

UNIVERSIDADE BANDEIRANTE DE SÃO PAULO  
JANAÍNA GUSMÃO ROMEIRO

AVALIAÇÃO DA AÇÃO EPIGENÉTICA E DA CITOTOXICIDADE DE  
UM DERIVADO DE UM ANÁLOGO DA CURCUMINA VEICULADO  
EM NANOEMULSÃO LIPÍDICA EM LINHAGENS TUMORAIS

São Paulo  
2013

UNIVERSIDADE BANDEIRANTE DE SÃO PAULO  
JANAÍNA GUSMÃO ROMEIRO

AVALIAÇÃO DA AÇÃO EPIGENÉTICA E DA CITOTOXICIDADE DE  
UM DERIVADO DE UM ANÁLOGO DA CURCUMINA  
VEICULADO EM NANOEMULSÃO LIPÍDICA EM LINHAGENS  
TUMORAIS

Dissertação apresentada à Universidade  
Bandeirante de São Paulo, como requisito  
parcial para a obtenção do título de  
Mestre em Farmácia, na Área de  
Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.  
Orientadora: Profa. Dra. Susana Nogueira  
Diniz  
Co-orientadora: Profa. Dra. Claudete  
Justina Valduga.

São Paulo  
2013

JANAÍNA GUSMÃO ROMEIRO

DISSERTAÇÃO (PÓS-GRADUAÇÃO) APRESENTADA  
À UNIVERSIDADE BANDEIRANTE DE SÃO PAULO COMO  
EXIGÊNCIA DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
*STRICTU SENSU* EM FARMÁCIA

Presidente e Orientador

Nome: \_\_\_\_\_  
Titulação: \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_  
Assinatura: \_\_\_\_\_

2ª Examinador

Nome: \_\_\_\_\_  
Titulação: \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_  
Assinatura: \_\_\_\_\_

3ª Examinador

Nome: \_\_\_\_\_  
Titulação: \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_  
Assinatura: \_\_\_\_\_

NOTA FINAL: \_\_\_\_\_

Biblioteca

Bibliotecário: \_\_\_\_\_  
Assinatura: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

São Paulo, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_

Aos meus pais por todo o carinho e admiração.  
E a toda a minha família por fazerem parte desta minha jornada.  
Agradecida.

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Susana Nogueira Diniz pela atenção, carinho e orientação não somente nos estudos técnicos como também nas conversas cotidianas.

À Profa. Dra. Claudete Justina Valduga pelos ensinamentos, orientação e ensinamentos diários.

À todos os professores da pós-graduação que colaboraram para que este projeto se realizasse.

À Universidade Bandeirante de São Paulo – UNIBAN pela oportunidade de aprimoramento e realização deste mestrado.

Às alunas Renata Godoy e Lívia Taba pela ajuda e colaboração na execução dos experimentos.

Aos técnicos do laboratório de pós-graduação em farmácia, em especial à supervisora Maria Cristina dos Santos.

Aos colegas de pós-graduação pela convivência e incentivo.

Muito obrigada!

## RESUMO

ROMEIRO, J.G. **Avaliação da ação epigenética e da citotoxicidade de um derivado da curcumina veiculado em nanoemulsão lipídica em linhagens tumorais**. 2012. 68 f. Dissertação (Pós-Graduação) apresentada à Universidade Bandeirante de São Paulo, como exigência do Curso de Pós-Graduação *Strictu sensu*– Curso de Farmácia, Universidade Bandeirante de São Paulo, 2012.

A curcumina é um composto natural que apresenta atividade antitumoral. Foi demonstrado que ele é capaz de inibir a carcinogênese e o crescimento do câncer. A atividade antitumoral da curcumina envolve diversos mecanismos como alteração do ciclo celular, e mecanismos de toxicidade celular levando a lise da célula cancerígena. Sabe-se que modificações nos mecanismos epigenéticos, dentre eles a metilação do DNA, tem sido correlacionada com o aparecimento e a progressão tumoral. Recentemente, foi demonstrado que a curcumina pode se ligar a enzima DNA metiltransferase 1, DNMT1, modulando sua ação sugerindo que esse composto é um agente hipometilante podendo vir a ser utilizado para reverter o padrão de metilação alterado no câncer. Entretanto dificuldades relacionadas à estabilidade da molécula como, por exemplo, a sua rápida metabolização, não faz da curcumina *in natura* um fármaco de escolha para o tratamento do câncer. O presente trabalho utilizou um derivado de um análogo da curcumina denominado de composto **2** veiculado em uma nanoemulsão lipídica que se mostrou estável, sem alterações visíveis macroscopicamente. Neste trabalho foi mostrado que a nanoemulsão lipídica contendo o composto **2** (NA), foi mais ativa contra a linhagem de melanoma murino, B16F10 (valor médio de  $IC_{50} = 375\mu M$ ), em comparação com as outras linhagens testadas jurkat e Raw (valores médios de  $IC_{50} = 1219$  e  $902\mu M$ ). Além disso, a atividade citotóxica da nanoemulsão NA (valor médio de  $IC_{50} = 375\mu M$ ) foi maior do que a observada quando utilizamos a nanoemulsão sem o composto **2** (NB) ( $IC_{50} = 490\mu M$ ) na linhagem B16F10. Especialmente na linhagem jurkat, foi observado que a nanoemulsão (NB), induziu uma proliferação de linfócitos tumorais (valor médio de  $IC_{50} = 1133\mu M$ ). Entretanto, quando a nanoemulsão NA foi utilizada, observou-se uma atividade anti-proliferativa nessas células (valor médio de

IC<sub>50</sub> = 1219 $\mu$ M). A linhagem de células Raw foi a mais resistente ao tratamento com a nanoemulsão NA. Estes resultados nos levaram a utilizar a linhagem de melanoma B16F10 para avaliar o efeito do tratamento com o composto 2 no padrão de metilação do DNA. Os resultados demonstraram uma alteração no padrão de metilação do DNA em fragmentos gênicos de 240, 420 e 750 pb, na presença de NA, sugerindo uma ação epigenética. Os dados apresentados aqui mostram que a formulação pode ser uma alternativa para o “delivery” de derivados de análogos da curcumina e que o tratamento *in vitro* com essa formulação alterou atividades biológicas de linhagens tumorais, tais como viabilidade celular e padrão de metilação do DNA.

Palavras-chave: Curcumina. Atividade antitumoral. Análogos da curcumina. Nanoemulsão. Epigenética.

## ABSTRACT

ROMEIRO, J.G. **Assessment of epigenetic and cytotoxic action of a derivative of curcumin in nanoemulsion lipid aired in tumor cell lines.** 2012. 68 f. Dissertation (Post-Graduated) presented to the Universidade Bandeirante de Sao Paulo, as a requirement of the Post-Graduated *Strictu sensu* –Pharmacy Course, Universidade Bandeirante Sao Paulo, 2012.

Curcumin is a natural compound that has an antitumoral activity. It was shown that this compound can inhibit carcinogenesis and cancer growth. The antitumoral activity of curcumin involves several mechanisms such as changes in cell cycle and cellular toxicity that leads to cancer cell lysis. It is known that changes in epigenetic mechanisms, including DNA methylation has been correlated with cacinogenes and cancer progression. Recently, it was demonstrated that curcumin can bind to DNA methyltransferase 1 enzyme, DNMT1, modulating its action and points to the useful of curcumim as a hipomethylating agent to modulate the altered methylation pattern observed in cancer. However, difficulties related to molecule stability such as rapid metabolism should difficulty its application for cancer treatment. A lipid nanoemulsion containing a derivative of a curcumin analogue, named compound **2**, was developed in this word. Our data showed that the formulation presented stable, with no visible macroscopically alterations. It was shown that the nanoemulsion containing the compound **2** (NA) was more active against murine melanoma cell line, B16F10 (average IC 50 = 423  $\mu$ M) compared with the other tested cell lines, Jurkat and RAW (average values of IC50 = 1176 and 945  $\mu$ M). Moreover, the cytotoxic activity of NA nanoemulsion in B16F10 cells was higher (IC 50 = 375  $\mu$ M) than that observed when using the nanoemulsion without the compound 2 (NB) (IC50 = 490  $\mu$ M). Otherwise, in Jurkat cells NB nanoemulsion induced the proliferation of tumor lymphocytes. However, when NA nanoemulsion was used, it was observed an anti-proliferative activity in these cells. RAW cell line was the most resistant to treatment with NA nanoemulsion. These results lead us to use murine melanoma B16F10 cell strain to investigate the epigenetic effect of NA nanoemulsion. Our results demonstrated that NA altered the pattern of DNA methylation in tumor cells. It was shown that DNA



fragments of 240, 420 and 750 bp were altered in the presence NA nanoemulsion, suggesting an epigenetic action. The data presented here show that this formulation can be an alternative to the “delivery” of curcumin derivatives and analogs, and that the *in vitro* treatment with this formulation altered biological activities in tumor cell lines, such as cell viability and pattern of DNA methylation.

Keywords: Curcumin. Antitumoral activity. Curcumin analogues, Nanoemulsion. Epigenetics.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Planta da <i>Curcuma longa</i> .....	18
Figura 2 – Fórmula estrutural da curcumina .....	18
Figura 3 – Reação de esterificação do ácido oleico com o composto 1 (1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona) na obtenção do composto 2 (1,5-bis(4-oleil-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona) .....	20
Figura 4 – Esquema das mudanças reversíveis na organização da cromatina que influenciam a expressão gênica .....	25
Figura 5 – Metilação do DNA .....	27
Figura 6 – Estrutura do nucleossomo composto por um octâmero de histonas .....	27
Figura 7 – Modificação das histonas .....	28
Figura 8 – Esquema das modificações epigenéticas .....	29
Figura 9 – Atividade biológica da curcumina através da modulação epigenética .....	31
Figura 10 – Morfologia de células de Jurkat .....	36
Figura 11 – Morfologia de células de monócitos / macrófagos (Raw) .....	37
Figura 12 – Morfologia de células de melanoma (B16F10) .....	38
Figura 13 – Análise da citotoxicidade de compostos contendo o composto 2 pelo método do “MTT” .....	39
Figura 14 – Formulações baseadas em emulsão lipídica com (NA) e sem o composto 2 (NB) .....	45
Figura 15 – Análise da citotoxicidade de células RAW tratadas com nanoemulsão contendo o composto 2 (NA) ou não (NB) em diferentes concentrações (2000 $\mu$ M; 200 $\mu$ M; 20 $\mu$ M; 2 $\mu$ M e 0,2 $\mu$ M) .....	48
Figura 16 – Análise da citotoxicidade de células RAW tratadas com o composto 1 em diferentes concentrações (2000 $\mu$ M; 200 $\mu$ M; 20 $\mu$ M; 2 $\mu$ M e 0,2 $\mu$ M) .....	49
Figura 17 – Análise da citotoxicidade de células Jurkat tratadas com nanoemulsão contendo o composto 2 (NA) ou não (NB) em diferentes concentrações (100 $\mu$ M; 50 $\mu$ M; 20 $\mu$ M e 10 $\mu$ M) .....	50

Figura 18 – Análise da citotoxicidade de células Jurkat tratadas com o composto 1 em diferentes concentrações (2000 $\mu$ M; 200 $\mu$ M; 20 $\mu$ M 2 $\mu$ M e 0,2 $\mu$ M .....	51
Figura 19 – Análise da citotoxicidade de células B16F10 tratadas com nanoemulsão contendo o composto 2 (NA) ou não (NB) em diferentes (40 $\mu$ M; 20 $\mu$ M; 10 $\mu$ M e 5 $\mu$ M) .....	52
Figura 20 – Análise da citotoxicidade de células B16F10 tratadas com o composto 1 em diferentes concentrações (1000 $\mu$ M; 500 $\mu$ M e 200 $\mu$ M) .....	53
Figura 21 – Viabilidade celular das células de melanoma murino (B16F10) .....	56
Figura 22 – Análise da integridade do DNA genômico de células tratadas com as nanoemulsões (NA e NB) em gel de agarose 1% .....	52
Figura 23 – Gel de poliacrilamida para análise do perfil de metilação do DNA genômico .....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CpG	ILHA CpG
DDC	DICLOROHEXILCARBODIIMIDA
DMNAP	4-DIMETILAMINOPIRIDINA
DMSO	DIMETILSULFÓXIDO
DNA	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO
DNMT	DNA METILTRANSFERASE
dNTP	DESOXIRRIBONUCLEOTÍDEO 5-FOSFATO
EDTA	ACIDO ETILENODIAMINOTETRACÉTICO
H2A	HISTONA 2A
H2B	HISTONA 2B
H3	HISTONA 3
H4	HISTONA 4
HAT	HISTONA ACETILTRANSFERASE
HDAC	HISTONA DEACETILASE
IC <sub>50</sub>	METADE DA CONCENTRAÇÃO MÁXIMA INIBITÓRIA
IL	INTERLEUCINA
Kb	KILOBASE
MAPK	PROTEÍNA KINASE MITÓGENA ATIVADA
miRNA	MICRORNA
MTT	3-(4,5-DIMETILTIAZOL-2-IL)-2,5-DIFENILTETRAZOLIO BROMÍDIO
NA	NANOEMULSÃO COM O COMPOSTO 2
NB	NANOEMUSLÃO SEM O COMPOSTO 2
NF-KB	FATOR NUCLEAR KAPPA B
°C	GRAUS CELSIUS
pb	PARES DE BASE
PCR	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE
pH	POTENCIAL HIDROGENIÔNICO
RNA	ÁCIDO RIBONUCLEICO
rpm	ROTAÇÃO POR MINUTO
SFB	SORO FETAL BOVINO

TEB TAMPÃO TRIS-EDTA BORATO  
TNF FATOR DE CRESCIMENTO TUMORAL  
TRIS TRI(HIDROXIMETIL) AMINOMETANO

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	18
2.1 CURCUMINA .....	18
2.2 ANÁLOGOS DA CURCUMINA .....	20
2.3 NANOEMULSÕES .....	21
2.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA DA CURCUMINA .....	22
2.4.1 Atividade antitumoral .....	22
2.4.2 Atividade em mecanismos epigenéticos .....	23
2.4.2.1 Epigenética – Conceitos gerais .....	24
2.4.2.2 Metilação do DNA .....	26
2.4.2.3 Modificações de histonas .....	27
2.4.2.4 MicroRNAs (miRNAs).....	30
2.4.2.5 Ação da Curcumina em mecanismos epigenéticos .....	31
3 OBJETIVOS.....	33
3.1 OBJETIVO GERAL .....	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 NANOEMULSÃO .....	34
4.1.1 Preparo da nanoemulsão .....	34
4.1.2 Estabilidade da nanoemulsão .....	34
4.2 CULTURA, MANUTENÇÃO E CONGELAMENTO DE LINHAGENS CELULARES .....	35
4.2.1 JURKAT .....	35
4.2.2 RAW .....	36
4.2.3 B16F10 .....	37
4.3 EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE .....	38
4.4 DETERMINAÇÃO DA IC <sub>50</sub> % .....	40
4.5Análise do perfil de metilação do DNA de células da linhagem de melanoma murino por MSAP-PCR .....	40
4.5.1 EXTRAÇÃO DO DNA.....	40

4.5.2 MSAP-PCR (Methylation Sensitive Arbitrarily Primed PCR) .....	41
4.5.3 AMPLIFICAÇÃO .....	42
4.5.4 ELETROFORESE .....	42
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
5.1 PREPARO DA NANOEMULSÃO .....	44
5.2 ATIVIDADE CITOTÓXICA <i>IN VITRO</i> DAS NANOEMULSÕES .....	45
5.2.1 Citotoxicidade em células da linhagem Raw .....	45
5.2.2 Citotoxicidade em células da linhagem Jurkat .....	47
5.2.3 Citotoxicidade em células da linhagem de melanoma murino .....	49
5.3 DETERMINAÇÃO DA IC <sub>50</sub> .....	51
5.4 ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DO DNA DE CÉLULAS B16F10 TRATADAS COM AS NANOEMULSÕES .....	53
5.4.1 Avaliação da integridade de DNA genômico .....	54
5.4.2 Geração de perfis de metilação do DNA .....	55
5.4.3 Comparação de padrões de metilação do DNA de melanoma murino antes e após o tratamento com as nanoemulsões .....	56
6 CONCLUSÃO .....	59
REFERÊNCIAS .....	60

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença que resulta do acúmulo e interação de alterações genéticas e epigenéticas, levando a um descontrole do ciclo celular e da expressão gênica (SHARMA; KELLY; JONES, 2009). O epigenoma do câncer é caracterizado por mudanças na metilação do DNA, bem como perfis de expressão alterado de enzimas modificadoras da cromatina, composto por desmetilação global e hipermetilação do promotor, sugerindo que a hipometilação leva à ativação de proto-oncogenes (LIU et al., 2012; SZYF, 2009; DAS; SINGAL, 2004).

Agentes naturais com potencial para quimioprevenção e tratamento do câncer incluem o fitoquímico curcumina (diferuloilmetano) (WATERS; MCLEOD, 2003). Estuda-se que os anéis aromáticos presentes na curcumina são necessários para a atividade citotóxica e androgênica, sem efeitos citotóxicos em células saudáveis (SYNG-AL et al., 2004). *In vitro*, a curcumina exibe atividade antiparasitária, antiespasmódica, antiinflamatória, efeitos gastrointestinais e, também, inibe a carcinogênese (ALI et al., 2006). No entanto, a aplicação clínica generalizada deste agente relativamente eficaz no câncer e, em outras doenças, tem sido limitada devido à baixa solubilidade na água e, conseqüentemente, a reduzida biodisponibilidade sistêmica (BISHT et al., 2007).

Atualmente a procura por um fármaco antitumoral ideal vem liderando os estudos nos centros de pesquisa, principalmente os fármacos de origem natural, que pressupõem que tenham menor efeito tóxico sendo mais seguros e mais eficazes. O desenvolvimento de novos agentes para o tratamento do câncer é imperativo, requerendo uma nova abordagem que integre a prevenção, o diagnóstico e o tratamento (O'SULLIVAN-COYNE, 2009).

A fim de ultrapassar estas limitações, várias abordagens foram testadas *in vitro*, incluindo a combinação da curcumina com adjuvantes (por exemplo, a piperina) e, o desenvolvimento de veículos de transporte que consistem em lipossomas, nanopartículas e formulações de fosfolípidos contendo curcumina. Este sistema de transporte é revestido por partículas lipídicas sólidas que são responsáveis pelo melhoramento no transporte das drogas. Recentemente tem-se encontrado várias aplicações para a nanoemulsão melhorando a solubilidade e a



biodisponibilidade de drogas lipofílicas (PIÑEYRO-LÓPEZ et al., 2007; KARASULU et al., 2007). Alterando as características da superfície do revestimento das nanopartículas lipídicas sólidas, com moléculas hidrofílicas, consegue-se melhorar a estabilidade e a biodistribuição da droga no plasma e, conseqüentemente, melhora a biodisponibilidade posterior da droga aprisionada nestas partículas. O uso de agentes vetorizados através da nanoemulsão permite que o composto atinja o alvo com uma maior segurança e eficácia diminuindo a sua toxicidade (VILA et al., 2004; LIANG et al., 2009).

Estudos demonstraram que estruturas análogas à curcumina possuem também atividade antitumoral e, embora sejam insolúveis em água, são mais facilmente incorporados aos sistemas nanoestruturados fazendo com que estes compostos atinjam o alvo com maior segurança e eficácia diminuindo a sua toxicidade (FRIEDMAN, 2009).

A atividade antitumoral da curcumina envolve diversos mecanismos dentre eles: a modificação do ciclo celular, determinada pela alteração da expressão, a ativação de ciclinas e pelos mecanismos de toxicidade celular, que levam à lise da célula cancerígena. Além disso, tem sido demonstrado que a curcumina pode se ligar à enzima DNA metiltransferase modulando a ação dessa enzima, sugerindo que esse composto é um potente agente hipometilante podendo ser utilizado para reverter o padrão de metilação alterado no câncer (REUTER, 2002).

Desta forma, este estudo pretende investigar a ação citotóxica de um derivado de um análogo da curcumina, denominado de composto **2**, veiculado em uma nanoemulsão lipídica e avaliar o efeito do tratamento da formulação na metilação do DNA de células tumorais de diferentes linhagens. Com esse estudo pretendemos elucidar alguns mecanismos antitumorais do composto **2**.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 CURCUMINA

O termo fitoquímico refere-se a uma ampla variedade de componentes, produzidos por plantas e ativos biologicamente. São encontrados em frutas, vegetais, grãos e exsudados de plantas e possuem ação antioxidante e hormonais (PADHYE et al., 2010). Fitoquímicos estão associados com a prevenção e tratamento de uma das quatro causas de problemas de saúde como, por exemplo, câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e hipertensão (BLOCH et al., 1995, apud PADHYE et al., 2010). Uma das classes mais importantes de fitoquímicos consiste de polifenóis (PADHYE et al., 2010).

Várias pesquisas têm abordado o potencial quimioterapêutico da curcumina (diferolulmetano), como uma planta contendo polifenol e relativamente não tóxica (SUÁREZ et al., 2002), bem como o de seus análogos, para o combate de alguns tipos de cânceres.

A cúrcuma (*Curcuma longa* Linn), é uma planta herbórea que mede um pouco mais de 1 metro e com estames curtos pertencente à família *Zingiberaceae* (Figura 1) (MASUDA et al., 1993). A curcumina comercial é encontrada nos mercados a preços bem acessíveis e contém três curcuminóides que lhe confere a cor amarela-alaranjada: curcumina (diferulmetano) (77%); demetoxicurcumina (18%) e bisdemetoxicurcumina (5%) (PADHYE, 2010).

A curcumina é uma substância amarela, sendo o principal corante presente nos rizomas da cúrcuma (CHENG et al., 2001). Quando se apresenta como pó é chamado de açafrão e também de tumérico (EIGNER; SCHOLZ et al., 1999 apud ARAÚJO et al., 2002) (Figura 1). A maioria dos efeitos medicinais do açafrão é atribuída à curcumina, o principal curcuminóide encontrado no açafrão (GAUTAN et al., 2007). É amplamente usada em muitos países da Ásia como um tempero, para colorir queijos e manteigas, nos cosméticos e em algumas preparações medicinais (AZEEM et al., 2009).



Figura 1 – Planta da *Curcuma longa*

Fonte: Reuter et al. (2011)

A curcumina possui faixa de fusão entre 176-177°C e forma um sal marrom-avermelhado com álcalis. É solúvel em etanol, álcalis, acetona, ácido acético e clorofórmio e insolúvel em óleo (ARAÚJO et al., 2001).

Estudos relataram possíveis relações estrutura-atividade da curcumina e de seus análogos (TEITEN, 2010). Foi relatado que o elevado potencial antiinflamatório e antitumoral dos curcuminóides, estão relacionados com o baixo nível de hidrogenação e, do elevado nível de metoxilação, mas também com o elevado nível de insaturação da porção dicetona presente na molécula da curcumina (Figura 2) (SUGIYAMA; KAWAKISHI; OSAWA, 1996). Por outro lado, o potencial de radicais livres dos curcuminóides foi relacionado com o número de metoxi-substituições e com o nível de hidrogenação da porção heptadieno da curcumina (SANDUR et al., 2007; SOMPARN et al., 2007). De fato, a glicosilação da curcumina do anel aromático proporciona um composto mais solúvel em água com uma maior estabilidade cinética e um bom índice terapêutico (FERRARI et al., 2007).

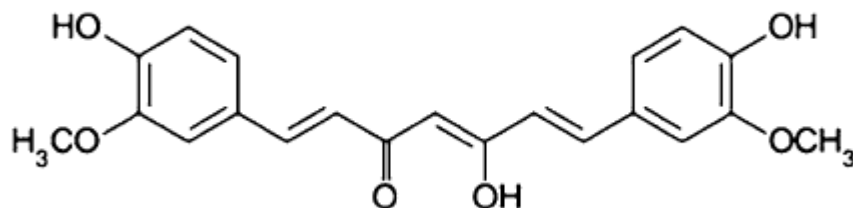


Figura 2 – Fórmula estrutural da curcumina

Fonte: Teiten et al.(2010)

## 2.2 ANÁLOGOS DA CURCUMINA

Um dos recursos para contornar os problemas inerentes à molécula da curcumina é o uso de moléculas análogas sintéticas (FRIEDMAN et al., 2009), visto que estas limitações requerem repetitivas doses orais devido à sua baixa biodisponibilidade, o que dificulta seu uso farmacológico (SHARMA et al., 2007; MAHESHWART et al., 2007).

As modificações sintéticas da curcumina fazem com que se obtenha uma melhora da sua biodisponibilidade. Estudos pré-clínicos indicam que devido à pobre biodisponibilidade e baixo perfil farmacocinético, a curcumina torna-se uma molécula instável nas condições fisiológicas, tendo com isso o seu uso limitado nas aplicações em terapias anticâncer (LIANG et al., 2009). A baixa biodisponibilidade da curcumina está relacionada à sua baixa absorção, rápida biotransformação e eliminação sistêmica (TEITEN et al., 2010).

Na última década, tem sido muito explorada a síntese de análogos sintéticos da curcumina, os quais foram preparados e avaliados para várias atividades farmacológicas. A maioria dos análogos tem mostrado muito boa atividade anticancerígena em vários modelos e em várias linhas celulares. No entanto, alguns análogos também têm demonstrado efeito antioxidante, anti-HIV, antimutagênico, antiangiogênico, antimalárico, antituberculoso, antiandrogênico, antiinflamatório dentre outros (AGRAWAL; MISHRA, 2010).

Alguns autores sugerem que a existência da associação do sistema beta-dicarbonílico na molécula de curcumina, o qual tem uma dupla ligação, e a presença de cetonas se relaciona com a lipofilicidade da molécula e, portanto, melhora a penetração na pele (Figura 2) (ARAÚJO; LEON, 2001).

No presente estudo foi utilizado um derivado do análogo da curcumina de maior estabilidade, quando comparado com a curcumina, o composto **2** (1,5-bis(4-oleil-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona), para os testes de citotoxicidade *in vitro* veiculado em nanoemulsão.

A síntese do composto **2** deu-se pela reação de esterificação do ácido oléico com composto **1** utilizando DCC e DMAP como catalisadores e diclorometano como solvente (Figura 3), com 100% de rendimento. Os grupos oleíla ligados às hidroxilas

fenólicas conferem maior lipofilicidade à molécula do composto **2** gerado, facilitando a sua incorporação no veículo (nanoemulsão lipídica) (SANTOS, 2010).

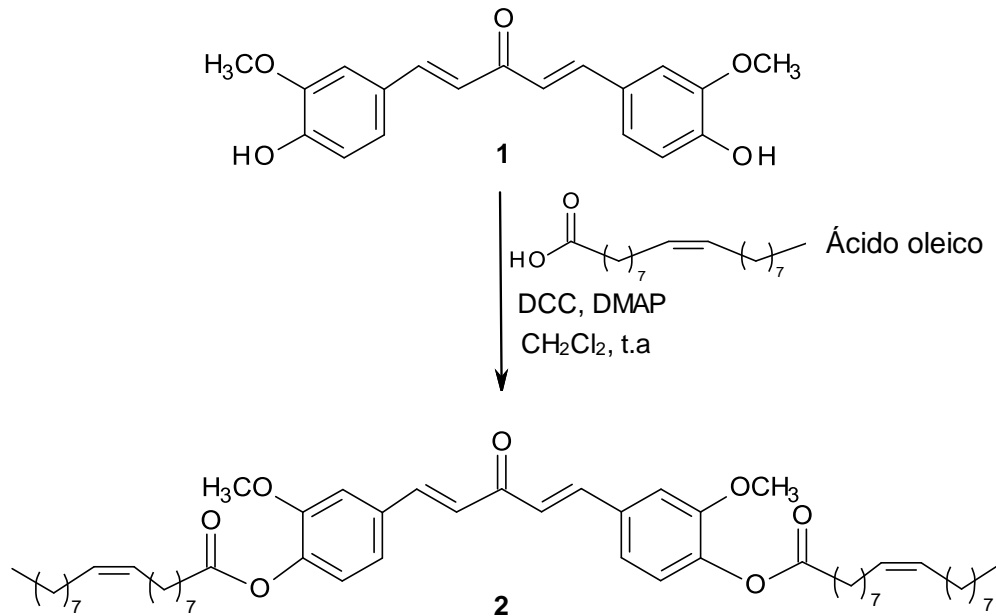


Figura 3 – Reação de esterificação do ácido oléico com o composto **1** (1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona) obtendo-se o composto **2** (1,5-bis(4-oleil-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona)

Fonte: Santos (2010)

### 2.3 NANOEMULSÕES

As emulsões constituídas por nanopartículas são elaboradas com o objetivo de melhorar a biodisponibilidade e farmacocinética de alguns fármacos, inclusive os fitoquímicos, promovendo um melhor desempenho destes fármacos. Estas nanopartículas são sistemas coloidais de transporte de drogas. O modelo de incorporação do emulsionante é importante para o padrão de liberação do fármaco. O tamanho das partículas afeta diretamente a liberação do fármaco e isto depende muito da composição do lipídeo que compõe a nanopartícula (PRABHAKAR; KRISHNA, 2011). As nanoemulsões estão sendo utilizadas para o tratamento de muitas doenças, devido ao seu sistema de transporte que inclui nanopartículas lipídicas sólidas (ÜNER; YENER, 2007).

O campo de uso para as nanoemulsões é amplo e recentemente tem-se pesquisado o uso destas para o transporte transdermal. Também são usadas para aplicações oculares, pulmonares, nasais, vaginais e transporte de drogas parenterais (AZEEM et al., 2009).

As vantagens das nanoemulsões referem-se ao controle e/ou liberação da droga no tecido alvo; a melhora da estabilidade de produtos farmacêuticos; no melhoramento de transporte da droga quando comparado a outros transportadores; na viabilidade de levar tanto drogas lipofílicas quanto hidrofílicas; a biocompatibilidade da maioria dos lipídeos, pois eles são biodegradáveis; o uso da água como solvente; custo acessível, pois os polímeros empregados são mais baratos; mais fácil de validar e obter aprovação regulamentar (ÜNER; YENER, 2007).

Em terapia gênica as nanopartículas vetorizadas têm um mecanismo para melhor atingir o tecido alvo mais facilmente (RAINER, MÜLLER;KECK, 2010).

## 2.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA DA CURCUMINA

### 2.4.1 Atividade antitumoral

A curcumina tem diversos alvos moleculares associados com numerosas cascatas bioquímicas e moleculares. Tem sido demonstrado que a curcumina liga-se fisicamente a mais de 33 proteínas diferentes incluindo a COX2, proteína quinase C, citocinas, enzimas e genes, regulando a proliferação celular, apoptose, dentre outras (FU; KURZROCK; 2010).

Estudos experimentais também revelaram que a curcumina regula a rota das moléculas nos sinais celulares de transdução, incluindo as rotas NF-kappa B (fator de transcrição Kappa B), Akt (Kinase), MAPK (Mapa Kinase), p53 (Proteína p53), AR, Ras (Proteína Ras) e ER (Receptor de Estrógeno) (HONG-LI et al., 2005).

Por apresentar diversos alvos moleculares, a curcumina tem demonstrado uma gama de atividades biológicas como, por exemplo, a atividade quimiopreventiva, antiinflamatórias, anticâncer, antiparasitário e antiespasmódico (SHAMA et al., 2005; ARAÚJO; LEON, 2001; SANDUR et al., 2007).

Muitos estudos demonstraram que a curcumina inibe a carcinogênese, por apresentar significativos efeitos antiproliferativos, apoptóticos e anti-angiogênicos, sendo um composto promissor para o tratamento de diversos cânceres, incluindo carcinoma de pâncreas, carcinoma de fígado, estômago, intestino e leucemia (LIMTRAKUI et al., 2001; CHENG et al., 2001; SYNG-AI, KUMARI; KHAR, 2001; LIN; LIN, 2008). A curcumina pode também regular negativamente a expressão de várias citocinas pró-inflamatórias incluindo TNF (fator de crescimento tumoral), IL-1 (interleucina 1), IL-2 (interleucina 2), IL-6 (interleucina 6), IL-8 (interleucina 8), IL-12 (interleucina 12), e as quimiocinas, muito provavelmente através de inativação do fator de transcrição NF-kB.

Os efeitos da curcumina nos vários modelos tumorais são amplamente variados e dependentes da taxa de crescimento e do tipo de tumor (LIMTRAKUI et al., 2001). Um estudo clínico relatou que após a administração oral (12 g/dia) de curcumina não se observou nenhum efeito tóxico em humanos (JAGETIA; AGGARWAL, 2007). Entretanto, as aplicações clínicas da curcumina são limitadas devido à sua instabilidade e indesejáveis propriedades do seu metabólito (LIANG et al., 2004). Estes problemas de solubilidade e metabolização estão sendo atualmente resolvidos com o uso da nanotecnologia e de estruturas análogas da curcumina. Sendo assim, o estudo do comportamento *in vitro*, de suas estruturas análogas torna-se imprescindível para que se obtenha um melhoramento do seu perfil farmacocinético para que se possa delimitar o início de sua ação e para o seu uso em estudos clínicos futuros.

#### 2.4.2 Atividade em mecanismos epigenéticos

#### 2.4.2.1 Epigenética – Conceitos gerais

O campo da genética tem se tornado parte integral da medicina moderna nos últimos 50 anos desde que Watson e Crick descreveram o modelo estrutural do DNA. Novas ferramentas baseadas nesse campo foram desenvolvidas para a melhoria de diagnósticos e terapias gênicas nestes últimos anos. Um campo promissor para o auxílio destas novas ferramentas para o diagnóstico molecular e terapias gênicas direcionadas é o campo da epigenética (RODENHISER; MANN, 2006).

O termo epigenética foi originalmente descrito por H. C. Waddington em 1942 para descrever a geração do fenótipo pela interação dos genes com o ambiente (AGGARWAL et al., 2006). Posteriormente, a epigenética foi definida como modificações reversíveis de rearranjos da cromatina que modulam a expressão do gene em células normais, sem alterar a sequência de DNA (GAURISANKAR; DAS, 2008). Estas alterações da cromatina estão relacionadas com a ativação ou inativação de genes (DAVIS; ROSS, 2007). Atualmente a epigenética não é um tema puramente especulativo como era na época de Waddington, mas baseia-se na crescente compreensão do entendimento das modificações químicas que o nosso genoma e proteínas regulatórias da cromatina são submetidas para controlar a sua função (ESTELLER, 2010).

Epigenética, em um amplo aspecto, é uma ponte entre o genótipo e o fenótipo – um fenômeno que muda o *locus* final ou o cromossomo sem alterar a sequência de DNA. Embora todas as células de um organismo multicelular compartilhem de um mesmo genótipo, o desenvolvimento organizacional gera diversos tipos celulares diferentes que são estáveis, com perfis de expressão e funções distintas. Assim, a diferenciação celular pode ser considerada um fenômeno epigenético onde cada linhagem celular exhibe instruções diferentes, as quais podem ser modificadas reversivelmente para regular a expressão gênica (GOLDBERG; ALLIS; BERNSTEIN, 2007).

A regulação epigenética é um dos aspectos críticos para o desenvolvimento. Isto é, conseguido através do recrutamento de processos moleculares como transcrição, bloqueio da transcrição ou degradação de transcritos existentes (MACDONALD, 2012). A regulação epigenética não é somente importante para



gerar diversos tipos celulares durante o desenvolvimento dos mamíferos, mas é importante também para a manutenção da estabilidade e integridade dos perfis de diferenciação destes diversos tipos celulares (CHEUNG; LAU, 2005).

Três mecanismos epigenéticos distintos parecem estar intrinsecamente relacionados e implicados para iniciar e sustentar modificações da cromatina e a expressão gênica: a metilação do DNA, as modificações de histonas e os microRNAs (miRNAs) regulatórios (KAWASAKI; TAIRA; MORRIS, 2005). Tanto a metilação do DNA, bem como, a modificação de histonas são mecanismos que regulam a formação de uma estrutura específica de cromatina, regulando a transcrição gênica. Desta forma, influenciam no fenótipo celular sem alteração do genótipo (ZAIDI et al., 2011). Assim, quando a cromatina está condensada (heterocromatina) ocorre à inativação dos genes (silenciamento). Por outro lado, quando a cromatina está relaxada (eucromatina) ocorre a transcrição de genes (ativação) (RODENHISER; MANN, 2006) (Figura 4).

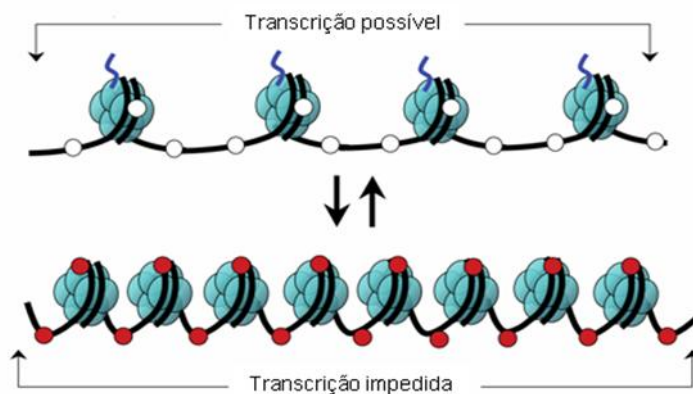


Figura 4 – Esquema das mudanças reversíveis na organização da cromatina que influenciam a expressão gênica. Os genes são expressos (ligados) quando a cromatina está relaxada (ativa), e são inativados (desligados) quando a cromatina está condensada (desativada)

Fonte: Rodenhiser; Mann, (2006)

O silenciamento do gene ao nível da cromatina é necessário para a vida de organismos eucarióticos e é particularmente importante na orquestração dos principais processos biológicos, incluindo a diferenciação e silenciamento de grandes domínios cromossômicos tais como o cromossomo X, durante o período de vida de mamíferos. Tal como a maioria dos processos biológicos, o silenciamento

pode tornar-se desregulado, resultando no desenvolvimento de doenças (JONES; BAYLIN, 2007). Assim, o epigenoma, então, é dinâmico e varia de célula para célula dentro de um mesmo organismo multicelular (SZYF, 2009).

#### 2.4.2.2 Metilação do DNA

A metilação do DNA é um dos principais mecanismos epigenéticos de controle da expressão gênica. A metilação controla várias funções do genoma, sendo essencial durante a morfogênese por determinar padrões epigenéticos distintos durante o desenvolvimento embrionário normal de mamíferos (USHIJIMA; ASADA, 2010). Exerce um papel importante no controle genético das células de mamíferos, atuando como um mecanismo global da manutenção da repressão da transcrição gênica, denominado de silenciamento (STRACHAM; READ, 2002).

Em humanos, a metilação do DNA ocorre nas citosinas seguidas de guaninas na seqüência do DNA, denominados dinucleotídeos CpGs, ou ilhas de CpGs. Estudos de distribuição de dinucleotídeos CpGs demonstraram que estas regiões não estão distribuídas aleatoriamente no genoma humano e apresentam-se normalmente desmetiladas. Estas regiões ricas em CpGs estão associadas normalmente às regiões 5' regulatória da maioria dos genes de expressão constitutiva, assim como, em grande parte dos genes tecido-específicos (ESTELLER, 2011; SIGALOTTI et al., 2010).

Outras regiões ricas em CpGs, fora das ilhas de CpG, apresentam-se fortemente metiladas. A metilação nessas regiões parece ser um fenômeno importante para a estabilização de regiões pericentroméricas e inativação de DNA exógeno, como viral, ocasionando o remodelamento da cromatina; este remodelamento é influenciado pela metilação do DNA (BIRD, 2002).

A metilação consiste em uma modificação covalente do DNA na qual um grupamento metil ( $\text{CH}_3$ ) é adicionado no carbono da posição 5 (C5) da citosina seguida de guanina na sequência de nucleotídeos do DNA, sempre no contexto 5'-C-G-3' (dinucleotídeos CpG). Esta metilação é catalisada por uma família de

enzimas chamadas metiltransferases (DNMTs) (DE OLIVEIRA et al., 2010; PRADHAN, 1999) (Figura 5).

As DNA metiltransferases estão divididas em duas classes com especificidades diferentes para substratos: DNMT1 que metilam preferencialmente fitas hemimetiladas do DNA, gerado durante a replicação e têm sido associadas com manutenção dos padrões de metilação do DNA durante a duplicação; e outro grupo composto pelas DNMT3a e 3b que não apresentam preferências por fitas de DNA hemimetilado, mas são responsáveis pela maioria dos processos de metilação de novo, ou seja, metilam novos sítios CpGs que não estavam metilados (DE OLIVEIRA et al., 2010; SIGALOTTI et al., 2010). A metilação de novo é essencial durante o desenvolvimento embrionário e o processo de diferenciação (BESTOR; JAENISCH, 1992; OKANO et al., 1999; BESTOR, 2000).

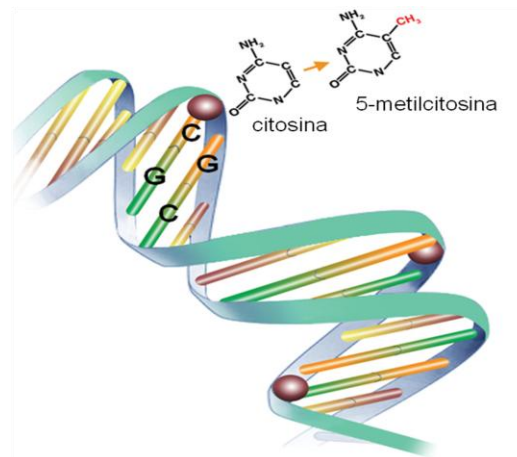


Figura 5 – Metilação do DNA na citosina presente nos dinucleotídeos CpG. Esta metilação acontece com a adição de um grupo metil ( $\text{CH}_3$ ) no carbono 5 da citosina, indicado em vermelho

Fonte: Barros; Offenbacher (2009)

#### 2.4.2.3 Modificações de histonas

O código de histonas é determinado pelo conjunto de modificações pós-transcricionais onde nessas proteínas atua como um importante mecanismo epigenético de controle da expressão gênica (GIBBONS, 2005). Estas histonas estão presentes na cromatina localizada dentro do DNA genômico, em uma unidade chamada de nucleossomo. O nucleossomo é composto por um núcleo de oito

histonas compreendidas em duas cópias de cada uma das seguintes histonas: H2A, H2B, H3 e H4 (Figura 6) (ZAIDI et al., 2011).

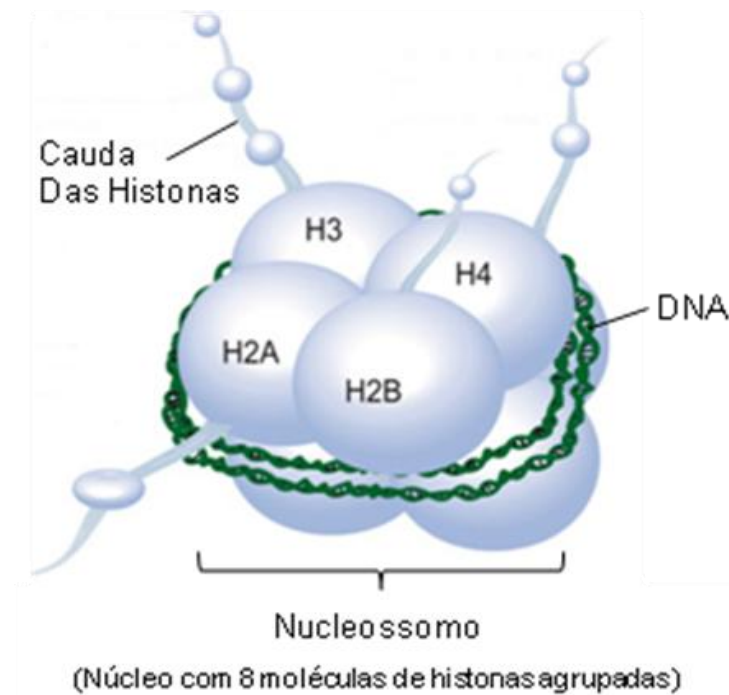


Figura 6 – Estrutura do nucleossomo composto por um octâmero de quatro diferentes tipos de histonas (H2A, H2B, H3 e H4). As modificações das histonas são catalisadas por diferentes enzimas dividindo o genoma em ativo, “eucromatina”, onde o DNA é transcrito ocorrendo à expressão dos genes e, silenciado, “heterocromatina” na qual o DNA não é transcrito não havendo a expressão gênica. A cromatina está empacotada dentro do núcleo do DNA formando a unidade chamada de nucleossomo.

Fonte: Zaidi et al. (2011)

Cada histona nucleossomal contém uma cauda amino N-terminal, a qual é o alvo de modificações pós-traducionais (Figura 7) (ESTELLER; GUIL, 2009). Histonas nucleossomais são modificadas por mais de 60 tipos diferentes de resíduos (COSGROVE, 2007, RUTHENBURG. LI; PATEL; ALLIS, 2007). Estas modificações ocorrem através da adição ou remoção de grupos acetil ou metil nestes resíduos, por enzimas específicas (COUTURE; TRIEVEL, 2006, ROTH; DENI; ALLIS, 2001).

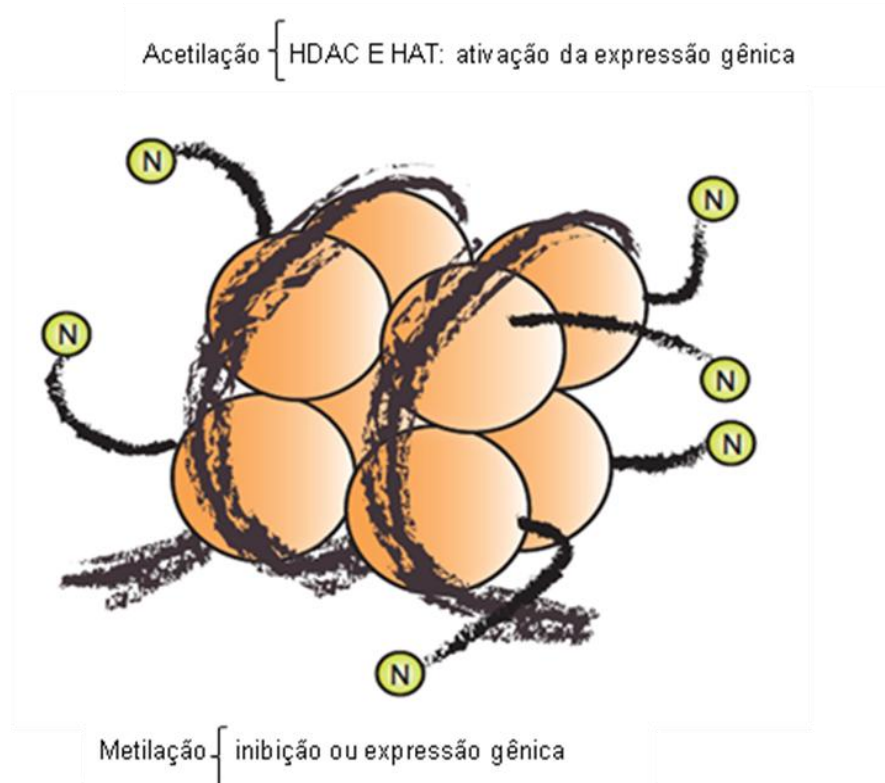


Figura 7 – Modificações de histonas. Histonas estão sujeitas a uma série de modificações pós-traducionais na sua cauda amino N-terminal. Estas modificações incluem metilação e acetilação sendo relacionadas com a estrutura da cromatina, gerando ativação na transcrição do DNA. A acetilação é conservada pelo equilíbrio da ação das enzimas histonas acetilases (HAT) e das histonas deacetilases (HDAC), relacionadas com a ativação dos genes expressos. A metilação das histonas pode resultar em expressão (H3K9; H3K27) ou ativação (H3K4) sobre a transcrição, dependendo do tipo de histona que está metilada.

Fonte: Sigalotti et al. (2010)

A acetilação das histonas é controlada pela ação equilibrada entre a enzima histona acetiltransferase (HAT), e a enzima histona deacetilases (HDAC). A acetilação de histonas tem sido associada à expressão gênica (ZHANG; DENT, 2005) e a deacetilação associada com inativação de genes, assim como a metilação do DNA (DAVIS; ROSS, 2007, SIGALOTTI et al., 2010). Por outro lado, a metilação das histonas pelas metiltransferases (HMT) pode ter efeitos repressivos da transcrição (SIGALOTTI et al., 2010) (Figura 8).

Assim, o genoma de eucariotos transporta marcadores químicos que são adicionados no DNA ou nas proteínas da cromatina para formar uma estrutura de cromatina específica. Esta informação epigenética não é uniforme, mas é aplicada

regionalmente sinalizando e preservando o estado da atividade local, dado pela transcrição ou o silenciamento gênico (BIRD, 2008).

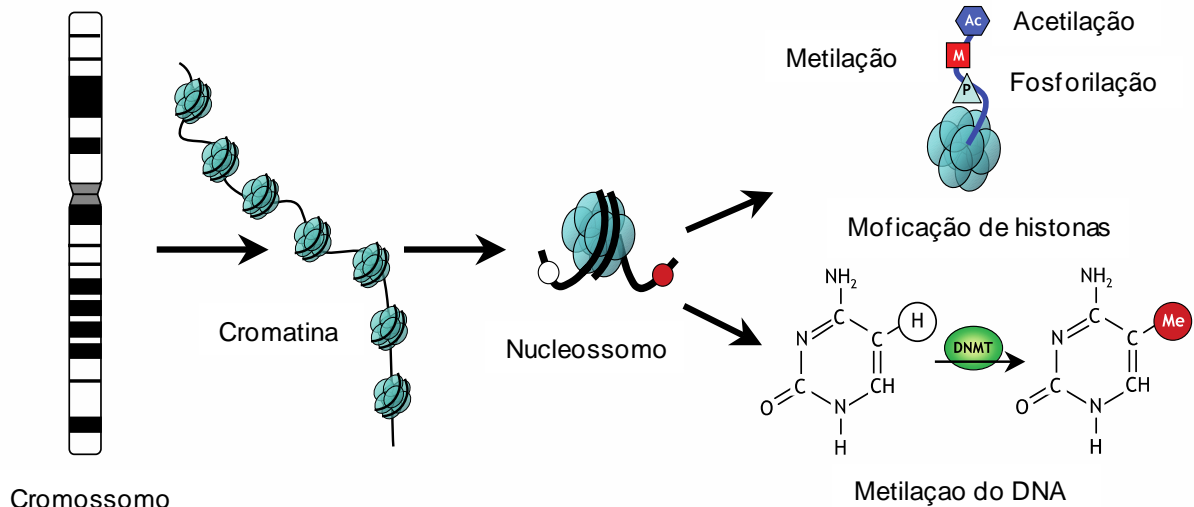


Figura 8 – Esquema das modificações epigenéticas. Fitas de DNA envolvidas por histonas, formando os nucleossomos. Estes nucleossomos são organizados dentro da cromatina, para a construção de um bloco de cromossomo. Modificações das histonas reversíveis e não específicas ocorrem em vários locais através da acetilação, metilação e fosforilação. A metilação do DNA ocorre na posição 5 da citosina residual em uma reação catalisada pelas DNA metiltransferases (DNMTs). Estas modificações são como uma assinatura epigenética específica que regula a organização da cromatina e expressão gênica

Fonte: Rodenhiser; Mann (2006)

#### 2.4.2.4 MicroRNAs (miRNAs)

Tornou-se evidente que RNAs não codificadores fazem parte dos mecanismos epigenéticos de controle da expressão gênica (PROBST, DUNLEAVY, ALMOUZNI, 2009, GOODRICH; KUGEL, 2006, MOAZED, 2009). Tem sido demonstrado que esses RNAs não codificadores são capazes de degradar mRNAs específicos (ESTELLER, 2008; GUIL; ESTELLER, 2009). Pequenas moléculas de RNA não codificante, estão sendo estudadas para o controle da expressão gênica. Estas moléculas incluem os microRNAs (miRNAs). MicroRNAs modulam a

expressão do gene de uma maneira epigenética e, são candidatos para novos componentes de redes reguladoras em um amplo espectro de circunstâncias (FILIPOWCZ; BHATTACHARYYA; SONENBERG, 2008, GOODRICH; KUGEL, 2006, MOAZED, 2009).

Expressões alteradas de miRNAs podem resultar através de vários mecanismos, incluindo anormalidades genômicas, regulação transcricional e processamento de miRNAs (WINTER et al., 2009). O mecanismo de silenciamento de miRNAs não está amplamente caracterizado mas surge como um fator importante na determinação epigenética do destino da expressão gênica em células tumorais como, por exemplo, no melanoma cutâneo (SIGALOTTI et al., 2010). Em muitos tipos de cânceres, hipermetilação das ilhas CpGs resultam em modificações hereditárias de genes promotores e de histonas ocasionando silenciamento de genes supressores do tumor (LUJAMBIO et al., 2007).

Combinado com a recente descoberta de que a curcumina é um agente de hipometilação de DNA e modulação epigenética da expressão de microRNA, pode ser um importante mecanismo subjacente aos efeitos biológicos da curcumina (NEGRINI et al., 2007).

#### 2.4.2.5 Ação da curcumina em mecanismos epigenéticos

A curcumina tem diversos alvos moleculares associados com numerosas cascatas bioquímicas e moleculares e tem sido reportada atividade exercida através de interação direta com e/ou modulação epigenética da expressão gênica (ANAND et al., 2008).

As atividades biológicas diferentes e amplas da curcumina são mediadas através da interação direta da curcumina com proteínas alvo, bem como da modulação epigenética de genes alvo. (FU; KURZROCK, 2010; REUTER, 2011). Além destas interações diretas com as proteínas alvo a curcumina pode exercer ações indiretas, como atuação em cascatas de transdução de sinal intracelular que regulam a expressão do gene. Estudos recentes têm demonstrado que a curcumina pode se ligar à enzima DNA metiltransferase (DNMT) modulando a ação dessa

enzima, além disso, a curcumina pode modular enzimas histonas deacetilases (HDAC) demonstrando uma ação epigenética desse composto (Figura 9) (FU; KURZROCK, 2010). É provável que a curcumina possua ação inibitória em p300/CBP (uma histona acetiltransferase); HDAC1 e HDAC3 (Figura 9) (CHEN et al., 2007), podendo representar um mecanismo ação epigenético de inibição do crescimento tumoral (Reuter et al. (2011); Fu; Kurzrock, (2010)

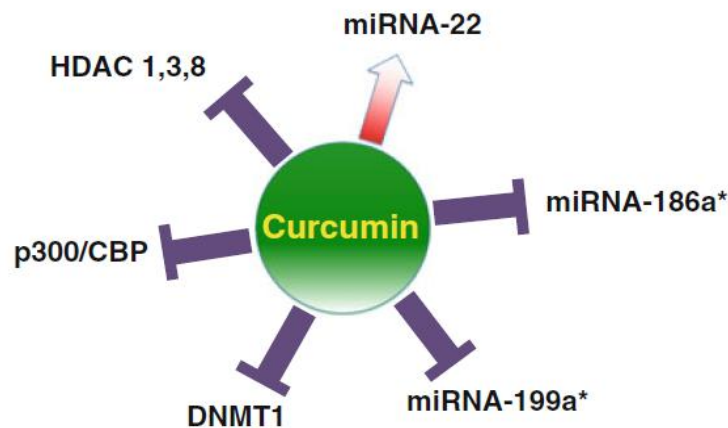


Figura 9 – Atividade biológica da curcumina através da modulação epigenética. Esquema dos mecanismos da curcumina na modulação epigenética via inibição das DNA metiltransferases (DNMTs), histonas acetiltransferases (HATs), histonas deacetilases (HDACs), microRNAs: 199a e 186a, (miRNAs), p300/CBP e ativação do microRNA-22 (miRNA). As vias de inibição/ativação destes respectivos alvos moleculares estão relacionadas com a morte celular e conseqüente inibição do crescimento do tumor

Fonte: Reuter et al. (2011); Fu; Kurzrock, (2010)

Em outro estudo com células da linhagem leucêmica foi demonstrado que o tratamento com 30  $\mu$ M de curcumina diminuiu os níveis de metilação global do DNA, demonstrando que a curcumina é um potente agente hipometilante podendo ser utilizado para reverter o padrão de metilação alterado no câncer (LIU et al., 2009).

Frente a estes fatos, este estudo pretende investigar a ação citotóxica do composto **2** veiculado em uma nanoemulsão e avaliar o efeito do tratamento na metilação do DNA em linhagens celulares. Com esse estudo pretendemos elucidar alguns mecanismos antitumorais de compostos derivados de substâncias naturais como, por exemplo, a curcumina.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação biológica do composto **2** veiculado em uma nanoemulsão lipídica.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar a formulação baseada em nanoemulsão lipídica contendo o composto **2** e avaliar sua estabilidade.
- Avaliar a citotoxicidade da formulação contendo o composto **2** em linhagens de células: Raw, Jurkat e B16F10.
- Investigar a ação epigenética da formulação com e sem o composto **2** no DNA de células tumorais da linhagem de melanoma murino (B16F10).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 NANOEMULSÃO

#### 4.1.1 Preparo da nanoemulsão

A metodologia de obtenção da nanoemulsão lipídica foi padronizada no Laboratório de síntese e formulações (LSF) da UNIBAN e utilizada neste trabalho sob orientação da Profa. Dra. Claudete Justina Valduga.

As formulações foram preparadas através de homogeneização a alta pressão em emulsificador (Emulsiflex C5, Avestin). A temperatura ideal para se obter a emulsificação deve ser superior ao ponto de fusão dos componentes. A temperatura adequada foi de 50°C e o tempo de emulsificação determinado para se obter partículas de tamanho desejado foi de 8 minutos para emulsão controle, sem o composto **2**, e de 20 minutos para a emulsão com o composto **2** (Santos, 2010). Esta diferença deve-se ao fato de uma nanoemulsão lipídica conter o derivado do análogo da curcumina e a outra nanoemulsão não.

As emulsões foram padronizadas com a seguinte composição: óleo de semente de algodão, fosfatidilcolina,  $\beta$ -caroteno, colesterol e Tween<sup>®</sup> 20 e, caso possua o composto **2** este é adicionado em a uma concentração pré-determinada (18%).

#### 4.1.2 Estabilidade da nanoemulsão

Segundo Santos, 2010, os testes de estabilidade realizados foram: tamanho das partículas e polidispersidade, acidez e peróxidos como mostrado segue nos itens: 4.2.3; 4.2.4 e 4.2.5.

## 4.2 CULTURA, MANUTENÇÃO E CONGELAMENTO DE LINHAGENS CELULARES

As linhagens celulares foram mantidas em meio de cultura RPMI – 1640 (Himedia Laboratories Pvt. Limited) enriquecido com glutamina 2 mM, tamponado com bicarbonato de sódio 24 mM, HEPES 20 mM, 10% de soro fetal bovino (SFB, LGC) e 0,2% de antibiótico (10000 U/mL de penicilina e 10000 µg/mL de estreptomicina) em garrafas de cultura a 37°C em estufa com atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico, com repiques a cada 24 ou 48 horas.

Para realização do congelamento as linhagens celulares foram colocadas no tubo de congelamento na concentração de  $1,0 \times 10^6$  células/mL, em 50% de meio de congelamento, composto por 20% DMSO (dimetilsulfóxido, Aldrich), 80% SFB, 50% de cultura (RPMI – 1640) e congeladas imediatamente no nitrogênio líquido onde ficaram armazenadas para uso posterior.

### 4.2.1 Jurkat

Na Figura 10 observa-se a morfologia das células da linhagem Jurkat, que são células leucêmicas, obtidas no banco de dados ATCC (<http://www.atcc.org>) e cedidas pelo Prof. Dr. Rui Curi (Departamento de Farmácia da Universidade de São Paulo – USP, laboratório do próprio professor), com crescimento em suspensão e mantidas em meio RPMI 1640 (Himedia Laboratories Pvt. Limited). Para a cultura de células Jurkat foi necessário mantê-las em garrafas contendo meio de cultura RPMI 1640 acrescido de 10% de soro fetal bovino em estufa a 37° C com 5% de dióxido de carbono. Após atingir o crescimento exponencial, as células foram mantidas em

repiques a cada dois dias de forma que não passaram de uma concentração de  $8 \times 10^5$  células/mL. Para o repique, as células foram retiradas da estufa para observação de morfologia e crescimento em microscópio invertido (Nikon eclipse TS100). Foram ressuspensas na própria garrafa para dissociação dos grumos facilitando a posterior contagem. Centrifugou-se a 1700 rpm por 10 minutos a 20°C. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” foi ressuspensado em 10 mL de meio RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino. Após foi realizada a contagem de células em câmara de Neubauer. Para a contagem das células e análise da viabilidade foi feita uma diluição de 1:10, sendo 10  $\mu$ L de células, 10  $\mu$ L de azul de Tripán e 80  $\mu$ L de PBS (tampão fosfato salina) não estéril. Nos experimentos de citotoxicidade essas células foram cultivadas em placas de 96 poços com RPMI completo na concentração de  $1,0 \times 10^5$ /poço.

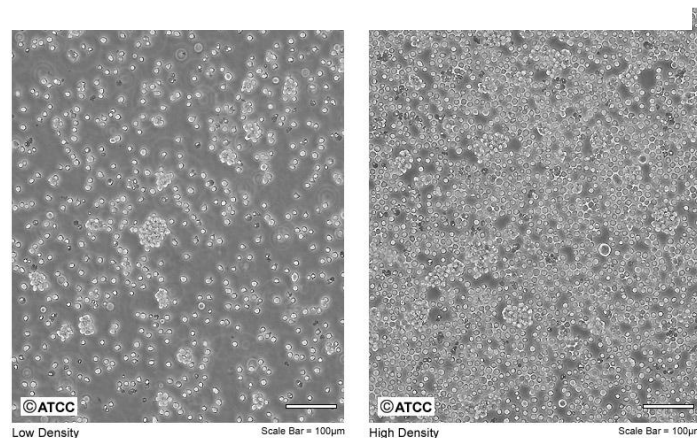


Figura 10 – Morfologia de células de Jurkat exemplificando o crescimento da linhagem

Fonte: <<http://www.atcc.org/Attachments/25948.jpg>> acesso em 09 abr 2012

#### 4.2.2 Raw

São macrófagos murinos obtidas no banco de dados ATCC do Rio de Janeiro ([www.bcrj.hucff.ufrj.br](http://www.bcrj.hucff.ufrj.br)) (Figura 11). Crescem aderidas e seu repique é feito pela raspagem das células com um “scraper” após a adição de PBS por três vezes. A centrifugação e contagem em câmara de Neubauer conforme item 4.2.1. Nos

experimentos de citotoxicidade essas células foram cultivadas em placas de 96 poços com RPMI completo na concentração de  $1,0 \times 10^4$ /poço.

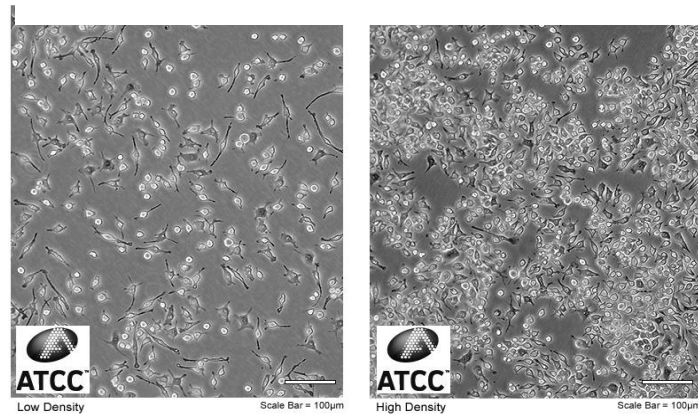


Figura 11 – Morfologia de células de monócitos / macrófagos (Raw) exemplificando o crescimento da linhagem.

Fonte: <<http://www.atcc.org/Attachments/25948.jpg>> acesso em 09 abr 2012

#### 4.2.3 B16F10

As células de melanoma murino foram obtidas no banco de dados ATCC (<http://www.atcc.org>) sendo cedidas pela Profa. Dra. Elaine Rodrigues (Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, Laboratório DMIP) (Figura 12). As células de melanoma apresentam morfologia fusiforme, parecida com as células epiteliais e, crescem aderidas na superfície da garrafa de cultura por moléculas de adesão expressas na sua membrana. Para o repique são lavadas com PBS três vezes, em seguida, coloca-se tripsina e completa com o meio de cultura RPMI 1640 acrescido de 10% de soro fetal bovino. Como o tempo do seu ciclo de replicação é 16h o seu repique é feito a cada 24 horas no máximo. A centrifugação a contagem é feita em câmara de Neubauer conforme item 4.2.1. Nos experimentos de citotoxicidade essas células foram cultivadas em placas de 96 poços com RPMI completo na concentração de  $7,5 \times 10^3$ /poço.

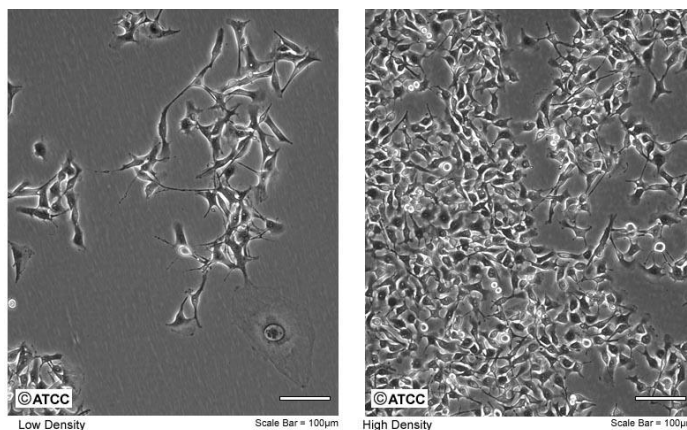


Figura 12 – Morfologia de células de melanoma (B16F10) exemplificando o crescimento da linhagem. Observa-se empilhamento celular (células sobrepostas) característico de células tumorigênicas. Em maior magnitude observa-se que as mesmas estão espalhadas, apresentam morfologia hexagonal. A superfície celular contém evidentes microespículas (PADYE et al., 2010).

Fonte: <<http://www.atcc.org/Attachments/12262.jpg>> acesso em 09 abr 2012

#### 4.3 EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE

Para a realização dos experimentos de citotoxicidade as células das linhagens tumorais Raw, B16F10, Jurkat foram cultivadas em placas de 96 poços com meio de cultura (RPMI completo) na concentração determinada para cada linhagem e tratadas com diversas concentrações do composto **2** em nanoemulsão lipídica, identificado como nanoemulsão com o composto **2** (NA), por 24 horas de acordo com a linhagem em estudo. Para os ensaios com os controles (C) os pocinhos não foram tratados com o referido composto ou foram tratados com a nanoemulsão sem o composto **2** (NB).

Após o período de 24 horas, a viabilidade celular foi avaliada em células das linhagens testadas em diferentes concentrações, em triplicata, por meio da análise colorimétrica de metiltetrazolium (teste de MTT / brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, da Sigma-Aldrich). O ensaio de viabilidade pelo MTT é baseado na capacidade das células viáveis em reduzir compostos a base de tetrazolium

(MARTIKAINEN et al., 1993) gerando um produto colorido chamado de formazona. Nos poços contendo as células tratadas ou não com o composto, foi adicionado 50µL de solução de MTT (5mg/mL) e incubados por 4h. Após esse período, o sobrenadante foi retirado e as células foram lisadas com 200µL DMSO (dimetilsulfóxido, Aldrich). A absorbância foi medida a 540nm em espectrofotômetro, e a medida da formazona formada correlacionou diretamente com o número de células viáveis na cultura. Quanto menor a absorbância, menor o número de células viáveis metabolizando o MTT em formazona e menor a cor gerada na reação (Figura 13 poços B2 e B3, por exemplo). Por outro lado, reações com coloração intensa e leituras de absorbância maiores (Figura 13 poços A1 e A2, por exemplo) se correlacionam com alta viabilidade celular, indicando baixa ou nenhuma atividade do composto.

Na Figura 13 pode ser visualizado a formazona formada nos poços que continham células viáveis (poços em roxo). Poços sem células viáveis aparecem transparentes, sem a presença de formazona metabolizada. Os resultados de citotoxicidade foram expressos como percentual de viabilidade em relação a 100% de viabilidade do controle.

Os dados obtidos a partir do testes de “MTT” foram submetidos à análise estatística pelo software o programa Graphpad® (prisma). Todos os testes estatísticos foram analisados considerando o nível de significância de 5%.

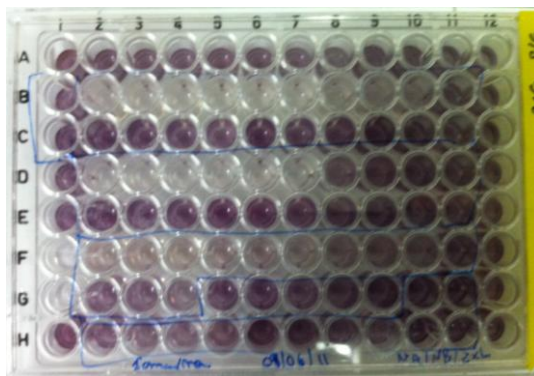


Figura 13 – Análise da citotoxicidade de compostos contendo o composto **2** pelo método do “MTT”. A diferença de intensidade da cor roxa é um indicativo da atividade do composto **2**.

Fonte: Acervo pessoal

#### 4.4 DETERMINAÇÃO DA IC<sub>50</sub>%

O IC<sub>50</sub>, índice de citotoxicidade de 50%, foi determinado após leitura das absorbâncias em leitor ELISA (Labtech), a qual se relaciona inversamente proporcional à concentração do composto, onde quanto maior a sua concentração menor a viabilidade celular, indicando uma atividade citotóxica deste composto. Esta medida de IC<sub>50</sub> equivalente à concentração do composto, onde se observa uma inibição de 50% da viabilidade celular comparada com 100% de viabilidade dos poços controle (sem o tratamento), foi calculada quando houve uma correlação ( $R \geq 0,7$ ) significativa ( $p < 0,05$ ) entre a concentração do composto (eixo x) e, viabilidade celular (eixo y). Após a construção do gráfico de correlação foi realizada a regressão linear para obtenção da equação da reta ( $y = ax + b$ ) que foi utilizada para o cálculo da IC<sub>50</sub>, substituindo-se o valor de y por 50%.

#### 4.5 ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DO DNA DE CÉLULAS DA LINHAGEM DE MELANOMA MURINO POR MSAP-PCR

##### 4.5.1 Extração do DNA

Células B16F10 foram cultivadas em meio de cultura (RPMI-1640) com o referido composto **2** na concentração de 10 $\mu$ M, que foi onde obteve-se uma maior diferença entre os dois grupos (NA x NB), por 48 horas. Após este período as células foram coletadas e centrifugadas a 1500rpm por 15 min. O pellet destas células que se formou foi lavado 1X com tampão PBS e ressuspenso em tampão de lise (Tris-HCl 10mM pH 8.0, EDTA 50mM pH 8.0, SDS 0,5% contendo 20 $\mu$ g/ $\mu$ L de RNase e proteinase K).



O DNA genômico, extraído das células, foi lisado a 55°C após incubar as células no tampão de lise. Esse lisado foi incubado com o mesmo volume de fenol equilibrado em tampão Tris e agitado por 15 min.

Centrifugou-se por 10 minutos a 3000rpm em temperatura ambiente, o sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para outro tubo Eppendorf® e acrescentado o mesmo volume de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1), agitou-se por 5 minutos e centrifugou-se por 10 minutos a 3000rpm em temperatura ambiente.

Foi adicionado novamente clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) e agitou-se, logo foi centrifugado por mais 10 minutos a 3000rpm, o sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para outro tubo e o DNA contido nele foi precipitado na presença de etanol absoluto gelado e acetato de sódio 0,3M com pH:5,2.

Este DNA precipitado foi mantido “overnight” (ON) no freezer a -20°C. Posteriormente, foi centrifugado por 20 minutos a 12000rpm e desprezado o sobrenadante. O precipitado (transparente) foi lavado com álcool 70%, em seguida, centrifugado por 10 minutos a 12000rpm, descartado o sobrenadante, seco (37° C). Este “pellet” foi ressuspenso em 100µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 Mm, pH 8).

Para a quantificação do DNA, foi realizada a leitura no aparelho espectrofotômetro, a 260 nm e 280 nm, para determinar a contaminação por proteína e a integridade do DNA extraído foi observada por eletroforese em gel de agarose a 1%.

#### 4.5.2 MSAP-PCR (“Methylation Sensitive Arbitrarily Primed” PCR)

Para análise do perfil de metilação do DNA foi utilizada a metodologia do MSAP-PCR. Esta técnica consiste na digestão do DNA juntamente com a técnica de AP-PCR (“Arbitrarilyprimed PCR”) para a identificação de mudanças aleatórias, mas específicas no perfil de metilação do DNA. Foi utilizada a enzima *MseI* para a fragmentação do DNA e facilitar a análise do padrão obtido. Para realização da técnica, 500ng de DNA genômico foram digeridos com as enzimas de restrição *MseI*

(5U) sozinha, *MseI* em combinação com *HpaII* (25U), *MseI* em combinação com *MspI* (25U) e DNA sem digerir como controle. As reações foram realizadas em um volume final de 50  $\mu$ L contendo o DNA, as enzimas de restrição, o tampão da enzima NEBuffer 2, BSA (albumina sérica bovina) e água. As enzimas de restrição foram adicionadas de forma que metade de seu volume total foi colocado no início da digestão e a outra metade foi adicionada somente após três horas de incubação. Todas as amostras foram incubadas em incubadora seca (Bioplus IT-2002) a 37°C “overnight”. Após digestão, as amostras foram diluídas 1:5 em água e armazenadas em freezer a -20°C, até o momento de uso.

#### 4.5.3 Amplificação

Após a digestão, os DNAs foram amplificados em reações de PCR (reação em cadeia da polimerase) com “primers” aleatórios MGE-2 (5' - AAC CCT CAC CCT AAC CGG CC-3') e MGF-2 (5' - AAC CCT CAC CCT AAC CCG CG - 3') contendo aproximadamente 100ng do DNA digerido. Foi realizado MSAP-PCR com as amostras de B16F10. Para cada tubo foram adicionados 1 $\mu$ L de DNA diluído e 19  $\mu$ L de mix contendo tampão com  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2$  (0,09 mM), dNTP (0,15 mM de cada), “primer” aleatório (1 $\mu$ M), Taq polimerase (0,1U) e água. Os tubos foram colocados no termociclador (Bio-Rad) com o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; trinta e cinco ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, hibridação a 40°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; extensão final a 72°C por 7 minutos e resfriamento a 4°C por até 20 horas. Ao término, os tubos foram armazenados em freezer a -20°C até o uso.

#### 4.5.4 Eletroforese

Para análise dos produtos da MSAP-PCR foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida 6% para DNA. Para dois geis foram adicionados a um Béquer de 100 mL, 80 mL de mistura de acrilamida/bisacrilamida 29:1, 800 µL de APS 10% (persulfato de amônio) e 80 µL de Ultra Pure™ TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina). O gel foi colocado entre as placas previamente montadas com seus respectivos pentes. Após a polimerização dos geis, os mesmos foram colocados em uma cuba para eletroforese contendo TBE 1X (Tris base 90mM, ácido bórico 90mM e EDTA 2mM, pH 8,0) e as amostras foram aplicadas juntamente com padrões de pesos moleculares de 1 Kb e 100 pb (10 µL) como marcadores. Para cada 15 µL de amostra foram adicionados 2,5 µL de tampão da amostra 6X (15% de ficoll, 0,05 % bromofenolazul, 0,05 % xilenocianol, H<sub>2</sub>O) para um volume final de 17,5 µL por tubo. A corrida eletroforética foi feita a 100 V durante 3 horas. Depois, a voltagem foi aumentada para 150 V por uma hora, até a saída do primeiro corante. Após, a voltagem foi aumentada para 200 V. Terminada a corrida eletroforética, os géis foram colocados em um recipiente e foram adicionados 150 mL de fixador (60 mL de etanol absoluto, 2 mL de ácido acético e H<sub>2</sub>O q.s.p. 600 mL). Agitou-se por 15 minutos e depois foi adicionada solução de prata (0,6 g de Ag para 40 mL de H<sub>2</sub>O) preparada previamente. Agitou-se por 10 minutos e após este período a solução foi retirada e foi adicionado um pouco de água destilada para lavar os géis. Em seguida a água foi retirada e acrescentaram-se 2,5 mL de revelador (9 g de NaOH, 1000 µL de formaldeído e H<sub>2</sub>O q.s.p. 300 mL). Agitou-se até aparecerem as bandas. O revelador foi retirado e adicionou-se um pouco de água destilada. A água foi retirada e colocou-se 150 mL de fixador, mantendo a agitação por mais 15 minutos. O padrão de bandas gerado foi avaliado comparando-se amostras antes e após o tratamento com o composto.

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de citotoxicidade obtidos foram submetidos à análise de variância (teste “t” não paramétrico = Mann-Whitney) entre os dois grupos de tratamento NA *versus* NB nas concentrações testadas. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados

indicativos de significância. Os testes foram realizados utilizando-se o programa Graphpad® (prisma) versão 5.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PREPARO DA NANOEMULSÃO

Devido à baixa eficiência de incorporação do composto **1** (SANTOS et al., 2010), os estudos de incorporação, avaliação da estabilidade e de citotoxicidade foram conduzidos apenas para o composto **2**. As emulsões foram obtidas contendo o composto **2** (NA) e sem o composto (NB) pela homogeneização em emulsificador. Apresentaram-se translúcidas, com coloração levemente amarelada devido à fosfatidilcolina e ao  $\beta$ -caroteno. Entretanto, a nanoemulsão contendo o composto **2** (NA) apresentou coloração amarela mais intensa, devido à presença do composto **2** que possui coloração característica amarela intensificando com isso a cor da nanoemulsão preparada (Figura 14).

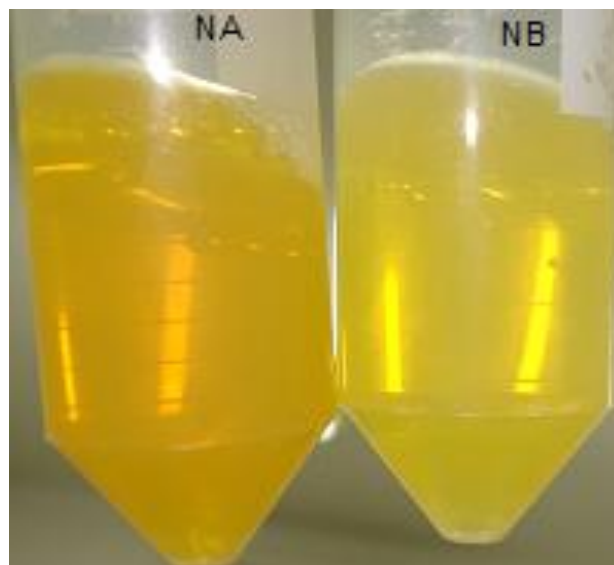


Figura14 – Formulações baseadas em emulsão lipídica com (NA) e sem o composto **2** (NB) – emulsão controle

Fonte: Acervo pessoal

No preparo das nanoemulsões, procurou-se utilizar apenas substâncias que compõem normalmente nosso organismo. O único componente que não está presente em lipoproteínas naturais, ou faz parte da dieta, é o Tween<sup>®</sup> 20. Seu uso como co-surfactante foi necessário, mas sua concentração foi ajustada como a mínima possível para se obter boa homogeneização e partículas de tamanho adequado (100nm). Após esse período a formulação foi alíquotada e armazenada em geladeira (2°C – 8°C).

## 5.2 ATIVIDADE CITOTOXICA *IN VITRO* DAS NANOEMULSÕES

Experimentos de citotoxicidade foram realizados utilizando-se o composto **2** veiculado em nanoemulsão (NA) e seu controle sem o composto (NB). Além disso, utilizou-se também o composto **1** diluído em DMSO para avaliar a ação direta desse composto nas culturas celulares, sem a interferência dos componentes da nanoemulsão. Não foi possível utilizar o composto **2** diretamente nas culturas diluído em DMSO, pois este não apresentou solubilidade satisfatória.

Em todos os experimentos foram testados, em paralelo, os veículos DMSO e nanoemulsão nos volumes correspondentes à cada concentração testada para os compostos **1** e **2**.

### 5.2.1 Citotoxicidade em células da linhagem Raw

Os resultados dos testes de citotoxicidade das formulações de nanoemulsão sem o composto **2** (NB), ou contendo o composto **2** (NA), em linhagens de macrófagos murinos demonstraram que nas menores concentrações de NA e NB (0,2 e 2µM) não houve alteração da viabilidade celular (Figura 15). Uma pequena diminuição da viabilidade (10%) foi observada a partir da concentração de 20µM de

NA e NB. Entretanto, nas concentrações maiores de nanoemulsão (200 e 2000  $\mu\text{M}$ ) foi observada diminuição acentuada da viabilidade (60% e 90%, respectivamente).

Entretanto, não foi observado nenhuma diferença na ação citotóxica entre as formulações, independente da presença ou não do composto **2** (Figura 15). A análise estatística (teste “t” não paramétrico) destes dados não demonstrou diferença significativa ( $p=0,5$ ) entre os dois grupos de tratamento (NA x NB) nas concentrações testadas, sugerindo que o efeito citotóxico observado nas maiores concentrações, pode ser devido a componentes da própria nanoemulsão presente nos dois grupos testados (Figura 15).

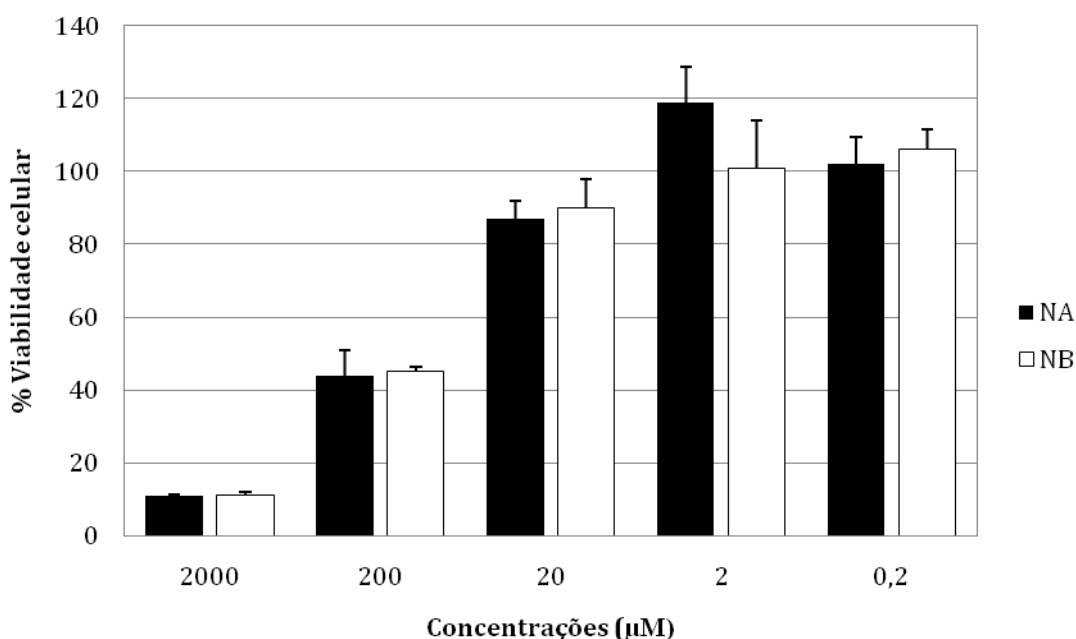


Figura 15 – Análise da citotoxicidade de células Raw tratadas com nanoemulsão contendo o composto **2** (NA) ou não (NB) em diferentes concentrações (2000 $\mu\text{M}$ ; 200 $\mu\text{M}$ ; 20 $\mu\text{M}$ ; 2 $\mu\text{M}$  e 0,2 $\mu\text{M}$ ). Os resultados foram expressos em % de viabilidade celular

Fonte: Acervo pessoal

A ação do composto **1** foi testada nessa linhagem e os resultados demonstram que esse composto diminuiu a viabilidade celular somente na concentração de 2000 $\mu\text{M}$  (Figura 16). Entretanto, quando o veículo (DMSO) utilizado para solubilizar o composto, foi testado sozinho, observou-se uma diminuição semelhante, em torno de 50%, da viabilidade na concentração correspondente a de 2000 $\mu\text{M}$  (dado não mostrado), sugerindo que o efeito citotóxico do composto **1**

observado nessa concentração pode ser devido ao próprio DMSO, já descrito como sendo tóxico para células em cultura. Portanto, pode-se concluir que pouco ou nenhum efeito citotóxico foi observado em células da linhagem Raw após o tratamento com o composto 1.

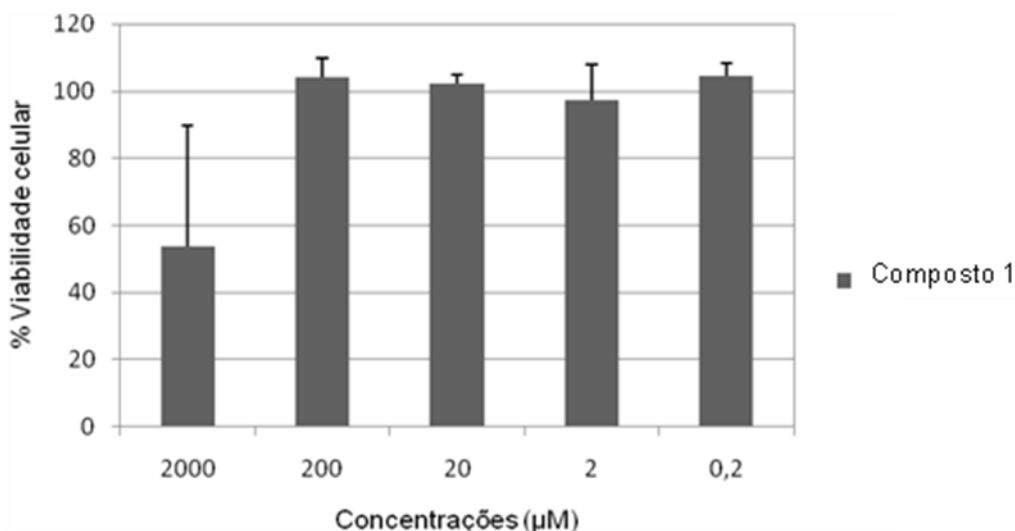


Figura 16 – Análise da citotoxicidade de células Raw tratadas com o composto 1 em diferentes concentrações (2000µM; 200µM; 20µM; 2µM e 0,2µM). Os resultados foram expressos em % de viabilidade celular

Fonte: Acervo pessoal

### 5.2.2 Citotoxicidade em células da linhagem Jurkat

O teste de citotoxicidade na linhagem Jurkat demonstrou que o tratamento com a nanoemulsão aumentou a viabilidade celular em todas as concentrações testadas, sugerindo que componentes da nanoemulsão podem induzir a proliferação de linfócitos tumorais (Figura 17). Entretanto, quando se utiliza a nanoemulsão contendo o composto 2 (NA), observa-se uma inibição significativa ( $p < 0,05^*$ , teste “t” não paramétrico) da proliferação das células Jurkat quando comparada com o grupo tratado com NB, em todas as concentrações, com exceção da concentração de 20µM (Figura 17). Esta inibição foi mais acentuada ( $p < 0,01^{**}$ ) quando utilizou-se maior quantidade de NA (100µM). Os dados apresentados aqui não atingiram uma

citotoxicidade de 50% das células, desta forma, o valor de IC<sub>50</sub> calculado (Tabela 1, item 5.3) foi um valor estimado.

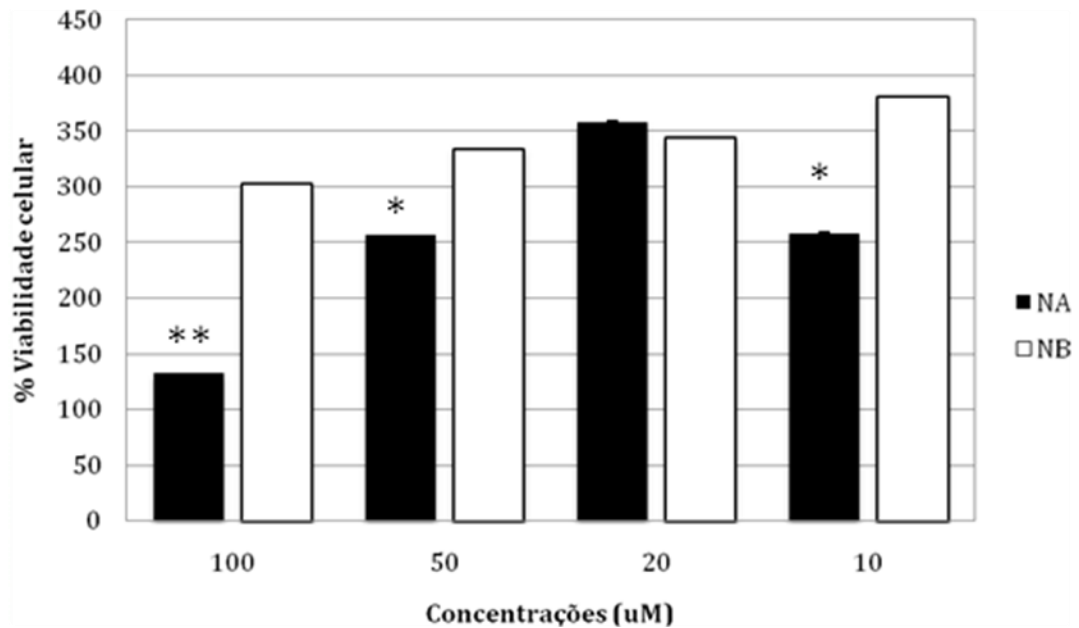


Figura 17 – Análise da citotoxicidade de células Jurkat tratadas com nanoemulsão contendo o composto 2 (NA) ou não (NB) em diferentes concentrações (100µM; 50µM; 20µM e 10µM). Os resultados foram expressos em % de viabilidade celular

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,001$

Fonte: Acervo pessoal

Foi observada atividade citotóxica em células jurkat mesmo com o tratamento de pequenas quantidas do composto 1 (0,2 µM), atingindo uma diminuição de mais de 50% da viabilidade celular na concentração de 200 µM (Figura 18). O tratamento com o veículo (DMSO) utilizado para solubilizar o composto 1 também indicou que na concentração correspondente a de 2000µM houve uma diminuição em torno de 50% da viabilidade (dado não mostrado), sugerindo que nesta concentração o efeito citotóxico observado foi devido à presença do DMSO. Portanto, a correlação entre as variáveis concentração de composto e viabilidade celular foi realizada sem essa concentração (2000µM).



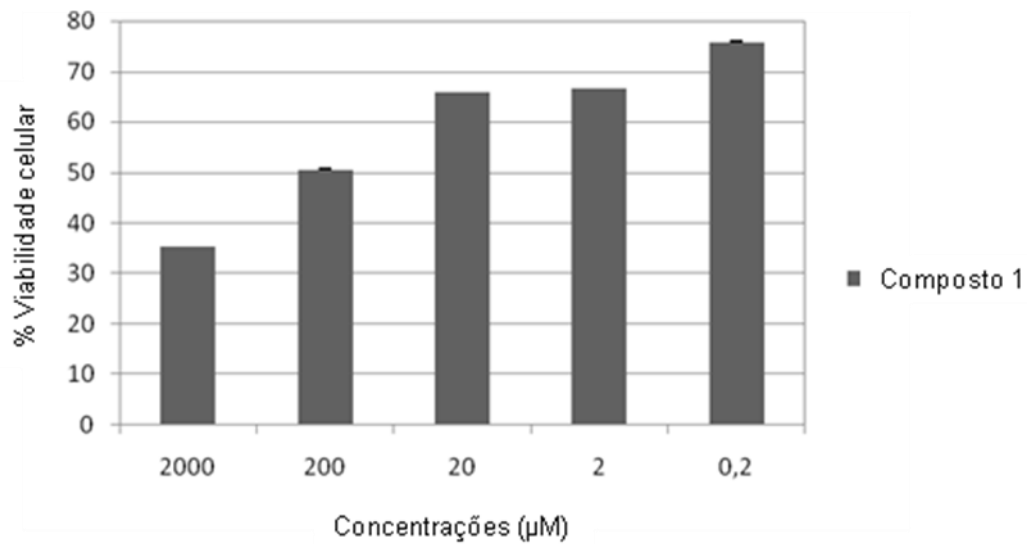


Figura 18 – Análise da citotoxicidade de células Jurkat tratadas com o composto 1 em diferentes concentrações (2000µM; 200µM; 20µM 2µM e 0,2µM). Os resultados foram expressos em % de viabilidade celular

Fonte: Acervo pessoal

Esses dados demonstram que o tratamento de células da linhagem linfocítica com compostos derivados da curcumina diminuiu a viabilidade celular e inibiu a proliferação de linfócitos tumorais.

### 5.2.3 Citotoxicidade em células da linhagem de melanoma murino

A viabilidade de células de melanoma murino (B16F10) foi pouco alterada com o tratamento de nanoemulsões na concentração de 50 e 100µM (Figura 19). Entretanto, nas concentrações maiores que 250µM, houve uma queda na viabilidade celular, tanto para o tratamento com nanoemulsão com (NA) ou sem (NB) o composto 2. Embora não se tenha observado diferenças na viabilidade das células comparando o tratamento com a nanoemulsão sem e com o composto 2 nas maiores concentrações, o tratamento com concentrações menores do composto 2 (NA), parece afetar a viabilidade das células de forma diferente do tratamento com a nanoemulsão controle (NB). Foi observada uma menor (viabilidade de células

tratadas com a nanoemulsão contendo o composto **2** na concentração de 50 $\mu$ M (Figura 19).

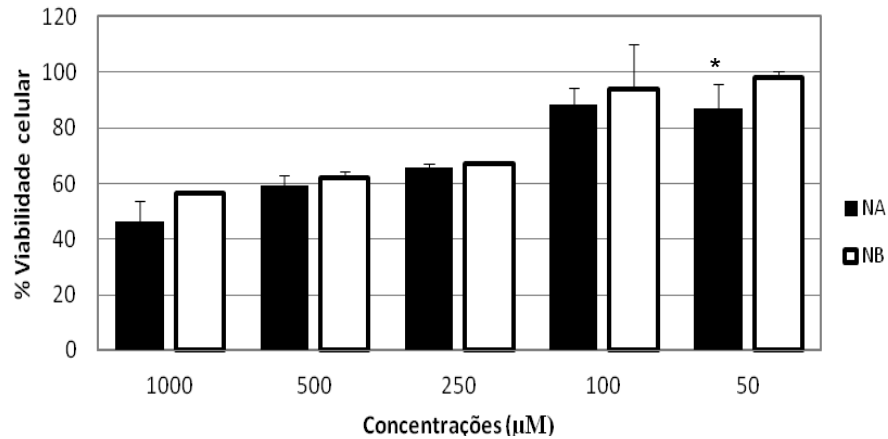


Figura 19 – Análise da citotoxicidade de células B16F10 tratadas com nanoemulsão contendo o composto **2** (NA) ou não (NB) em diferentes (1000 $\mu$ M; 500 $\mu$ M; 250 $\mu$ M; 100 $\mu$ M e 50 $\mu$ M). Os resultados foram expressos em % de viabilidade celular.

Fonte: Acervo pessoal

Células de melanoma murino tratadas com o composto **1** tiveram sua viabilidade pouco alterada (85-70%), mesmo quando tratadas com elevadas concentrações (1000 $\mu$ M) (Figura 20). Esse resultado demonstrou uma baixa atividade citotóxica desse composto frente a células de melanoma. O valor de IC<sub>50</sub> para essa linhagem foi calculado, mas representa uma estimativa, uma vez que não foi atingida a citotoxicidade de 50% das células (Tabela 1, item 5.3).

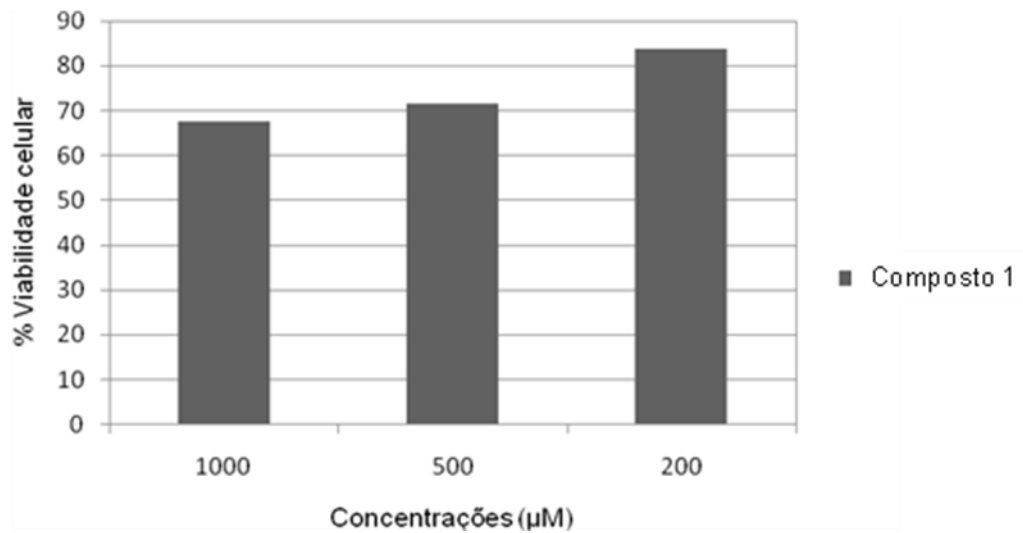


Figura 20 – Análise da citotoxicidade de células B16F10 tratadas com o composto **1** em diferentes concentrações (1000µM; 500µM e 200µM) por 24h. Os resultados foram expressos em % de viabilidade celular calculada pela metodologia do MTT

Fonte: Acervo pessoal

### 5.3 DETERMINAÇÃO DA IC<sub>50</sub>

A concentração do composto onde se observa um efeito tóxico em 50% das células adicionadas nos poços foi calculada pela regressão linear entre as variáveis concentração do composto e percentual de viabilidade celular. O cálculo do valor de IC<sub>50</sub> foi realizado quando foi obtida uma correlação ( $r > 0,8$ ) significativa ( $p < 0,05$ ) entre essas variáveis.

A Tabela 1 mostra os valores de IC<sub>50</sub> obtido pelo tratamento de diferentes linhagens com as nanoemulsões sem (NB) e com (NA) o composto **2**, e pelo tratamento com o composto **1**. Pode-se observar que as nanoemulsões foram mais ativas contra a linhagem de melanoma murino, B16F10, pois, menores quantidades de composto foram necessárias para matar 50% das células. Entretanto, em nenhuma outra linhagem foi observada uma diferença significativa entre o tratamento com a nanoemulsão contendo o composto **2**, com exceção da linhagem de melanoma murino (Tabela 1). Já os valores de IC<sub>50</sub> do composto **1** mostraram que este foi mais ativo na

linhagem de células Jurkat. A linhagem macrofágica foi a mais resistente ao tratamento com compostos derivados da curcumina (Tabela 1).

Tabela 1 – IC<sub>50</sub> (µM) do composto 1 e 2 em três linhagens celulares tumorais. Valores de IC<sub>50</sub> obtidos de células de diferentes linhagens (Jurkat, Raw e B16F10) tratadas por 24 horas com nanoemulsões contendo (NA) ou não (NB) o composto 2, ou como composto 1.

	NA	NB	COMPOSTO 1
<b>RAW</b>	902	989	2173
<b>Jurkat</b>	1219	1133	202
<b>B16F10</b>	375	490	1812

IC50 = Concentração que inibe 50% da concentração inicial da viabilidade celular

Fonte: Arquivo pessoal

A curcumina apresenta-se como um composto promissor para o uso como agente quimiopreventivo. Os resultados indicam que embora a curcumina e seus análogos apresentem atividades para suprimir vias inflamatórias e proliferação celular, a falta de unidades para estes análogos pode reduzir suas atividades (apud ANAND, 2011). Sua utilização é limitada devido à sua cor; sua baixa solubilidade em água e a sua baixa biodisponibilidade (ANAND, 2008). Nanopartículas baseadas em abordagens de distribuição de drogas têm o potencial para o processamento de agentes hidrofóbicos como a curcumina dispersível em meios aquosos, contornando assim os problemas da baixa solubilidade (BISHT et al., 2007).

Neste trabalho, foi desenvolvida uma formulação contendo um derivado da curcumina em nanopartículas de emulsão. Foi mostrado que a formulação se manteve estável, sem alterações visíveis macroscopicamente e, que o tratamento *in vitro* com esta formulação, é citotóxico para as células tumorais pesquisadas. Esses dados indicam que a formulação pode ser uma unidade alternativa para o “delivery” de análogos da curcumina e para aumento da sua biodisponibilidade quando administrada *in vivo*

Este estudo demonstrou que as formulações induziram alterações da viabilidade celular da célula tumoral. Diversos estudos têm mostrado que a curcumina interfere nas múltiplas vias da sinalização celular e, que muitos destes

análogos têm demonstrado boa atividade antitumoral em vários modelos animais e várias linhagens celulares *in vitro* (AGGARWAL, 2010). As células da linhagem Raw são derivadas de macrófagos murinos transformados com retrovírus tornando-se imortalizada. Os dados deste trabalho demonstraram que os compostos **1** e **2** apresentaram uma baixa atividade citotóxica nesta linhagem o que não ocorreu nas outras linhagens tumorais, sugerindo que possa existir uma especificidade destes compostos **1** e **2** contra o câncer.

Especialmente na linhagem jurkat, foi observada atividade anti-proliferativa da nanoemulsão com o composto **2**. A curcumina, um diferuolmentano, tem demonstrado atividade antiinflamatória e anti-proliferativa. Os análogos possuem atividade para supressão da proliferação de leucemina, leucemia de células T (jurkat), próstata e de mama. Além disso, estudos têm demonstrado o papel da curcumina na inibição da proliferação de Linfócitos T estimulados com mitógenos, e como um potente inibidor de LT resistentes ao tratamento com o imunossupressor ciclosporina A. Estes efeitos parecem ocorrer pela inibição da síntese de IL-2, da cadeia alfa de seu receptor e da sinalização da ligação de IL-2 ao seu receptor (Forward NA, Biochem Biophys Res Commun, 2011, Ranjan DJ, 2004). A ação imunossupressora da curcumina deverá ser melhor investigada como uma nova alternativa terapeutica imunossupressora, principalmente nos casos de resistência ao tratamento com inibidores da calcineurina, como a ciclosporina A e o tacrolimus.

Em relação à ação citotóxica em B16F10 foi observado que a formulação apresentou uma citotoxicidade significativa que foi diferente entre os dois grupos (NA x NB). Portanto, esta foi a linhagem escolhida para a avaliação do efeito do tratamento com este composto **2** no padrão de metilação do DNA.

#### 5.4 ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DO DNA DE CÉLULAS B16F10 TRATADAS COM AS NANOEMULSÕES

Para avaliar o efeito do tratamento com as nanoemulsões no padrão de metilação DNA, determinamos uma concentração onde fosse observada diferença na viabilidade das células entre os grupos de nanoemulsões (NA e NB) sem

alteração significativa da viabilidade das células, uma vez que a partir dessa cultura seria extraído o DNA. Assim, com esse resultado (Figura 21), escolhemos a concentração de 10  $\mu\text{M}$  de nanoemulsões para o tratamento das células B16F10 e extração de seu DNA genômico para análise do perfil de metilação.

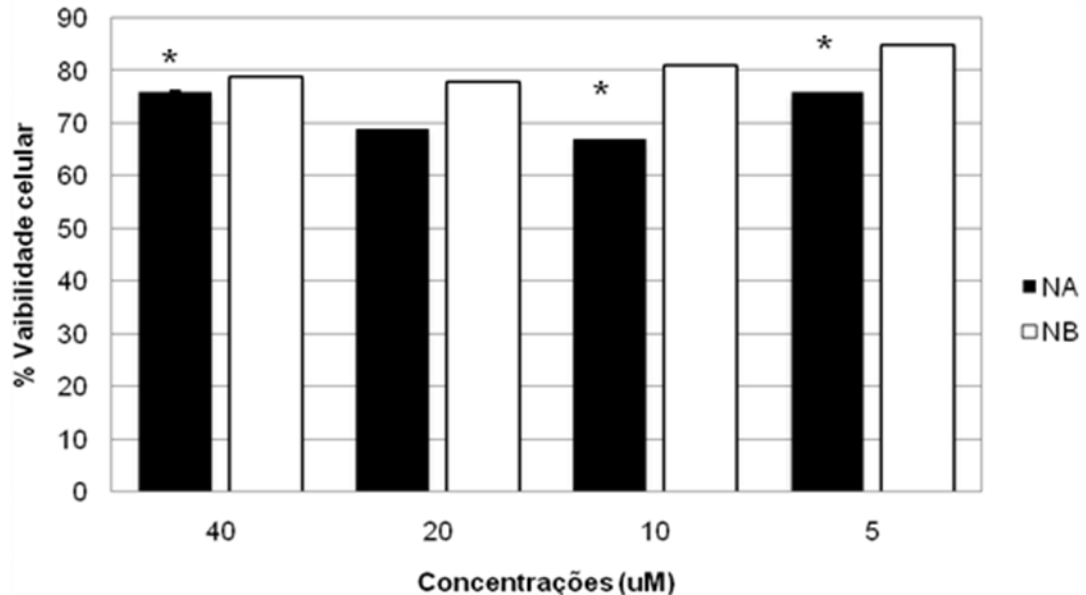


Figura 21 – Análise da Viabilidade celular de células B16F10 tratadas na ausência (NB) ou na presença do composto **2** (NA) em diferentes concentrações (40 $\mu\text{M}$ ; 20 $\mu\text{M}$ ; 10 $\mu\text{M}$  e 5 $\mu\text{M}$ ) veiculado em nanoemulsão lipídica por 24h. Os resultados foram expressos em % de viabilidade celular calculada pela metodologia do MTT. \*  $p < 0,05$ .

#### 5.4.1 Avaliação da integridade de DNA genômico

A integridade do DNA genômico extraído dessas culturas foi avaliada pela migração do DNA por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio. Este DNA mostrou um perfil de bandas com alto peso molecular, acima do padrão de peso molecular de 23 Kb (Figura 22 – canaleta 1), demonstrando a presença de DNA genômico íntegro nas amostras representadas (Figura 22– canaletas 1, 2, 4 e 6). Em algumas amostras (Figura 22 – canaletas 3 e 5) observamos também a presença de uma discreta contaminação com RNA (Figura 22).

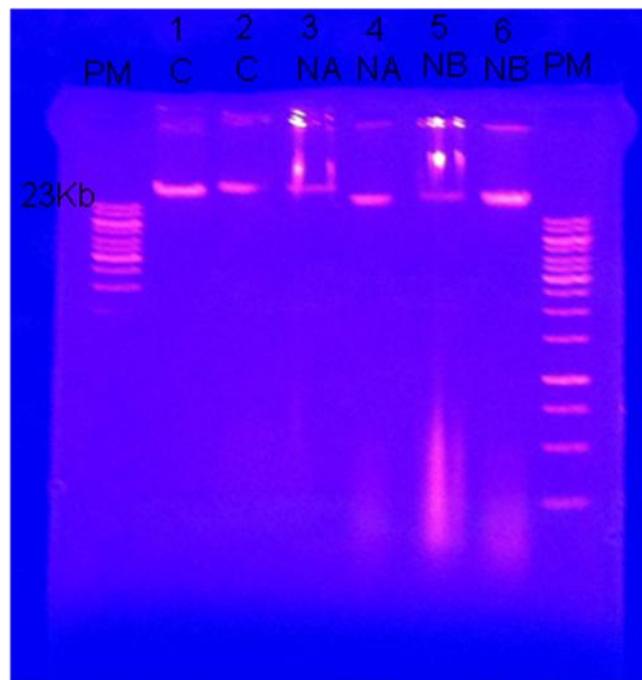


Figura 22 – Análise da integridade do DNA genômico de células tratadas com nanoemulsões. Eletroforese de DNA genômico extraído de B16F10 em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. O número 1 corresponde ao peso molecular de 1 Kb. As amostras de DNA genômico correspondem aos números 2 a 5. Onde PM = peso molecular; C = controle; NA = nanoemulsão com o composto **2** e NB = nanoemulsão sem o composto **2**  
 Fonte: Acervo pessoal

#### 5.4.2 Geração de perfil de metilação do DNA

Padrões de metilação do DNA foram gerados pela técnica de MSAP-PCR utilizando “primers” aleatórios MGF-2 e MGE-2 e eletroforese em gel de poliacrilamida corado pela prata. Utilizamos a enzima *Msel* cujo sítio de reconhecimento está representado no DNA genômico humano com uma alta frequência. A geração desse perfil de bandas permitiu a diminuição da complexidade da análise, embora a exploração de mais regiões genômicas diferencialmente metiladas seja restringida pelo tratamento com essas enzimas: *HpaII* e *MspI* são isosquizômeros, ou seja, reconhecem a mesma sequência de DNA. Desta forma, os fragmentos gerados por *Msel* que apresentam sítio para estas enzimas, devem necessariamente ser digeridos com *MspI* (enzima não sensível à metilação). Esta

cliva o fragmento independentemente de estar ou não metilado. Se os fragmentos estiverem metilados, a enzima *HpaII* (sensível à metilação), não irá digerir o DNA, mas se o fragmento estiver desmetilado essa enzima reconhecerá o sítio e irá clivar o DNA, não gerando bandas após a amplificação do DNA por PCR. Desta forma, através da análise do padrão de bandas geradas determinamos o perfil de metilação de diversos fragmentos gênicos.

#### 5.4.3 Comparação de padrões de metilação do DNA de melanoma murino antes e após o tratamento com as nanoemulsões

O padrão de metilação gerado pelo “primer” MGE-2 demonstrou que a maioria das bandas observadas em *MseI* não apresentaram sítios para as enzimas *MspI* e *HpaII*, não podendo, assim, serem avaliadas (Figura 23 – setas laranjas).

Nossos resultados demonstram a presença de uma banda de aproximadamente 1100pb que não sofreu alteração no padrão de metilação após o tratamento com nanoemulsões contendo (NA) ou não (NB) o composto **2** (Figura 23 – setas vermelhas), permanecendo sempre metilada. Por outro lado, fragmentos gênicos de aproximadamente 240 e 420pb estavam metilados no DNA de células controle (Figura 23 canaleta 3, setas pretas e amarelas). Esses fragmentos sofreram desmetilação após o tratamento com NB (Figura 23, canaleta 8 – setas pretas e amarelas) e voltaram ou permaneceram com o padrão metilado do controle após o tratamento com NA (Figura 24, canaleta 6 – setas pretas e amarelas). A banda do gel correspondente a 750pb não sofreu alteração de metilação após o tratamento com NB, permanecendo desmetilada. Entretanto, após o tratamento com NA essa banda apresentou-se metilada (Figura 23, canaleta 6, setas azuis).

Esses resultados demonstraram que o tratamento com a nanoemulsão sozinha, sem o composto **2** (NB) algumas vezes alterou (bandas 240 e 420pb) e outras vezes não alterou (bandas 750 e 1100pb) o padrão de metilação do DNA, quando comparado ao padrão das células controle. Entretanto, quando as células foram tratadas com a nanoemulsão contendo o composto **2** (NA) alguns padrões alterados pela NB foram revertidos ou não foram alterados em relação ao padrão do



controle (fragmentos de 240 e 420pb). Por outro lado, alguns fragmentos gênicos foram alterados somente quando tratados com a NA (750 pb).

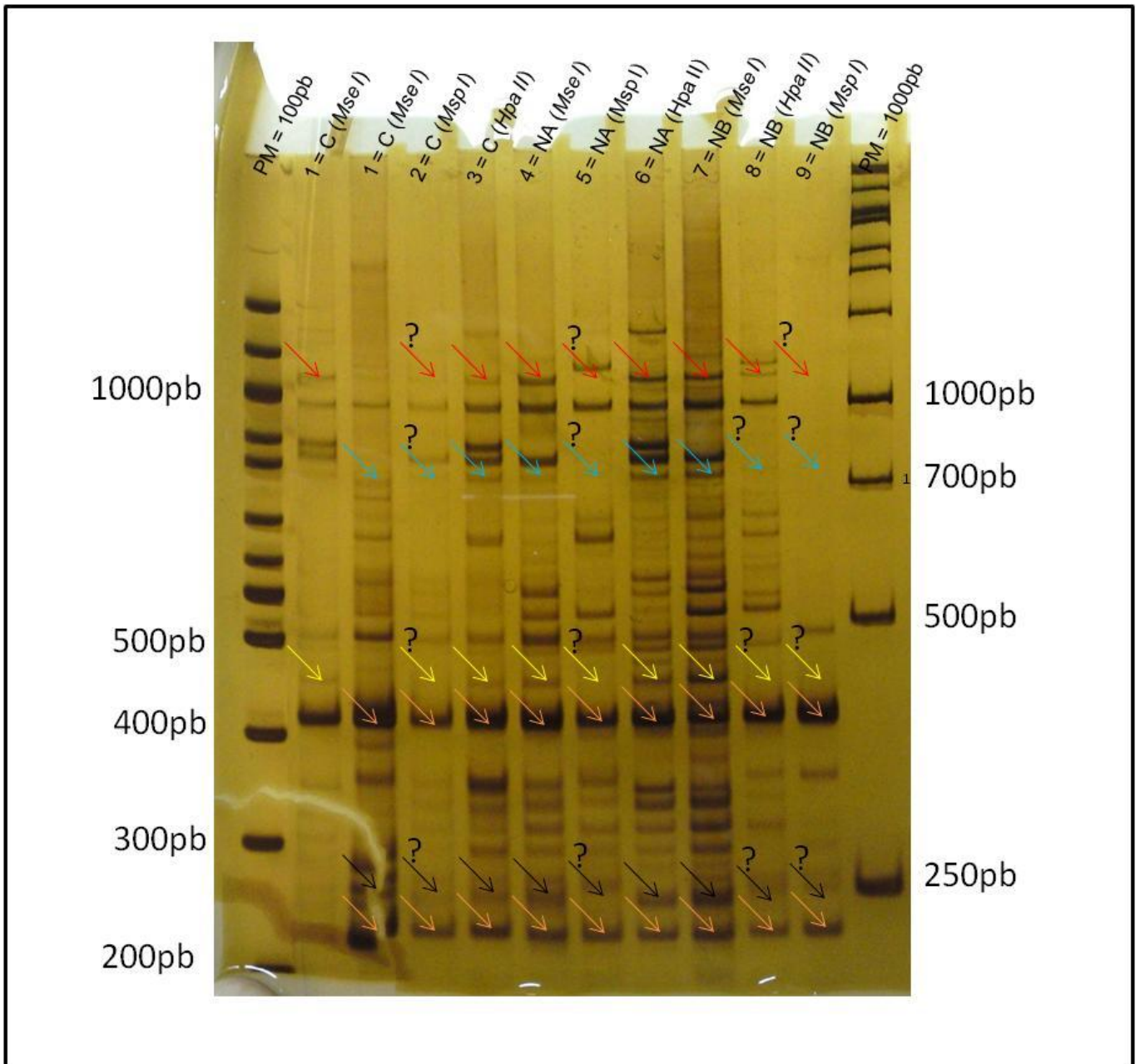


Figura 23 – Gel de poliacrilamida 6% corado com prata para análise do perfil de metilação do DNA genômico. As bandas no gel mostram o perfil de metilação do composto **2** veiculado em nanoemulsão. Nos poços de 1 – 4 temos a aplicação das amostras controle contendo somente as células B16F10 com as seguintes enzimas de restrição: *MseI*, *MspI* e *HpaII* respectivamente; nos poços. Nos poços 4 e 7 temos o perfil de bandas que foram geradas pela enzima de restrição *MseI*, sendo que no poço 4 foi aplicado a amostra com a nanoemulsão com o composto **2** (NA) e no poço 7 foi aplicado a amostra com a nanoemulsão sem o composto **2** (NB).

Estudos recentes têm demonstrado que a curcumina pode se ligar à enzima DNA metiltransferase inibindo sua ação e também pode inibir enzimas histonas deacetilases, sugerindo um efeito epigenético desse composto. Foi mostrada ação epigenética da curcumina na regulação da expressão de histonas deacetilases HDAC1, HDAC3 e HDCA8 em células da linhagem de linfoma Raji (linfoma de células Burkkit) (LIU et al., 2005). Em outro estudo com células da linhagem leucêmica foi demonstrado que o tratamento com 30 $\mu$ M de curcumina diminuiu os níveis de metilação global do DNA, demonstrando que a curcumina é um potente agente hipometilante podendo ser utilizado para reverter o padrão de metilação alterado no câncer (LIU et al., 2005).

Embora nossos resultados não tenham mostrado um efeito desmetilante do composto **2**, foi mostrado que derivados da curcumina possuem ação epigenética pela alteração de padrões de metilação no DNA de células de melanoma murino podendo reverter padrões alterados e, apontam para estudos de caracterização das regiões diferencialmente metiladas pelo tratamento.

## 6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o desenvolvimento de uma nanoformulação lipídica contendo o composto **2**, é um método que possibilita gerar um veículo com ação citotóxica em linhagens tumorais além de contornar problemas relacionados às propriedades físico-químicas do composto **1**.

Este trabalho também mostrou que o tratamento de células de melanoma murino com o composto **2** veiculado em nanoemulsão alterou o padrão de metilação do DNA. A análise do padrão global de metilação do genoma identificou regiões específicas do DNA genômico associadas com mudanças na metilação do DNA durante o tratamento *in vitro* com nanoemulsão lipídica em melanoma murino.

Entretanto, estudos futuros para identificar os fragmentos gênicos com padrão de metilação alterados e a utilização dessa formulação contendo o composto **2** em modelo animal, deverão ser feitos para que se possa determinar seu mecanismo de ação e sua atividade antitumoral *in vivo*, para futuras aplicações clínicas de derivados da curcumina em benefício da terapia do câncer.

## REFERÊNCIAS

AGGARWAL, S. et al. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates expression of cell proliferation and antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of I $\kappa$ B $\alpha$  kinase and Akt activation. **Molecular Pharmacology**, USA, v. 69, p. 195–206, 2006.

AGRAWAL, D. K.; MISHRA, P. K. Curcumin and its analogues: potential anticancer agents. **Medical Research Review**, v. 30, n. 5, p. 818-860, 2001.

ALI, B. H. et al., Some Biological Properties of Curcumin: A Review. **Natural Product Communications**, v. 1, n. 6, p. 509-521, 2006.

ANAND, P. et al. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature, **Biochem Pharmacol**.USA, v. 76, n. 11, p.1590-611, dez 2008.

ARAÚJO, C. A. C.; LEON, L. L. Biological Activities of *Curcuma longa* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 5, p. 723-728, 2001.

AZEEM et al. Nanoemulsion Components Screening and Selection: a Technical Note. **AAPS Pharmaceuticals Science Technology**, v. 10, n. 1, p. 69-76, 2009.

BARROS, S. P.; OFFENBACHER, S. Epigenetics: Connecting Environment and Genotype to Phenotype and Disease. **Journal Dentist Research**, v. 88, n. 5, p. 400-408, 2009.

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes and Development**. United Kingdon, v.16, p. 16-21, july 2002.

CHEN, Y. et al. Curcumin, both histone deacetylase and p300/CBP-specific inhibitor, represses the activity of nuclear factor kappa B and Notch 1 in Raji cells, **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, China, .101, n. 6, p. 427-33, out. 2007.

CHENG, A. L. et al. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. **Anticancer Research**, v. 21, n. 4B, p. 2895-2900, 2001

EIGNER, D; SCHOLZ, D. *Ferula asa-foetida* and *Curcuma longa* in traditional medical treatment and diet in Nepal. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 67, n.1, p. 1-6, 1999.

ESTELLER, M. Cancer Epigenetics for the 21st Century: What's Next?. **Genes & Cancer**. v.2, n. 6, p. 604-606, 2011

ESTELLER, M. Epigenetic changes in cancer. **F1000 Biology Reports**. v. 3, n. 9, p. 1-6, 2011.

FAZZARI, M.J.; GREALLY, J.M. Introduction to epigenomics and epigenome-wide analysis, **Methods in Molecular Biology**. v. 620, p. 243-265, 2010.

FU S.; KURZROCK R. **Development of Curcumin as an epigenetic agent. Cancer**, v. 116, n. 20, p. 4670-4676, out. 2010.

GARDINER-GARDEN, M.; FROMMER, M. CpG islands in vertebrate genomes. **Journal Molecular Biology**, v.196, p. 261-282, 1987.

GAURISANKAR, S.; DAS, T. Anti cancer effects of curcumin: cycle of life and death, **Cell Division**. v3, n. 14, p. 1 – 14, 2008.

GAUTAM, S. C.; GAO X.; DULCHAVSKY S. Immunomodulation by curcumin, **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 595, p. 321 – 341, 2007.

GUIL, S; ESTELLER, M. DNA methylomes, histone codes and miRNAs: Tying it all together. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 41, p. 87-95, 2009.

HAN, S. S. et al. Curcumin causes the growth arrest and apoptosis of B cell lymphoma by downregulation of *egr-1*, *c-myc*, *bcl-XL*, *NF- $\kappa$ B*, and *p53*. **Clinical Immunology**, v. 93, p. 152–61, 1999.

HONG-LI, L. et al., Curcumin, a potent anti-tumor reagent, is a novel histone deacetylase inhibitor regulating B-NHL cell line Raji proliferation. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 26, n. 5, p. 603–609, may 2005.

JAGETIA, G. C.; AGGARWAL, S. “Spicing up” of the immune system by curcumin, **Journal of Clinical Immunology**, v. 27, p.19 – 35, 2007.

JONES, P. A.; Takai, D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. **Science**, Estados Unidos, v.293, n. 5532, p. 1068-1070, aug. 2001.

KARASULU et al. Controlled Release of Methotrexate from W/O Microemulsion and Its In Vitro Antitumor Activity. **Drug Delivery**, v. 14, n. 4, p. 225-233, 2007.

LARSEN et al. CpG islands as gene markers in the human genome. **Genomics**, v. 13, n. 4, p. 1095-107, ago.1992.

LIANG, G. et al. Exploration and synthesis of curcumin analogues with improved structural stability both in vitro and in vivo as cytotoxic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, China, v. 17, p. 2623–2631, 2009.

LIMTRAKUL, P. et al. Inhibition of carcinogen induced c-Ha-ras and c-fos proto-oncogenes expression by dietary curcumin. **BMC Cancer**. v. 1, n. 1, p. 1–7. 2001.

LIN, C-L; LIN, J-K, Curcumin: a Potential Cancer Chemopreventive Agent through Suppressing NF- $\kappa$ B Signaling. **Journal of Cancer Molecules**. v. 4, n. 1, 11-16, dez. 2008.

LIU, H-li Curcumin, a potent anti-tumor reagent, is a novel histone deacetylase inhibitor regulating B-NHL cell line Raji proliferation, **Acta Pharmacologica Sinica**. China, v. 26, n. 5, p. 603- 609, maio 2005.

LIU, ZHONGFA., XIE, Z., JONES, W., PAVLOVICZ, R. E., LIU, S., YU, J., LI, P., LIN, J., FUCHS, J. R., MARCUCCI, G., LI, C., CHAN, K. K. Curcumin is a potent DNA hypomethylation agent. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.19, p.706-709, 2009

LOVELYN C.; ATTAMA A. A.,Current State of Nanoemulsions in Drug Delivery,**Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 2, p. 626-639, 2011.

LUJAMBIO, A. et al., Genetic Unmasking of an Epigenetically Silenced microRNA in Human Cancer Cells, **Cancer Research**, v67, n. 4, p. 1424-1429, fev. 2007.

MASUDA, T. et al., Anti-oxidative and Anti-inflammatory Curcumin-Related Phenolics from Rhizomes of Curcuma Domestica. **Phytochemistry**, v. 32, n. 6, p.1557-1560, 1993.

MAHESHWARI R. K. et al.,Multiple biological activities of curcumin: a short review. **Life Science**, USA, v. 78, n. 18, p. 2081-2087, mar 2006.

MEI, Z. et al. Solid lipid nanoparticle and microemulsion for topical delivery of triptolide. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, n. 2, p. 189-196, 2003.

MIHO M.; SUZUKI; BIRD, A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. **Nature Reviews Genetics**, v.9, p. 465-476. 2008.

MODAGHEGHA M-H. et al., Safety Evaluation of Saffron (*Crocus sativus*) Tablets in Healthy Volunteers. **Phytomedicine**, v. 15, n. 12, p. 1032-1037, 2008.

MUKHERJEE, S.; RAY, S.; THAKUR, R. S. Solid Lipid Nanoparticles: A Modern Formulation Approach in Drug Delivery System. **Indian Journal Pharmacology Science**, v. 71, n. 4, p. 349-358, aug. 2009.

NEGRINI, M. et al., Micro-RNAs in human cancer: from research to therapy. **Journal Cell Science**, v. 120, n.11, p. 1833-1840, april 2007.

O'SULLIVAN-COYNE, G. et al., Curcumin induces apoptosis-independent death in oesophageal cancer cells. **British Journal of Cancer**, v. 101, n. 9, p. 1585-1595, 2009.

PADHYE, S. et al., Perspectives on Chemopreventive and Therapeutic Potential of Curcumin Analogs in Medicinal Chemistry, **Mini Review Medical Chemistry**, v. 10, n. 5, 372 – 387, 2010.

PIÑEYRO-LÓPEZ, A. et al. Evaluation of the bioequivalence of single 100-mg doses of two oral formulations of cyclosporin a microemulsion: A randomized, open-label, two-period crossover study in healthy adult male mexican volunteers. **Clinical Therapeutics**, v. 29, n. 9, p. 2049-2054, 2007.

PRABHAKAR, Ch.; KRISHNA, K. B. A Review on Polymeric Nanoparticles. **Research Journal of Pharmacy and Technology**. Índia, v. 4, n. 4, p. 496-498, 2011.

RAINER, H.; MÜLLER, C.; KECK, M. Pharmaceutical nanoparticles - From their innovative origin to their future. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 310, p. 1-2, 2010.

RAZIN, A.; CEDAR, H. DNA methylation and gene expression. **Microbiology Reviews**. v. 55, n. 3, p. 451-458, 1991.

REUTER, S. et al. Epigenetic changes induced by curcumin and other natural compounds. **Genes Nutr**. v. 6, n. 93, p. 93-108, 2011.

RODENHISER, D; MANN, M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. **CMAJ**. v. 174, n. 3, p.341-348, 2006.

SANDUR, S. K. et al. Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 8, p. 1765–1773,2007.

SANTOS, M.A. **Desenvolvimento de formulação antitumoral contendo 1,5-diarilpenta-1,4-dien-3-ona**. 36 f. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC). Universidade Bandeirante de São Paulo. São Paulo. 2010.

SHAFIQ, S. et al. Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation. **European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceutics**, v. 66, n. 2, 227-243, 2007.

SHAMA R. A.; GESCHER A. J.; STEWARD, W. P. Curcumin: the story so far. **European Journal Cancer**, v. 41, n.13, p. 1955-1968, 2005.

SHARMA R.A.; STEWARD W.P.; GESCHER A.J., Pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin. Reino Unido, **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 70, p. 453-470, 2007.

SIGALOTTI, L. et al. Epigenetics of human cutaneous melanoma: setting the stage for new therapeutic strategies. **Journal of Translational Medicine**. v. 8, n. 56, p. 1-22, 2010.

SUÁREZ et al., **Propriedades antitumorais do 1,5-Bis(4-Hidroxi-3-metoxifenil)penta-1,4-dien-3-one e seus derivados e seu procedimento de obtenção**. PI0207141-0, 2002.

SUÁREZ, Q. Estratégia de Síntese de Fenóis e Derivados Polifuncionais com Propriedades Antitumorais e Baixa Toxicidade, Revista Pesquisa e Inovação Farmacêutica, v. 1, n. 1, p. 3-14; 2009.

SYNG-AIC., KUMARi A. L., KHAR A. Effect of curcumin on normal and tumor cells: role of glutathione and bcl-2. **Molecular Cancer Therapeutics**. v.3, n. 9, p. 1101-1108, 2004.



SZYF, M. Epigenetics, DNA Methylation, and Chromatin Modifying Drugs,. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Canada, v. 49, p. 243-263, 2009.

TAMVAKOPOULOS, C. et al **Metabolism and Anticancer Activity of the Curcumin Analogue, Dimethoxycurcumin**, *Clinical Cancer Research*, v. 13, n.4, fev. p. 1269-1277, 2007.

TEITEN, M-H. et al. Chemopreventive potential of curcumin in prostate cancer, **Genes Nutr**, v.5, p. 61–74, 2010.

ÜNER M.; YENER, G. Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives. **International Journal of Nanomedicine**. v. 2, n. 3, p. 289-300. 2007.

VILA et al. Transport of PLA-PEG particles across the nasal mucosa: effect of particle size and PEG coating density. **Journal Control Release**, v. 98, n. 2, p. 231-244, 2004.

WATERS J. W., MCLEOD H. L. Cancer pharmacogenomics: current and future applications. **Biochemistry Biophys Acta**, v. 17, n. 2, p. 99-111, 2003.

WINTER, J. et al., Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 3, p.228-234, mar 2009.

YANG, C et al., Analysis of DNA Methylation in Various Swine Tissues. **PLoS ONE**. v. 6, n 1, p. XX, 2011.

ZHENYU, J.; Targeting DNA Damage and Repair by Curcumin. *Breast Cancer. Basic and Clinical Research*, v. 4, p. 1-3, 2010.