

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

PRISCILA DAYANE DE FREITAS SANTOS

**EXTRAÇÃO DE CURCUMINÓIDES E OBTENÇÃO *IN SITU* DE
NANOPARTÍCULAS**

DISSERTAÇÃO

CAMPO MOURÃO

2018

PRISCILA DAYANE DE FREITAS SANTOS

**EXTRAÇÃO DE CURCUMINÓIDES E OBTENÇÃO *IN SITU* DE
NANOPARTÍCULAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Odinei Hess Gonçalves

Coorientador: Prof. Dr. Evandro Bona

CAMPO MOURÃO

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

SA237e

Santos, Priscila Dayane de Freitas

Extração de curcuminóides e obtenção de *in situ* de nanopartículas /
Priscila Dayane de Freitas Santos – 2018.
85 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Odinei Hess Gonçalves

Coorientador: Prof. Dr. Evandro Bona

Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do
Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos.
Campo Mourão, 2018.

Inclui bibliografias.

1. Fenólicos. 2. Cúrcuma 3. Alimentos – Dissertações. I. Gonçalves,
Odinei Hess, orient. II. Bona, Evandro, coorient. III. Universidade
Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia de Alimentos. IV. Título.

CDD: 664

Biblioteca Câmpus Medianeira
Fernanda Cristina Gazolla Bem dos Santos CRB 9/1735



TERMO DE APROVAÇÃO

EXTRAÇÃO DE CURCUMINÓIDES E OBTENÇÃO IN SITU DE NANOPARTÍCULAS

Por

PRISCILA DAYANE DE FREITAS SANTOS

Essa dissertação foi apresentada às treze horas, do dia vinte e um de fevereiro de dois mil e dezoito, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Linha de Pesquisa Ciência e Tecnologia de Produtos Alimentícios, no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos - PPGTA, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dr. Evandro Bona (Coorientador – UTFPR)

Prof. Dr. Wyrllen Everson de Souza (Membro Externo – UTFPR)

Profa. Dra. Isabel Cristina Fernandes Rodrigues Ferreira (Membro Externo – Instituto Politécnico de Bragança, com participação à distância, sendo a assinatura no presente Termo dispensada conforme Regulamento da Pós-Graduação *Stricto Sensu* da UTFPR)

A via original com as assinaturas encontra-se na secretaria do programa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, especialmente aos meus pais Scheila de Freitas e Marcelo Rodrigues, e ao meu irmão, Marcelo Junior, por todos os esforços feitos ao longo da vida para que pudessem me proporcionar esta oportunidade. Agradeço a eles pelo incentivo, apoio e dedicação.

Agradeço ao meu companheiro, Henrique Montanholi, por estar ao meu lado todos esses anos, nos momentos bons e ruins, os quais pudemos dividir.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Odinei Hess Gonçalves, pela oportunidade de trabalharmos juntos novamente, por me guiar no desenvolvimento deste trabalho, pelos conhecimentos e experiências passados, e pela grande ajuda prestada. Também agradeço aos meus co-orientadores, Dr. Evandro Bona e Dr. Rafael Porto Ineu, pela paciência e disposição em me ensinar, acompanhar e ajudar durante todos os trabalhos realizados. A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, por transmitirem seus conhecimentos a mim e aos meus colegas e por sempre estarem dispostos a tirar minhas dúvidas.

Agradeço aos meus colegas de pesquisa, Aline Coqueiro, Cristhian Lopes e Cristiane Grella, que dedicaram seu tempo a contribuir com a realização deste trabalho.

Agradeço pela oportunidade de conhecer meus colegas e amigos de mestrado, Valquíria Maeda, Thaysa Moya, Larissa Rocha, Jéssica Thaís, Fernanda Rúbio, Tamires Barlati, Igor de Sá, Felipe Rocha, Gustavo Makimori, Luiza Mariano, Tatiane Vieira, Heloísa Moraes, Franciele Viell, Mirian Soudaleff e Alexandre Guimarães, pelo apoio que me deram e por todos os momentos que passamos juntos.

Agradeço aos professores que compuseram minha banca de qualificação, Dra. Fernanda Vitória Leimann e Dr. Wyrllen Everson de Souza, pelas sugestões e contribuições.

Por fim, agradeço à CAPES pelo apoio financeiro e a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente, com a conclusão deste mestrado.

RESUMO

SANTOS, Priscila Dayane de Freitas. **Extração de curcuminóides e obtenção *in situ* de nanopartículas**. 2018. 85 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2018.

Os curcuminóides são compostos fenólicos presentes nos rizomas da *Curcuma longa* L.. Eles possuem propriedades de interesse para as indústrias farmacêutica e de alimentos, porém têm seu uso limitado pela baixa solubilidade em água. Uma forma de aumentar sua solubilidade e estabilidade a fatores externos é encapsulando-os em matrizes poliméricas biocompatíveis. Entretanto, processos de extração e encapsulação conduzidos separadamente requerem tempo e recursos, elevando os custos de obtenção das nanopartículas e reduzindo sua aplicação. Assim, o objetivo deste trabalho foi obter nanopartículas de curcuminóides encapsulados em poli(vinil pirrolidona) (PVP) concomitantemente ao processo de extração destes do rizoma da *Curcuma longa* L.. As condições de extração e encapsulação foram otimizadas por meio de um Delineamento Central Composto Rotacional, sendo selecionadas como variáveis independentes temperatura, percentual de etanol no solvente e massa de encapsulante (PVP). Os curcuminóides extraídos (bisdemetoxicurcumina, demetoxicurcumina e curcumina) e sua solubilidade em água (utilizados como variáveis dependentes no planejamento) foram quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. As nanopartículas obtidas na condição ótima foram caracterizadas pelas técnicas de Calorimetria Diferencial de Varredura, Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier, Microscopia Eletrônica de Transmissão e Difração de Raios-X. Os percentuais de extração e solubilidade em água dos pigmentos curcuminóides, quantificados após o planejamento experimental, foram ajustados a equações quadráticas, resultando em 8 modelos estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Foram empregadas funções de desejabilidade para a otimização simultânea das respostas avaliadas. A condição experimental ótima encontrada foi: 29,9°C, 99% de solvente etanol e 15,38 mg de PVP. Neste ponto foram previstos para a solubilidade em água 0,0015 mg.mg_{curcuma}⁻¹ de bisdemetoxicurcumina, 0,0014 mg.mg_{curcuma}⁻¹ de demetoxicurcumina e 0,0038 mg.mg_{curcuma}⁻¹ de curcumina e para o percentual de extração, 10,9% de curcuminóides totais. A caracterização das nanopartículas produzidas nas condições ótimas demonstrou que a estrutura física dos curcuminóides foi alterada de cristalina para amorfa, além de terem sido identificadas interações químicas entre os curcuminóides e o encapsulante (PVP), o que sugere que a encapsulação foi eficiente. Nos ensaios biológicos, as nanopartículas de curcuminóides inibiram significativamente a atividade *in vitro* de cérebro de ratos das enzimas acetilcolinesterase (AChE) (12% de inibição para 50 µM) e glutathione S-transferase (GST) (30% de inibição para 5 µM). Dessa forma, foi possível otimizar a extração e encapsulação simultânea dos curcuminóides da cúrcuma, facilitando o processo de obtenção de nanopartículas destes compostos. As nanopartículas, de uma forma geral, apresentaram ação moduladora sobre as enzimas dos sistemas colinérgico e antioxidante endógeno, mesmo quando dispersas em água, apesar da hidrofobicidade dos curcuminóides.

Palavras-chave: Fenólicos. Cúrcuma. Encapsulação. Sonicação. Planejamento experimental. Solubilidade. Acetilcolinesterase.

ABSTRACT

SANTOS, Priscila Dayane de Freitas. **Curcuminoids extraction and *in situ* nanoencapsulation**. 2018. 85 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2018.

Curcuminoids are phenolic compounds found in *Curcuma longa* L. rhizomes, which present interesting properties for pharmaceutical and food industries. However, their application is limited due to their poor water solubility. Enhanced solubility and stability of these compounds to external factors may be achieved by encapsulation techniques using biocompatible polymers. Nevertheless, application is still difficult due to high time consumption, resources and high costs when extraction and encapsulation processes are conducted separately. The objective of this work was to produce curcuminoids-loaded polyvinylpyrrolidone (PVP) nanoparticles during their extraction from *Curcuma longa* L. rhizomes. Optimization of the experimental conditions was performed by the Central Composite Design (CCD) methodology. Temperature, ethanol percentage in the solvent and encapsulant mass (PVP) were selected as independent variables. Quantification of the extracted curcuminoids (curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin) and their water solubility were determined by High Performance Liquid Chromatography. Characterization of nanoparticles obtained under the optimal conditions was performed by Differential Scanning Calorimetry, Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Transmission Electron Microscopy and X-Ray Diffraction. The extraction yield and water solubility of the curcuminoids, quantified after the experimental design were fitted to quadratic models resulting in eight statistically significant regressions ($p < 0.05$). Desirability functions were used for the simultaneous optimization of the responses. The optimized experimental conditions were 29.9°C, 99% ethanol and 15.38 mg PVP. At this point, the predicted responses were 0.0015 $\text{mg}\cdot\text{mg}_{\text{turmeric}}^{-1}$ for bisdemethoxycurcumin solubility, 0.0014 $\text{mg}\cdot\text{mg}_{\text{turmeric}}^{-1}$ for demethoxycurcumin solubility, 0.0038 $\text{mg}\cdot\text{mg}_{\text{turmeric}}^{-1}$ for curcumin solubility and 10.9% extraction yield for total curcuminoids. Characterization of the nanoparticles produced under the optimal conditions revealed that the physical state of curcuminoids was modified from crystalline to amorphous and chemical interactions between curcuminoids and encapsulant were detected, which strongly suggests their encapsulation. Biological assays revealed that curcuminoids nanoparticles significantly inhibited the *in vitro* activities of acetylcholinesterase (AChE) (12% inhibition for 50 μM) and glutathione S-transferase (GST) (30% inhibition for 5 μM), from rat brain tissue. It was possible to simultaneously extract and encapsulate the curcuminoids from turmeric demonstrating that curcuminoids may act in the cholinergic and endogenous antioxidant systems despite their hydrophobicity.

Keywords: Phenolic. Turmeric. Encapsulation. Sonication. Experimental design. Solubility. Acetylcholinesterase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas químicas dos pigmentos curcuminóides bisdemetoxicurcumina, demetoxicurcumina e curcumina.	18
Figura 2 – Estrutura química do PVP.	25
Figura 3 – Gráficos de contorno da resposta percentual de extração dos curcuminóides totais referentes às variáveis: a) temperatura e percentual de etanol no solvente; b) temperatura e massa de PVP; e c) percentual de etanol no solvente e massa de PVP.	44
Figura 4 - Gráficos de contorno da resposta solubilidade em água (em logaritmo natural) dos curcuminóides totais referentes às variáveis: a) temperatura e percentual de etanol no solvente; b) temperatura e massa de PVP; e c) percentual de etanol no solvente e massa de PVP.	45
Figura 5 - Cromatograma de HPLC dos pigmentos curcuminóides.	48
Figura 6 – Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) das nanopartículas de curcuminóides.	50
Figura 7 - Espectros de FTIR da curcumina, do PVP, da mistura física (15:1 m/m) e das nanopartículas de curcuminóides em PVP.	51
Figura 8 – Termogramas de DSC da curcumina, do PVP, da mistura física (15:1 m/m) e das nanopartículas de PVP contendo curcuminóides.	52
Figura 9 - Difrátogramas de DRX da curcumina, do PVP, da mistura física (15:1 m/m) e das nanopartículas de PVP contendo curcuminóides.	53
Figura 10 – Atividade enzimática in vitro da AChE em atividade percentual em relação ao controle (% do controle) de cérebro de rato frente a: curcuminóides puros em DMSO 3,33% (25 µM, 50 µM, 100 µM e 200 µM) e em água (200 µM); nanopartículas de curcuminóides em água (25 µM, 50 µM, 100 µM e 200 µM); e PVP em água (13,8 µM). As barras de erro representam média ± erro padrão, para n = 4. *p < 0,05; ***p < 0,001; ****p < 0,0001, em relação ao controle (atividade enzimática na ausência dos compostos (100%)). CUR = curcuminóides; NP = nanopartículas; W = água.	54
Figura 11 - Atividade enzimática in vitro da GST (em % do controle) de cérebro de rato frente a: curcuminóides puros em DMSO 3,33% (5 µM, 25 µM e 50 µM) e em água (50 µM); nanopartículas de curcuminóides em água (0,1 µM, 5 µM,	

25 μM e 50 μM); e PVP em água (13,8 μM). As barras de erro representam média \pm erro padrão, para $n = 4$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, em relação ao controle (atividade enzimática na ausência dos compostos (100%)). CUR = curcuminóides; NP = nanopartículas; W = água. 54

Figura 12 - Gráfico dos valores previstos e observados, referente ao modelo obtido para a resposta percentual de extração dos curcuminóides totais. 74

Figura 13 - Gráfico dos valores previstos e observados, referente ao modelo obtido para a resposta solubilidade em água da bisdemetoxicurcumina. 75

Figura 14 - Gráfico dos valores previstos e observados, referente ao modelo obtido para a resposta solubilidade em água da demetoxicurcumina. 76

Figura 15 - Gráfico dos valores previstos e observados, referente ao modelo obtido para a resposta solubilidade em água da curcumina. 77

Figura 16 – Gráficos de contorno relacionando as variáveis temperatura e percentual de etanol no solvente, para a resposta percentual de extração dos compostos: a) bisdemetoxicurcumina; b) demetoxicurcumina; e c) curcumina. 79

Figura 17 – Gráficos de contorno relacionando as variáveis temperatura e massa de PVP, para a resposta percentual de extração dos compostos: a) bisdemetoxicurcumina; b) demetoxicurcumina; e c) curcumina. 80

Figura 18 – Gráficos de contorno relacionando as variáveis percentual de etanol no solvente e massa de PVP, para a resposta percentual de extração dos compostos: a) bisdemetoxicurcumina; b) demetoxicurcumina; e c) curcumina. 81

Figura 19 – Gráficos de contorno relacionando as variáveis temperatura e percentual de etanol no solvente, para a resposta solubilidade em água (em logaritmo natural) dos compostos: a) bisdemetoxicurcumina; b) demetoxicurcumina; e c) curcumina. 82

Figura 20 – Gráficos de contorno relacionando as variáveis temperatura e massa de PVP, para a resposta solubilidade em água (em logaritmo natural) dos compostos: a) bisdemetoxicurcumina; b) demetoxicurcumina; e c) curcumina. 83

Figura 21 – Gráficos de contorno relacionando as variáveis percentual de etanol no solvente e massa de PVP, para a resposta solubilidade em água (em logaritmo natural) dos compostos: a) bisdemetoxicurcumina; b) demetoxicurcumina; e c) curcumina. 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Matriz de ensaios contendo os valores reais e codificados das variáveis independentes e as respostas das variáveis dependentes.....	38
Tabela 2 – Matriz de correlação das respostas percentual de extração e solubilidade em água dos compostos bisdemetoxicurcumina (bis), demetoxicurcumina (deme), curcumina (cur) e curcuminóides totais (totais). Todos os coeficientes são estatisticamente significativos ($p < 0,01$).	39
Tabela 3 – Modelos codificados, coeficientes de determinação ajustados, erros puros e p-valores obtidos para as respostas percentual de extração e solubilidade em água dos compostos curcuminóides. Onde x_1 é a variável codificada da temperatura ($^{\circ}\text{C}$), x_2 é a variável codificada do percentual de etanol no solvente e x_3 é a variável codificada da massa de PVP (mg).....	41
Tabela 4 – Valores previstos e observados obtidos para as respostas percentual de extração dos curcuminóides e solubilidade em água (em logaritmo natural) na condição ótima, com intervalo de confiança de 95%.....	48
Tabela 5 - Condições utilizadas na obtenção das nanopartículas PVP-curcuminóides.....	49
Tabela 6 - ANOVA da resposta percentual de extração da bisdemetoxicurcumina, ao nível de significância de 95%.....	71
Tabela 7 - ANOVA da resposta percentual de extração da demetoxicurcumina, ao nível de significância de 95%.	71
Tabela 8 - ANOVA da resposta percentual de extração da curcumina, ao nível de significância de 95%.....	72
Tabela 9 - ANOVA da resposta percentual de extração dos curcuminóides totais, ao nível de significância de 95%.	72
Tabela 10 - ANOVA da resposta solubilidade em água da bisdemetoxicurcumina, ao nível de significância de 95%.	72
Tabela 11 - ANOVA da resposta solubilidade em água da demetoxicurcumina, ao nível de significância de 95%.	73
Tabela 12 - ANOVA da resposta solubilidade em água da curcumina, ao nível de significância de 95%.....	73

Tabela 13 - ANOVA da resposta solubilidade em água dos curcuminóides totais, ao nível de significância de 95%.	73
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 Curcuminóides	17
3.1.1 Características físico-químicas	18
3.1.2 Propriedades	19
3.1.3 Atividade biológica.....	20
3.2 Técnicas de extração	22
3.3 Encapsulação de compostos bioativos	24
3.3.1 Materiais encapsulantes	25
3.3.2 Técnicas de encapsulação	26
3.4 Planejamento experimental	27
3.4.1 Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR)	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Material	31
4.2 Obtenção do pó da <i>Curcuma longa L.</i>	31
4.3 Planejamento experimental	32
4.4 Extração e encapsulação dos curcuminóides	32
4.5 Respostas do planejamento experimental	33
4.5.1 Quantificação dos curcuminóides	33
4.5.2 Determinação da solubilidade em água.....	33
4.6 Caracterização das nanopartículas	34
4.7 Ensaios biológicos	35

4.7.1 Homogeneização do tecido de cérebro de rato	35
4.7.2 Atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE)	35
4.7.3 Atividade enzimática da glutathione S-transferase (GST)	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 Planejamento experimental.....	37
5.2 Otimização das condições experimentais	47
5.3 Caracterização das nanopartículas de curcuminóides em PVP	49
5.4 Ensaio biológico	54
6. CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
APÊNDICE A	71
APÊNDICE B	74
APÊNDICE C	78

1. INTRODUÇÃO

Os curcuminóides são compostos fenólicos de coloração amarela alaranjada extraídos dos rizomas da *Curcuma longa* L., popularmente conhecida como cúrcuma, açafrão-da-terra, turmérico, raiz-de-sol, açafrão-da-índia e gengibre amarelo. Tem sido utilizada ao longo dos séculos, principalmente em países do oriente, como condimento e colorante em alimentos, e também como composto medicinal (SARIKA et al., 2016; LIU et al., 2016). Os curcuminóides possuem diversas propriedades de interesse, principalmente para as indústrias alimentícias e farmacêuticas, como atividades antioxidante (AK; GÜLÇIN, 2008), antimicrobiana (BAJPAI; CHAND; AHUJA, 2015; SILVA et al., 2017b), anti-inflamatória (MURAKAMI et al., 2008; ROCHA et al., 2014), imunomoduladora (SRIVASTAVA et al., 2011) e anticarcinogênica (SARIKA; NIRMALA, 2016).

Os curcuminóides podem ser extraídos dos rizomas da cúrcuma por meio de técnicas como Soxhlet, maceração, digestão e extração assistida por micro-ondas. Wakte et al. (2011) empregaram o método de Soxhlet com acetona como solvente para extrair curcumina dos rizomas de *Curcuma longa*, obtendo 2,1% do composto após 8 horas de extração. Paulucci et al. (2013) utilizaram a técnica de maceração dinâmica para atingir um percentual de extração de curcumina de 62,6% após 24 horas de processo utilizando etanol 96% como solvente. Já Li, Ngadi e Ma (2014) extraíram curcuminóides do pó de cúrcuma pela técnica de extração assistida por micro-ondas, obtendo um rendimento máximo, após otimização, de 1,01 g/100 g_{massa seca} utilizando um tempo de extração de 7 minutos.

Entretanto, grande parte dessas técnicas apresenta baixo rendimento, alto custo de operação, além de demandarem tempo e recursos, resultando num produto de custo elevado. Um método que vem sendo explorado devido às vantagens que oferece é o de Extração Assistida por Ultrassom (EAU) ou simplesmente sonicação. Seus principais benefícios são o menor tempo e o maior rendimento de extração, menor consumo de solventes orgânicos, possibilidade de variar tais solventes, menores custos e gastos energéticos (CHEMAT et al., 2017). Por essas características, é tida como uma tecnologia mais limpa, já que resulta em menor liberação de resíduos e, portanto, em menor impacto ambiental.

O ultrassom é caracterizado por ondas sonoras com frequência acima de 20 kHz, faixa na qual o ouvido humano não é capaz de detectar (TIWARI, 2015). Os dispositivos utilizados nessa técnica podem ser de dois tipos: banho de imersão e sonda. O equipamento por sonda apresenta maior eficiência de sonicação quando comparado ao de banho, já que no primeiro caso a intensidade das ondas ultrassônicas no material sob estudo é maior (GOPAL; MUTHU; CHUN, 2015).

Mesmo com o aperfeiçoamento dos métodos de extração, os benefícios dos curcuminóides ainda são pouco aproveitados, devido ao fato de serem extremamente insolúveis em água (WANG et al., 2016; JAFARI; SABAH; RAHAIE, 2016). Uma das formas encontradas para superar essa dificuldade, tanto para os curcuminóides quanto para diversos compostos naturais pouco hidrofílicos, tem sido a micro ou a nanoencapsulação dessas substâncias. Estes são procedimentos nos quais materiais líquidos, sólidos ou gasosos são envolvidos ou recobertos por uma matriz contínua, com o objetivo de protegê-los do meio externo ou melhorar suas propriedades físico-químicas (SHEKHAR et al., 2010). Materiais encapsulados apresentam maior estabilidade ao calor, à oxidação e à luz, tendo ainda sua afinidade pela água aumentada (SHI; RAO; YU, 2008; PARAMERA; KONTELES; KARATHANOS, 2011; MOUSSA et al., 2016). Outra vantagem dessas técnicas é a potencialização dos efeitos benéficos que os compostos bioativos já possuem, fato que pode ser explicado pela diminuição no tamanho das suas partículas, o que resulta em maior área superficial e, conseqüentemente, maior contato com o meio em que se encontram (YU; HUANG, 2010; YEN et al., 2010; KRAUSZ et al., 2015; HUANG et al., 2016).

A encapsulação de um material pode ser conduzida de diversas formas, por meio de técnicas como coacervação (SHAHGHOLIAN; RAJABZADEH, 2016), emulsificação (WANG et al., 2008), precipitação em não-solvente (KHAN; RATHOD, 2014) e dispersão sólida (KARAVAS et al., 2006). A técnica de dispersão sólida abrange um conjunto de procedimentos, dentre eles o método de evaporação de solvente, que baseia-se na dissolução do material de interesse e do polímero em um solvente em comum, como etanol, sendo este evaporado em seguida. É uma técnica viável e econômica que permite melhorar a biodisponibilidade de compostos pouco solúveis em água, porém apresenta como desvantagens o uso de solventes orgânicos e a necessidade de temperaturas relativamente elevadas (FRIZON et al., 2013).

A extração e encapsulação simultânea de compostos bioativos, como os curcuminóides, seria interessante do ponto de vista comercial, pois permitiria a

redução dos custos e do tempo necessários para a obtenção dos produtos encapsulados.

Tendo em vista as informações apresentadas e levando em conta a inexistência de trabalhos que relatem a extração e encapsulação simultânea dos curcuminóides, propõe-se a extração destes do pó de cúrcuma e sua encapsulação na matriz de poli(vinil pirrolidona) em uma única etapa, utilizando-se as técnicas de extração assistida por ultrassom e dispersão sólida por evaporação de solvente. Com isso espera-se reduzir o número de etapas para a obtenção de nanopartículas de curcuminóides e avaliar a sua viabilidade de uso em testes biológicos.

A presente Dissertação foi elaborada de forma a apresentar uma breve introdução ao tema, seguida dos seus objetivos. Em seguida, uma revisão bibliográfica é realizada no Capítulo 3, contendo as informações relevantes ao assunto abordado no trabalho. Os resultados do planejamento experimental de extração e encapsulação dos curcuminóides são apresentados no Capítulo 5, bem como a condição experimental ótima encontrada. A partir dessa condição, a caracterização das nanopartículas é apresentada, seguida pela determinação da atividade biológica em ensaios enzimáticos *in vitro*. As principais conclusões do trabalho são apresentadas no Capítulo 6 e as referências bibliográficas são listadas no Capítulo 7. Resultados complementares são apresentados nos apêndices.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Extrair e encapsular simultaneamente os curcuminóides presentes na *Curcuma longa* L. a partir das técnicas de sonicação e dispersão sólida por evaporação de solvente, respectivamente.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar a extração e encapsulação dos curcuminóides bisdemetoxicurcumina, demetoxicurcumina e curcumina da cúrcuma, pelas técnicas de sonicação e dispersão sólida;
- Avaliar a influência dos parâmetros experimentais temperatura, solvente e massa de encapsulante sobre a extração e encapsulação dos curcuminóides individuais e totais, utilizando um Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR);
- Quantificar os curcuminóides extraídos e a solubilidade em água dos curcuminóides encapsulados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos;
- Determinar as condições ótimas para a máxima obtenção conjunta da solubilidade em água dos curcuminóides individuais e do percentual de extração dos curcuminóides totais, empregando funções de desejabilidade e um algoritmo simplex sequencial;
- Caracterizar as nanopartículas produzidas nas condições ótimas pelas técnicas de Calorimetria Diferencial de Varredura, Espectroscopia no Infravermelho, Microscopia Eletrônica de Transmissão e Difração de Raios-X;
- Avaliar a ação *in vitro* dos curcuminóides livres e encapsulados na atividade das enzimas acetilcolinesterase e glutathione S-transferase de cérebro de ratos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Curcuminóides

Compostos bioativos são substâncias geralmente encontradas em pequenas quantidades em vegetais e seus derivados. Podem ser obtidos a partir de diversas fontes, como frutas, extratos vegetais, microrganismos, cereais, organismos marinhos, dentre outros. São exemplos de compostos bioativos os polifenóis, como os flavonoides e a curcumina (KRIS-ETHERTON et al., 2002; AJILA et al., 2007; SULERIA et al., 2016).

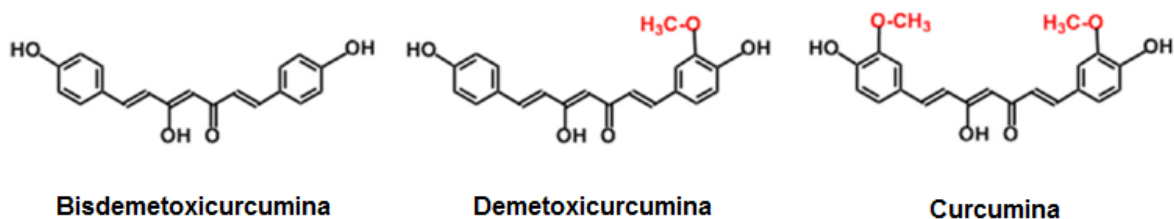
Os curcuminóides são compostos fenólicos presentes nos rizomas da cúrcuma (*Curcuma longa* L.), planta medicinal pertencente à família Zingiberaceae, caracterizada botanicamente como uma planta perene, de pedúnculo curto, folhas grandes e alongadas, e rizomas piriformes ou alongados. Devido à sua coloração amarela e aroma característico, a cúrcuma é considerada um condimento de grande importância na culinária de países como Índia e China, além de ser amplamente reconhecida por suas propriedades medicinais, citadas em textos antigos, como o Ayurveda. Outras aplicações da cúrcuma que se estendem até os dias atuais em países asiáticos, de onde é nativa, incluem tratamentos cosméticos e uso em práticas religiosas (GOVINDARAJAN; STAHL, 1980; CHATTOPADHYAY et al., 2004).

Os rizomas de cúrcuma possuem em sua composição proteínas, lipídios, carboidratos, minerais e umidade, cujos teores variam de acordo com a região de origem da planta. Na cúrcuma indiana, estes valores são de aproximadamente 6,3% de proteínas, 5,1% de lipídios, 69,4% de carboidratos, 3,5% de minerais e 13,1% de umidade (GOVINDARAJAN; STAHL, 1980; CHATTOPADHYAY et al., 2004). Além destes constituintes básicos, estão presentes ainda óleos essenciais e pigmentos curcuminóides, responsáveis pela coloração amarela dos rizomas. O conteúdo destes pigmentos na cúrcuma pode variar de 3 a 15%, dos quais a curcumina é o componente majoritário (50-60%), seguida pela demetoxicurcumina (20-30%) e pela bisdemetoxicurcumina (7-20%) (LI et al., 2011; PERKO et al., 2015). A curcumina comercial é constituída de uma mistura dos três pigmentos curcuminóides, devido à dificuldade de obtenção de quantidades significativas dos compostos puros (LI et al., 2011).

3.1.1 Características físico-químicas

A curcumina (1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona, ou diferoluilmetano ($C_{21}H_{20}O_6$), é o principal pigmento curcuminóide presente nos rizomas da cúrcuma e pertence ao grupo dos difenil heptanóides, em conjunto com a demetoxicurcumina ($C_{20}H_{18}O_5$) (4-hidroxicinamoilo-(4-hidroxi-3-metoxicinamoil) metano) e a bisdemetoxicurcumina ($C_{19}H_{16}O_4$) (bis-(4-hidroxicinamoil) metano). Este conjunto possui mais de 100 compostos identificados, que são caracterizados pela presença de um esqueleto arila-C7-arila, ou seja, dois grupos fenil ligados por uma cadeia de sete carbonos (RAVINDRAN; BABU; SIVARAMAN, 2007). Na Figura 1 são apresentadas as estruturas químicas dos três pigmentos curcuminóides.

Figura 1 - Estruturas químicas dos pigmentos curcuminóides bisdemetoxicurcumina, demetoxicurcumina e curcumina.



Fonte: OSÓRIO-TOBÓN et al. (2016).

As moléculas de curcumina, demetoxicurcumina e bisdemetoxicurcumina apresentam tautomerismo ceto-enol, sendo a forma enol predominante em meios alcalinos, enquanto em meios ácidos, neutros e no estado sólido a forma ceto é observada. Os pigmentos curcuminóides possuem três valores de pKa distintos, $pK_{a1} = 8,38$, $pK_{a2} = 9,88$ e $pK_{a3} = 10,51$. Os compostos são insolúveis em água em condições ácidas e neutras, e instáveis em meios básicos, porém são solubilizados com facilidade nos solventes etanol, metanol, acetona e dimetilsulfóxido (DMSO). Com relação às propriedades ópticas, sua coloração amarela é resultante da absorção de energia na região visível do espectro UV-Vis, no qual a absorção máxima em solvente metanol ocorre próximo a 430 nm (PRASAD et al., 2014; AMALRAJ et al.,

2016). Em sua forma natural, a curcumina possui estrutura cristalina, apresentando temperatura de fusão em torno de 178°C (SUN et al., 2013; LI et al., 2015).

3.1.2 Propriedades

Os pigmentos curcuminóides, especialmente a curcumina, têm despertado o interesse de pesquisadores nas últimas décadas e, mais recentemente, das indústrias farmacêutica e alimentícia, devido ao amplo espectro de aplicações que possibilita. Suas diversas propriedades benéficas vêm sendo exploradas ao longo dos séculos, principalmente em países asiáticos, de onde a cúrcuma é oriunda, sendo o pó obtido dos seus rizomas secos utilizado como tintura em tecidos, repelente de insetos, condimento em alimentos (como colorante e aromatizante). Na medicina tradicional oriental é aplicado no tratamento de anorexia, sinusite, doenças gástricas, hepáticas, respiratórias e inflamatórias(MOGHADAMTOUSI et al., 2014; MAHMOOD et al., 2015;FADUS et al., 2016).

Atualmente, o *Food and Drug Administration* (FDA) considera a curcumina como sendo segura (*Generally Accepted As Safe*, GRAS), o que significa que seu consumo não oferece riscos à saúde (CATALAN-LATORRE et al., 2016).Vários estudos recentes têm investigado e comprovado que a curcumina apresenta propriedades antioxidante (AK; GÜLÇIN, 2008; YEN et al., 2010), anti-inflamatória (MURAKAMI et al., 2008; ROCHA et al., 2014), anticarcinogênica (CHAURASIA et al., 2015; ZHANG et al., 2016a), antidepressiva (CHANG et al., 2016),antibacteriana (RAI et al., 2008; MUN et al., 2013; TEOW et al., 2016), antifúngica (KHALIL et al., 2012;HUANG et al., 2016a) e antiviral (QIN et al., 2014; RHEIN et al., 2016). Ainda, a administração de curcumina no tratamento de outras condições associadas ou desencadeadas por processos inflamatórios vem sendo estudada, obtendo-se resultados satisfatórios, como no caso de doenças cardiovasculares (JIANG et al., 2017), neurodegenerativas (SEYEDZADEH et al., 2014), respiratórias (ZHANG et al., 2016b), autoimunes (WANG et al., 2016b) e alérgicas (WU; XIAO, 2016). Estes estudos demonstram a ação imunomoduladora da curcumina, ou seja, sua capacidade de regular respostas imunes do organismo, permitindo o controle e o tratamento das doenças relacionadas (SRIVASTAVA et al., 2011).

3.1.3 Atividade biológica

3.1.3.1 *Estresse oxidativo*

O estresse oxidativo ocorre devido a um desequilíbrio entre os radicais livres e demais espécies reativas formadas normalmente nos organismos e os antioxidantes endógenos, sejam eles enzimáticos ou não enzimáticos. Espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas naturalmente nas células de organismos aeróbios, durante o processo de respiração celular, por exemplo, sendo os tipos mais comuns dessas espécies o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (CAROCHO; FERREIRA, 2013). A presença em excesso desses compostos pode levar à oxidação de componentes celulares, principalmente lipídicos, danificando tecidos do organismo e permitindo o desenvolvimento de condições como envelhecimento, câncer, diabetes, doenças neurológicas e cardiovasculares, dentre outras (BATINIĆ-HABERLE; REBOUÇAS; SPASOJEVIĆ, 2010; KLAUNIG; WANG, 2017; KOROVIĆ et al., 2017; TEJASWI et al., 2017; CHIKARA et al., 2018).

A fim de evitar os danos causados pelas espécies reativas, o organismo possui um sistema de defesa antioxidante, que inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD - E.C. 1.15.1.1), catalase (CAT - E.C. 1.11.1.6) e glutathione S-transferase (GST - E.C. 2.5.1.18) além de antioxidantes não enzimáticos, como a glutathione reduzida (GSH). A SOD é a enzima responsável por dismutar os radicais superóxido em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este último, que ainda caracteriza uma espécie reativa, é então convertido em água e oxigênio pela CAT. Já a GST catalisa a conjugação da GSH com eletrófilos, que podem ser produtos do estresse oxidativo, resultando em compostos estáveis (SIES, 1997; IOANNIDES, 2001; BATINIĆ-HABERLE; REBOUÇAS; SPASOJEVIĆ, 2010).

Existem substâncias, como os curcuminóides, capazes de modular a atividade de antioxidantes endógenos ou de mimetizar seu comportamento, o que permite controlar os níveis de espécies reativas nas células e, assim, evitar ou reverter o estresse oxidativo. Barik et al. (2005) relataram que um complexo de cobre com curcumina foi capaz de mimetizar a ação da enzima SOD, além de inibir a peroxidação lipídica induzida por radiação gama em soluções lipossomais. Kaur et al. (2006) administraram lipopolissacarídeo a ratos e verificaram uma diminuição nas defesas antioxidantes dos animais (GSH e SOD), o que resultou em um quadro de estresse

oxidativo. Nos animais tratados com curcumina, as reduções no nível da GSH e na atividade da SOD foram atenuadas de forma dose-dependente e significativa. Sankar et al. (2013) verificaram o efeito da curcumina livre e encapsulada sobre os danos oxidativos induzidos por arsênio em ratos. Dentre os danos causados, houve redução da atividade das enzimas SOD, CAT, glutathiona peroxidase (GPx - E.C. 1.11.1.9) e glutathiona redutase (GR - E.C. 1.8.1.7), sendo que nos ratos tratados com curcumina livre e encapsulada essa redução foi minimizada. Jaiswal et al. (2016) induziram o estresse oxidativo no cérebro de ratos utilizando carbofurano. Ratos expostos ao composto tóxico e não tratados com curcumina apresentaram inibição na atividade das enzimas SOD, GST e CAT, enquanto nos ratos tratados com curcumina essa inibição foi amenizada. Panahi et al. (2015) avaliaram o efeito da suplementação com curcuminóides-piperina sobre os indicadores de estresse oxidativo em pacientes com síndrome metabólica. Seus resultados demonstraram que a suplementação causou um aumento significativo na atividade da SOD sérica.

3.1.3.2 Sistema colinérgico

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor envolvido em funções cognitivas, como a memória, produzido a partir da colina e do acetil-CoA pela enzima colina-acetiltransferase (ChAT). A acetilcolinesterase (AChE - E.C. 3.1.1.7) é a principal enzima responsável pela hidrólise da ACh em colina e acetato durante o ciclo colinérgico, regulando a concentração do neurotransmissor na sinapse e permitindo que o ciclo seja finalizado. Existem substâncias que atuam como inibidores reversíveis ou irreversíveis das enzimas colinérgicas, sendo que inibidores reversíveis vem sendo utilizados na clínica para fins terapêuticos, no tratamento de doenças neurológicas e neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson (SOREQ; SEIDMAN, 2001; COLOVIC et al., 2013).

Alguns estudos apontam que os pigmentos curcuminóides agem como inibidores reversíveis da AChE. Ahmed e Gilani (2009) avaliaram a ação inibidora dos pigmentos curcuminóides em ensaios *in vitro*, *ex vivo*, e seus efeitos sobre a memória de ratos. Os resultados indicaram que os pigmentos, individualmente e em conjunto, reduziram a atividade enzimática da AChE *in vitro* e *ex vivo*, exceto a curcumina, que apresentou resultado semelhante somente nos ensaios de memória, o que pode significar que o uso dos curcuminóides em conjunto é mais eficiente em aumentar os

níveis de ACh no organismo. Jaques et al. (2011) estudaram a ação neuroprotetiva da curcumina, pesquisando seu efeito sobre a atividade da AChE em ratos expostos a fumaça de cigarro. Nos ratos tratados com curcumina, houve prevenção no aumento da atividade enzimática observado no córtex cerebral dos ratos que foram submetidos à fumaça, o que demonstra que o composto modula o sistema colinérgico quando há exposição à fumaça de cigarro. Abbasi et al. (2012) determinaram a inibição da AChE pela curcumina e seus derivados sintéticos, obtendo IC₅₀ (concentração de inibidor responsável por reduzir em 50% a atividade enzimática máxima) que variaram de 58 a 298 µmol.L⁻¹. Estudos de cinética enzimática *in vitro* são utilizados como poderosas ferramentas para o *screening* de possíveis compostos com ações biológicas (SAMADI et al., 2011).

3.2 Técnicas de extração

Compostos bioativos são encontrados em diversos tipos de materiais, com diferentes características. O primeiro passo para a caracterização e o estudo das propriedades dessas substâncias é a extração da matriz em que estão contidas. Os principais fatores que afetam o processo de extração são a natureza do composto e da sua fonte, tipo de solvente, temperatura, tempo e pressão. As técnicas mais antigas empregadas na obtenção de extratos naturais são utilizadas ainda nos dias de hoje, como maceração, infusão, decocção e Soxhlet. Entretanto, tais métodos são caracterizados por elevado consumo de solventes orgânicos em alguns casos, são demorados, trabalhosos e resultam em baixos rendimentos de extração (AZMIR et al., 2013; BRUSOTTI et al., 2014). Assim, nos últimos anos, tecnologias não convencionais de extração vêm sendo desenvolvidas e popularizadas, como no caso das técnicas de extração assistida por micro-ondas, extração assistida por ultrassom, extração com fluido supercrítico, extração com líquido pressurizado, dentre outras (WANG; WELLER, 2006).

Os pigmentos curcuminóides têm sido extraídos dos rizomas da cúrcuma por diversas técnicas convencionais e não convencionais. Wakte et al. (2011) compararam o percentual de extração de curcumina obtido a partir dos métodos de Soxhlet, extrações assistidas por micro-ondas, ultrassom e dióxido de carbono supercrítico. Seus resultados demonstraram que após oito horas de extração por

Soxhlet foi atingido um rendimento de 2,1% de curcumina, enquanto que por extração assistida por micro-ondas e ultrassom foi possível obter quantidade semelhante em apenas cinco minutos. Osorio-Tobón et al. (2014) isolaram os pigmentos curcuminóides da cúrcuma por extração com líquido pressurizado, necessitando de um tempo seis vezes menor que a extração por Soxhlet para obter um rendimento semelhante de 4,4%. Li, Ngadi e Ma (2014) obtiveram 1,03 g/100 g_{massa seca} de curcuminóides após dez minutos de extração assistida por ultrassom em regime pulsado, quantidade maior que a resultante ao fim de cinco horas de extração por Soxhlet (0,87 g/ 100 g_{massa seca}).

A técnica de extração assistida por ultrassom destaca-se por ser versátil, podendo ser aplicada a uma variedade de compostos e com diferentes tipos de solventes, por ser um método simples e rápido, de menor custo quando comparado a outros não convencionais, por resultar em rendimentos elevados, por utilizar baixas temperaturas, o que confere maior estabilidade à substâncias sensíveis e contribui para a maior qualidade do produto final, e pelo menor consumo de solventes orgânicos, sendo considerada uma tecnologia verde (TIWARI, 2015). Os estudos sobre este tema tiveram início com Sir Isaac Newton, que formulou sua teoria sobre as ondas sonoras em 1687. Basicamente, o som e o ultrassom diferem pela frequência das ondas, sendo as audíveis existentes entre 10 Hz e 20 kHz, enquanto o ultrassom ocorre acima de 20 kHz (TIWARI, 2015). O aumento na taxa de extração por ultrassom está diretamente relacionado ao seu mecanismo de ação, que se baseia no fenômeno de cavitação acústica. Segundo este, a propagação de ondas ultrassônicas em um meio líquido resulta em forças de cisalhamento, que levam à formação de bolhas de cavitação. Quando estas implodem, geram turbulência e podem danificar as partículas da matriz na qual o composto de interesse está contido, a partir de mecanismos de fragmentação, erosão, descamação superficial e rompimento. Como resultado, o material torna-se mais suscetível à ação do solvente, acelerando o processo de extração (VILKHU et al., 2008; CHEMAT et al., 2017).

Diversos estudos relatam a extração da curcumina e dos curcuminóides pela técnica de ultrassom. Mandal et al. (2009) determinaram as condições ótimas de extração assistida por ultrassom da curcumina, utilizando um equipamento do tipo banho, e demonstraram que em 70 minutos de extração, utilizando como solvente 20 mL de uma mistura contendo etanol e água (80% v/v), foi atingido um rendimento de 3,96%, valor duas vezes maior que o obtido após 4 horas de extração por Soxhlet.

Martins et al. (2013) em seu trabalho, extraíram os pigmentos curcuminóides dos rizomas de cúrcuma por meio de um ultrassom do tipo sonda, com frequência de 20 kHz, utilizando uma mistura de solventes etanol:água (7:3). O teor de pigmentos extraídos foi de 165,9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de extrato, ao fim de 5 minutos de sonicação. Gopal, Muthu e Chun (2015) compararam os equipamentos de ultrassom dos tipos banho e sonda com relação ao rendimento de extração de curcumina em solvente água. Os autores concluíram que o equipamento de sonda é mais eficiente, já que em 1 minuto de extração este proporcionou um teor de curcumina maior que o obtido em 10 minutos no ultrassom de banho. Hadi et al. (2015) avaliaram os efeitos dos fatores amplitude de sonicação, tempo e temperatura de extração, tamanho das partículas e volume de solvente aquoso sobre a eficiência de extração dos curcuminóides presentes na *Curcuma domestica*. Apenas o aumento no tamanho das partículas teve efeito negativo sobre a resposta e as condições ótimas encontradas foram amplitude de sonicação de 100%, tempo de extração de 20 minutos, volume de solvente de 10 mL, temperatura de 60°C e tamanho de partícula entre 0,3 e 0,6 mm.

Em todos os casos, os extratos obtidos são instáveis, já que os pigmentos curcuminóides são sensíveis à diversos fatores externos como pH, luz, temperatura e agentes oxidantes. Ainda, sua aplicação é dificultada pela baixa solubilidade da curcumina em água, o que reduz sua biodisponibilidade no organismo (WANG et al., 2011; HUANG et al., 2016b). Dessa forma, torna-se necessário o emprego de tecnologias que garantam maior estabilidade a essas substâncias.

3.3 Encapsulação de compostos bioativos

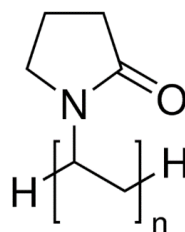
A técnica de encapsulação é definida como a incorporação de um material (sólido, líquido ou gasoso) na superfície ou no interior de partículas, ou cápsulas. Esta divide-se em micro e nanoencapsulação, que diferem com relação ao tamanho das partículas obtidas (entre 1 e 1000 μm , e entre 1 e 1000 nm, respectivamente). O composto a ser encapsulado pode ser denominado núcleo, fase interna ou recheio, enquanto o material que o envolve é chamado encapsulante, parede ou fase externa (GIBBS et al., 1999; MUNIN; EDWARDS-LÉVY, 2011). Micro ou nanocápsulas são formadas quando o recheio é envolvido por uma membrana do encapsulante, enquanto micro ou nanopartículas são caracterizadas por uma matriz contínua na qual

o recheio se encontra disperso (EZHILARASI; KARTHIK; CHHANWAL, 2013). Alguns dos compostos comumente utilizados como encapsulantes incluem polímeros naturais, como amidos e gomas, polímeros sintéticos, como poli(vinil pirrolidona) e polietileno glicol, além de lipídios e ceras (SHEKHAR et al., 2010).

3.3.1 Materiais encapsulantes

O PVP (poli(vinil pirrolidona)) é um polímero não-tóxico amplamente aplicado na produção de micro e nanopartículas. Sua estrutura molecular possui uma porção fortemente hidrofílica, composta pela fração pirrolidona, e também uma região hidrofóbica, na qual se encontra o grupo alquila, como pode ser observado na Figura 2. Essas características tornam o PVP um estabilizante eficaz, capaz de evitar a aglomeração de partículas em fase aquosa. Isso porque suas cadeias volumosas impedem o contato entre as partículas dispersas, resultando em seu distanciamento e fazendo com que a dispersão coloidal se mantenha estável. O PVP é solubilizado com facilidade em água e em solventes não aquosos, devido ao seu caráter anfifílico (KOCZKUR et al., 2015). Seu uso como encapsulante de compostos bioativos e nutracêuticos, como a curcumina, pode ser observado em diversos estudos recentes (PARADKAR et al., 2004; KARAVAS et al., 2006; KAEWNOPPARAT et al., 2009; WU et al., 2009; FRIZON et al., 2013; KUMAVAT et al., 2013; MARTINS et al., 2013).

Figura 2 – Estrutura química do PVP.



Fonte: Sigma-Aldrich (2017).

3.3.2 Técnicas de encapsulação

Técnicas de micro e nanoencapsulação têm sido utilizadas exaustivamente nos últimos anos a fim de conferir estabilidade a substâncias sensíveis a variações de pH, temperatura, umidade e luz, além de permitirem a liberação modificada de compostos bioativos e fármacos no organismo humano. Nesses casos, as substâncias com propriedades de interesse, que podem estar presentes em alimentos ou medicamentos, são transportadas por meio das micro ou nanopartículas, que evitam a degradação do composto bioativo ao longo do caminho e facilitam que sejam absorvidas no organismo, aumentando assim sua biodisponibilidade. Tais técnicas proporcionam ainda melhorias nas características físico-químicas de certas substâncias, como o aumento da dispersabilidade de compostos hidrofóbicos em água, e intensificam propriedades benéficas que os materiais de interesse possuem (PARAMERA; KONTELES; KARATHANOS, 2011; MARTINS et al., 2013; LI et al., 2015; HUANG et al., 2016b). Este fato se deve à redução no tamanho das partículas obtidas, o que aumenta a superfície de contato com o meio em que se encontram (EZHILARASI; KARTHIK; CHHANWAL, 2013).

Existem diversos métodos de nanoencapsulação aplicáveis a uma gama de materiais, como emulsificação (SARI et al., 2015), dispersão sólida (KARAVAS et al., 2006), coacervação (CHIRIO et al., 2011), complexação de inclusão (LÓPEZ-TOBAR et al., 2012) e nanoprecipitação (YEN et al., 2010). A técnica de dispersão sólida baseia-se na mistura de um ou mais ingredientes ativos a uma matriz sólida, que deve ser inerte e biocompatível. As nanopartículas resultantes podem ser obtidas de duas formas, por fusão ou por evaporação de solvente. No primeiro caso, o composto bioativo e o encapsulante são aquecidos acima da temperatura de fusão do último, sendo em seguida rapidamente resfriados, o que oferece como vantagem a não utilização de solventes orgânicos, porém impossibilita a aplicação do método a substâncias termolábeis. Já no processo de evaporação de solvente, a mistura sólida obtida é solubilizada em um solvente orgânico comum, que é posteriormente eliminado por evaporação. Neste caso, as temperaturas empregadas são baixas, contudo é necessário escolher solventes de baixa toxicidade e que possam ser facilmente removidos, como o etanol (WU et al., 2009; FRIZON et al., 2013).

Alguns trabalhos relatam a nanoencapsulação da curcumina a partir da técnica de dispersão sólida e evidenciam o aumento da solubilidade e da taxa de dissolução

das nanopartículas produzidas em comparação ao composto *in natura*. Paradkar et al. (2004) prepararam dispersões sólidas de curcumina em PVP, em diferentes proporções, por *spray drying*, com o intuito de melhorar sua dissolução em meio ácido. Seus resultados demonstraram que as dispersões sólidas com razões de curcumina e PVP de 1:7 e 1:10 apresentaram dissolução completa em ácido clorídrico 0,1 M após 30 minutos de análise, enquanto a curcumina pura obteve um percentual de liberação menor que 10% ao fim de 90 minutos. Kaewnopparat et al. (2009) produziram dispersões sólidas de curcumina em PVP pelo método de evaporação de solvente e realizaram estudos de solubilidade e dissolução das partículas obtidas, de suas misturas físicas e do composto puro em fluido gástrico simulado sem pepsina e fluido intestinal simulado sem pancreatina. Os resultados comprovaram o aumento da solubilidade das dispersões sólidas nos dois meios testados em comparação à curcumina pura, sendo este aumento proporcional à quantidade de PVP na formulação. O mesmo ocorreu nas análises de dissolução, nas quais a curcumina pura apresentou uma liberação menor que 1% em 60 minutos, enquanto suas dispersões sólidas exibiram dissolução completa nos dois fluidos em aproximadamente 15 minutos. Martins et al. (2013) elaboraram micropartículas de pigmentos curcuminóides em PVP pela técnica de dispersão sólida e observaram um aumento na solubilidade das micropartículas em comparação aos pigmentos puros da ordem de 100 vezes (21,30 µg/mL e 0,22 µg/mL, respectivamente).

3.4 Planejamento experimental

Nota-se que tanto as técnicas de extração quanto as de encapsulação são complexas, sendo afetadas por diversos fatores, que devem ser considerados para otimizar a obtenção dos produtos de interesse. Nesse sentido, planejamentos experimentais podem ser empregados a fim de facilitar a avaliação dos parâmetros que influenciam tais processos. Eles são utilizados na pesquisa científica e na prática industrial para identificar quais variáveis de um processo têm influência sobre as propriedades finais de um material ou produto, chamadas de respostas. Isso possibilita otimizar tais processos, resultando em maiores rendimentos de produto, maior reprodutibilidade, reduções de tempo de operação e de custos. Um

planejamento experimental consiste de um conjunto de ensaios nos quais as variáveis de entrada de um sistema são modificadas com o intuito de se observar o efeito dessa mudança sobre a variável de saída, ou resposta, obtida. Assim, o delineamento experimental visa a conduzir os ensaios de forma adequada à obtenção das informações desejadas. Dependendo da abordagem empregada é possível utilizar diferentes estratégias de experimentação, dentre elas a de um fator por vez e a fatorial. Na primeira, um dos fatores é variado enquanto os outros são mantidos fixos em um determinado nível, sendo este procedimento repetido para todos os fatores. Um problema dessa abordagem é que ela não leva em conta possíveis interações entre os fatores, o que conduz a interpretações equivocadas sobre os resultados. Já na estratégia fatorial, os fatores variam juntos, o que permite estudar seus efeitos principais e suas interações. Essa abordagem permite o melhor aproveitamento das informações obtidas a partir dos experimentos conduzidos. Existem vários tipos de delineamentos experimentais, que devem ser selecionados de acordo com o objetivo que se pretende atingir com o estudo (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; MONTGOMERY, 2013).

3.4.1 Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR)

Um delineamento central composto rotacional consiste de um planejamento fatorial completo ou fracionário de resolução maior que 5, constituído por três partes: uma parte cúbica, que possui 2^k experimentos para um fatorial completo, sendo k fatores com dois níveis cada; uma parte axial, formada por $2k$ ensaios; e uma última parte contendo os pontos centrais replicados para possibilitar a avaliação do erro experimental. Estes planejamentos permitem que os dados obtidos sejam ajustados a um polinômio de segunda ordem, ou modelo quadrático, genericamente apresentado na Equação 1.

$$y = \beta_0 + \sum_i \beta_i x_i + \sum_i \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (1)$$

onde y corresponde à variável dependente, ou resposta, x às variáveis independentes, β aos coeficientes de regressão estimados a partir dos dados experimentais, e ε refere-se ao erro experimental no sistema. Para cada variável independente, o DCCR possui 5 níveis de variação: $-\alpha$ e $+\alpha$, referentes à parte axial do delineamento; -1 e $+1$, referentes à parte fatorial do delineamento; e o nível intermediário 0 , ou ponto central. A representação espacial dos pontos axiais depende da forma como o valor α é calculado. É de grande importância que o modelo adquirido forneça boas previsões dentro da região experimental de interesse, ou seja, que a variabilidade das respostas previstas seja constante. Isso pode ser conseguido se o delineamento possuir rotabilidade, isto é, se as variâncias das estimativas forem equidistantes do centro do planejamento, o que ocorre quando $\alpha = \frac{1}{n^4}$, sendo n o número de pontos experimentais da parte fatorial do planejamento.

O DCCR é um tipo de planejamento que permite a aplicação da Metodologia de Superfícies de Resposta (RSM, *Response Surface Methodology*), na qual modelos matemáticos obtidos de um delineamento geram superfícies que possuem regiões ótimas, onde são alcançados valores máximos para as respostas sob estudo (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010). Uma maneira de determinar essas condições consiste no uso de um algoritmo *simplex* sequencial, como o Nelder-Mead, que utiliza um poliedro de $n + 1$ vértices (para n dimensões) para encontrar uma combinação que resulte em um ponto ótimo na superfície de resposta. O algoritmo de Nelder-Mead permite que quatro operações sejam realizadas: reflexão, contração, expansão e encolhimento. Uma iteração completa deste algoritmo inclui ordenação, reflexão, expansão, contração externa, contração interna e encolhimento (BONA et al., 2000). Entretanto, o *simplex* sequencial é capaz de otimizar apenas uma resposta por vez. Assim, quando se deseja otimizar várias respostas simultaneamente é necessário o emprego funções de desejabilidade. Neste método, as variáveis dependentes são convertidas em funções individuais que assumem valores entre 0 e 1 , onde 0 é atribuído a respostas com pouca desejabilidade, ou seja, que não se encontram no valor alvo, e 1 a respostas com desejabilidade elevada. Em seguida, é possível aplicar o *simplex* sequencial para selecionar os níveis dos fatores de forma a maximizar a desejabilidade global, que corresponde à média geométrica das funções individuais. Desse modo, é possível determinar as condições de operação ótimas de um sistema

ou processo, que satisfaçam da melhor forma possível os objetivos desejados (MONTGOMERY, 2013).

Dessa forma, a aplicação de um DCCR em conjunto com um algoritmo simplex sequencial torna-se uma alternativa interessante para viabilizar a extração e a encapsulação simultânea dos curcuminóides da cúrcuma, possibilitando a determinação das condições experimentais ótimas para rendimentos máximos de curcuminóides encapsulados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Rizomas de cúrcuma foram adquiridos no comércio local, na cidade de Campo Mourão – PR. Para a extração e encapsulação foram utilizados álcool etílico absoluto P.A. (NEON, 99,8%), poli(vinil pirrolidona) (PVP, Sigma-Aldrich, massa molecular média de $40.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) e água destilada. Para as análises de caracterização foram utilizados metanol (Cinética, 99,8%), acetonitrila (Sigma-Aldrich, G CHROMASOLV, padrão cromatográfico), ácido acético glacial (NEON, 99,8%), curcumina comercial (Sigma-Aldrich, 81,9% de curcumina, 15,8% de demetoxicurcumina e 2,3% de bisdemetoxicurcumina) e água destilada. Padrões cromatográficos de curcumina, demetoxicurcumina e bisdemetoxicurcumina foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Para as análises biológicas, cérebros de ratos Wistar foram cedidos pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e pela Universidade Estadual de Maringá (UEM). Fosfato de potássio monobásico P.A. (Vetec), fosfato de potássio dibásico anidro P.A. (NEON), ácido 5'-5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (Sigma-Aldrich, >98%), glutathiona reduzida (Vetec), tris (hidroximetil) amino metano (Dinâmica) e iodeto de acetiltiocolina (Sigma-Aldrich, >98%) foram utilizados nos testes de modulação enzimática.

4.2 Obtenção do pó da *Curcuma longa* L.

Rizomas de *Curcuma longa* L. foram lavados, descascados manualmente, congelados em ultra-freezer a -80°C e liofilizados. Em seguida, foram triturados resultando em um pó com diferentes granulometrias, que foram classificadas por meio de peneiras com aberturas de 53, 150, 425 e 1000 μm . Para os experimentos de extração foi utilizada a fração retida entre as peneiras com aberturas de 150 e 425 μm , por ser a fração obtida em maior quantidade.

4.3 Planejamento experimental

Para determinar as condições ótimas de extração e encapsulação dos curcuminóides foi realizado um Delineamento Central Composto Rotacional com $k = 3$ variáveis independentes (temperatura (°C), percentual de etanol no solvente e massa de PVP (mg)). O número de experimentos resultantes foi de $2^k + 2k = 14$ ensaios, mais 4 pontos centrais adicionais, totalizando 18 experimentos. As variáveis dependentes estudadas foram o percentual de extração da bisdemetoxicurcumina, da demetoxicurcumina, da curcumina e dos curcuminóides totais, e a solubilidade em água destes compostos, somando 8 respostas. Os dados foram analisados no *software* Statistica 7.1.

A matriz com os experimentos codificados e não-codificados será apresentada na seção de Resultados e Discussão juntamente com as respostas do planejamento.

A otimização das respostas solubilidade em água da bisdemetoxicurcumina, solubilidade em água da demetoxicurcumina, solubilidade em água da curcumina e percentual de extração dos curcuminóides totais foi implementada através de um algoritmo *simplex* sequencial utilizando o software MATLAB R2008b.

4.4 Extração e encapsulação dos curcuminóides

Para a extração e a encapsulação simultânea dos curcuminóides do pó de cúrcuma, foi utilizada uma combinação das técnicas de sonicação e de dispersão sólida segundo Gopal, Muthu e Chun (2015) e Silva et al. (2017), respectivamente, com modificações. Um tubo Falcon contendo o pó da cúrcuma (10 mg) foi mantido em um banho na temperatura requerida pelo planejamento, sendo a sonda do ultrassom (Fischer Scientific, 120 W, ponteira de 1/8") posicionada em seu interior, a cerca de 2 cm do fundo. Separadamente, poli(vinil pirrolidona) (PVP) foi adicionada ao solvente (álcool etílico e água, dependendo da condição experimental) sob agitação magnética branda. Essa solução foi vertida no tubo Falcon e a solução foi sonicada por 3 minutos em regime de pulsos (30 segundos de sonicação e 10 segundos de pausa) a fim de evitar o sobreaquecimento da amostra. Ao fim deste tempo, a solução foi filtrada em

filtros de nylon (porosidade de 0,45 μm) e levada à estufa para evaporação do solvente a 60°C, sob circulação forçada.

4.5 Respostas do planejamento experimental

4.5.1 Quantificação dos curcuminóides

A quantificação dos curcuminóides extraídos da cúrcuma foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, Dionex – UltiMate 3000), pela técnica de calibração externa. Curvas de calibração relacionando diferentes concentrações ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e as áreas dos picos foram construídas para os padrões de curcumina, demetoxicurcumina e bisdemetoxicurcumina. Foram utilizados como fase móvel acetonitrila e água acidificada (1% em volume de ácido acético) a uma vazão de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, em uma coluna Acclaim® 120 C18, com dimensões de 4,6 x 250 mm e tamanho de partículas de 5 μm (Dionex-Thermo Scientific), a 40°C. O gradiente de eluição utilizado foi de 60% a 100% de acetonitrila em 8 minutos, permanecendo nessa composição por 4 minutos antes de retornar à condição inicial. A detecção foi realizada por um detector de arranjo de diodos (DAD) em 427 nm.

4.5.2 Determinação da solubilidade em água

Uma alíquota do extrato (2 mL) foi transferida para um tubo de ensaio, que foi levado a uma estufa para secagem a 60°C por aproximadamente 72 h em circulação de ar forçada. Em seguida foi adicionada água destilada ao tubo (4 mL) e este foi mantido a 25°C por 3 h. Após esse período, o conteúdo do tubo foi filtrado (0,45 μm), a solução obtida congelada em ultra-freezer a -80°C e liofilizada. Por fim, o pó obtido foi dissolvido em metanol e sua concentração determinada em HPLC, onde as áreas dos picos obtidos foram comparadas às curvas de calibração previamente construídas. A fração solúvel foi considerada como sendo aquela que passou no filtro, ou seja, a fração formada por nanopartículas com diâmetros menores que 450 nm. Dessa forma, o teor de curcuminóides solúveis em água indica indiretamente a

quantidade dos compostos encapsulada na matriz de PVP após o processo de extração/encapsulação. A solubilidade em água de cada composto, em $\text{mg.mg}_{\text{cúrcuma}}^{-1}$, foi calculada por meio da Equação 2, onde C é a concentração dos curcuminóides determinada em HPLC (mg.mL^{-1}), V é o volume de metanol adicionado ao composto liofilizado (mL), e m é a massa de cúrcuma utilizada na extração (mg).

$$\text{Solubilidade} = \frac{C \times V}{m} \quad (2)$$

4.6 Caracterização das nanopartículas

Foram obtidas nanopartículas na condição ótima conforme o planejamento experimental e estas foram caracterizadas.

A técnica de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC, Perkin Elmer DSC4000) foi empregada para avaliar indiretamente se os curcuminóides foram encapsulados na matriz de PVP. Para esta análise, foram pesados em porta-amostras de alumínio aproximadamente 3 a 5 mg da amostra. Estes foram submetidos a aquecimento de 20 a 200°C com taxa de aquecimento de 20°C.min⁻¹ e fluxo de nitrogênio gasoso de 50 mL.min⁻¹.

A técnica de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR, Shimadzu Affinity-1) foi empregada com o objetivo de identificar interações químicas entre os curcuminóides e o PVP, indicando a encapsulação dos compostos na matriz polimérica. A análise foi conduzida no intervalo de número de onda de 4000 a 600 cm⁻¹, com resolução de 2 cm⁻¹ e 32 leituras cumulativas.

A morfologia das nanopartículas obtidas foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (equipamento JEOL, modelo JEM-1011) operando a 100 kV, com faixa de magnificação de 50 a 600.000 vezes. Para a análise, algumas gotas da amostra foram depositadas sobre uma grade de cobre de 300 *mesh*, estando esta previamente recoberta por um filme de parlódio. As grades foram secas a temperatura ambiente e em seguida analisadas.

As nanopartículas obtidas, além dos compostos puros utilizados em sua produção, foram submetidas à técnica de difração de Raios-X, para confirmar as modificações na estrutura cristalina dos curcuminóides decorrentes do processo de

encapsulação. A análise foi conduzida em um difratômetro (Bruker, D8 advance) utilizando intervalo angular de 3 a 60°, velocidade angular de 5,9°.min⁻¹, tensão de 40KV e corrente de 35 mA.

4.7 Ensaios biológicos

4.7.1 Homogeneização do tecido de cérebro de rato

Cérebros de ratos foram pesados e adicionados de tampão Tris-HCl pH 7,4 na concentração de 10 mM e na proporção de 1:10 (m:v). A mistura foi homogeneizada a 12000 rpm por 1 minuto (Ultra-turrax, IKA T25 digital) e, em seguida, centrifugada a 12000 rpm por 10 minutos (MiniSpin plus, Eppendorf). O sobrenadante (S1) foi recolhido e congelado a -80°C, para posterior uso nos ensaios biológicos. Para os ensaios de atividade enzimática, as concentrações de curcuminóides puros e de nanopartículas de curcuminóides avaliadas foram escolhidas com base em curvas de concentração prévias. Tais curvas foram feitas para as enzimas AChE (25 µM - 200 µM) e GST (0,01 µM - 200 µM).

4.7.2 Atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE)

A avaliação *in vitro* da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) de tecido cerebral de ratos, na presença de curcuminóides livres e encapsulados, foi conduzida de acordo com o método descrito previamente por Ellman et al. (1961), com algumas adaptações. Soluções contendo 24 mM de tampão fosfato de potássio pH = 7,5, S1 e as amostras foram pré-incubadas por 2 minutos à 25°C, e então adicionadas de 1,04 mM de DTNB (ácido 5'-5'-ditiobis(2-nitrobenzóico)) e de 0,83 mM de ACh (acetiltiocolina). A atividade enzimática foi determinada em espectrofotômetro UV-Vis (OceanOptics, USB650), observando-se o aumento na absorbância das amostras em 480 nm, sendo feitas leituras de 30 em 30 segundos durante 4 minutos. O comprimento de onda utilizado nas leituras (480 nm) foi selecionado a fim de possibilitar a avaliação dos compostos de interesse em altas concentrações. Isso

porque o comprimento de onda recomendado nas metodologias tradicionais (412 nm) coincide com o comprimento de absorção máxima dos curcuminóides, o que inviabilizaria os ensaios. Nanopartículas de curcuminóides em água (nas concentrações finais de 25 μM , 50 μM , 100 μM e 200 μM) e curcuminóides livres em DMSO 3,33% (nas concentrações finais de 25 μM , 50 μM , 100 μM e 200 μM), foram avaliados com relação à sua ação moduladora da AChE. Também foi verificado o efeito de uma solução aquosa de PVP, com concentração final de 13,8 μM (equivalente à quantidade de PVP presente em uma solução com 100 μM de nanopartículas), e de uma solução aquosa de curcuminóides puros (com concentração final de 200 μM) sobre a atividade enzimática. Os resultados foram expressos em porcentagem do controle (solução sem adição de amostra). A técnica teve como objetivo avaliar a degradação da acetilcolina pela AChE, seguida da reação da tiocolina formada com o DTNB, resultando em TNB, um composto de coloração amarelada. Assim, quanto maior a concentração de tiocolina formada, maior a atividade da enzima.

4.7.3 Atividade enzimática da glutathione S-transferase (GST)

A atividade da enzima GST, em presença de curcuminóides livres e encapsulados, foi avaliada segundo o método descrito por Habig, Pabst e Jakoby (1974). Soluções contendo 24 mM de tampão fosfato de potássio pH = 7,5, S1 e as amostras foram pré-incubadas por 2 minutos à 25°C, e então adicionadas de 1 mM de CDNB e 1 mM de GSH. A atividade enzimática foi determinada em espectrofotômetro UV-Vis (OceanOptics, USB650), medindo-se as absorbâncias das soluções de 30 em 30 segundos, durante 4 minutos, em 340 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem do controle (solução sem adição de amostra). Nanopartículas de curcuminóides em água (nas concentrações finais de 0,1 μM , 5 μM , 25 μM e 50 μM) e curcuminóides livres em DMSO 3,33% (nas concentrações finais de 5 μM , 25 μM e 50 μM), foram avaliados com relação à sua ação moduladora da GST. Também foi verificado o efeito de uma solução aquosa de PVP, com concentração final de 13,8 μM , e de uma solução aquosa de curcuminóides puros (com concentração final de 50 μM) sobre a atividade enzimática.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Planejamento experimental

A matriz de ensaios contendo as variáveis independentes reais e codificadas, além dos resultados obtidos para as respostas percentual de extração e solubilidade em água dos curcuminóides, é apresentada na Tabela 1. Nela, bis, deme, cur e totais referem-se, respectivamente, aos compostos bisdemetoxicurcumina, demetoxicurcumina, curcumina e aos curcuminóides totais. A partir das respostas apresentadas foram estimados coeficientes de correlação, sendo a matriz de correlação exibida na Tabela 2.

Tabela 1 - Matriz de ensaios contendo os valores reais e codificados das variáveis independentes e as respostas das variáveis dependentes.

Ensaio	T (°C)	%EtOH	PVP (mg)	% extração				Solubilidade x 10 ⁻⁵ (mg.mg _{curcuma} ⁻¹)			
				bis	deme	cur	totais	bis	deme	cur	totais
1	-1 (32,1)	-1(20)	-1(4,1)	0,07	0,01	0,14	0,22	1,40	0,14	0,17	1,72
2	1 (52,9)	-1 (20)	-1 (4,1)	0,21	0,29	1,37	1,88	1,51	0,25	0,67	2,43
3	-1 (32,1)	1 (80)	-1 (4,1)	2,39	2,33	6,06	10,79	104,04	92,67	234,84	431,56
4	1 (52,9)	1(80)	-1 (4,1)	2,32	2,25	5,76	10,33	90,86	79,40	197,76	368,02
5	-1 (32,1)	-1 (20)	1 (25,9)	0,19	0,27	1,25	1,71	1,82	0,62	1,39	3,83
6	1 (42,9)	-1(20)	1 (25,9)	0,85	0,97	2,88	4,71	8,75	7,09	13,81	29,64
7	-1 (32,1)	1(80)	1 (25,9)	2,10	2,02	5,18	9,30	76,51	77,55	222,50	376,56
8	1 (52,9)	1(80)	1 (25,9)	2,25	2,17	5,59	10,01	95,10	93,53	269,13	457,76
9	-1,68 (25)	0(50)	0 (15)	2,03	1,99	5,19	9,20	29,86	27,76	69,93	127,55
10	1,68 (60)	0 (50)	0(15)	2,08	2,01	5,21	9,31	31,64	28,06	71,53	131,23
11	0 (42,5)	-1,68(0)	0(15)	0,08	0,03	0,07	0,18	0,71	0,07	0,06	0,84
12	0 (42,5)	1,68(100)	0 (15)	2,35	2,33	6,13	10,81	45,84	37,59	96,71	180,13
13	0 (42,5)	0(50)	-1,68 (0)	2,04	1,98	5,08	9,10	1,56	0,34	0,97	2,87
14	0 (42,5)	0 (50)	1,68(30)	1,92	1,85	4,78	8,55	40,56	39,61	107,06	187,24
15 (C)	0 (42,5)	0(50)	0(15)	1,98	1,91	4,95	8,84	21,48	15,77	34,81	72,07
16 (C)	0 (42,5)	0(50)	0 (15)	2,02	1,97	5,08	9,07	23,03	18,65	45,63	87,30
17 (C)	0 (42,5)	0(50)	0 (15)	2,12	2,07	5,31	9,50	27,56	24,19	63,02	114,78
18 (C)	0 (42,5)	0 (50)	0 (15)	2,00	1,94	5,06	9,00	28,23	24,96	65,87	119,06

Fonte: Autoria própria.

Tabela 2 – Matriz de correlação das respostas percentual de extração e solubilidade em água dos compostos bisdemetoxicurcumina (*bis*), demetoxicurcumina (*deme*), curcumina (*cur*) e curcuminóides totais (*totais*). Todos os coeficientes são estatisticamente significativos ($p < 0,01$).

		% extração				Solubilidade (mg.mg ⁻¹ curcuma)			
		bis	deme	cur	totais	bis	deme	cur	totais
% extração	bis	1,000	0,991	0,984	0,997	0,861	0,864	0,866	0,866
	deme	0,991	1,000	0,997	0,998	0,862	0,869	0,877	0,873
	cur	0,984	0,997	1,000	0,993	0,874	0,884	0,895	0,889
	totais	0,997	0,998	0,993	1,000	0,866	0,870	0,875	0,873
Solubilidade (mg.mg ⁻¹ curcuma)	bis	0,861	0,862	0,874	0,866	1,000	0,998	0,991	0,996
	deme	0,864	0,869	0,884	0,870	0,998	1,000	0,997	0,999
	cur	0,866	0,877	0,895	0,875	0,991	0,997	1,000	0,999
	totais	0,866	0,873	0,889	0,873	0,996	0,999	0,999	1,000

Fonte: Autoria própria.

Quando duas variáveis são perfeitamente relacionadas entre si, elas possuem um coeficiente de correlação igual a 1. Este valor pode ser positivo, caso o aumento de uma variável ocasione o aumento da outra, ou negativo, caso o aumento de uma seja acompanhado da diminuição da outra. Se a relação linear existente for parcial, o coeficiente de correlação assumirá um valor entre 0 e ± 1 (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010). Nota-se que todas as respostas estudadas são fortemente correlacionadas e que todos os coeficientes são positivos. Isso indica que condições experimentais que favoreceram altos teores de extração proporcionaram, ao mesmo tempo, maiores eficiências de encapsulação dos pigmentos curcuminóides. Tendo em vista essa informação, os resultados apresentados serão discutidos apenas com base nas respostas percentual de extração e solubilidade em água dos curcuminóides totais, pois estas são representativas do todo.

Os resultados da quantificação dos curcuminóides (Tabela 1) demonstraram que os percentuais de extração obtidos para as diferentes condições experimentais variaram de 0,07% a 2,39% para a bisdemetoxicurcumina, de 0,01% a 2,33% para a demetoxicurcumina, de 0,07% a 6,13% para a curcumina e de 0,18% a 10,81% para os curcuminóides totais.

No caso da resposta solubilidade em água, os resultados obtidos após a quantificação dos curcuminóides variaram de $0,71 \times 10^{-5}$ a $104,04 \times 10^{-5} \text{ mg.mg}_{\text{cúrcuma}}^{-1}$ para a bisdemetoxicurcumina, de $0,07 \times 10^{-5}$ a $93,53 \times 10^{-5} \text{ mg.mg}_{\text{cúrcuma}}^{-1}$ para a demetoxicurcumina, de $0,06 \times 10^{-5}$ a $269,13 \times 10^{-5} \text{ mg.mg}_{\text{cúrcuma}}^{-1}$ para a curcumina e de $0,84 \times 10^{-5}$ a $457,76 \times 10^{-5} \text{ mg.mg}_{\text{cúrcuma}}^{-1}$ para os curcuminóides totais. As respostas referentes aos ensaios 13 e 14, nos quais a variável massa de PVP passou de seu nível inferior (0 mg) para o superior (30 mg), evidenciam o aumento na solubilidade dos três pigmentos, sendo este aumento da ordem de 26 vezes para a bisdemetoxicurcumina, de 116 vezes para a demetoxicurcumina, de 110 vezes para a curcumina e de 65 vezes para os curcuminóides totais. Para a obtenção dos modelos, os valores das respostas de solubilidade dos curcuminóides foram submetidos a uma transformação de Box-Cox do tipo logaritmo natural, com o objetivo de aproximar a disposição dos dados de uma distribuição normal e melhorar seu ajuste aos modelos, já que as informações em sua forma original não apresentavam normalidade (MONTGOMERY, 2013).

Os modelos codificados obtidos, bem como os coeficientes de determinação ajustados, os erros puros e os p-valores determinados por Análise de Variância (ANOVA) são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Modelos codificados, coeficientes de determinação ajustados, erros puros e p-valores obtidos para as respostas percentual de extração e solubilidade em água dos compostos curcuminóides. Onde x_1 é a variável codificada da temperatura (°C), x_2 é a variável codificada do percentual de etanol no solvente e x_3 é a variável codificada da massa de PVP (mg).

Resposta	Modelo codificado	R ² ajustado	Erro puro	p-valor
%extração da bisdemetoxicurcumina	$y = 2,05 + 0,07x_1 - 0,09x_1^2 + 0,85x_2 - 0,38x_2^2 + 0,01x_3 - 0,11x_3^2 - 0,09x_1x_2 + 0,09x_1x_3 - 0,14x_2x_3$	0,841	0,065	0,0013
%extração da demetoxicurcumina	$y = 1,99 + 0,08x_1 - 0,07x_1^2 + 0,81x_2 - 0,36x_2^2 + 0,02x_3 - 0,10x_3^2 - 0,12x_1x_2 + 0,08x_1x_3 - 0,16x_2x_3$	0,865	0,068	0,0007
%extração da curcumina	$y = 5,14 + 0,22x_1 - 0,15x_1^2 + 1,99x_2 - 0,89x_2^2 + 0,08x_3 - 0,24x_3^2 - 0,34x_1x_2 - 0,46x_2x_3$	0,906	0,150	0,00005
%extração dos curcuminóides totais	$y = 9,18 + 0,37x_1 - 0,31x_1^2 + 3,64x_2 - 1,63x_2^2 + 0,11x_3 - 0,46x_3^2 - 0,55x_1x_2 + 0,31x_1x_3 - 0,76x_2x_3$	0,882	0,282	0,0004
Solubilidade da bisdemetoxicurcumina	$\log y = -8,31 + 0,13x_1 + 0,15x_1^2 + 1,58x_2 - 0,45x_2^2 + 0,53x_3 - 0,33x_3^2 - 0,19x_1x_2 + 0,23x_1x_3 - 0,28x_2x_3$	0,836	0,134	0,0014
Solubilidade da demetoxicurcumina	$\log y = -8,30 + 0,22x_1 + 2,22x_2 - 0,86x_2^2 + 0,94x_3 - 0,57x_3^2 - 0,37x_1x_2 + 0,27x_1x_3 - 0,60x_2x_3$	0,905	0,219	0,00005
Solubilidade da curcumina	$\log y = -7,39 + 0,27x_1 + 2,43x_2 - 1,02x_2^2 + 0,97x_3 - 0,52x_3^2 - 0,45x_1x_2 - 0,61x_2x_3$	0,934	0,299	0,000003
Solubilidade dos curcuminóides totais	$\log y = -6,77 + 0,18x_1 + 1,97x_2 - 0,69x_2^2 + 0,76x_3 - 0,47x_3^2 - 0,29x_1x_2 - 0,40x_2x_3$	0,878	0,238	0,00006

Fonte: Autoria própria.

Na análise estatística das respostas de percentual de extração, todos os termos lineares, quadráticos e de interação entre as três variáveis apresentaram efeitos estatisticamente significativos sobre as respostas, ao nível de 95% de significância. O termo de interação entre a temperatura e a massa de PVP do percentual de extração da curcumina não foi significativo. Para todos os compostos, os efeitos lineares foram positivos, ou seja, os aumentos da temperatura, do percentual de etanol e da massa de PVP resultaram em um maior percentual de extração dos curcuminóides. Por outro lado, os efeitos dos termos quadráticos e de interação foram, em sua maioria, negativos, evidenciando que o aumento nas respostas promovido pelos termos lineares apresenta um ponto máximo, a partir do qual valores superiores das variáveis resultam em diminuição dos percentuais de extração. Ainda, as interações negativas demonstram efeitos antagônicos, isto é, quando as variáveis têm seus níveis elevados simultaneamente, o resultado é a diminuição das respostas.

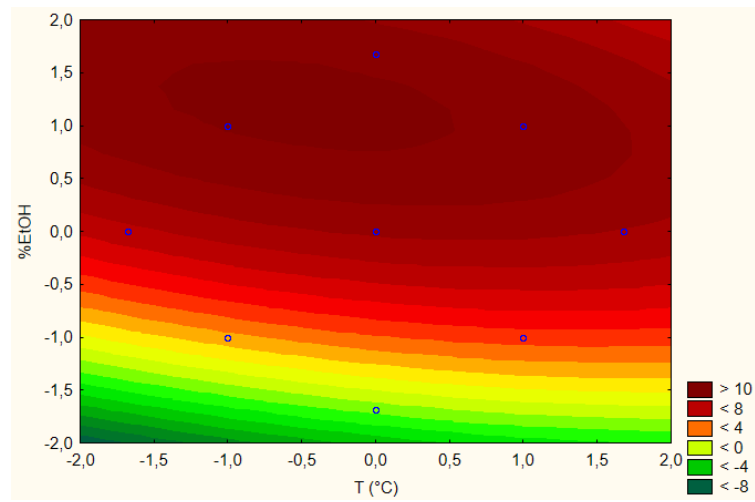
Nota-se que os modelos selecionados, obtidos após os termos não significativos serem ignorados, apresentam coeficientes de determinação ajustados maiores que 0,84, o que significa que para os três compostos mais de 84% dos dados se ajustam aos modelos quadráticos apresentados. As Análises de Variância (ANOVA, Apêndice A), realizadas para validar os modelos, demonstraram que para os quatro casos a falta de ajuste foi significativa, o que significa que não se pode garantir que as regiões experimentais possuem homocedasticidade (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010). Apesar disso, as regressões apresentaram p-valores menores que 0,01, o que indica que elas são estatisticamente significativas com 99% de significância, e os gráficos dos valores previstos e observados evidenciaram que os resíduos estão distribuídos de forma aleatória (Apêndice B). Assim, as informações apresentadas indicam que os quatro modelos obtidos são válidos.

Em relação à análise estatística das respostas de solubilidade, os termos lineares das três variáveis independentes apresentaram efeitos estatisticamente significativos e positivos sobre a solubilidade dos três compostos e dos curcuminóides totais. Ainda, os termos quadráticos e as interações entre as variáveis citadas resultaram, em sua maioria, em efeitos significativos e negativos sobre as solubilidades dos pigmentos. É possível observar que os modelos obtidos possuem coeficientes de determinação ajustados que vão de 0,84 a 0,93, demonstrando que nos quatro casos a maior parte dos dados se ajustam bem ao

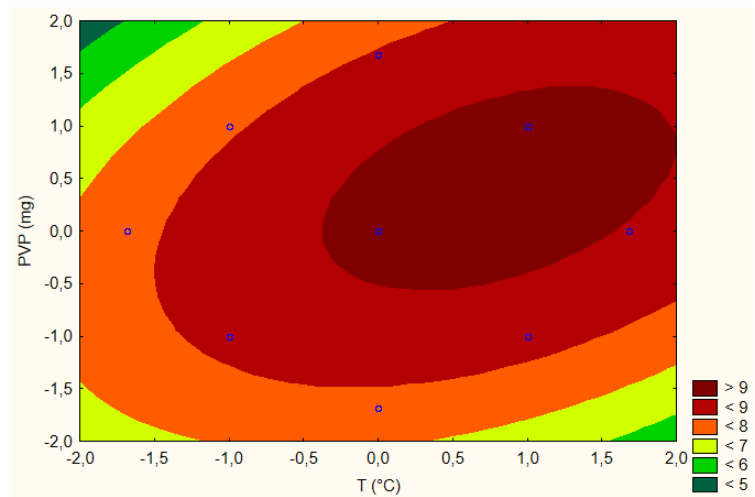
modelo quadrático. Novamente, as Análises de Variância (ANOVA) indicaram falta de ajuste estatisticamente significativa, porém os p-valores resultantes para as regressões foram menores que 0,01, comprovando que modelos selecionados são estatisticamente significativos com 99% de significância, além de seus resíduos estarem distribuídos aleatoriamente.

Os gráficos de contorno originados para as respostas percentual de extração e solubilidade em água dos curcuminóides totais são apresentadas nas Figuras 3 e 4. Os gráficos referentes às outras respostas do planejamento experimental encontram-se no Apêndice C. Em cada gráfico de contorno, a terceira variável foi fixada no nível central.

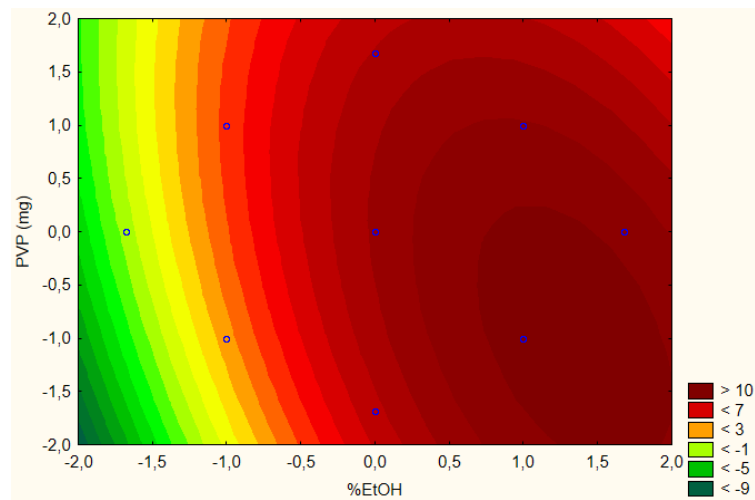
Figura 3 – Gráficos de contorno da resposta percentual de extração dos curcuminóides totais referentes às variáveis: a) temperatura e percentual de etanol no solvente; b) temperatura e massa de PVP; e c) percentual de etanol no solvente e massa de PVP.



(a)



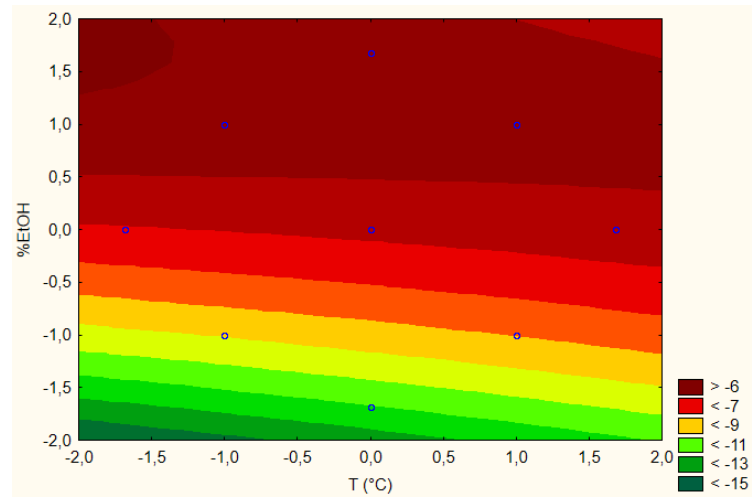
(b)



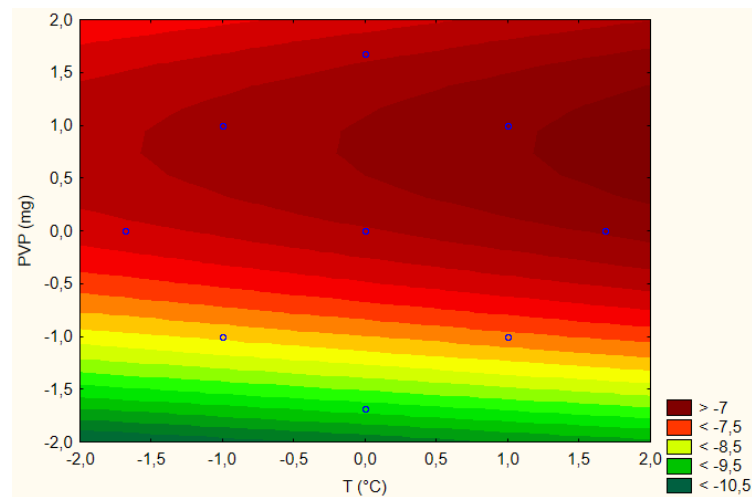
(c)

Fonte: Autoria própria.

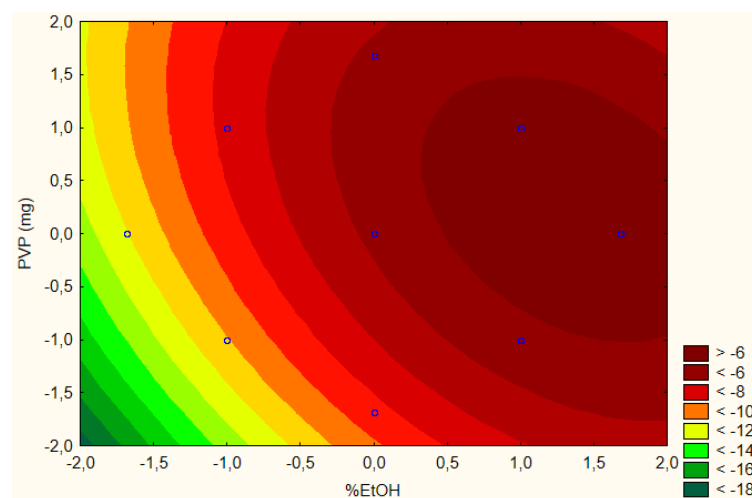
Figura 4 - Gráficos de contorno da resposta solubilidade em água (em logaritmo natural) dos curcuminóides totais referentes às variáveis: a) temperatura e percentual de etanol no solvente; b) temperatura e massa de PVP; e c) percentual de etanol no solvente e massa de PVP.



(a)



(b)



(c)

Fonte: Autoria própria.

Nos gráficos de contorno apresentados nota-se a presença de regiões onde as respostas percentual de extração e solubilidade em água atingem valores máximos para os pigmentos curcuminóides. Na medida que se aumenta o percentual de solvente etanol, maiores níveis de extração são atingidos, o que reafirma o elevado efeito positivo da variável sobre as respostas demonstrado anteriormente. Isso é explicado pela natureza hidrofóbica dos curcuminóides, que não possuem afinidade pela água mas são solúveis em etanol e, portanto, quanto maior a proporção de solvente orgânico na mistura, maior a eficiência de extração resultante (AZMIR et al., 2013). Li, Ngadi e Ma (2014) verificaram um comportamento similar ao extrair os curcuminóides da cúrcuma por extração assistida por ultrassom, onde o aumento na concentração de etanol até 84% resultou em um rendimento máximo. Acima desta proporção de solvente a extração dos compostos foi reduzida. Xu et al. (2016), de forma semelhante, observaram um aumento progressivo na extração de antioxidantes naturais a medida que a concentração de etanol foi elevada, seguido por um declínio no rendimento quando percentuais de solvente maiores que 60% foram utilizados.

Com relação à temperatura, os maiores valores de percentual de extração e de solubilidade em água obtidos se estendem ao longo de grande parte da faixa de níveis estudada. Isso significa que, apesar de ser significativo, o efeito da temperatura sobre as respostas é pouco relevante, diferente do que ocorreu com o percentual de etanol no solvente, por exemplo. Assim o valor da temperatura poderia ser fixado próximo ao nível inferior, resultando em menor gasto energético. Este comportamento difere do observado na maior parte dos processos de extração de compostos bioativos, nos quais o aumento da temperatura é normalmente associado a maiores eficiências de extração (WANG; WELLER, 2006; PAULUCCI et al., 2013; OSORIO-TOBÓN et al., 2014). Isso pode ser explicado pelo fato de que, na extração assistida por ultrassom, a temperatura influencia no processo de cavitação devido a mudanças na tensão superficial do líquido e no aumento da pressão de vapor. Quando isso ocorre, há formação de uma grande quantidade de bolhas de cavitação, que colapsam de forma menos violenta, diminuindo os efeitos da sonicação no meio. Dessa forma, temperaturas mais baixas favorecem a extração assistida por ultrassom (CHEMAT et al., 2017).

Os gráficos de contorno indicam ainda que o aumento na massa de PVP até próximo de seu nível intermediário é acompanhado de maiores percentuais de extração e solubilidades dos pigmentos curcuminóides. Acima dessa faixa observa-se

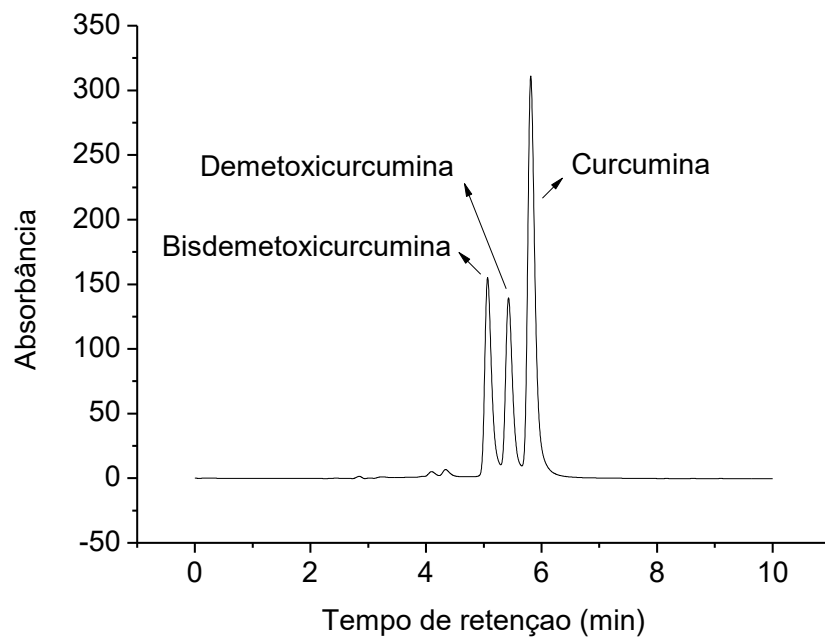
um declínio nas respostas obtidas. Este aumento pode ser decorrente da maior interação entre o polímero e os compostos, já que seu caráter anfifílico permite a formação de um complexo solúvel com os pigmentos hidrofóbicos, facilitando a dispersão destes em água (KAEWNOPPARAT et al., 2009; MARTINS et al., 2013b). Karavas et al. (2006) verificaram que a solubilidade da felodipina aumentou até um valor máximo de 16 mg/L quando a concentração de PVP no sistema variou de 0 a 95% (m/m). Entretanto, acima de 75% de polímero o aumento não foi significativo. Silva et al. (2017) encapsularam luteína em PVP e demonstraram que houve aumento das interações entre os compostos com o aumento da concentração de PVP, evidenciado por espectroscopia UV-Vis.

Para as três variáveis estudadas, nota-se que o comportamento da resposta solubilidade em água se assemelha ao da resposta percentual de extração. Assim, apesar de fisicamente o percentual de solvente orgânico não afetar um processo de encapsulação, ficou claro que este fator teve grande influência sobre as respostas de solubilidade, que estão diretamente ligadas à eficiência de encapsulação obtida. Esse fato é explicado pela elevada correlação existente entre as respostas avaliadas, como pode ser verificado na Tabela 2.

5.2 Otimização das condições experimentais

Aplicando-se funções de desejabilidade em conjunto com o *simplex* sequencial foram obtidas as condições ótimas para maximizar as respostas solubilidade em água da bisdemetoxicurcumina, solubilidade em água da demetoxicurcumina, solubilidade em água da curcumina e percentual de extração dos curcuminóides totais. As condições determinadas foram: temperatura de 29,9°C, percentual de etanol de 99% e massa de PVP de 15,38 mg. Com o intuito de validar a otimização realizada, a extração e encapsulação dos curcuminóides foi conduzida nessa condição em duplicata. Na Figura 5 pode-se observar um dos cromatogramas obtidos durante a quantificação em HPLC dos curcuminóides extraídos no ponto ótimo. Na Tabela 4 são apresentados os valores previstos para as respostas no ponto ótimo e os valores reais obtidos, ambos com intervalo de confiança de 95%.

Figura 5 - Cromatograma de HPLC dos pigmentos curcuminóides.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 4 – Valores previstos e observados obtidos para as respostas percentual de extração dos curcuminóides e solubilidade em água (em logaritmo natural) na condição ótima, com intervalo de confiança de 95%.

Resposta				
	Solubilidade ($\text{mg} \cdot \text{mg}_{\text{cúrcuma}}^{-1}$)			% extração
	Bisdemetoxicurcumina	Demetoxicurcumina	Curcumina	Curcuminóides totais
Valor previsto	$-6,51 \pm 0,47$	$-6,54 \pm 0,74$	$-5,56 \pm 1,01$	$10,89 \pm 0,99$
Valor observado	$-6,81 \pm 1,01$	$-6,87 \pm 1,14$	$-5,92 \pm 1,24$	$9,31 \pm 2,01$

Fonte: Autoria própria.

Os tempos de retenção de cada composto foram: 5,0 minutos para a bisdemetoxicurcumina, 5,4 minutos para a demetoxicurcumina e 5,8 minutos para a curcumina, o que está de acordo com a polaridade de cada composto e a consequente afinidade pela coluna cromatográfica. Nota-se que os valores observados são próximos dos valores previstos pelos modelos e encontram-se dentro dos intervalos

de confiança calculados. Foi possível atingir valores máximos para todas as respostas, o que pode ser explicado pelo fato de elas serem fortemente correlacionadas umas com as outras, como citado anteriormente (coeficientes de correlação maiores que 0,86). Estes resultados, em conjunto com os coeficientes de determinação ajustados, os gráficos de resíduos e os p-valores das regressões, confirmam que os modelos obtidos são válidos e possuem boa capacidade preditiva.

5.3 Caracterização das nanopartículas de curcuminóides em PVP

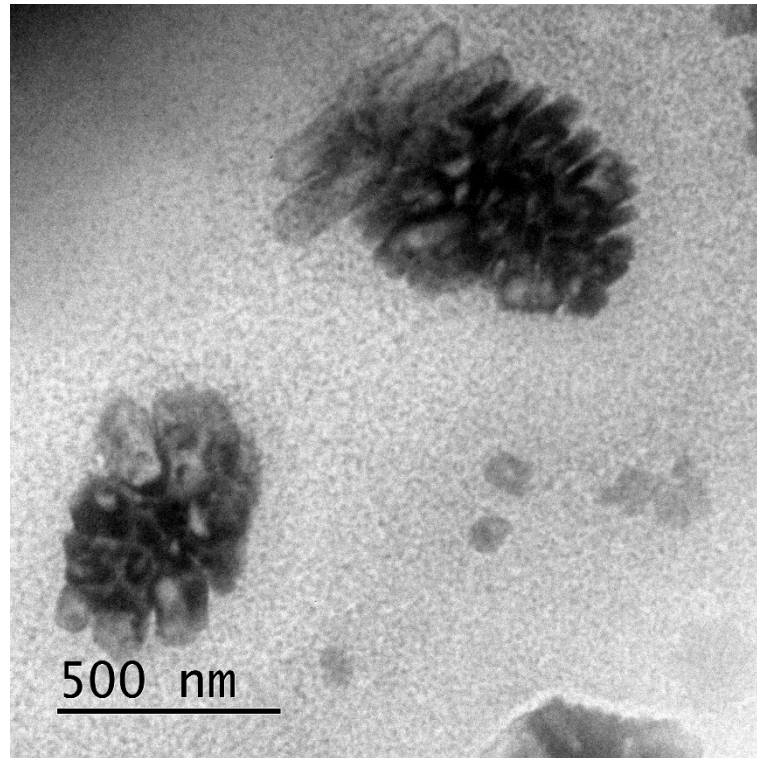
Nanopartículas foram produzidas nas condições ótimas determinadas anteriormente, pela aplicação do algoritmo simplex sequencial em conjunto com funções de desejabilidade, de acordo com a Tabela 5, na temperatura de 29,9°C. Uma imagem das nanopartículas é apresentada na Figura 6.

Tabela 5 - Condições utilizadas na obtenção das nanopartículas PVP-curcuminóides.

Componente	Quantidade
Etanol (mL)	9,90
Água destilada (mL)	0,10
PVP (mg)	15,38
Cúrcuma (mg)	10,00

Fonte: Autoria própria.

Figura 6 – Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) das nanopartículas de curcuminóides.

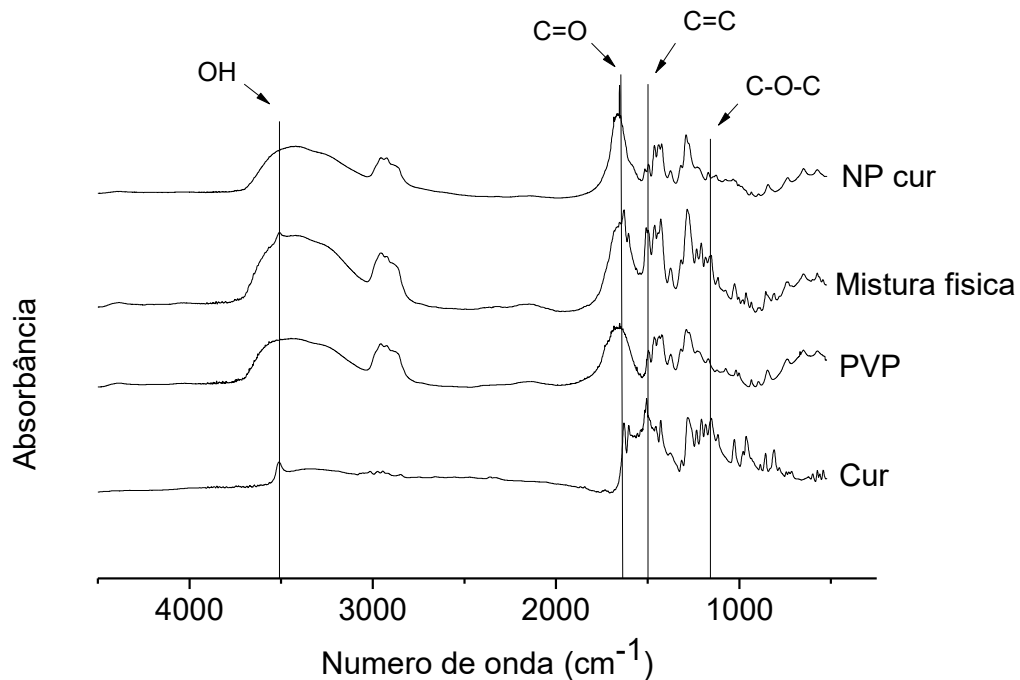


Fonte: Autoria própria.

As nanopartículas apresentaram formas irregulares e tamanhos em torno de 400 nm, como pode ser observado na Figura 6. Outros autores (KARAVAS et al., 2007; SILVA et al., 2017a) obtiveram nanopartículas esféricas utilizando o método convencional de dispersão sólida, o que sugere que a morfologia foi afetada pela etapa de extração. Uma possível explicação para esse fato é que a taxa de extração foi limitante, limitando a quantidade de curcuminóides disponíveis para formar as nanopartículas. Isso porque na técnica de dispersão sólida, as nanopartículas de curcuminóides em PVP são formadas por complexação através de ligações de hidrogênio e os dois compostos devem estar presentes, em um solvente comum (KARAVAS et al., 2007; SILVA et al., 2017a).

Na Figura 7 são apresentados os espectros no infravermelho obtidos a partir da curcumina e do PVP, de sua mistura física na proporção 15:1 (m/m), e das nanopartículas de PVP contendo curcuminóides, também na proporção de 15:1 (m/m).

Figura 7 - Espectros de FTIR da curcumina, do PVP, da mistura física (15:1 m/m) e das nanopartículas de curcuminóides em PVP.



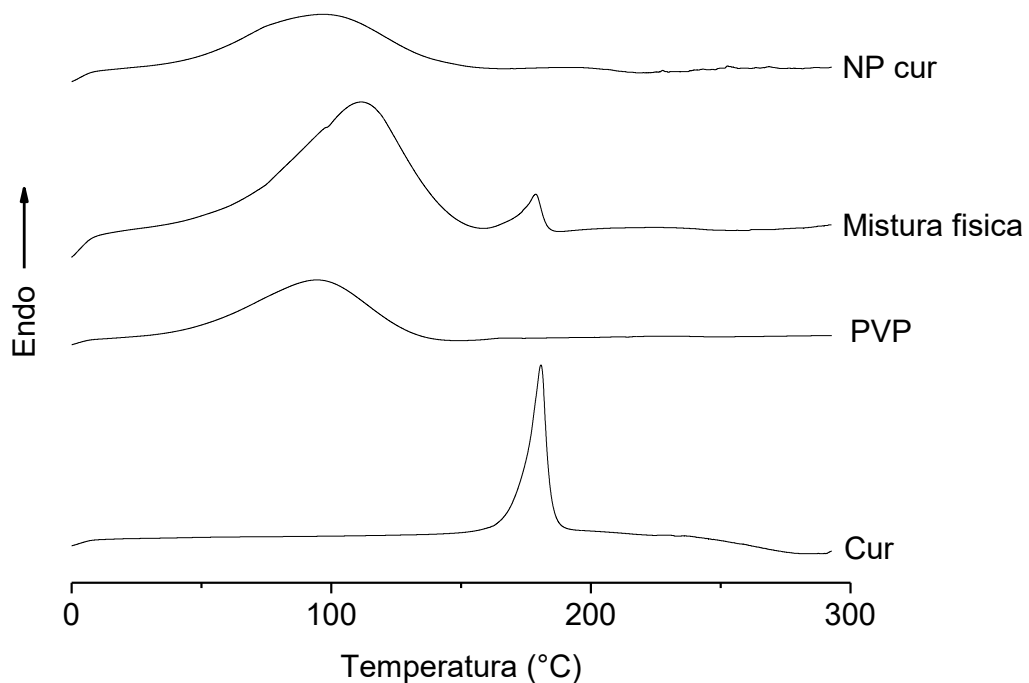
Fonte: Autoria própria.

É possível observar no espectro da curcumina os picos de absorção característicos em aproximadamente 3500 cm^{-1} (estiramento dos grupos hidroxila (OH)), 1630 cm^{-1} (grupos carbonila (C=O)), 1500 cm^{-1} (ligações C=C), 1150 cm^{-1} (grupo C-O-C) (ROCHA et al., 2014; BLANCO-PADILLA et al., 2015; RAJ; SHANKARAN, 2016). Em relação ao PVP, este possui um pico alargado entre 3600 e 3000 cm^{-1} , associado à presença de umidade no material, devido à sua afinidade pela água, uma segunda banda ampla entre 3000 e 2800 cm^{-1} , referente à vibração de estiramento do C-H, além dos picos característicos em 1660 cm^{-1} (vibração de estiramento do C=O) e em 1420 cm^{-1} (vibração de flexão do CH_2) (KOCZKUR et al., 2015). Os picos característicos dos dois compostos estão presentes, em menor intensidade, no espectro da mistura física, porém alguns são inexistentes no espectro das nanopartículas, como o pico referente à hidroxila da curcumina, o que sugere sua encapsulação no interior da matriz polimérica. Apesar de ter sido utilizada apenas a curcumina para a caracterização do composto puro e da mistura física, vale notar que o grupamento hidroxila está presente nos três curcuminóides extraídos e

encapsulados. Comportamento semelhante é relatado em outros estudos nos quais a curcumina foi submetida ao processo de encapsulação (PARADKAR et al., 2004; KUMAVAT et al., 2013; KHAN; RATHOD, 2014).

Na Figura 8 são apresentados os termogramas de DSC obtidos para a curcumina pura, para o PVP, para a mistura física dos compostos na proporção 15:1 (m/m) e para as nanopartículas de PVP contendo curcuminóides.

Figura 8 – Termogramas de DSC da curcumina, do PVP, da mistura física (15:1 m/m) e das nanopartículas de PVP contendo curcuminóides.



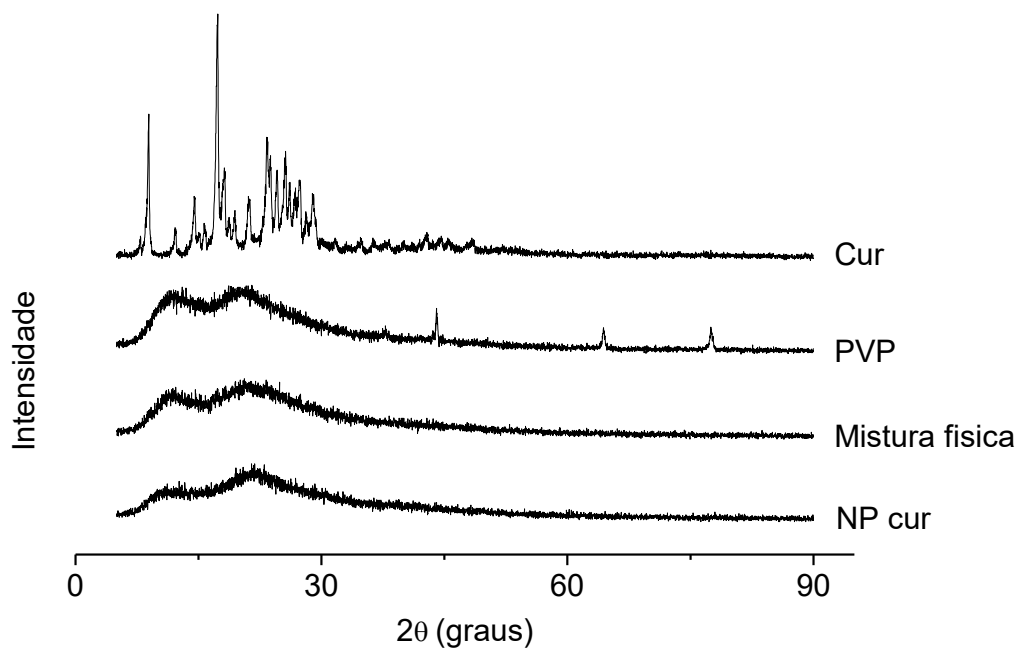
Fonte: Autoria própria.

No termograma da curcumina nota-se um pico endotérmico em 180°C, que corresponde à sua temperatura de fusão. Este valor está de acordo com o reportado na literatura (RACHMAWATI et al., 2013). A curva do PVP possui um pico endotérmico alargado entre 50 e 150°C, decorrente da perda de umidade do material, já que o PVP é um polímero amorfo altamente higroscópico (FRIZON et al., 2013). O termograma da mistura física evidencia os picos associados aos dois compostos, o que demonstra que não houve interação entre eles e que a estrutura cristalina da curcumina não foi modificada. Entretanto, na curva referente às nanopartículas o pico de fusão dos

compostos bioativos não está presente, indicando a conversão do estado físico destes do cristalino para o amorfo (ROCHA et al., 2014; LI et al., 2015).

Na Figura 9 são apresentados os difratogramas de DRX obtidos para a curcumina pura, para o PVP, para a mistura física dos compostos na proporção 15:1 (m/m) e para as nanopartículas de PVP contendo curcuminóides.

Figura 9 - Difratogramas de DRX da curcumina, do PVP, da mistura física (15:1 m/m) e das nanopartículas de PVP contendo curcuminóides.



Fonte: Autoria própria.

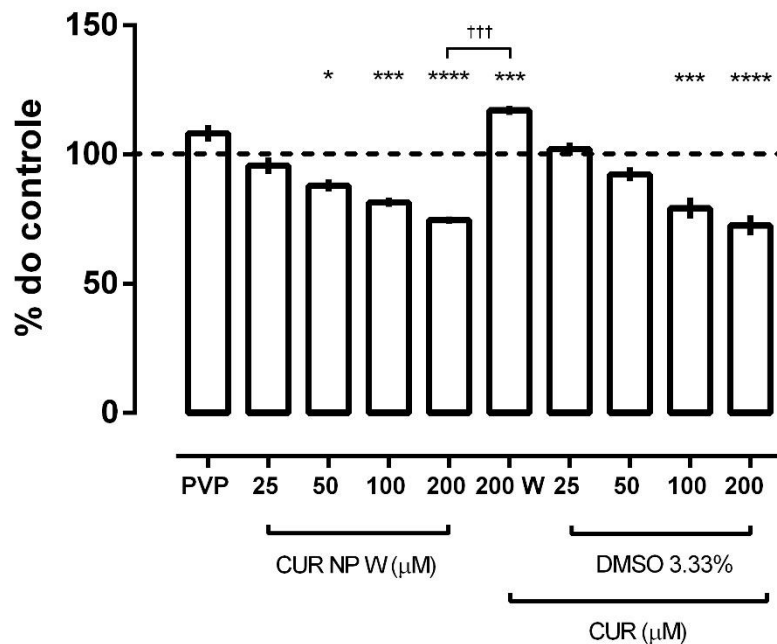
No difratograma da curcumina pura é possível observar uma série de picos entre 8° e 29°, que são característicos de sua estrutura cristalina (SUN et al., 2013). Por outro lado, a natureza amorfa do PVP é evidenciada pela ausência de picos em seu difratograma. Nos difratogramas da mistura física e das nanopartículas de curcuminóides não são observados picos característicos da curcumina, o que sugere que a análise de DRX foi menos sensível que as análises de DSC e FTIR em detectar a modificação da estrutura dos curcuminóides, após o processo de encapsulação.

Essas informações, em conjunto com as apresentadas anteriormente, confirmam a encapsulação dos curcuminóides na matriz de PVP.

5.4 Ensaios biológicos

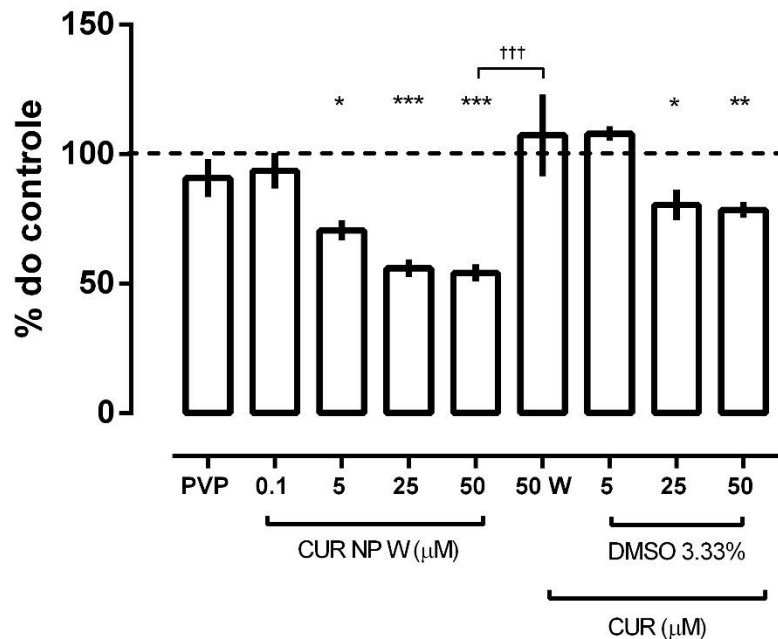
Os curcuminóides livres (extraídos na condição ótima, contudo sem a presença do PVP) e as nanopartículas de curcuminóides produzidas nas condições ótimas, foram avaliados com relação à suas ações moduladoras das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e glutathiona S-transferase (GST). Na Figura 10 é apresentado o gráfico de atividade enzimática da AChE, frente aos curcuminóides livres e encapsulados nas concentrações finais de 25 μM , 50 μM , 100 μM e 200 μM . Na Figura 11 é apresentado o gráfico de atividade enzimática da glutathiona S-transferase (GST), frente aos curcuminóides livres (5 μM , 25 μM e 50 μM) e encapsulados (0,1 μM , 5 μM , 25 μM e 50 μM).

Figura 10 – Atividade enzimática *in vitro* da AChE em atividade percentual em relação ao controle (% do controle) de cérebro de rato frente a: curcuminóides puros em DMSO 3,33% (25 μM , 50 μM , 100 μM e 200 μM) e em água (200 μM); nanopartículas de curcuminóides em água (25 μM , 50 μM , 100 μM e 200 μM); e PVP em água (13,8 μM). As barras de erro representam média \pm erro padrão, para $n = 4$. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$, em relação ao controle (atividade enzimática na ausência dos compostos (100%); ††† $p < 0,001$ entre as duas condições). CUR = curcuminóides; NP = nanopartículas; W = água.



Fonte: Autoria própria.

Figura 11 - Atividade enzimática *in vitro* da GST (em % do controle) de cérebro de rato frente a: curcuminóides puros em DMSO 3,33% (5 μ M, 25 μ M e 50 μ M) e em água (50 μ M); nanopartículas de curcuminóides em água (0,1 μ M, 5 μ M, 25 μ M e 50 μ M); e PVP em água (13,8 μ M). As barras de erro representam média \pm erro padrão, para n = 4. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, em relação ao controle (atividade enzimática na ausência dos compostos (100%); +++ p < 0,001 entre as duas condições). CUR = curcuminóides; NP = nanopartículas; W = água.



Fonte: Autoria própria.

É possível observar que o efeito dos curcuminóides puros e encapsulados sobre a atividade enzimática apresentou comportamento concentração-dependente, ou seja, à medida que a concentração dos compostos aumentou, a atividade da AChE diminuiu. Os curcuminóides livres foram capazes de inibir significativamente a atividade da enzima ($p < 0,001$) a partir da concentração final de 100 μ M, sendo o percentual de inibição para essa concentração de aproximadamente 21%. Já no caso das nanopartículas a inibição significativa ($p < 0,05$) foi alcançada a partir da concentração final de 50 μ M, para a qual a enzima foi inibida em cerca de 12%.

O PVP não alterou significativamente a atividade da AChE, o que confirma que a inibição causada pelas nanopartículas foi decorrente somente dos compostos encapsulados e não do material encapsulante. Ainda, os curcuminóides livres em água (200 μ M) não foram capazes de inibir a atividade enzimática, demonstrando que a encapsulação potencializou a atividade inibitória para os curcuminóides, apesar da

sua hidrofobicidade quando na sua forma livre. É importante notar que a atividade dos curcuminóides nanoencapsulados e livres em água diferiu significativamente ($p < 0,0001$) para essas duas condições.

Poucos estudos relatam ensaios *in vitro* de modulação da AChE pelos curcuminóides. Ainda, não foram encontrados trabalhos que avaliaram a ação moduladora de nanopartículas de curcuminóides. Ahmed e Gilani (2009) obtiveram um percentual de inibição da AChE de cerca de 60%, para uma concentração de curcuminóides livres em etanol igual a 30 μM . No presente estudo, o maior percentual de inibição enzimática (27%) foi obtido para uma dose de 200 μM de curcuminóides livres. Entretanto, é importante ressaltar que, no estudo citado, não é revelada a concentração de etanol utilizada para solubilizar os curcuminóides e sabe-se, por meio de estudos prévios, que concentrações de etanol maiores que 30% são capazes de inibir a ação da AChE *per se*. Além disso, os autores utilizaram enzima acetilcolinesterase purificada proveniente de enguias elétricas nas análises, o que pode explicar a diferença com os valores encontrados aqui.

De acordo com a hipótese colinérgica, doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, seriam causadas pela perda de neurotransmissores acetilcolina ou pelo aumento na atividade da enzima AChE no cérebro. Como resultado, ocorre a redução no tempo de contato entre o neurotransmissor e os receptores presentes na membrana pós-sináptica, dificultando a transmissão de informação entre os neurônios e levando à perda de memória. Dessa forma, as drogas usualmente empregadas no tratamento do Alzheimer, e de outras doenças neurodegenerativas, consistem de inibidores reversíveis da AChE, pois estes equilibram o sistema colinérgico, permitindo tempo de contato suficiente para a propagação de informações no sistema nervoso (SIEGFRIED, 1993; ARAUJO; STUDZINSKI; MILGRAM, 2005; COLOVIC et al., 2013). Neste trabalho, os curcuminóides livres e nanoencapsulados se mostraram inibidores reversíveis da enzima AChE, o que sugere que eles possuem potencial para serem utilizados no tratamento de doenças causadas pelo desequilíbrio do sistema colinérgico.

Para o caso da enzima glutathione S-transferase (GST), novamente, nota-se um comportamento concentração-dependente entre as concentrações de curcuminóides livres e encapsulados e a atividade enzimática. Os curcuminóides livres inibiram significativamente ($p < 0,05$) a ação da GST a partir da concentração final de 25 μM , sendo a inibição para essa concentração de aproximadamente 20%. Já as

nanopartículas de curcuminóides inibiram significativamente ($p < 0,05$) a atividade da enzima a partir da concentração de $5 \mu\text{M}$, sendo o percentual de inibição igual a 30%.

Ainda, o PVP não inibiu de forma significativa, *per se*, a atividade da enzima. O comportamento dos curcuminóides livres em água e das nanopartículas diferiu significativamente entre si ($p < 0,001$), para uma mesma concentração final de $50 \mu\text{M}$. Os curcuminóides livres em água não diferiram do controle em relação à atividade da GST, ao nível de 5% de significância, enquanto as nanopartículas foram capazes de inibir a enzima em cerca de 55%.

A GST é uma das enzimas envolvidas no combate ao estresse oxidativo no organismo. Sua função é detoxificar xenobióticos ou agentes citotóxicos (como drogas, toxinas e carcinógenos), por meio da catálise da reação entre tais compostos e a glutationa, o que resulta na formação de espécies menos reativas. A atividade excessiva da GST está associada à resistência a múltiplas drogas, fenômeno observado com frequência durante o tratamento de doenças como o câncer. Esse tipo de resistência impede que tais doenças sejam combatidas de forma eficiente. Nestes casos, a redução na atividade enzimática por meio de moduladores da GST seria interessante, do ponto de vista terapêutico (SCHULTZ; DUTTA; TEW, 1997; HAYESHI et al., 2007; LI et al., 2017). No presente trabalho, os curcuminóides livres e nanoencapsulados inibiram de forma significativa a atividade *in vitro* da GST de cérebro de ratos. Isso indica que as nanopartículas de curcuminóides produzidas poderiam ser empregadas a fim de reverter a resistência à medicamentos, de forma mais intensa que os compostos puros.

Outros autores relataram comportamento semelhante da curcumina frente a enzima GST. Oetari et al. (1996) verificaram que a curcumina inibiu em cerca de 58% (para uma dose de $30 \mu\text{M}$) a atividade da GST de fígado de ratos, tratados com β -naftoflavona (βNF). Hayeshi et al. (2007) avaliaram o efeito da curcumina sobre a atividade *in vitro* da GST humana recombinante. Para uma dose de $5 \mu\text{M}$, foi obtida uma inibição de 50% na atividade da GST P1-1. Vale ressaltar que, nos estudos citados, foi avaliado somente o efeito da curcumina, e não dos curcuminóides, sobre a atividade da GST, e que as enzimas utilizadas nos ensaios foram provenientes de diferentes tecidos. Esses fatores podem explicar a diferença nos percentuais de inibição enzimática obtidos, em comparação aos valores apresentados neste trabalho.

Os resultados demonstram que os curcuminóides na forma encapsulada inibiram a atividade das enzimas AChE e GST de forma mais potente que na forma

pura. Esse comportamento pode estar relacionado com a interação entre as moléculas de água do meio com a estrutura quaternária da enzima, uma vez que quando a enzima não está ligada com o substrato as moléculas de água estabilizam a mesma. A natureza hidrofílica do encapsulante e do complexo curcuminóides-PVP formado pode estabilizar a enzima resultando na diminuição da taxa de degradação do substrato. Adicionalmente, o fato de as nanopartículas apresentarem tamanho da ordem 400 nanômetros (Figura 6) pode ter levado a um efeito estérico no sítio catalítico da enzima, ocasionando uma inibição da atividade enzimática (COLOVIC et al., 2013; NELSON; COX, 2014).

6. CONCLUSÃO

Os curcuminóides presentes na cúrcuma foram extraídos e simultaneamente encapsulados em poli(vinil pirrolidona). A influência de parâmetros experimentais (solvente, temperatura e encapsulante) sobre o processo foi avaliada através de um Delineamento Central Composto Rotacional e modelos quadráticos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) foram obtidos a partir das respostas. As condições experimentais ótimas para a máxima obtenção conjunta das respostas solubilidade em água dos curcuminóides individuais e percentual de extração dos curcuminóides totais foram determinadas por meio de funções de desejabilidade, levando aos seguintes valores: 29,9°C, 99% de solvente etanol e 15,38 mg de encapsulante PVP. A validação experimental do ponto ótimo demonstrou que os valores previstos pelos modelos foram semelhantes aos valores observados, comprovando a boa capacidade preditiva das regressões. Nanopartículas de curcuminóides em PVP foram produzidas nas condições ótimas, encontradas pelas funções de desejabilidade, e sua caracterização indicou a mudança na estrutura física dos compostos curcuminóides do estado cristalino para o estado amorfo, além de demonstrar a interação entre os curcuminóides e o encapsulante. Essas informações confirmaram a encapsulação dos curcuminóides na matriz polimérica de PVP. Os ensaios biológicos realizados demonstraram que os curcuminóides livres e nanoencapsulados foram capazes de modular a atividade *in vitro* das enzimas AChE e GST de cérebro de ratos. Os compostos puros não apresentaram atividade quando em água, demonstrando que a encapsulação potencializou sua atividade em meio aquoso pela diminuição do seu caráter hidrofóbico. Tais informações sugerem que as nanopartículas de curcuminóides possuem potencial para serem usadas a fim de reverter quadros de resistência à medicamentos e no tratamento de doenças relacionadas ao desequilíbrio do sistema colinérgico, como a doença de Alzheimer.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, M. A. et al. Curcumin and its derivatives: Moderate inhibitors of acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and trypsin. **Scientia Iranica**, v. 19, n. 6, p. 1580–1583, 2012.

AHMED, T.; GILANI, A. H. Inhibitory effect of curcuminoids on acetylcholinesterase activity and attenuation of scopolamine-induced amnesia may explain medicinal use of turmeric in Alzheimer's disease. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 91, n. 4, p. 554–559, 2009.

AJILA, C. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. **Food Chemistry**, v. 105, p. 982–988, 2007.

AK, T.; GÜLÇİN, I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. **Chemico-Biological Interactions**, v. 174, n. 1, p. 27–37, 2008.

AMALRAJ, A. et al. Biological activities of curcuminoids , other biomolecules from turmeric and their derivatives - A review. **Journal of Traditional Chinese Medical Sciences**, p. 1–29, 2016.

ARAUJO, J. A.; STUDZINSKI, C. M.; MILGRAM, N. W. Further evidence for the cholinergic hypothesis of aging and dementia from the canine model of aging. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 29, n. 3, p. 411–422, 2005.

AZMIR, J. et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials : A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013.

BAJPAI, S. K.; CHAND, N.; AHUJA, S. Investigation of curcumin release from chitosan/cellulose micro crystals (CMC) antimicrobial films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 440–448, 2015.

BARIK, A. et al. Evaluation of a new copper(II)-curcumin complex as superoxide dismutase mimic and its free radical reactions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 39, n. 6, p. 811–822, 2005.

BATINIĆ-HABERLE, I.; REBOUÇAS, J. S.; SPASOJEVIĆ, I. Superoxide dismutase mimics: chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. **Antioxidants & redox**

signaling, v. 13, n. 6, p. 877–918, 2010.

BLANCO-PADILLA, A. et al. Characterization, release and antioxidant activity of curcumin-loaded amaranth-pullulan electrospun fibers. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 2, p. 1137–1144, 2015.

BONA, E. et al. Aplicativo para otimização empregando o método simplex seqüencial. **Acta Scientiarum**, v. 22, n. 5, p. 1201–1206, 2000.

BRUSOTTI, G. et al. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources : The role of analysis in the ethnopharmacological approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 218–228, 2014.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, n. 1, p. 15–25, 2013.

CATALAN-LATORRE, A. et al. Freeze-dried eudragit-hyaluronan multicompartiment liposomes to improve the intestinal bioavailability of curcumin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2016.

CHANG, X. et al. Analysis of anti-depressant potential of curcumin against depression induced male albino wistar rats. **Brain Research**, v. 1642, p. 219–225, 2016.

CHATTOPADHYAY, I. et al. Turmeric and curcumin : Biological actions and medicinal applications. **Current Science**, v. 87, n. 1, 2004.

CHAURASIA, S. et al. Lipopolysaccharide based oral nanocarriers for the improvement of bioavailability and anticancer efficacy of curcumin. **Carbohydrate Polymers**, v. 130, p. 9–17, 2015.

CHEMAT, F. et al. Ultrasound assisted extraction of food and natural products . Mechanisms , techniques , combinations , protocols and applications . A review. **Ultrasonics - Sonochemistry**, v. 34, p. 540–560, 2017.

CHIKARA, S. et al. Oxidative stress and dietary phytochemicals: Role in cancer chemoprevention and treatment. **Cancer Letters**, v. 413, p. 122–134, 2018.

CHIRIO, D. et al. Formulation of curcumin-loaded solid lipid nanoparticles produced by

fatty acids coacervation technique. **Journal of microencapsulation**, v. 28, n. 6, p. 537–48, 2011.

COLOVIC, M. B. et al. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropharmacology**, v. 11, n. 3, p. 315–335, 2013.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88–95, 1961.

EZHILARASI, P. N.; KARTHIK, P.; CHHANWAL, N. Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components : A Review. **Food Bioprocess Technol**, v. 6, p. 628–647, 2013.

FADUS, M. C. et al. Curcumin : An age-old anti-inflammatory and anti-neoplastic agent. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, p. 1–8, 2016.

FRIZON, F. et al. Dissolution rate enhancement of loratadine in polyvinylpyrrolidone K-30 solid dispersions by solvent methods. **Powder Technology**, v. 235, p. 532–539, 2013.

GIBBS, B. F. et al. Encapsulation in the food industry : a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 50, p. 213–224, 1999.

GOPAL, J.; MUTHU, M.; CHUN, S. One-step, ultrasonication-mobilized, solvent-free extraction/synthesis of nanocurcumin from turmeric. **RSC Advances**, v. 5, p. 48391–48398, 2015.

GOVINDARAJAN, V. S.; STAHL, W. H. Turmeric - chemistry, technology and quality. **C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 12, n. 3, p. 199–301, 1980.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130–7139, 1974.

HADI, B. et al. Ultrasonic-Assisted Extraction of Curcumin Complexed with Methyl- β - Cyclodextrin. **Food Anal. Methods**, v. 8, p. 1373–1381, 2015.

HAYESHI, R. et al. The inhibition of human glutathione S-transferases activity by plant polyphenolic compounds ellagic acid and curcumin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 2, p. 286–295, 2007.

HUANG, L. et al. Antifungal curcumin promotes chitin accumulation associated with decreased virulence of *Sporothrix schenckii*. **International Immunopharmacology**, v. 34, p. 263–270, 2016a.

HUANG, X. et al. Enhancement of curcumin water dispersibility and antioxidant activity using core – shell protein – polysaccharide nanoparticles. **Food Research International**, v. 87, p. 1–9, 2016b.

IOANNIDES, C. **Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics**. [s.l.] John Wiley & Sons, LTD, 2001.

JAFARI, Y.; SABAHI, H.; RAHAIE, M. Stability and loading properties of curcumin encapsulated in *Chlorella vulgaris*. **Food Chemistry**, v. 211, p. 700–706, 2016.

JAISWAL, S. K. et al. Curcumin Mediated Attenuation of Carbofuran Induced Oxidative Stress in Rat Brain. **Biochemistry Research International**, v. 2016, 2016.

JAQUES, J. A. DOS S. et al. The effect of curcumin in the ectonucleotidases and acetylcholinesterase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of cigarette smoke-exposed rats. **Cell Biochemistry and Function**, v. 29, n. 8, p. 703–707, 2011.

JIANG, S. et al. Curcumin as a potential protective compound against cardiac diseases. **Pharmacological Research**, 2017.

KAEWNOPPARAT, N. et al. Increased Solubility , Dissolution and Physicochemical Studies of Curcumin-Polyvinylpyrrolidone K- Solid Dispersions. **International Scholarly and Scientific Research and Innovation**, v. 3, n. 7, p. 210–215, 2009.

KARAVAS, E. et al. Effect of hydrogen bonding interactions on the release mechanism of felodipine from nanodispersions with polyvinylpyrrolidone. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, p. 103–114, 2006.

KARAVAS, E. et al. Combining SEM , TEM , and micro-Raman techniques to differentiate between the amorphous molecular level dispersions and nanodispersions of a poorly water-soluble drug within a polymer matrix. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 340, p. 76–83, 2007.

KAUR, G. et al. Inhibition of oxidative stress and cytokine activity by curcumin in amelioration of endotoxin-induced experimental hepatotoxicity in rodents. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 145, n. 2, p. 313–321, 2006.

KHALIL, O. A. K. et al. Curcumin antifungal and antioxidant activities are increased in the presence of ascorbic acid. **Food Chemistry**, v. 133, n. 3, p. 1001–1005, 2012.

KHAN, W. H.; RATHOD, V. K. Process intensification approach for preparation of curcumin nanoparticles via solvent – nonsolvent nanoprecipitation using spinning disc reactor. **Chemical Engineering & Processing: Process Intensification**, v. 80, p. 1–10, 2014.

KLAUNIG, J. E.; WANG, Z. Oxidative stress in carcinogenesis. **Current Opinion in Toxicology**, 2017.

KOCZKUR, K. M. et al. Polyvinylpyrrolidone (PVP) in nanoparticle synthesis. **Dalton Transactions**, v. 44, p. 17883–17905, 2015.

KOROVILA, I. et al. Proteostasis, oxidative stress and aging. **Redox Biology**, v. 13, n. December 2016, p. 550–567, 2017.

KRAUSZ, A. E. et al. Curcumin-encapsulated nanoparticles as innovative antimicrobial and wound healing agent. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 11, n. 1, p. 195–206, 2015.

KRIS-ETHERTON, P. M. et al. Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. **The American Journal of Medicine**, v. 113, 2002.

KUMAVAT, S. D. et al. Characterization and Evaluation of Curcumin - PVP Solid Dispersion by Solvent Evaporation Technique. **INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL & RESEARCH SCIENCES**, v. 2, n. 5, p. 693–706, 2013.

LI, J. et al. Soluble starch formulated nanocomposite increases water solubility and stability of curcumin. **Food Hydrocolloids**, 2015.

LI, M.; NGADI, M. O.; MA, Y. Optimisation of pulsed ultrasonic and microwave-assisted extraction for curcuminoids by response surface methodology and kinetic study. **FOOD CHEMISTRY**, v. 165, p. 29–34, 2014.

LI, S. et al. Chemical composition and product quality control of turmeric (*Curcuma longa* L .). **Pharmaceutical Crops**, v. 2, p. 28–54, 2011.

LI, S. et al. Overcoming resistance to cisplatin by inhibition of glutathione S-

transferases (GSTs) with ethacraplatin micelles in vitro and in vivo. **Biomaterials**, v. 144, p. 119–129, 2017.

LIU, Y. et al. Molecular interactions, characterization and antimicrobial activity of curcumin-chitosan blend films. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 564–572, 2016.

LÓPEZ-TOBAR, E. et al. Encapsulation and isomerization of curcumin with cyclodextrins characterized by electronic and vibrational spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 62, p. 292–298, 2012.

MAHMOOD, K. et al. Recent developments in curcumin and curcumin based polymeric materials for biomedical applications : A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 877–890, 2015.

MANDAL, V. et al. Design and Optimization of Ultrasound Assisted Extraction of Curcumin as an Effective Alternative for Conventional Solid Liquid Extraction of Natural Products. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 1, 2009.

MARTINS, R. M. et al. Curcuminoid content and antioxidant activity in spray dried microparticles containing turmeric extract. **Food Research International**, v. 50, n. 2, p. 657–663, 2013.

MOGHADAMTOUSI, S. Z. et al. A Review on Antibacterial , Antiviral , and Antifungal Activity of Curcumin. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. [s.l: s.n.].

MOUSSA, Z. et al. Encapsulation of curcumin in cyclodextrin-metal organic frameworks : Dissociation of loaded CD-MOFs enhances stability of curcumin. **Food Chemistry**, v. 212, p. 485–494, 2016.

MUN, S. et al. Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Phytomedicine**, v. 20, p. 714–718, 2013.

MUNIN, A.; EDWARDS-LÉVY, F. Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. **Pharmaceutics**, v. 3, p. 793–829, 2011.

MURAKAMI, Y. et al. Comparative anti-inflammatory activities of curcumin and tetrahydrocurcumin based on the phenolic O-H bond dissociation enthalpy, ionization potential and quantum chemical descriptor. **Anticancer Research**, v. 28, n. 2 A, p.

699–708, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6 ed. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NETO, B. DE B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. [s.l: s.n.].

OETARI, S. et al. Effects of curcumin on cytochrome P450 and glutathione S-transferase activities in rat liver. **Biochemical Pharmacology**, v. 51, n. 1, p. 39–45, 1996.

OSORIO-TOBÓN, J. F. et al. Extraction of curcuminoids from deflavored turmeric (*Curcuma longa* L .) using pressurized liquids: Process integration and economic evaluation. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 95, p. 167–174, 2014.

P.R., S. et al. Preparation, characterization and biological evaluation of curcumin loaded alginate aldehyde–gelatin nanogels. **Materials Science and Engineering: C**, v. 68, p. 251–257, 2016.

PANAHI, Y. et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of curcuminoid-piperine combination in subjects with metabolic syndrome: A randomized controlled trial and an updated meta-analysis. **Clinical Nutrition**, v. 34, n. 6, p. 1101–1108, 2015.

PARADKAR, A. et al. Characterization of curcumin – PVP solid dispersion obtained by spray drying. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 271, p. 281–286, 2004.

PARAMERA, E. I.; KONTELES, S. J.; KARATHANOS, V. T. Stability and release properties of curcumin encapsulated in *Saccharomyces cerevisiae* , β -cyclodextrin and modified starch. **Food Chemistry**, v. 125, n. 3, p. 913–922, 2011.

PAULUCCI, V. P. et al. Optimization of the extraction of curcumin from *Curcuma longa* rhizomes. **Revista Brasileira de Farmacognosia - Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 1, p. 94–100, 2013.

PERKO, T. et al. Isolation , characterization and formulation of curcuminoids and in vitro release study of the encapsulated particles. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 103, p. 48–54, 2015.

PRASAD, S. et al. Curcumin , a component of golden spice : From bedside to bench

and back. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 6, p. 1053–1064, 2014.

QIN, Y. et al. Curcumin inhibits the replication of enterovirus 71 in vitro. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 4, n. 4, p. 284–294, 2014.

RACHMAWATI, H. et al. Development of Curcumin Nanocrystal : Physical Aspects. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 1, p. 204–214, 2013.

RAI, D. et al. Curcumin inhibits FtsZ assembly: an attractive mechanism for its antibacterial activity. **Biochem. J.**, v. 155, p. 147–155, 2008.

RAJ, S.; SHANKARAN, D. R. Curcumin based biocompatible nanofibers for lead ion detection. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 226, p. 318–325, 2016.

RAVINDRAN, P. N.; BABU, K. N.; SIVARAMAN, K. **Turmeric: The genus Curcuma**. [s.l: s.n.].

RHEIN, C. VON et al. Curcumin and Boswellia serrata gum resin extract inhibit chikungunya and vesicular stomatitis virus infections in vitro. **Antiviral Research**, v. 125, p. 51–57, 2016.

ROCHA, B. A. et al. Curcumin encapsulated in poly-L-lactic acid improves its anti-inflammatory efficacy in vivo. **Advancement in Medicinal Plant Research**, v. 2, p. 62–73, 2014.

SAMADI, A. et al. European Journal of Medicinal Chemistry Synthesis , biological assessment and molecular modeling of new multipotent MAO and cholinesterase inhibitors as potential drugs for the treatment of Alzheimer ' s disease. v. 46, p. 4665–4668, 2011.

SANKAR, P. et al. Effects of Nanoparticle-Encapsulated Curcumin on Arsenic-Induced Liver Toxicity in Rats. **Environmental Toxicology**, p. 628–637, 2013.

SARI, T. P. et al. Preparation and characterization of nanoemulsion encapsulating curcumin. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 540–546, 2015.

SARIKA, P. R.; NIRMALA, R. J. Curcumin loaded gum Arabic aldehyde-gelatin nanogels for breast cancer therapy. **Materials Science and Engineering C**, v. 65, p. 331–337, 2016.

SCHULTZ, M.; DUTTA, S.; TEW, K. D. Inhibitors of glutathione S-transferases as

therapeutic agents. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 26, n. 2–3, p. 91–104, 1997.

SEYEDZADEH, M. H. et al. Study of curcumin immunomodulatory effects on reactive astrocyte cell function. **International Immunopharmacology**, 2014.

SHAHGHOLIAN, N.; RAJABZADEH, G. Fabrication and characterization of curcumin-loaded albumin / gum arabic coacervate. **Food hydrocolloids**, v. 59, p. 17–25, 2016.

SHEKHAR, K. et al. A REVIEW ON MICROENCAPSULATION. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 5, n. 2, p. 58–62, 2010.

SHI, G.; RAO, L.; YU, H. Stabilization and encapsulation of photosensitive resveratrol within yeast cell. v. 349, p. 83–93, 2008.

SIEGFRIED, K. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease. **European Neuropsychopharmacology**, v. 3, n. 3, p. 170–171, 1993.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, n. 2, p. 291–295, 1997.

SILVA, J. T. DO P. et al. Analytical validation of an ultraviolet-visible procedure for determining lutein concentration and application to lutein-loaded nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 230, p. 336–342, 2017a.

SILVA, A. C. DA et al. Production and characterization of curcumin microcrystals and evaluation of the antimicrobial and sensory aspects in minimally processed carrots. **Food Funct.**, v. 8, n. 5, p. 1851–1858, 2017b.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 2, n. 4, p. 294–302, 2001.

SRIVASTAVA, R. M. et al. Immunomodulatory and therapeutic activity of curcumin. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 3, p. 331–341, 2011.

SULERIA, H. A. R. et al. Marine Bioactive Compounds and Health Promoting Perspectives; Innovation Pathways for Drug Discovery. **Trends in Food Science & Technology**, 2016.

SUN, X. Z. et al. Electrospun curcumin-loaded fibers with potential biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 147–153, 2013.

TEJASWI, G. et al. Myeloperoxidase, protein carbonyls and oxidative stress in coronary artery disease. **Journal of Indian College of Cardiology**, v. 7, n. 4, p. 149–152, 2017.

TEOW, S. et al. Antibacterial Action of Curcumin against Staphylococcus aureus : A Brief Review. **Journal of Tropical Medicine**, 2016.

TIWARI, B. K. Ultrasound : A clean , green extraction technology. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 100–109, 2015.

VILKHU, K. et al. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, p. 161–169, 2008.

WAKTE, P. S. et al. Optimization of microwave , ultra-sonic and supercritical carbon dioxide assisted extraction techniques for curcumin from Curcuma longa. **Separation and Purification Technology**, v. 79, n. 1, p. 50–55, 2011.

WANG, L. et al. Characterization of stress degradation products of curcumin and its two derivatives by UPLC – DAD – MS / MS. **Arabian Journal of Chemistry**, v. In Press, 2016a.

WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutra- ceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 300–312, 2006.

WANG, S. et al. Nanotechnologies for Curcumin : An Ancient Puzzler Meets Modern Solutions. v. 2011, 2011.

WANG, S. et al. Curcumin ameliorates experimental autoimmune myasthenia gravis by diverse immune cells. **Neuroscience Letters**, v. 626, p. 25–34, 2016b.

WANG, X. et al. Enhancing anti-inflammation activity of curcumin through O / W nanoemulsions. **Food Chemistry**, v. 108, p. 419–424, 2008.

WU, K. E. et al. Formation and Characterization of Solid Dispersions of Piroxicam and Polyvinylpyrrolidone Using Spray Drying and Precipitation with Compressed Antisolvent. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 7, p. 2422–2431, 2009.

WU, S.; XIAO, D. Effect of curcumin on nasal symptoms and air fl ow in patients with perennial allergic rhinitis. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, p. 1–6, 2016.

XU, D. P. et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from the flower of *Jatropha integerrima* by response surface methodology. **Molecules**, v. 21, n. 1, p. 1–12, 2016.

YEN, F.-L. et al. Curcumin Nanoparticles Improve the Physicochemical Properties of Curcumin and Effectively Enhance Its Antioxidant and Antihepatoma Activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 7376–7382, 2010.

YU, H.; HUANG, Q. Enhanced in vitro anti-cancer activity of curcumin encapsulated in hydrophobically modified starch. **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 669–674, 2010.

ZHANG, L. et al. Curcumin-cyclodextrin complexes enhanced the anti-cancer effects of curcumin. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 48, p. 31–38, 2016a.

ZHANG, M. et al. Curcumin ameliorates alveolar epithelial injury in a rat model of chronic obstructive pulmonary disease. **Life Sciences**, v. 164, p. 1–8, 2016b.

APÊNDICE A

Nas Tabelas 6 a 13 são apresentadas as Análises de Variância (ANOVA) realizadas para validar os modelos quadráticos referentes às respostas percentual de extração e solubilidade em água dos curcuminóides individuais e totais.

Tabela 6 - ANOVA da resposta percentual de extração da bisdemetoxicurcumina, ao nível de significância de 95%.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	F tabelado	p-valor
Regressão	12,0070	9	1,3341	11,0816	3,3881	0,0012
Resíduos	0,9631	8	0,1204			
Falta de ajuste	0,9503	5	0,1901	44,4197	9,0135	0,0052
Erro puro	0,0128	3	0,0043			
Total	12,9701	17				

Fonte: Autoria própria.

Tabela 7 - ANOVA da resposta percentual de extração da demetoxicurcumina, ao nível de significância de 95%.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	F tabelado	p-valor
Regressão	11,1883	9	1,2431	13,2191	3,3881	0,0007
Resíduos	0,7523	8	0,0940			
Falta de ajuste	0,7385	5	0,1477	31,9389	9,0135	0,0084
Erro puro	0,0139	3	0,0046			
Total	11,9407	17				

Fonte: Autoria própria.

Tabela 8 - ANOVA da resposta percentual de extração da curcumina, ao nível de significância de 95%.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	F tabelado	p-valor
Regressão	67,3556	8	8,4195	21,6864	3,2296	0,0001
Resíduos	3,4941	9	0,3882			
Falta de ajuste	3,4267	6	0,5711	25,3981	8,9406	0,0115
Erro puro	0,0675	3	0,0225			
Total	70,8497	17				

Fonte: Autoria própria.

Tabela 9 - ANOVA da resposta percentual de extração dos curcuminóides totais, ao nível de significância de 95%.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	F tabelado	p-valor
Regressão	225,5450	9	25,0606	15,2191	3,3881	0,0004
Resíduos	13,1732	8	1,6467			
Falta de ajuste	12,9337	5	2,5867	32,4051	9,0135	0,0082
Erro puro	0,2395	3	0,0798			
Total	238,7182	17				

Fonte: Autoria própria.

Tabela 10 - ANOVA da resposta solubilidade em água da bisdemetoxicurcumina, ao nível de significância de 95%.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	F tabelado	p-valor
Regressão	43,8119	9	4,8680	10,6249	3,3881	0,0014
Resíduos	3,6654	8	0,4582			
Falta de ajuste	3,6114	5	0,7223	40,1712	9,0135	0,0060
Erro puro	0,0539	3	0,0180			
Total	47,4772	17				

Fonte: Autoria própria.

Tabela 11 - ANOVA da resposta solubilidade em água da demetoxicurcumina, ao nível de significância de 95%.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	F tabelado	p-valor
Regressão	96,7879	8	12,0985	21,3374	3,2296	0,0001
Resíduos	5,1031	9	0,5670			
Falta de ajuste	4,9592	6	0,8265	17,2334	8,9406	0,0200
Erro puro	0,1439	3	0,0480			
Total	101,8909	17				

Fonte: Autoria própria.

Tabela 12 - ANOVA da resposta solubilidade em água da curcumina, ao nível de significância de 95%.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	F tabelado	p-valor
Regressão	114,8851	7	16,4122	35,2050	3,1355	0,0000
Resíduos	4,6619	10	0,4662			
Falta de ajuste	4,3936	7	0,6277	7,0178	8,8867	0,0687
Erro puro	0,2683	3	0,0894			
Total	119,5469	17				

Fonte: Autoria própria.

Tabela 13 - ANOVA da resposta solubilidade em água dos curcuminóides totais, ao nível de significância de 95%.

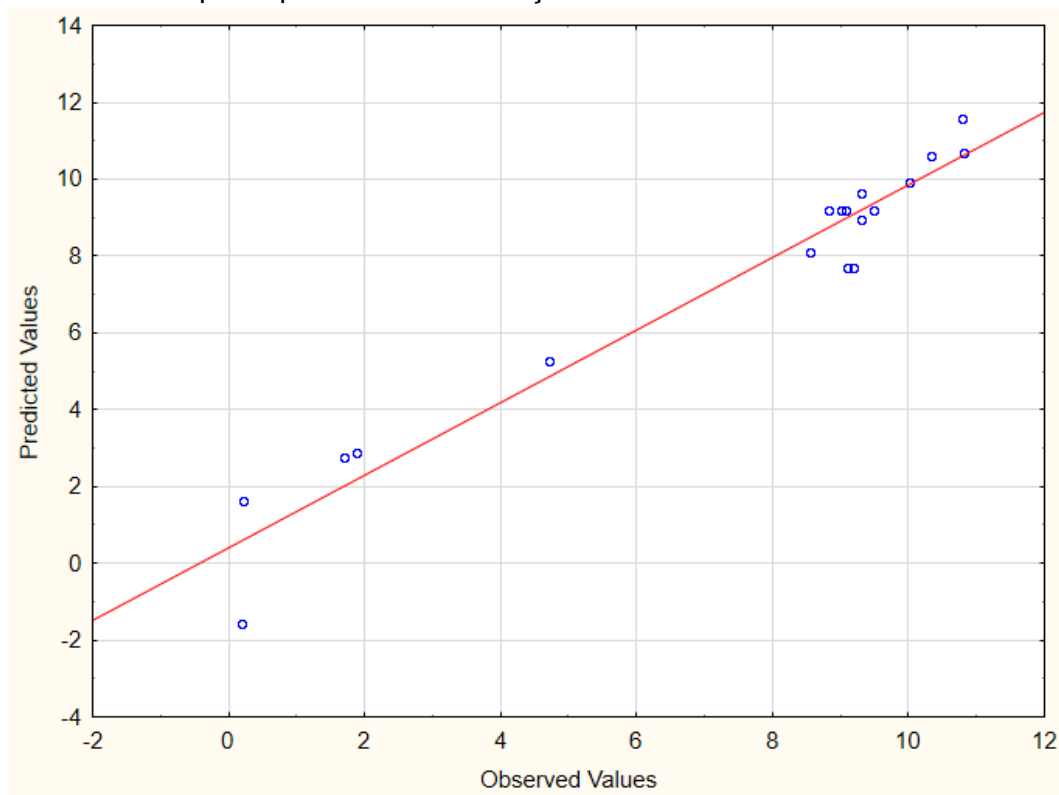
Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	F tabelado	p-valor
Regressão	71,3515	7	10,1931	18,4036	3,1355	0,0001
Resíduos	5,5386	10	0,5539			
Falta de ajuste	5,3692	7	0,7670	13,5788	8,8867	0,0278
Erro puro	0,1695	3	0,0565			
Total	76,8901	17				

Fonte: Autoria própria.

APÊNDICE B

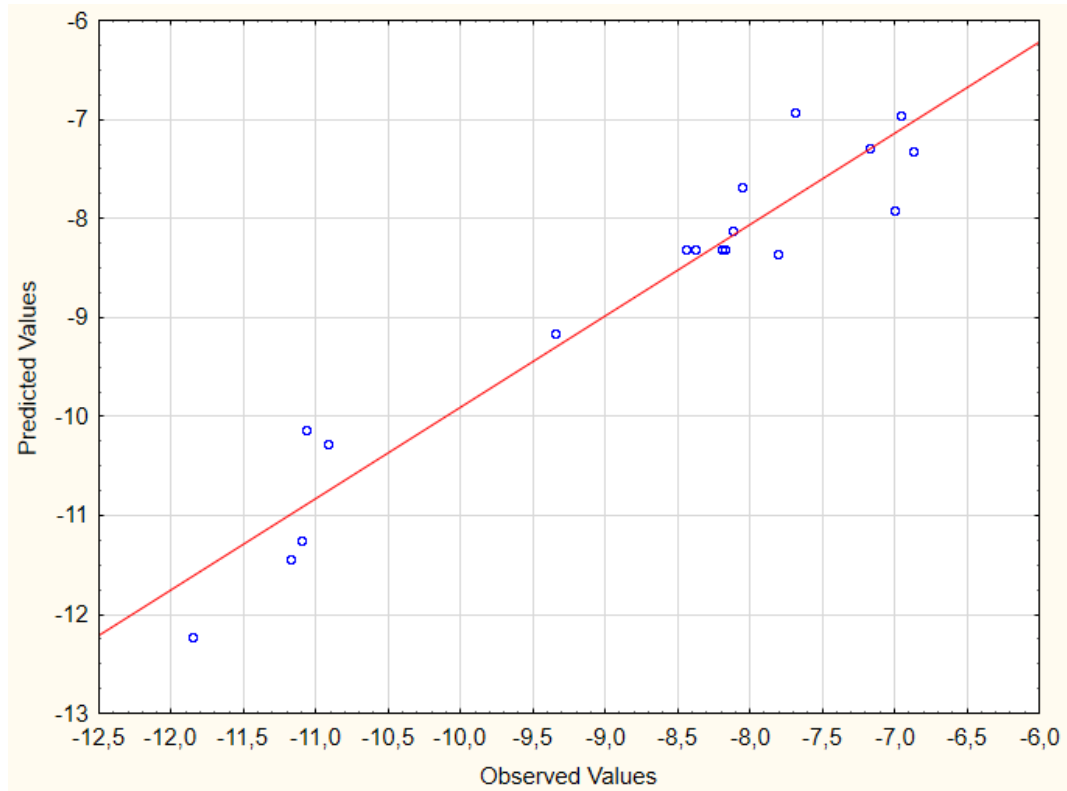
Nas Figuras 12 a 15 são apresentados os gráficos que relacionam os valores previstos e observados para as diferentes condições avaliadas por meio do planejamento experimental. Os gráficos referem-se aos modelos utilizados na otimização da extração e encapsulação simultânea dos curcuminóides.

Figura 12 - Gráfico dos valores previstos e observados, referente ao modelo obtido para a resposta percentual de extração dos curcuminóides totais.



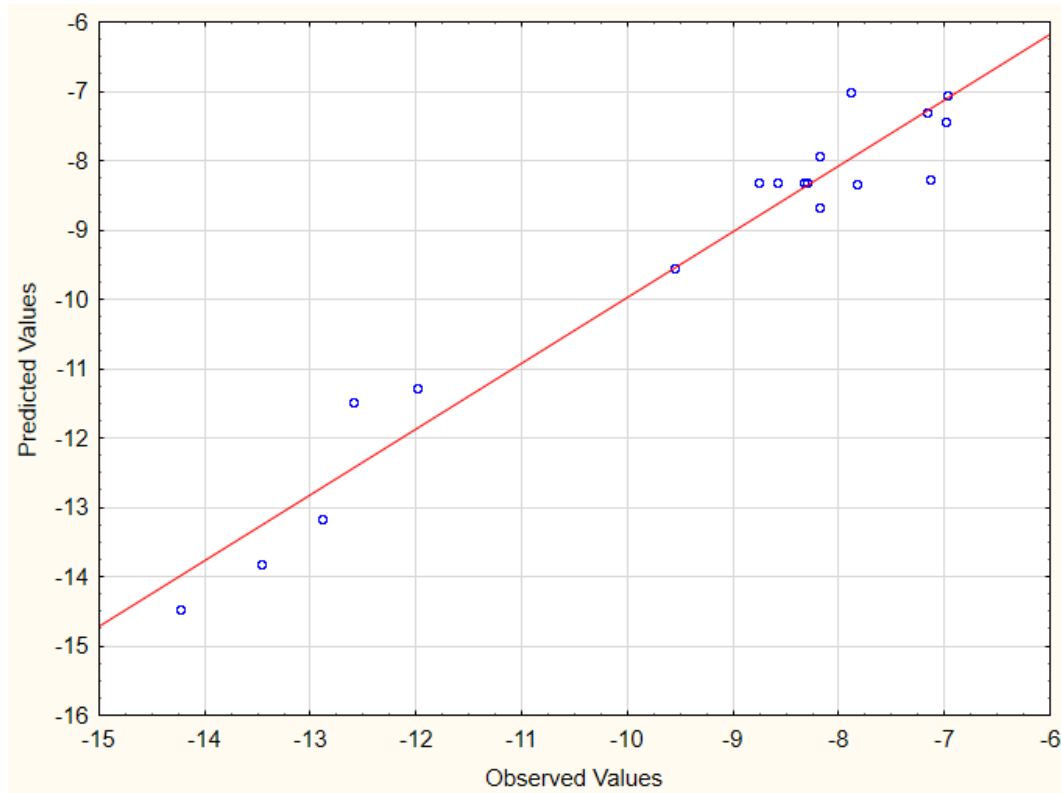
Fonte: Autoria própria.

Figura 13 - Gráfico dos valores previstos e observados, referente ao modelo obtido para a resposta solubilidade em água da bisdemetoxicurcumina.



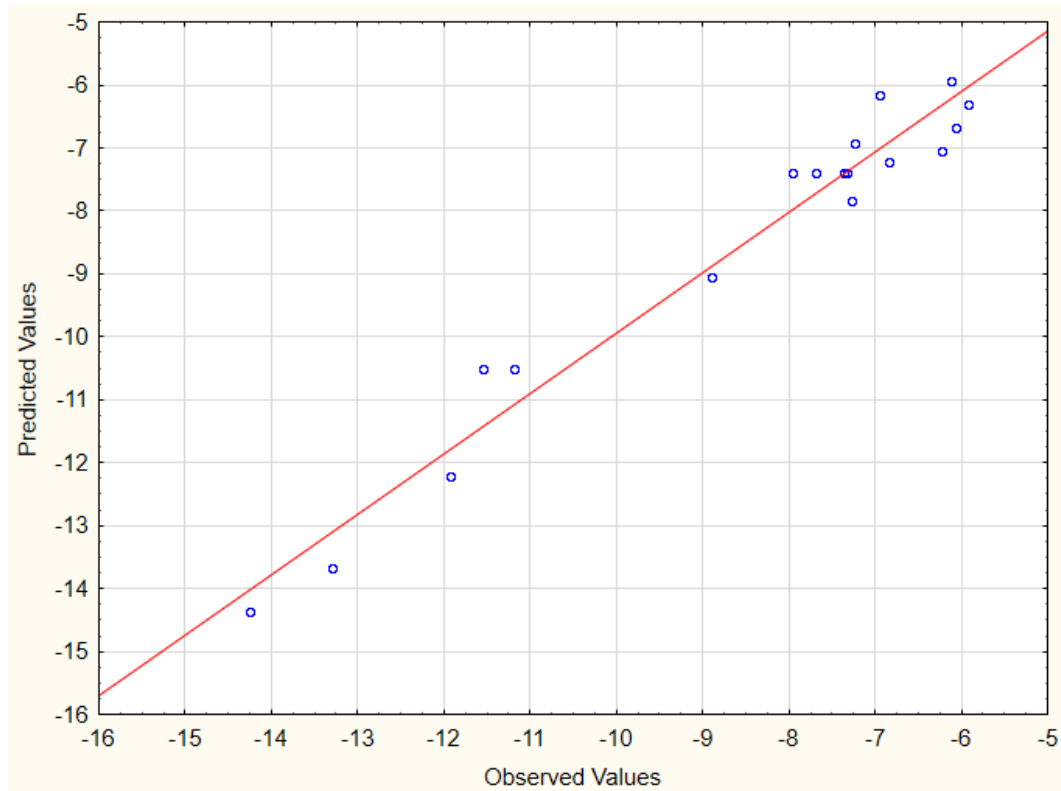
Fonte: Autoria própria.

Figura 14 - Gráfico dos valores previstos e observados, referente ao modelo obtido para a resposta solubilidade em água da demetoxicurcumina.



Fonte: Autoria própria.

Figura 15 - Gráfico dos valores previstos e observados, referente ao modelo obtido para a resposta solubilidade em água da curcumina.

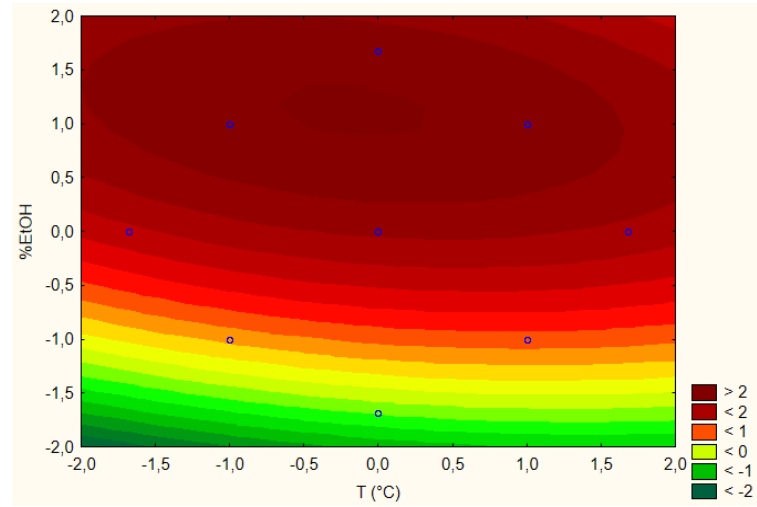


Fonte: Autoria própria.

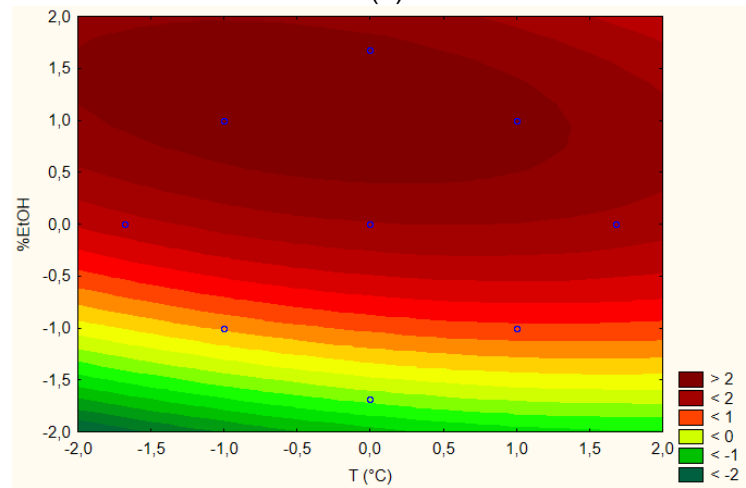
APÊNDICE C

Nas Figuras 16 a 21 são apresentados os gráficos de contorno obtidos para as respostas percentual de extração e solubilidade em água dos pigmentos curcuminóides, diante das variáveis temperatura, percentual de etanol no solvente e massa de encapsulante PVP.

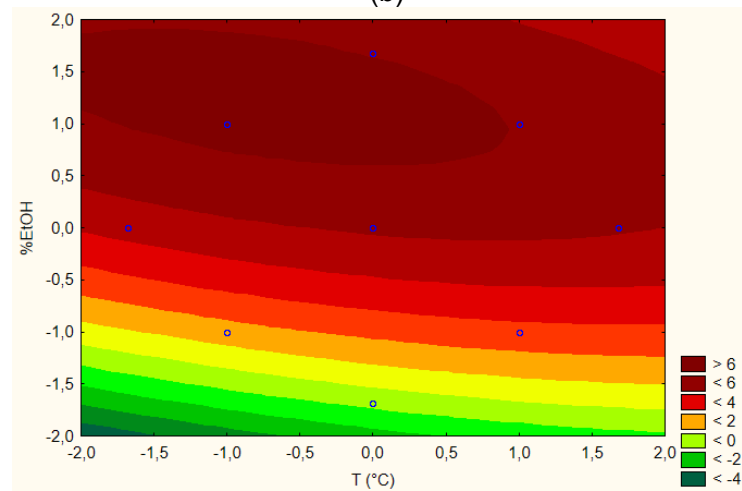
Figura 16 – Gráficos de contorno relacionando as variáveis temperatura e percentual de etanol no solvente, para a resposta percentual de extração dos compostos: a) bisdemetoxicurcumina; b) demetoxicurcumina; e c) curcumina.



(a)



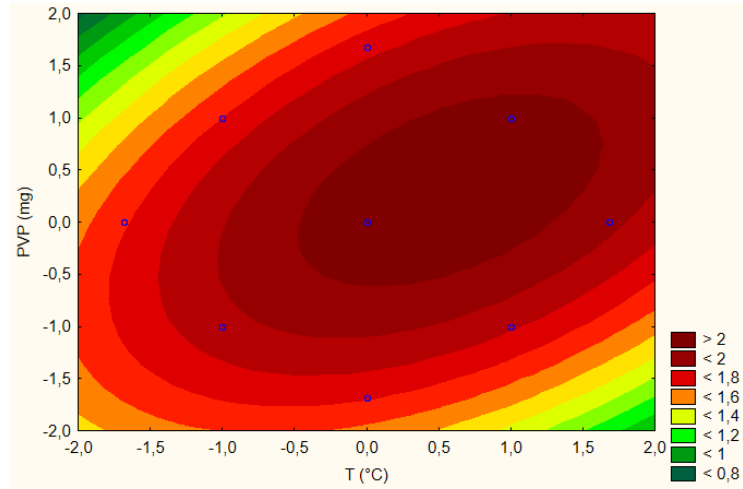
(b)



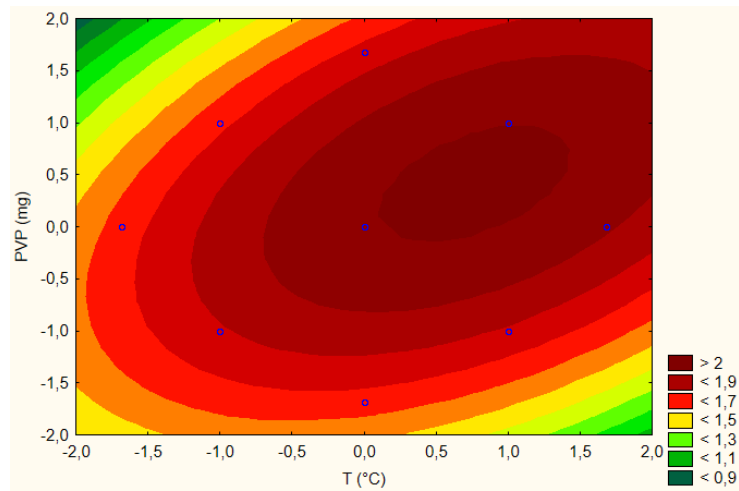
(c)

Fonte: Autoria própria.

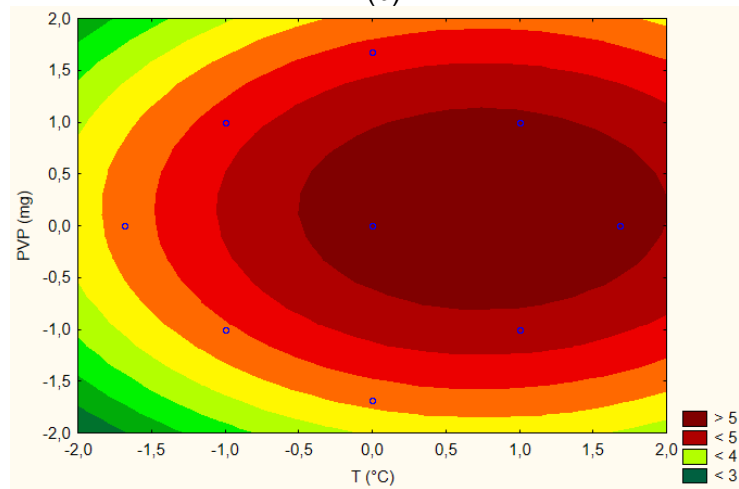
Figura 17 – Gráficos de contorno relacionando as variáveis temperatura e massa de PVP, para a resposta percentual de extração dos compostos: a) bisdemetoxicurcumina; b) demetoxicurcumina; e c) curcumina.



(a)



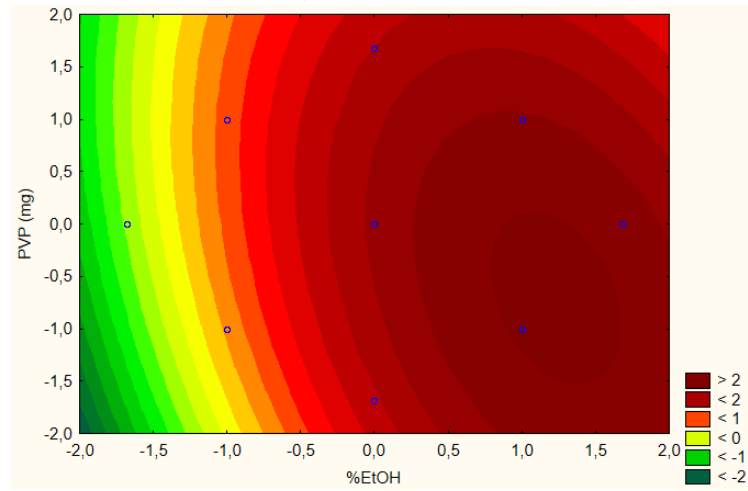
(b)



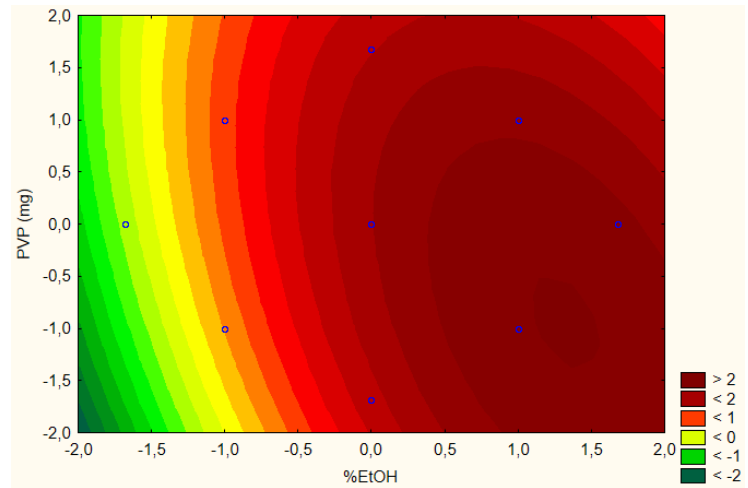
(c)

Fonte: Autoria própria.

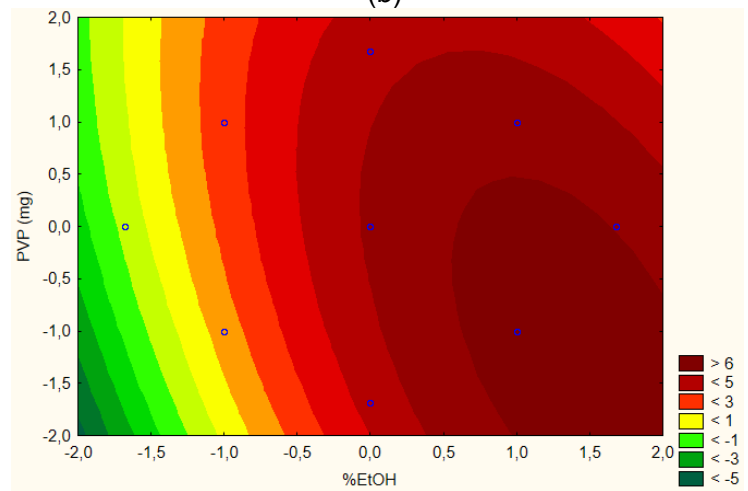
Figura 18 – Gráficos de contorno relacionando as variáveis percentual de etanol no solvente e massa de PVP, para a resposta percentual de extração dos compostos: a) bisdemetoxicurcumina; b) demetoxicurcumina; e c) curcumina.



(a)



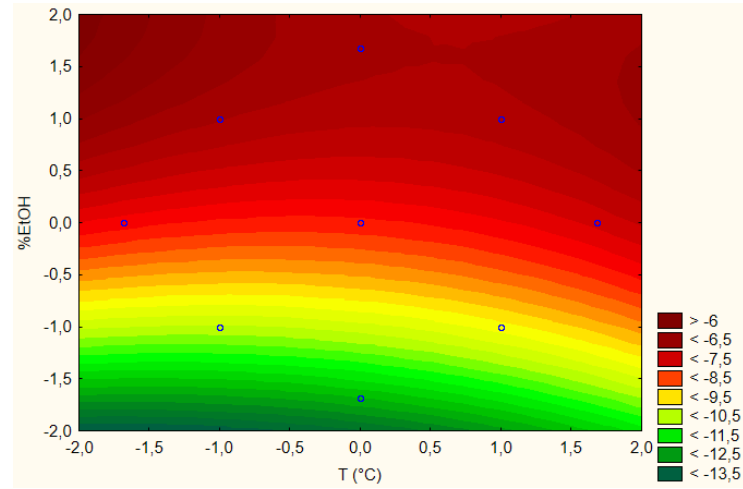
(b)



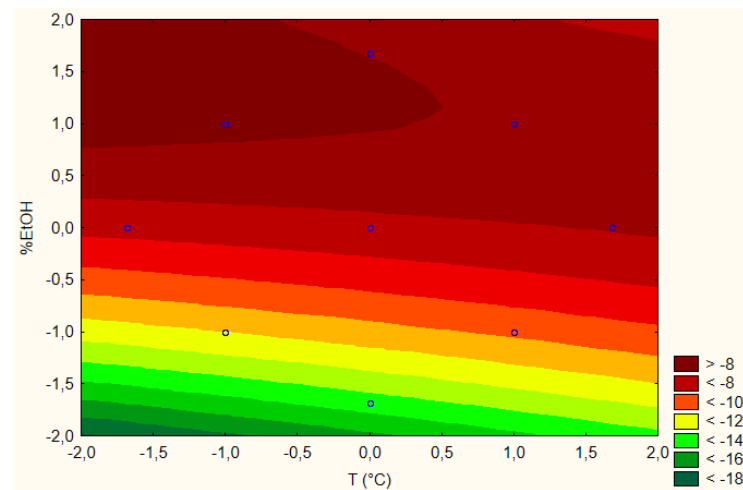
(c)

Fonte: Autoria própria.

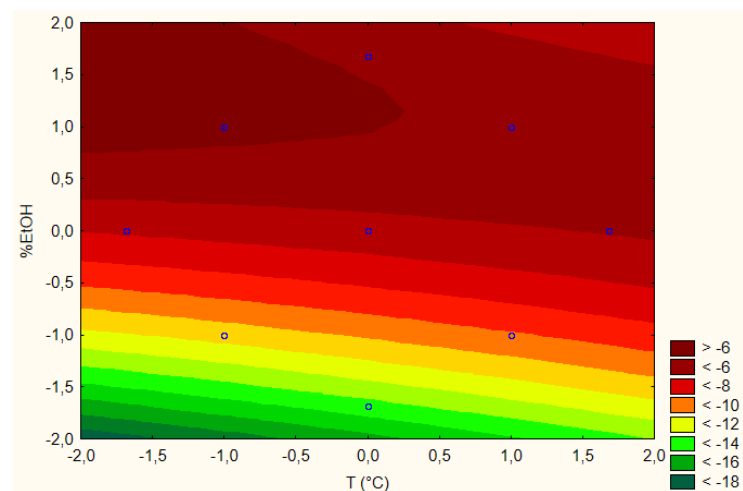
Figura 19 – Gráficos de contorno relacionando as variáveis temperatura e percentual de etanol no solvente, para a resposta solubilidade em água (em logaritmo natural) dos compostos: a) bisdemetoxicurcumina; b) demetoxicurcumina; e c) curcumina.



(a)



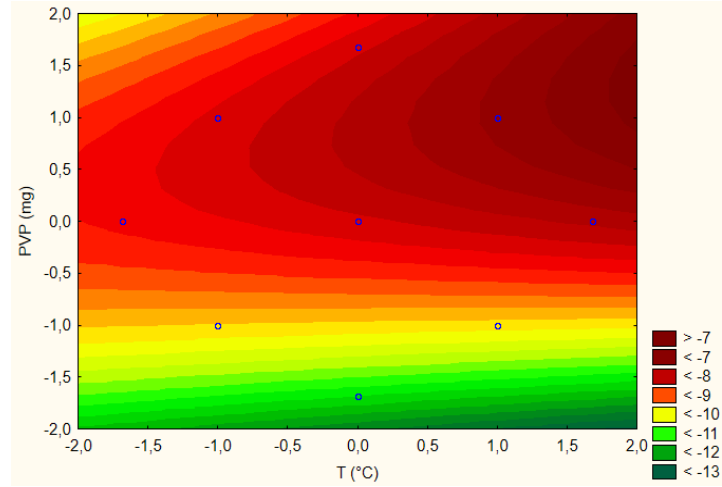
(b)



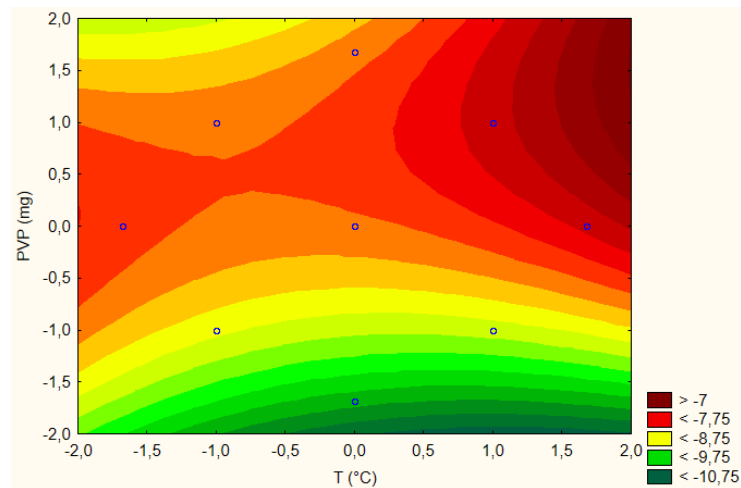
(c)

Fonte: Autoria própria.

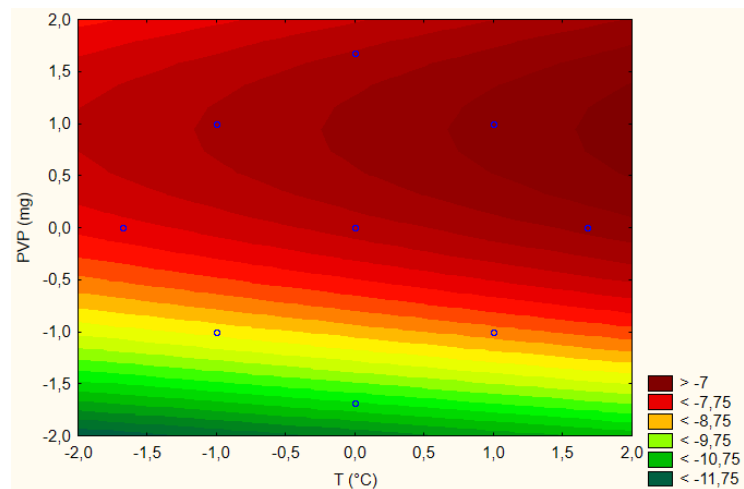
Figura 20 – Gráficos de contorno relacionando as variáveis temperatura e massa de PVP, para a resposta solubilidade em água (em logaritmo natural) dos compostos: a) bisdemetoxicurcumina; b) demetoxicurcumina; e c) curcumina.



(a)



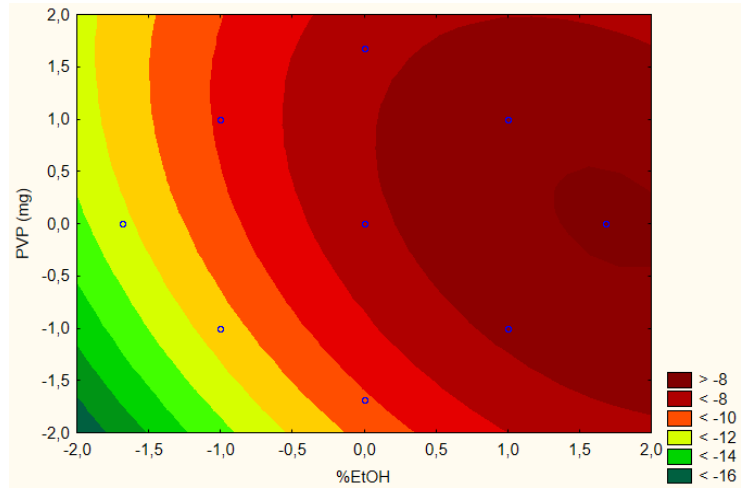
(b)



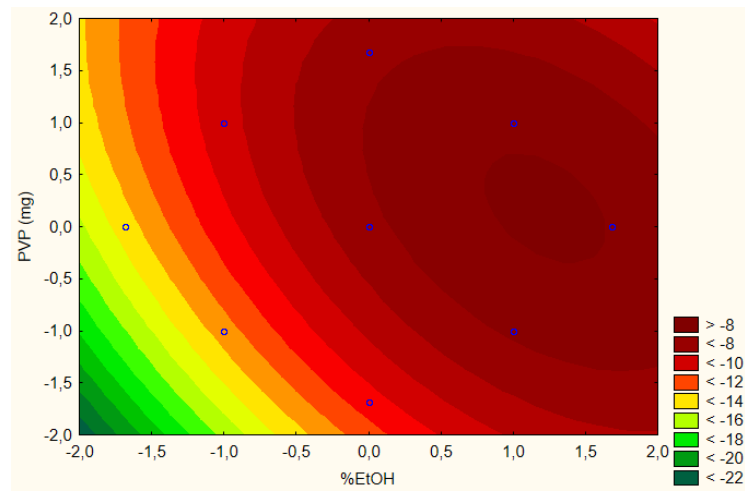
(c)

Fonte: Autoria própria.

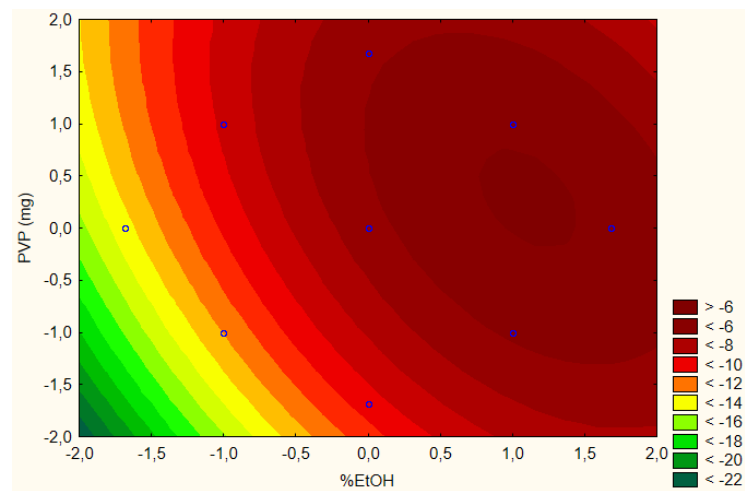
Figura 21 – Gráficos de contorno relacionando as variáveis percentual de etanol no solvente e massa de PVP, para a resposta solubilidade em água (em logaritmo natural) dos compostos: a) bisdemetoxicurcumina; b) demetoxicurcumina; e c) curcumina.



(a)



(b)



(c)

Fonte: Autoria própria.