



**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA
FEDERAL DO PARANÁ**
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de
Alimentos

**Nanoencapsulação de curcumina em polímeros
biodegradáveis/biocompatíveis**

Rosana Aparecida da Silva Buzanello

Campo Mourão/Medianeira

2013

Rosana Aparecida da Silva Buzanello

**Nanoencapsulação de curcumina em polímeros
biodegradáveis/biocompatíveis**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Campo Mourão/Medianeira

2013



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos



TERMO DE APROVAÇÃO

NANOENCAPSULAÇÃO DE CURCUMINA EM POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS/BIOCOMPATÍVEIS

Por

ROSANA APARECIDA DA SILVA BUZANELLO

Essa dissertação foi apresentada às 14 horas, do dia 25 de março de 2013, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Linha de Pesquisa Ciência e Tecnologia de Produtos Alimentícios, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi argüida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dr. Odinei Hess Gonçalves (Orientador)

Prof. Dra. Rafaelle Bonzanini Romero (Membro Externo)

Prof. Dr. Lucio Cardozo Filho (Membro Externo)

Prof. Dr. Nilson Evelazio de Souza (Membro Externo)

O Termo de Aprovação assinado encontra-se no Programa do Curso.

Orientador
Professor Dr. Odinei Hess Gonçalves

Co-orientadora
Professora Dra. Fernanda Vitória Leimann

AGRADECIMENTOS

Ao meu esposo Alexandre Buzanello e familiares, pelo amor, paciência e apoio em todos os momentos.

Aos meus orientadores Prof. Odinei Hess Gonçalves e Prof.^a Fernanda Vitória Leimann, pela oportunidade de desenvolvimento deste projeto, principalmente pelo apoio, carinho, dedicação e conhecimento.

Ao Prof. Lucio Cardozo Filho, da Universidade Estadual de Maringá, pela parceria ao projeto disponibilizando a curcumina para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Universidade Federal de Santa Catarina, em especial ao Laboratório de Controle de Processos (LCP), pelos recursos disponibilizados para determinação dos tamanhos das partículas e a Luana Becker Peres pela realização destas análises.

Aos alunos de iniciação científica Mateus Ferreira de Souza, Ana Caroline Ferro e Karine Cristine Kaufmann pela dedicação e auxílio em todas as atividades desenvolvidas.

A CAPES e CNPq pela concessão de bolsas de estudo.

RESUMO

A curcumina tem potencial para substituir corantes artificiais considerados nocivos à saúde humana, contudo sua aplicação industrial se torna um desafio devido à sua sensibilidade frente a agentes externos e sua baixa solubilidade em água. O processo de nanoencapsulação em polímeros biodegradáveis e biocompatíveis é uma alternativa promissora para viabilizar a utilização da curcumina. Neste trabalho, a técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente foi utilizada para obtenção de nanopartículas de polímeros biodegradáveis/biocompatíveis (poli(L-ácido láctico) (PLLA) e Eudragit S100 (poli(metacrilato de metila-co-ácido metacrílico)) contendo curcumina. Um planejamento fatorial completo (2^k) para quatro variáveis experimentais foi realizado a fim de avaliar o diâmetro médio e índice de polidispersão de tamanhos das nanopartículas de PLLA sem adição da curcumina. Os resultados demonstram a existência de interações complexas entre as variáveis avaliadas e que, de um modo geral, a polidispersão de tamanhos é menos sensível às mudanças nas condições experimentais do que o diâmetro médio. A metodologia de quantificação por espectrofotometria UV-Vis foi avaliada quanto às figuras de mérito em relação à linearidade, especificidade, exatidão, precisão e limites de detecção e quantificação. Os estudos de validação possibilitaram garantir com segurança os resultados obtidos para os valores de recuperação percentual e de eficiência de encapsulação da curcumina nas nanopartículas. Para a nanoencapsulação da curcumina, foi avaliada a influência da concentração de curcumina, do tipo de surfatante e dos polímeros encapsulantes (PLLA e Eudragit S100) sobre a morfologia das nanopartículas, eficiência de encapsulação e a recuperação percentual, parâmetro este que mede a perda de curcumina durante o processo de encapsulação. A adição de curcumina acima de 3%_{massa} levou a menores recuperações percentuais, contudo sem prejudicar a eficiência de encapsulação. O uso de lecitina de soja, um surfatante biocompatível, levou a eficiências de encapsulação superiores do que quando comparado com o lauril sulfato de sódio. Da mesma forma, a recuperação de curcumina diminuiu quando foi utilizado Eudragit S100 em comparação ao PLLA, possivelmente devido à baixa interação entre os grupos polares de ácido metacrílico e a curcumina. As análises de espectroscopia de infravermelho e de calorimetria diferencial de varredura sugeriram que a curcumina foi encapsulada no interior das nanopartículas e se encontram dispersas na matrix polimérica em sua forma amorfa. O processo de miniemulsificação/evaporação do solvente se mostrou uma técnica robusta para a obtenção de nanopartículas contendo curcumina já que altos valores de eficiência de encapsulação foram encontrados para diferentes condições experimentais.

Palavras-chave: Curcumina. Nanopartículas. Miniemulsificação. Polímeros. Ultrassom. Poli(ácido láctico). PLLA.

ABSTRACT

Curcumin can potentially substitute synthetic dyes considered harmful to human health. However, its susceptibility to external agents and very low water solubility turn its industrial application into a challenge. The nanoencapsulation of curcumin in biocompatible, biodegradable polymers is a promising alternative to enable the use of curcumin. In this work, the miniemulsification/solvent evaporation technique was used to obtain nanoparticles composed by biodegradable/biocompatible polymers (poly(L-lactic acid) (PLLA) and Eudragit S100 (poly(methyl methacrylate-co-methacrylic acid))) containing curcumin. A full factorial experimental design (2^k) to four variables was carried to evaluate the Z-average diameter and polydispersity index of PLLA nanoparticles without curcumin. Results demonstrated the existence of complex relationships between the experimental variables and also that the polydispersity index is less sensitive to the change in the experimental conditions than the particles diameter. The methodology for quantification by UV-Vis spectrophotometry was evaluated in respect to the figures of merit: linearity, specificity, accuracy, precision and limits of detection and quantification. Curcumin recovery and the encapsulation efficiency can be safely determined by this methodology. The curcumin nanoencapsulation was studied and the influence of curcumin concentration, type of surfactant and the encapsulant polymers (PLLA and Eudragit S100) on the nanoparticles morphology, encapsulation efficiency and curcumin recovery (defined as the lost of curcumin during the encapsulation process) were evaluated. The addition of curcumin above 3%_{weight} led to low recovery values but there was no effect on the encapsulation efficiency. The use of soybean lecithin a biocompatible surfactant led to encapsulation efficiencies higher than when sodium lauryl sulfate was used. Similarly, the curcumin recovery decreased when Eudragit S100 were used probably due to the low interaction between the polar groups of methacrylic acid and curcumin. Infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry strongly suggested that curcumin was encapsulated within the nanoparticles and is dispersed in the polymer matrix in as amorphous state. Results demonstrated that miniemulsification/solvent evaporation is a robust technique to obtain nanoparticles containing curcumin since high encapsulation efficiencies were achieved for different experimental conditions.

Keywords: Curcumin. Nanoparticles. Miniemulsification. Ultrasonnd. Poly(lactic acid). PLLA.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 4.....	7
Figura 1 – Representação esquemática da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente.....	8
Figura 2 – Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para o diâmetro médio das nanopartículas.....	17
Figura 3 – Gráfico dos valores observados versus valores preditos.....	18
Figura 4 – Gráfico normal dos resíduos.....	19
Figura 5 – Curva de contorno (a) e superfície de resposta (b) para a variação de <i>hold-up</i> versus concentração de PLLA.....	20
Figura 6 – Curva de contorno (a) e superfície de resposta (b) para a variação de <i>hold-up</i> versus variação da concentração de lecitina.....	21
Figura 7 – Curva de contorno (a) e superfície de resposta (b) para a variação da concentração de lecitina versus a concentração de PLLA.....	22
Figura 8 – Curva de contorno (a) e superfície de resposta (b) para a variação da concentração de PLLA versus fração de solvente.....	22
Figura 9 – Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para os valores de índice de polidispersão (IPD) de tamanhos das nanopartículas.....	25
Figura 10 – Gráfico dos valores observados versus valores preditos.....	26
Figura 11 – Gráfico normal de resíduos.....	26
Figura 12 – Curva de contorno (a) e superfície de resposta (b) para a variação de <i>hold-up</i> versus concentração de PLLA.....	27
Figura 13 – Curva de contorno (a) e superfície de resposta (b) para a variação de <i>hold-up</i> versus concentração de lecitina.....	28
Figura 14 – Curva de contorno (a) e superfície de resposta para a variação de <i>hold-up</i> versus a fração de solvente.....	28
Figura 15 – Curva de contorno (a) e superfície de resposta (b) para variação da fração de solvente versus a concentração de PLLA.....	29
Figura 16 – Curva de contorno (a) e superfície de resposta (b) para variação da concentração de lecitina versus a concentração de PLLA.....	30

CAPÍTULO 5.....	32
Figura 1 – Espectros UV-Vis para (a) curcumina pura, (b) lecitina de soja e (c) nanopartículas de PLLA.....	40
Figura 2 – Curvas de calibração padrão da curcumina.....	42
Figura 3 – Relação entre os valores observados e preditos para curva de calibração da curcumina.....	42
Figura 4 – Gráfico dos resíduos para os valores de absorvância preditos.....	43
Figura 5 – Teste de dispersão das nanopartículas (a) de PLLA puro, (b) de PLLA contendo curcumina (3% _{massa}) e (c) curcumina pura (5 mg em 10 mL de água destilada).....	48
CAPÍTULO 6.....	50
Figura 1 – Estrutura química dos principais componentes utilizados.....	54
Figura 2 – Representação esquemática da obtenção das nanopartículas de curcumina encapsulada em PLLA utilizando surfatante hidrofílico.....	56
Figura 3 – Absorbâncias da curcumina em clorofórmio (a, b) na presença e (c, d) ausência de luz ambiente.....	60
Figura 4 – Absorbâncias da curcumina em diclorometano (a, b) na presença e (c, d) ausência de luz ambiente.....	61
Figura 5 – Absorbâncias da curcumina em PLLA e diclorometano na presença de luz.....	62
Figura 6 – Absorbâncias da curcumina em Eudragit S100 e diclorometano na presença de luz.....	62
Figura 7 – Termogramas da curcumina, das nanopartículas de PLLA e das nanopartículas de PLLA contendo 3% _{massa} de curcumina.....	70
Figura 8 – Termograma da curcumina, do Eudragit S100 e das nanopartículas de Eudragit S100.....	71
Figura 9 – Termograma da curcumina, do Eudragit S100, e das nanopartículas de PLLA e das nanopartículas de PLLA : Eudragit S100 (1:1 m/m).....	71
Figura 10 - Termograma das nanopartículas de PLLA : Eudragit S100 (1:1 m/m), PLLA e Eudragit S100.....	73
Figura 11 – Micrografias das nanopartículas de PLLA contendo 1% _{massa} de curcumina.....	75

Figura 12 – Micrografias das nanopartículas de PLLA:Eudragit S100 (1:1 m/m) contendo 3% _{massa} de curcumina.....	76
Figura 13 – Espectros FTIR dos compostos utilizados na obtenção de nanopartículas de curcumina.....	77
Figura 14 – Espectros FTIR da curcumina, das nanopartículas de PLLA e das nanopartículas de PLLA contendo 3% _{massa} de curcumina.....	79
Figura 15 – Espectros FTIR da curcumina e das nanopartículas de PLLA:Eudragit S100 (1:1) contendo 3% _{massa} de curcumina.....	80

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 4	7
Tabela 1 – Níveis e fatores das variáveis do planejamento experimental.....	14
Tabela 2 – Matriz para o planejamento experimental com valores codificados.....	14
Tabela 3 – Respostas do planejamento experimental: diâmetro médio (D_z) e índice de polidispersão (IDP) para os fatores X1, X2, X3 e X4.....	16
Tabela 4 – Análise de variância para o diâmetro médio das nanopartículas.....	16
Tabela 5 – Efeitos estimados e valor de p para o diâmetro médio das nanopartículas.....	17
Tabela 6 – Análise de variância para o índice de polidispersão das nanopartículas.....	24
Tabela 7 – Efeitos estimados e valor de p para o IPD das nanopartículas.....	24
CAPÍTULO 5	32
Tabela 1 – Formulações das nanopartículas de curcumina encapsulada em PLLA para validação analítica da determinação de curcumina.....	37
Tabela 2 – Absorbância das soluções de curcumina com concentrações de 0,040 mg/mL a 0,004 mg/mL.....	41
Tabela 3 – Análise de variância para os resultados das curvas de calibração padrão.....	43
Tabela 4 – Estudo da exatidão para validação do método analítico de determinação de curcumina.....	44
Tabela 5 – Estudo dos níveis de precisão (precisão intermediária, repetibilidade e reprodutibilidade com o mesmo analista em laboratórios diferentes) para validação do método analítico de determinação da curcumina.....	45
Tabela 6 – Estudo dos níveis de precisão (precisão intermediária, repetibilidade e reprodutibilidade com analistas diferentes em um mesmo laboratório) para validação do método analítico de determinação da curcumina.....	45
Tabela 7 – Diâmetro médio, índice de polidispersão de tamanhos, recuperação percentual e eficiência de encapsulação obtidos.....	47

CAPÍTULO 6.....	50
Tabela 1 – Formulações empregadas nos experimentos.....	64
Tabela 2 – Valores de diâmetro médio (D_z) e índice de polidispersão (IPD) de tamanhos.....	64
Tabela 3 – Valores de recuperação percentual e eficiência de encapsulação para as amostras de curcumina nanoencapsulada com diferentes concentrações de curcumina.....	64
Tabela 4 – Formulações empregadas nos experimentos.....	66
Tabela 5 – Valores de diâmetro médio (D_z) e índice de polidispersão (IPD) de tamanhos.....	66
Tabela 6 – Valores de recuperação percentual e eficiência de encapsulação para as nanopartículas contendo curcumina em função da variação de surfatante.....	67
Tabela 7 – Formulações empregadas nos experimentos.....	68
Tabela 8 – Valores de diâmetro médio (D_z) e índice de polidispersão (IPD) de tamanhos.....	68
Tabela 9 – Valores de recuperação percentual e eficiência de encapsulação curcumina em relação ao agente encapsulante.....	69
Tabela 10 – Temperaturas de fusão e cristalinidade do PLLA nas diferentes condições experimentais.....	73
Tabela 11 – Grupamentos e bandas características da curcumina.....	78
Tabela 12 – Grupamentos e bandas características do PLLA.....	78
Tabela 13 – Grupamentos e bandas características do Eudragit S100.....	78
Tabela 14 – Grupamentos e bandas características da lecitina.....	79

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	2
2 OBJETIVOS	5
2.1 OBJETIVO GERAL	5
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
3 APRESENTAÇÃO	6
4 OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE POLI(L-ÁCIDO LÁTICO) (PLLA) PELA TÉCNICA DE MINIEMULSIFICAÇÃO: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS EXPERIMENTAIS	7
4.1 INTRODUÇÃO	7
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	11
4.2.1 MATERIAL	11
4.2.2 POLIMERIZAÇÃO DE L-LACTÍDEO	11
4.2.3 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PLLA.....	12
4.2.4 CARACTERIZAÇÃO	12
4.2.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	13
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
4.3.1 DIÂMETRO MÉDIO EM INTENSIDADE (DZ)	16
4.3.1.1 Análise das superfícies de resposta e curvas de contorno.....	19
4.3.2 ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO DE TAMANHOS	23
4.3.2.1 Análise das superfícies de resposta e curvas de contorno: Índice de polidispersão	27
4.4 CONCLUSÕES	30
5 VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA- VISÍVEL (UV-VIS) PARA A DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE CURCUMINA NANOENCAPSULADA EM POLI(L-ÁCIDO LÁTICO)	32
5.1 INTRODUÇÃO	32
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	34
5.2.1 MATERIAL	34
5.2.2. ESTUDO DE VALIDAÇÃO.....	34

5.2.2.1 Linearidade.....	34
5.2.2.2 Limite de Detecção (LOD)	35
5.2.2.3 Limite de Quantificação (LOQ)	35
5.2.2.4 Precisão	36
5.2.3.5 Exatidão (método de recuperação)	36
5.2.4 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE CURCUMINA ENCAPSULADA EM PLLA	37
5.2.5 ESPECIFICIDADE	37
5.2.6 DETERMINAÇÃO DA RECUPERAÇÃO PERCENTUAL DE CURCUMINA	38
5.2.7 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO	39
5.2.8 DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHOS DAS NANOPARTÍCULAS.....	39
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.3.1 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA	40
5.3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	46
5.4 CONCLUSÕES	48
6 ENCAPSULAÇÃO DE CURCUMINA	50
6.1 INTRODUÇÃO	50
6.2 MATERIAL E MÉTODOS	53
6.2.1 REAGENTES	53
6.2.2 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	55
6.2.2.1 Procedimento 1: Lecitina (surfatante lipofílico) e PLLA (encapsulante).....	55
6.2.2.2 Procedimento 2: SLS (surfatante hidrofílico) e PLLA (encapsulante).....	55
6.2.2.3 Procedimento 3: Surfatante lipofílico (lecitina) e PLLA:Eudragit S100 (encapsulantes).....	56
6.2.3 DETERMINAÇÃO DA RECUPERAÇÃO PERCENTUAL DE CURCUMINA E DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO	56
6.2.4 DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHOS DAS NANOPARTÍCULAS.....	57
6.2.5 ENSAIOS DE ESTABILIDADE DA CURCUMINA POR UV-VIS	57
6.2.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	58
6.2.7 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	58
6.2.8 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA	58

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
6.3.1 ESTABILIDADE DA CURCUMINA.....	59
6.3.2 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE CURCUMINA.....	63
6.3.3 INFLUÊNCIA DO SURFATANTE: LAURIL SULFATO DE SÓDIO (SLS) E LECITINA DE SOJA.....	66
6.3.4 INFLUÊNCIA DO ENCAPSULANTE: EUDRAGIT S100 E PLLA.....	67
6.3.5 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC).....	70
6.3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	74
6.3.7 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO.....	77
6.4 CONCLUSÕES.....	80
7 CONCLUSÕES GERAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

1 INTRODUÇÃO

A curcumina, composto fitoquímico de cor amarelo-alaranjada, é uma estrutura polifenólica de baixa massa molar isolada a partir do rizoma do açafrão (*Curcuma longa*). É um diferuloilmetano, sendo uma molécula lipofílica com vários grupos fenólicos e duplas ligações conjugadas (SONG *et al.*, 2011). Diversos estudos têm comprovado sua baixa toxicidade intrínseca e grande variedade de efeitos terapêuticos como a sua atividade antioxidante, antiinflamatória, antimicrobiana, propriedades antitumorais, atividade hepato e nefro protetora; efeito sobre células imunitárias (linfócitos T, linfócitos B, macrófagos, células dendríticas e outras) atividade contra o Alzheimer e a AIDS (AGGARWAL; KUMAR; BHARTI, 2003; MAHESHWARI *et al.*, 2006; AGGARWAL *et al.*, 2007; AK e GÜLÇİN, 2008; HATCHER *et al.*, 2008; PARI; TEWAS; ECKEL, 2008; GILDA *et al.*, 2010; ANITHA *et al.*, 2011).

Apesar do crescente interesse da comunidade científica nas propriedades da curcumina, suas aplicações ainda são limitadas devido à sua baixa solubilidade em água e sensibilidade frente a condições alcalinas, tratamento térmico, luz, íons metálicos, enzimas, ácido ascórbico, dentre outros (LIN *et al.*, 2009; PARAMERA; KONTELES; KARATHANOS, 2011). Segundo Anitha *et al.* (2011), a curcumina pode ser degradada por hidrólise ácida ou alcalina, oxidação e fotodegradação. A decomposição depende do pH com reações mais rápidas de pH neutro e básico. A curcumina é estável a pH inferior a 6,5 (WANG *et al.*, 1997; PFEIFFER *et al.*, 2003). Diversos estudos têm demonstrado que a curcumina apresenta má absorção, metabolismo e eliminação rápidos, resultando em baixa biodisponibilidade (MISHRA; MOHAMMADA; MISHRA, 2008).

Do ponto de vista da alimentação humana, a prática industrial adota o uso de corantes sintéticos devido a sua praticidade, estabilidade e custo. Contudo, tais corantes em geral não são recomendados e seu uso é justificado somente do ponto de vista econômico (PRADO; GODOY, 2003). Como exemplo, o corante amarelo tartrazina (INS 102) é responsável por inúmeros casos de reações alérgicas (asma, bronquite, rinite, dor de cabeça, dentre outros) conforme demonstraram estudos

realizados nos Estados Unidos e Europa (BRASIL, 2007) e seu uso deve ser informado no rótulo dos produtos, por determinação da ANVISA no Brasil e nos EUA pelo *Food and Drug Administration* (FDA). Devido à sua coloração amarela intensa, a curcumina é um candidato para a substituição da tartrazina em escala industrial.

Nesse contexto, a encapsulação da curcumina em polímeros biodegradáveis e/ou biocompatíveis se apresenta como uma alternativa promissora para melhorar suas propriedades tecnológicas e substituir os corantes amarelos sintéticos em escala industrial. Nanopartículas devem apresentar melhores resultados do que micropartículas pois sua grande área superficial pode potencializar a ação corante, além de serem imperceptíveis durante a sua ingestão.

Nanopartículas poliméricas têm sido amplamente estudadas para liberação controlada de compostos e ingredientes alimentícios encapsulados (MADENE *et al.*, 2006) e sua obtenção consiste na incorporação, absorção ou dispersão de compostos bioativos, os quais se desejam proteger, em pequenas estruturas com diâmetros em escala nanométrica (ANTON; BENOIT; SAUNIER, 2008; GARCÍA; FORBE; GONZALES, 2010). Elas podem ser classificadas como esferas ou cápsulas, de acordo com sua estrutura. Quando o material encapsulado encontra-se disperso no interior da partícula polimérica, essa estrutura é chamada de nanoesfera ou microesfera. No caso das nanocápsulas ou microcápsulas, o material encontra-se em um núcleo líquido confinado pela parede polimérica. Em ambos os casos o material também pode encontrar-se adsorvido na superfície polimérica. O polímero controla a liberação do material e o protege de efeitos nocivos da radiação ultravioleta, umidade e do contato com oxigênio (ANTON; BENOIT; SAUNIER, 2008).

Dos trabalhos disponíveis sobre a curcumina nanoencapsulada (ANAND *et al.*, 2009; BISHT *et al.*, 2007; SONG *et al.*, 2011, ANITHA *et al.*, 2011, DAS *et al.*, 2010; LERTSUTTHIWONG *et al.*, 2008; SHAIKH *et al.*, 2009, GOMEZ-ESTACA *et al.*, 2012; DANDEKAR *et al.*, 2010a) é possível concluir que tanto a técnica de encapsulação quanto o material encapsulante tem grande influência na eficiência de encapsulação e, conseqüentemente, no potencial de aplicação das nanopartículas obtidas. Em geral a curcumina nanoencapsulada apresenta vantagens sobre a curcumina *in natura*, principalmente em relação à solubilidade em água e à sua

biodisponibilidade. Contudo, a grande maioria dos trabalhos se concentra no uso da curcumina em aplicações biomédicas, negligenciando a capacidade da curcumina em substituir os corantes artificiais atualmente utilizados na indústria de alimentos.

Quando o objetivo é obter aditivos alimentares, os materiais encapsulantes devem ser inertes, isentos de impurezas, além de ser biodegradáveis e biocompatíveis, não-carcinogênicos, não alergênicos e não-mutagênicos, devendo causar pouca ou nenhuma resposta imunológica. Outra característica fundamental é a capacidade de aprisionamento de concentrações adequadas e suficientes do composto a ser encapsulado (URBAN; MUSYANOVYCH; LANDFESTER; 2009). Polímeros como o poli(ácido láctico) e o poli(metacrilato de metila-co-ácido metacrílico) (conhecido pelo nome comercial Eudragit S100) são candidatos para o uso como encapsulantes de aditivos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter curcumina encapsulada em nanopartículas utilizando polímeros biocompatíveis como o poli(L-ácido lático) (PLLA) e poli(metacrilato de metila-co-ácido metacrílico) (Eudragit S100) pela técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito de parâmetros experimentais na distribuição de tamanhos das nanopartículas através de planejamento experimental fatorial;
- Validar a metodologia analítica utilizada para quantificação de curcumina em nanopartículas de PLLA;
- Avaliar a influência de parâmetros experimentais como concentração de curcumina, tipo de surfatante e proporção de polímeros (Eudragit S100 e PLLA) sobre as propriedades das nanopartículas (tamanho, eficiência de encapsulação e morfologia);
- Caracterizar as nanopartículas de curcumina pelas técnicas de: Calorimetria Diferencial de Varredura, Espectrofotometria no Infravermelho e Microscopia Eletrônica de Transmissão.

3 APRESENTAÇÃO

Esta Dissertação encontra-se dividida nos seguintes capítulos:

Nos Capítulos 1, 2 e 3 são apresentados uma introdução geral ao trabalho, seus objetivos e a forma de apresentação, respectivamente.

O Capítulo 4 apresenta os resultados sobre a influência de parâmetros experimentais sobre a distribuição de tamanhos das nanopartículas de poli(L-ácido láctico) obtidas pela técnica de miniemulsificação/evaporação de solvente.

Um parâmetro importante na encapsulação é a eficiência do processo de encapsulação, ou seja, quanto material foi efetivamente incorporado nas nanopartículas. A validação da técnica de espectrofotometria ultravioleta-visível (UV-VIS) para a determinação quantitativa de curcumina nanoencapsulada é apresentada no Capítulo 5.

Finalmente, os experimentos de encapsulação da curcumina e caracterização da dispersão final são apresentados no Capítulo 6. As conclusões gerais do trabalho bem como sugestões para trabalhos futuros fazem parte do Capítulo 7. Em seguida são listadas as referências bibliográficas.

CAPÍTULO 4

OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE POLI(L-ÁCIDO LÁTICO) (PLLA) PELA TÉCNICA DE MINIEMULSIFICAÇÃO: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS EXPERIMENTAIS

4.1 INTRODUÇÃO

Há um crescente interesse da comunidade científica no uso de materiais biodegradáveis/biocompatíveis para a encapsulação de aditivos alimentares, pois estes são atóxicos ou podem ser absorvidos pelo organismo. Bendix (1998) comenta que, no caso dos polímeros derivados do ácido lático, estes são degradados no organismo por simples hidrólise da estrutura do éster, produzindo compostos não prejudiciais e não tóxicos. Os produtos de degradação, ou são excretados pelos rins ou, finalmente, eliminados como dióxido de carbono e água através de vias bioquímicas bem conhecidas. Polímeros como o poli(L-ácido lático) podem ser conformados na forma de nanopartículas através de diferentes modos e a seleção da técnica depende da função que o agente encapsulante irá desempenhar, do tamanho desejado das nanopartículas e do meio de liberação (MADENE, *et al.* 2006).

Uma série de técnicas para a obtenção de nanopartículas encontra-se discutida de forma extensiva na literatura, como a emulsificação/evaporação do solvente (GANGRADE e PRICE, 1991; BARAN; ÖZER; HASIRCI, 2002 a,b; REIS *et al.*, 2006; POLETTO *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2007), emulsificação/difusão do solvente (POLETTO *et al.*, 2008), nanoprecipitação (BLOUZA *et al.*, 2006; DONG e FENG, 2006; LEGRAND *et al.*, 2007; MOINARD-CHÉCOT *et al.*, 2008; WEISS-ANGELI *et al.*, 2008), a formação de partículas com fluidos supercríticos (COSTA *et al.*, 2007; FRANCESCHI *et al.*, 2008; PRIAMO *et al.*, 2011), polimerização em miniemulsão (MARIE; LANDFESTER; ANTONIETTI, 2002; ROMIO *et al.*, 2009 a,b; STEINMACHER *et al.*, 2010) e a miniemulsificação/evaporação do solvente (PICH *et*

al., 2006; MUSYANOVYCH *et al.*, 2008; URBAN, MUSYANOVYCH e LANDFESTER, 2009; ZHUANG e HOGEN-ESCH, 2010; LEIMANN *et al.*, 2011).

A técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente vem sendo utilizada para a obtenção de nanopartículas a partir de polímeros pré-formados (EL-AASSER, *et al.*, 1977; VANDERHOFF *et al.*, 1978; VANDERHOFF *et al.*, 1979; BUDHIAN; SIEGEL; WINEY, 2007; MUSYANOVICH *et al.*, 2008; XIE *et al.*, 2011; LEIMANN *et al.*, 2012, *in press*). Numa primeira etapa, o polímero e demais aditivos são adicionados a um solvente orgânico. Em seguida, tal solução é dispersa em água na forma de gotas nanométricas estáveis, com diâmetros na faixa de 1-10 μm utilizando um equipamento de dispersão de alta eficiência, como o sonicador. Numa terceira etapa, o solvente é removido por extração ou evaporação. Com a diminuição da quantidade de solvente nas gotas durante sua remoção, as nanopartículas são formadas em função da diminuição da solubilidade do polímero no solvente e sua consequente precipitação como partículas submicrométricas (PICH *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 2006; MUSYANOVYCH *et al.*, 2008). O surfatante é adicionado na água ou na fase orgânica de acordo com a sua hidrofobicidade. A Figura 1 ilustra a técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente para a encapsulação de um composto hidrofóbico.

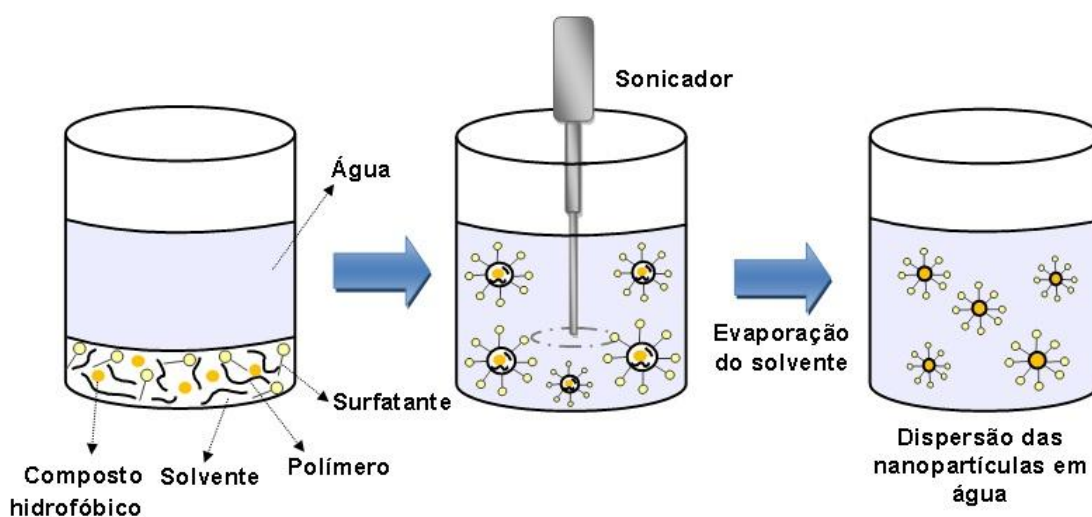


Figura 1 – Representação esquemática da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente. Fonte: Adaptado de Musyanovych *et al.* (2008).

A definição do diâmetro final das nanopartículas pode ser descrito pelo balanceamento das forças de quebra e coalescência das nanogotas durante o processo de obtenção, levando em conta a degradação difusional das gotas de menores tamanhos. Asua (2002) revisou os principais fenômenos envolvidos na formação das nanopartículas quando ultrassom é utilizado como fonte de energia apontando a falta de relações quantitativas relacionando a distribuição final de tamanhos das nanopartículas com as condições experimentais. Contudo, a dependência do tamanho das nanopartículas com parâmetros experimentais vem sendo alvo de estudos. Behrend, Ax e Schubert, (2000) concluíram que a viscosidade da fase contínua não influencia o tamanho das nanogotas formadas durante a sonicação, mas a presença de estabilizantes em sistemas do tipo óleo-em-água leva em geral à diminuição do tamanho médio. Fatores como a fração volumétrica da fase dispersa, potência e tempo de aplicação do ultrassom também foram estudados, demonstrando serem fatores importantes para o tamanho final das nanogotas formadas (ABISMAÏL *et al.*, 1999). A viscosidade da fase dispersa também é importante (VANDERHOFF *et al.*, 1978; MUSYANOVYCH *et al.*, 2008; LEIMANN *et al.*, 2012, *in press*) pois diminui a ocorrência de quebra das nanogotas durante a sonicação. Para um determinado polímero e solvente, a viscosidade da fase dispersa é função principalmente da quantidade de polímero utilizado.

O tamanho médio final e a distribuição de tamanhos das nanopartículas são de grande importância em aplicações como a encapsulação de compostos, tanto para fins de proteção como de liberação modificada, e a influência de parâmetros experimentais sobre essas propriedades deve ser bem conhecida. Leimann *et al.* (2013) demonstraram que a degradação por hidrólise de partículas de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) é fortemente influenciada pelo seu tamanho final devido à variação da área superficial total das mesmas em contato com a fase aquosa.

O tamanho das nanopartículas é influenciado pela energia despendida na dispersão das nanogotas, pelas concentrações e propriedades do polímero e do surfatante, pelo solvente utilizado e pela fração de fase dispersa. Além disso, essas variáveis se relacionam de forma complexa, o que torna necessária a utilização de planejamentos experimentais que levem em conta a interação entre elas. A

metodologia do planejamento fatorial, associada à análise de superfícies de respostas, é uma ferramenta que fornece informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo que envolve as técnicas de tentativa e erro. Experimentos delineados em esquemas fatoriais são aqueles que envolvem combinações entre os níveis de dois ou mais variáveis independentes, chamadas de fatores. Planejamentos fatoriais apresentam uma vantagem incontestável por fornecer o maior número de graus de liberdade para o resíduo (CUNICO *et al.*, 2008; RODRIGUES; IEMA, 2009).

Prakobvaitayakit e Nimmannit (2003) utilizaram um delineamento experimental em um esquema fatorial 2^3 e metodologia da superfície de resposta para avaliar a produção de nanopartículas de poli(ácido láctico)-co-glicólico (PLGA) contendo itraconazol e benzoato de benzila pela técnica de deposição interfacial e deslocamento do solvente. A concentração de PLGA, benzoato de benzila e itraconazol foram as variáveis selecionadas e apresentaram efeito significativo sobre o diâmetro médio das partículas e a eficiência de encapsulação.

Kermabon-Avon, Bressy e Margailan (2009) produziram nanopartículas de poli(metacrilato de metila) (PMMA) pela técnica de polimerização em miniemulsão utilizando hexadecano como co-estabilizador e dodecil sulfato de sódio como surfatante através de um delineamento experimental em dois esquemas fatoriais. As variáveis estudadas em um dos esquemas fatoriais foram a concentração de iniciador, concentração co-estabilizador e concentração de surfatante, em um planejamento fatorial completo 2^3 . No segundo planejamento fatorial completo 2^2 , os autores avaliaram as variáveis tempo de sonicação e amplitude do equipamento. Com os resultados obtidos foi possível estabelecer dois modelos matemáticos que demonstraram a capacidade de prever o diâmetro das partículas, a partir das condições de síntese, com uma precisão de 1-2 nm em um intervalo de 75 a 180 nm.

De uma forma geral, na miniemulsificação/evaporação do solvente os trabalhos experimentais não utilizam planejamentos experimentais na avaliação da distribuição dos tamanhos das nanopartículas. Assim, o efeito das interações entre as variáveis são negligenciados, podendo levar a conclusões incompletas sobre os fenômenos envolvidos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da variação de

parâmetros experimentais sobre o tamanho de nanopartículas de poli(L-ácido láctico) (PLLA) produzidas pela técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente. Foi utilizado um planejamento fatorial completo cujas variáveis foram a composição do solvente da fase orgânica (diclorometano e clorofórmio), a fração mássica da fase orgânica e as concentrações de surfatante e de polímero.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 MATERIAL

L-lactídeo (Purac) e octanoato de estanho (Sigma-Aldrich) foram utilizados para síntese do poli(L-ácido láctico) (PLLA). Clorofórmio (Vetec, 99% de pureza) e metanol (PróQuímicos, 99,5% de pureza) foram utilizados na purificação do PLLA após a síntese. Clorofórmio e diclorometano (Vetec, 99,5% de pureza) foram utilizados como solvente, lecitina de soja (Alfa Aesar) como surfatante e água destilada como meio contínuo na obtenção das nanopartículas.

4.2.2 POLIMERIZAÇÃO DE L-LACTÍDEO

Poli(L-ácido láctico) (PLLA) foi sintetizado através da polimerização por abertura de anel de L-lactídeo utilizando octanoato de estanho como catalisador. L-lactídeo e catalisador ($5.000 \text{ mol}_{\text{L-lactídeo}}/\text{mol}_{\text{cat}}$) foram cuidadosamente adicionados em um vaso reacional e purgados com nitrogênio gasoso durante 40 minutos. Após, vácuo foi aplicado (-400 mmHg) e o vaso foi selado e mantido em um banho de óleo a 120°C. Após 24 horas, este foi imerso em um banho de gelo para parar a reação. Traços de L-lactídeo não reagido foram removidos por dissolução do material em clorofórmio e precipitação em metanol a 10°C. O polímero foi armazenado em embalagem selada a vácuo a -10°C. O PLLA obtido apresentou massa molar média ponderal de 3.800 g/mol e polidispersão de 1,43.

4.2.3 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PLLA

As nanopartículas de PLLA foram produzidas de acordo com o procedimento descrito por Leimann *et al.* (2013) com algumas modificações. A fase orgânica foi preparada dissolvendo-se lecitina de soja e PLLA em clorofórmio/diclorometano por 10 minutos. Em todos os experimentos a fase aquosa consistiu de água destilada, que foi então adicionada sob agitação mecânica por 10 minutos na fase orgânica obtendo-se uma macroemulsão. A miniemulsificação foi realizada em um banho de gelo usando o tempo de sonicação de 180 s e amplitude de 100%, em um regime de pulsos (30 s sonicação, 10 s pausa) usando um equipamento sonicador Fisher-Scientific – Ultrasonic Dismembrator 120 W com ponta de 1/8". Os parâmetros de sonicação foram definidos conforme estudos preliminares (SILVA-BUZANELLO *et al.*, 2011). A miniemulsão foi transferida para um erlenmeyer de 125 mL e mantida sob agitação por 18 h e 40 °C em uma incubadora *shaker* para evaporação do solvente, resultando em uma dispersão das nanopartículas em água. Nos experimentos não foi utilizado um cosurfatante adicional, pois é conhecido que polímeros pré-formados adicionados na fase óleo podem inibir a degradação difusional da miniemulsão durante a preparação das nanopartículas (REIMERS e SHORK, 1996; WANG *et al.*, 1998). Sabe-se que o tamanho das nanopartículas é influenciado pela posição da sonda de ultrassom (MUJUMDAR; SENTHIL; PANDIT, 1997), por isso o sistema experimental foi planejado de forma a manter constante fatores geométricos como a altura e diâmetro do recipiente onde as miniemulsões foram preparadas e a posição da sonda dentro do recipiente.

4.2.4 CARACTERIZAÇÃO

A distribuição de massas molares foi determinada por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) usando tetrahydrofurano como eluente a 1 mL/min e um detector de índice de refração. A curva de calibração foi obtida usando padrões de poliestireno de 580 a 3.800.000 g/mol.

O diâmetro médio em intensidade (D_z) e o índice de polidispersão (IPD) final das nanopartículas foram determinados por espalhamento de luz dinâmico (Malvern

– Zetasizer - Nano Series) com detector a 173° (*backscatter detection*) em amostras sem diluição prévia. Os valores foram calculados partindo-se da análise cumulativa e da distribuição de tamanhos em intensidade aplicando um ajuste multiexponencial em uma função de autocorrelação. O diâmetro médio em intensidade (D_z) foi determinado com base na intensidade da luz dispersa do material assumindo a existência de um tamanho de partícula (MALVERN, 2011).

O índice de polidispersão (IPD) é utilizado em medidas de espalhamento de luz como uma medida indireta da largura da distribuição do tamanho das partículas. Assumindo uma distribuição gaussiana unimodal de tamanhos das nanopartículas, o índice de polidispersão se relaciona com o desvio padrão (σ) e o diâmetro médio em intensidade (D_z) de acordo com a Equação 1 (MALVERN, 2002). Dessa forma, maiores valores de IPD significam distribuições mais largas dos tamanhos das nanopartículas.

$$IPD = \frac{\sigma^2}{D_z^2} \quad (1)$$

4.2.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Um planejamento fatorial completo 2^4 foi aplicado a fim de avaliar os efeitos das seguintes variáveis: fração mássica da fase orgânica, concentração de PLLA, concentração de lecitina e razão de diclorometano e clorofórmio na mistura de solvente orgânico. Os níveis reais e codificados das variáveis estão descritos na Tabela 1 e a Tabela 2 apresenta a matriz de ensaios codificada. As respostas analisadas foram o diâmetro médio de nanopartículas em intensidade (D_z) e índice de polidispersão (IPD).

Tabela 1 – Níveis e fatores das variáveis do planejamento experimental.

	Fatores	Níveis reais e codificados		
		-1	0	1
X1	Fração mássica da fase orgânica <i>hold-up</i> (g/g _{total})	0,180	0,260	0,340
X2	Concentração PLLA (g/g _{solvente})	0,018	0,026	0,034
X3	Concentração Lecitina (g/g _{fase orgânica})	0,020	0,025	0,030
X4	Fração volumétrica CH ₂ Cl ₂ (ml _{CH₂Cl₂} /ml _{CH₂Cl₂+CHCl₃})	0,250	0,500	0,750

Tabela 2 – Matriz para o planejamento experimental com valores codificados.

Experimento	Ordem Aleatória	X1	X2	X3	X4
1	5	-1	-1	-1	-1
2	6	1	-1	-1	-1
3	4	-1	1	-1	-1
4	2	1	1	-1	-1
5	15	-1	-1	1	-1
6	18	1	-1	1	-1
7	12	-1	1	1	-1
8	16	1	1	1	-1
9	1	-1	-1	-1	1
10	8	1	-1	-1	1
11	3	-1	1	-1	1
12	7	1	1	-1	1
13	13	-1	-1	1	1
14	14	1	-1	1	1
15	17	-1	1	1	1
16	11	1	1	1	1
17	9	0	0	0	0
18	10	0	0	0	0

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Há um grande número de fatores que são conhecidos por afetar o tamanho médio das nanopartículas e a sua distribuição de tamanhos obtidos pela técnica de miniemulsificação/evaporação de solvente (ASUA, 2002; MUSYANOVYCH *et al.*, 2008). O número de experimentos aumenta exponencialmente em função do número de fatores avaliados, principalmente se interações de ordem superior entre os mesmos devam ser levadas em consideração.

As variáveis a serem avaliadas no delineamento experimental foram cuidadosamente selecionadas com base na literatura disponível. Embora a potência do sonificador seja uma variável importante no processo de miniemulsificação (BUDHIAN; SIEGEL; WINEY, 2007) estudos preliminares mostraram que as miniemulsões não se apresentaram estáveis quando foi utilizada potência inferior a 100%, provavelmente devido à baixa potência do gerador de ultrassom disponível (120 W). As variáveis concentração de PLLA e fração mássica da fase orgânica foram selecionadas, pois afetam diretamente a quantidade de nanopartículas obtidas, ou seja, a produtividade do processo, o que é importante no caso da aplicação final do produto. A variação da proporção dos solventes do polímero (diclorometano:clorofórmio) foi escolhida pois, estes apresentam diferentes valores de tensão superficial, que é um parâmetro importante na formação das nanopartículas (ASUA, 2002). Outro motivo é que, apesar de o clorofórmio ser comumente utilizado, o diclorometano apresenta menor toxicidade e possui seu limite de ingestão diária regulamentado pelo FDA em $0,00035 \text{ mg/kg}_{\text{massa corporal}} \cdot \text{dia}$ (FDA, 2011) para uso em formulações farmacêuticas. A concentração de lecitina de soja foi escolhida, pois a estabilidade das miniemulsões depende da capacidade do surfatante em manter as nanogotas estáveis durante a evaporação do solvente e manter a estabilidade das nanopartículas durante o prazo de utilização da miniemulsão, seja na liberação modificada ou como agente protetor de fármacos ou aditivos.

A Tabela 3 apresenta a matriz de ensaios codificada e os valores das respostas obtidas para o diâmetro médio (D_z) e índice de polidispersão (IPD) das nanopartículas.

Tabela 3 – Respostas do planejamento experimental: diâmetro médio (D_z) e índice de polidispersão (IDP) para os fatores X1, X2, X3 e X4.

Experimento	Ordem Aleatória	X1	X2	X3	X4	D_z (nm)	IDP (-)
1	5	-1	-1	-1	-1	142	0,197
2	6	1	-1	-1	-1	147	0,184
3	4	-1	1	-1	-1	164	0,191
4	2	1	1	-1	-1	193	0,215
5	15	-1	-1	1	-1	154	0,133
6	18	1	-1	1	-1	179	0,211
7	12	-1	1	1	-1	163	0,236
8	16	1	1	1	-1	266	0,355
9	1	-1	-1	-1	1	136	0,165
10	8	1	-1	-1	1	193	0,193
11	3	-1	1	-1	1	159	0,133
12	7	1	1	-1	1	171	0,186
13	13	-1	-1	1	1	170	0,223
14	14	1	-1	1	1	170	0,169
15	17	-1	1	1	1	144	0,137
16	11	1	1	1	1	190	0,208
17	9	0	0	0	0	169	0,180
18	10	0	0	0	0	153	0,153

X1: fração mássica da fase orgânica (*hold-up*); X2: concentração de PLLA; X3: concentração de lecitina; X4: fração volumétrica de diclorometano na fase orgânica.

4.3.1 DIÂMETRO MÉDIO EM INTENSIDADE (D_z)

A Tabela 4 apresenta a análise de variância e a Tabela 5 os valores de efeitos estimados e valor de p para o diâmetro médio das nanopartículas. A Figura 2 apresenta o Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados, também para o diâmetro médio das nanopartículas. Através desta visualização é possível perceber em ordem decrescente os efeitos significativos para 5% de significância ($p=0,05$).

Tabela 4 – Análise de variância para o diâmetro médio das nanopartículas.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F_{calc}	F_{tab}	p
Regressão	14007,7	11	14007,7	130,3	4,0	0,0000032
Resíduo	644,8	6	231,4			
Total	14652,5	17	-	$R^2 = 95,6\%$		

SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MQ: quadrados médios; F_{calc} : F calculado; F_{tab} : F tabelado.

Tabela 5 – Efeitos estimados e valor de p para o diâmetro médio das nanopartículas.

Fatores	Efeitos	Erro padrão	$t_{\text{Calc}} (6)$	p
Média	170,17	2,44	69,64	<0,00001
(1) <i>Hold-up</i>	34,63	5,18	6,68	0,0005
(2) [PLLA]	19,88	5,18	3,83	0,0086
(3) [Lecitina]	16,38	5,18	3,16	0,0196
(4) x CH ₂ Cl ₂ *	-9,38	5,18	-1,81	0,1205*
1 x 2	12,88	5,18	2,48	0,0476
1 x 3*	8,88	5,18	1,71	0,1377*
2 x 4	-21,13	5,18	-4,08	0,0065
3 x 4	-12,63	5,18	-2,44	0,0508
1 x 2 x 3	18,13	5,18	3,50	0,0129
1 x 2 x 4	-12,63	5,18	-2,44	0,0508
1 x 3 x 4	-14,63	5,18	-2,82	0,0303

Hold-up: fração mássica da fase orgânica; [PLLA]: concentração de PLLA; [Lecitina]: concentração de lecitina; x CH₂Cl₂: fração volumétrica de diclorometano na fase orgânica.

* Efeitos não significativos a 95% de confiança.

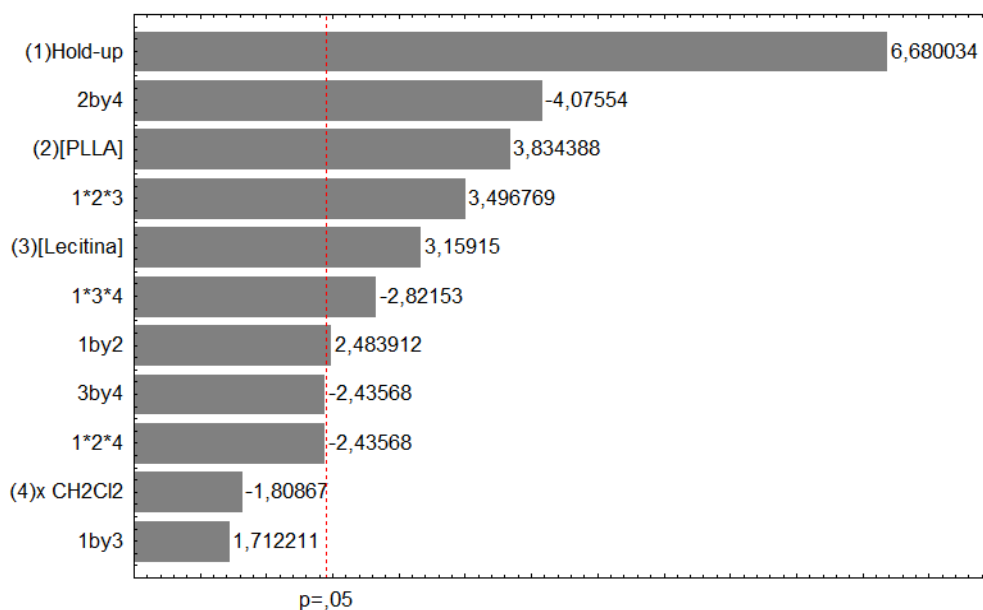


Figura 2 – Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para o diâmetro médio das nanopartículas.

Mediante a análise de variância (Tabela 4) pode-se perceber que o valor de F calculado é superior ao de F tabelado, portanto há rejeição da hipótese nula, concluindo que a variação dos parâmetros apresenta interferência na resposta de diâmetro médio das nanopartículas. Observa-se pela Tabela 5 que o efeito principal

da fração de diclorometano (4) e o efeito de interação entre a fração mássica da fase orgânica e a concentração de lecitina (1*3) não foram significativos a 95% de confiança, com um valor de p superior a 0,10. Entretanto, como os demais efeitos de interação envolvendo estas variáveis foram significativos no mesmo intervalo de confiança, os mesmos foram considerados e mantidos no modelo, apresentado na Equação 1.

$$D_z = 170,17 + 17,31X_1 + 9,93X_2 + 8,19X_3 - 4,69X_4 + 6,44X_{12} + 4,44X_{13} - 10,56X_{24} - 6,31X_{34} + 9,06X_{123} - 6,31X_{124} - 7,31X_{134} \quad (1)$$

A Figura 3 apresenta o gráfico dos valores observados *versus* os valores preditos e a Figura 4 apresenta o gráfico normal dos resíduos.

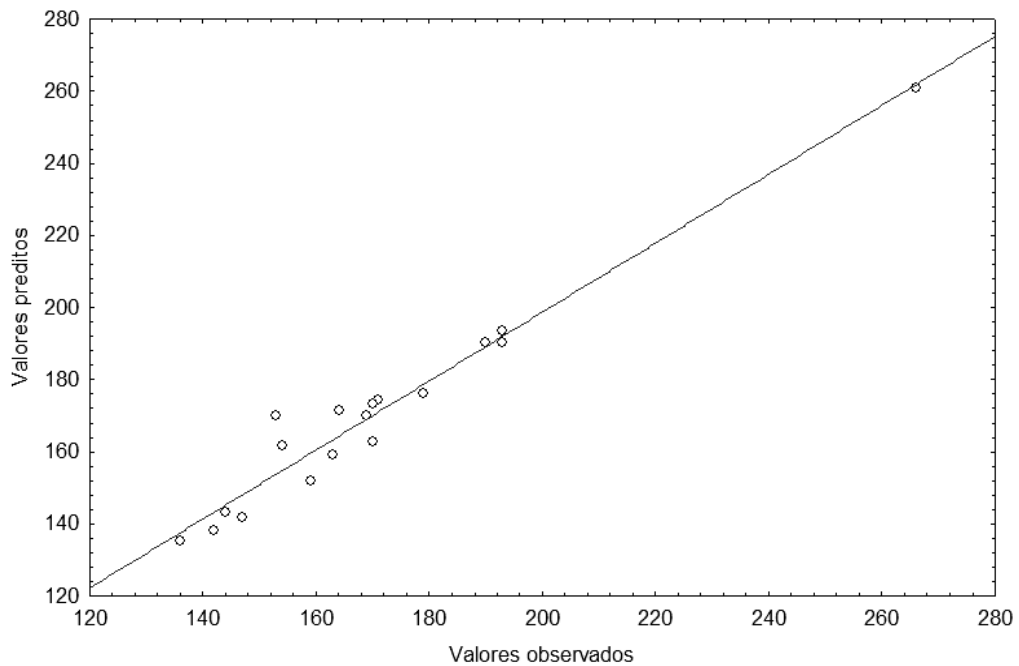


Figura 3 – Gráfico dos valores observados *versus* valores preditos.

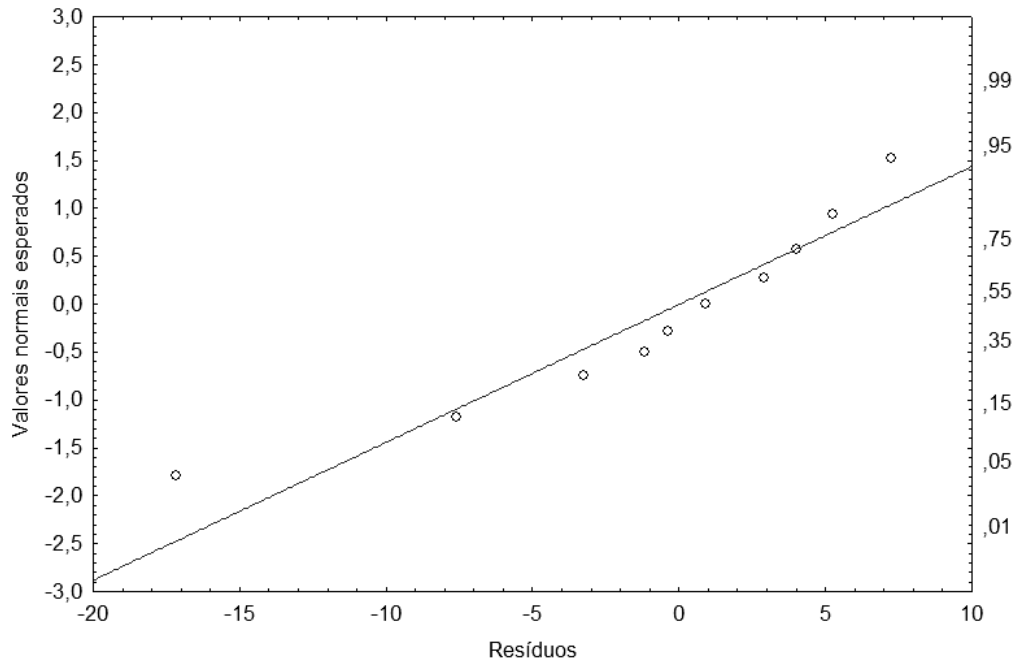


Figura 4 – Gráfico normal dos resíduos.

É possível observar uma boa concordância entre os valores observados e preditos pelo modelo, indicando que este pode ser utilizado para prever valores de diâmetros médios dentro da faixa experimental avaliada (Figura 3). A Figura 4 permite concluir que há uma distribuição aleatória entre os resíduos de todos os ensaios, sugerindo resíduos independentes.

4.3.1.1 Análise das superfícies de resposta e curvas de contorno

A Figura 5 apresenta a curva de contorno e superfície de resposta para a variação de *hold-up* (fração mássica de fase orgânica) versus a variação da concentração de PLLA.

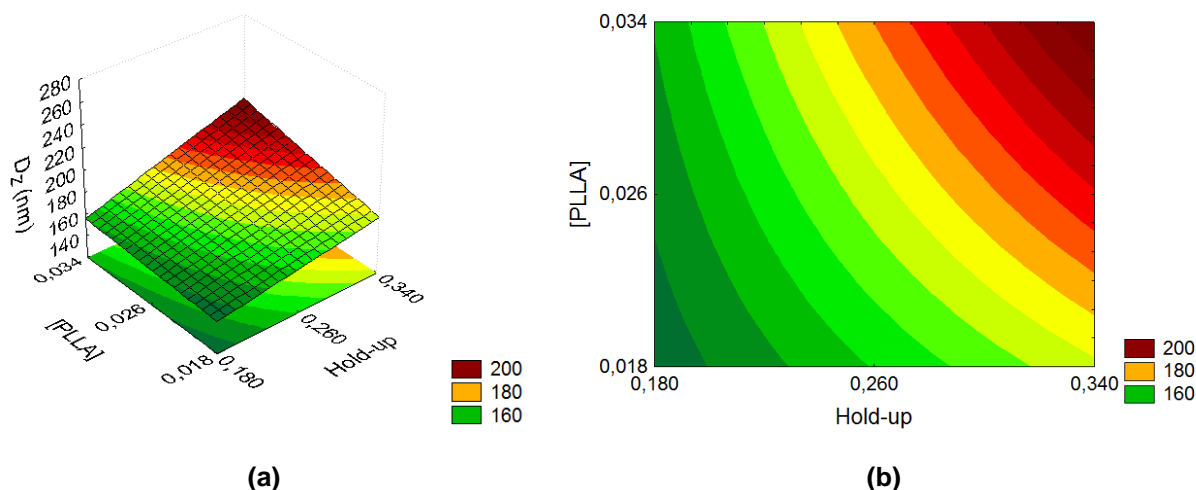


Figura 5 – Curva de contorno (a) e superfície de resposta (b) para a variação de *hold-up* versus concentração de PLLA (0,025g lecitina/g_{fase orgânica}; 0,5 ml CH₂Cl₂/ml CH₂Cl₂+CHCl₃).

A superfície de resposta da Figura 5 aponta para valores máximos do diâmetro médio das nanopartículas nos níveis superiores das duas variáveis. O aumento do diâmetro médio com o aumento da concentração do polímero deve-se ao aumento da viscosidade da fase dispersa, que dificulta a quebra das nanogotas pelo ultrassom deslocando a distribuição de tamanhos no sentido dos maiores tamanhos. Budhian, Siegel e Winey (2007) encapsularam haloperidol em poli(ácido lático-co-ácido glicólico) pela técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente variando a concentração de polímero (PLGA) e observaram o mesmo efeito no diâmetro médio das nanopartículas. Os autores também atribuíram o efeito ao aumento da viscosidade da fase dispersa com o aumento da viscosidade causada pela maior concentração de polímero. Resultados semelhantes foram obtidos outros autores (ASTETE; KUMAR; SABLIOV, 2007; LEIMANN *et al.*, 2012, *in press*).

Para baixos valores de concentração de PLLA, a influência do *hold-up* foi menos acentuada quando comparada a altas concentrações de PLLA, demonstrando que o tamanho médio das nanopartículas não pode ser considerado como uma função linear em relação dessas variáveis. Isso pode ser visualizado pelos efeitos de interação 1*2 e 1*2*4 na Figura 5.

A Figura 6 apresenta a curva de contorno e superfície de resposta para a variação de *hold-up* versus a variação da concentração de lecitina.

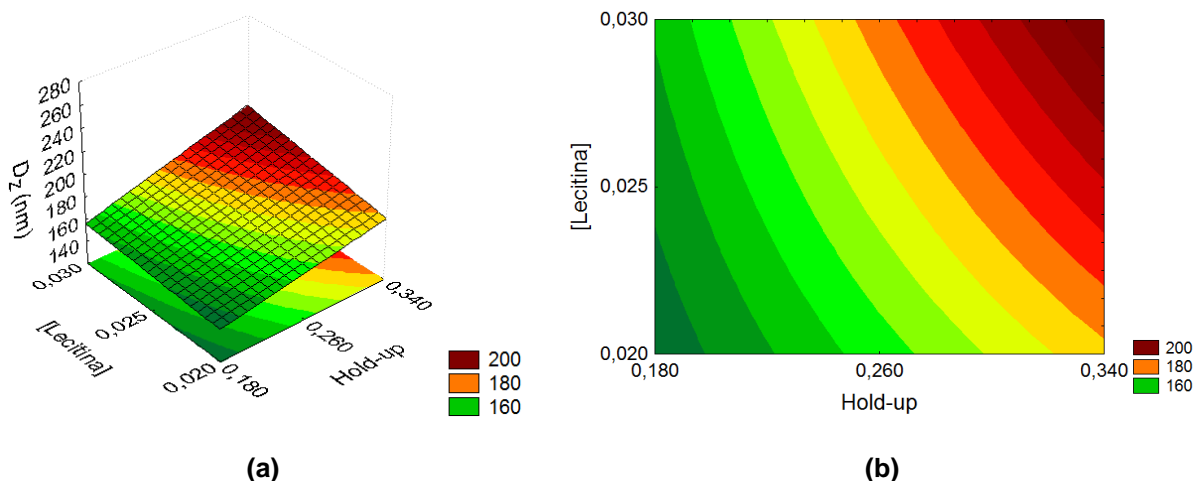


Figura 6 – Curva de contorno (a) e superfície de resposta (b) para a variação de *hold-up* versus variação da concentração de lecitina (0,026 g PLLA/g_{solvente}; 0,5 ml CH₂Cl₂/ml CH₂Cl₂+CHCl₃).

Pela Figura 6 é possível verificar que os níveis superiores das duas variáveis analisadas acarretaram em partículas com diâmetro médio maior. Foi possível observar que utilizando a lecitina de soja, partículas menores foram obtidas quando a sua concentração foi inferior dentro dos níveis estudados, resultado possivelmente do aumento da viscosidade da fase orgânica causado pela lecitina. Novamente o efeito da interação entre essas variáveis (1*3*4) pode ser observado resultando na maior variação do diâmetro médio quando maiores valores de lecitina são utilizados. Isso é importante, pois quando a concentração de lecitina estiver próxima do nível inferior do planejamento experimental (0,02 g/g_{fase orgânica}), a fração volumétrica da fase orgânica pode ser aumentada afetando de forma menos acentuada o tamanho médio das nanopartículas.

A Figura 7 apresenta a curva de contorno e superfície de resposta para a variação da concentração de lecitina versus a variação da concentração de PLLA.

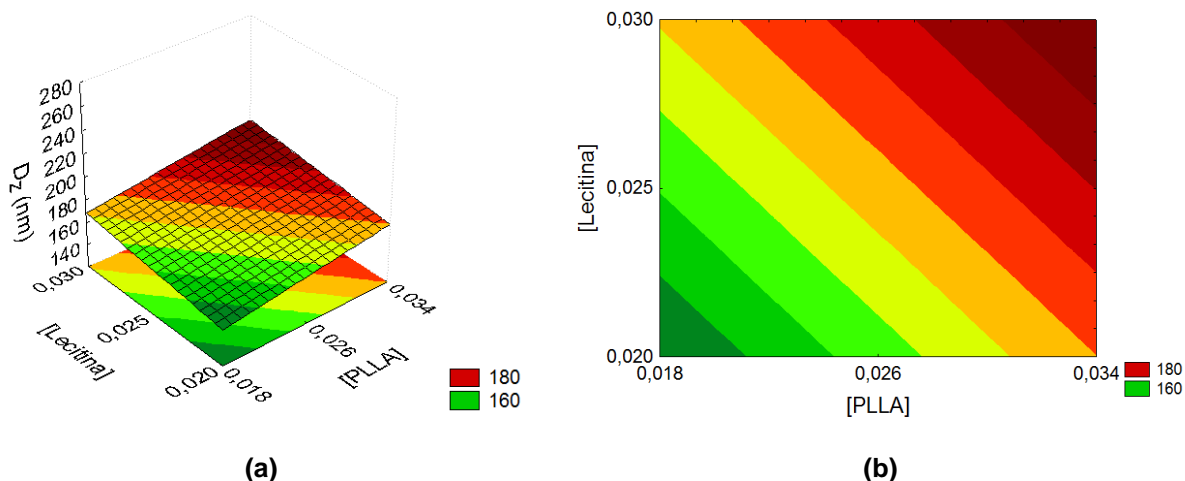


Figura 7 – Curva de contorno (a) e superfície de resposta (b) para a variação da concentração de lecitina versus a concentração de PLLA (hold-up = 0,26 g/g_{total}; 0,5 ml_{CH₂Cl₂}/ml_{CH₂Cl₂+CHCl₃}).

Concentrações elevadas de PLLA em combinação com concentrações elevadas de lecitina resultaram em diâmetros médios de partículas maiores. Musyanovych *et al.* (2008) obtiveram partículas maiores com concentração elevada de polímero em seu estudo, fenômeno atribuído ao aumento da viscosidade da fase orgânica.

A Figura 8 apresenta a superfície de resposta e curva de contorno para a variação da concentração de PLLA versus a fração de solvente.

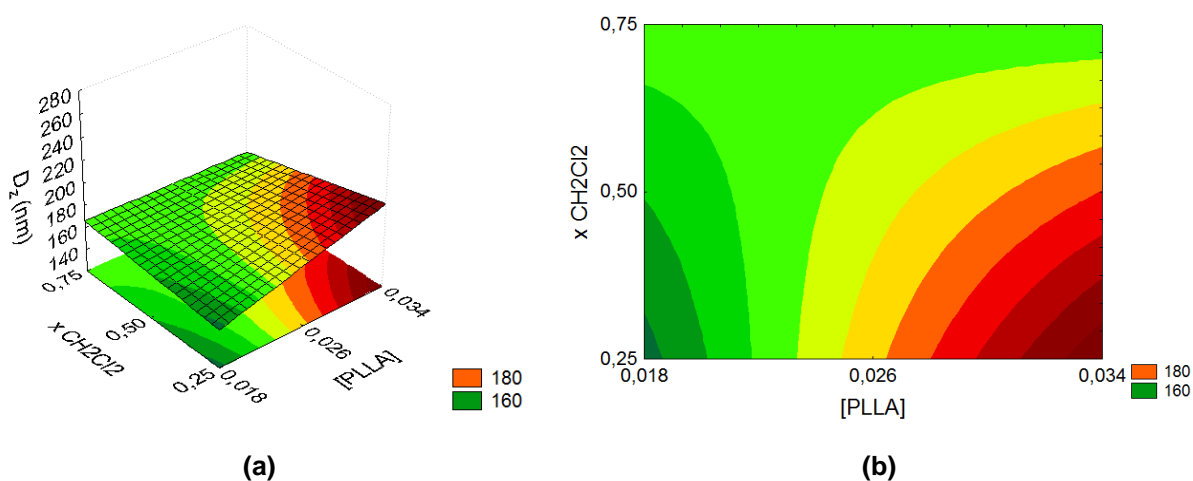


Figura 8 – Curva de contorno (a) e superfície de resposta (b) para a variação da concentração de PLLA versus fração de solvente (0,026 g PLLA/g_{solvente}; hold-up = 0,26 g/g_{total}).

Os valores máximos de diâmetro médio foram obtidos com o nível superior da concentração de PLLA e o nível inferior da fração de diclorometano na mistura de solventes. O comportamento não-linear mostrado pelo gráfico reflete as interações que ocorrem entre o solvente e o polímero (2*4) e entre o surfatante e o solvente (3*4). Para proporções de diclorometano na mistura de solventes acima de 70%, a variação da concentração de PLLA não influenciou o tamanho médio final das nanopartículas, na faixa experimental investigada. Quanto maior a proporção de clorofórmio na mistura de solventes, maior foi a variação no diâmetro médio, sugerindo que o uso deste solvente deve ser avaliado com cuidado devido ao risco de desestabilização da miniemulsão.

Jeon *et al.* (2000) obtiveram nanopartículas de PLGA utilizando membranas de diálise sem surfatantes e o tamanho final das nanopartículas se mostrou dependente do solvente utilizado. Song *et al.* (2006) também obtiveram resultados semelhantes na obtenção de nanopartículas de poli(ácido láctico) pelo método de deslocamento de solvente e atribuíram o resultado à diferença de solubilidade dos solventes orgânicos utilizados na água.

4.3.2 ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO DE TAMANHOS

A Tabela 6 apresenta a análise de variância e a Tabela 7 os valores de efeitos estimados e valor de p para os resultados do índice de polidispersão (IPD) de tamanhos das nanopartículas. A Figura 9 apresenta o Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para o IPD de tamanhos das nanopartículas. Através desta visualização é possível perceber em ordem decrescente os efeitos significativos para 5% de significância ($p=0,05$).

Tabela 6 – Análise de variância para o índice de polidispersão das nanopartículas.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F _{calc}	F _{tab}	p
Regressão	0,038	9	0,038	53,7	3,4	0,0000034
Resíduo	0,006	8	0,001	R ² = 87,03%		
Total	0,044	17	-			

SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MQ: quadrados médios; F_{calc}: F calculado; F_{tab}: F tabelado.

Tabela 7 – Efeitos estimados e valor de p para o IPD das nanopartículas.

Fatores	Efeitos	Erro padrão	t _{Calc} (8)	p
Média	0,19	0,01	30,75	<0,00001
(1) <i>Hold-up</i>	0,04	0,01	2,88	0,0206
(2) [PLLA]*	0,02	0,01	1,75	0,1185*
(3) [Lecitina]*	0,03	0,01	1,96	0,0863*
(4) x CH ₂ Cl ₂	-0,04	0,01	-2,90	0,0200
1 x 2*	0,03	0,01	2,14	0,0644*
2 x 3*	0,03	0,01	2,01	0,0791*
2 x 4	-0,04	0,01	-3,37	0,0099
1 x 3 x 4	-0,03	0,01	-2,35	0,0467
2 x 3 x 4 *	-0,03	0,01	-2,16	0,0626*

Hold-up: fração mássica de fase orgânica; [PLLA]: concentração de PLLA; [Lecitina]: concentração de lecitina; x CH₂Cl₂: fração volumétrica de diclorometano na fase orgânica; IPD: índice de polidispersão.

* Efeitos não significativos a 95% de confiança.

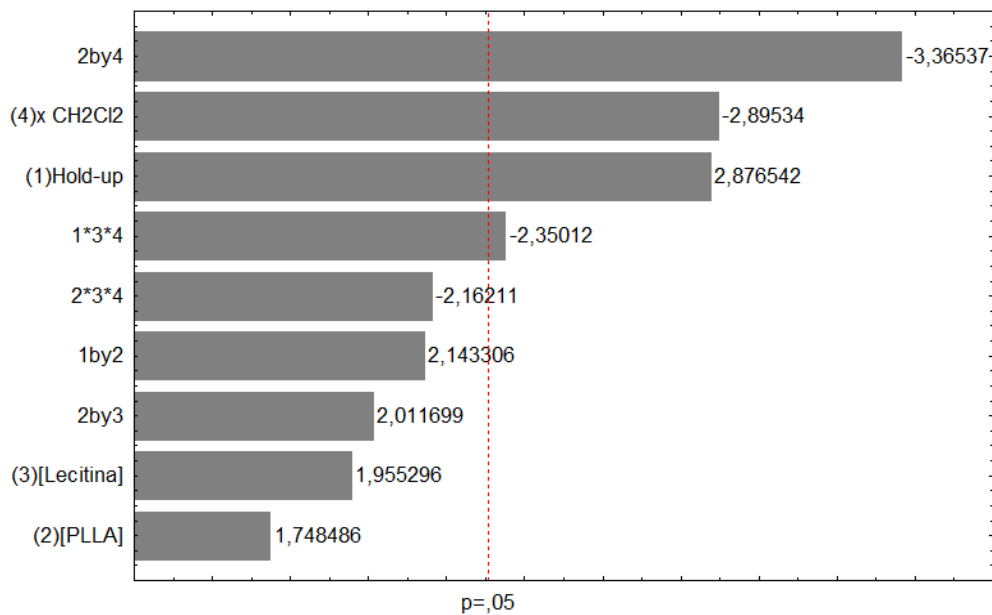


Figura 9 – Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para os valores de índice de polidispersão (IPD) de tamanhos das nanopartículas.

A análise de variância permitiu verificar que o valor de F calculado foi superior ao valor de F tabelado, assim como foi observado para o diâmetro médio, havendo rejeição da hipótese nula também para os resultados de índice de polidispersão, apresentando interferência na resposta com a variação dos parâmetros na obtenção das nanopartículas.

O efeito principal da concentração de PLLA e da concentração de lecitina não foi significativo a 95% de confiança. Além disso, os efeitos de interação entre a fração mássica de fase dispersa (*hold-up*) e concentração de PLLA (1*2), entre a concentração de PLLA e concentração de lecitina (2*3) e entre a concentração de PLLA, a concentração de lecitina e a fração volumétrica de diclorometano na fase orgânica (2*3*4) também não apresentaram significância. Porém, como os demais efeitos envolvendo essas variáveis (2*4 e 1*3*4) foram significativos, todos os efeitos foram mantidos no modelo. O modelo matemático que pode descrever o comportamento do índice de polidispersão (IPD) de tamanhos das nanopartículas obtidas encontra-se representado na Equação 2.

$$IPD = 0,19 + 0,02X_1 + 0,01X_2 + 0,01X_3 - 0,02X_4 + 0,01X_{12} + 0,01X_{23} - 0,02X_{24} - 0,01X_{134} \quad (2)$$

As Figuras 10 e 11 apresentam o gráfico dos valores observados *versus* os valores preditos e o gráfico normal dos resíduos, respectivamente.

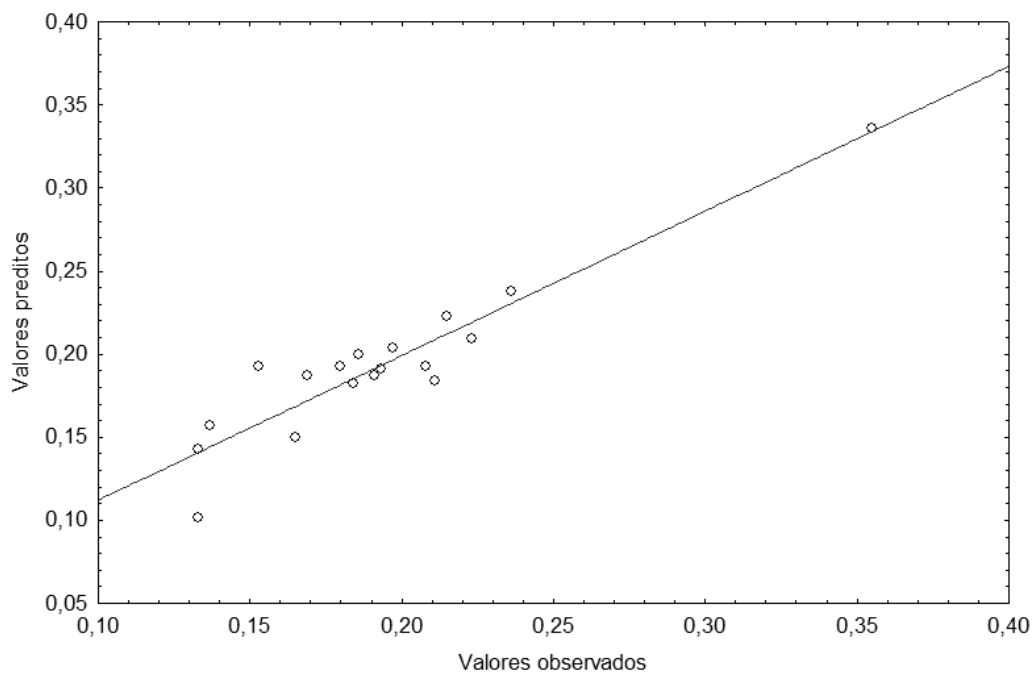


Figura 10 – Gráfico dos valores observados *versus* valores preditos.

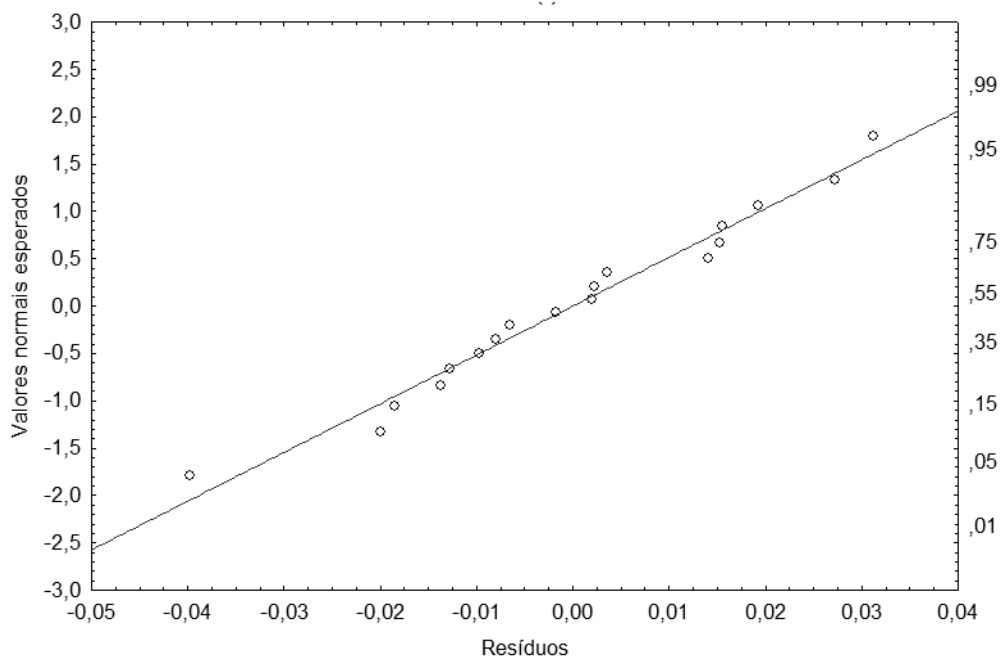


Figura 11 – Gráfico normal de resíduos.

Assim como foi observado para os valores de diâmetro médio, também é possível concluir que o índice de polidispersão pode ser bem descrito pelo modelo proposto (Figura 10). Além disso, houve distribuição aleatória entre os resíduos de todos os ensaios, sugerindo resíduos independentes (Figura 11).

4.3.2.1 Análise das superfícies de resposta e curvas de contorno: Índice de polidispersão

A Figura 12 apresenta a superfície de resposta e a curva de contorno com a variação de *hold-up* (fração mássica de fase orgânica) *versus* a concentração de PLLA.

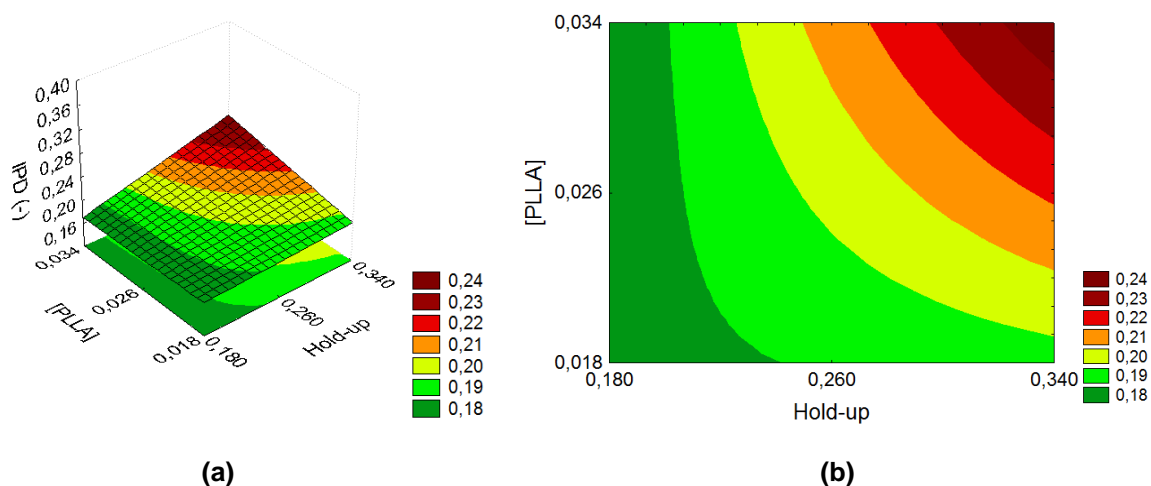


Figura 12 – Curva de contorno (a) e superfície de resposta (b) para a variação de *hold-up* *versus* concentração de PLLA (0,025g lecitina/g_{fase orgânica}; 0,5 ml_{CH₂Cl₂}/ml_{CH₂Cl₂+CHCl₃}).

Os valores máximos para o IPD foram obtidos para os níveis superiores da concentração de PLLA e de *hold-up*. Para baixos valores de *hold-up*, a concentração de PLLA não apresentou influência sobre o IPD e o mesmo ocorreu quando baixos valores de concentração de PLLA foram utilizados.

A Figura 13 apresenta a curva de contorno e superfície de resposta para a variação de *hold-up* *versus* a variação da concentração de lecitina.

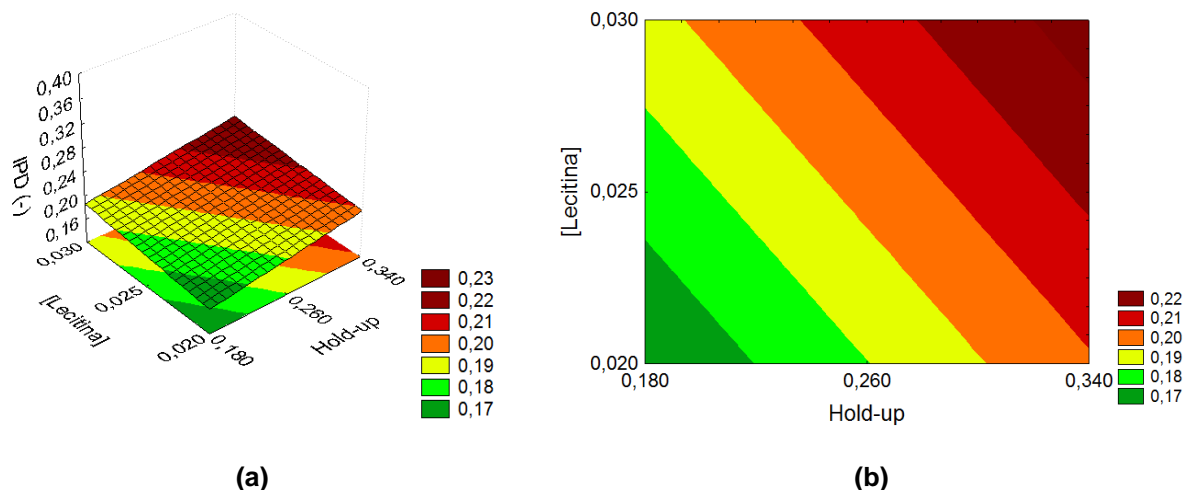


Figura 13 – Curva de contorno (a) e superfície de resposta (b) para a variação de *hold-up* versus concentração de lecitina (0,026 g PLLA/g_{solvente}; 0,5 ml CH₂Cl₂/ml CH₂Cl₂+CHCl₃).

Valores máximos de IPD foram encontrados nos níveis superiores das variáveis na faixa experimental avaliada e o formato da superfície de resposta ilustra a falta de interação entre as variáveis.

A Figura 14 apresenta a superfície de resposta e curva de contorno para a variação de *hold-up* versus a variação da fração de solvente.

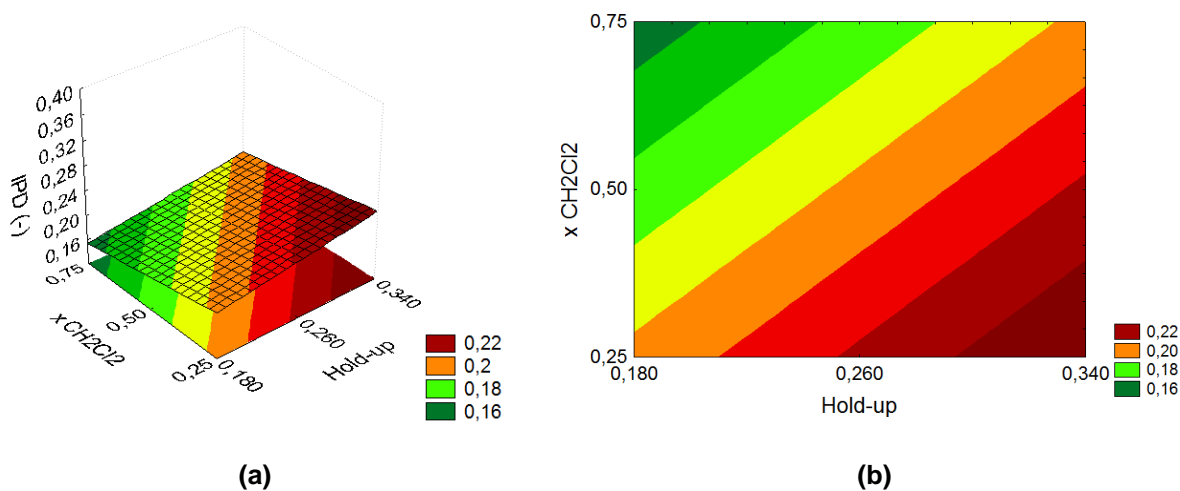


Figura 14 – Curva de contorno (a) e superfície de resposta para a variação de *hold-up* versus a fração de solvente (0,026 g PLLA/g_{solvente}; 0,025g lecitina/g_{fase orgânica}).

O índice de polidispersão apresentou maiores valores para valores maiores de *hold-up* e menor proporção de diclorometano na mistura de solventes, ou seja, o

uso de diclorometano favoreceu a obtenção de partículas com distribuição de tamanhos mais estreitas.

A Figura 15 apresenta a superfície de resposta e curva de contorno comparando a variação da fração de solvente com a concentração de PLLA.

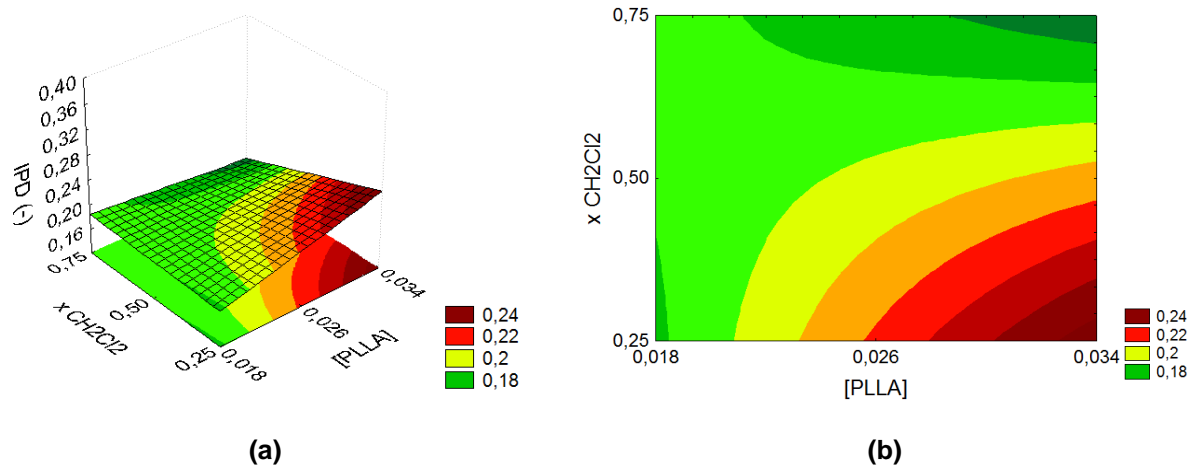


Figura 15 – Curva de contorno (a) e superfície de resposta (b) para variação da fração de solvente versus a concentração de PLLA (0,025g lecitina/g_{fase orgânica}; hold-up = 0,26 g/g total).

Os maiores valores de IPD foram encontrados quando maiores concentrações de polímero e menores proporções de diclorometano foram utilizadas. Ainda é possível observar o comportamento não-linear do IPD em relação a essas variáveis, pois numa grande região da superfície de resposta o índice de polidispersão se mostrou independente das variáveis.

A Figura 16 apresenta a superfície de resposta e curva de contorno para a variação da concentração de lecitina com a concentração de PLLA.

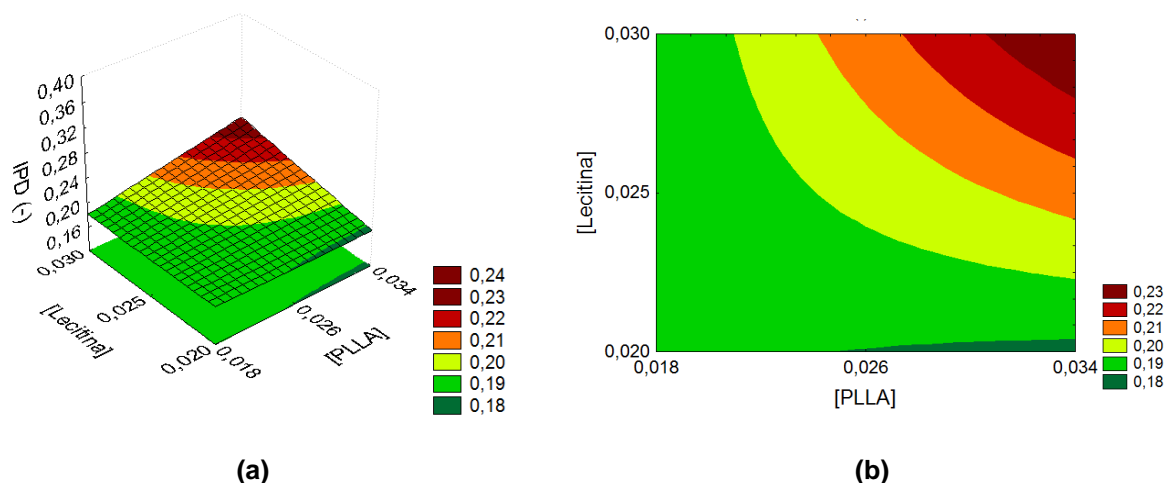


Figura 16 – Curva de contorno (a) e superfície de resposta (b) para variação da concentração de lecitina versus a concentração de PLLA (0,5 ml CH_2Cl_2 /ml $\text{CH}_2\text{Cl}_2+\text{CHCl}_3$; hold-up = 0,26 g/g_{total}).

Quando foram utilizadas menores concentrações de lecitina e maiores concentrações de PLLA, menores valores de IPD foram obtidos, indicando novamente um comportamento não-linear do IPD, em relação a essas variáveis.

4.4 CONCLUSÕES

O diâmetro médio e índice de polidispersão das nanopartículas produzidas variaram entre 136 e 266 nm e, 0,133 e 0,355, respectivamente, em função das condições experimentais avaliadas pelo planejamento fatorial completo 2^4 .

O planejamento experimental demonstrou a existência de interações significativas entre a concentração de lecitina, de PLLA, da fração volumétrica de fase dispersa e da relação diclorometano/clorofórmio utilizados. Como consequência, os valores de diâmetro médio final e do índice de polidispersão podem ser de difícil previsão e qualquer mudança nas variáveis experimentais deve ser precedida do estudo prévio dos tamanhos das nanopartículas.

Assim, mediante os resultados obtidos, para trabalhos posteriores adotou-se o uso de diclorometano como único solvente orgânico na obtenção das nanopartículas, bem como a utilização de lecitina a uma concentração um pouco menor que seu nível inferior (0,015 g/g_{fase orgânica}). Essas condições experimentais possibilitam a utilização de concentrações de polímero e de fração mássica de fase dispersa em seus níveis superiores, parâmetros que melhoram o rendimento do

processo de obtenção das nanopartículas, sem interferir de maneira significativa nos resultados de diâmetro médio e índice de polidispersão de tamanhos.

CAPÍTULO 5

VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-VIS) PARA A DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE CURCUMINA NANOENCAPSULADA EM POLI(L-ÁCIDO LÁTICO)

5.1 INTRODUÇÃO

Diversos estudos têm comprovado a baixa toxicidade intrínseca e grande variedade de efeitos terapêuticos da curcumina, como a sua atividade antioxidante, antiinflamatória, antimicrobiana, propriedades antitumorais, atividade hepato e nefro protetora; efeito sobre células imunitárias (linfócitos T, linfócitos B, macrófagos, células dendríticas e outras) atividade contra o Alzheimer e a AIDS (AGGARWAL; KUMAR; BHARTI, 2003; MAHESHWARI *et al.*, 2006; AGGARWAL *et al.*, 2007; AK e GÜLÇİN, 2008; HATCHER *et al.*, 2008; PARI; TEWAS; ECKEL, 2008; GILDA *et al.*, 2010; ANITHA *et al.*, 2011).

Em virtude de seus inúmeros benefícios potenciais, há um crescente interesse da comunidade científica nas propriedades terapêuticas da curcumina (AK e GÜLÇİN, 2008; GILDA *et al.*, 2010), entretanto, suas aplicações ainda são limitadas, devido à sua baixa solubilidade em água e sensibilidade para condições alcalinas, tratamento térmico, luz, íons metálicos, enzimas, ácido ascórbico, dentre outros (LIN *et al.*, 2009; PARAMERA; KONTELES; KARATHANOS, 2011).

Nanopartículas e micropartículas poliméricas têm sido amplamente estudadas para liberação controlada de fármacos e ingredientes alimentícios encapsulados, bem como para limitar a degradação ou perda de um determinado composto durante o processamento e armazenamento (MADENE *et al.*, 2006). Portanto, a encapsulação da curcumina se caracteriza como uma solução para viabilizar sua aplicação (ANAND *et al.*, 2010; BISHT *et al.*, 2007; DAS *et al.*, 2010; LERTSUTTHIWONG *et al.*, 2008; YALLAPU; JAGGI, CHAUHA; 2010; YU e HUANG, 2010).

Dentre as técnicas de obtenção das nanopartículas, destaca-se a técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente. O processo é baseado na preparação de uma fase orgânica, constituída de solvente orgânico, polímero (usado como agente encapsulante) e o aditivo a ser encapsulado e, também; uma fase aquosa constituída de água destilada. Um surfatante é adicionado na fase orgânica, na fase aquosa ou em ambos dependendo do caso. A solução é dispersa em água na forma de gotas nanométricas estáveis com o uso de um equipamento de dispersão de alta eficiência, como o sonicador. Posteriormente, o solvente é removido por extração ou evaporação e as nanopartículas são formadas em função da diminuição da solubilidade do polímero no solvente e sua conseqüente precipitação (PICH *et al.*, 2006; MUSYANOVYCH *et al.*, 2008; LEIMANN *et al.*, 2013).

Após a encapsulação da curcumina a sua concentração real presente nas nanopartículas deve ser conhecida, pois podem ocorrer perdas ou degradação durante o processo de encapsulação. Um método analítico confiável deve ser utilizado para determinar tal concentração e, para tanto, uma metodologia deve ser validada (ICH, 2005). A validação é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o desenvolvimento e transferência de um método (ALVES *et al.*, 2010). Para registro de novos produtos, o órgão regulador do Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e o dos Estados Unidos da América, o *Food and Drug Administration* (FDA), exigem a validação das metodologias analíticas e, para isso, são estabelecidos documentos oficiais que direcionam os critérios a serem adotados nesse processo. Segundo a ANVISA (BRASIL, 2003), a validação de um procedimento analítico deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Conforme o *World Health Organization Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations* (1992), a avaliação sistemática de um procedimento analítico para demonstrar que está sob as condições nas quais deve ser aplicado.

Este trabalho descreve os parâmetros de validação declarados pelas diretrizes contidas no documento gerado pela *International Conference on Harmonisation* (ICH, 2005) e conforme a ANVISA (BRASIL, 2003), para alcançar um método analítico com características aceitáveis de confiabilidade, adequação e

viabilidade para a determinação quantitativa da curcumina encapsulada em nanopartículas de poli(L-ácido láctico) (PLLA).

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 MATERIAL

A curcumina (Sigma-Aldrich, 99,5% pureza), o diclorometano (Vetec, 99,5% de pureza) e o metanol (PróQuímicos, 99,5% de pureza) foram utilizados conforme recebidos. O poli(L-ácido láctico) (PLLA) ($M_w = 3.780$ g/mol) foi sintetizado a partir do L-lactídeo, pela síntese de abertura do anel, conforme descrito no Capítulo 4. Água destilada foi utilizada como meio contínuo das miniemulsões. Lecitina de soja (Alfa Aesar) foi utilizada como surfatante na obtenção das nanopartículas. As soluções foram filtradas em filtros de membrana de nylon Millipore (diâmetro de $0,45 \mu\text{m}$) e centrifugadas em filtros Amicon (membrana com tamanho de corte de 100 kDa).

5.2.2. ESTUDO DE VALIDAÇÃO

Na validação do método analítico foram avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação e precisão de acordo com as normas estabelecidas pela *International Conference on Harmonisation* (ICH, 2005) e pela RE nº 899/03 da ANVISA (BRASIL, 2003).

5.2.2.1 Linearidade

A linearidade pode ser definida como a capacidade de se obter resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração de analito na amostra, dentro de um determinado intervalo (ICH, 2005; BRASIL, 2003; USP, 1999).

A linearidade foi estudada utilizando soluções de curcumina em diclorometano e metanol, na proporção de 1:1 (v/v), com seis diferentes níveis de concentração em cada curva, com concentrações variando de $4 \mu\text{g/mL}$ a $40 \mu\text{g/mL}$, sendo o estudo conduzido em três dias diferentes, utilizando a técnica de espectrofotometria de ultravioleta-visível (UV-Vis).

5.2.2.2 Limite de Detecção (LOD)

O limite de detecção é determinado pela análise de amostras com concentrações conhecidas de analito e por determinação do nível mínimo em que o analito pode ser detectado de forma segura (ICH, 2005; INMETRO, 2003).

Pode ser determinada a partir da equação linear da curva de calibração da amostra ($Y = a + bx$), utilizando o valor obtido para o coeficiente angular (b) e a variância residual (S) determinada pelo cálculo do desvio padrão de um número adequado de amostras em branco (em média sete amostras), conforme a Equação 1 (ICH, 2005).

$$LOD = S \times \frac{3,3}{b} \quad (1)$$

O valor de 3,3 refere-se a uma constante numérica calculada de acordo com o nível de confiança exigido, indicando a probabilidade de ocorrência de erros α (falsos positivos) e β (falsos negativos) igual a 5% (95% de confiança) (CURRIE, 1995).

5.2.2.3 Limite de Quantificação (LOQ)

O limite de quantificação é a menor quantidade de analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão adequadas. O limite de quantificação é um parâmetro de ensaios quantitativos para os níveis baixos de compostos em matrizes da amostra (ICH, 2005).

Assim como o LOD, o LOQ pode ser determinado a partir da equação linear da curva de calibração da amostra ($Y = a + bx$), utilizando o valor obtido para o coeficiente angular (b) e a variância residual (S) determinado pelo cálculo do desvio padrão de um número adequado de amostras em branco de acordo (em média sete amostras) com a Equação 2 (ICH, 2005).

$$LOQ = S \times \frac{10}{b} \quad (2)$$

Segundo Currie (1999) o LOQ é expresso em termos de desvio padrão relativo, denominado de DPR_Q , sendo este valor igual ao máximo tolerado, convencionalmente igual a 10%. Deste modo, a constante utilizada para o cálculo do limite de detecção é realizado em função deste limite ($k_Q=1/DPR_Q$), resultando no valor de 10.

5.2.2.4 Precisão

A precisão de um procedimento analítico expressa o grau de concordância (grau de dispersão) entre uma série de medidas obtidas a partir de amostragem múltipla de uma mesma amostra homogênea nas condições prescritas (ICH, 2005; INMETRO, 2003).

Foram determinados os seguintes níveis de precisão: precisão intermediária (ensaios em dias diferentes), repetibilidade (diferentes ensaios no mesmo dia) e a reprodutibilidade (ensaios com variação do analista e do laboratório utilizado) onde, para todos os níveis, foram realizadas seis varreduras de três soluções com concentração de curcumina conhecida (4, 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$). Os níveis de precisão foram calculados pelo desvio padrão relativo percentual (DPR %) dos resultados obtidos nas curvas analíticas.

5.2.3.5 Exatidão (método de recuperação)

Segundo a *International Conference on Harmonisation* (ICH, 2005) e a ANVISA (BRASIL, 2003), a exatidão de um procedimento analítico apresenta o grau de concordância entre o valor que é aceito como verdadeiro convencional (ou um valor de referência aceito) e o valor encontrado. Para esta determinação foram preparadas soluções de curcumina em diclorometano/metanol (1:1, v/v), com as seguintes concentrações: 4, 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$, correspondendo aos níveis: mínimo, médio e máximo da curva de calibração padrão da curcumina, previamente determinada. As amostras foram analisadas e as concentrações foram recalculadas a partir da curva de calibração e foram comparadas com as concentrações teóricas (porcentagem de recuperação). Estes ensaios foram conduzidos em triplicata e realizados em dois dias diferentes.

5.2.4 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE CURCUMINA ENCAPSULADA EM PLLA

As nanopartículas foram produzidas conforme descrito no Capítulo 4. A curcumina foi adicionada após a dissolução da lecitina de soja e do PLLA. Na Tabela 1 são apresentadas as formulações das nanopartículas de curcumina encapsulada em PLLA.

Tabela 1 – Formulações das nanopartículas de curcumina encapsulada em PLLA para validação analítica da determinação de curcumina.

Condição Experimental	Massa de componentes (g)				
	Água destilada	Lecitina	Diclorometano	Curcumina	PLLA
3% curcumina*	22,4552	0,1796	11,7161	0,0115	0,3940
1% curcumina*	22,4683	0,1802	11,5860	0,0042	0,3930

*Porcentagem de curcumina em relação à massa de polímero.

5.2.5 ESPECIFICIDADE

A especificidade do método foi testada por meio de soluções contendo os reagentes de formulação, nas mesmas condições das nanopartículas de curcumina encapsulada em PLLA, para garantir que não houvesse interferência na região de absorvância tomada como referência para quantificação da curcumina (465 nm), conforme *International Conference on Harmonisation* (ICH, 2005). Foi realizada a varredura completa de 190 a 600 nm da curcumina, lecitina e das nanopartículas de PLLA puro. Foram preparadas soluções de curcumina e de lecitina em diclorometano:metanol 1:1 (v/v), com concentrações de 0,04 mg/mL e 0,7 mg/mL, respectivamente, em seguida a varredura das mesmas foi feita em espectrofotômetro UV-Vis (PG Instruments).

Para a leitura das nanopartículas de PLLA puro a amostra foi preparada com a secagem de alíquota de 1 mL da dispersão das nanopartículas em água (70 °C) e posterior diluição em 1 mL de diclorometano e 1 mL de metanol. A solução foi filtrada utilizando um filtro de membrana Millipore (0,45 µm), em seguida utilizou-se 1 mL para diluição em diclorometano:metanol 1:1 (v/v) em balão volumétrico de 10 mL, simulando o processo de determinação da recuperação percentual, que será

descrita adiante (item 5.2.6). Por fim foi realizada a varredura no espectrofotômetro UV-Vis.

5.2.6 DETERMINAÇÃO DA RECUPERAÇÃO PERCENTUAL DE CURCUMINA

A determinação da recuperação percentual de curcumina ao final do processo de nanoencapsulação foi realizada com o objetivo de identificar perdas operacionais, as quais os processos estão sujeitos. Em última análise, a recuperação percentual fornece uma medida qualitativa da estabilidade da miniemulsão formada. Além disso, para determinar o valor real da eficiência de encapsulação, é necessário verificar a quantidade de composto encapsulado em função do valor final, ou seja, a concentração real de composto presente na amostra.

Para determinação do valor de recuperação percentual, alíquotas de 1 mL de cada uma das amostras coletadas das dispersões foram secas imediatamente após o final do preparo das nanopartículas em estufa de circulação forçada de ar a 70 °C por 2 horas. Em seguida, as alíquotas secas foram diluídas em 1 mL de diclorometano e o polímero foi precipitado pela adição de 1 mL de metanol. As amostras diluídas foram filtradas utilizando um filtro de membrana Millipore (0,45 µm). A alíquota de 1 mL do filtrado foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com solvente (diclorometano:metanol 1:1 v/v). As absorbâncias das diluições foram determinadas por espectrofotometria ultravioleta-visível (UV-Vis, PG Instruments) em 465 nm e a porcentagem de recuperação foi determinada pela sua curva de calibração. A recuperação percentual foi determinada pela Equação 3.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{[\text{curcumina}]_{\text{real}}}{[\text{curcumina}]_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (3)$$

Na equação 3, a $[\text{curcumina}]_{\text{real}}$ refere-se à concentração de curcumina presente na dispersão ao final do processo de nanoencapsulação e, a $[\text{curcumina}]_{\text{inicial}}$ refere-se à concentração de curcumina adicionada no início do processo de nanoencapsulação.

5.2.7 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

A partir das análises de recuperação são obtidas as concentrações reais de curcumina presente na dispersão final de nanopartículas após o processo de nanoencapsulação. Entretanto, estes valores não indicam se a curcumina encontra-se encapsulada ou somente dispersa na água. Para isso é realizada a determinação da eficiência de encapsulação, que indica a quantidade de curcumina incorporada nas nanopartículas e adsorvida em sua superfície.

Para a determinação da eficiência de encapsulação (EE, %), alíquotas de 0,5 mL de cada uma das amostras foram transferidas para tubos eppendorf com filtros Amicon (membrana com tamanho de corte de 100 kDa), centrifugadas a 14.500 rpm por 30 minutos, utilizando uma centrífuga Mini Spin Plus Eppendorf. O filtrado obtido foi seco em estufa de circulação forçada de ar a temperatura de 70 °C por 24 horas. As amostras secas foram diluídas em 1 mL de diclorometano e em 1 mL de metanol e a alíquota de 1 mL foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e completado com solvente (diclorometano:metanol 1:1 v/v). As absorvâncias foram determinadas por espectrofotometria UV-Vis a 465 nm e a eficiência de encapsulação (EE (%)) foi calculada de acordo com a Equação 4.

$$EE (\%) = \left(\frac{[curcumina]_{real} - [curcumina]_{n\tilde{a}o\ encapsulada}}{[curcumina]_{real}} \right) \times 100 \quad (4)$$

5.2.8 DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHOS DAS NANOPARTÍCULAS

O diâmetro médio (D_z) e índice de polidispersão (IPD) das nanopartículas foram determinados conforme descrito no Capítulo 4.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA

Os espectros dos reagentes constituintes das nanopartículas de curcumina foram analisados separadamente e os resultados são apresentados na Figura 1.

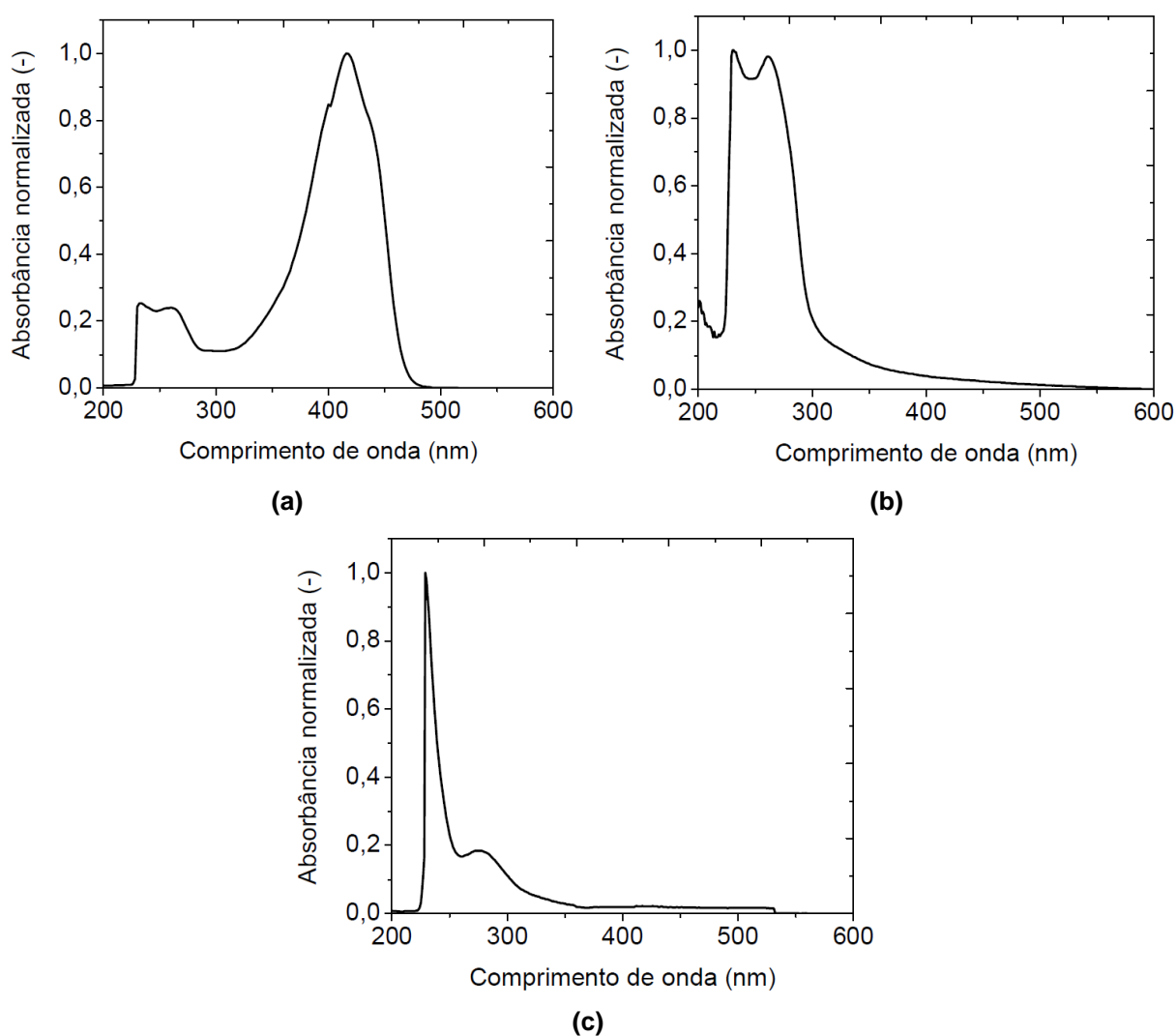


Figura 1 – Espectros UV-Vis para (a) curcumina pura, (b) lecitina de soja e (c) nanopartículas de PLLA.

A curcumina apresenta absorção máxima no comprimento de onda em torno de 425 nm, contudo esse valor não foi utilizado para a construção das curvas de calibração, pois a lecitina de soja também apresenta absorção nessa região. A fim

de evitar a interferência da lecitina na quantificação da curcumina, foi escolhido o comprimento de onda de 465 nm para a construção da curva de calibração, região onde a lecitina apresentou baixos valores de absorvância normalizada (0,02).

A linearidade foi avaliada com a análise de seis soluções de curcumina com concentrações variando de 40 $\mu\text{g/mL}$ a 4 $\mu\text{g/mL}$, realizadas em triplicata. Na Tabela 2 são apresentadas as concentrações estudadas e as absorvâncias obtidas em cada uma das varreduras realizadas. Na Figura 2 podem ser observadas as três curvas de calibração padrão da curcumina obtidas, bem como a equação da reta de cada uma delas. Na Figura 3 encontra-se o gráfico de ajuste da curva padrão e na Figura 4 o gráfico de resíduos para os valores preditos. A Tabela 3 apresenta a análise de variância para os resultados da curva padrão.

Tabela 2 – Absorvância das soluções de curcumina com concentrações de 40 $\mu\text{g/mL}$ a 4 $\mu\text{g/mL}$.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância		
	Curva Padrão		
	1	2	3
4	0,225	0,227	0,224
8	0,496	0,500	0,489
16	0,994	1,011	0,996
24	1,368	1,351	1,386
32	1,912	1,893	1,889
40	2,206	2,188	2,183

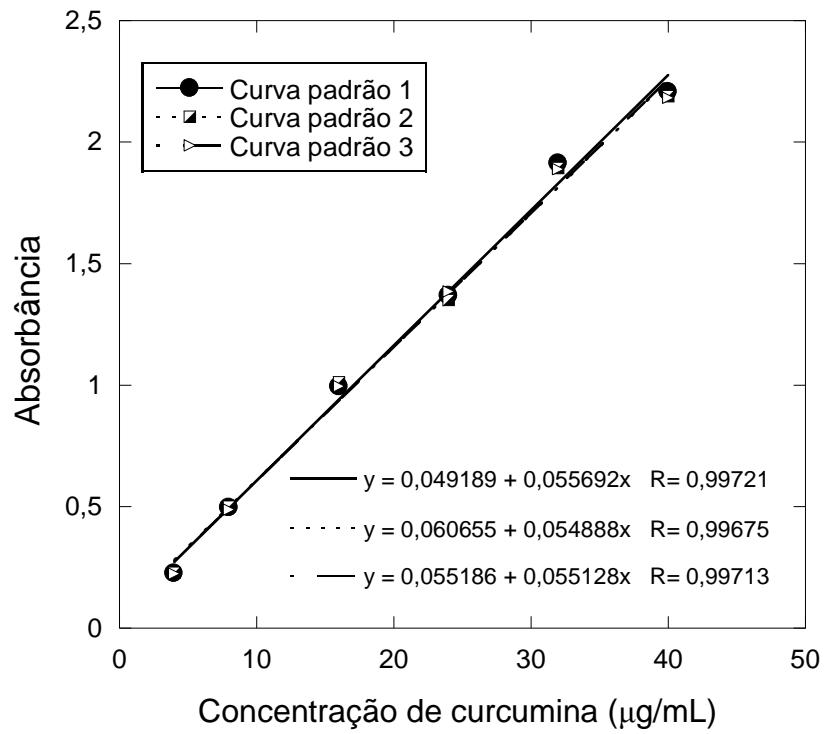


Figura 2 – Curvas de calibração padrão da curcumina.

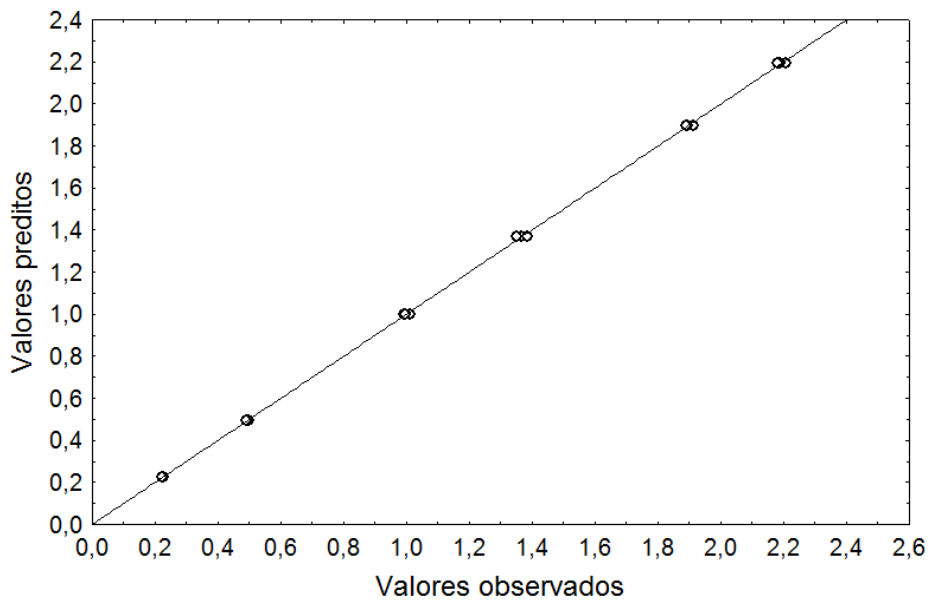


Figura 3 – Relação entre os valores observados e preditos para curva de calibração da curcumina (intervalo de confiança de 95%).

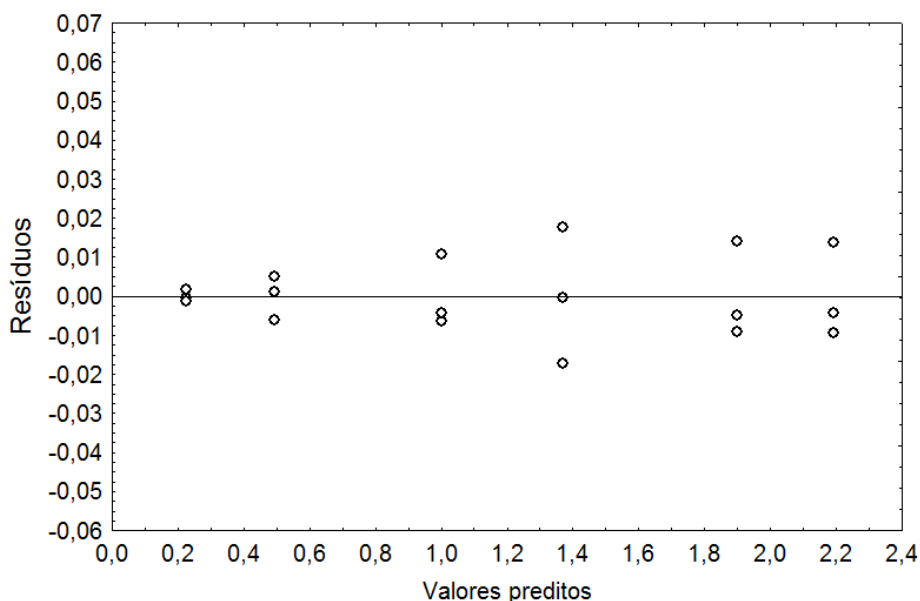


Figura 4 – Gráfico dos resíduos para os valores de absorvância preditos.

Tabela 3 – Análise de variância para os resultados das curvas de calibração padrão.

Fonte de variação	GL	SQ	MQ	F _{calc}	F _{tab}	ρ
Modelo	1	25,7714	25,7714	214761,8	4,7	$< 10^{-27}$
Regressão linear	5	8,9612	1,7922	14935,3	3,1	$< 10^{-30}$
Resíduos	12	0,0014	0,0001			
Total	17	8,9626				

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; MQ: quadrados médios; F_{calc}: F calculado; F_{tab}: F tabelado.

Com base nos valores obtidos para a curva de calibração padrão da curcumina, os valores médios encontrados para os coeficientes angular e linear da curva de calibração foram, respectivamente, $55,236 \pm 0,413$ e $0,055 \pm 0,006$. O coeficiente de correlação da reta foi igual a 0,997, indicando uma boa linearidade dos dados já que a ANVISA (BRASIL, 2003) recomenda um coeficiente de correlação igual a ou superior a 0,99 e o INMETRO (2003) um valor acima de 0,90.

Na Figura 3 é possível observar que os dados apresentam uma distribuição normal quanto aos valores observados e os preditos e na Figura 4 percebe-se que os resíduos apresentam um comportamento de distribuição ao redor de zero. Segundo Ribeiro e Ferreira (2008), os resíduos representam a parcela da variabilidade dos dados que não foi explicada pelo ajuste, e são interpretados com uma estimativa de erro, de modo que, os resíduos devem ser normalmente e

independentemente distribuídos ao redor de zero, e devem apresentar média zero e variância constante.

O LOD e o LDQ foram determinados pela análise do solvente utilizado para dissolução da curcumina (diclorometano e metanol, na proporção de 1:1 v/v). Os valores para LOD e LDQ encontrados foram, respectivamente, 0,00004 e 0,001 mg/mL.

Na Tabela 4 são apresentados os valores obtidos no estudo da exatidão para validação do método analítico de determinação de curcumina.

Tabela 4 – Estudo da exatidão para validação do método analítico de curcumina.

Concentração de curcumina adicionada (µg/mL)	Amostra (dia)	Concentração de curcumina encontrada (µg/mL)	Média das concentrações de curcumina encontradas (µg/mL) ± DPR (n=6)	Taxa de recuperação média (intervalo) (%) (n=6)
4,00	1a	3,11	3,09 ± 6,80	77,2
	1b	3,11		(76,4 - 77,6)
	1c	3,09		
	2a	3,09		
	2b	3,07		
	2c	3,06		
20,00	1a	19,54	19,46 ± 6,96	97,3
	1b	19,37		(96,3 - 98,3)
	1c	19,27		
	2a	19,66		
	2b	19,45		
	2c	19,45		
40,00	1a	38,64	38,53 ± 3,67	96,3
	1b	38,46		(95,9 - 96,6)
	1c	38,35		
	2a	38,73		
	2b	38,43		
	2c	38,55		

DPR = Desvio Padrão Relativo.

As concentrações de curcumina máxima e média avaliadas apresentaram valores de exatidão superiores a 96%. Já a concentração de 4 µg/mL, apesar de ser quatro vezes maior que o LDQ e 100 vezes maior que o LOD, apresentou exatidão de 77,2% (Tabela 4). Segundo Ribani *et al.* (2004), é importante considerar que,

como a eficiência do método varia em função da concentração da substância na maioria dos casos, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações. Além disso, os autores comentam que valores aceitáveis variam de acordo com o objetivo da análise, por exemplo, os intervalos aceitáveis no caso de traços de substâncias geralmente estão entre 70 e 120%, porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120% (RIBANI *et al.* 2004).

A precisão intermediária (inter-dia), repetibilidade (intra-dia) e reprodutibilidade (intra-laboratórios e intra-analistas) foram determinadas, mediante o cálculo do desvio padrão relativo de soluções de curcumina com concentrações de 4, 20 e 40 µg/mL e os resultados são apresentados nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5 – Estudo dos níveis de precisão (precisão intermediária, repetibilidade e reprodutibilidade com o mesmo analista em laboratórios diferentes) para validação do método analítico de determinação da curcumina.

Concentração de curcumina adicionada (µg/mL)	Laboratório I			Laboratório II			Reprodutibilidade DPR (%)
	1º Dia DPR (%)	2º Dia DPR (%)	Inter-dia (n=6) DPR (%)	1º Dia DPR (%)	2º Dia DPR (%)	Inter-dia (n=6) DPR (%)	
4	1,36	0,49	0,93	0,47	0,54	0,51	0,72
20	1,01	0,44	0,73	0,74	0,97	0,86	0,79
40	0,36	0,28	0,32	1,02	0,34	0,68	0,50

DPR (%): Desvio Padrão Relativo Percentual.

Tabela 6 – Estudo dos níveis de precisão (precisão intermediária, repetibilidade e reprodutibilidade com analistas diferentes em um mesmo laboratório) para validação do método analítico de determinação da curcumina.

Concentração de curcumina adicionada (µg/mL)	Analista I			Analista II			Reprodutibilidade DPR (%)
	1º Dia DPR (%)	2º Dia DPR (%)	Inter-dia (n=6) DPR (%)	1º Dia DPR (%)	2º Dia DPR (%)	Inter-dia (n=6) DPR (%)	
4	1,36	0,49	0,93	0,63	1,30	0,97	0,95
20	1,01	0,44	0,73	1,42	1,31	1,37	1,05
40	0,36	0,28	0,32	1,63	1,24	1,44	0,88

DPR (%): Desvio Padrão Relativo Percentual.

É possível verificar que os valores para precisão intermediária (inter-dia), repetibilidade (intra-dia), para verificação da reprodutibilidade (Tabelas 5 e 6), apresentam valores de desvio padrão relativo percentual inferiores a 1,5%, estando dentro de uma faixa aceitável, sendo 5% o limite máximo recomendado pela ANVISA (BRASIL, 2003) para metodologias analíticas. Grillo *et al.* (2010) estudaram a validação dos métodos analíticos para a determinação da quantidade de benzocaína encapsulada em poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato), pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e seus valores de desvio padrão relativo para precisão intermediária e repetibilidade, foram inferiores a 2%. Shaik *et al.* (2009) avaliaram a validação do método analítico para determinação da quantidade de curcumina encapsulada em poli(ácido lático-co- glicólico), também pela técnica CLAE e obteve valores de desvio padrão relativos para precisão intermediária e repetibilidade menores que 3%.

Para a precisão intermediária, o valor de $F_{2,3}$ calculado foi igual a 1,57. Para a reprodutibilidade inter-laboratório o valor de $F_{2,9}$ calculado foi igual a 0,72 e, para a reprodutibilidade inter-analista o valor de $F_{2,9}$ foi de 0,10. Em todos os casos foram obtidos valores inferiores ao de F tabelado, indicando que, para todas as precisões, independente da concentração da solução de curcumina analisada e de laboratórios e analistas diferentes, os resultados de desvio padrão relativo percentual obtidos foram semelhantes, não havendo diferença significativa.

Dessa forma, pode-se considerar que a técnica utilizada é adequada quanto a linearidades, limites de quantificação e detecção, precisão e exatidão, na faixa de concentração 40 $\mu\text{g/mL}$ a 4 $\mu\text{g/mL}$, para análise de quantificação da curcumina nanoencapsulada.

5.3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

Para a caracterização das nanopartículas, foram determinados o diâmetro médio (D_z) e o índice de polidispersão (IPD) das nanopartículas de curcumina encapsulada em PLLA. Além disso, foram determinadas a recuperação percentual e a eficiência de encapsulação, como apresentado na Tabela 7.

Tabela 7 – Diâmetro médio, índice de polidispersão de tamanhos, recuperação percentual e eficiência de encapsulação obtidos.

Concentração de curcumina (%)*	Recuperação (%)	EE (%)	D _z (nm)	IPD (-)
1	98,0 ± 1,1	99,5 ± 0,5	184 ± 4	0,195 ± 0,005
3	98,4 ± 1,2	99,8 ± 0,2	171 ± 8	0,170 ± 0,034

*Porcentagem em relação à massa de polímero.

Recuperação (%): recuperação percentual; EE (%): eficiência de encapsulação; D_z: diâmetro médio; IPD: índice de polidispersão.

A concentração de curcumina não apresentou influência no nível de significância de 5% sobre o tamanho médio e a polidispersão de tamanhos, de acordo com o Teste de Tukey. Os valores de recuperação percentual para ambas as amostras foram próximos a 98% (Tabela 6), indicando que a curcumina permaneceu na dispersão ao longo de todo o processo de produção das nanopartículas sem grandes perdas, ou seja, o sistema se manteve estável. Os altos valores de eficiência de encapsulação foram obtidos, como esperado devido à alta hidrofobicidade da curcumina. Dandekar *et al.* (2010b) produziram nanopartículas de curcumina encapsulada em hidrogel de hidroxipropil metil celulose e poli(vinil pirrolidona) também pela técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente. Os autores encontraram valores de eficiência de encapsulação de 72%, indicando uma baixa afinidade entre a curcumina e os encapsulantes utilizados. Yallapu *et al.* (2010) encapsulou curcumina em poli(ácido lático-co-glicólico) pela técnica de nanoprecipitação, utilizando estabilizantes como poli(vinil álcool) e poli(L-lisina) e obteve resultados de eficiência de encapsulação entre 49,6 ± 4,5% e 89,5 ± 3,2%. Entretanto, nenhum dos autores estudou o processo de recuperação de curcumina.

Uma propriedade importante das nanopartículas para sua aplicação final é a capacidade de dispersão em água. Para tanto, preparou-se dispersões de nanopartículas de PLLA sem curcumina, nanopartículas de PLLA contendo curcumina e de curcumina *in natura*, em água destilada, contendo a concentração de curcumina de 50 µg/mL. Na Figura 5 pode ser observado o comportamento das três dispersões.

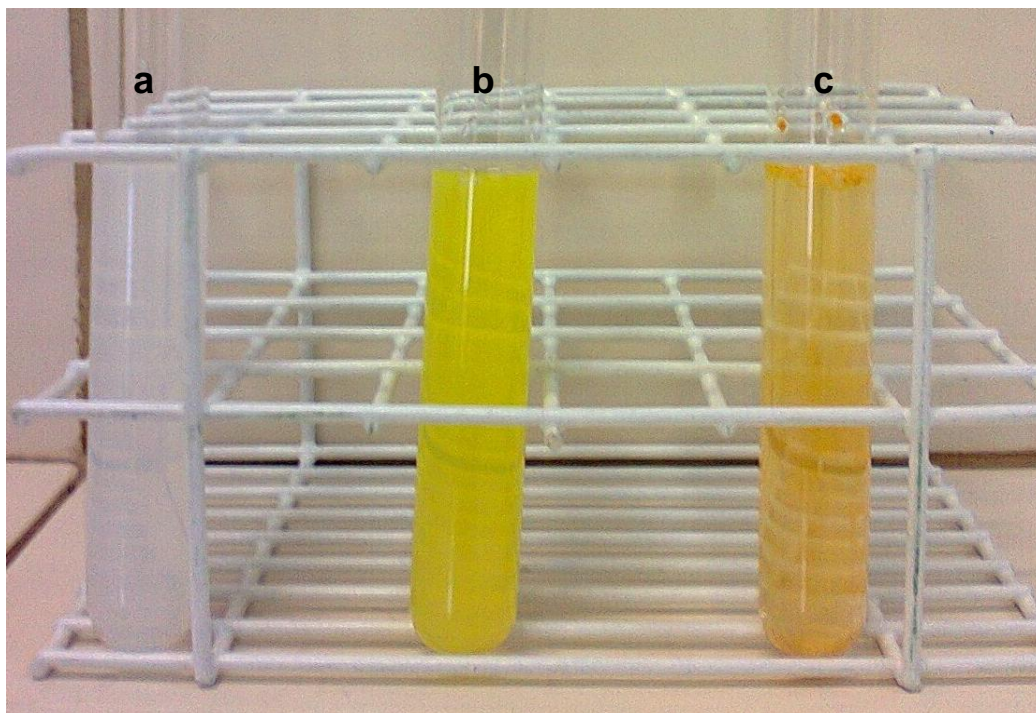


Figura 5 – Teste de dispersão das nanopartículas (a) de PLLA puro, (b) de PLLA contendo curcumina e (c) curcumina pura.

É visível que as nanopartículas contendo curcumina podem ser prontamente dispersas em água resultando num sistema visualmente homogêneo. O mesmo não ocorreu com a curcumina pura, observando-se a presença de partículas de curcumina suspensas, confirmando sua baixa solubilidade em água quando livre. Esse comportamento, também reportado por Shao *et al.* (2011) para nanopartículas curcumina encapsulada em polietilenoglicol e poli(caprolactona) e, por Anitha *et al.* (2011) para nanopartículas de curcumina encapsulada em *orto*-carboximetil quitosana, sugerindo que quando encapsulada, a curcumina tem potencial de uso em alimentos e formulações aquosas.

5.4 CONCLUSÕES

Os estudos de validação dos procedimentos analíticos possibilitaram garantir a segurança dos resultados obtidos para os valores de recuperação percentual e de eficiência de encapsulação da curcumina em nanopartículas de poli(L ácido láctico). O limite de detecção indicou que concentrações de curcumina da ordem de 0,04 µg/mL podem ser determinadas pelo método. Além disso, a técnica utilizada é

adequada para análise de quantificação da curcumina nanoencapsulada na faixa de concentração 40 $\mu\text{g/mL}$ a 4 $\mu\text{g/mL}$.

Curcumina foi encapsulada em nanopartículas de poli(L-ácido láctico) apresentando valores de eficiência de encapsulação e recuperação acima de 98%, demonstrando que este é um bom encapsulante para a mesma. Ao contrário da curcumina não encapsulada, as nanopartículas contendo curcumina puderam ser prontamente dispersas em água destilada, encorajando seu uso em formulações alimentícias.

CAPÍTULO 6

ENCAPSULAÇÃO DE CURCUMINA

6.1 INTRODUÇÃO

A utilização e consumo da curcumina apresentam inúmeras vantagens, contudo seu potencial na indústria de alimentos atualmente é subestimado devido principalmente à sua baixa solubilidade em água e sua sensibilidade frente às condições de processamento dos alimentos (LIN *et al.*, 2009; PARAMERA; KONTELES; KARATHANOS, 2011). As novas técnicas de encapsulação utilizando materiais biocompatíveis/biodegradáveis se apresentam como uma solução para ampliar a aplicabilidade da curcumina (BISHT *et al.*, 2007; LERTSUTTHIWONG *et al.*, 2008; ANAND *et al.*, 2010; DAS *et al.*, 2010; YALLAPU; JAGGI; CHAUHAN, 2010; YU e HUANG, 2010).

Anand *et al.* (2009) encapsularam curcumina em nanopartículas de poli(ácido glicólico-co-ácido láctico) (PLGA) comparando sua atividade biológica com a curcumina não encapsulada. Foi demonstrado que a biodisponibilidade *in vivo* da curcumina aumentou quando esta foi encapsulada, em experimentos utilizando ratos. Curcumina também foi encapsulada em poli(vinil pirrolidona) e monoacrilato de polietileno glicol visando à sua aplicação terapêutica (BISHT *et al.*, 2007). Os autores confirmaram que a curcumina nanoencapsulada é prontamente dispersa em água, tornando possível seu uso em alimentos com formulações aquosas.

Song *et al.* (2011) encapsularam curcumina em micelas poliméricas constituídas de PLGA-PEG-PLGA (poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)-b-poli(etileno glicol)-b-poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)), onde as micelas foram obtidas a partir da síntese por abertura de anel e a curcumina foi encapsulada pelo método de diálise. As partículas apresentaram eficiência de encapsulação acima de 95% e, mediante estudos conduzidos em ratos, os autores observaram que as micelas diminuíram a absorção da curcumina através do fígado e baço, porém, a distribuição foi melhorada no pulmão e no cérebro.

Anitha *et al.* (2011) produziram curcumina nanoencapsulada em *orto*-carboximetil quitosana, obtendo partículas de estruturas esféricas com um diâmetro médio de cerca de 150 nm e com eficiência de encapsulação de 87%. Conduziram estudos da atividade de curcumina nanoencapsulada demonstrando efeito tóxico para determinadas células cancerígenas e não tóxicas para células normais.

Das *et al.* (2010) encapsularam curcumina num sistema composto por três polímeros (alginato-quitosana-*pluronic*) para aplicações na área biomédica utilizando a técnica de reticulação com cloreto de cálcio. A eficiência de encapsulação foi baixa para as formulações sem o uso do *pluronic*, sugerindo que os encapsulantes utilizados não sejam os mais indicados para o caso da curcumina. A técnica de reticulação com cloreto de cálcio utilizando alginato como agente encapsulante também foi utilizada por Lertsutthiwong *et al.* (2008), contudo os autores reportaram baixa eficiência de encapsulação e estabilidade das nanopartículas apenas em baixas temperaturas (4°C), o que pode inviabilizar a sua aplicação em larga escala.

Shaikh *et al.* (2009) encapsularam curcumina pela técnica de emulsão/difusão do solvente utilizando poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) como encapsulante, com eficiência de encapsulação de no máximo 86%. Apesar da baixa eficiência, os autores demonstraram que o processo de encapsulação aumenta consideravelmente a biodisponibilidade da curcumina administrada por via oral. Os autores sugerem que a nanoencapsulação pode ser uma alternativa promissora para o aumento da biodisponibilidade oral de outras moléculas hidrofóbicas.

Gomez-Estaca *et al.* (2012) estudaram a obtenção de nanopartículas de curcumina encapsulada em zeína (proteína do milho) pelo método de atomização eletrodinâmica, avaliando o efeito principal das variáveis de processo de obtenção na morfologia e tamanho das partículas, obtendo eficiências de encapsulação de 85 a 90%. Também avaliaram a capacidade de coloração da curcumina nanoencapsulada em uma matriz alimentar aquosa (leite semidesnatado) obtendo excelentes resultados de coloração se comparada com a curcumina comercial. Estes resultados confirmam o potencial corante da curcumina nanoencapsulada para fins alimentícios, principalmente quando se refere a matrizes alimentares

aquosas, uma vez que a curcumina *in natura* é um composto altamente hidrofóbico, dificultando sua dispersão em matrizes hidrofílicas.

Dandekar *et al.* (2010a) avaliaram a toxicidade de nanopartículas de curcumina sensíveis ao pH, utilizando Eudragit S100 como encapsulante, avaliando a toxicidade aguda, sub-aguda e genotoxicidade, para comprovar a segurança da utilização das nanopartículas. As partículas foram produzidas mediante a técnica de emulsificação/evaporação do solvente e apresentaram eficiência de encapsulação de aproximadamente 73%. A formulação mostrou-se não tóxica na dose equivalente de 2000 mg/Kg de peso corporal de curcumina no estudo da toxicidade aguda, 100 mg/Kg (dose terapêutica geral) para a sub-aguda e, os estudos de genotoxicidade provou segurança celular equivalente a três vezes a dose terapêutica. Desta forma, a curcumina encapsulada em nanopartículas poliméricas de Eudragit S100 foram consideradas seguras para administração oral.

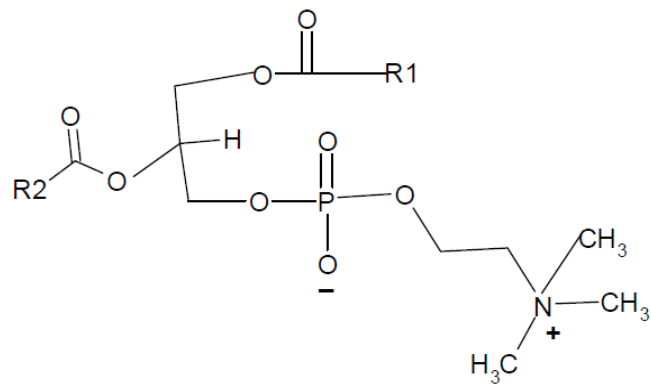
A análise dos trabalhos disponíveis sobre a curcumina nanoencapsulada permite concluir que tanto a técnica de encapsulação quanto o material encapsulante tem grande influência na eficiência de encapsulação e, conseqüentemente, no potencial de aplicação das nanopartículas obtidas. Os dados permitem concluir que a curcumina nanoencapsulada apresenta vantagens sobre a curcumina *in natura*, principalmente em relação à solubilidade em água e à sua biodisponibilidade. Outra consideração é que a grande maioria dos trabalhos se concentra no uso da curcumina em aplicações biomédicas, negligenciando a capacidade da curcumina em substituir os corantes artificiais atualmente utilizados na indústria de alimentos.

O objetivo deste estudo foi obter curcumina nanoencapsulada em poli(L-ácido láctico) e em Eudragit S100, avaliando a influência de condições experimentais sobre a recuperação percentual, a eficiência de encapsulação da curcumina e a morfologia das nanopartículas.

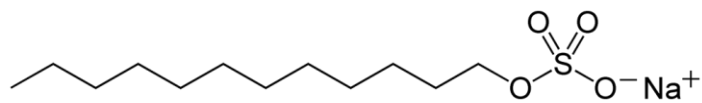
6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 REAGENTES

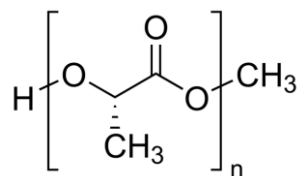
O poli(L-ácido láctico) (PLLA) ($M_w = 3.780 \text{ g/mol}$) foi sintetizado a partir do L-lactídeo, pela síntese de abertura do anel, conforme descrito no Capítulo 4. A curcumina (Sigma-Aldrich, 99,5% de pureza) foi utilizada como recebida. O Eudragit S100 (Evonik Industries AG) é um copolímero biocompatível comercial do ácido metacrílico e do metacrilato de metila na proporção 1:2 com massa molar média ponderal de 125.000 g/mol (MUSTAFIN, 2011; OBEIDAT; PRICE, 2006). Diclorometano (Vetec, 99,5% de pureza) foi utilizado como solvente da fase orgânica para obtenção das nanopartículas e na determinação da eficiência de encapsulação e porcentagem de recuperação. Metanol (PróQuímicos, 99,8% de pureza) também foi utilizado na determinação da eficiência de encapsulação e porcentagem de recuperação. Água destilada foi utilizada como meio contínuo das miniemulsões. Lauril sulfato de sódio (SLS, Isofar, 90,0% de pureza) e lecitina de soja (Alfa Aesar) foram utilizados como surfatante na obtenção das nanopartículas. A Figura 1 apresenta as estruturas químicas dos principais compostos utilizados.



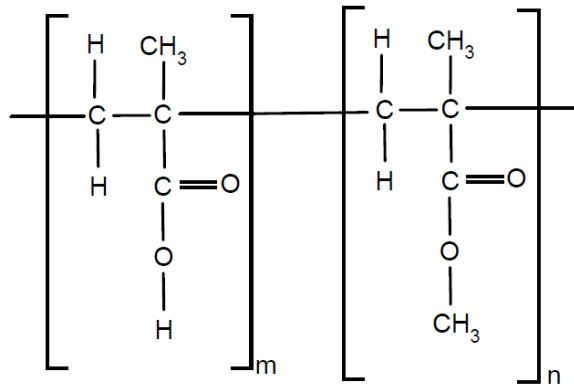
(a) Lecitina de soja.



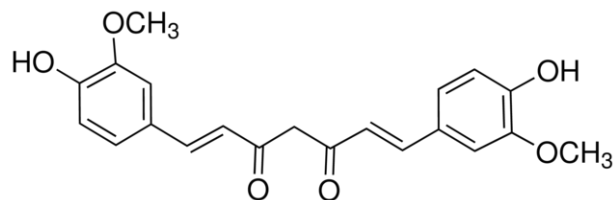
(b) Lauril sulfato de sódio.



(c) Poli(L-ácido láctico).



(d) Eudragit S100.



(e) Curcumina.

Figura 1 – Estrutura química dos principais componentes utilizados.

6.2.2 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas foram produzidas pela técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente conforme descrito adiante. Em todos os casos o pH das miniemulsões variou de 3,9 até 5,1. A quantidade de água evaporada na etapa de perda do solvente foi determinada de forma gravimétrica e readicionada a fim de manter a proporção mássica das dispersões.

O processo de obtenção das nanopartículas variou em função das condições experimentais, portanto, o procedimento foi dividido em função dos reagentes utilizados.

6.2.2.1 Procedimento 1: Lecitina (surfatante lipofílico) e PLLA (encapsulante)

Esse procedimento foi descrito em detalhes no Capítulo 4 com a curcumina sendo adicionada após a solubilização da lecitina de soja e do PLLA.

6.2.2.2 Procedimento 2: SLS (surfatante hidrofílico) e PLLA (encapsulante)

Primeiramente, preparou-se a fase aquosa dissolvendo o surfatante (lauril sulfato de sódio, SLS) em água destilada sob agitação mecânica por 15 minutos. Em seguida, preparou-se a fase orgânica dissolvendo o PLLA em diclorometano sob agitação por 15 minutos e, em seguida, a curcumina foi adicionada à mistura, mantendo-se a agitação por 3 minutos. Após esse tempo, a fase aquosa (surfatante e água destilada) foi adicionada à fase orgânica, mantendo-se a agitação por 5 minutos, procedendo-se com a sonicação conforme descrito no procedimento 1. A Figura 2 apresenta a representação esquemática para obtenção das nanopartículas de curcumina encapsulada em PLLA mediante o procedimento 2.

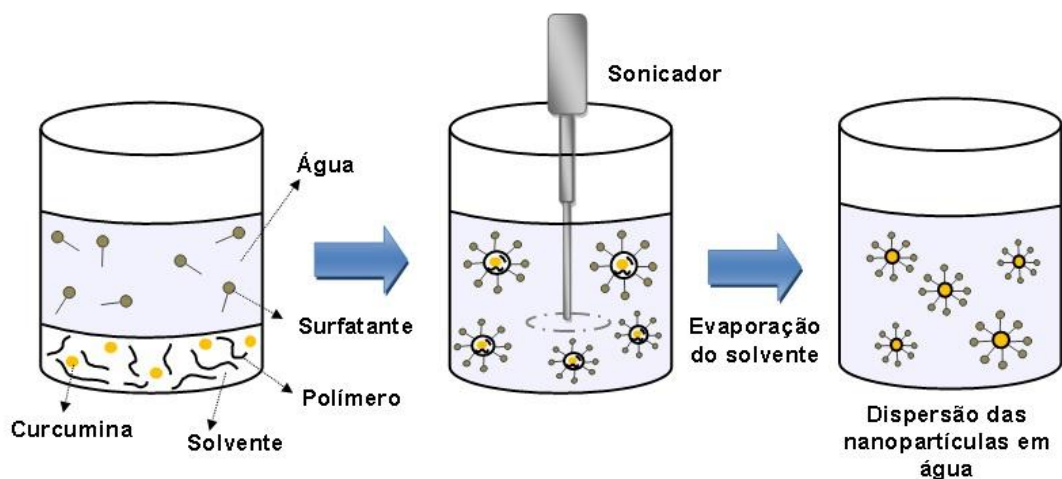


Figura 2 – Representação esquemática da obtenção das nanopartículas de curcumina encapsulada em PLLA utilizando surfatante hidrofílico.

6.2.2.3 Procedimento 3: Surfatante lipofílico (lecitina) e PLLA:Eudragit S100 (encapsulantes)

Quando o Eudragit S100 foi utilizado como agente encapsulante (sozinho ou em combinação com o PLLA), primeiramente foi necessário dissolvê-lo em diclorometano sob agitação a 60 °C por 20 minutos. Em seguida, a mistura foi resfriada e o solvente evaporado foi repostado. Após, adicionou-se a lecitina, o PLLA, a curcumina e a água destilada, realizando o processo de agitação e de sonicação conforme descrito no Capítulo 4.

6.2.3 DETERMINAÇÃO DA RECUPERAÇÃO PERCENTUAL DE CURCUMINA E DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

A determinação da recuperação percentual de curcumina ao final do processo de nanoencapsulação e da eficiência de encapsulação foram descritas no Capítulo 5. Os ensaios foram realizados em triplicata e seus dados foram tratados utilizando o *software Statistic 7.0* através de análise de variância (ANOVA) e do teste de Tukey.

6.2.4 DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHOS DAS NANOPARTÍCULAS

O diâmetro médio (D_z) e índice de polidispersão (IPD) das nanopartículas foram determinados através da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering* – DLS) conforme descrito no Capítulo 4.

6.2.5 ENSAIOS DE ESTABILIDADE DA CURCUMINA POR UV-VIS

A estabilidade da curcumina na presença dos compostos utilizados na miniemulsificação (solventes e polímeros) foi avaliada por espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-Vis, PG Instruments). Os espectros foram normalizados em função do valor de máxima absorvância registrada para a primeira leitura da solução. Primeiramente, foram preparadas soluções de curcumina em diclorometano ou em clorofórmio e as análises foram realizadas na presença ou ausência de luz ambiente. As soluções foram preparadas a partir de uma solução inicial de 3 mg de curcumina em um balão volumétrico de 50 mL. 1 mL dessa solução foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e completado com solvente, resultando na concentração final de $4,9 \times 10^{-3}$ mg de curcumina/g_{solução}. Para os testes na ausência de luz, as soluções foram protegidas da exposição à luz antes e durante a análise. Realizou-se a medida da absorvância das soluções na faixa de 300 nm a 600 nm utilizando uma cubeta de quartzo nos períodos de tempo de 0, 10, 20, 30, 60, 90 e 120 minutos.

Adicionalmente, os experimentos foram realizados em soluções contendo curcumina e os polímeros encapsulantes (PLLA ou Eudragit S100) em diclorometano na presença ou ausência de luz ambiente. Inicialmente foi preparada a solução contendo 0,1 g de PLLA em 100 g de diclorometano sob agitação mecânica por 15 minutos. Em seguida, 3,8 mg de curcumina foram adicionadas em 76,46 g da mistura de solvente e PLLA. Pipetou-se 1 mL da solução resultante em um balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com solução inicial que continha PLLA e diclorometano.

6.2.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A caracterização morfológica das nanopartículas foi realizada através da técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET, JEOL, modelo JEM-1011, 100 kV, faixa de magnificação de 50 a 600.000 vezes) no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina. As amostras para análise foram preparadas sem diluição e gotejadas sobre grades de cobre de 300 mesh previamente recobertas com filme de parlódio. As grades foram secas em temperatura ambiente, tingidas com tetróxido de ósmio por 4 horas em recipiente fechado, cobertas com filme de carbono e analisadas.

6.2.7 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Para identificar a existência de possíveis interações químicas entre os reagentes utilizados para o processo de nanoencapsulação da curcumina, foram realizadas análises de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier com modo de refletância atenuada (FTIR-UATR, Frontier PerkinElmer) com resolução de 4 cm^{-1} , intervalo de número de onda de $4000\text{ a }600\text{ cm}^{-1}$, com modo de refletância atenuada de diamante (UATR). A análise foi realizada em triplicada para cada uma das amostras, obtendo-se seus valores de varredura médios e procedendo a normalização dos picos.

6.2.8 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA

Calorimetria diferencial de varredura foi empregada para avaliar o estado físico da curcumina após o procedimento de encapsulação utilizando um equipamento de análise térmica simultânea (STA, do inglês *Simultaneous Thermal Analysis*, Perkin Elmer modelo STA 6000). As amostras foram liofilizadas e as massas utilizadas para análise variaram de 9 a 12 mg. Foi utilizado porta-amostra de platina para alocar as amostras durante o aquecimento. As amostras passaram por

aquecimento de 20 a 390°C com taxa de aquecimento de 10°C/min e fluxo de nitrogênio de 30 mL/min.

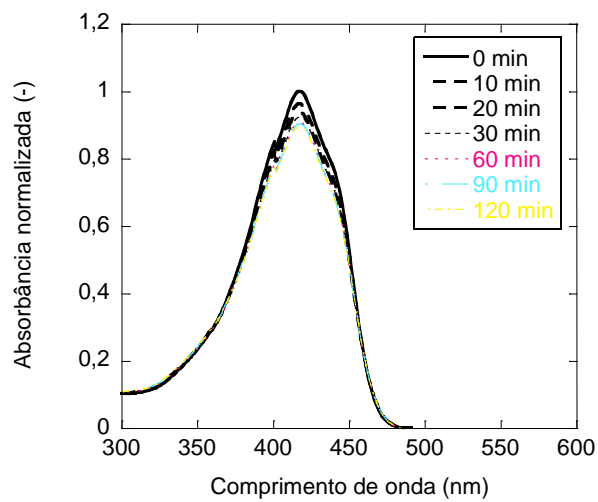
Considerando a entalpia envolvida na fusão do PLLA 100% cristalino como sendo 93,7 J/g (GARLOTTA, 2001), foi possível calcular o grau de cristalinidade da amostra (χ_c , %) usando a Equação 1, onde ΔH_m^c é o calor de fusão do PLLA totalmente cristalino e ΔH_m é a entalpia de fusão do PLLA na amostra.

$$\chi_c(\%) = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^c} \times 100 \quad (1)$$

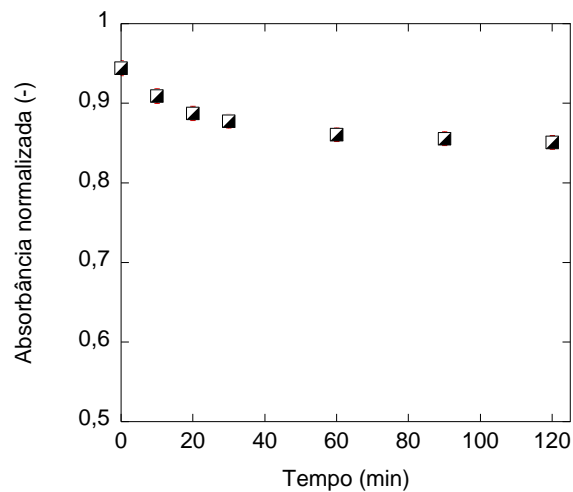
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 ESTABILIDADE DA CURCUMINA

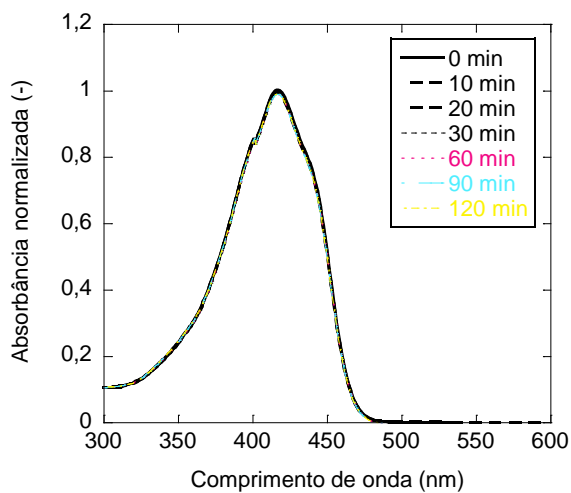
Para a produção de nanopartículas através de metodologias em que se utilizam solventes orgânicos em sua elaboração é necessário avaliar se o solvente provoca alterações no composto a ser encapsulado, ou seja, se tal composto é estável na presença do solvente. As Figuras 3 e 4 apresentam, respectivamente, as variações das absorvâncias registradas para as soluções de curcumina em clorofórmio ou em diclorometano. As Figuras 5 e 6 apresentam, respectivamente, os valores das absorvâncias da curcumina em diclorometano contendo PLLA ou Eudragit S100 na presença de luz em função do tempo. Os ensaios foram realizados na presença e ausência de luz e as barras verticais indicam uma variação de $\pm 1\%$ do valor medido.



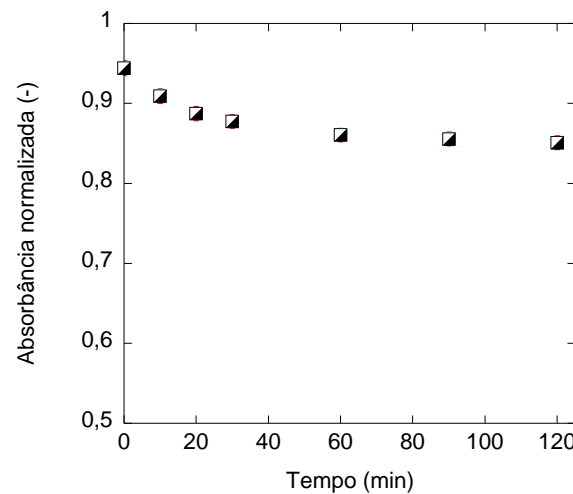
(a) Varredura em UV-Vis.



(b) Absorbância em 425 nm ao longo do tempo.

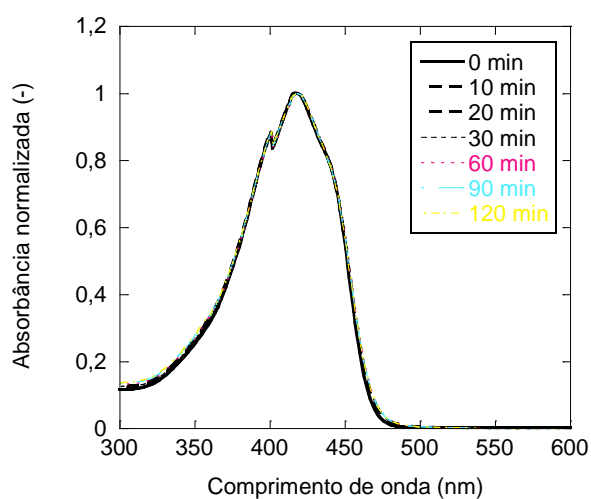


(c) Varredura em UV-Vis.

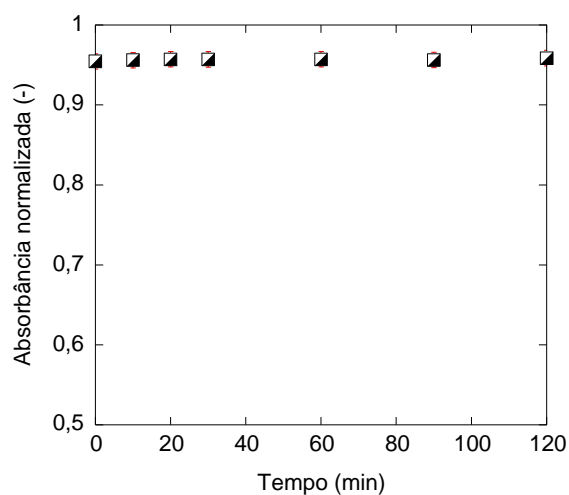


(d) Absorbância em 425 nm ao longo do tempo.

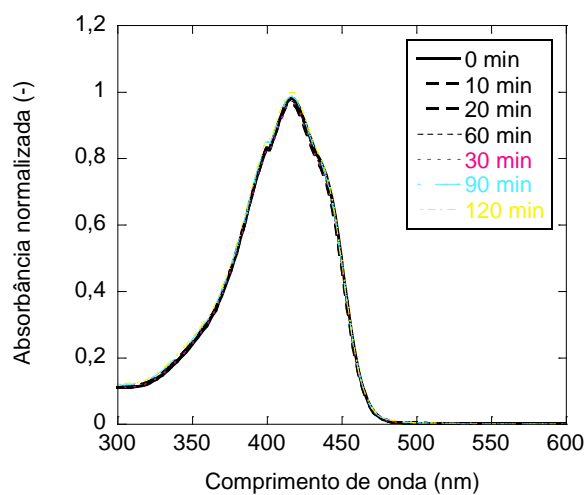
Figura 3 – Absorbâncias da curcumina em clorofórmio (a, b) na presença e (c, d) ausência de luz ambiente (barras verticais indicam variação de $\pm 1\%$ do valor medido).



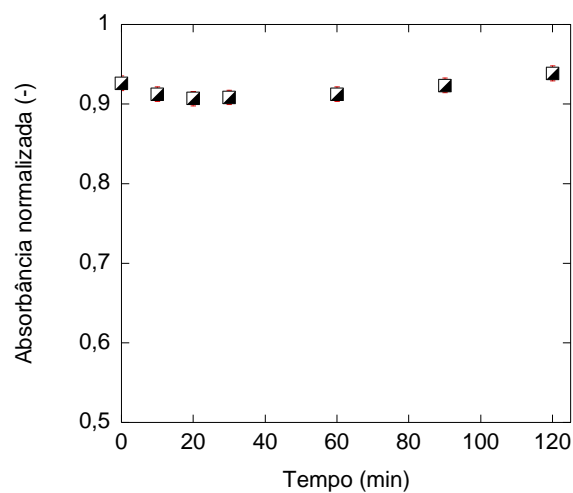
(a) Varredura em UV-Vis.



(b) Absorbância em 425 nm ao longo do tempo.

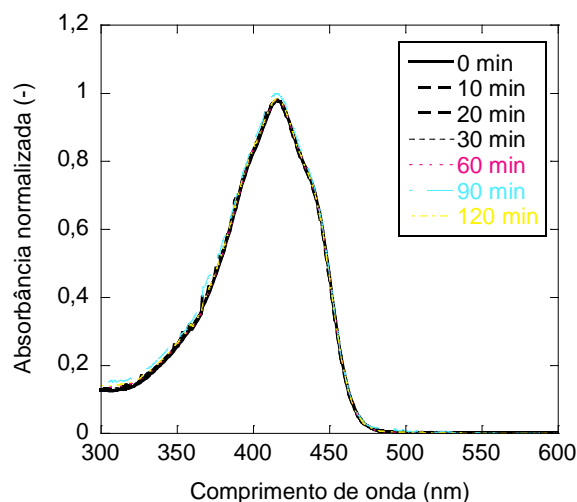


(c) Varredura em UV-Vis.

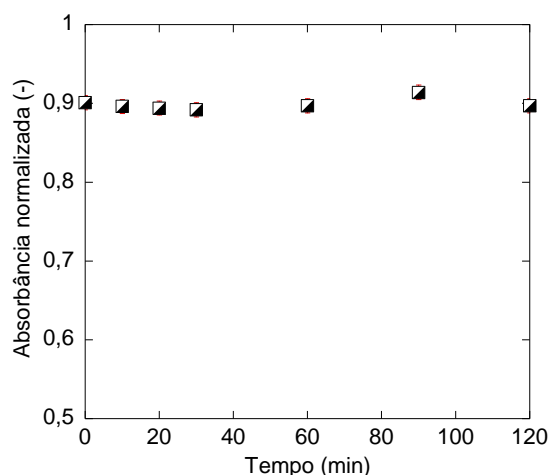


(d) Absorbância em 425 nm ao longo do tempo.

Figura 4 – Absorbâncias da curcumina em diclorometano (a, b) na presença e (c, d) ausência de luz ambiente (barras verticais indicam variação de $\pm 1\%$ do valor medido).

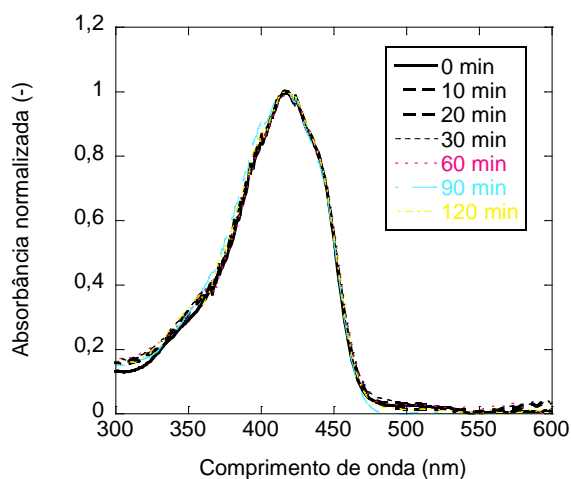


(a) Varredura em UV-Vis.

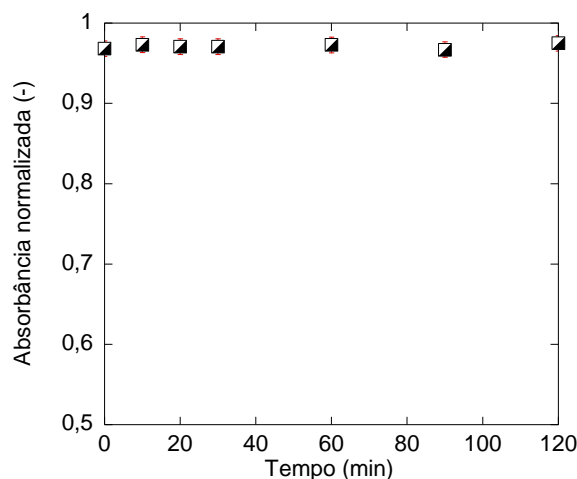


(b) Absorbância em 425 nm ao longo do tempo.

Figura 5 – Absorbâncias da curcumina em PLLA e diclorometano na presença de luz (barras verticais indicam variação de $\pm 1\%$ do valor medido).



(a) Varredura em UV-Vis.



(b) Absorbância em 425 nm ao longo do tempo.

Figura 6 – Absorbâncias da curcumina em Eudragit S100 e diclorometano na presença de luz (barras verticais indicam variação de $\pm 1\%$ do valor medido).

Foi possível observar que a absorbância em clorofórmio na presença da luz diminuiu ao longo do tempo, indicando a degradação da curcumina. Para o caso da curcumina dissolvida em clorofórmio na ausência de luz, a variação da absorbância foi menor que $\pm 1\%$ em relação aos valores medidos, indicando que a curcumina se manteve estável nessas condições. Contudo, realizar os experimentos na ausência de luz requer uma série de cuidados que aumentam a complexidade do procedimento experimental.

O diclorometano, tanto na presença quanto na ausência de luz, não causou alteração significativa na absorbância da curcumina. Para ambos os casos, a variação ocorreu dentro da faixa de $\pm 1\%$ dos valores medidos, conforme exemplificado para o comprimento de onda de 425 nm. Mesmo na presença do PLLA ou de Eudragit S100 não houve variação da absorbância da curcumina após duas horas, o que indica que a presença do solvente e dos polímeros encapsulantes não afetou a curcumina. Dessa forma, diclorometano e os polímeros foram selecionados para a obtenção de nanopartículas contendo curcumina encapsulada pela técnica de miniemulsificação/evaporação de solvente.

6.3.2 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE CURCUMINA

A concentração de curcumina adicionada nas formulações das nanopartículas foi variada em 1, 3, 6 e 18%_{massa}, em função da massa de polímero utilizado. Na Tabela 1 são apresentadas as formulações empregadas nos experimentos para a avaliação da concentração de curcumina. A Tabela 2 apresenta os valores do diâmetro médio (D_z) e do índice de polidispersão de tamanhos (IPD) das nanopartículas, determinadas em duplicata, acompanhadas pela codificação resultante do teste de Tukey. A Tabela 3 apresenta os valores de recuperação percentual e eficiência de encapsulação obtidos para as quatro condições de concentração de curcumina estudadas (realizadas em triplicata), bem como a codificação resultante do teste de Tukey. A determinação da recuperação percentual de curcumina ao final do processo de nanoencapsulação é essencial, pois indica de forma indireta a estabilidade da dispersão formada durante a miniemulsificação. Além disso, para determinar a eficiência de encapsulação é necessário verificar a quantidade de composto encapsulado em função do valor real presente na amostra.

Tabela 1 – Formulações empregadas nos experimentos.

Concentração de curcumina (% _{massa}) [*]	Massa dos componentes (g)				
	Água	Lecitina	Diclorometano	Curcumina	PLLA
1%	22,4683	0,1802	11,5860	0,0042	0,3930
1%	22,4815	0,1800	11,7140	0,0040	0,3924
3%	22,4552	0,1796	11,7161	0,0115	0,3940
3%	22,4426	0,1798	11,5990	0,0121	0,3945
6%	22,4649	0,1799	11,7590	0,0237	0,3935
6%	22,4622	0,1800	11,5560	0,0236	0,3936
18%	22,4461	0,1790	11,6560	0,0706	0,3925
18%	22,4521	0,1790	11,6139	0,0711	0,3932

^{*}Concentração de curcumina em função da massa de polímero.

Tabela 2 – Valores de diâmetro médio (D_z) e índice de polidispersão (IPD) de tamanhos.

Concentração de curcumina (% _{massa})	D _z (nm)	IPD (-)
0	187 ± 6	0,223 ± 0,004
1	184 ± 4	0,195 ± 0,005
3	171 ± 8	0,170 ± 0,034
6	177 ± 6	0,160 ± 0,014
18	187 ± 3	0,216 ± 0,009
<i>p</i> (ANOVA)	0,123	0,0514

Tabela 3 – Valores de recuperação percentual e eficiência de encapsulação para as amostras de curcumina nanoencapsulada com diferentes concentrações de curcumina.

Concentração de curcumina (% _{massa}) [*]	Recuperação (%) ^{**}	EE (%)
1	98,0 ± 1,1 ^a	99,5 ± 0,5
3	98,4 ± 1,2 ^a	99,8 ± 0,2
6	67,0 ± 3,2 ^b	99,8 ± 0,2
18	26,5 ± 0,9 ^c	98,3 ± 1,3
<i>p</i> (ANOVA)	0,000000000129	0,0894

^{*}Concentração de curcumina em relação à massa de polímero.

^{**}Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre os tratamentos (Teste de Tukey).

Tanto para o D_z quanto para o IPD, o teste de Tukey indicou não haver diferença significativa em relação à concentração de curcumina adicionada ao nível de significância de 5%. Os resultados do teste de Tukey permitem observar que, dentre os valores de recuperação percentual, as formulações com 1 e 3%_{massa} de curcumina não apresentaram diferença significativa entre si. A adição de maiores quantidades de curcumina levou à diminuição da recuperação percentual, indicando a perda da estabilidade da miniemulsão e, conseqüentemente, da curcumina adicionada. Esses resultados permitem considerar que nanopartículas contendo concentrações elevadas de curcumina não puderam ser obtidas nas condições experimentais avaliadas. Apesar da recuperação de curcumina depender da quantidade inicial de curcumina adicionada, a eficiência de encapsulação apresentou valores elevados em todas as condições experimentais ao nível de significância de 8,9%, indicando que cerca de 99% de toda a curcumina presente no sistema após o procedimento de preparação das nanopartículas se encontra encapsulada.

Paramera, Konteles e Karathanos (2011) também estudaram a encapsulação de curcumina sob diferentes concentrações, porém utilizando como agente encapsulante células de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e amido modificado. Eles observaram que a eficiência de encapsulação diminuiu com o aumento da proporção de curcumina:células de levedura. Wang *et al.* (2009) encapsularam curcumina em amido poroso e gelatina pela técnica de *spray-drying* identificando que a eficiência de encapsulação aumentou em função da proporção de encapsulante. Estes resultados demonstram a importância da definição de proporções entre agente encapsulante e composto encapsulado, de modo a atingir eficiências de encapsulação satisfatórias. Patel, Tiwari e Velikov (2010) encapsularam curcumina em nanopartículas de zeína (proteína do milho) pela técnica de precipitação em anti-solvente variando também a concentração de curcumina. Os autores observaram que o aumento gradual da quantidade de curcumina levou à diminuição da eficiência de encapsulação, sugerindo que proporções superiores de curcumina podem acarretar em precipitados que acabam se depositando na superfície das partículas e não se incorporam à matriz polimérica. Paramera, Konteles e Kathanos (2011) obtiveram valores de eficiência de

encapsulação variando de 5% a 89%, dependendo das condições experimentais utilizadas e, em geral, maiores concentrações de curcumina levaram a menores eficiências de encapsulação.

6.3.3 INFLUÊNCIA DO SURFATANTE: LAURIL SULFATO DE SÓDIO (SLS) E LECITINA DE SOJA

A Tabela 4 apresenta as formulações empregadas nos experimentos para a avaliação do surfatante. As concentrações de surfatante de lecitina e SLS correspondem à mesma concentração molar. A Tabela 5 apresenta os valores de diâmetro médio (D_z) e índice de polidispersão (IPD) e a análise do teste de Tukey. A Tabela 6 apresenta os valores de recuperação percentual e eficiência de encapsulação e a análise do teste de Tukey.

Tabela 4 – Formulações empregadas nos experimentos.

Surfatante	Massa dos componentes (g)					
	Água	Lecitina*	SLS*	Diclorometano	Curcumina**	PLLA
SLS	22,5665	-	0,0686	11,5960	0,0118	0,3949
SLS	22,4662	-	0,0680	11,6110	0,0118	0,3930
Lecitina	22,4552	0,1796	-	11,7161	0,0115	0,3940
Lecitina	22,4426	0,1798	-	11,5990	0,0121	0,3945

*Concentração de surfatante de $2 \cdot 10^{-5}$ mol/g_{fase orgânica}.

** Concentração de curcumina de 3% em relação à massa de polímero.

Tabela 5 – Valores de diâmetro médio (D_z) e índice de polidispersão (IPD) de tamanhos.

Surfatante*	D_z (nm)	IPD (-)
SLS	155 ± 1	0,170 ± 0,009
Lecitina	171 ± 8	0,170 ± 0,034
p (ANOVA)	0,111	0,985

*[surfatante]= $2 \cdot 10^{-5}$ mol/g_{fase orgânica}.

Tabela 6 – Valores de recuperação percentual e eficiência de encapsulação para as nanopartículas contendo curcumina em função da variação de surfatante.

Surfatante*	Recuperação (%)	EE** (%)
SLS	97,7 ± 1,6	95,6 ± 1,7 ^b
Lecitina	98,4 ± 1,2	99,8 ± 0,2 ^a
<i>p</i> (ANOVA)	0,550	0,0129

*Concentração de surfatante de $2 \cdot 10^{-5}$ mol/g_{fase orgânica}.

**Letras diferentes na coluna indicam que há diferença significativa ao nível de 5% entre os tratamentos (Teste de Tukey).

As nanopartículas obtidas com SLS como surfatante apresentaram valores de D_z menores que os obtidos com lecitina, ao nível de significância de 11%. Os valores de IPD não apresentaram diferença significativa para os dois surfatantes. Musyanovych *et al.* (2008) estudaram a obtenção de nanopartículas de PLLA pela técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente e concluíram que surfatantes iônicos resultam em partículas com diâmetros médios e índice de polidispersão de tamanhos inferiores, em comparação aos outros surfatantes.

Apesar da recuperação percentual não ter sido influenciada pelo tipo de surfatante, a eficiência de encapsulação foi menor quando o SLS foi utilizado. Resultados semelhantes foram obtidos por Leimann (2011), que estudou a eficiência de encapsulação de progesterona em nanopartículas de PHBV através da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente. Isso pode ter ocorrido pelo fato de o SLS ser solúvel na fase aquosa e a lecitina ser solúvel na fase orgânica. A difusão do diclorometano durante a etapa de evaporação pode ter levado à difusão da curcumina para fora das nanopartículas, sendo então estabilizada pelo SLS na fase aquosa.

6.3.4 INFLUÊNCIA DO ENCAPSULANTE: EUDRAGIT S100 E PLLA

A Tabela 7 apresenta as formulações empregadas nos experimentos para a avaliação do polímero encapsulante. Os experimentos foram realizados em duplicata e as proporções mássicas de Eudragit S100 e PLLA utilizadas foram 1:0 (apenas Eudragit S100), 1:1, 1:2 e 0:1 (apenas PLLA). A Tabela 8 apresenta os valores do

diâmetro médio (D_z) e do índice de polidispersão (IPD) de tamanhos obtidos em função da variação da condição experimental, bem como, as codificações determinadas pelo teste de Tukey. A Tabela 9 apresenta os resultados dos valores de recuperação e eficiência de encapsulação de curcumina para as nanopartículas obtidas com diferentes composições de encapsulante.

Tabela 7 – Formulações empregadas nos experimentos.

Polímero encapsulante*	Massa dos componentes (g)					
	Água	Lecitina	Diclorometano	Curcumina †	PLLA	E S100**
E S100 : PLLA (0:1)	22,4552	0,1796	11,7161	0,0115	0,3940	-
E S100 : PLLA (0:1)	22,4426	0,1798	11,5990	0,0121	0,3945	-
E S100 : PLLA (1:0)	22,4822	0,1804	11,6790	0,0120	-	0,3920
E S100 : PLLA (1:0)	22,4811	0,1796	11,5840	0,0122	-	0,3925
E S100 : PLLA (1:1)	22,4731	0,1812	11,6650	0,0118	0,1964	0,1967
E S100 : PLLA (1:1)	22,4532	0,1799	11,5610	0,0118	0,1960	0,1963
E S100 : PLLA (1:2)	22,4531	0,1804	11,6001	0,0120	0,2625	0,1318
E S100 : PLLA (1:2)	22,4903	0,1791	11,5600	0,0121	0,2617	0,1308

* Proporção mássica.

** E S100: Eudragit S100.

† Concentração de curcumina de 3% em relação à massa de polímero.

Tabela 8 – Valores de diâmetro médio (D_z) e índice de polidispersão (IPD) de tamanhos.

Proporção de Polímeros *	D_z (nm)**	IPD (-)
E S100:PLLA 0:1	171 ± 8 ^b	0,170 ± 0,034
E S100:PLLA 1:1	195 ± 9 ^b	0,235 ± 0,023
E S100:PLLA 1:2	183 ± 3 ^b	0,218 ± 0,028
E S100:PLLA 1:0	232 ± 9 ^a	0,235 ± 0,018
<i>p</i> (ANOVA)	0,00601	0,181

E S100: Eudragit S100.

* Concentração de curcumina de 3% em relação à massa de polímero.

** Letras diferentes na coluna indicam que há diferença significativa entre os tratamentos (Teste de Tukey).

Tabela 9 – Valores de recuperação percentual e eficiência de encapsulação curcumina em relação ao agente encapsulante.

Proporção mássica E S100 : PLLA [†]	Recuperação (%) [*]	EE (%) [*]
1:0	72,5 ± 2,6 ^c	99,3 ± 0,1 ^b
1:1	84,1 ± 3,1 ^b	99,5 ± 0,1 ^{a, b}
1:2	85,7 ± 1,2 ^b	99,7 ± 0,2 ^{a, b}
0:1	98,4 ± 1,2 ^a	99,8 ± 0,2 ^a
p (ANOVA)	0,00000424	0,0178

^{*}Letras diferentes na coluna indicam que há diferença significativa entre os tratamentos (Teste de Tukey).

[†] Concentração de curcumina de 3% em relação à massa de polímero.

O D_z aumentou com o aumento da proporção de Eudragit S100 na formulação, efeito que pode estar relacionado com o aumento da viscosidade da mistura diclorometano/encapsulante quando uma maior proporção de Eudragit S100 foi utilizada.

O aumento da proporção de Eudragit S100 levou à diminuição da recuperação percentual de curcumina, possivelmente devido ao maior caráter hidrofílico do Eudragit S100, que possuem menor afinidade pela curcumina. Durante o processo de nanoencapsulação, os grupamentos de ácido metacrílico presentes na estrutura do Eudragit S100, apesar de apresentar afinidade com os grupamentos hidroxila e carbonila da curcumina, podem ter se voltado para a parte externa das nanopartículas, interagindo com a água e reduzindo a intensidade de interação com a curcumina, resultando em uma recuperação percentual menor. A eficiência de encapsulação para o caso de Eudragit S100 como encapsulante também foi estatisticamente menor do que para o PLLA, contudo todas as condições experimentais avaliadas foram eficientes na encapsulação da curcumina.

Apesar dos baixos valores de recuperação apresentado pelas nanopartículas de curcumina com maior proporção de Eudragit S100, a utilização deste polímero se faz muito interessante no que diz respeito a uma futura aplicação na liberação modificada da curcumina. Segundo Thakral, Ray e Majumdar (2010) este polímero apresenta uma propriedade importante relacionada a sua solubilidade dependente

do pH. Os autores desenvolveram um estudo da encapsulação de um fármaco utilizando Eudragit S100 como um dos agentes encapsulantes, juntamente com quitosana, possibilitando o direcionamento do fármaco diretamente no cólon, uma vez que o polímero é completamente degradado em pH neutro. A utilização deste tipo de polímero possibilita controlar a etapa certa em que se deseja liberar o composto bioativo em questão e, no caso da indústria de alimentos, pode ser vista como uma alternativa para aplicação em produtos ácidos, onde a curcumina será liberada somente após sua ingestão.

6.3.5 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

A Figura 7 apresenta os termogramas da curcumina pura, das nanopartículas de PLLA puro e das nanopartículas de PLLA contendo 3%_{massa} de curcumina. Na Figura 8 são apresentados os termogramas da curcumina pura, das nanopartículas de Eudragit S100 e das nanopartículas de Eudragit S100 contendo 3%_{massa} de curcumina. Na Figura 9 são apresentados os termogramas da curcumina pura, das nanopartículas de PLLA, de Eudragit S100 e de PLLA:Eudragit S100 (1:1 m/m; 3%_{massa} de curcumina).

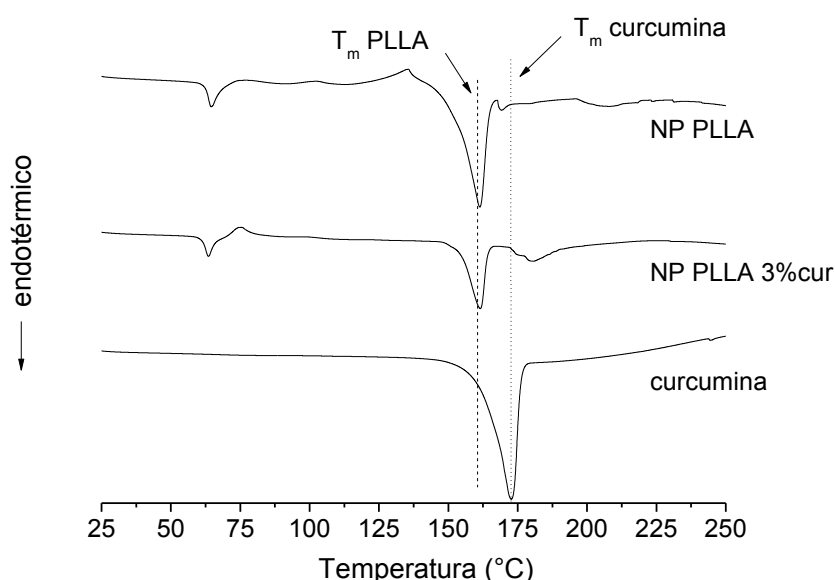


Figura 7 – Termogramas da curcumina, das nanopartículas de PLLA e das nanopartículas de PLLA contendo 3%_{massa} de curcumina. A linha tracejada indica a T_m do PLLA e linha pontilhada indica a T_m da curcumina. (NP: nanopartículas; T_m : temperatura de fusão).

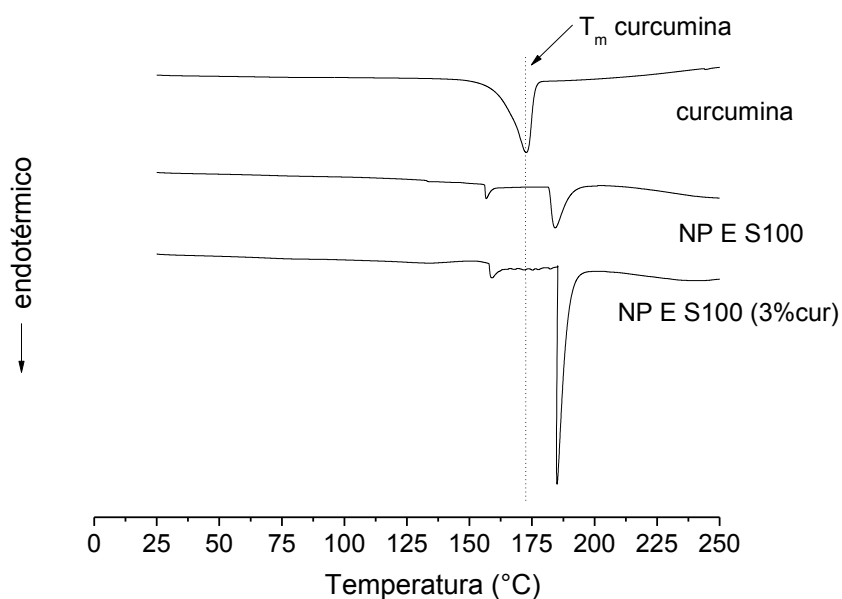


Figura 8 – Termograma da curcumina, do Eudragit S100 e das nanopartículas de Eudragit S100 (NP: nanopartículas; E S100: Eudragit S100; T_m : temperatura de fusão).

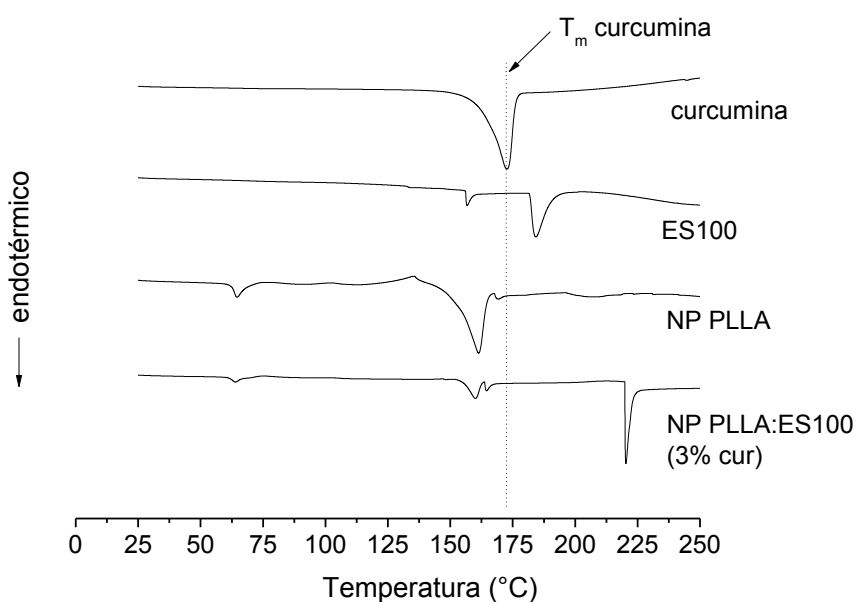


Figura 9 – Termograma da curcumina, do Eudragit S100, e das nanopartículas de PLLA e das nanopartículas de PLLA : Eudragit S100 (1:1 m/m) (NP: nanopartículas; E S100: Eudragit S100; T_m : temperatura de fusão).

É possível identificar o ponto de fusão da curcumina pura na temperatura de 171°C, resultado este de acordo com a literatura (YALLAPU; JAGGI; CHAUHAN, 2010; YALLAPU *et al.*, 2010; GÁLICO *et al.*, 2010; DANDEKAR *et al.*, 2010b). Para

as nanopartículas contendo PLLA (Figura 7) é possível observar um pico a cerca de 60°C que corresponde ao pico de relaxação após a transição vítrea, resultado da história térmica da amostra. Os valores de temperatura de transição vítrea e de fusão do PLLA não foram alteradas pela presença da curcumina.

Para as nanopartículas de Eudragit S100 (Figura 8), a transição vítrea ocorreu a cerca de 160°C e fusão cristalina em 180°C, o que corresponde aos valores descritos na literatura (EVONIK, 2011 e SHARMA *et al.*, 2011, respectivamente) e que não foram afetadas pela presença da curcumina. Na Figura 9 também é possível observar que as propriedades térmicas dos encapsulantes foram mantidas a despeito da presença da curcumina, com exceção da temperatura de fusão do Eudragit S100, que foi deslocado para maiores valores.

Em todos os casos, não foi possível detectar nos termogramas a presença do pico de fusão cristalina da curcumina, sugerindo que ela se encontra em sua forma amorfa distribuída no interior das nanopartículas, ou seja, formando uma mistura sólida homogênea com os encapsulantes. O desaparecimento do pico de fusão cristalina de compostos durante a sua encapsulação é utilizado por diversos autores como uma forte indicação de que tal composto se encontra no interior das partículas e não apenas adsorvido na sua superfície na forma de cristais. Yallapu *et al.* (2010) estudaram a encapsulação da curcumina em PLGA e mediante os resultados de análises térmicas identificaram que as amostras de curcumina nanoencapsulada não apresentaram o pico de fusão característico da curcumina pura, sugerindo a distribuição da curcumina ao longo da matriz polimérica. Yallapu, Jaggi e Chauhan (2010) obtiveram curcumina nanoencapsulada em ciclodextrina e verificaram que o pico de fusão da curcumina desapareceu após a sua encapsulação. Dandekar *et al.* (2010b) encapsularam curcumina em hidrogéis e observaram que o pico endotérmico em torno de 178°C desapareceu após a encapsulação. Os autores comentam que isso pode indicar que o fármaco deve estar presente em um estado amorfo ou em um estado de solução sólida na matriz do polímero, ou ainda como uma fase cristalina desordenada no interior das partículas. Sharma *et al.* (2011) obtiveram resultados semelhantes encapsulando papaína em Eudragit S100 e Maghsoodi (2009) com a encapsulação de naproxeno em Eudragit L100.

A Tabela 10 apresenta os valores de temperatura de fusão e cristalinidade do PLLA. A Figura 10 apresenta em detalhes a região de transição vítrea do PLLA e do Eudragit S100.

Tabela 10 – Temperaturas de fusão e cristalinidade do PLLA nas diferentes condições experimentais.

Condição experimental	T _m (°C)	ΔH _m (J/g)	χ _c (%)
PLLA puro	167	67,5	72,0
Nanopartículas de PLLA	161	45,3	48,4
Nanopartículas de PLLA (Curcumina 1% _{massa})	154	19,1	20,4
Nanopartículas de PLLA (Curcumina 3% _{massa})	161	26,9	28,7
Nanopartículas de E S100:PLLA 1:1** (Curcumina 3% _{massa})	160	22,5*	24,0

*Considerando a proporção mássica de PLLA e Eudragit S100.

** E S100: Eudragit S100.

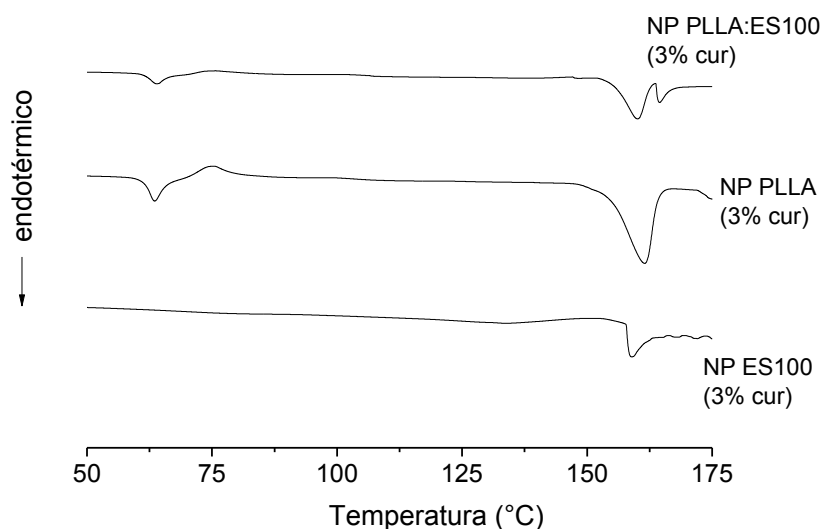


Figura 10 – Termograma das nanopartículas de PLLA : Eudragit S100 (1:1 m/m), PLLA e Eudragit S100 (NP: nanopartículas; E S100: Eudragit S100).

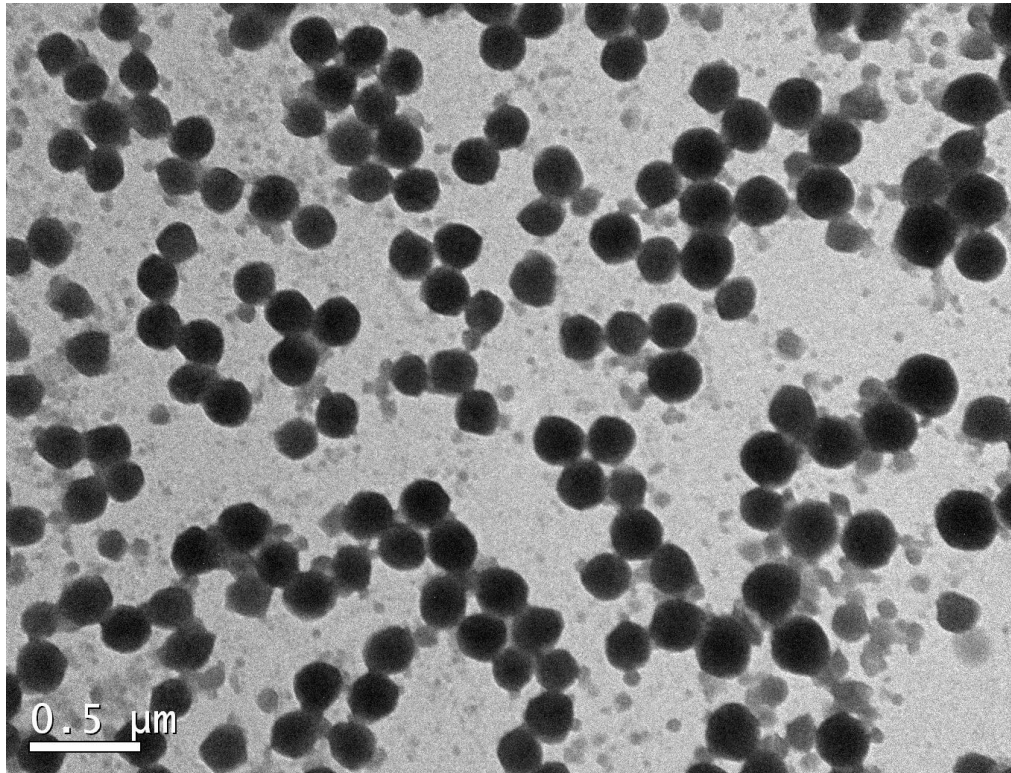
A cristalinidade do PLLA puro, ou seja, antes da obtenção das nanopartículas foi alta, contudo o PLLA na forma de nanopartículas se mostrou menos cristalino possivelmente em decorrência da conformação do polímero durante a evaporação do solvente, fazendo com que o valor de cristalinidade de equilíbrio não fosse

atingido. A presença da curcumina fez diminuir a cristalinidade do PLLA, indicando novamente que esta deve se encontrar no interior das nanopartículas e não na forma de cristais adsorvidos na superfície, por exemplo. Finalmente, a cristalinidade do PLLA quando utilizado em conjunto do Eudragit S100 não apresentou variação, sugerindo que estes polímeros devem formar fases separadas nas nanopartículas.

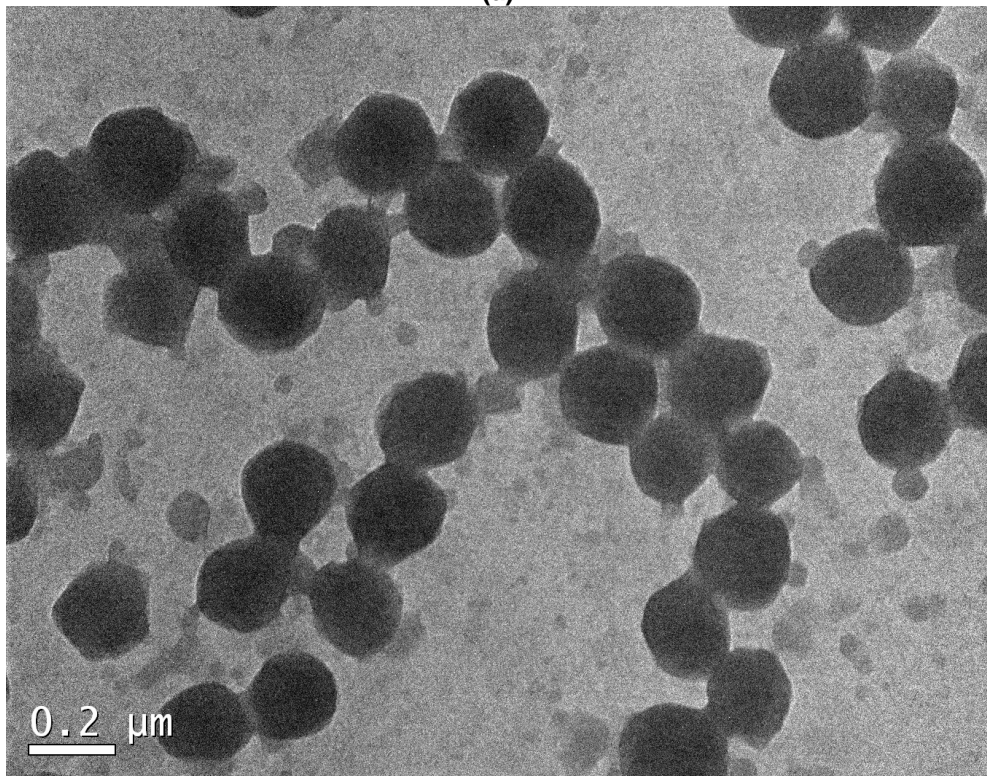
Nas partículas formadas por PLLA e Eudragit S100 (1:1 m/m) é possível observar a presença da transição vítrea do PLLA (cerca de 60 °C) e do Eudragit S100, esta última próxima da temperatura de fusão do PLLA. Comparando com as nanopartículas obtidas com os polímeros separados, nota-se que não houve mudança nas transições vítreas dos polímeros, o que em geral é um indicativo de separação entre as fases poliméricas e de imiscibilidade entre os materiais (PAUL, 1986; LU e WEISS, 1992).

6.3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A Figura 11 apresenta micrografias das nanopartículas de PLLA contendo 1%_{massa} de curcumina. Na Figura 12 são apresentadas imagens das nanopartículas compostas por PLLA e Eudragit S100 (1:1 m/m) contendo 3%_{massa} de curcumina.

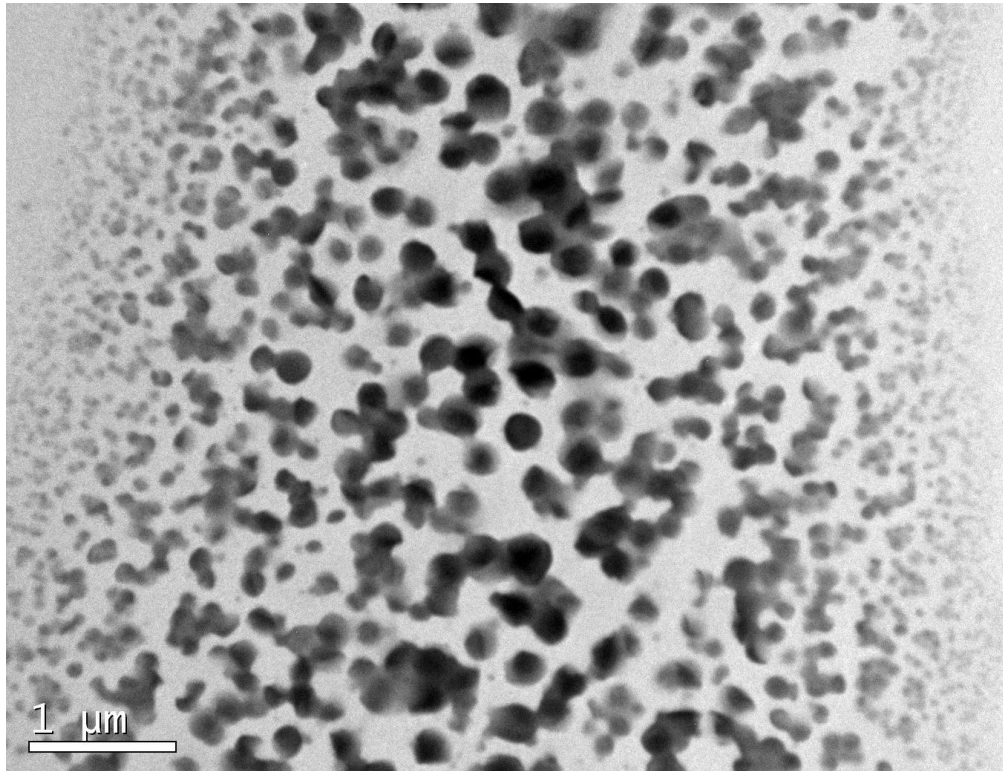


(a)

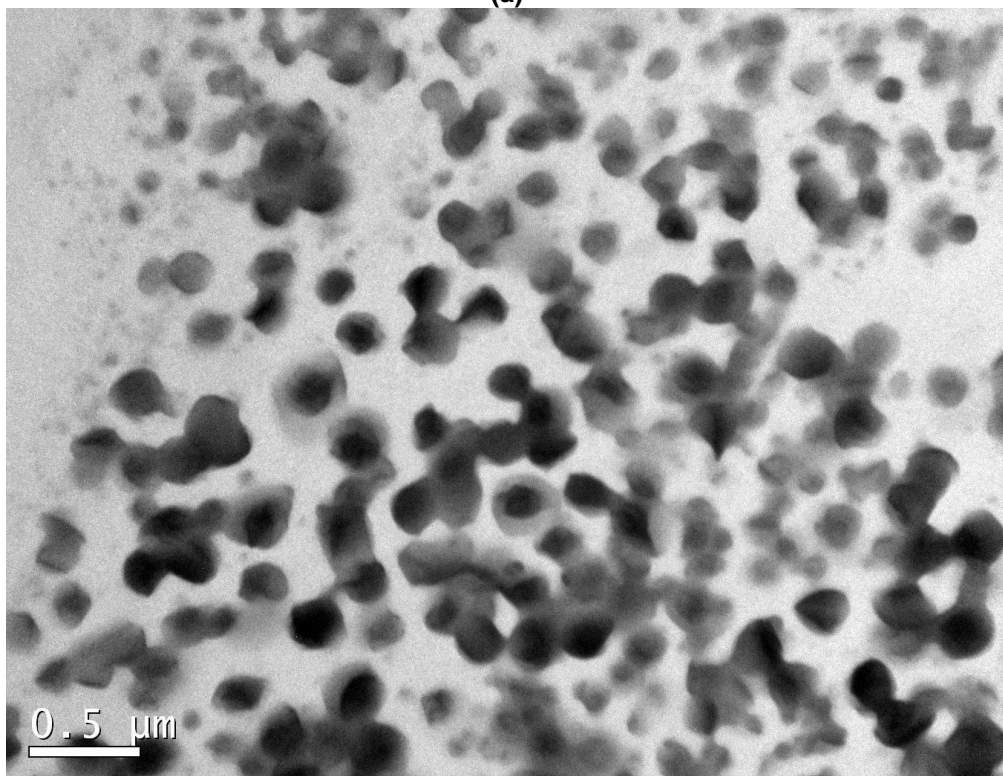


(b)

Figura 11 – Micrografias das nanopartículas de PLLA contendo 1%_{massa} de curcumina.



(a)



(b)

Figura 12 – Micrografias das nanopartículas de PLLA:Eudragit S100 (1:1 m/m) contendo 3%_{massa} de curcumina.

As partículas de PLLA apareceram nas micrografias como esferas compactas com diâmetros de cerca de 200 nm, corroborando os resultados de Espalhamento Dinâmico de Luz (Tabela 2). As nanopartículas de Eudragit e PLLA como encapsulantes apresentaram morfologia com separação de fases entre os polímeros, concordando com os resultados das análises térmicas. Na maioria das nanopartículas o PLLA (cinza claro) aparece na parte mais externa devido ao seu caráter hidrofílico (o Eudragit S100 aparece como cinza escuro/preto).

6.3.7 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

A Figura 13 apresenta os espectros de infravermelho dos compostos utilizados no preparo das nanopartículas: curcumina, PLLA, Eudragit S100 e lecitina e nas Tabelas 11, 12, 13 e 14 são apresentadas as principais bandas de absorção desses compostos. Na Figura 14 são comparados os espectros da curcumina, de nanopartículas de PLLA e de nanopartículas de PLLA contendo 3%_{massa} de curcumina. O espectro das nanopartículas compostas de Eudragit S100 e PLLA contendo 3%_{massa} de curcumina é comparado ao espectro da curcumina pura na Figura 15.

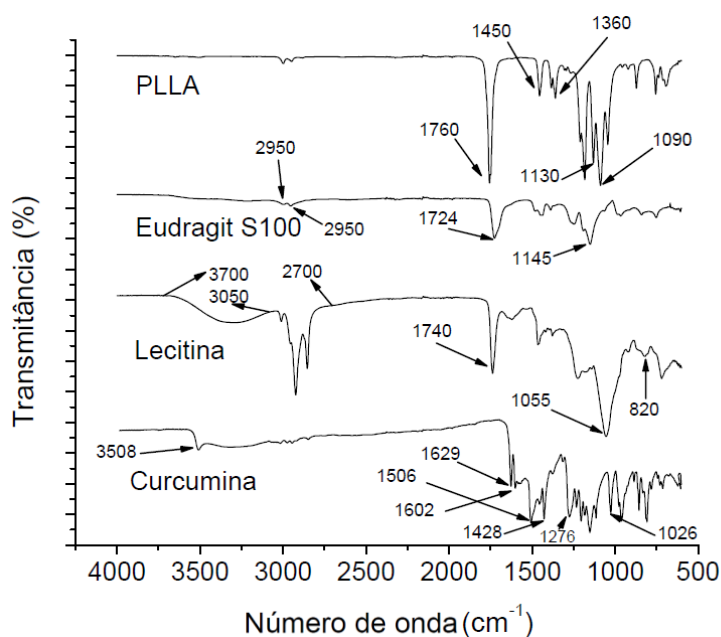


Figura 13 – Espectros FTIR dos compostos utilizados na obtenção de nanopartículas de curcumina.

Tabela 11 – Grupamentos e bandas características da curcumina.

Grupamento	Bandas (cm⁻¹)	Fonte
O-H (axial)	3508	Paramera; Kontheles; Kathanos (2011)
C=O	1629	Paramera; Kontheles; Kathanos (2011)
C-C aromático	1602	Silverstein; Webster; Kiemle (2007), Paramera; Kontheles; Kathanos (2011)
C=O e C=C	1506	Paramera; Kontheles; Kathanos (2011)
C-H olefínico	1428	Paramera; Kontheles; Kathanos (2011)
C-O fenólico (axial)	1276	Silverstein; Webster; Kiemle (2007)
C-O-C (axial simétrica)	1026	Silverstein; Webster; Kiemle (2007)

Tabela 12 – Grupamentos e bandas características do PLLA.

Grupamento	Bandas (cm⁻¹)	Fonte
C-H	1450 e 1360	Cavallaro <i>et al.</i> (1995), Motta; Duek (2006)
C=O	1760	Cavallaro <i>et al.</i> (1995), Motta; Duek (2006)
C-O (estiramento assimétrico)	1130	Drumond; Wang; Mothé (2004)
C-O-C (estiramento simétrico)	1090	Drumond; Wang; Mothé (2004)

Tabela 13 – Grupamentos e bandas características do Eudragit S100.

Grupamento	Bandas (cm⁻¹)	Fonte
C=O	1724	Evonik (2011)
Carboxil esterificado	1730	Evonik (2011)
Ester	1145, 1195 e 1250	Evonik (2011)
C-H	2950 e 3000	Evonik (2011)

Tabela 14 – Grupamentos e bandas características da lecitina.

Grupamento	Bandas (cm ⁻¹)	Fonte
C=O	1740	Nirmala <i>et al.</i> (2011)
O-H do grupo fosfato protonado	3050 - 2700	Silverstein; Webster; Kiemle (2007)
R-O-P-O-R' (estiramento)	1055 e 820	Derkach; Dyakina; Levachev (2005), Silverstein; Webster; Kiemle (2007)
-OH (água adsorvida)	3700 a 3050	Nirmala <i>et al.</i> (2011)

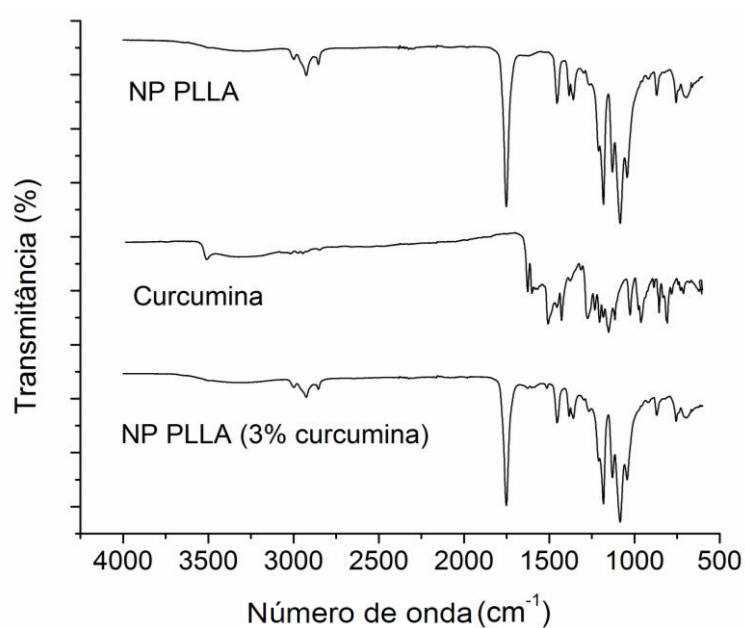


Figura 14 – Espectros FTIR da curcumina, das nanopartículas de PLLA e das nanopartículas de PLLA contendo 3%_{massa} de curcumina.

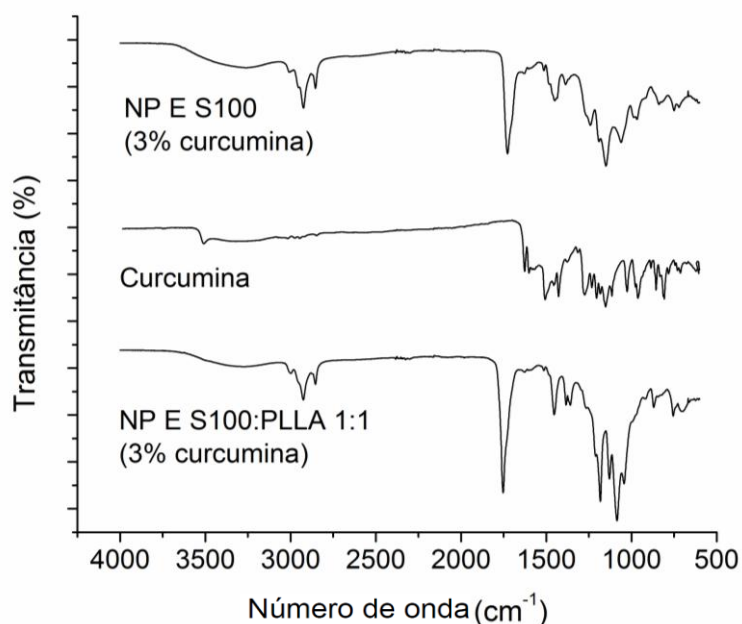


Figura 15 – Espectros FTIR da curcumina e das nanopartículas de PLLA:Eudragit S100 (1:1) contendo 3%_{massa} de curcumina.

Na análise desses dados é importante notar que os espectros foram normalizados a fim de que as diferenças de concentração dos constituintes não invalidassem as discussões. A banda do grupamento –OH fenólico (3508 cm^{-1}) é frequentemente utilizada para avaliar as interações entre a curcumina e os materiais encapsulantes (YALLAPU *et al.*, 2010; PARAMERA; KONTELES; KATHANOS, 2011). A comparação dos espectros das nanopartículas de PLLA e de Eudragit S100 mostra que as bandas da curcumina apresentam menor intensidade após a sua encapsulação, permanecendo apenas as bandas características dos encapsulantes. Esse efeito pode ser atribuído ao fato de a curcumina estar localizada no interior das nanopartículas, corroborando os resultados das análises térmicas.

6.4 CONCLUSÕES

A encapsulação da curcumina em polímeros biocompatíveis foi realizada através da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente. Os resultados demonstraram que o clorofórmio levou ao decréscimo da intensidade na absorbância na região de 425 nm na presença de luz, indicando que este não é um solvente adequado para a nanoencapsulação da curcumina. O diclorometano não

levou à mudança nos espectros de UV-Vis da curcumina mesmo na presença de luz, sugerindo que este seja um solvente adequado. A presença do poli(L-ácido láctico) e de Eudragit S100 também não apresentou influência sobre a degradação da curcumina.

A produção de nanopartículas com diferentes concentrações de curcumina demonstraram que existe uma quantidade máxima (em torno de 3%_{massa}) que pode ser encapsulada nas condições experimentais avaliadas. Os valores de diâmetro médio (D_z) e índice de polidispersão (IPD) das partículas não sofreram influência significativa com a variação da concentração de curcumina.

De acordo com as análises térmicas e de espectroscopia de infravermelho, a curcumina encontra-se no interior das nanopartículas, formando uma mistura sólida homogênea com os polímeros encapsulantes. As imagens de microscopia eletrônica de transmissão mostraram que houve separação de fases entre o PLLA e o Eudragit S100.

De um modo geral, pode-se concluir que o processo de miniemulsificação/evaporação do solvente é uma técnica robusta para a obtenção de nanopartículas contendo curcumina já que altos valores de eficiência de encapsulação foram encontrados para diferentes condições experimentais.

CAPÍTULO 7

CONCLUSÕES GERAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A seguir são listadas as principais conclusões encontradas no trabalho.

O planejamento fatorial completo 2⁴, realizado para avaliar a influência de condições experimentais no tamanho das nanopartículas de poli(L-ácido láctico) (PLLA), demonstrou a existência de interações significativas entre a concentração de lecitina, de PLLA, da fração volumétrica de fase dispersa e da relação diclorometano/clorofórmio, levando a comportamentos não lineares do tamanho médio e da polidispersão de tamanhos.

Os estudos das figuras de mérito da análise de espectroscopia de UV-Vis demonstraram que é possível determinar com segurança os valores de recuperação percentual e de eficiência de encapsulação da curcumina nas nanopartículas.

Os testes de estabilidade da curcumina demonstraram que o solvente diclorometano e os polímeros PLLA e Eudragit S100 não causaram mudanças acentuadas nos espectros de absorção da curcumina (425 nm), diferente do que foi observado para o clorofórmio, sugerindo que os mesmos sejam adequados para utilização no processo de produção de nanopartículas de curcumina pelo método de miniemulsificação/evaporação do solvente.

A variação da concentração de curcumina na produção de nanopartículas provocou diferença significativa nos valores de recuperação percentual, que diminuiu quando a concentração de curcumina utilizada foi superior a 3%_{massa}, caracterizando menor estabilidade da miniemulsão. Contudo, para eficiência de encapsulação, os valores não apresentaram diferença significativa indicando que apesar das perdas durante o processamento as amostras apresentaram alta eficiência de encapsulação. Os valores de diâmetro médio (D_z) e índice de polidispersão (IPD) das partículas também não sofreram influência significativa com a variação da concentração de curcumina.

A lecitina de soja se mostrou um eficiente surfatante para o sistema, pois levou à formação de miniemulsões estáveis e também por ser um surfatante biocompatível. A utilização de Eudragit S100 nas formulações de nanopartículas levou a baixos valores de recuperação de curcumina, contudo apresentando altos valores de eficiência de encapsulação.

Ao contrário da curcumina *in natura*, as nanopartículas contendo curcumina puderam ser prontamente dispersas em água destilada, encorajando seu uso em formulações alimentícias.

As análises de calorimetria diferencial de varredura apresentaram o desaparecimento do pico de fusão da curcumina após a sua encapsulação, indicando que a mesma encontra-se em sua forma amorfa distribuída no interior das nanopartículas. As análises de FTIR demonstraram pela comparação dos espectros das nanopartículas de curcumina encapsulada em PLLA e de Eudragit S100 que as bandas de curcumina apresentaram menor intensidade após a sua encapsulação, permanecendo apenas as bandas características dos encapsulantes, efeito esse também atribuído ao fato de a curcumina estar localizada no interior das nanopartículas.

De acordo com as análises térmicas e de espectroscopia de infravermelho, a curcumina encontra-se no interior das nanopartículas, formando uma mistura sólida homogênea com os polímeros encapsulantes. As imagens de microscopia eletrônica de transmissão mostraram que houve separação de fases entre o PLLA e o Eudragit S100.

Para trabalhos futuros são sugeridos os seguintes a serem abordados:

- Avaliar a atividade antioxidante da curcumina nanoencapsulada;
- Estudar o processo de liberação *in vitro* e *in vivo* das nanopartículas de curcumina encapsulada em PLLA e em Eudragit S100;
- Avaliar a aplicação das nanopartículas como corante em produtos alimentícios de caráter hidrofílico, como sucos de frutas e gelatinas;
- Estudar a tensão interfacial entre os polímeros e demais componentes das nanopartículas;
- Estudar a estabilidade das nanopartículas em função do tempo e condições de armazenamento;
- Estudar a aplicação de outros tipos de surfatantes biocompatíveis.

REFERÊNCIAS

ABISMAÏL, B.; CANSELIER, J.P.; WILHELM, A.M.; DELMAS, H.; GOURDON, C. Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 6, p. 75–83. 1999.

AGGARWAL, B. B.; KUMAR, A.; BHARTI, A. C. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Research*, v. 23, p. 363-398. 2003.

AGGARWAL, B. B.; SUNDARAM, C.; MALANI, N.; ICHIKAWA, H. "Curcumin: the Indian solid gold". *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 595, p. 1-75. 2007.

AK, T.; GÜLÇİN, İ. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem. Biol. Interact.* v. 174, p. 27-37. 2008.

ALVES, L. D. S.; ROLIM, L. A.; FONTES, D. A. F.; ROLIM-NETO, P. J. Desenvolvimento de Método Analítico para Quantificação do Efavirenz por Espectrofotometria no UV-Vis. *Química Nova*, v. 33, n. 9, p. 1967-1972. 2010.

ANAND, P.; KUNNUMAKKARA, A. B.; NEWMAN, R. A.; AGGARWAL, B. B. Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. *Molecular Pharmaceutics*, v. 4 n. 6, p. 807-818. 2009.

ANAND P., NAIR. H. B., SUNG B., KUNNUMAKKARA A. B., YADAV V. R., TEKMAL R. R. Design of curcumin-loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity *in vitro* and superior bioavailability *in vivo*. *Biochemical Pharmacology*, v. 79, p. 330-338. 2010.

ANITHA, A.; MAYA, S.; DEEPA, N.; CHENNAZHI, K. P.; NAIR, S. V.; TAMURA, H.; JAYAKUMAR, R. Efficient water soluble O-carboxymethyl chitosan nanocarrier for the delivery of curcumin to cancer cells. *Carbohydrate Polymers*, v. 83, p. 452-461. 2011.

ANTON, N; BENOIT, J-P; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-A review. *Journal of Controlled Release*, v. 128, p. 185–199. 2008.

ASTETE, C. E.; KUMAR, C. S. S. R.; SABLIOV, C. M. Size control of poly(D,L-lactide-co-glycolide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide)-magnetite nanoparticles synthesized by emulsion evaporation technique. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 299, p. 209-216. 2007.

ASUA, J. M. Miniemulsion polymerization. *Progress in Polymer Science*, v. 27, p. 1283-1346. 2002.

BARAN, E. T; ÖZER, N; HASIRCI, V. Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) nanocapsules as enzyme carriers for cancer therapy: an in vitro study. *Journal of Microencapsulation*, v. 19, n. 3, p. 363-376. 2002a.

BARAN, E. T; ÖZER, N; HASIRCI, V. In vivo half life of nanoencapsulated L-asparaginase. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 13, p. 1113-1121. 2002b.

BEHREND, O.; AX, K.; SCHUBERT, H. Influence of continuous phase viscosity on emulsification by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 7, p. 77–85. 2000.

BENDIX, D. Chemical synthesis of polylactide and its copolymers for medical applications. *Polymer Degradation and Stability*, v. 59, p. 129-135. 1998.

BISHT, S.; FELDMANN, G.; SONI, S.; RAVI, R.; KARIKAR, C.; MAITRA, A.; MAITRA, A. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin ("nanocurcumin"): a novel strategy for human cancer therapy. *Journal of Nanobiotechnology*, v. 5, n. 3, p. 1-18. 2007.

BLOUZA, I. L; CHARCOSSET, C; SFAR, S; FESSI, H. Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 325, p. 124–131. 2006.

BRASIL. Resolução RE nº999 de 29/5/2003. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02/06/2003, seção 1 - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprova o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.

BRASIL. Informe Técnico nº. 30, de 24 de julho de 2007. Considerações sobre o corante amarelo tartrazina. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/30_240707.htm> Acesso em: setembro de 2011.

BUDHIAN, A.; SIEGEL, S. J.; WINEY, K. I. Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: systematic study of particle size and drug content. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 336, p. 367–375. 2007.

CAVALLARO, G.; MANNA, G. L.; LIVERI, V. T.; ALIOTTA, F.; FONTANELLA, M. E. Structural Investigation of Water/Lecithin/Cyclohexane Microemulsions by FT-IR Spectroscopy. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 176, p. 281-285. 1995.

COSTA, M. S.; DUARTE, A. R. C.; CARDOSO, M. M.; DUARTE, C. M. M. Supercritical antisolvent precipitation of PHBV microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 328, p. 72-77. 2007.

CUNICO, M. W. M.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; ZAWADZKI, S. F.; PERALTA-ZAMORA, P.; VOLPATO, N. Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. *Visão Acadêmica, Curitiba*, v. 9, n.1, p. 23-32. 2008.

DANDEKAR, P.; DHUMAL, R.; JAIN, R.; TIWARI, D.; VANAGE, G.; PATRAVALE, V. Toxicological evaluation of pH-sensitive nanoparticles of curcumin: Acute, sub-acute and genotoxicity studies. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, p. 2073-2089. 2010a.

DANDEKAR, P. P.; JAIN, R.; PATIL, S.; DHUMAL, R.; TIWARI, D.; SHARMA, S.; VANAGE, G.; PATRAVALE, V. Curcumin-Loaded Hydrogel Nanoparticles: Application in Anti-Malarial Therapy and Toxicological Evaluation. *Pharmaceutical Nanotechnology*, v. 99, n. 12, p. 4992-5010. 2010b.

DAS, R. K.; KASOJU, N.; BORA, U. Encapsulation of curcumin in alginate-chitosan-pluronic composite nanoparticles for delivery to cancer cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 6, p. 153–160. 2010.

DERKACH; S. R.; DYAKINA, T. A.; LEVACHEV; S. M. Redistribution of Water and Gelatin between Contacting Liquid Phases According to the IR Spectroscopy Data: The Role of Lecithin. *Colloid Journal*, v. 67, N. 5, p. 547-553. 2005.

DONG, Y.; FENG, S-S. Nanoparticles of poly(D,L-lactide)/methoxy poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) blends for controlled release of paclitaxel. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 78, p. 12-19. 2006.

DRUMOND; W. S., WANG, S. H., MOTHÉ, C. G. Síntese e caracterização do copolímero Poli (Ácido Lático-B-Glicol Etilênico). *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, Associação Brasileira de Polímeros, v. 14, n. 2, abril-junho, p. 74-79. 2004.

EL-AASSER, M.S.; VANDERHOFF, J.W.; MISRA, S. C.; MANSON, J. A. Electron Microscopy of Epoxy Latexes and Their Films. *J. Coatings Technology*, v. 49, n. 635, p. 71-78. 1977.

EVONIK. Evonik Industries AG. Technical Information: Eudragit L 100 and Eudragit S100, INFO 7.3/E, p. 1-7. October, 2011.

FDA, U.S. Food and Drug Administration, disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfNewListing.cfm?rpt=cediListing&id=632>> Acesso em: agosto de 2011.

FRANCESCHI, E; DE CESARO, A. M; FEITEN, M; FERREIRA, S. R. S; DARIVA, C; KUNITA, M. H; RUBIRA, A. F; MUNIZ, E. C; CORAZZA, M. L; OLIVEIRA, J. V. Precipitation of β -carotene and PHBV and co-precipitation from SEDS technique using supercritical CO₂. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 47, p. 259-269. 2008.

GÁLICO, D. A.; FUGITA, R. A.; GERRA, R. B.; HOLANDA, B. B. C.; PERPÉTUO, G. L.; BANNACH, G. Estudo térmico e espectroscópico da Curcumina. 34^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2010.

GANGRADE, N.; PRICE, J. C. Poly(hydroxybutyrate-hydroxivalerate) microspheres containing progesterone: preparation, morphology and release properties. *Journal of Microencapsulation*, v. 8, n.2, p. 185-202. 1991.

GARCÍA, M.; FORBE, T.; GONZALEZ, E. Potential applications of nanotechnology in the agro-food sector. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 30, n. 3, p. 573-581. 2010.

GARLOTTA, D. A Literature Review of Poly(Lactic Acid). *Journal of Polymers and the Environment*, v. 2, p. 63-84. 2001.

GILDA S.; KANITKAR, M; BHONDE, R; PARADKAR, A. Activity of water-soluble turmeric extract using hydrophilic excipients. *Food Science and Technology*, v. 43, n. 1, p. 59-66. 2010.

GOMEZ-ESTACA, J.; BALAGUER, M. P.; GAVARA, R.; HERNANDEZ-MUNOZ, P. Formation of zein nanoparticles by electrohydrodynamic atomization: Effect of the main processing variables and suitability for encapsulating the food coloring and active ingredient curcumin. *Food Hydrocolloids*, v. 28, p. 82-91. 2012.

GRILLO, R.; MELO, N. F. S.; ARAÚJO, D. R.; PAULA, E.; DIAS FILHO, N. L.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Validation of an HPLC Method for quantitative Determination of Benzocaine in PHBV-Microparticles and PLA-Nanoparticles. *Latin American Journal of Pharmacy (formerly Acta Farmacéutica Bonaerense)*, v. 28, n.3, p. 393-399. 2009.

HATCHER, H.; PLANALP, R.; CHO, J.; TORTI, F. M.; TORTI, S. V. Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 65, p. 1631-1652. 2008.

ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (Q2R1). International Conference on Harmonisation, Geneva, 13 p. 2005.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.

JEON, H.-J.; JEONG, Y.-I.; JANG, M.-K.; PARK, Y.-H.; NAH, J.-W. Effect of solvent on the preparation of surfactant-free poly(dl-lactide-co-glycolide) nanoparticles and norfloxacin release characteristics. *International Journal Of Pharmaceutics*, v. 207, p. 99-108. 2000.

KERMABON-AVON, G.; BRESSY, C., MARGAILLAN, A. Statistical design strategies to optimize properties in miniemulsion polymerization of methyl methacrylate. *European Polymer Journal*, v. 45, p. 1208-1216. 2009.

LEGRAND, P.; LESIEUR, S.; BOCHOT, A.; GREF, R.; RAATJES, W.; BARRATT, G.; VAUTHIER, C. Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 344, p. 33-43. 2007.

LEIMANN, F. V.; MUSYANOVYCH, A.; SAYER, C.; LANDFESTER, K.; ARAUJO, P. H. H. Hydrolysis of PHBV nanoparticles prepared via miniemulsion technique. In: 7th International Symposium on Natural Polymers and Composites, ISNaPol, 2010, Gramado, RS. 7th ISNaPol, 2010.

LEIMANN, F. V. Nanopartículas híbridas de polímero natural (PHBV)/polímero sintético. Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Abril. 133 p. 2011.

LEIMANN, F. V.; BIZ, M. H. ; MUSYANOVYCH, A. ; SAYER, C. ; LANDFESTER, K.; ARAUJO, P. H. H. . Hydrolysis of Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) nanoparticles. Journal of Applied Polymer Science (Online), v. 128, p. 3093-3098, 2013.

LEIMANN, F. V.; CARDOZO FILHO, L.; SAYER, C.; ARAUJO, P. H. H. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Nanoparticles Prepared by Miniemulsion/Solvent Evaporation Technique. Effect of PHBV Molar Mass and Concentration. Brazilian Journal of Chemical Engineering (Impresso), 2012 (*in press*).

LERTSUTTHIWONG, P.; NOOMUN, K.; JONGAROONNGAMSANG, N., ROJSITTHISAK, P., NIMMANNIT, U. Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil. Carbohydr. Polym., v. 74, p. 209–214. 2008.

LIN, C-C.; LIN, H-Y.; C., H-C.; YU, M-W.; LEE, M-H. Stability and characterisation of phospholipid-based curcumin-encapsulated microemulsions. Food Chemistry, v. 116, p. 923–928. 2009.

LU, X.; WEISS, R. A. Relationship between the Glass Transition Temperature and the Interaction Parameter of Miscible Binary Polymer Blends. Macromolecules, v. 25, p. 3242-3246. 1992.

MADENE, A.; JACQUOT, M.; SCHER, J.; DESOBRY, S. Flavor encapsulation and controlled release – a review. International Journal of Food Science and Technology, v. 41, p. 1-21, 2006.

MAHESHWARI, R. K.; SINGH, A. K.; GADDIPATI, J.; SRIMAL, R. C. Multiple biological activities of curcumin: A short review. Life Sciences, v. 78, p. 2081-2087. 2006.

MALVERN. Malvern Instruments Worldwide. What Does Polydispersity Mean? Frequently asked question, 2002, p. 1-3. Disponível em: <[http://www.malvern.com/malvern/kbase.nsf/allbyno/KB000792/\\$file/MRK656-01_An_Introduction_to_DLS.pdf](http://www.malvern.com/malvern/kbase.nsf/allbyno/KB000792/$file/MRK656-01_An_Introduction_to_DLS.pdf)>

MALVERN. Malvern Instruments Worldwide. Dynamic Light Scattering: common terms defined. Inform white paper, 2011, p. 1-6. Disponível em: <[http://www.malvern.com/malvern/kbase.nsf/allbyno/KB003060/\\$file/MRK1764-01_INFORM_DLS%20terms%20defined.pdf](http://www.malvern.com/malvern/kbase.nsf/allbyno/KB003060/$file/MRK1764-01_INFORM_DLS%20terms%20defined.pdf)>

MARIE, E.; LANDFESTER, K.; ANTONIETTI, M. Synthesis of Chitosan-Stabilized Polymer Dispersions, Capsules, and Chitosan Grafting Products via Miniemulsion. *Biomacromolecules*, v. 3, p. 475-481. 2002.

MAGHSOODI, M. Physicomechanical Properties of Naproxen-Loaded Microparticles Prepared from Eudragit L100. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, v. 10, n. 1, p. 120-128. 2009.

MISHRA, V. K.; MOHAMMADA, G.; MISHRA, S. K. Downregulation of telomerase activity may enhanced by nanoparticle mediated curcumin delivery. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, v. 3, n. 4, p. 163-169. 2008.

MOINARD-CHÉCOT, D; CHEVALIER, Y; BRIANÇON, S; BENEY, L; FESSI, H. Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion–diffusion process. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 317, p. 458-468. 2008.

MOTTA. A. C.; DUEK, E. A. R. Síntese, Caracterização e Degradação “ *in vitro*” do Poli(L-ácido láctico). *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 16, n. 1, p. 26-32. 2006.

MUJUMDAR, S.; SENTHIL; K. P.; PANDIT A. B. Emulsification by ultrasound: Relation between intensity and emulsion quality. *Indian Journal of Chemical Technology*, v. 4, n.6, p. 277-284. 1997.

MUSTAFIN, R. I. Drug synthesis methods and manufacturing technology interpolymer combinations of chemically complementary grades of eudragit copolymers: a new direction in the design of peroral solid dosage forms of drug delivery systems with controlled release (Review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, v. 45, n. 5, p. 28-30. 2011.

MUSYANOVYCH, A; SCHMITZ-WIENKE, J; MAILÄNDER, V; WALTHER, P; LANDFESTER, K. Preparation of Biodegradable Polymer Nanoparticles by Miniemulsion Technique and Their Cell Interactions. *Macromolecular Bioscience*, v. 8, p. 127-139. 2008.

NIRMALA, R.; PARK, H.-M.; NAVAMATHAVAN, R.; KANG, H.-S.; EL-NEWEHY, M. H.; KIM, H. Y. Lecithin blended polyamide-6 high aspect ratio nanofiber scaffolds via electrospinning for human osteoblast cell culture. *Materials Science and Engineering C*, v. 31, p. 486-493. 2011.

OBEIDAT, W. M.; PRICE, J. C. Preparation and evaluation of Eudragit S100 microspheres as pH-sensitive release preparations for piroxicam and theophylline using the emulsion–solvent evaporation method. *Journal of Microencapsulation*, v. 23, p. 192-202. 2006.

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, p. 913–922. 2011.

PARI, L.; TEWAS, D.; ECKEL, J. Role of curcumin in health and disease. *Arch Physiol Biochem*, v. 2, n. 114, p. 127-49. 2008.

PATEL, A.; HU, H.; TIWARI, J. K.; VELIKOV, K. P. Synthesis and characterisation of zein–curcumin colloidal particles. *Soft Matter*, v. 6, p. 6192-6199. 2010.

PAUL, D. R. Polymer blends: phase behavior and property relationships. Paul, D. R.; Sperling, L. H. (Eds), *Advances in chemistry series 211. Multicomponent polymer materials*, American Chemical Society, Washington, DC (1986), p. 3-19.

PFEIFFER, E.; HÖHLE, S.; SOLYOM, A. M.; METZLER, M. Studies on the stability of turmeric constituents. *Journal of Food Engineering*, v. 56, p. 257-259. 2003.

PICH, A.; SCHIEMENZ, N.; CORTEN, C.; ADLER, H-J P. Preparation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) particles in O/W emulsion. *Polymer*, v. 47, p. 1912–1920. 2006.

POLETTI, F. S; JÄGER, E; RE, M. I; GUTERRES, S. S; POHLMANN, A. R. Rate-modulating PHBV/PCL microparticles containing weak acid model drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 345, p. 70–80. 2007.

POLETTI, F. S; FIEL, L. A; DONIDA, B; RE, M. I; GUTERRES, S. S; POHLMANN, A. R. Controlling the size of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) nanoparticles prepared by emulsification–diffusion technique using ethanol as surface agent. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, v. 324, p. 105–112. 2008.

PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Corantes artificiais em alimentos. Alim. Nutr., Araraquara, v. 14, n. 2, p. 237-250. 2003.

PRAKOBVAITAYAKIT, M.; NIMMANNIT, U. Optimization of polylactic-co-glycolic acid nanoparticles containing itra-conazole using 23 factorial design. American Association of Pharmaceutical Scientists, v. 4, p. 1-9. 2003.

PRIAMO, W. L.; CESARO, A. M.; BENETTI, S. C.; OLIVEIRA, J. V.; FERREIRA, S. In vitro release profiles of β -carotene encapsulated in PHBV by means of supercritical carbon dioxide micronization technique. Journal of Supercritical Fluids, v. 56, p. 137-143. 2011.

REIMERS, J. L.; SCHORK, F. J. Predominant Droplet Nucleation in Emulsion Polymerization. Journal of Applied Polymer Science, v. 60, p. 251-262. 1996.

REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, v. 2, p. 8–21. 2006.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Química Nova, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO; F. A.; FERREIRA, M. M. C. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. Química Nova, v. 31, n. 1, p. 164-171. 2008.

RODRIGUES, M. I; LEMMA, A. F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos. 2 ed., Campinas, SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 358 p. 2009.

ROMIO, AP. P; BERNARDY, N; SENNA, E. L; ARAÚJO, P. H. H; SAYER, C. Polymeric nanocapsules via miniemulsion polymerization using redox initiation. Materials Science and Engineering C, v. 29, p. 514-518. 2009a.

ROMIO, A. P; SAYER, C; ARAÚJO, P. H. H; AL-HAYDARI, M; WU, L; da ROCHA, S. P. Nanocapsules by Miniemulsion Polymerization with Biodegradable Surfactant and Hydrophobe. Macromolecular Chemistry and Physics, v. 210, p. 747-751. 2009b.

SHAIKH, J.; ANKOLAB, D. D.; BENIWAL, V.; SINGHA, D.; KUMAR, M. N. V. R. Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, n. 37, p. 223-230. 2009.

SHAO, J.; ZHENG, D.; JIANG, Z.; XU, H.; HU, Y.; LI, X.; LU, X. Curcumin delivery by methoxy polyethylene glycol–poly(caprolactone) nanoparticles inhibits the growth of C6 glioma cells. *Acta Biochim Biophys Sin*, v. 43, n.4, p. 267-274. 2011.

SHARMA, M.; SHARMA, V.; PANDA, A. K.; MAJUMDAR, D. K. Development of enteric submicron particle formulation of papain for oral delivery. *International Journal of Nanomedicine*, v. 6, p. 2097-2111. 2011.

SILVA-BUZANELLO, R. A.; ESPERANÇA, E. S.; SOUZA, M. F.; LEIMANN, F. V.; GONÇALVES, O. H. Influência de condições operacionais na obtenção de nanopartículas de poliestireno. *Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos, Campo Mourão, PR*, v. 2, n. 1, p. 33-37. 2011.

SONG, K. C.; LEE, H. S.; CHOUNG, I. Y.; CHO, K. I.; AHN, Y.; CHOI, E. J. The effect of type of organic phase solvents on the particle size of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 276, p. 162-167. 2006.

SONG, Z.; FENG, R.; SUN, M.; GUO, C.; GAO, Y.; LI, L.; ZHAI, G. Curcumin-loaded PLGA-PEG-PLGA triblock copolymeric micelles: Preparation, pharmacokinetics and distribution in vivo. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 354, p. 116-123. 2011.

STEINMACHER, F. R.; BERNARDY, N.; MORETTO, J. B.; BARCELOS, E. I.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C. Kinetics of MMA and VAc Miniemulsion Polymerizations Using Miglyol and Castor Oil as Hydrophobe and Liquid Core. *Chemical Engineering Technology*, v. 33, n. 11, p. 1-12. 2010.

THAKRAL, N. K.; RAY, A. R.; MAJUMDAR, D. K. Eudragit S-100 entrapped chitosan microspheres of valdecoxib for colon cancer. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 21, p. 2691-2699. 2010.

URBAN, M.; MUSYANOVYCH, A.; LANDFESTER, K. Fluorescent Superparamagnetic Polylactide Nanoparticles by Combination of Miniemulsion and Emulsion/Solvent Evaporation Techniques. *Macromolecular Chemistry and Physics*, v. 210, p. 961-970. 2009.

USP. United States Pharmacopeia Convention; US Pharmacopeia 24, Validation of Compendial Methods, 1225, Rockville, 1999.

VANDERHOFF, J. W., EL-AASSER, M. S.; HOFFMAN, J. D., US Patent 4,070,323. 1978.

VANDERHOFF, J. W.; EL-AASSER, M. S.; UGELSTAD, J. U.S. Patent 4,177,177. 1979.

WANG, C.; YE, W.; ZHENG, Y.; LIU, X.; TONG, Z. Fabrication of drug-loaded biodegradable microcapsules for controlled release by combination of solvent evaporation and layer-by-layer self-assembly. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 338, p. 165-173. 2007.

WANG, S. T.; SCHORK, F. J.; POEHLEIN, C. W.; COOCH, J. W. Emulsion and Miniemulsion Copolymerization of Acrylic Monomers in the Presence of Alkyd Resin. *Journal of Applied Polymer Science*, v 60 (12), p. 2069-2076. 1998.

WANG, X.; JIANG, Y.; WANG, Y.-W.; HUANG, M.-T.; HO, C.-T.; HUANG, Q. Enhancing anti-inflammation activity of curcumin through O/W nanoemulsions. *Food Chemistry*, v. 108, p. 419-424. 2008.

WANG, Y.; LU, Z.; LV, F.; BIE, X. Study on microencapsulation of curcumin pigments by spray drying. *European Food Research and Technology*, v. 229, p. 391-396. 2009.

WANG, Y.-J.; PAN, M.-H.; CHENG, A.-L.; LIN, L.-I.; HO, Y.-S.; HSIEH, C.-Y.; LIN, J.-K. Stability of curcumin in butter solutions and characterization of its degradation products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 15, 1867-1876. 1997.

WEISS-ANGELI, V.; POLETTI, F. S.; ZANCAN, L. R.; BALDASSO, F.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Nanocapsules of Octyl Methoxycinnamate Containing Quercetin Delayed the Photodegradation of Both Components Under Ultraviolet A Radiation. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v.4, p. 80–89. 2008.

WHO. World Health Organization Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations; Thirty-second report, WHO Technical Report Series, n. 823, Geneva, 1992.

YALLAPU, M. M., JAGGI, M., CHAUHAN, S. C. β -Cyclodextrin-curcumin self-assembly enhances curcumin delivery in prostate cancer cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 79, p. 113-125. 2010.

YALLAPU, M. M.; GUPTA, B. K.; JAGGI, M.; CHAUHAN, S. C. Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 351, p. 19-29. 2010.

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

XIE, X.; TAO, Q.; ZOU, Y.; ZHANG, F.; GUO, M.; WANG, Y.; WANG, H.; ZHOU, Q.; YU, H. PLGA Nanoparticles Improve the Oral Bioavailability of Curcumin in Rats: Characterizations and Mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, p. 9280-9289. 2011.

ZHUANG, D.; HOGEN-ESCH, T. E. Controlled Emission through Fluorescent Polymer Nanopigments. *Macromolecules*, v. 43, p. 8170-8176. 2010.