inadequada absorção e internalização em células e degradação em pH alcalino. Consequentemente, sua biodisponibilidade é prejudicada, resultando em baixas concentrações plasmáticas obtidas após administração oral e, dessa forma, as devidas concentrações de CM não atingem o tecido alvo (57). Devido à sua baixa solubilidade em água (< 7 mg/L) e instabilidade em pH fisiológico (90% de CM é degradada em tetrahidrocurcumina em 30 min.) a via intravenosa igualmente não é uma via ideal para a administração da CM (55). Assim, apesar de ser listada como a terceira geração de substâncias quimiopreventivas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) e, em estudos clínicos mostrar-se efetiva no tratamento de vários tipos de câncer e na regressão de psoríase e de lesões pré-malignas de bexiga, os problemas relacionados à terapia com esta substância a impede de ser aprovada como um agente terapêutico (51).

A demetoxicurcumina é o segundo curcuminóide em maior abundância no extrato de *C. longa*, sendo que em sua molécula há a falta de um grupo metóxi ligado a um anel benzeno (Figura 1). Estudos também apontam que a DCM possui propriedades biológicas semelhantes às da curcumina, porém possui maior estabilidade em meio fisiológico (58). De acordo com resultados obtidos por Leng e colaboradores (59), a DCM foi capaz de inibir a proliferação e induzir apoptose em células tronco de glioblastoma *in vitro* e *in vivo* ao inibir a ativação de JAK/STAT3, apresentando um efeito superior aos efeitos do fármaco utilizado no tratamento de glioblastoma multiforme. Outro estudo mostra que a DCM inibiu a proliferação celular e induziu apoptose em células de câncer de ovário pela regulação de miR-551a (60). Já a molécula de bisdemetoxicurcumina (Figura 1) não possui nenhum grupo metóxi ligado em seus dois anéis benzênicos. Igualmente à DCM, a BDCM é mais estável do que a curcumina em meio fisiológico, apresentando potencial anti-inflamatório, antiproliferativo, pro-apoptótico e antiangiogênico (61)(62)(63)(64)(65).

Visto o potencial biológico tanto do extrato de *C. longa* quanto de seus curcuminóides isoladamente, torna-se vantajoso desenvolver um sistema terapêutico eficaz, capaz de carrear o extrato e melhorar a estabilidade e biodisponibilidade dessas moléculas, bem como potencializar sua atividade biológica, direcionando-as ao tecido alvo. Assim, novas alternativas têm sido estudadas como os sistemas de liberação baseados na nanotecnologia, o que inclui os lipossomas, nanopartículas, micelas, nanogels, nanoemulsões, suspensões de nanocristais, dendrímeros, complexos fosfolipídicos e dispersões sólidas (66). Dentre as nanopartículas que

têm sido desenvolvidas, as nanopartículas lipídicas sólidas e os carreadores lipídicos nanoestruturados merecem destaque por serem altamente estáveis, de fácil escalonamento e possuírem elevada capacidade de incorporar moléculas lipofílicas.

Neste contexto, o encapsulamento de ECL em carreadores lipídicos nanoestruturados contendo O-Cd é um sistema eficiente de administrar essas moléculas insolúveis em meio aquoso, melhorar a segurança, perfis farmacocinéticos e a biodisponibilidade (21). Quanto à terapia intravesical do CB, a administração de ECL em nanopartículas pode aumentar sua permeação no urotélio, seu tempo de retenção e promover maior estabilidade de modo a otimizar a terapêutica de CB pela via intravesical.

1.4 Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) e Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN)

Avançadas tecnologias de sistemas de liberação sustentada são desenvolvidas a fim de aprimorar a segurança e eficácia do tratamento antineoplásico (16)(68). Nesse sentido, formulações nanoparticuladas contendo fármacos insolúveis têm sido estrategicamente elaboradas com sucesso. Dentre essas, destacam-se os lipossomas, micelas, nanocristais, micro e nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) entre outras. Essas nanoestruturas são biocompatíveis e permitem solubilizar fármacos, controlar a liberação do fármaco no tecido alvo, reduzir toxicidade e efeitos colaterais, aumentar a biodisponibilidade e melhorar a estabilidade (21)(69). As NLS e os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) foram desenvolvidos como alternativa para outros carreadores coloidais. Projetados com o objetivo de superar os aspectos limitantes dos lipossomas e das nanoemulsões lipídicas, essas nanoestruturas podem ser preparadas sem solvente orgânico, possuem alta estabilidade e são facilmente produzidas em larga escala (70)(71)(72). As NLS são formadas por lipídios sólidos à temperatura ambiente e corporal, surfactantes para emulsificação e água. Geralmente, os lipídios utilizados na produção dos NLS são triglicerídeos e ceras (73)(74). Um dos lipídios que pode ser utilizado na preparação de NLS é o miristato de miristila. Este monoéster de cadeia reta apresenta ponto de fusão em 39°C, o que permite a preparação de NLS a temperaturas mais baixas. Além disso, este lipídio já foi utilizado na preparação de NLS contendo dibucaína com reduzido diâmetro e

índice de polidispersão e não apresentou citotoxicidade para as células 3T3 e HaCaT, indicando, desta forma, ser um lipídio interessante para a produção de NLS (75). Além do lipídio sólido para a preparação das NLS é necessário a utilização de estabilizantes que irão garantir a estabilidade das nanopartículas produzidas. Vários tensoativos podem ser utilizados na produção de NLS como, por exemplo, polissorbatos, monooleato de sorbitano, poloxamer etc (73). Os estabilizantes não-iônicos como o Pluronic® F68 e F127, são utilizados como estabilizantes das NLS devido a baixa toxicidade, por serem aprovados pelo FDA tanto para uso oral como parenteral e tópico e por fornecer às partículas estabilidade estérica e elétrica (76).

As NLS são biodegradáveis e podem ser estocadas por pelo menos um ano. As técnicas de preparação utilizadas incluem a emulsão a quente, emulsificação e evaporação de solvente, difusão de solvente, spray-drying e homogeneização à alta pressão (73)(77).

Os CLN surgiram no final dos anos 90, depois das NLS, com o intuito de tornar o processo de encapsulamento mais eficiente e diminuir a expulsão do ativo durante a estocagem, o que comumente ocorria com as NLS. Há três diferentes modelos de CLN. O primeiro, chamado de “CLN imperfeito” (Figura 2A), é formado por uma mistura de glicerídeos compostos por diferentes ácidos graxos, o que gera imperfeições no cristal. Consequentemente, a eficiência de encapsulamento é aumentada devido ao maior espaço formado para acomodar o ativo. O “CLN amorfo” (Figura 2B), que consiste em uma mistura de lipídios sólidos com lipídios líquidos (óleo), gera partículas em um estado sólido amorfo e evita a expulsão do ativo durante a estocagem, aumentando a eficiência de encapsulação de moléculas lipofílicas. Já o terceiro modelo, chamado de “múltiplo CLN” (Figura 2C), é uma dispersão de óleo em lipídio sólido. Nesse caso, a solubilidade das moléculas de óleo no lipídio sólido é excedida, o que leva à separação de fase e formação de nanocompartimentos de óleo no interior da matriz lipídica sólida (78)(79). Diversos óleos podem ser utilizados na produção dos CLN amorfo ou múltiplo como, por exemplo, óleo de coco, óleo de argan, óleo de soja etc. Um óleo interessante, devido as suas propriedades biológicas, que pode ser utilizado na produção dos CLN é a oleorresina de *Copaifera duckei*.

Figura 2: Esquematização estrutural dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN).

A) CLN imperfeito; B) CLN amorfo; C) múltiplo CLN.

Pesquisas têm sido conduzidas com o intuito de avaliar as NLS e CLN quanto às suas propriedades, efeitos e eficiência em encapsular quimioterápicos e tratar de forma seletiva diversos tipos de neoplasias, inclusive o CB. Battaglia e colaboradores (80) demonstraram, em modelo *in vitro* e *in vivo* de tumores mamários, um maior acúmulo do metotrexato encapsulado em NLS no tumor e maior eficácia da terapia. Xu e colaboradores (81) avaliaram a atividade do antineoplásico docetaxel carregado por NLS funcionalizadas ou não com galactose frente a carcinomas hepatocelular humano. A citotoxicidade dessas nanopartículas frente à linhagem BEL7402 foi superior ao Taxotere® e às partículas não funcionalizadas. No estudo *in vivo*, em modelo murino de hepatocarcinoma, houve maior eficácia antitumoral com baixa toxicidade sistêmica em comparação com o Taxotere® e partículas não funcionalizadas. Andrade e colaboradores (82) ao avaliarem a penetração cutânea, *in vitro*, dos fármacos clobetasol e tacrolimus (utilizados no tratamento de lúpus eritematoso discóide), encapsulados em carreadores lipídicos nanoestruturados, notaram que os CLN aumentaram significativamente a retenção cutânea dos fármacos no estrato córneo e na pele remanescente. Nos estudos de permeação cutânea do antineoplásico paclitaxel foi verificado que o encapsulamento do fármaco nos CLN aumentou aproximadamente 3 vezes sua quantidade no estrato córneo quando comparado com sua administração na forma não encapsulada.

Houve também um aumento de 1,5 vezes da quantidade de paclitaxel no estrato córneo em relação à aplicação tópica de outras partículas lipídicas (83).

Pesquisas recentes têm obtido resultados promissores com o encapsulamento de CM em NLS. Kakkar e colaboradores (84) verificaram que houve liberação sustentada por até 7 dias da CM encapsulada em NLS, sendo que em estudo farmacocinético *in vivo* desse sistema houve um aumento significativo da biodisponibilidade após administração oral em todas as doses testadas quando comparada com a CM livre. Em outro estudo, NLS-CM revestida com transferrina, melhorou a fotoestabilidade da substância, assim como sua atividade anticancerígena frente à linhagem de câncer de mama MCF-7. Também houve considerável melhora no *uptake* celular comparado com a CM livre e com o NLS-CM não revestido (85). Oliveira e colaboradores (86) avaliaram o potencial citotóxico *in vitro* de nanopartículas de sílica contendo CM revestidas com folato em células de câncer de próstata. As nanopartículas foram significativamente citotóxicas às células tumorais, enquanto que células normais foram bem menos afetadas. Jourghanian e colaboradores (87) compararam a atividade antimicrobiana do sistema NLS-CM com a mesma concentração de CM livre, usando *E. coli* e *S. aureus*. Observaram que a atividade antimicrobiana de NLS-CM reduziu consideravelmente a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM). Chen e colaboradores (88) prepararam CLN contendo CM para o tratamento do câncer cerebral e avaliaram a citotoxicidade do sistema CLN-CM tanto *in vitro* quanto *in vivo*. CLN-CM melhorou o efeito alvo da CM para o tumor cerebral, aumentando sua eficiência inibitória de 19,5% para 82,3%. Outros estudos têm obtido resultados promissores com o encapsulamento do extrato. Uma formulação tópica contendo NLS encapsulando os curcuminóides apresentou boa espalhabilidade e estabilidade, sendo que as nanopartículas foram capazes de impedir a permeação e penetração do composto na derme e epiderme por longo período em estudo *ex vivo* (89). Nayak e colaboradores (90) prepararam carreadores lipídicos nanoestruturados encapsulando os curcuminóides para tratamento antimalárico *in vivo*, e observaram que os mesmos encapsulados apresentaram duas vezes mais potencial antimalárico quando comparados com os curcuminóides livres.

Como pode ser observado, diversos estudos apontam para o potencial antitumoral da curcumina e do extrato encapsulados em NLS e CLN e indicam que o encapsulamento dos mesmos nestes sistemas nanoestruturados pode aumentar sua

eficácia. Contudo, não há trabalhos disponíveis utilizando CLN como carreador para liberação intravesical desses curcuminóides no tratamento do câncer de bexiga. Nesse sentido, o presente trabalho visa explorar o potencial antitumoral do extrato frente a células de câncer de bexiga, uma vez que os curcuminóides que o compõe possuem interessantes propriedades biológicas já comprovadas.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Preparo e caracterização de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo oleorresina de *Copaífera duckei* encapsulando o extrato de *Curcuma longa*, e avaliação da citotoxicidade deste sistema em células de câncer de bexiga, visando investigar o potencial biológico do oleorresina e do extrato para futuro tratamento de câncer de bexiga pela via intravesical.

2.2 Específicos

- Utilizar o planejamento experimental como ferramenta para estudar as influências de variáveis independentes nas propriedades físicas dos carreadores;
- Preparar os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) com e sem O-Cd (CLN imperfeito) pelo método de emulsão à quente e sonicação;
- Encapsular o ECL nos CLN e avaliar a quantidade máxima do extrato que pode ser encapsulada nos mesmos;
- Caracterizar os CLN e CLN_{imp} com e sem ECL quanto ao diâmetro, índice de polidispersão e potencial zeta por espalhamento de luz dinâmico (DLS);
- Avaliar a estabilidade ao longo do tempo dos CLN armazenados à 4°C;
- Avaliar a eficiência de encapsulação do ECL e a capacidade de encapsulação;
- Caracterizar as partículas por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA);
- Caracterizar as partículas por microscopia de força atômica (AFM);
- Caracterizar as partículas por calorimetria exploratória diferencial (DSC);
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* em células de câncer de bexiga (RT4) do O-Cd livre e do ECL livre e encapsulado nos carreadores preparados, utilizando o

6. CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos permitem concluir que o planejamento fatorial elaborado neste estudo foi de grande relevância uma vez que permitiu investigar a influência de fatores nas propriedades físico-químicas dos carreadores e por fim, escolher a formulação mais adequada para os objetivos propostos (menor diâmetro, baixo Pdl e perfil de distribuição de diâmetro monomodal). Dessa forma, foi possível obter carreadores lipídicos nanoestruturados para o encapsulamento de ECL com propriedades físico-químicas interessantes para futura terapia do câncer de bexiga.
- Os carreadores preparados apresentaram diâmetro médio próximo de 200 nm, baixo índice de polidispersão ($<0,3$), potencial zeta negativo, formato esférico e superfície lisa. Os carreadores foram estáveis durante todo o período de tempo estudado quando armazenados em geladeira (4 °C). A análise em NTA permitiu conhecer as concentrações das partículas nas dispersões, sendo de suma importância para os estudos de citotoxicidade. A presença do O-Cd no carreador trouxe característica amorfa à matriz lipídica, uma vez que os CLN apresentaram índice de recristalização de 56,69%.
- O encapsulamento do ECL não alterou de forma significativa as propriedades físico-químicas dos carreadores. A eficiência de encapsulação dos carreadores foi de aproximadamente 70%. Já a capacidade de encapsulação dos CLN-ECL e CLN_{imp}-ECL foi de 0,6% e 1%, respectivamente.
- O carreador contendo O-Cd com ou sem ECL apresentou potencial citotóxico frente à linhagem de células de câncer de bexiga (RT4), sendo que o efeito do O-Cd prevaleceu mesmo com a presença do ECL. O O-Cd livre não foi tóxico às células. O carreador imperfeito não apresentou citotoxicidade, porém apresentou toxicidade considerável ao encapsular o ECL. O ECL livre foi tóxico às células.
- Os carreadores com ECL foram altamente internalizados pelas células RT4, o que pôde ser notado devido à forte intensidade de fluorescência verde dos curcuminóides do extrato. As células que internalizaram os CLN-ECL apresentaram

fragmentações no núcleo, indicando morte por apoptose. Já o *uptake* celular do ECL livre não foi favorável.

- Todos os efeitos biológicos demonstrados pelos CLN, CLN-ECL e CLN_{imp}-ECL aliados as suas propriedades físico-químicas, os tornam sistemas promissores para futura terapia do câncer de bexiga.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.Zhang J, Miao L, Guo S, Zhang Y, Zhang L, Satterlee A, Kim WY, Huang L. Synergistic anti-tumor effects of combined gemcitabine and cisplatin nanoparticles in a stroma-rich bladder carcinoma model. J Control Release 2014 May;182:90-96. doi: doi: 10.1016/j.jconrel.2014.03.016.
- 2.Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativa 2016 – Incidência de Câncer no Brasil [Internet]. [Acesso em 22 junho 2017]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/sintese-de-resultados-comentarios.asp>.
- 3.International Agency for Research on Cancer (IARC). GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 [Internet]. [Acesso em 22 junho 2017] Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
- 4.Sociedade Brasileira de Urologia (SBU) e Sociedade Brasileira de Patologia (SBP). Câncer de bexiga: Estadiamento e Tratamento I. Rev Ass Med Bras. 2008;54(3): 196-198.
- 5.Shimada K, Fujii T, Anai S, Fujimoto K, Konishi N. ROS generation via NOX4 and its utility in the cytological diagnosis of urothelial carcinoma of the urinary bladder. BMC Urol. 2011 Oct;11:1-22. doi: 10.1186/1471-2490-11-22.
- 6.National Cancer Institute (NCI). Bladder Cancer [Internet]. [Acesso em 01 julho 2017]. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/bladder>.
- 7.Hassan JM, Chang SS, Cookson MS, Smith Jr, JA. Prognosis and Management of Invasive Transitional Cell Carcinoma. In: RICHIE JP, D'AMICO AV. (Eds). Urol. Oncol. Philadelphia: Elsevier, 2005. p. 338-357.
- 8.Morales A, Eidinger D. Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of adenocarcinoma of the kidney. J. Urol. 1976 Apr;115(4):377-380.

9. Lestre SAI, João A, Gameiro CD, Lopes MJP. Granulomas do pênis – uma complicação rara da terapia intravesical com Bacilo Calmette-Guérin. *An Bras Dermatol*. 2011 Jul/Aug;86(4):759-762. doi: 10.1590/S0365-05962011000400021.

10. Meyer JP, Persad R, Gillatt DA. Use of bacille Calmette-Guérin in superficial bladder cancer. *Postgrad Med J*. 2002 Aug;78(922):449-454. doi: 10.1136%2Fpmj.78.922.449.

11. Higuchi T, Shimizu M, Owaki A, Takahashi M, Shinya E, Nishimura T, Takahashi H. A possible mechanism of intravesical BCG therapy for human bladder carcinoma: Involvement of innate effector cells for inhibition of tumor growth. *Cancer Immunol. Immunother*. 2009 Jan;58(8):1245-1255. doi: 10.1007/s00262-008-0643-x.

12. Lamm DL, Blumenstein BA, Crissman JD, Montie JE, Gottesman JE, Lowe BA, Sarosdy MF, Bohl RD, Grossman HB, Beck TM, Leimert JT, Crawford ED. Maintenance BCG immunotherapy for recurrent TA, T1 and CIS TCC of the bladder: A randomized Southwest Oncology Group Study. *J Urol*. 2000 Apr;163(4):1124-1129.

13. Nakamura T, Fukiage M, Higuchi M, Nakaya A, Yano I, Miyazaki J, Nishiyama H, Akaza H, Ito T, Hosokawa H, Nakayama T, Harashima H. Nanoparticulation of BCG-CWS for application to bladder cancer therapy. *J Control Release* 2014 Feb;176: 44-53. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.12.027.

14. Kappor R, Vijjan V, Singh P. Bacillus Calmette-Guerin in the management of superficial bladder cancer. *Indian J Urol*. 2008 Jan; 24(1):72-76. doi: 10.4103/0970-1591.38608.

15. Tsallas A, Jackson J, Burt H. The uptake of paclitaxel and docetaxel into ex vivo porcine bladder tissue from polymeric micelle formulations. *Cancer Chemother Pharm*. 2011 Aug;68(2):431-444. doi: 10.1007/s00280-010-1499-2.

16. Lin Z, Gao W, Hu H, Ma K, He B, Dai W, Wang X, Wang J, Zhang X, Zhang Q. Novel thermo-sensitive hydrogel system with paclitaxel nanocrystals: High drug-loading, sustained drug release and extended local retention guaranteeing better efficacy and lower toxicity. *J Control Release* 2014 Jan;174:161-170. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.10.026.

17. Adiyat KT, Katkoori D, Soloway MS. Intravesical Chemotherapy. In: Iokeshwar VB, Merseburger AS, Hautmann SH. (Eds). *Bladder Tumors: Molecular Aspects and Clinical Management*. New York: Humana Press, 2010. p. 253-270.

18.American Cancer Society (ACS). Intravesical therapy for bladder cancer [Internet]. [Acesso em 01 julho 2017]. Disponível em: <http://www.cancer.org/cancer/bladdercancer/detailedguide/bladder-cancer-treating-intravesical-therapy>

19.Mugabe C, Raven PA, Fazli L, Baker JHE, Jackson JK, Liggins RT, So AI, Gleave ME, Brooks DE, Burt HM. Tissue uptake of docetaxel loaded hydrophobically derivatized hyperbranched polyglycerols and their effects on the morphology of the bladder urothelium. *Biomaterials* 2012 Jan;33(2):692-703. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.081.

20.Master AM, Sen Gupta A. EGF receptor-targeted nanocarriers for enhanced cancer treatment. *Nanomedicine* 2012 Dec;7(12):1895-1906. doi: 10.2217/2Fnm.12.160.

21.Guo S, Huang L. Nanoparticles containing insoluble drug for cancer therapy. *Biotech Adv.* 2014 Jul-Aug;32(4):778-788. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.10.002.

22.Ali HSM, York P, Ali AMA, Blagdena N. Hydrocortisone nanosuspensions for ophthalmic delivery: A comparative study between microfluidic nanoprecipitation and wet milling. *J Control Release* 2011Jan;149(2):175-181. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.10.007

23.Yamaguchi MH, Garcia RF. Óleo de copaíba e suas propriedades medicinais: Revisão bibliográfica. *Ver. Saúde Pesq.* 2012;5(1):137-146.

24.Pieri FA, Mussi MC, Moreira MAS. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp): Histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. *Rev Bras Plantas Med.* 2009;11(4):465-472. doi: 10.1590/S1516-05722009000400016.

25.Veiga Jr VF, Pinto AC, Maciel MAM. Plantas medicinais: Cura segura? *Quím. Nova* 2005 May-Jun;28(3):519-528. doi: 10.1590/S0100-40422005000300026.

26.Ramos MFS. Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por 'spray-drying': Estudo de estabilidade e avaliação farmacológica [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas;2006.

27.Cascon V, Gilbert B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. *Phytochemistry* 2000 Dec;55(7):773-778. doi: 10.1016/S0031-9422(00)00284-3.

28. Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Jr VF. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. Quím. Nova 2002 May;25(3):429-438. doi: 10.1590/S0100-40422002000300016.
29. Basile AC, Sertié JAA, Freitas PCD, Zanini AC. Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian *copaifera*. J Ethnopharmacol. 1988 Jan;22(1):101-109.
30. Paiva LAF, Rao VSN, Gramosa NV, Silveira RA. Gastro-protective effect of *Copaifera langsdorffii* oil-resin on experimental gastric ulcer models in rats. J Ethnopharmacol. 1998 Aug;62(1):73-78.
31. Paiva LAF, De Alencar Cunha KM, Santos FA, Gramosa NV, Silveira ER, Rao VSN. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. Phytother Res. 2002 Dec;16(8):737-739. doi:10.1002/ptr.1049.
32. Veiga Jr VF, Pinto AC. O gênero *Copaifera* L. Quím. Nova 2002 Jul;25(2):273-286.
33. Paiva LAF, Gurgel LA, De Sousa ET, Silveira ER, Silva RM, Santos FA, Rao VSN. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic-acid induced colitis in rats. J Ethnopharmacol. 2004 Jul;93(1):51-56. doi: 10.1016/j.jep.2004.03.028.
34. Neto JSL, Gramosa NV, Silveira ER. Constituintes químicos dos frutos de *Copaifera langsdorffii* Desf. Quím. Nova 2008;31(5):1078-1080. doi: 10.1590/S0100-40422008000500025.
35. Gomes NM, Rezende CM, Fontes SP, Matheus ME, Fernandes PD. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. J Ethnopharmacol. 2007 Feb;109(3):486-492. doi: 10.1016/j.jep.2006.08.018.
36. Ohsaki A, Yan LT, Ito S, Edatsugi H, Iwata D, Komoda Y. The isolation and *in vivo* potent antitumour activity of clerodane diterpenoid from the oleoresin of the Brazilian medicinal plant, *Copaifera langsdorffii* desfon. Bioorg Med Chem Lett. 1994; 4(24): 2889-2892. doi: 10.1016/S0960-894X(01)80834-9.
37. Lima SR, Veiga Jr VF, Christo HB, Pinto AC, Fernandes PD. *In vivo* and *in vitro* studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. Phytother Res. 2003 Nov;17(9):1048-1053. doi: 10.1002/ptr.1295.

- 38.Gomes NM, Rezende CM, Fontes SP, Hovell AMC, Landgraf RG, Matheus ME, Pinto AC, Fernandes PD. Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid Erlich tumor. J Ethnopharmacol. 2008 Sep;119(1): 179-184. doi: 10.1016/j.jep.2008.06.033.

- 39.Montes LV, Broseghini LP, Andreatta FS, Sant'anna MES, Neves VM, Silva AG. Evidências para o uso da óleo-resina de copaíba na cicatrização de ferida – uma revisão sistemática. Natureza on line 2009;7(2):61-67.

- 40.Maistro EL, Carvalho JCT, Cascon V, Kaplan MAC. In vivo evaluation of the mutagenic potential and phytochemical characterization of oleoresin from *Copaifera duckey* Dwyer. Genet Mol Biol. 2005 Oct-Dec; 28(4):833-838. doi: 10.1590/S1415-47572005000500028.

- 41.Castro-e-silva Jr O, Zucoloto S, Ramalho FS, Reis JMC, Bastos AAC, Brito MVH. Antiproliferative activity of *Copaifera duckei* oleoresin on liver regeneration in rats. Phytother Res. 2004 Jan;18(1):92-94. doi: 10.1002/ptr.1351.

- 42.Dos santos ECG, Donnici CL, De Rezende AA, Andrade EHA, Soares LAL, Farias LM, De Carvalho MAR, Almeida MG. Effects of *Copaifera duckei* Dwyer oleoresin on the cell wall and cell division of *Bacillus cereus*. J Med Microbiol. 2013 Jul;62(Pt 7):1032-1037. doi: 10.1099/jmm.0.060046-0.

- 43.Carvalho JCT, Cascon V, Possebon LS, Morimoto MSS, Cardoso LGV, Kaplan MAC, Gilbert B. Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. Phytother Res. 2005 Nov;19(11):946-950. doi:10.1002/ptr.1762.

- 44.Borges CHG, Cruz MG, Carneiro LJ, et al. *Copaifera duckei* Oleoresin and Its Main Nonvolatile Terpenes: In Vitro Schistosomicidal Properties. Chem Biodivers. 2016 Oct;13:1348-56. doi: 10.1002/cbdv.201600065.

- 45.Costa JC, Valladão GMR, Pala G, Gallani SU, et al. *Copaifera duckei* oleoresin as a novel alternative for treatment of monogenean infections in pacu *Piaractus mesopotamicus*. Aquaculture 2017 Mar;471:72-79. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.11.041.

- 46.Sachetti CG, Fascineli ML, Sampaio JA, Lameira OA, Caldas ED. Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaiba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). Braz J Pharm. 2009 Sep;19(4):937-941. doi: 10.1590/S0102-695X2009000600025.

47.Chang H-B, Chen B-H. Inhibition of lung cancer cells A549 and H460 by curcuminoid extracts and nanoemulsions prepared from *Curcuma longa* Linnaeus. Int J Nanomedicine 2015 Aug;10(1):5059-5080. doi: 10.2147/IJN.S87225.

48.Syed HK, Liew KB, Loh GOK, Peh KK. Stability indicating HPLC-UV method for detection of curcumin in *Curcuma longa* extract and emulsion formulation. Food Chem. 2015 Aug;170:321-26.

49.Alibakhshi A, Zarghami N, et al. Telomerase Activity in the Lung and Breast Cancer Cell Lines: Different Levels of Inhibition by *Curcuma longa* Extract. Clin Biochem. 2011 Sep;44(13):S115-S116. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2011.08.281.

50.Mendonça LM. Avaliação de uma preparação hidrossolúvel de curcumina sobre a toxicidade induzida pelo quimioterápico cisplatina: possíveis efeitos protetores in vitro e in vivo, e identificação de alterações na expressão do gene Tp53 [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2012.

51.Sun M, Su X, Ding B, He X, Liu X, Yu A, Lou H, Zhai G. Advances in nanotechnology-based delivery systems for curcumin. Nanomedicine 2012 Jul;7(7):1085-1100. doi:10.2217/nnm.12.80.

52. Zeng Y, Qiu F, Liu Y, Qu G, Yao X. Isolation and identification of phase 1 metabolites of demethoxycurcumin in rats. Drug Metab Dispos. 2007 Jun;35(9):1564-1573. doi: 10.1124/dmd.107.015008.

53.Mendonça LM, Santos GC, Antonucci GA, Santos AC, Bianchi MLP, Antunes LMG. Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of curcumin in PC12 cells. Mutation Res. 2009 Apr;675(1):29-34. doi: 10.1016/j.mrgentox.2009.02.003.

54.Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the antiinflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. Int J Biochem Cell Biol. 2009 Jan; 41(1):40-59. doi:10.1016/j.biocel.2008.06.010.

55.Zhou H, Beevers CS, Huang S. Targets of curcumin. Current Drug Targets 2011 Mar;12(3):332-347.

56.Peng J-R, Qian, Z-Y. Drug delivery systems for overcoming the bioavailability of curcumin: not only the nanoparticle matters. Nanomedicine 2014 Jul;9(6):747-750. doi:10.2217/nnm.14.21.

57. Leite KRM, Chade DC, Sanudo A, Sakiyama BYP, Batocchio G, Srougi M. Effects of curcumin in an orthotopic murine bladder tumor model. *Int Braz J Urol.* 2009 Sep-Oct; 35(5):599-607. doi:10.1590/S1677-55382009000500012.

58. Mohanty C, Sahoo SK. The *in vitro* stability and *in vivo* pharmacokinetics of curcumin prepared as an aqueous nanoparticulate formulation. *Biomaterials* 2010 Sep;31(25): 6597-6611, 2010. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.04.062.

59. Wu Y, Zhang P, Yang H, Ge Y, Xin Y. Effects of demethoxycurcumin on the viability and apoptosis of skin cancer cells. *Mol Med Rep.* 2017 Feb;16:539-46. doi: 10.3892/mmr.2017.6666.

60. Leng L, Zhong X, Sun G, Qiu W, Shi L. Demethoxycurcumin was superior to temozolomide in the inhibition of the growth of glioblastoma stem cells in vivo. *Tumor Biol.* 2016 Sep;37(12):15847-15857. doi: 10.1007/s13277-016-5399-x.

61. Du Z, Sha X. Demethoxycurcumin inhibited human epithelial ovarian cancer cells' growth via up-regulating miR-551a. *Tumor Biol.* 2017 Mar;39(3):1-10. doi: 10.1177/1010428317694302.

62. Pei H, Yang Y, Cui L, Yang J, Li X, Yang Y, Duan H. Bisdemethoxycurcumin inhibits ovarian cancer via reducing oxidative stress mediated MMPs expressions. *Sci Rep.* 2016 Jun;6:1-8. doi: 10.1038/srep28773.

63. Yang H, Fan S, An Y, Wang X, Pan Y, et al. Bisdemethoxycurcumin exerts pro-apoptotic effects in human pancreatic adenocarcinoma cells through mitochondrial dysfunction and a GRP78-dependent pathway. *Oncotarget.* 2016 Nov;7(50):83641-83656. doi: 10.18632/oncotarget.13272.

64. Yu C-C, Yang S-T, Huang W-W, Peng S-F, et al. Bisdemethoxycurcumin induces DNA damage and inhibits DNA repair associated protein expressions in NCI-H460 human lung cancer cells. *Environ Toxicol.* 2016 Dec;31(12):1859-68. doi: 10.1002/tox.22187.

65. Mehanny M, Hathout RM, Geneidi AS, Mansour S. Bisdemethoxycurcumin loaded polymeric mixed micelles as potential anti-cancer remedy: Preparation, optimization and cytotoxic evaluation in a HepG-2 cell model. *J Mol Liq.* 2016 Feb;214:162-70. doi: 10.1016/j.molliq.2015.12.007.

- 66.Li PJ, Woo SJ, Jee J-G, Sung SH, Kim HP. Bisdemethoxycurcumin induces apoptosis in activated hepatic stellate cells via cannabinoid receptor 2. *Molecules* 2015 Jan;20(1): 1277-92. doi: 10.3390/molecules20011277.

- 67.Codevilla, C. F.; Barin, J. S.; Silva, C. B.; Silva, T. M.; Menezes, C. R. Incorporação da curcumina em sistemas nanoestruturados: Revisão. *Ciência & Natura*, v. 37, p. 153-163, 2015.

- 68.Durán N, Durán M, Tasic L, Marcato PD. Tecnologia de nanocristais em fármacos. *Quím. Nova* 2010 jan;33(1):151-158. doi:10.1590/S0100-40422010000100028.

- 69.Schwarz JC, Weixelbaum A, Pagitsch E, Löw M, Resch GP, Valenta C. Nanocarriers for dermal drug delivery: Influence of preparation method, carrier type and rheological properties. *Int J Pharm.* 2012 Nov;437(1-2):83–88. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.08.003.

- 70.Müller RH, Mäder K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm.* 2000 Jul;50(1):161-177. doi: 10.1016/S0939-6411(00)00087-4.

- 71.Mehnert W, Mäder K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001 Apr;47(2-3):165-196. doi: 10.1016/S0169-409X(01)00105-3.

- 72.Doktorovova S, Souto EB, Silva AM. Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers – A systematic review of *in vitro* data. *Eur J.Pharm Biopharm.* 2014 May;87(1):1-18. doi:10.1016/j.ejpb.2014.02.005.

- 73.Marcato PD. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. *Rev Eletron Farm.* 2009;6(2):1-37. doi: 10.5216/ref.v6i2.6545.

- 74.Swathi G, Prasanthi NL, Manikiran SS, Ramarao N. Solid lipid nanoparticles: Colloidal carrier systems for drug delivery. *Int J Pharm Sci Res.* 2010 Nov;1(12):1-16.

- 75.Barbosa RM, et al. Cytotoxicity of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers containing the local anesthetic dibucaine designed for topical application. *J Phys.: Conf Ser.* 2013;429:1-8. doi:10.1088/1742-6596/429/1/012035.

76.Villanova JCO, et al. Aplicações farmacêuticas de polímeros. Polímeros: Ciência e Tecnologia 2010;20(1):51-64.

77.Nair R, Kumar ACK, Priya VK, Yadav CM, Raju PY. Formulation and evaluation of chitosan solid lipid nanoparticles of carbamazepine. Lipids Health Dis. 2012 Jun;11(72):1-8. doi:10.1186%2F1476-511X-11-72.

78.Jenning V, Mäder K, Gohla SH. Solid lipid nanoparticles (SLNTM) based on binary mixtures of liquid and solid lipids: a ¹H-NMR study. Int J Pharm. 2000 Sep;205(1-2):15-21. doi:10.1016/S0378-5173(00)00462-2.

79.Üner M, Radtke M, Wissing SA. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. Encyc Nanosci Nanotech., American Scientific Publishers 2007;10:43-56.

80.Battaglia L, Serpe, L.; Muntoni, E.; Zara, G.; Trotta, M.; Gallarate, M. Methotrexate-loaded SLNs prepared by coacervation technique: *in vitro* cytotoxicity and *in vivo* pharmacokinetics and biodistribution. *Nanomedicine*, v. 6, n. 9, p. 1561-1573, 2011.

81.Xu Z, Chen L, Gu W, Zhang Z, Xi Y, Li Y. The performance of docetaxel-loaded solid lipid nanoparticles targeted to hepatocellular carcinoma. Biomaterials 2009 Jan; 30(2):226–232. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.09.014.

82.Andrade LM, Amorim ICS, Santos APK, Lima EM, Marreto RM, Taveira SF. Aumento da permeação cutânea *in vitro* do tacrolimus e clobetasol por encapsulação em carreadores lipídicos nanoestruturados. Ver. Biotec. Ciência 2013;2(1):1-10.

83.Tosta FV. Desenvolvimento de sistemas lipídicos nanoestruturados contendo paclitaxel: estudos de permeação cutânea [dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia; 2014.

84.Kakkar V, Singh S, Singla D, Kaur IP. Exploring solid lipid nanoparticles to enhance the oral bioavailability of curcumin. Mol Nutr Food Res. 2011;55(3):495-503. doi: 10.1002/mnfr.201000310.

85.Mulik RS, Monkkonen J, Juvonem RO, Mahadik KR, Paradkar AR. Transferrin mediated solid lipid nanoparticles containing curcumin: enhanced *in vitro* anticancer activity by induction of apoptosis. Int J Pharm. 2010 Oct;398(1-2):190-203. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.07.021.

- 86.Oliveira LF, Bouchmella K, Gonçalves KA, Bettini J, Kobarg J, Cardoso MB. Functionalized sílica nanoparticles as an alternative platform for targetet drug-delivery of water insoluble drugs. *Langmuir* 2016 Mar;32(13):3217-3225. doi:10.1021/acs.langmuir.6b00214.

- 87.Jourghanian P, Ghaffari S, Ardjmand M, Haghighat S, Mohammadnejad M. Sustained release curcumin loaded solid lipid nanoparticles. *Adv Pharm Bull.* 2016 Mar;6(1):17-21. doi:10.15171%2Fapb.2016.004.

- 88.Chen Y, Pan L, Jiang M, Li D, Jin L. Nanostructured lipid carriers enhance the bioavailability and brain cancer inhibitory efficacy of curcumin both *in vitro* and *in vivo*. *Drug Delivery* 2016;23(4):1383-1392. doi:10.3109/10717544.2015.1049719.

- 89.Zamarioli CM, Martins RM, Carvalho EC, Freitas LAP. Nanoparticles containing curcuminoids (*Curcuma longa*): development of topical delivery formulation. *Rev bras farmacogn.* 2015 Feb;25:53-60. doi:10.1016/j.bjp.2014.11.010.

- 90.Nayak AP, Tiyafoonchai W, Patankar S, Madhusudhan B, Souto EB. Curcuminoids-loaded lipid nanoparticles: Novel approach towards malaria treatment. *Colloids Surf., B.* 2010 Jul;81:263-273. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.07.020.

- 91.Brasil. Resolução - RE n. 899, 29 maio 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília (DF): Ministério da Saúde. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RE_899_2003_COMP.pdf/ff6fd6b-3ad1-4d0f-9af2-3625422e6f4b.

- 92.United States Pharmacopeia. Rockville: United States Pharmacopeial Convention. 2007; p. 2118.

- 93.Cass QB, Degani ALG. Desenvolvimento de métodos por HPLC: Fundamentos, Estratégias e Validação. São Carlos: EdUFSCar; 2013. p. 77.

- 94.Vander Heyden Y, Nijhuis A, Smeyers-Verbeke J, Vandeginste BMG, Massart DL. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *J Pharm Biomed Anal.* 2001;24:723-753.

- 95.Neto B, De Scarminio B, Bruns IS, Edward R. Como fazer experimentos: aplicações na ciência e na indústria. Porto Alegre: Bookman; 2010. p. 414.

96.Malvern Instruments. Espalhamento de luz dinâmico (DLS) [Internet]. [Acesso em 20 julho 2017]. Disponível em: www.malvern.com/br/products/technology/dynamic-light-scattering/.

97.Malvern Instruments. Potencial Zeta [Internet]. [Acesso em 20 julho 2017]. Disponível em: www.malvern.com/br/products/measurement-type/zeta-potential.

98.Soni MG, Carabin IG, Burdock GA. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). Food Chem Toxicol. 2005 Jul; 43(7):985-1015.

99.Ibrahim WM, AlOmran AH, Yassin AEB. Novel sulpiride-loaded solid lipid nanoparticles with enhanced intestinal permeability. Int J Nanomedicine 2013 Dez;9:129-144. doi:10.2147/IJN.S54413.

100.Shete H, Patravale V. Long chain lipid based tamoxifen NLC. Part I: Preformulation studies, formulation development and physicochemical characterization. Int J Pharm. 2013 Mar;454:573-583. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.03.034.

101.Sha M, Pathak K. Development and statistical optimization of solid lipid nanoparticles of simvastatin by using 2(3) full factorial design. AAPS PharmSciTech. 2010 Jun;11(2):489-96. doi: 10.1208/s12249-010-9414-z.

102.Borenfreund E, Puerner JA. A simple quantitative procedure using monolayer culture for toxicity assays. J Tissue Cult Meth. Mar;9(1):7-9.

103.Koop, HS. Hidrogéis binários de xantana e galactomananas com incorporação de curcumina visando uso tópico [tese]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas; 2012.

104.Kiuchi F, Goto Y, Sugimoto N, Akao N, Kondo K, Tsuda Y. Nematocidal Activity of Turmeric: Synergistic Action of Curcuminoids. Chem Farm Bull. 1993 Feb;41(9):1640-43.

105.Moreira MR, Souza AB, Moreira MA, Bianchi TC, Carneiro LJC, Estrela FT, Santos RA, Januário AH, Martins CHG, Ambrosio SR, Veneziani RCS. RP-HPLC analysis of manool-rich *Salvia officinalis* extract and its antimicrobial activity against bacteria associated with dental caries. Rev Bras Farmacogn. 2013 Nov;23(13):870:876. doi: 10.1590/S0102-695X2013000600003.

106. Aggarwal BB, Bhatt ID, Ichikawa H, Ahn KS, Sethi G, Sandur SK, Sundaram C, Seeram N, Shishodia S. Curcumin – Biological and Medicinal Properties. In: Ravindran PN, Babu KN, Sivaraman K, editors. *Turmeric – The genus *Curcuma**. New York: CRC Press;2007. p. 297-368.

107. Teófilo RF, Ferreira MMC. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para calculus de planejamentos experimentais, um tutorial. *Quim Nova*. 2006 Dez;29(2):338-50.

108. Marinho MRM. Planejamento fatorial: uma ferramenta ponderosa para os pesquisadores. Seção de pôster apresentada: XXXIII Congresso Brasileiro de Ensino de Engenharia; 12-15 set. 2005; Campina Grande, PB, Brasil.

109. Figueiro JF, Andreani T, Egea MA, Garcia ML, Souto SB, Souto EB. Experimental factorial design applied to mucoadhesive lipid nanoparticles via multiple emulsion process. *Colloids Surf., B*. 2012 May;100:84-89.

110. Venturini CG, Bruinsmann FA, Contri R V, Fonseca FN, Frank LA, Amore CMD, Raffin RP, Buffon A, Pohlmann AR, Guterres SS. Co-encapsulation of imiquimod and copaiba oil in novel nanostructured systems: promising formulations against skin carcinoma. *Eur J Pharm Sci*. 2015 nov; 79:36–43. doi: 10.1016/j.ejps.2015.08.016.

111. Svetlichny G, Cunha SL, Silva FEK, Bueno K, Pohlmann AR. Solid lipid nanoparticles containing copaiba oil and allantoin: development and role of nanoencapsulation on the antifungal activity. *Pharmazie* 2015 Aug;70:155-64. doi: 10.1691/ph.2015.4116.

112. Müller RH, Petersen RD, Hommoss A, Pardeike J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007 Jul;59(6):522-30. doi: 10.1016/j.addr.2007.04.012.

113. Siekmann B, Westesen K. Thermoanalysis of the recrystallization process of melt-homogenized glyceride nanoparticles. *Colloids Surf., B*. 1994 Nov;3(3):159–75.

114. Pacheco CC. DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS CONTENDO ÓLEO DE *Copaifera reticulata* Ducke [dissertação]. Manaus: Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Farmácia; 2014.

115. Lippacher A, Mu RH, Mader K. Liquid and semisolid SLN e dispersions for topical application: rheological characterization. *Eur J Pharm Biopharm*. 2004 Nov; 58(3):561–67. doi: 10.1016/j.ejpb.2004.04.009.

116.Moloughney JG, Weisleder N. Poloxamer 188 (P188) as a Membrane Resealing Reagent in Biomedical Applications. *Recent Pat Biotechnol.* 2012 Dec;6(3):200-11.

117.Wang JC, Bindokas VP, Skinner M, Emrick T, Marks JD. Mitochondrial mechanisms of neuronal rescue by F-68, a hydrophilic Pluronic block co-polymer, following acute substrate deprivation. *Neurochem Int.* 2017 Apr. doi: 10.1016/j.neuint.2017.04.007.

118.Lacerda SDP. CARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO À BASE DE CERA DE CARNAÚBA: DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E USO NA ENCAPSULAÇÃO DE BENZOFENONA-3 [dissertação]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, Ciências de Saúde; 2009.

119.Goppert TM, Muller RH. Polysorbate-stabilized solid lipid nanoparticles as colloidal carriers for intravenous targeting of drugs to the brain: Comparison of plasma protein adsorption patterns. *J Drug Target* 2005 Apr;13(3):179–87. doi: 10.1080/10611860500071292.

120.Freitas C, Muller RH. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN) and crystallinity of the lipid phase. *Eur J Pharm Biopharm.* 1999 Mar; 47(2):125–3.

121.Alguacil J, Kogevinas M, Real FX, Silverman DT, Malats N, Real FX, García-Closas M, Tardón A, Rivas M, Torà M, García-Closas R, Serra C, Carrato A, Pfeiffer RM, Fortuny J, Samanin C, Rothman N. Urinary pH , cigarette smoking and bladder cancer risk. *Carcinogenesis* 2011 Jun;32(6):843–7. doi:10.1093/carcin/bgr048.

122.Chu Y, Li D, Luo YF, He XJ, Jiang MY. Preparation and in vitro evaluation of glycyrrhetic acid-modified curcumin-loaded nanostructured lipid carriers. *Molecules* 2014 Feb;19(2):2445–57. doi: 10.3390/molecules19022445.

123.Fang M, Jin Y, Bao W, Gao H, Xu M, Wang D, Wang X, Yao P, Liu L. In vitro characterization and in vivo evaluation of nanostructured lipid curcumin carriers for intragastric administration. *Int J Nanomedicine* 2012 Oct;7:5395–404. doi: 10.2147/IJN.S36257

124.Madane RG, Mahajan HS. Curcumin-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) for nasal administration: design, characterization, and in vivo study. *Drug Deliv.* 2016 May;23(4):1326-34. doi: 10.3109/10717544.2014.975382.

125.Senyigit ZA, Karavana SY, Ilem-Ozdemir D, Çaliskan Ç, Waldner C, Sen S, Bernkop-Schnurch A, Baloglu E. Design and evaluation of an intravesical delivery system for superficial bladder cancer: preparation of gemcitabine HCl-loaded chitosan-thioglycolic acid nanoparticles and comparison of chitosan/poloxamer gels as carriers. *Int J Nanomedicine* 2015 Oct;10:6493-507. doi: 10.2147/IJN.S93750.

126.Guhasarkar S, Banerjee R. Intravesical drug delivery: Challenges , current status, opportunities and novel strategies. *J Control Release* 2010 Sep;148(2):147–59. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.08.03

127.Lin PC, Lin S, Wang PC, Sridhar R. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnol Adv.* 2014 Nov;32(4):711-26. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.11.006.

128.Patri AK, Dobrovolskaia MA, Stern ST, Mcneil SE. Preclinical Characterization of Engineered Nanoparticles Intended for Cancer Therapeutics. In: Amiji Ma, editor. *Nanotechnology for Cancer Therapy*. New York: CRC Press; 2006;105–37.

129.Thatipamula RP, Palem CR, Gannu R, Mudragada S, Yamsani MR. Formulation and in vitro characterization of domperidone loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. *DARU* 2011;19(1):23–32.

130.Carlton RA. Polarized Light Microscopy. In: Carlton RA, author. *Pharmaceutical Microscopy*. New York: Springer; 2011; 7-64.

131.Attama AA, Momoh MA, Builders PF. Lipid Nanoparticulate Drug Delivery Systems: A Revolution in Dosage Form Design and Development. In: Demir Ali, editor. *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*. [place unknown]: InTech; 2016; 107-40.

132.Li J, Liu D, Tan G, Zhao Z, Xinggang Y, Pan W. A comparative study on the efficiency of chitosan-N-acetylcysteine, chitosan oligosaccharides or carboxymethyl chitosan surface modified nanostructured lipid carrier for ophthalmic delivery of curcumin. *Carbohydr Polym.* 2016 Aug; 146:435-44. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.03.079.

133.Meng F, Asghar S, Xu Y, Wang J, Jin X, Wang Z, Wang J, Ping Q, Zhou J, Xiao Y. Design and evaluation of lipoprotein resembling curcumin-encapsulated protein-free nanostructured lipid carrier for brains targeting. *Int J Pharm.* 2016 Jun;506(1-2):46-56. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.04.033.

134.Hole P, Sillence K, Hannel C, Maguire CM, et al. Interlaboratory comparison of size measurements on nanoparticles using nanoparticle tracking analysis (NTA). *J Nanopart Res.* 2013 Nov;15:1-12. doi: 10.1007/s11051-013-2101-8.

135.Filipe V, Hawe A, Jiskoot W. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. *Pharm Res.* 2010 May;27(5):796-810. doi: 10.1007/s11095-010-0073-2.

136.Kong B, Seog JH, Graham LM, Lee SB. Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)* 2011 Jul; 6(5):929–941. doi: 10.2217/nnm.11.77.

137.Dieckmann Y, Colfen H, Hofmann H, Petri-Fink, A. Particle Size Distribution Measurements of Manganese-Doped ZnS Nanoparticles. *Anal. Chem.* 2009 May; 81(10):3889–3895. doi: 10.1021/ac900043y.

138.Nahak P, Karmakar G, Chettri P, Roy B, Guha P, Besra SE, et al. Influence of Lipid Core Material on Physicochemical Characteristics of an Ursolic Acid-Loaded Nanostructured Lipid Carrier: An Attempt To Enhance Anticancer Activity. *Langmuir* 2016 Sep;32(38):9816-25. doi: 10.1021/acs.langmuir.6b02402.

139.Boakye CHA, Patel K, Patel AR, Faria HAM, Zucolotto V, Safe S, Singh M. Lipid-based oral delivery systems for skin deposition of a potential chemopreventive DIM derivative: characterization and evaluation. *Drug Deliv. and Transl. Res.* 2016 Oct;6(5):526-39. doi: 10.1007/s13346-016-0302-2.

140.Neupane YR, Srivastava M, Ahmad N, Kumar N, Bhatnagar A, Kohli K. Lipid based nanocarrier system for the potential oral delivery of decitabine: Formulation design, characterization, *ex vivo*, and *in vivo* assesment. *Pharm. Nanotech.* 2014 Nov;477:601-612. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.11.001.

141.Svilenov H, Tzachev C. Solid Lipid Nanoparticles – A Promising Drug Delivery System. In: Seifalian A, Mel A, Kalaskar DM. *Nanomedicine*. London: One Central Press; 2014.

142.Zhao S, Minh LV, Li N, Garamus VM, Handge UA, Liu J, Zhang R, et al. Doxorubicin hydrochloride-oleic acid conjugate loaded nanostructured lipid carriers for tumor specific drug release. *Colloids Surf., B.* 2016 Apr;145:95-103. doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.04.027.

- 143.Song A, Zhang X, Li Y, Mao X, Han F. Effect of liquid to solid lipid ratio on characterizations of flurbiprofen-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for transdermal administration. *Drug Dev Ind Pharm*. 2016 Aug;42(8):1308-14. doi: 10.3109/03639045.2015.1132226.
- 144.Montenegro L, Lai F, Offerta A, Sarpietro MG, Micicchè L, Maccioni AM, Valenti D, Fadda AM. From nanoemulsions to nanostructured lipid carriers: A relevant development in dermal delivery of drugs and cosmetics. *J Drug Deliv Technol*. 2016 Apr; 32:100-12. doi: 10.1016/j.jddst.2015.10.003.
- 145.Mishra A, Iman SS, Aqil M, Ahad A, Sultana Y, Aameeduzzafar, Ali A. Carvedilol nano lipid carriers: formulation, characterization and in-vivo evaluation. *Drug Deliv*. 2016 May;23(4):1486-94. doi: 10.3109/10717544.2016.1165314.
- 146.Suresh G, Manjunath K; Venkateswrlu V, Satyanarayana V. Preparation, characterization and in vitro and in vivo evaluation of lovastatin solid lipid nanoparticles. *AAPS PharmSciTech*. 2007 Mar;8(1):E162-E170. doi: 10.1208%2Fpt0801024.
- 147.Jesser WA, Shneck RZ; Gile WW. Solid-liquid equilibria in nanoparticles of Pb-Bi alloys. *Phys Rev B*. 2004 Apr;69:1-13. doi: 10.1103/PhysRevB.69.144121.
- 148.Wang MT, Jin Y, Yang YX, et al. In vivo biodistribution, antiinflammatory, and hepatoprotective effects of liver targeting dexamethasone acetate loaded nanostructured lipid carrier system. *Int J Nanomedicine* 2010 Aug;5:487-97.
- 149.Mu L, Feng SS. Fabrication, characterization and in vitro release of paclitaxel (Taxol) loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres prepared by spray drying technique with lipid/cholesterol emulsifiers. *J Control Release* 2011 Oct;76(3):239-54.
- 150.Sun M, Nie S, Pan X, Zhang R, Fan Z, Wang S. Quercetin-Nanostructured lipid carriers: Characteristics and anti-breast cancer activities *in vitro*. *Coll and Surfaces B: Biointerfaces* 2014 Jan;113(1):15-24. doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.08.032.
- 151.Gomes MJ, Martins S, Ferreira D, Segundo MA, Reis S. Lipid nanoparticles for topical and transdermal application for alopecia treatment: development, physicochemical characterization, and in vitro release and penetration studies. *Int J Nanomedicine* 2014 Mar;9(1):1231-1242. doi: 10.2147/IJN.S45561.

152.Zimmermann E, Souto EB, Müller RH. Physicochemical investigations on the structure of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) by means of DSC and ¹H NMR. *Pharmazie* 2005 Jul;60(7):508-513

153.Teeranachaideekul V, Boonme P, Souto EB, Müller RH, Junyaprasert VB. Influence of oil content on physicochemical properties and skin distribution of Nilered-loaded NLC. *J Control Release* 2008 Jun;128(2):134-141. doi: 10.1016/j.jconrel.2008.02.011.

154.Amaral, LH. Preparo e avaliação de carreadores lipídicos nanoestruturados de extrato lipofílico de babaçu (*Orbignya sp.*) [dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia; 2013.

155.Ferreira MSP. Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas com paclitaxel para tratamento do glioma [dissertação]. Portugal: Universidade do Porto, Faculdade de Farmácia; 2015.

156.Pardeike J, Hommoss A, Müller RH. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int J Pharmaceutics* 2009 Jan;366(1-2):170-184. doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.10.003.

157.Cunnighane, M.J. Genomics and proteomics: the new millenium of drug Discovery and development. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2000 Jul-Aug; 44(1):291-300.

158.Dorato MA, Buckley LA. Toxicology in the drug discovery and development process. *Curr Protoc in Pharmacol.* 2006 Apr; 32:10.3:10.3.1–10.3.35. doi: 10.1002/0471141755.ph1003s32.

159.Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz AS. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Mat Research* 2003 Apr-Jun;6(3):1980-5373. doi: 10.1590/S1516-14392003000300003.

160.Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc.* 2008;3(7):1125-1131. doi: 10.1038/nprot.2008.75.

161.Zwolak, I. Comparison of five different in vitro assays for assessment of sodium metavanadate cytotoxicity in Chinese hamster ovary cells (CHO-K1 line). *Toxicol Ind Health* 2015;31(8):677-690. doi:10.1177/0748233713483199.

162.Vallianou NG, Evangelopoulos A, Schizas N, Kazazis C. Potential Anticancer Properties and Mechanisms of Action of Curcumin. *Anticancer Res.* 2015;35:645-652.

163.Candeias LP, MacFarlane DPS, McWhinnie SLW, Maidwell NL, Roeschlaub CA, Sammes PG, Whittlesey R. The catalysed NADH reduction of resazurin to resorufin. *J Am Chem Soc., Perkin Trans. 2* 1998 Sep;0(11):2333-34.

164.Pace RT, Burg KJL. Toxic effects of resazurin on cell cultures. *Cytotechnology* 2015;67:13-17.doi: 10.1007/s10616-013-9664-1.

165.O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assesment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem.* 2000 Jun;267:5421-5426.

166.Putnam KP, Bombick DW, Doolittle DJ. Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicol In vitro* 2002 May;16:599-607.

167.Ragazzi M, Longo C, Piana S. Ex Vivo (Fluorescence) Confocal Microscopy in Surgical Pathology: State of the Art. *Adv Anat Pathol.* 2016 May;23(3):159-69.

168.Paddock SW. Confocal Laser Scanning Microscopy. *Biotech.* 1999 Nov;27(5):992-1004.

169.Nguyen HN, Phuong TH, Nguyen AS, Nguyen DT, Do HD, Thi QN, Thi MNH. Curcumin as fluorescent probe for directly monitoring in vitro uptake of curcumin combined paclitaxel loaded PLA-TPGS nanoparticles. *Adv Nat Sci.: Nanosci. Nanotechnol.* 2016 Mar;7:1-6. doi:10.1088/2043-6262/7/2/025001.

170.Curic S, Wu Y, Shan B, Schaaf C, et al. Curcumin acts anti-proliferative and pro-apoptotic in human meningiomas. *J Neurooncol.* 2013 May;113:385-96. doi: 10.1007/s11060-013-1148-9.

171.Sivakumar B, Aswathy RG, Nagaoka Y, Iwai S, et al. Augmented cellular uptake and antiproliferation against pancreatic cancer cells induced by targeted curcumin and SPION encapsulated PLGA nanoformulation. *Mater Express* 2014;4(3):183-195. doi: 10.1166/mex.2014.1160.