

UNIVERSIDADE BANDEIRANTE DE SÃO PAULO
DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO PROFISSIONAL EM FARMÁCIA
MARIA APARECIDA DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA UM
DERIVADO DA CURCUMINA E ANÁLISE DA SUA FORMULAÇÃO
PARA USO ENDOVENOSO

SÃO PAULO
2013

UNIVERSIDADE BANDEIRANTE DE SÃO PAULO
DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO PROFISSIONAL EM FARMÁCIA
MARIA APARECIDA DOS SANTOS

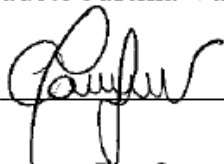
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA UM
DERIVADO DA CURCUMINA E ANÁLISE DA SUA FORMULAÇÃO
PARA USO ENDOVENOSO

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. Claudete Justina
Valduga.

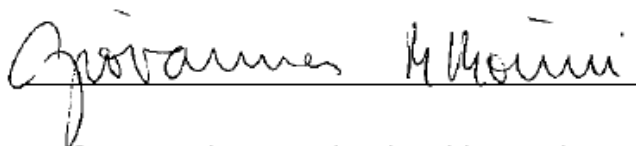
SÃO PAULO
2013

BANCA EXAMINADORA

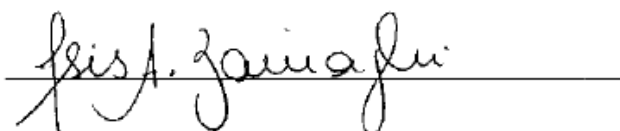
Profa. Dra. Claudete Justina Valduga (Presidente)



Profa. Dra. Giovanna Bonfante Borini- UNINOVE (1º Suplente Externa)



Profa. Dra. Isis Amaral Zainaghi Arvati - UNIBAN (2º Membro Titular Interno)



Aos meus pais e meus irmãos pelo amor incondicional. À minha querida orientadora que não desistiu de mim quando eu havia desistido. Aos meus tios Donária, Maria e Nelson que sempre me apoiaram no decorrer dessa jornada, ao meu namorado e aos meus grandes e queridos amigos que sempre me incentivaram e encorajaram quando eu mais precisava.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela força e amparo nas horas de angústia e desânimo.

Agradeço aos meus pais Custódia e Arlindo por tudo, sua dedicação, compreensão, educação e amor, aos meus irmãos Lucilene, Gabriel e Guilherme pelo carinho e torcida.

Agradeço imensamente à minha orientadora Claudete Justina Valduga que com muita paciência me ensinou e ajudou nas horas mais difíceis, sempre me incentivando a crescer, me animou e encorajou para continuar a lutar.

Agradeço ao meu namorado André pelo amor e incentivo durante toda jornada.

Agradeço ao professor Hélio A. Stéfani da FCF-USP por ter cedido o HPLC para realização das análises cromatográficas.

Ao corpo docente do Programa de Mestrado Profissional em Farmácia pelo conhecimento transmitido e pelo incentivo de sempre.

Aos funcionários da UNIBAN, em especial aos funcionários Ivair D. Gonçalves, Oseraldo V. Rocha, Maria Cristina dos Santos e à secretaria de Pós-graduação.

Aos alunos de Iniciação Científica Kelly F. da Silva e Thales Guimarães pela ajuda na reta final.

Agradeço aos meus grandes amigos que são minha segunda família, pelos momentos divertidos no decorrer dessa jornada.

Agradeço a todos os meus tios, tias, primos, primas, avó e avô que sempre torceram por mim e confiaram na minha capacidade.

A todos, minha eterna gratidão...

“A saudade é a certeza do amor, pois só quem ama sente alegria em rever o que ficou, lembrar o que passou e foi bom, mas pode ser ainda melhor”.

RESUMO

SANTOS, M. A. **Desenvolvimento de método bioanalítico para um derivado da curcumina e análise da sua formulação para uso endovenoso.** 72p. Dissertação de mestrado – Mestrado Profissional em Farmácia, Universidade Bandeirante de São Paulo, 2013.

A 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona (**1**) é um composto fenólico com estrutura similar à da curcumina, substância de origem natural com uma grande variedade de efeitos biológicos. O composto **1** possui boa atividade antitumoral e baixa toxicidade animal, porém apresenta problemas de solubilidade. O sal monossódico (**2**) apresenta propriedades biológicas similares ao composto **1**, mas com leve redução na sua atividade antitumoral, provavelmente devido à rápida biotransformação. Por isso, dois grupos acila foram ligados às hidroxilas fenólicas do composto **1** (latenciação), para posteriormente ser formulado em nanoemulsão lipídica para administração endovenosa. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar uma metodologia bioanalítica para quantificação do composto **4** em plasma, e analisar as propriedades físico-químicas da formulação desenvolvida, quanto à estrutura e forma das partículas, pH, estabilidade e adequação para uso endovenoso. Para o desenvolvimento e validação do método bioanalítico, foi utilizada cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em coluna de fase reversa, com fase móvel de isopropanol:acetonitrila:(ácido fosfórico/água–20%) (85:5:10) a um fluxo de 0,8 mL/min e comprimento de onda de análise de 360 nm. A seletividade do método foi confirmada pela ausência de picos na região de quantificação do analito, em torno de 3,2 minutos. A extração do composto **4**, em amostras de plasma, foi realizada por precipitação das proteínas plasmáticas com tetraidrofurano:*n*-butanol (1:1) e apresentou eficiência de extração/recuperação em torno de 50%. A curva de calibração, para quantificar o ativo no plasma, foi realizada com sete amostras de plasma humano, em triplicata, contaminadas com o composto **4** nas concentrações 31,25, 62,5, 125, 250 e 500 µg/mL. O coeficiente de correlação, $r = 0,999$, mostra que há uma boa conformação dos dados experimentais a um modelo linear. A precisão, avaliada para as concentrações baixa (31,25 µg/mL), média (125 µg/mL) e alta (500 µg/mL), mostra que os valores de coeficiente de variação 14,2%, 10,9% e 10,7%, respectivamente, estão dentro da variação de 15 % para precisão, estabelecidos pela ANVISA. Embora a eficiência extração tenha

variado entre 45,6-57,7%, a exatidão variou entre 97,1 e 106,3% para as cinco concentrações entre 32,125 e 500 µg/mL. Estes valores de variação estão de acordo com aqueles preconizados pela ANVISA, para métodos bioanalíticos, que devem ser inferiores a 20%, para o limite superior de quantificação (LSQ) e limite inferior de quantificação (LIQ), e para outras concentrações não deve ultrapassar 15%.

A síntese do composto **4** e desenvolvimento da formulação são viáveis, visto que apresentam rendimento em torno de 100% para ambas as etapas. As características organolépticas da formulação (cor, odor, opacidade e precipitados) se mantiveram estáveis pelo período de análise de 6 meses. As partículas de emulsão, analisadas por microscopia eletrônica de transmissão, apresentaram forma arredondada, com características de nanoemulsão lipídica líquida. As propriedades físico-químicas da formulação são adequadas para administração endovenosa, quanto ao tamanho das partículas (80-100nm) polidispersidade (0,2), potencial zeta (-30mV) e pH (4,7-6,0). O potencial hemolítico da nanoemulsão contendo o composto **4** foi insipiente (<1%), demonstrando a segurança da formulação, que poderá ser utilizada posteriormente para dar continuidade aos estudos pré-clínicos de farmacocinética, biodistribuição e atividade antitumoral.

Palavras-chave: Curcuminóides. Nanoemulsão. Validação de método bioanalítico.

ABSTRACT

SANTOS, M. A. **Development of bioanalytical method for a curcumin derivative and analysis of its formulation for intravenous use.** 72p. Dissertação de mestrado – Mestrado Profissional em Farmácia, Universidade Bandeirante de São Paulo, 2013.

The 1,5-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-penta-1,4-dien-3-one (**1**) is a phenolic compound which structure is similar to curcumin, a natural substance with a wide variety of biological effects. Compound **1** has good antitumoral activity and low animal toxicity, but shows problems of solubility. The monosodium salt (**2**) shows biological properties similar to compound **1**, but its antitumor activity was slightly reduced, probably due to the rapid biotransformation. Therefore, two acyl groups were attached at the phenolic hydroxyls of compound **1** (latention), to be afterward formulated in lipid nanoemulsion for endovenous use. In this context, the aim of this work was to develop and to validate a bioanalytical method for quantification of compound **4** in plasma, and to analyze the physicochemical properties of its formulation, regarding the particle structure and shape, pH, stability and suitability for intravenous administration. For the development and validation of the bioanalytical method it was used high performance liquid chromatography (HPLC) in reverse phase column, with isopropanol:acetonitrile:(phosphoric acid/water at 20%) (85:5:10) at 0.8 mL/min of flow and 360 nm of wave length of analysis. The selectivity of the method was confirmed by the absence of interferences signals in the analyte quantification region, around of 3.2 minutes. The extraction of compound **4**, from plasma samples was performed by plasma proteins precipitation with tetrahydrofuran:*n*-butanol (1:1), at an extraction/recover efficiency of around 50%. A calibration curve for quantification of the active in the plasma was performed with seven plasma samples, in triplicate, spiked with compound **4** at concentration 31.25, 62.5, 125, 250 and 500 µg/mL. The correlation coefficient, $r = 0.999$, shows that experimental data fits to a linear model. The precision, evaluated for low (31.25 µg/mL), medium (125 µg/mL) and high (500 µg/mL) concentrations, shows that the coefficient of variation 14.2%, 10.9% and 10.7%, respectively, are within the range of 15% for precision stipulated by ANVISA. Even though the efficiency of extraction was between 45.6-57.7%, the accuracy values, ranged between 97.1 and 106.3% for the five concentrations between 32.125 and 500 µg/mL respectively. These values are in

agreement with that stipulated by ANVISA for bioanalytical methods, which must be lower than 20% for upper limit of quantification (ULOQ) and lower limit of quantification (LLOQ), and for other concentrations it cannot be more than 15 %.

The synthesis of compound **4** and formulation development are feasible, since the yield of both steps was around 100%. The organoleptic properties of the formulation (color, odor, opacity and precipitated material) remained stable for the period of analysis of 6 months. The emulsion's particles analyzed by transmission electron microscopy showed rounded shape, with characteristics of liquid lipid nanoemulsion. The physicochemical properties of the formulation are suitable for intravenous administration, regarding the particle size (80-100 nm), polydispersity (0.2), zeta potential (-30mV) and pH (4.7-6.0). The hemolytic potential of the nanoemulsion loaded with compound **4** was negligible (<1%), proving the safety of the formulation, which can be used afterward for continuing the pre-clinical studies of pharmacokinetic, biodistribution and antitumor activity.

Keywords: Curcuminoids. Nanoemulsion. Bioanalytical method validation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural da 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona (1), do derivado monossódico (2) e da curcumina (3).	20
Figura 2 - Fórmula estrutural da 1,5-bis(4-oleil-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona (4).	22
Figura 3 - Estruturas dos compostos FLLL-11, GO-Y030 e FLLL-12.	23
Figura 4 - Estrutura da Curcumina (3) e seus produtos de biotransformação desmetoxicurcumina (5) e bisdesmetoxicurcumina (6).	23
Figura 5 - Reação de condensação de Knoevenagel para obtenção de derivados da curcumina com anel aromático ligado ao carbono central C4; condições reacionais: (a) benzaldeído, 4-hidroxibenzaldeído, 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído (vanilina), trifetilfosfina (catalisador), 75-80 °C/3 h.	25
Figura 6 - Estrutura geral dos derivados monocarbonilados estruturalmente relacionados à curcumina, utilizados para estudos de REA (sem a β-cetona), onde as letras indicam os diferentes grupos funcionais da molécula.	27
Fonte: Modificado de Liang et al., 2009.	27
Figura 7 - Cromatograma do composto 1 obtido por HPLC utilizando como fase móvel água:acetonitrila:ácido acético (65:33,75:1,25) a um fluxo de 1,0 mL/min e 210 nm.	45
Figura 8 - Esquema reacional para diacilação do composto 1 para obtenção de 4.	46
Figura 9 - Espectro de RMN de hidrogênio do composto 4.	47
Figura 10 - Espectro de RMN de carbono treze do composto 4.	47
Figura 11 - Estrutura do composto 2, onde são apontados os principais sítios para reações de biotransformação.	48
Figura 12 - Cromatograma do composto 4 diluído em isopropanol, obtido por HPLC utilizando como fase móvel isopropanol:acetonitrila:(ácido fosfórico:água–20%) (85:5:10) a um fluxo de 0,8 mL/min e 360 nm.	50
Figura 13 - Cromatograma de uma amostra de plasma humano contaminado com composto 4, extraído com tetraidrofurano:n-butanol, obtido por HPLC, utilizando como fase móvel isopropanol:acetonitrila:(ácido fosfórico:água–20%) (85:5:10) a um fluxo de 0,8 mL/min e 360 nm.	51

Figura 14 - Cromatograma de uma amostra de plasma humano extraído com tetraidrofurano: <i>n</i> -butanol, obtido por HPLC, utilizando como fase móvel isopropanol:acetonitrila;(ácido fosfórico:água–20%) (85:5:10) a um fluxo de 0,8 mL/min e 360 nm.....	52
Figura 15 - Curva de calibração para o composto 4 em plasma humano. Os dados das áreas foram obtidos por HPL nas concentrações de 31,25 a 500 µg/mL.	54
Figura 16 - Cromatograma da amostra de plasma humano contendo 31,25 µg/mL, extraído com isopropanol, obtido por HPLC, utilizando como fase móvel isopropanol:acetonitrila:(ácido fosfórico:água–20%) (85:5:10) a um fluxo de 0,8 mL/min e 360 nm.....	54
Figura 17 - (A) Formulações baseadas em emulsão lipídica com composto 4 (esquerda) e sem o composto 4 (direita) – emulsão controle; (B) Micrografia da emulsão controle e; (C) Micrografia da emulsão com o composto 4	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análogos estruturais monocarbonilados da curcumina: ciclopentanona (A), 1,5-diarilpentadieno-3-ona (B) e cicloexanona (C).....	24
Tabela 2 - Exemplos de fármacos comuns que são substratos das isoenzimas CYP P450 nas reações de fase I.	30
Tabela 3 - Exemplos de reações de conjugação de fase II.....	30
Tabela 4 - Área dos picos das amostras de plasma contaminadas com 31,25- 500 µg/mL do composto 4 , obtida por HPLC, para análise de precisão.....	55
Tabela 5 - Dados da área do pico do composto 4 em isopropanol e em plasma para calculo da exatidão.	56

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C _{max}	Concentração máxima
CMC	Carboximetilcelulose
CMD	Concentração Média Determinada
COX-2	Ciclooxigenase-2
CV	Coeficiente de Variação
CYP 450	Citocromo P450
DCC	Dicicloexilcarbodiimida
DL ₅₀	Dose Letal 50%
DMAP	Dimetilaminopiridina
DP	Desvio Padrão
GC/MS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa
GHS	<i>Globally Harmonized Classification System</i>
HIV-I	Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo I
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
¹ H NMR	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
IC ₅₀	Índice de citotoxicidade 50%.
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LC/MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas
LIQ	Limite Inferior de Quantificação
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
OECD/CEE	Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento da Comunidade Econômica Européia

PBS	Tampão Fosfato
PLGA	Ácido Poli(Lático-Coglicólico)
REA	Relação Estrutura Atividade
Rpm	Rotações por Minuto
THF	Tetraidrofurano
$t_{1/2}$	Meia-vida
T_{max}	Tempo máximo de absorção
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
UDPGA	Ácido Uridina–Difosfato–Glicurônico
Vd	Volume de distribuição

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
2.	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1.	SÍNTESE E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE CURCUMINÓIDES.....	20
2.2.	RELAÇÃO ESTRUTURA E ATIVIDADE DA CURCUMINA E ANÁLOGOS ...	26
2.3.	FARMACOCINÉTICA.....	28
2.3.1.	Aspectos gerais	28
2.3.2.	Reações de fase I.....	29
2.3.3.	Reações de fase II.....	30
2.3.4.	Farmacocinética dos curcuminóides.....	31
2.4.	EMPREGO DE FORMULAÇÕES NA MELHORIA DO DESEMPENHO DA CURCUMINA E ANÁLOGOS	32
2.5.	VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO	34
2.5.1	Limite inferior de quantificação	35
2.5.2.	Faixa linear de trabalho	35
2.5.3.	Exatidão.....	36
2.5.4.	Precisão.....	36
2.5.5.	Seletividade	37
2.5.6.	Recuperação	37
3.	OBJETIVOS	38
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	38
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4.	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1.	MATERIAL.....	39
4.1.2.	Reagentes e solventes	39
4.1.3.	Equipamentos.....	40
4.2.	METODOLOGIA.....	40
4.2.1	Síntese e caracterização do composto 1 e seu derivado diacilado 4	40
4.2.2	Condições para a análise cromatográfica.....	41
4.2.3	Soluções estoque	41
4.2.4	Preparação dos padrões e da curva de calibração	41
4.2.5	Validação de Método bioanalítico por HPLC	42

4.2.6	Preparação das formulações.....	42
4.2.7	Caracterização das formulações	43
4.2.8	Teste de hemólise	44
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1.	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO COMPOSTO 1 E SEU DERIVADO DIACILADO 4.....	45
5.2.	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO	49
5.3.1	Curva de calibração.....	52
5.3.2	Precisão.....	55
5.3.3	Exatidão.....	56
5.3.	DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO LIPÍDICA CONTENDO O COMPOSTO 4	57
5.4.	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL HEMOLÍTICO DA FORMULAÇÃO CONTENDO O COMPOSTO 4	59
6	CONCLUSÃO.....	61
	REFERÊNCIAS.....	62

1. INTRODUÇÃO

A curcumina, composto de origem natural proveniente da *Curcuma longa*, possui grande variedade de efeitos biológicos, tais como atividade antioxidante, antiinflamatória e antitumoral (ANAND et al., 2008). A 1,5-diarilpenta-1,4-dien-3-ona e derivados como a 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona (**1**) são compostos fenólicos com estrutura similar à da curcumina, que possuem boa atividade antitumoral e baixa toxicidade animal, conforme demonstrado em estudos *in vivo* (SUÁREZ et al., 2002).

O principal problema relacionado à curcumina e seus derivados, como o composto **1**, é a baixa solubilidade em água e também em excipientes lipofílicos. Na tentativa de tornar o composto **1** solúvel em água e facilitar a realização dos estudos *in vivo*, o mesmo foi convertido em seu respectivo sal monossódico (**2**). Esta modificação levou a uma pequena redução na sua atividade antitumoral em relação à forma neutra, pois a forma ionizada possui rápida biotransformação e, conseqüentemente, rápida eliminação.

Para resolver esses problemas de solubilidade e melhorar os parâmetros farmacocinéticos, que são bastante comuns quando se trata da descoberta de novas substâncias com atividade biológica, fez-se o uso de sistemas nanoparticulados, baseados em emulsões que, além de facilitar a administração destas substâncias, aumenta sua concentração nos tecidos tumorais, minimizando os efeitos tóxicos. Para isso, desenvolveu-se uma formulação de administração por via endovenosa, baseada em emulsão, para o derivado diacilado da 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona. A acilação do composto **1** pela introdução de dois grupos oleíla nas hidroxilas fenólicas, teve ação citotóxica reduzida em torno de 30 vezes em relação ao composto **1**, realizado para a linhagem tumoral de melanoma murino B16F10. Isto se deve provavelmente, à grande lipossolubilidade do composto, que no meio de cultura aquoso, tornou a substância indisponível para as células (VALDUGA, 2011).

Frente a resultados tão promissores, abre-se a possibilidade de estender as pesquisas pré-clínicas para conhecer melhor o comportamento do composto **4** em modelos animais, como camundongos, através de estudos de farmacocinética e biodistribuição. Por isso, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e validação

de método bioanalítico para análise do composto **4** em plasma e avaliação das características da sua formulação em emulsão lipídica para uso endovenoso.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. SÍNTESE E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE CURCUMINÓIDES

Muitos dos compostos utilizados no tratamento das mais variadas doenças humanas são de origem natural. Muitos destes compostos já são sintetizados em laboratório com a finalidade de aumentar a quantidade de produto disponível para realização de testes biológicos, ou então são modificados, para melhorar algumas das suas propriedades físico-químicas ou farmacológicas.

Os compostos estruturalmente relacionados com o composto **1** (Figura 1) são muito explorados como promissores agentes farmacológicos devido à sua similaridade com a curcumina (**3**), um marcador químico encontrado na *Curcuma longa*, planta proveniente da Índia que é utilizada como pigmento e condimento alimentar (“curry”). A curcumina é extensivamente estudada devido às suas propriedades antitumoral, antioxidante, antiartrite, antiamilóide e antiinflamatória (ANAND et al., 2008).

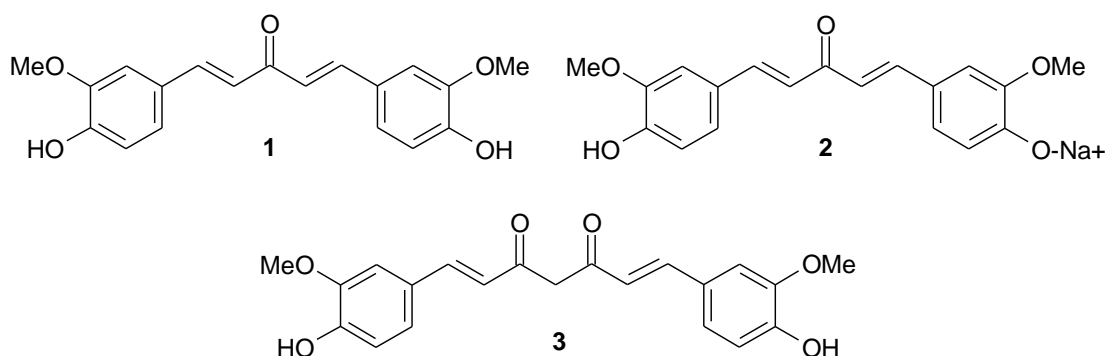


Figura 1 - Fórmula estrutural da 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona (**1**), do derivado monossódico (**2**) e da curcumina (**3**).

O composto **1** foi sintetizado pela primeira vez em 1927 (GLASER e TRAMER, 1927) e, desde então, vem sendo explorado biologicamente como um análogo da curcumina. Somente em 1993, o composto **1** foi isolado e caracterizado a partir de rizomas da mesma planta (MASUDA et al., 1993). Nesse trabalho os autores relataram a atividade antioxidante e antiinflamatória das pentadienonas.

Ensaio pré-clínicos *in vitro* e *in vivo* confirmam a enorme potencialidade do composto **1** (**B14**) em inibir o desenvolvimento de células tumorais do tipo melanoma B16F10, bem como o desenvolvimento de metástases (SUÁREZ et al., 2002).

Ensaio de toxicidade aguda do composto **1** em Miglyol®, como determinação da dose letal 50% (DL₅₀), e toxicidade subcrônica, também foram realizados, evidenciando praticamente a ausência de toxicidade. Já, o seu derivado monossódico (**2**), sintetizado para tornar o composto solúvel em água, apresentou DL₅₀ de 14 mg/Kg, por via endovenosa. Não foram observadas alterações hematológicas, como imunossupressão ou reações auto-imunes, degenerativas, ou hipersensibilidade. Em ensaios para avaliar a regressão tumoral em camundongos inoculados com células melanoma B16F10 e tratados diariamente com 0,71 mg/kg do composto **1**, observou-se regressão da massa tumoral de 84% em comparação com o grupo não-tratado (SUÁREZ et al., 2002, 2006 e 2008, FAIÃO-FLORES, et al., 2008).

Em estudos de regressão tumoral em camundongos portadores de melanoma murino B16F10 tratados com o composto **2**, dacarbazina (fármaco indicado para o tratamento de melanoma) e com ambos os ativos, observou-se que **2** induziu apoptose e dacarbazina, necrose. O composto **2** não afetou significativamente as células normais e, além disso, promoveu diminuição da carga tumoral, tanto na monoterapia, quanto em associação com a dacarbazina (FAIÃO-FLORES, et al., 2013a). Também foi observada apoptose (morte programada de células) em ensaios de citotoxicidade do composto **2** contra células de melanoma SK-MEL-5 (FAIÃO-FLORES, et al., 2013b).

A acilação do composto **1** pela introdução de dois grupos oleíla nas hidroxilas fenólicas, produzindo o composto **4** (Figura 2) e incorporação em nanoemulsão lipídica para uso endovenoso, teve ação citotóxica reduzida à metade em relação ao composto **1**, para a linhagem tumoral de melanoma murino B16F10. Porém, em estudos preliminares, realizados em camundongos inoculados com a mesma linhagem celular, os resultados de regressão tumoral foram semelhantes aos encontrados para o composto **1** (25%), além de reduzir o número de metástases (VALDUGA et al., 2011). A toxicidade em camundongos Balb/C para a formulação foi muito baixa (DL₅₀ = 2500 mg/kg) e classificada na categoria 5, de acordo com o *Globally Harmonized Classification System* (GHS), protocolo da Organização para

Cooperação Econômica e Desenvolvimento da Comunidade Econômica Européia (OECD 2001; VALDUGA et al., 2011).

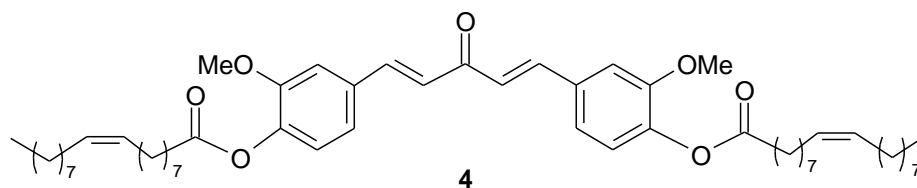


Figura 2 - Fórmula estrutural da 1,5-bis(4-oleil-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona (4).

Um resultado muito interessante encontrado para composto **4**, formulado em nanoemulsão lipídica, foi sua capacidade de alterar o padrão de metilação do DNA em fragmentos gênicos de 240, 420 e 750 pb, comprovando assim a sua ação epigenética (ROMEIRO, 2012). De acordo com a literatura, a curcumina pode se ligar a enzima DNA metiltransferase inibindo sua ação e também pode inibir enzimas histonas deacetilases, sugerindo um efeito epigenético. Em células da linhagem de linfoma Raji (linfoma de células Burkkit) a curcumina agiu na regulação da expressão de histonas deacetilases HDAC1, HDAC3 e HDCA8 (LIU et al., 2005). Células leucêmicas tratadas com 30 μ M de curcumina apresentaram redução dos níveis de metilação global do DNA, demonstrando que a curcumina é um potente agente hipometilante, podendo ser utilizada para reverter o padrão de metilação alterado no câncer (LIU et al., 2009).

Pequenas modificações estruturais na curcumina podem melhorar sua atividade antitumoral, mas acredita-se que o fragmento dicetona não seja indispensável para essa atividade. A substituição do fragmento dicetona por um anel isoxazol, ou pirazol aumenta o efeito inibitório da curcumina sobre a COX-2 (Ciclo Oxigenase-2). Esta enzima está fortemente envolvida em muitos aspectos da progressão tumoral e da resistência aos fármacos. Em outros estudos, o pirazol inibiu com elevada seletividade e potência a proliferação de células endoteliais de aorta bovina, sendo um potencial agente anti-angiogênico (SIMONI et al., 2008).

Análogos da curcumina, como GO-Y030, FLLL-11 (composto **1**) e FLLL-12 (Figura 3), demonstraram maior potencial que a curcumina em inibir o crescimento de linhagens de células de câncer colorretal por apoptose (CEN et al., 2009). O estudo comprovou que os compostos FLLL-11 e FLLL-12 apresentaram citotoxicidade de até 200 vezes maior que a curcumina em linhagens de células de

câncer coloretal (CEN et al., 2009).

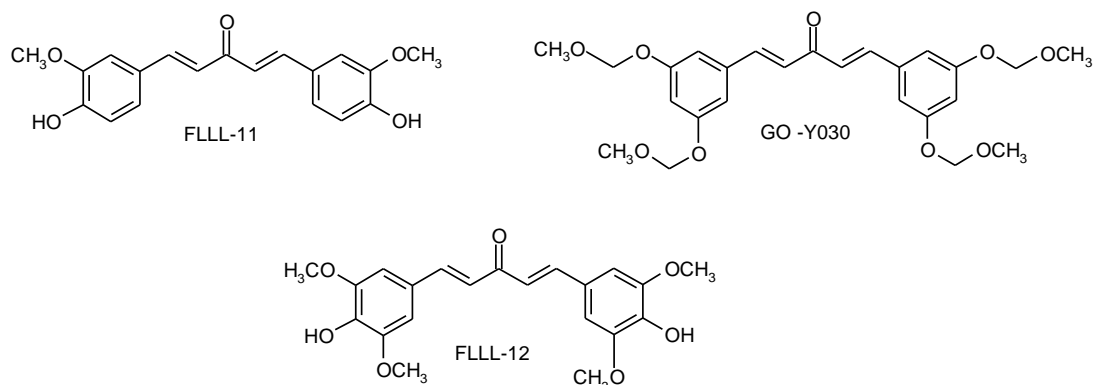


Figura 3 - Estruturas dos compostos FLLL-11,GO-Y030 e FLLL-12.

Além dos derivados sintéticos da curcumina, alguns metabólitos também apresentam atividade biológica superior, como é o caso da desmetoxicurcumina (**5**) (Figura 4), que se mostrou mais ativa como antitumoral, antioxidante e antimutagênico, e a bisdesmetoxicurcumina (**6**), que apresentou um desempenho superior ao da curcumina como inibidora da proliferação de células de câncer de mama e na indução da atividade antiparasitária (ANAND et al., 2008).

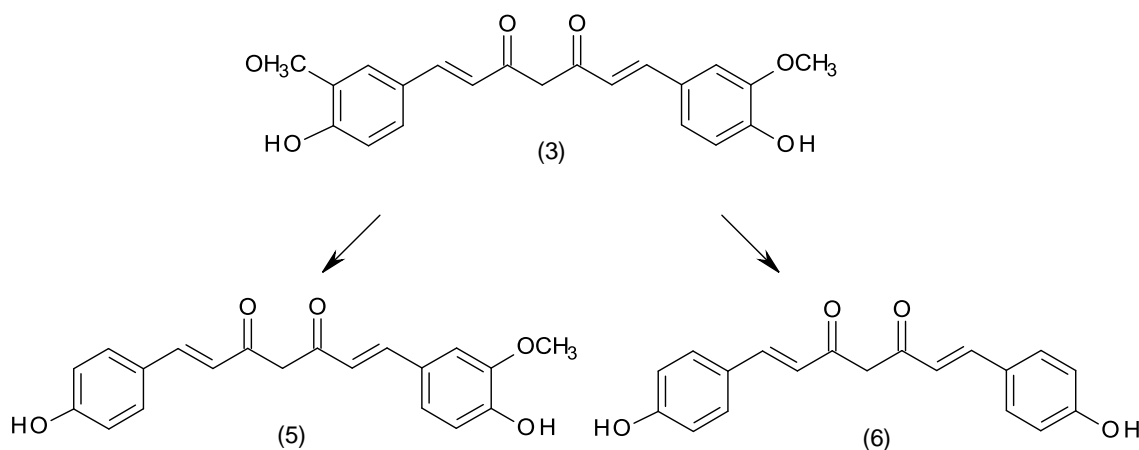
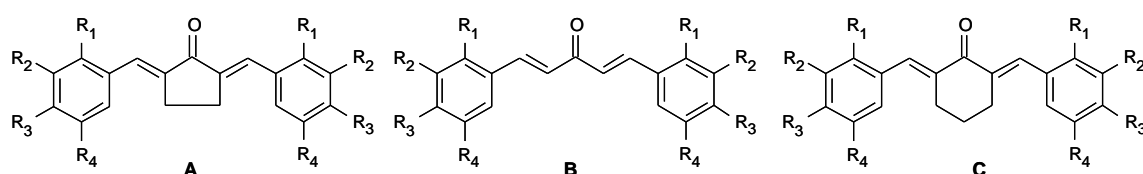


Figura 4 - Estrutura da Curcumina (**3**) e seus produtos de biotransformação desmetoxicurcumina (**5**) e bisdesmetoxicurcumina (**6**).

Derivados da curcumina, com apenas uma carbonila na estrutura, como a ciclopentanona (**A**), 1,5-diarilpentadieno-3-ona (**B**) e ciclohexanona (**C**) (Tabela 1), apresentaram atividade bactericida superior contra bactérias do gênero *Enterobacter cloacae*, e frente a bactérias gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*,

Micrococcus, *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus epidermidis* (LIANG et al., 2008). Os análogos **B** foram mais efetivos na inibição do crescimento das bactérias testadas do que **A** e **C**, principalmente os compostos **B13** e **B14** (composto **1**), que possui os grupos CH₃O e OH comprovando que a posição do substituinte tem grande importância na atividade antibacteriana.

Tabela 1 - Análogos estruturais monocarbonilados da curcumina: ciclopentanona (**A**), 1,5-diarilpentadieno-3-ona (**B**) e ciclohexanona (**C**) (LIANG et. al., 2008).



Substituintes	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1	H	H	OCH ₂ CH ₃	H
2	H	H	F	H
3	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
4	H	H	N(CH ₃) ₂	H
6	Br	H	H	H
7	H	CF ₃	*	H
8	F	CF ₃	H	H
10	H	Br	H	H
11	H	OCH ₃	*	H
12	H	H	*	H
13	H	H	OH	H
14	H	OCH ₃	OH	H
16	H	H	OCH ₂ CH=CH ₂	*
17	H	OCH ₃	OCH ₂ CH=CH ₂	H

Os ensaios antiparasitários *in vitro* e *in vivo* realizados no departamento de parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo mostraram que os compostos **13** e **14** (Tabela 1) são potenciais leishmanicidas exibindo interessante atividade, particularmente, contra amastigotas de *Leishmania amazonensis* (SUÁREZ et al., 2002).

Estudos recentes, com diferentes grupos ligados à molécula de curcumina, obtidos através de reações de condensação de Knoevenagel (Figura 5), indicaram o potencial da curcumina em atuar como agente antimalárico. Foi evidenciada inibição do crescimento de células *in vitro* do *Plasmodium falciparum*, que é o protozoário

transmissor da malária. Todos os compostos sintetizados apresentaram atividade superior à da curcumina. O composto **14** que possui $R_1=H$, $R_2=OCH_3$ e $R_3=OH$ exibiu grande capacidade de inibição do crescimento do parasita, sendo o mais potente de todos. O resultado indica que a presença do grupo hidroxila (OH) no anel ligado ao carbono central C4 seja o responsável pelo aumento da atividade antimalárica (MISHRA et al., 2008).

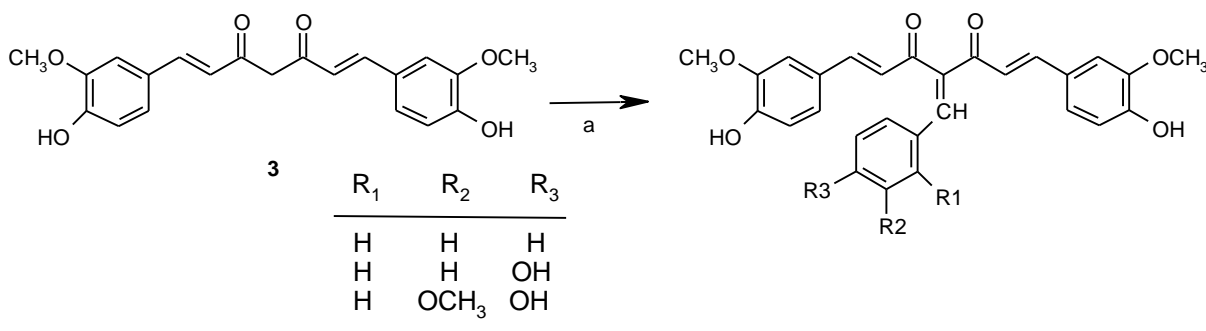


Figura 5 - Reação de condensação de Knoevenagel para obtenção de derivados da curcumina com anel aromático ligado ao carbono central C4; condições reacionais: (a) benzaldeído, 4-hidroxibenzaldeído, 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído (vanilina), trifetilfosfina (catalisador), 75-80 °C/3 h.

Existem estudos demonstrando que a inflamação está relacionada com a patogênese de várias doenças incluindo câncer, arteriosclerose, diabetes, artrite reumatóide e doenças inflamatórias intestinais (KRISHINAMOORTHY et al., 2006 e JANKUN et al., 2006).

O poder de ação antiinflamatória, antioxidante e principalmente de inibição da α -glicosidase, que é uma enzima chave na digestão de carboidratos, foi evidenciado e comprovado, pela redução dos níveis de açúcar no sangue em estudos com curcuminóides, como desmetóxicurcumina (**5**) e bisdesmetóxicurcumina (**6**) (Figura 4). A α -glicosidase foi relacionada como um contribuinte para a glicosilação do vírus da imunodeficiência humana tipo I (HIV-I) (WALKER et al., 1987). O composto **5** demonstrou maior atividade em relação à inibição da enzima do que **3** e **6**, sendo que a inibição foi expressa em valores de IC_{50} (concentração necessária para a atingir 50 % de inibição). Derivados contendo grupos tetraidroxila exibiram atividade inibitória com valores de IC_{50} ainda menores que **5**. O estudo revelou um grande potencial inibitório dos curcuminóides e análogos da curcumina em relação à inibição da α -glicosidase, podendo ter grande importância na pesquisa e desenvolvimento de fármacos antidiabéticos (DU et al., 2006).

A curcumina tem apresentado efeitos benéficos na indução de citocinas, como fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6), que são mediadoras de processos inflamatórios. Porém, como barreira limitante tem-se o pobre perfil farmacocinético e credita-se a isso à presença do grupo β -dicetona da molécula de curcumina, que faz com que ocorra uma rápida biotransformação e baixa absorção da substância. Baseado nisso, LIANG e colaboradores (2008) sintetizaram novos compostos com estruturas mais estáveis para que fossem avaliadas suas atividades antiinflamatórias *in vitro* (Tabela 1). A maioria dos compostos demonstrou aumento da indução do TNF- α e IL-6 em macrófagos. Os análogos sintetizados foram ciclopentanona (**A**), 1,5-diaryl-1,4-pentadieno-3-ona (**B**) e cicloexanona (**C**).

Em experimentos *in vivo*, realizados através da indução da inflamação (edema) em orelhas de ratos (WANG et al., 2008), comprovaram o aumento da atividade antiinflamatória da curcumina com a administração oral, na forma de nanoemulsões, contendo triacilgliceróis e Tween[®] 20.

Outros estudos comprovaram a ação antiinflamatória da curcumina administrada por via oral emulsionada em carboximetilcelulose (CMC). A formulação apresentou um potente efeito antiinflamatório no gene deficiente da interleucina-10 (IL-10), que está bem caracterizada na doença inflamatória intestinal (UNG et al., 2009).

2.2. RELAÇÃO ESTRUTURA E ATIVIDADE DA CURCUMINA E ANÁLOGOS

Durante a última década, estudos com modificações estruturais da curcumina indicaram um aumento na bioatividade, por isso, estes compostos têm sido intensamente estudados. Entretanto, alguns desses estudos estão focados na melhora do perfil farmacocinético. Estudos anteriores sugerem que o perfil metabólico e a estabilidade da curcumina (**3**) podem ser aumentados pela retirada da fração β -cetona (LIANG et al., 2008).

Não existem ainda estudos que comprovem o mecanismo de ação em sistemas biológicos do composto **1**, bem como para os curcuminóides em geral (ANAND et al., 2008). Mas, acredita-se que as duas hidroxilas sejam importantes para o efeito biológico. Apesar da vasta ação biológica apresentada pelo composto **1**

e derivados, o grande problema relacionado à aplicação clínica é a instabilidade dos compostos e problemas relacionados à absorção e biodisponibilidade. Sendo assim, existe um grande interesse na síntese e na exploração do potencial biológico de compostos análogos que possuam uma estrutura mais estável como o representado na Figura 6, onde se tem um composto monocarbonílico.

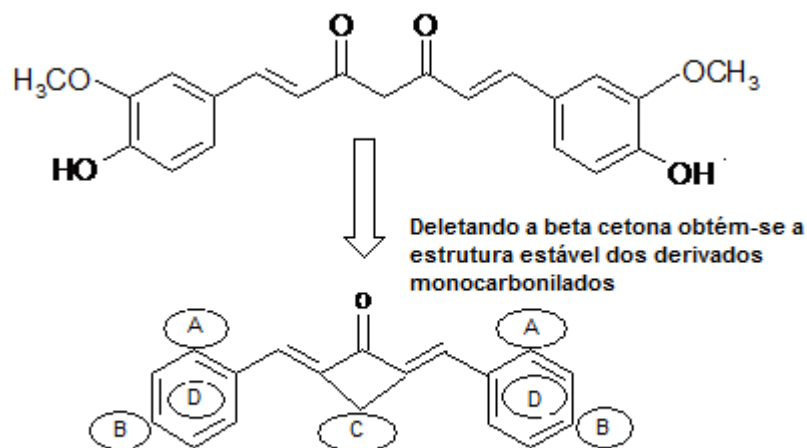


Figura 6 - Estrutura geral dos derivados monocarbonilados estruturalmente relacionados à curcumina, utilizados para estudos de REA (sem a β -cetona), onde as letras indicam os diferentes grupos funcionais da molécula.
Fonte: Modificado de Liang et al., 2009.

Para os derivados monocarbonilados com estrutura geral representada anteriormente, os estudos de Relação Estrutura Atividade (REA) mostraram que um substituinte fortemente retirador de elétrons na posição **A** pode aumentar a atividade biológica e, quanto mais retirador de elétrons é o grupo, mais citotóxico é o composto. Um doador fraco de elétrons na posição **B** é mais favorável para a atividade antitumoral, enquanto que um forte retirador de elétrons pode abolir sua atividade. A presença de uma cetona ou uma ciclohexanona na posição **C** torna o composto mais ativo em comparação com a ciclohexanona, na mesma posição, do que a própria curcumina. Análogos com uma cetona em **C** (composto **1**) apresentaram expressiva atividade antiproliferativa contra células de tumores de mama e próstata, com potência 4 vezes maior que a curcumina (FUCHS et al., 2009).

A exploração de estudos de REA com análogos da curcumina é cada vez mais frequente, com o propósito de encontrar substâncias com maior estabilidade, seletividade e biodisponibilidade.

2.3. FARMACOCINÉTICA

2.3.1. Aspectos gerais

A farmacocinética pode ser definida como a seqüência temporal das concentrações do fármaco alcançadas em diferentes regiões do organismo durante e após a administração de um fármaco, isto é, os eventos observados durante e após a interação do mesmo com seu receptor, ou outro local primário de ação (RANG et. al., 2003). Caracteriza-se, entre outros aspectos, pela construção de modelos que representam um sistema de compartimentos no organismo e nos quais se supõe que se distribui o fármaco depois de administrado. Um compartimento pode ser um grupo de tecidos com características fisiológicas e físico-químicas similares, tais como a corrente sanguínea, um órgão, células sanguíneas, etc. Depois de sua introdução na corrente sanguínea, por um processo de absorção, bem como, por injeção intravenosa, o fármaco se distribui nestes compartimentos, ou seja, se distribui para os tecidos.

O processo de distribuição é, em geral, rápido e se caracteriza por ser reversível. Sendo assim, o fármaco presente no sangue se encontra em estado de equilíbrio com o fármaco em outros fluidos, tecidos ou órgãos de distribuição. Como conseqüência deste equilíbrio, as alterações de concentração do fármaco no sangue indicam alterações de concentração em outros compartimentos. A transferência do fármaco do sangue para urina ou a outros compartimentos de excreção, assim como os processos de biotransformação dos fármacos, no plasma e tecidos, em produtos metabólicos, são processos irreversíveis. Esta irreversibilidade dá lugar ao processo denominado eliminação, que compreende todos aqueles mecanismos que determinam a eliminação do fármaco do organismo, seja por excreção urinária, biliar ou outras vias (CÁRCAMO, 1982).

A farmacocinética também pode ser definida como sendo o estudo da dinâmica de absorção, distribuição, biotransformação e eliminação de um fármaco (WILKINSON, 2001). Assim, o objetivo da farmacocinética é descrever as alterações na concentração de fármacos e de seus metabólitos nos vários fluidos do organismo e tecidos em função do tempo. Equações matemáticas e modelos são utilizados

para descrever os resultados experimentais e para obter parâmetros farmacocinéticos, tais como: constante de velocidade de transferência (k), constantes de absorção, biotransformação e eliminação de fármacos, volume de distribuição (V_d), o grau de ligação às proteínas plasmáticas, entre outros (WILKINSON, 2001).

A biotransformação de fármacos envolve dois tipos de reações importantes conhecidas como reações de fase I e fase II, que freqüentemente, mas não de forma invariável ocorrem em seqüência. As reações de fase I são catabólicas (oxidação, redução e hidrólise) e quase sempre os produtos são mais reativos. As reações de fase II são sintéticas (anabólicas), e envolvem a conjugação com a formação de compostos inativos (RANG et al., 2003). As reações de fase I e II ocorrem no fígado, embora algumas ocorram no plasma.

2.3.2. Reações de fase I

As enzimas do citocromo P450 formam uma grande família de enzimas correlatas, porém distintas. Até o momento sabe-se que existem 74 famílias de genes CYP, sendo que três principais delas (CYP1, CYP2 e CYP3) estão envolvidas na biotransformação de fármacos no fígado humano. A oxidação dos fármacos pelo sistema da monoxigenase P450 necessita da presença do fármaco que atua como substrato, da enzima P450 e, além disso, de oxigênio molecular, NADPH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato) e uma flavoproteína (NADPH-P450 redutase). A seguir estão relacionadas as enzimas envolvidas no metabolismo de alguns dos fármacos mais utilizados na terapêutica (Tabela 2) (RANG et al., 2003).

Tabela 2 - Exemplos de fármacos comuns que são substratos das isoenzimas CYP P450 nas reações de fase I.

Isoenzima P450	Fármacos
CYP1A1	Teofilina
CYP1A2	Cafeína, paracetamol, tacrina e teofilina
CYP2A6	Metoxiflurano
CYP2C8	Taxol
CYP2C9	Ibuprofeno, fenitoína, tolbutamida, warfarina
CYP2C19	Omeprazol
CYP2D6	Clozapina, codeína, debrisoquina, metoprolol
CYP2E1	Álcool, enflurano, halotano
CYP3A4/5	Ciclosporina, losartan, nifedipina, terfenadina

2.3.3. Reações de fase II

Se o fármaco possuir um grupo hidroxila, tiol (S-OH) ou amino (NH₂) na molécula original ou num produto decorrente do metabolismo de fase I é suscetível à conjugação, isto é, a fixação de um grupo substituinte e essa etapa é conhecida como fase II.

Os grupamentos mais frequentes envolvidos na formação de conjugados são: sulfato, metila, acetila, glicila e glutaciona. A formação de glicuronídeo envolve a formação de um composto de alta energia, o ácido uridina difosfato glicurônico (UDPGA). Ocorrem também reações de acetilação e de metilação com enzimas conforme mostrado na Tabela 3 (RANG et al., 2003).

Tabela 3 - Exemplos de reações de conjugação de fase II.

Tipo de reação	Substrato	Enzima envolvida	Produto
Glicuronidação	R-OH	$\xrightarrow{\text{UDPG}}$	R-O-Glicuronídeo
	RNH ₂	UDPG Transferase	RNH-Glicuronídeo
	R-SH		R-S-O
Metilação	R-OH	$\xrightarrow{\text{S-adenosil-metionina}}$	R-O-CH ₃
Acetilação	RNH ₂	$\xrightarrow[\text{N-acetiltransferase}]{\text{Acetil - CoA}}$	RNHCOCH ₃

2.3.4. Farmacocinética dos curcuminóides

A curcumina apresenta baixa biodisponibilidade por via oral (MAITI et. al., 2007 e WANG et. al., 2008). Em ensaios para avaliação da curcumina em ratos, após administração oral (500 mg/Kg), a biodisponibilidade foi em torno de 1% (YANG et. al., 2007).

Os compostos **1** e **3** apresentam atividade biológica interessante, porém apresentam problemas de solubilidade. Diversos trabalhos tiveram como objetivo o estudo do perfil farmacocinético da curcumina e seus produtos de biotransformação. Na pesquisa de novos fármacos para administração extravascular para o combate e prevenção de doenças, um dos quesitos mais avaliados é a absorção e a biodisponibilidade da substância, desde o local de aplicação até a chegada ao plasma.

Nos estudos de farmacocinética utilizando o derivado monossódico do composto **1**, que foi transformado em um sal para torná-lo solúvel em água (composto **2**), esperava-se que sua meia-vida ($t_{1/2}$) fosse próximo ao do composto **1**, uma vez que, em contato com o plasma, o sal poderia ser convertido na sua forma neutra. Porém, após a injeção endovenosa em camundongos e análise do plasma e órgãos, observou-se que o sal desaparece da circulação até 30 minutos após a injeção (VALDUGA et. al., 2010; LEONARDO, 2010). A meia-vida do composto **1** em camundongos, por via oral, é de $5,9 \pm 4,1$ horas, sendo que o pico máximo de absorção (C_{max}) ocorre após 30 minutos (T_{max}) (LIANG et al., 2009).

A redução expressiva da meia-vida do composto **2** deve-se à rápida biotransformação; não foi detectada a presença dos compostos **1** ou **2** em nenhum dos órgãos analisados, porém, foram identificados vários metabólitos por cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa acopladas a um espectrômetro de massa (LC/MS e GC/MS). Foram identificados produtos de reações de metabolismo de fase I (redução e oxidação e alquilação) e reações de fase II, pela conjugação com o grupo sulfato, glicuronato ou glutamil, algumas vezes na mesma molécula, mostrando que uma mesma molécula pode sofrer ação das enzimas do citocromo P450, sulfotransferases, glicuronidases e glutathione S-transferase (LEONARDO et. al., 2010).

LIANG e colaboradores (2009) analisaram o perfil farmacocinético do composto **1** comparado à curcumina, após administração oral de 500 mg/kg em camundongos. A absorção de **1** foi em torno de 10 vezes maior que a curcumina, além de apresentar meia-vida ($t_{1/2}$) 2 vezes superior e como consequência a biotransformação foi mais lenta.

As principais barreiras de absorção da curcumina, a permeabilidade *in vitro* e *in situ* e o fluxo do derivado glicuronidado foram monitorados na porção do jejuno de ratos e em células Caco-2. Nos experimentos *in situ*, a curcumina foi mais permeável sob condições ácidas, porém essa permeabilidade era bastante inferior aos padrões de alta permeabilidade. A piperina é um inibidor da biotransformação da curcumina, ela inibe os transportadores de membrana e diminui a quantidade da forma glicuronidada transportada do plasma para o intestino. É recomendada a inclusão de piperina em formulações contendo curcumina para inibir a glicuronidação da curcumina e aumentar o transporte de glicuronídeos formados no plasma, aumentando a probabilidade de distribuição em tecido alvo do glicuronídeo e a interconversão da curcumina (BERGINC et al., 2012).

A curcumina possui grande efeito na inibição de algumas isoformas da enzima citocromo P450 como a CYP2D6, CYP2B6, CYP1A2, CYP3A4, CYP2C9. Os estudos sugerem que a inibição do CYP3A4 e, em menor extensão, do CYP2C9 têm potencial para causar interações medicamentosas através da co-administração da curcumina e outros fármacos metabolizados por essas enzimas (APPIAH-OPONG, et al., 2007). Em estudos *in vitro*, nos quais foram avaliados 33 análogos da curcumina, do tipo pentadienonas, verificou-se que o composto **1** inibe CYP2C9 de forma moderada, e CYP2D6 fortemente (APPIAH-OPONG, et al., 2008).

2.4. EMPREGO DE FORMULAÇÕES NA MELHORIA DO DESEMPENHO DA CURCUMINA E ANÁLOGOS

A grande dificuldade para continuidade dos estudos das propriedades da curcumina é a sua baixa solubilidade em água, sendo assim os pesquisadores têm buscado alternativas e mecanismos para melhorar a absorção desta substância. Dentre elas, o uso de nanopartículas lipídicas para a distribuição de curcumina na

medula óssea e baço, por via intravenosa. Através da microscopia confocal de escaneamento pode ser observada a distribuição da curcumina pelos tecidos. Esse sistema pode ser útil e apropriado para terapias antioxidante e antiinflamatórias (SOU et al., 2008).

Além da melhora no perfil farmacocinético proporcionado pelo uso de sistemas nanoparticulados, estes podem também conferir uma melhora na ação farmacológica, pois melhoram a interação com o receptor. Nanoesferas de curcumina em ácido poli(láctico-coalicólico) (PLGA) possuem ação citotóxica superior contra células tumorais (MUKERJEE e VISHWANATHA, 2009) e permitem a liberação controlada da curcumina por longos períodos de tempo, aumentando sua ação antitumoral em camundongos, utilizando pela primeira vez uma formulação injetável para a substância (SHAHANI et al., 2010). A curcumina formulada em emulsão de carboximetilcelulose (CMC), administrada por via oral, apresentou um potente efeito inibidor no gene deficiente da interleucina-10 (IL-10), que está bem caracterizada na doença inflamatória intestinal (UNG et. al., 2009).

Uma formulação de curcumina em combinação com fosfolipídios foi utilizada para avaliar a absorção e o efeito hepatoprotetor em ratos, antes e depois da administração de tetracloreto de carbono (CCl₄). O complexo curcumina–fosfolipídeo protegeu o fígado, restabelecendo os níveis de enzimas do sistema glutatona hepática e de superóxido dismutase, catalase e ácido tiobarbitúrico em relação ao grupo tratado com tetracloreto de carbono. O complexo proporcionou melhor atividade hepatoprotetora e antioxidante em ratos do que a curcumina livre, nas mesmas doses (MAITI et al., 2007).

A formulação de um derivado difluorado da curcumina com β -ciclodextrina mostrou-se bastante ativa contra células de câncer de pâncreas (BxPC-3), mama (MDA-MB-231) e próstata (PC3) (DANDAWATE et al., 2012). Dentre os análogos pentadienílicos da curcumina, existe apenas um trabalho na literatura que descreve a preparação de derivados 1,5-diaril-3-oxo-1,4-pentadienila formulados em surfactantes catiônicos geminais conjugados de β -ciclodextrina. As formulações foram altamente eficientes na inibição do crescimento de células de melanoma, apresentaram excelente seletividade celular, desencadeando apoptose nas células tumorais sem causar toxicidade aos queratinócitos epidermais humanos (MICHEL et al., 2012).

Estas possibilidades podem ser estendidas a outros derivados da curcumina que apresentaram melhora na atividade biológica, mas que apresentam os mesmos problemas de solubilidade.

2.5. VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO

Existem diversos métodos para análise e quantificação de fármacos em fluidos biológicos, como a cromatografia gasosa, a eletroforese capilar e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O método mais utilizado é a cromatografia líquida de alta eficiência, que corresponde a um método físico-químico de separação, no qual os componentes a serem separados são distribuídos em duas fases: uma fixa de grande área superficial denominada fase estacionária, e outra um fluido que percorre através dela sendo por isto, denominada fase móvel (COLLINS et al., 1997). O uso do HPLC acoplado a um espectrômetro de massas (LC/MS) tem crescido muito nos últimos anos, visto que, esta técnica analítica permite a identificação de produtos de biotransformação.

A validação é o ato ou efeito de validar, tornar válido, tornar legítimo ou legal, confirmar por ensaio e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos com o objetivo de diminuir ou controlar os fatores que levam à imprecisão ou inexatidão de um dado que foi gerado (ANVISA, 2012). Entre esses fatores podem ser citados: variabilidade de amostra, eventual contaminação, reagentes inadequados, pipetagem errada, variações de temperatura, descuido na manutenção de equipamentos, calibração ineficiente, analista despreparado e perdas durante a análise.

Segundo a resolução RDC nº 27/2012 da ANVISA, a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações pretendidas, assegurando a confiabilidade dos resultados. No desenvolvimento de um método analítico, é importante avaliar se os parâmetros de validação estão de acordo com os requisitos estabelecidos pelo protocolo utilizado na validação da metodologia. Com relação aos parâmetros de desempenho e critérios de aceitação, os laboratórios, ao reproduzirem métodos oficiais o mesmo será considerado validado quando forem avaliados parâmetros como precisão,

exatidão e linearidade. No caso de metodologias não oficiais, a metodologia só será considerada validada se forem avaliados os seguintes requisitos, quando aplicáveis: seletividade, linearidade, intervalo, precisão intermediária, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez (ANVISA, 2012; SHAH et al., 1992 e FDA, 1995).

2.5.1 Limite inferior de quantificação

Limite inferior de quantificação (LIQ) é a menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser determinada na curva de calibração preparada na matriz, com precisão e exatidão menores que 20%, sob condições experimentais aceitáveis (ANVISA, 2012).

Além disso, a resposta do LIQ deve ser, no mínimo, cinco vezes superior a qualquer interferência da amostra branco no tempo de retenção do composto. O limite inferior de quantificação do método deve ser confirmado por meio da análise em sextuplicata, em três dias consecutivos, de amostras plasmáticas contendo o composto **4** e avaliada a relação sinal/ruído nos cromatogramas.

2.5.2. Faixa linear de trabalho

Em um determinado método quantitativo, existe um determinado intervalo de concentração em que o analito pode ser quantificado com exatidão, precisão e linearidade adequadas. Este intervalo especificado compreende a faixa superior e inferior do limite de quantificação, sendo definido pela resposta do analito no equipamento em que foi efetuada a análise. Na maioria dos casos este procedimento é derivado do estudo da linearidade (ANVISA, 2003). Na prática, a linearidade é determinada por intermédio de gráficos de calibração, seguidos de tratamento estatístico.

2.5.3. Exatidão

Expressa a concordância entre o valor encontrado e o valor aceito como verdadeiro ou referência. Valores baixos de exatidão são ocasionados por erros sistemáticos que provocam desvios ou tendências nos resultados. A exatidão é expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR), não se admitindo valores fora da faixa de 15% do valor nominal exceto para o LIQ (Limite Inferior de Quantificação) para o qual não se admitem valores superiores a 20% do valor nominal (ANVISA, 2012).

A exatidão é determinada através das seguintes equações:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração Média Experimental}}{\text{valor nominal}} \times 100 \quad (\text{eq. 1})$$

ou ainda,

$$\text{Inexatidão} = \frac{\text{Concentração Média Experimental} - \text{Valor nominal}}{\text{valor nominal}} \times 100 \quad (\text{eq. 2})$$

2.5.4. Precisão

Expressa a proximidade entre vários resultados analíticos obtidos por repetidas aferições de múltiplas alíquotas de uma única matriz. A precisão deve ser determinada em uma mesma corrida (precisão intracorrída), quando medida no mesmo dia, ou como precisão intercorrída, quando medida ao longo de diferentes corridas e em no mínimo três corridas diferentes. A precisão deve ser expressa como Desvio Padrão Relativo (DPR) ou Coeficiente de Variação (CV%) não se admitindo valores superiores a 15% exceto para o LIQ (Limite Inferior de Quantificação), para o qual se admitem valores menores ou iguais a 20% (ANVISA, 2012).

$$\text{CV} = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Conc. Média Experimental}} \times 100 \quad (\text{eq. 3})$$

2.5.5. Seletividade

Corresponde à capacidade do método em diferenciar e quantificar o analito e o padrão interno (PI) de maneira inequívoca na presença de outros componentes da amostra. Em geral uma forma simples de verificar a seletividade de um método cromatográfico é observar a presença de picos na região do tempo de retenção do analito de interesse (ANVISA, 2012).

2.5.6. Recuperação

A recuperação avalia a eficiência da extração ou do método de tratamento das amostras biológicas. É calculada comparando-se a resposta obtida para o analito, adicionado na matriz biológica e extraído, com a resposta obtida para o analito em amostras preparadas em solvente, não extraídas, estas representam, portanto 100% (CASSIANO et al., 2009). Para realizar a avaliação da recuperação deve-se utilizar três níveis de concentrações: baixo, médio e alto de acordo com a curva de calibração. Apesar de altos valores serem desejáveis para maximizar a sensibilidade do método, não é necessário que este valor seja de 100% mas, que a recuperação seja consistente, precisa e reprodutiva.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um método bioanalítico para quantificar o composto **4** em amostras de plasma e avaliar as características da sua formulação, baseada em emulsão lipídica, para uso endovenoso.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método cromatográfico líquido seletivo para análise e quantificação do composto **4** na ausência de interferentes;
- Determinar uma metodologia eficiente para extração do princípio ativo de amostras de plasma;
- Validar os parâmetros de precisão e exatidão do método bioanalítico e determinar o limite de detecção e quantificação do método;
- Caracterizar físico-quimicamente a formulação contendo o composto **4**;
- Avaliar o potencial hemolítico da formulação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.2. Reagentes e solventes

- Acetona (Cinética)
- Acetonitrila HPLC (Merck[®])
- Ácido Clorídrico (FMaia)
- Ácido oléico (Sigma Chem. Co.)
- Ácido Fosfórico (Merck[®])
- Ácido Trifluoroacético (Merck[®])
- Água Destilada
- β -caroteno (Sigma Chem. Co.)
- Colesterol (Sigma Chem. Co.)
- Cloreto de Sódio P.A. (Cinética)
- Clorofórmio P.A. (Fluka)
- Dicicloexilcarbodiimida (Merck[®])
- Dimetilaminopiridina (Merck[®])
- Fenolftaleína (Lipoid)
- Hidróxido de Sódio (Cinética)
- Isopropanol grau HPLC (J.T.Baker)
- 1,5-bis(4-oleil-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona
- Metanol grau HPLC (Merck[®])
- Molibdato de Amônio (Cinética)
- Óleo de semente de algodão (Sigma Chem. Co.)
- Tween[®] 20 (Sigma Chem. Co)
- Trietilamina (Merck[®])
- Vanilina (Fluka)

4.1.3. Equipamentos

- Agitador Magnético Marconi MA-162
- Balança de precisão de 0,01g (Mettler Toledo)
- Banho de aquecimento Fisatom 562
- Centrífuga de alta rotação 10000 rpm (Eppendorf)
- Coluna Phenomenex 4,6 mm I.D X 15 cm, ODS C18 diâmetro de partícula 5 µm
- Detector DAD (Diode Array Detector) - 360 nm
- Homogeneizador de alta pressão Emulsiflex-C5 (Avestin, Ontario, Canadá)
- HPLC Agilent 1100 (Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP – Lab. Prof. Hélio A. Stéfani).
- *Laser Light-Scattering* Brookhaven Instruments Co., Holtsville-NY) – Lab. Profa. Iolanda M. Cuccovia - IQUSP)
- Microscópio de Transmissão Eletrônica 906E LEO (Instituto Butantan)
- pHmetro Sensoglass SP 769T
- Pré-coluna Luna C18 (2) (Phenomenex)
- Sistema Millipore de purificação de água MilliQ-Plus (FCF – USP)
- Ultrassom SONICS (VCX130)

4.2. METODOLOGIA

4.2.1 Síntese e caracterização do composto **1** e seu derivado diacilado **4**

A 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona (**1**) foi sintetizada de acordo com metodologia desenvolvida no laboratório do Prof. José Quincoces Suárez (SUÁREZ et. al., 2002). O composto **1** foi obtido através da reação da vanilina com acetona e ácido clorídrico usado como catalisador. A 1,5-bis(4-oleil-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona (**4**) foi obtida através da reação do composto **1** (1 mmol) com ácido oléico (2,2 mmol), em presença de dicitloexilcarbodiimida (DCC) (4 mmol) e dimetilaminopiridina (DMAP) (2 mmol) (STEGLICH, 1978). Os compostos sintetizados foram analisados e caracterizados através de ressonância magnética

nuclear, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e infravermelho e ultravioleta, na Universidade Bandeirante de São Paulo.

4.2.2 Condições para a análise cromatográfica

Foi determinada a melhor condição cromatográfica para análise e quantificação do composto **4** por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em equipamento Agilent 1100 com detector DAD (Diode Array Detector) ($\lambda = 360$ nm) (Palo Alto, CA, USA), coluna Phenomenex 4,6 mm I.DX15 cm, ODS (octadecilsilano) C18 (Phenomenex, Torrance, USA) com diâmetro de partícula de 5 μ m e uma pré-coluna Luna C18 (2) (guard cartridge) (Phenomenex, Torrance, USA). A fase móvel é composta de isopropanol:acetonitrila:(ácido fosfórico/água–20%) (85:5:10) a um fluxo de 0,8 mL/min.

Para a quantificação das amostras foi realizada uma curva de calibração com concentrações de 31,25 – 500 μ g/mL do composto **4**.

4.2.3 Soluções estoque

Uma solução estoque do composto **4** na concentração de 1mg/mL em isopropanol foi preparada e armazenada a 4 °C. Diluições seriadas foram feitas com o plasma para fazer uma série de soluções-padrão.

4.2.4 Preparação dos padrões e da curva de calibração

Uma solução-estoque primária de plasma humano obtido do Banco de Sangue do Instituto do coração (INCOR-HC-FM-USP), de concentração 500 μ g/mL foi preparada a partir da solução do composto **4** a 1mg/mL. Esta solução foi diluída novamente em plasma para preparar os padrões nas concentrações de 31,25, 62,5, 125, 250 e 500 μ g/mL. A cada tubo foram adicionados 200 μ L das soluções padrão

de plasma e 400 μL de *n*-butanol:tetraidrofurano (THF) 1:1. Os tubos foram agitados em vórtex por 1 min e então centrifugados a 10000 rpm por 10 min. 500 μL do sobrenadante foram transferidos para tubos de ensaio e evaporados sob fluxo de nitrogênio a 36 °C. O resíduo foi reconstituído com 200 μL de isopropanol e 20 μL foram injetados no HPLC. Para obtenção da curva, foram injetados 3 amostras para cada concentração, preparados no mesmo dia da análise (SHAH et al., 1992).

4.2.5 Validação de Método bioanalítico por HPLC

Para validação do método bioanalítico foram injetadas amostras extraídas de plasma humano obtido do Banco de Sangue do Instituto do coração (INCOR-HC-FM-USP), contaminadas com concentrações conhecidas do composto **4**.

Foram determinados o limite inferior de quantificação (LIQ), o limite de superior de quantificação (LSQ), a linearidade, a precisão e a exatidão.

4.2.6 Preparação das formulações

Foram pesados em um becker de 10 mL, o óleo de algodão (Sigma Chem. Co), a fosfatidilcolina (surfactante principal), o colesterol, o β -caroteno (antioxidante), o composto **4** e o Tween[®] 20 (co-surfactante, Sigma Chem. Co) e adicionados 10 mL de solução de cloreto de sódio 0,1 M, a 50°C. A mistura foi agitada por um minuto em agitador magnético e em ultrassom durante 3 minutos, para pré-emulsificação. Em seguida, a mistura foi emulsificada em homogeneizador de alta pressão, Emulsiflex C5, a temperatura entre 50 a 55 °C e 750-1200 bar, por um período de 20 minutos.

Também foi preparada uma emulsão sem o composto **4**, nas mesmas condições anteriores, exceto pelo tempo de emulsificação, que foi de 8 minutos. Esta emulsão foi produzida para ser utilizada como controle em todos os ensaios.

Após o processo de emulsificação, os conteúdos foram transferidos para um tubo falcon e centrifugados durante 30 minutos a 2.400 rpm. O sobrenadante foi

filtrado com filtro Chromafil® 20 µm para esterilização, e armazenados em tubos falcon estéreis e conservados em geladeira.

4.2.7 Caracterização das formulações

As formulações foram caracterizadas através das seguintes análises:

- Características organolépticas: cor, odor, presença de precipitados e opacidade foram analisados visualmente pelo período de análise de 6 meses.
- pH: foi analisado em pHmetro e através de titulação com solução de NaOH (Cinetica) 0,005 M, utilizando fenolftaleína (Fluka) como indicador; 250 µL de emulsão contendo o composto **4** diluídos em 5,0 mL de etanol PA (Fluka) e titulados com a base.
- Tamanho das partículas, polidispersidade e potencial zeta: Foram analisados em *Laser Light-Scattering* no Instituto de Química da USP (Laboratório da Profa. Iolanda M. Cuccovia). Para esta análise foi preparada uma solução de 50 µL de amostra em 4 mL de solução de cloreto de sódio (Cinetica) 0,9 % e filtrada momentos antes da análise. Para análise do potencial zeta foram utilizados 1,2 mL desta solução filtrada. Todas as análises foram realizadas em 25 °C.
- Microscopia eletrônica de transmissão (MET): Esta análise foi realizada no Instituto Butantan, com a colaboração da Profa. Sylvia Mendes Carneiro. Foram diluídos 2,5 µL das formulações em 0,2 mL de solução de NaCl (Cinetica) 0,1 M e uma gota foi aplicada sobre grelhas de cobre revestidas com parlodium-carbono de 300 ou 400 malhas. Depois de 1-2 minutos o excesso de líquido foi eliminado com um papel absorvente, deixando uma pequena quantidade de fluido residual. A coloração negativa foi feita com a adição de 5 µL de molibdato de amônio (Cinetica) a 2% e pH 7,2, durante 5-10 segundos e, em seguida, secou-se com papel absorvente. As Grelhas

foram examinadas em um microscópio de transmissão eletrônica 906E LEO a uma voltagem de aceleração de 100 kV. As imagens foram adquiridas por uma câmera CCD MegaView através do programa de imagem de Plataforma Universal TEM e salvas em extensão TIF.

4.2.8 Teste de hemólise

Para realizar o teste de hemólise foram utilizados 0,5 mL de suspensão de eritrócitos em tampão fosfato de pH 7,4 (PBS) misturados com 0,5 mL do composto **4** veiculado em emulsão e emulsão controle nas concentrações 700, 350, 175, 87,5 e 43,75 μM (concentração final de eritrócitos $\cong 0,5 \times 10^9 / \text{mL}$). Incubou-se a mistura a 37°C por 1 hora com leve agitação no shaker e após foi centrifugada em 2400 rpm por 10 minutos. Retirou-se o sobrenadante e diluiu-se 1:10 para leitura em espectrofotômetro a 540 nm (WIDNER, 2006; DAS, 2010).

Como controle negativo da hemólise (0%) foi feita a incubação de eritrócitos com PBS puro, na mesma condição das amostras. Como controle positivo, para determinar o valor de 100% de hemólise foi feita a incubação de eritrócitos com 1% (p/v) de Triton em água, também na mesma condição experimental.

Todos os testes foram realizados em triplicata.

Para quantificação do percentual de hemólise utilizou-se a seguinte equação:

$$\text{Percentual de hemólise} = \frac{\text{amostra} - \text{controle negativo}}{\text{controle positivo} - \text{controle negativo}} \times 100 \quad (\text{eq. 4})$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO COMPOSTO 1 E SEU DERIVADO DIACILADO 4

A 1,5-diaril-1,4-pentadien-3-ona (**1**) foi obtida através de reação de condensação entre a vanilina e a acetona tendo como catalisador o ácido clorídrico (HCl). O produto foi purificado por precipitação em acetonitrila e água, obtendo-se rendimento de 84 % e pureza de 100 %, de acordo com análise por HPLC (Figura 7). A principal impureza encontrada neste tipo de reação é a vanilina, utilizada como material de partida para obtenção do composto **1**, com tempo de retenção de 3,4 minutos. Portanto, pode-se assegurar a pureza do composto **1** que possui um tempo de retenção de 8,587 minutos. O interferente que pode ser visualizado no cromatograma é o pico do solvente utilizado como fase móvel em torno de 1,0 minuto.

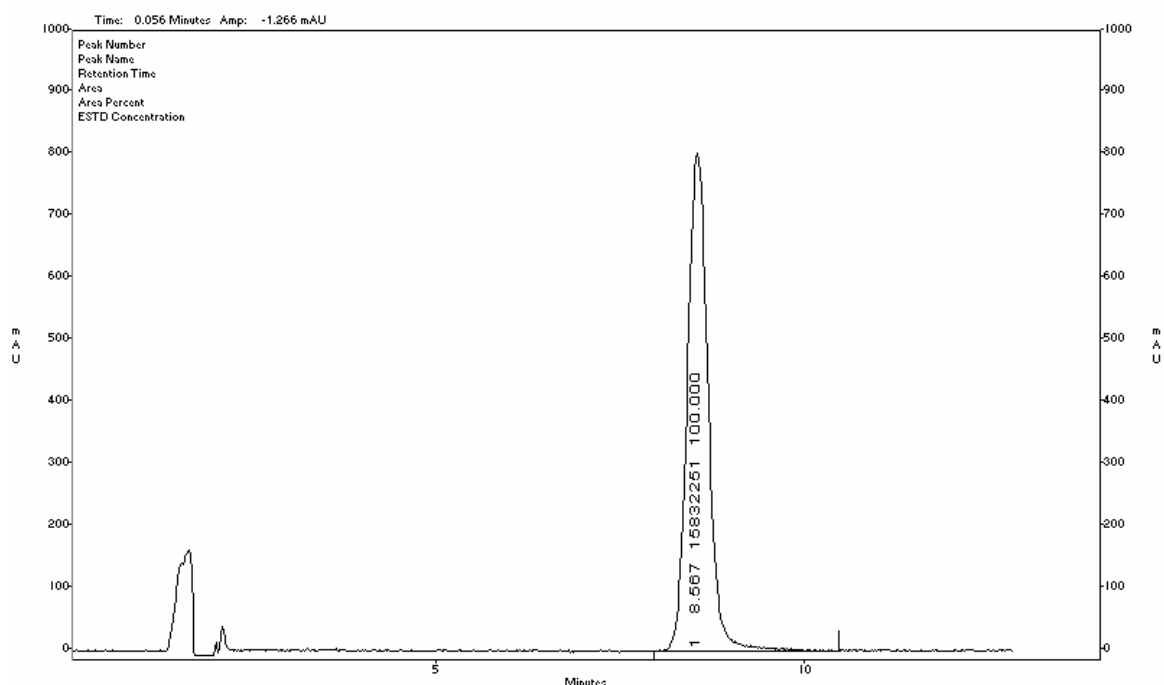


Figura 7 - Cromatograma do composto **1** obtido por HPLC utilizando como fase móvel água:acetonitrila:ácido acético (65:33,75:1,25) a um fluxo de 1,0 mL/min e 210 nm.

Para aumentar a lipofilicidade do composto **1** foram introduzidos dois grupos oleíla nas hidroxilas fenólicas. Para isso, foram colocados para reagir, 1 equivalente

do composto **1** e 2,2 equivalentes de ácido oléico, em presença de dicitloexilcarbodiimida (DCC) e dimetilaminopiridina (DMAP) como catalisadores e diclorometano anidro, com rendimento 100 % (Figura 8). Este método de esterificação, conhecido como esterificação de Steglich é uma reação branda, que permite a conversão de substratos ácidos lábeis em ésteres (STEGLICH, 1978), minimizando a formação de subprodutos que poderiam dificultar a purificação do produto.

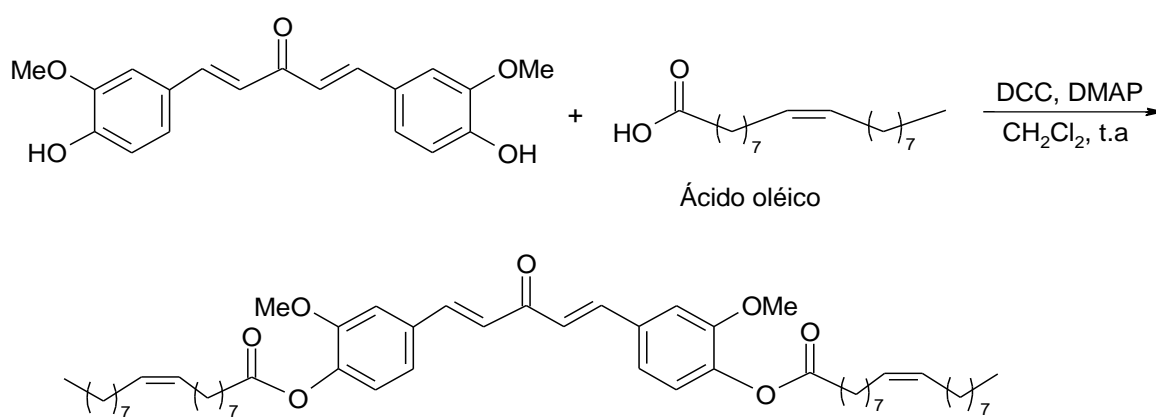


Figura 8 - Esquema reacional para diacilação do composto **1** para obtenção de **4**.

A estrutura do composto **4** foi confirmada através do espectro de infravermelho, ^1H NMR e ^{13}C NMR, onde se observam, além dos sinais referentes à estrutura básica do composto **1**, os sinais que confirmam a ligação de dois grupos oleíla em cada uma das hidroxilas fenólicas de **1**. No espectro de infravermelho foram detectados os sinais característicos das carbonilas dos grupos éster em 1764 cm^{-1} e cetona em 1715 cm^{-1} , e, em 1652 , 1621 e 1600 cm^{-1} aparecem os sinais de estiramento C=C, alifáticos e aromáticos. No espectro de ^1H NMR (Figura 9) observa-se um tripleto em $0,86\text{ ppm}$, referente aos CH_3 terminais dos grupos oleíla, multiplete na região de $1,25$ - $2,04\text{ ppm}$, referente aos hidrogênios metilênicos dos grupos oleíla, $2,57\text{ ppm}$, referente aos CH_2 ligados aos carbonos vizinhos às carbonilas dos grupos éster e $5,32$ - $5,36\text{ ppm}$ referente aos hidrogênios dos carbonos das ligações duplas. Também, no espectro de ^{13}C NMR (Figura 10), se observam sinais que confirmam a presença dos grupos oleíla, como os sinais na região de $14,00\text{ ppm}$, referente aos CH_3 terminais, $22,58$ - $33,91\text{ ppm}$ referente aos CH_2 metilênicos e $171,45\text{ ppm}$ referente às carbonilas dos grupos éster.

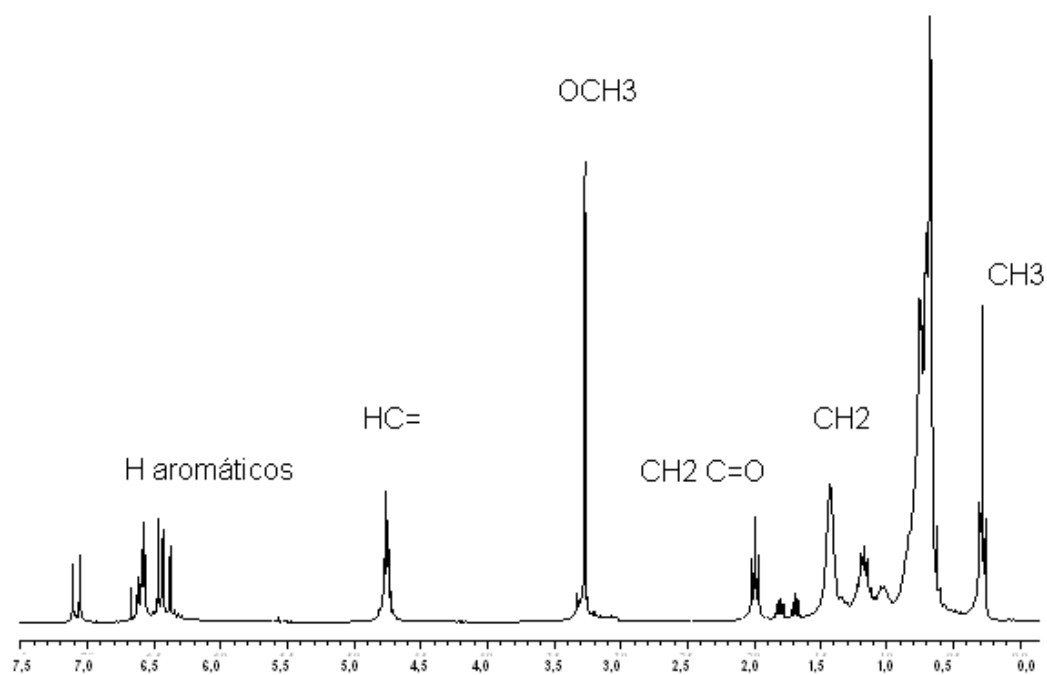


Figura 9 - Espectro de RMN de hidrogênio do composto **4**.

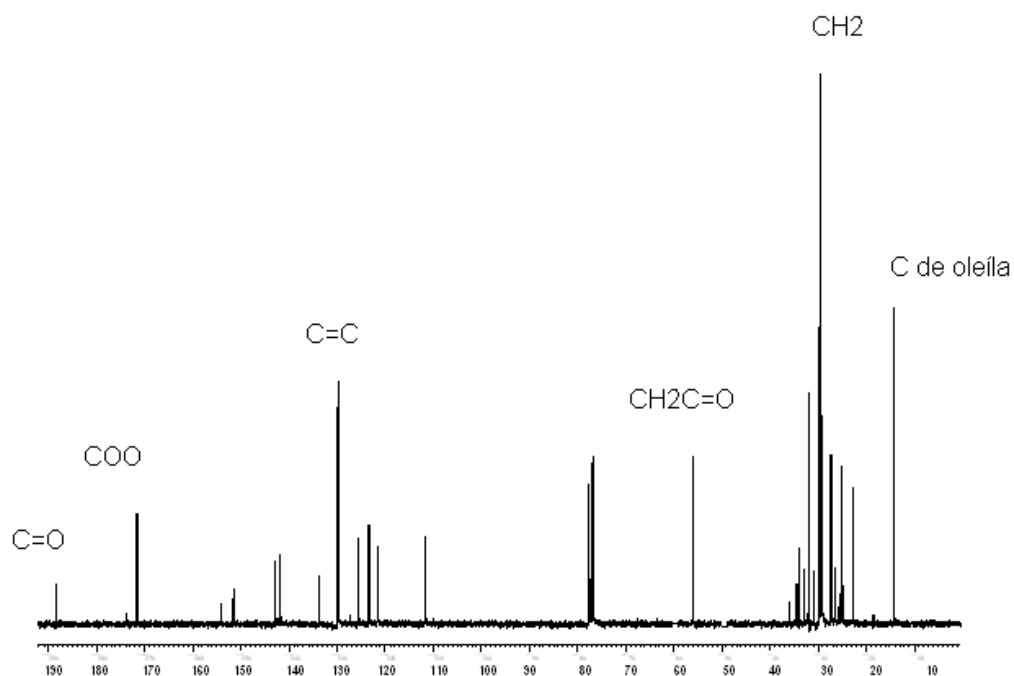


Figura 10 - Espectro de RMN de carbono treze do composto **4**.

Não existem ainda estudos que comprovem o mecanismo de ação do composto **1**, bem como para os curcuminóides em geral (ANAND et al., 2008), mas acredita-se que as duas hidroxilas sejam importantes para o efeito biológico. A

proposta de latenciação para o composto **1** é viável, uma vez que uma das suas principais atividades biológicas é ação antitumoral e, como se sabe, a grande maioria das células tumorais possui esterases, que podem hidrolisar os compostos esterificados, liberando-os para que exerçam sua ação (LUNDBERG, 1994).

Com a transformação do composto **1** em seu derivado monossódico (**2**), a meia-vida foi expressivamente reduzida de $5,9 \pm 4,314$ horas (via oral) (LIANG et al., 2009) para $11,09 \pm 0,86$ minutos (via endovenosa). Sendo que, após 30 minutos ele desaparece da circulação plasmática devido à rápida biotransformação. Nos estudos realizados de farmacocinética e biodistribuição do composto **2** não houve detecção de **2** em nenhum dos órgãos analisados nos tempos 5', 10', 15', 30', 1h, 2h, 4h, 8h e 24h, foram identificados somente seus produtos de biotransformação (VALDUGA et al., 2010; LEONARDO, 2010).

Reações de biotransformação de fase I (redução e oxidação e alquilação) e reações de fase II, pela conjugação com o grupo sulfato (OSO_3H), glicuronato ou glutamil, mostrando que apenas uma molécula do composto **2** pode sofrer ação de diversas enzimas do citocromo P450 (Figura 11), como epóxido hidrolases, que estão envolvidas na hidroxilação de anéis aromáticos e de ligações duplas, uridina difosfato glicuronil transferases (UDPGT), que promovem glicuronidação e sulfotransferases, que promovem sulfatação (COLEMAN, 2010).

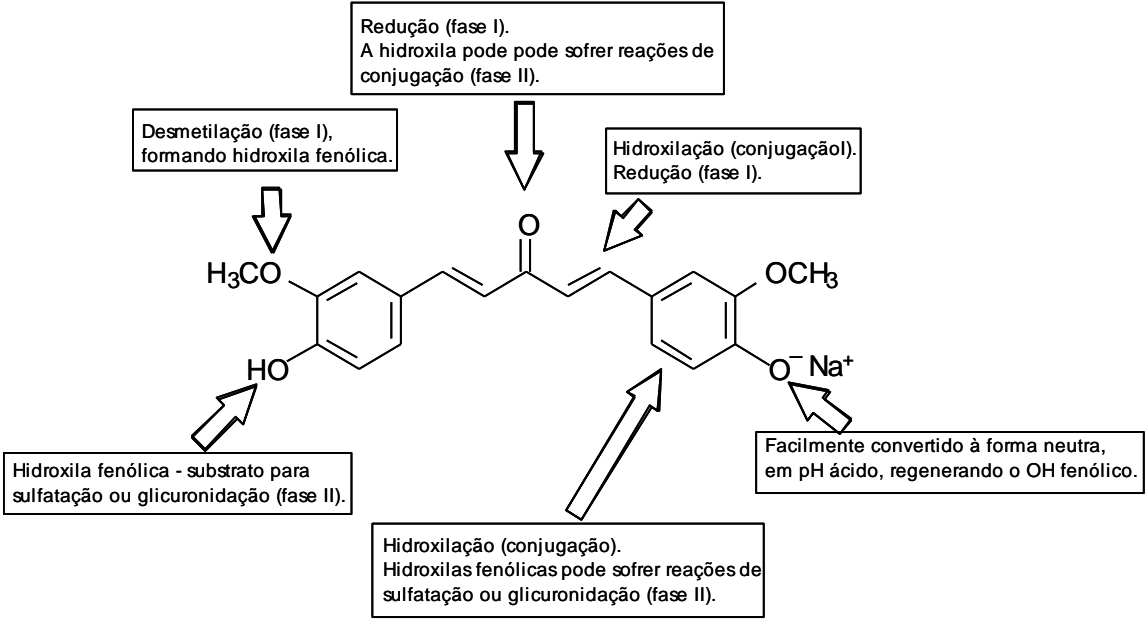


Figura 11 - Estrutura do composto **2**, onde são apontados os principais sítios para reações de biotransformação.

O composto **2** em contato com o plasma é convertido à forma neutra (**1**). Quando o composto **2** se encontra em baixas concentrações no organismo grande parte dele está forma livre (sal solúvel). Apesar disso, não foram observadas grandes diferenças na capacidade de regressão tumoral do composto **2** em comparação ao composto **1**.

Para resolver problemas de solubilidade no desenvolvimento de fármacos, uma das ferramentas mais utilizadas é a latencição, que consiste basicamente em adicionar um transportador a um fármaco modelo ativo resultando em um composto isento de ação farmacológica. Este fármaco ao entrar no organismo sofre cisão por meio de reações químicas ou enzimáticas, libera o transportador e torna-se novamente ativo (BUNDGAARD, 1991 apud CHIN; FERREIRA, 1999). Por isso, espera-se que a latencição do composto **4**, através da reação de esterificação, aumente sua meia-vida. Pois, agora será necessária uma reação de biotransformação adicional, que é a hidrólise para a liberação das cadeias de ácido graxo e do composto **1**.

Atualmente, com objetivo de encontrar transportadores eficientes que ultrapassem as barreiras biológicas, transportar o fármaco para o local de específico de ação, como no caso dos antitumorais, a grande maioria das pesquisas envolvendo a latencição de fármacos tem se voltado para o desenvolvimento de pró-fármacos altamente seletivos os chamados pró-fármacos dirigidos.

Estudos prévios mostraram que a formulação contendo o composto **4** apresentou ação citotóxica contra linhagens de melanoma murino B16F10 e alteração do padrão de metilação do DNA. As alterações foram identificadas através da análise do padrão global de metilação em regiões específicas do DNA genômico nos sítios de enzimas de restrição associadas às mudanças de metilação do DNA, comprovando que a latencição não compromete a ação do composto, mas, melhora problemas relacionados com a solubilidade (ROMEIRO, 2012).

5.2. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO

Devido aos resultados promissores obtidos com a formulação do composto **4** em emulsão lipídica, neste trabalho desenvolveu-se um método bioanalítico para

quantificação do composto **4** em plasma, sem ser formulado. Esta metodologia será aplicada nos estudos farmacocinéticos em camundongos, a serem realizados posteriormente para a formulação.

Para o desenvolvimento do método cromatográfico de análise, utilizou-se cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando com fase estacionária, coluna de fase reversa de octadecilsilano (C18). Foram testados vários tipos e misturas de solventes, para ajustar o tempo de retenção acima de 2,5-3,0 minutos, pois normalmente, componentes do plasma que podem ser extraídos juntamente com o princípio ativo, saem entre 1,5 e 2,5 minutos. O sistema de solventes que apresentou o melhor resultado foi a mistura isopropanol:acetonitrila:(ácido fosfórico/água–20%) (85:5:10) a um fluxo de 0,8 mL/min e comprimento de onda 360 nm. O pico do analito encontra-se em 3,186 minutos (Figura 12). Também foram testadas outras misturas, variando proporções de água, metanol, trietilamina, heptano, diclorometano, ácido trifluoracético, acetonitrila e ácido fosfórico.

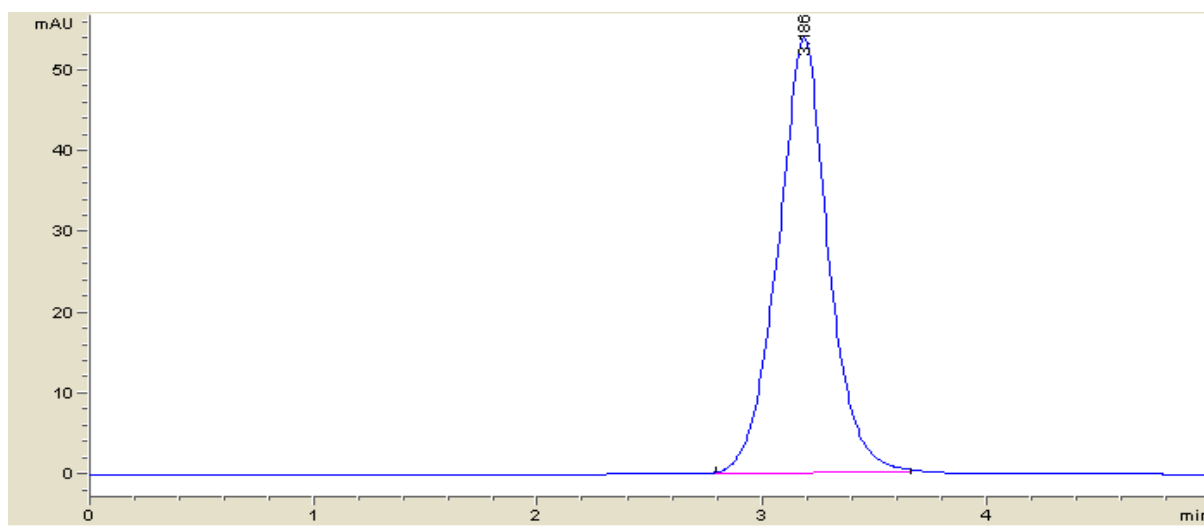


Figura 12 - Cromatograma do composto **4** diluído em isopropanol, obtido por HPLC utilizando como fase móvel isopropanol:acetonitrila:(ácido fosfórico:água–20%) (85:5:10) a um fluxo de 0,8 mL/min e 360 nm.

Para a validação de metodologia bioanalítica, foram injetadas amostras de concentração conhecida do composto **4** e amostras extraídas de plasma, para determinação de precisão e exatidão.

Para o desenvolvimento do protocolo de validação do método bioanalítico

foram consideradas as características farmacocinéticas do composto **4**, suas características físico-químicas e o objetivo que se pretende atingir com a metodologia validada. Para este estudo, a quantificação das amostras ocorreu por HPLC e a validação foi baseada no Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos - Resolução - RDC nº 27, de 17 de maio de 2012 (ANVISA).

As Figuras 12, 13 e 14 mostram os cromatogramas obtidos para o composto **4**, diluído em isopropanol, de uma amostra de plasma contaminada com o composto **4**, extraída com tetraidrofurano:*n*-butanol (1:1), e uma amostra de plasma humano (branco) extraída com tetraidrofurano:*n*-butanol (1:1), respectivamente. É possível verificar que o método de análise é bastante seletivo, pois os sinais que aparecem na região de quantificação do analito são de intensidade muito baixa e se assemelham ao ruído.

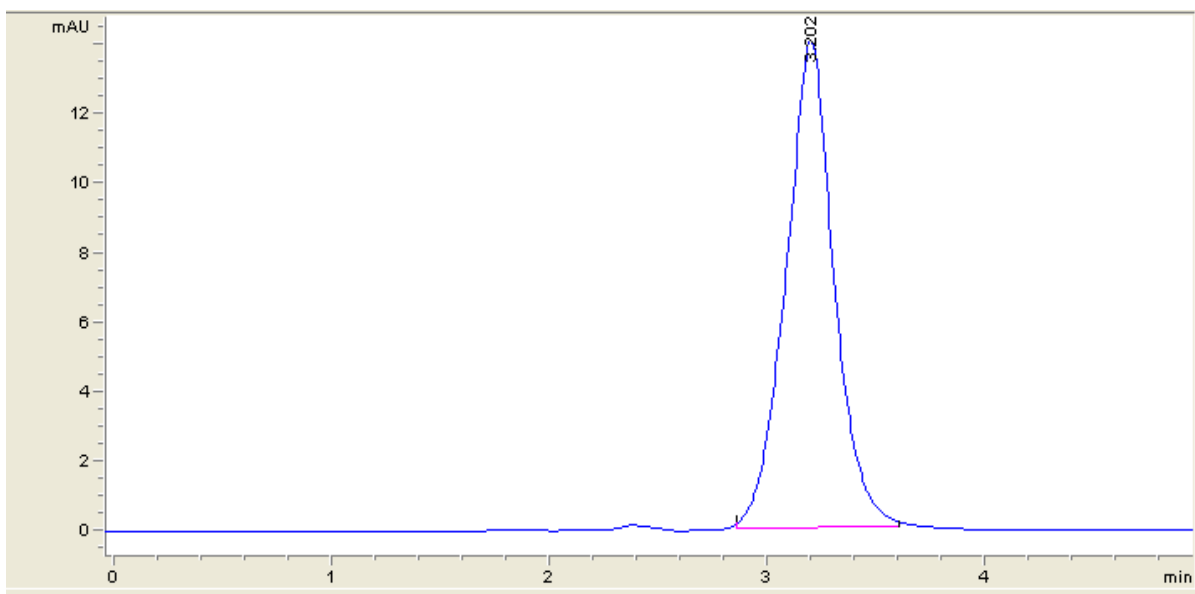


Figura 13 - Cromatograma de uma amostra de plasma humano contaminado com composto **4**, extraído com tetraidrofurano:*n*-butanol, obtido por HPLC, utilizando como fase móvel isopropanol:acetonitrila:(ácido fosfórico:água–20%) (85:5:10) a um fluxo de 0,8 mL/min e 360 nm.

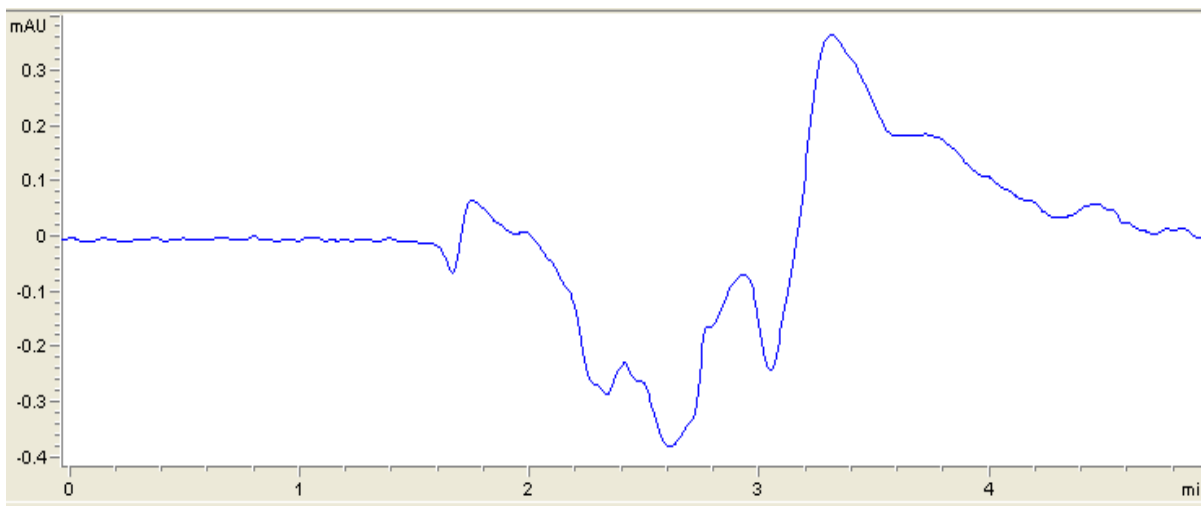


Figura 14 - Cromatograma de uma amostra de plasma humano extraído com tetraidrofurano:*n*-butanol, obtido por HPLC, utilizando como fase móvel isopropanol:acetonitrila;(ácido fosfórico:água–20%) (85:5:10) a um fluxo de 0,8 mL/min e 360 nm.

5.3.1 Curva de calibração

A curva de calibração, bem como toda a validação da metodologia para análise e quantificação do composto **4** foi realizada com plasma humano. Esta escolha se deu pela impossibilidade de se obter plasma de camundongo - modelo animal utilizado para a realização dos experimentos de farmacocinética e biodistribuição - em quantidade suficiente para a realização dos ensaios.

A análise e quantificação de substâncias no plasma podem ser feitas através da injeção direta do plasma, após centrifugação, diretamente no HPLC, porém este método não é adequado devido à grande quantidade de substâncias, como proteínas e sais que estão presentes e acabam contaminando a coluna, diminuindo assim o seu tempo de vida útil. Por isso, são empregados métodos de extração, através do uso de solventes orgânicos, que podem ser miscíveis ou imiscíveis. Quando são utilizados solventes miscíveis, o processo deve promover a precipitação das proteínas e as substâncias analisadas devem ficar solúveis no sobrenadante. Para esse fim, os solventes mais utilizados são etanol, metanol, isopropanol e acetonitrila. Quando são utilizados solventes imiscíveis, ocorre separação de fases, sendo que as substâncias analisadas devem estar solúveis na fase orgânica. Neste caso, os solventes mais utilizados são éter, clorofórmio e diclorometano.

Para extração do composto **4** do plasma, foram testadas as duas metodologias citadas anteriormente, sendo que o método de extração por precipitação se mostrou mais eficiente. Foram testados isopropanol, metanol, éter diisopropílico, *n*-butanol, mistura de isopropanol:tetraidrofurano 1:2, mistura de tetraidrofurano:*n*-butanol 1:1 e mistura de isopropanol:*n*-butanol 1:1. O solvente que apresentou maior eficiência de extração foi a mistura de tetraidrofurano:*n*-butanol 1:1, que promove a precipitação das proteínas plasmáticas e a solubilização do composto **4**, que permanece no sobrenadante, permitindo recuperação do princípio ativo adicionado em torno de 50%. O caráter altamente lipofílico do composto **4** faz com que interaja fortemente com as proteínas plasmáticas, dificultando sua extração. A recuperação não é mais um parâmetro de interesse na determinação da validação de um método, desde que a precisão e a exatidão estejam adequadas (ANVISA, 2012). Porém, para análise de farmacocinética e biodistribuição este é de grande importância, já que demonstra a eficiência do processo de extração do analito da matriz biológica contribuindo para o aumento da sensibilidade do método.

No método analítico, a linearidade pode ser determinada por uma análise estatística de regressão linear, com isto é possível determinar a proporcionalidade entre a resposta instrumental e a concentração do analito a ser determinado (BRITAIN, 1998). A curva de calibração foi construída utilizando-se as seguintes concentrações 31,25, 62,5, 125, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$ do composto **4**, em amostras de plasma humano. O número recomendado para se obter uma boa resposta é de no mínimo 5 concentrações (SHAH, et. al., 1991). O valor do coeficiente de correlação foi de $r = 0,999$ demonstrando boa linearidade do método (Figura 15).

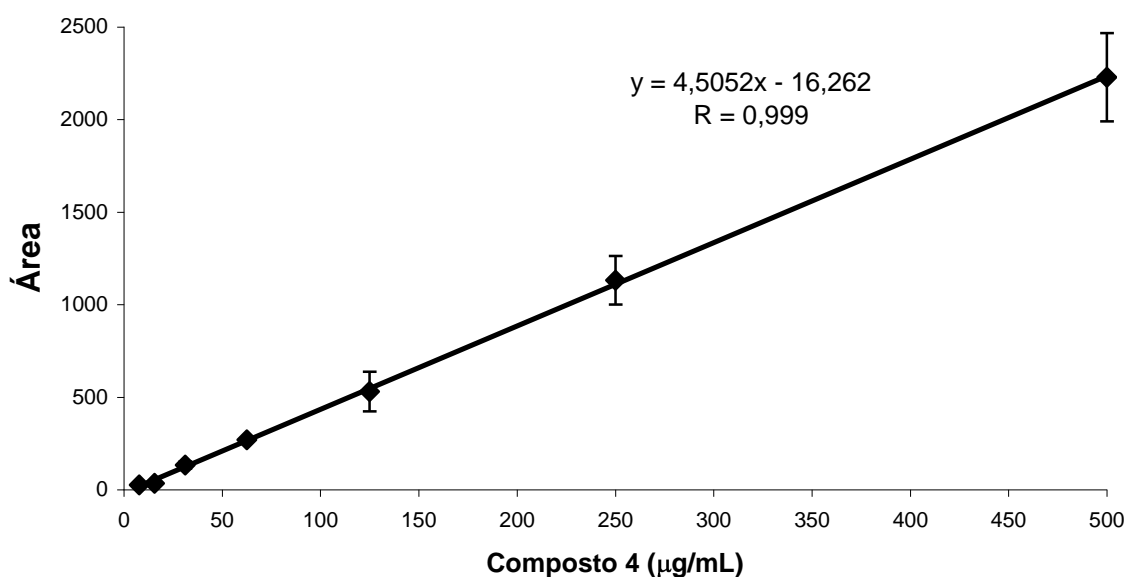


Figura 15 - Curva de calibração para o composto **4** em plasma humano. Os dados das áreas foram obtidos por HPL nas concentrações de 31,25 a 500 µg/mL.

Para os dados obtidos no processo de extração, o limite inferior de quantificação (LIQ) do método analítico foi de 31,25 µg/mL, que apresenta relação sinal/ruído maior que 3. Este resultado está de acordo com as normas da ANVISA, que estabelece que a resposta dos picos interferentes no tempo de retenção do analito não podem ser superiores a 20 %, como pode ser visualizado no cromatograma da Figura 16 em comparação com o da Figura 14.

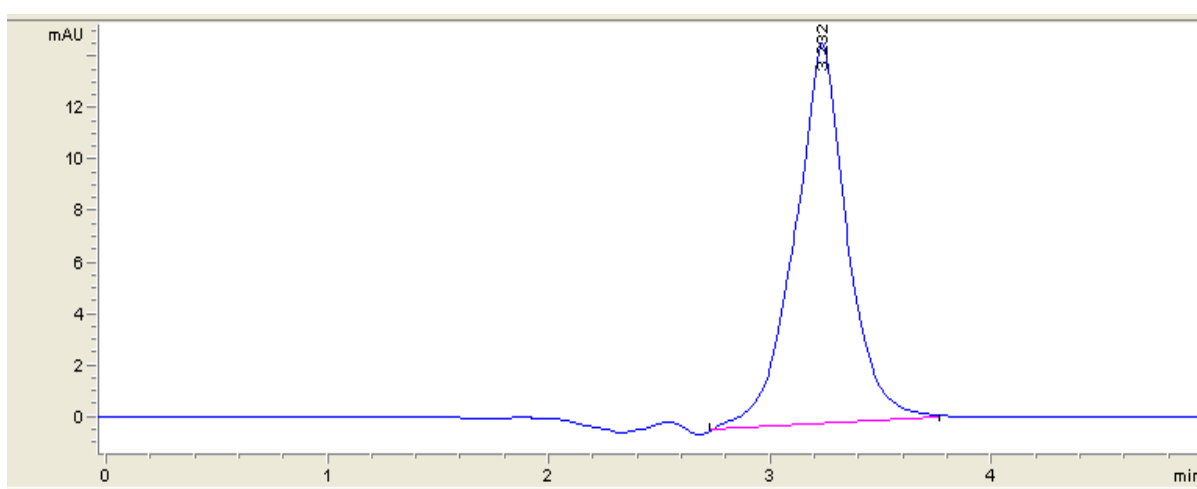


Figura 16 - Cromatograma da amostra de plasma humano contendo 31,25 µg/mL, extraído com isopropanol, obtido por HPLC, utilizando como fase móvel isopropanol:acetonitrila:(ácido fosfórico:água–20%) (85:5:10) a um fluxo de 0,8 mL/min e 360 nm.

As amostras se mantiveram estáveis durante todo o processo de extração e análise. Não se observaram picos adicionais nos cromatogramas das amostras analisadas.

5.3.2 Precisão

Foi determinada a precisão para 3 amostras de plasma contendo o composto **4**, nas concentrações 31,25, 125 e 500 $\mu\text{g/mL}$, em quintuplicata, extraídas imediatamente após a preparação.

Para cada concentração foram calculadas as médias das leituras, o desvio padrão e o coeficiente de variação (Tabela 4). O resultado encontrado para o coeficiente de variação foi de 10,7%, para a concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ (LSQ), de 10,9%, para 125 $\mu\text{g/mL}$, e de 14,2% para 31,25 $\mu\text{g/mL}$ (LIQ). Os dados mostram que os valores obtidos para o limite superior de quantificação (LSQ-500 $\mu\text{g/mL}$) e limite inferior de quantificação (LIQ-31,25) estão dentro dos padrões estabelecidos para a validação de métodos analíticos, que não deve ser superior a 20 % para o LIQ e LSQ. Para a concentração média (125 $\mu\text{g/mL}$), o valor de coeficiente de variação também está dentro do estabelecido pela ANVISA, que é de 15 %.

Tabela 4 - Área dos picos das amostras de plasma contaminadas com 31,25-500 $\mu\text{g/mL}$ do composto **4**, obtida por HPLC, para análise de precisão.

Comp. 4 ($\mu\text{g/mL}$)	Média	Desvio P.	CV (%)
500	2228,78	237,73	10,7
250	1131,92	130,93	11,6
125	478,66	52,03	10,9
62,5	270,24	9,62	3,6
31,25	133,22	18,86	14,2

5.3.3 Exatidão

A exatidão do método foi determinada através da comparação entre a concentração absoluta e a concentração experimental, demonstrando a eficiência (ou exatidão) do processo de extração, que foi calculada pela divisão entre o resultado da concentração média experimental e a concentração teórica multiplicada por 100.

$$\text{Taxa recuperação} = [\text{conc. encontrada} / \text{conc. absoluta}] \times 100 \quad (\text{eq. 5})$$

Os valores encontrados nos cálculos da exatidão foram entre 97,13 e 106,3 % para as cinco concentrações entre 32,125 e 500 µg/mL (Tabela 5). Estes valores de variação estão dentro daqueles preconizados pela ANVISA, para métodos bioanalíticos, que devem ser inferiores a 20%, para o limite superior de quantificação (LSQ) e limite inferior de quantificação (LIQ), e para outras concentrações não deve ultrapassar 15 %. A taxa de recuperação encontrada foi entre 45,61 e 57,66 %.

Tabela 5 - Dados da área do pico do composto 4 em isopropanol e em plasma para cálculo da exatidão.

Comp. 4 (µg/mL)	Área do pico em i-PrOH	Área do pico em Plasma	Recálculo	Exatidão	Recuperação
500	3929,70	2228,78	498,22	99,64	56,72
250	1963,25	1131,92	254,83	101,93	57,66
125	956,29	530,69	121,42	97,13	55,50
62,5	490,84	270,24	63,62	101,80	55,06
31,25	292,10	133,22	33,22	106,30	45,61

5.3. DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO LIPÍDICA CONTENDO O COMPOSTO 4

Como já se sabe, muitos compostos naturais apresentam atividade biológica importante, mas seu uso é proibitivo devido a sua toxicidade. Por isso, muitos deles são derivatizados e, apesar de terem sua atividade reduzida, seu uso é compensado pela diminuição dos efeitos tóxicos, possibilitando assim, seu uso na clínica. Além disso, muitos outros sistemas empregando nanotecnologia vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de melhorar as propriedades dos fármacos. Especialmente, na área de antitumorais, são desenvolvidos e estudados sistemas para veiculação de fármacos como lipossomas, emulsões lipídicas, complexos com dextrina, nanopartículas poliméricas, micelas poliméricas e dendrímeros. Todos estes sistemas visam melhorar o direcionamento dos quimioterápicos aos tecidos tumorais, além de melhorarem propriedades farmacocinéticas e, algumas vezes, facilitarem a etapa de desenvolvimento farmacotécnico.

A formulação contendo o composto 4 possui em sua composição fosfatidilcolina, triglicerídeo (óleo de semente de algodão), colesterol, Tween[®] 20, β -caroteno e o composto 4. Estas concentrações são calculadas com relação aos componentes sem considerar a solução aquosa. Porém quando calculado em relação ao percentual global da formulação a concentração do Tween[®] é de 1,8 %. Procurou-se utilizar apenas componentes que não fossem estranhos ao organismo, por isso o uso de componentes biocompatíveis/biodegradáveis. O único componente que não está presente em lipoproteínas naturais, ou não faz parte da dieta, é o Tween[®] 20 que pode ser utilizado até 4% (STRICKLEY, 2004). Seu uso como surfactante foi necessário, mas sua concentração foi ajustada como a mínima possível para se obter boa homogeneização e partículas com tamanho de aproximadamente 100 nm. A presença de moléculas grandes (polímeros) na superfície das partículas aumenta sua estabilidade, diminuindo a coalescência, pois aumenta a repulsão entre partículas. Tais partículas, rodeadas por moléculas poliméricas, quando injetadas têm a propriedade de aumentar a meia-vida dos fármacos, pois permanecem por mais tempo em circulação, devido ao fato de reduzir a captação pelo sistema fagocítico mononuclear (JOSHI e MÜLLER, 2009).

O β -caroteno foi utilizado na composição como antioxidante. O colesterol foi

adicionado com a finalidade de aumentar a estabilidade das emulsões quando injetadas, pois diminui a ação das lipases e diminui a remoção plasmática das partículas (RÖSSNER e VESSBY, 1977).

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 as partículas de tamanho desejado foi de 8 minutos para emulsão sem o composto **4** e de 20 minutos quando o mesmo é incorporado.

As emulsões apresentam coloração amarela (Figura 17) devido ao β -caroteno. O composto **4**, que tem coloração amarela escuro, confere uma tonalidade levemente mais escura para a emulsão, conforme Figura 17 A à esquerda. As análises por microscopia eletrônica de transmissão mostraram que as partículas de emulsão apresentam forma arredondada com tamanho entre 80 e 100 nm, tanto no controle (Figura 17 B), quanto na emulsão contendo o composto **4** (Figura 17 C). Além disso, é possível verificar que ambas apresentam característica de nanoemulsão lipídica líquida.

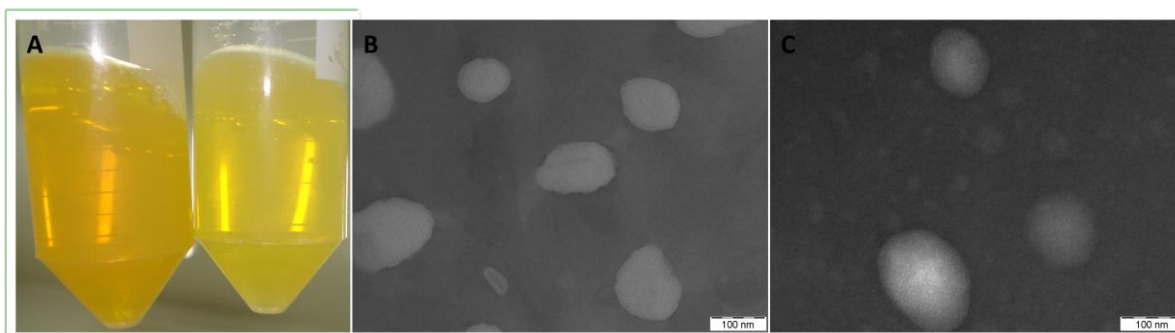


Figura 17 - (A) Formulações baseadas em emulsão lipídica com composto **4** (esquerda) e sem o composto **4** (direita) – emulsão controle; (B) Micrografia da emulsão controle e; (C) Micrografia da emulsão com o composto **4**.

A taxa de incorporação do composto **4** foi em torno de 100 %, analisada por HPLC o tamanho de partícula de 80-100 nm (Figura 18), a polidispersidade das emulsões foi em torno de 0,2 e o potencial zeta em torno de -30 mV. Tais propriedades permaneceram estáveis pelo período de análise de 6 meses.

O tamanho é um fator crítico para qualquer sistema de liberação em nanoescala. As partículas devem ser menores que as fenestrações vasculares (380-

780 nm) para extravasar e atingir os tumores. Porém, partículas maiores que 100 nm sofrem opsonização pelo sistema fagocítico mononuclear (BREWER et al., 2007).

O potencial *zeta* indica a influência da adsorção e dissociação de componentes iônicos e grupos funcionais, respectivamente, na interface com o meio dispersante. Fosfolipídios como a lecitina e poliésteres conferem potencial *zeta* negativo, enquanto que os tensoativos aniônicos conferem potencial *zeta* mais elevados. Isto ocorre porque quanto mais negativo for o potencial *zeta*, mais estável será a formulação, devido às forças repulsivas formadas ao redor da nanopartícula, em relação ao meio dispersante, evitando assim instabilidades como a agregação (SCHAFFAZICK et al., 2003).

O pH das formulações preparadas variou entre 4,7 e 6,0 e não variou durante o período de análise de 6 meses. A acidez titulável das emulsões realizada com solução de NaOH 0,05 M foi em torno de 2% e se manteve durante o período observado sem haver alteração. A acidez da emulsão é causada pela hidrólise dos triglicerídeos, originando ácidos graxos livres. As formulações desenvolvidas neste trabalho apresentam valores de pH dentro da faixa normalmente encontrada para medicamentos de uso endovenoso existentes no mercado, que apresentam pH da formulação entre 4-8. Para volumes pequenos, a variação pode ser maior (SWEETANA e AKERS, 1996).

5.4. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL HEMOLÍTICO DA FORMULAÇÃO CONTENDO O COMPOSTO 4

Para o uso adequado de excipientes em formulações injetáveis, ou formulações para outras vias de administração, é necessário seguir algumas considerações que garantem a eficiência e a não interferência do excipiente na formulação. Desta forma, é possível minimizar a interação do excipiente com o princípio ativo, ou até mesmo o risco de toxicidade para o paciente, como reações alérgicas, intolerância, diminuição no efeito terapêutico, dentre outras. O excipiente ideal é aquele que não oferece nenhum ou quase nenhum tipo de risco ao paciente que faz uso, e não interfere na ação do ativo principal, atuando apenas para melhoria da estabilidade, veiculação, apresentação ou da aparência da formulação.

Dentre os fatores a serem analisados, os estudos de hemólise *in vitro* são de extrema importância para determinar o potencial hemolítico do excipiente e as mudanças que ocorrem nesse potencial quando comparadas diversas concentrações do produto. Quanto menor o potencial hemolítico do excipiente, mais seguro ele será.

Uma vez que a via de administração pretendida para formulação contendo o derivado da curcumina em estudo (4) é a endovenosa, foram realizados testes de hemólise para assegurar que a mesma não apresenta este risco. Para as concentrações utilizadas (700, 350, 175, 87,5 e 43,75 μM do composto 4 na formulação e volumes equivalentes de emulsão controle), o máximo de hemólise observado foi 1% para as concentrações de 350 e 700 μM , demonstrando a segurança da formulação para seguimento de estudos pré-clínicos e clínicos (FDA, 2005).

6 CONCLUSÃO

As etapas de síntese para a obtenção da 1,5-bis(4-oleil-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona (**4**) estão bem estabelecidas, com rota sintética economicamente viável; as reações são simples e os produtos são obtidos com rendimento e grau de pureza elevados.

O método bioanalítico para quantificação do composto **4** em amostras de plasma foi desenvolvido, com valores adequados de precisão, exatidão e linearidade descritos pelos padrões estabelecidos para validação de métodos bioanalíticos.

O desenvolvimento da formulação contendo o composto **4** está bem definido quanto aos excipientes. As propriedades físico-químicas das formulações, quanto ao tamanho e forma das partículas, caracterizam-na como uma nanoemulsão. Os valores de pH, polidispersidade e potencial *zeta* favorecem a estabilidade das formulações durante o armazenamento, que neste caso se mantiveram estáveis pelo período de análise de seis meses. Durante este período, não se observou coalescência das partículas, oxidação dos lipídeos, mudança nas características organolépticas, como odor, cor, presença de precipitados e opacidade.

As propriedades físico-químicas das formulações estudadas são adequadas para administração endovenosa, pois a capacidade de hemólise é de baixa relevância, em torno de 1%, demonstrando a segurança da formulação, que poderá ser empregada em estudos pré-clínicos de farmacocinética e biodistribuição e atividade antitumoral.

REFERÊNCIAS

- ANAND, P., THOMAS, S. G., KUNNUMAKKARA, A. B., SUNDARAM, C., HARIKUMAR, K. B., SUNG, B., THARAKAN, S. T., MISRA, K., PRIYADARSINI, I. K., RAJASEKHARAN, K. N., AGGARWAL, B. B. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. **Biochemistry and Pharmacology**, v.76, p.1590-1611, 2008.
- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 27, de 17 maio de 2012.
- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução RE n. 899*, de 29 maio 2003.
- APPIAH-OPONG, R., COMMANDEUR, J. N. M., VUGT-LUSSENBURG, B., VERMEULEN, N. P. E. Inhibition of human recombinant cytochrome P450s by curcumin and curcumin decomposition products. **Toxicology**, v.235, p.83-91, 2007.
- APPIAH-OPONG, R., ESCH, I., COMMANDEUR, J. N. M., ANDARINI, M., VUGT-LUSSENBURG, B., VERMEULEN, N. P. E. Structure and activity relationships for the inhibition of recombinant human cytochromes P450 by curcumin analogues. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.43, p.1621-1631, 2008.
- BERGINC, K., TRONTELJ, J., BASNET, N., S., KRISTL, A. Physiological barriers to the oral delivery of curcumin. **Pharmazie**, v.67, p.518-524, 2012.
- BREWER, M., ZHANG, T. DONG, W., RUTHERFORD, M., TIAN, Z. R., Future Approaches of Nanomedicine in Clinical Science. **Medical Clinics of North America**, v.91, p.963-1016, 2007.

BRITTAIN, H., G. Validação de métodos não cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**. Edição Brasileira, São Paulo, v.2, p. 4-9, 1998.

CÁRCAMO, E.C. Introduction a la farmacocinética. Washington, D.C., 1982.

CASSIANO, N. M., BARREIRO, J. C., MARTINS, L. R. R., OLIVEIRA, R. V., CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v.32, p.1021-1030, 2009.

CEN, L., HUTZEN, B., BALL, S., DEANGELIS, S., CHEN, S., FUCHS, J., LI, C. New structural analogues of curcumin exhibit potent growth suppressive activity in human colorectal carcinoma cells. **Bio Med Central Cancer**, v.9, 2009.

CHIN M. C, FERREIRA E.I. O processo de latenciação no planejamento de fármacos. **Química Nova**, v.22, p.75-84, 1999.

COLEMAN, M. D. Human Drug Metabolism: An Introduction. Chippenham, UK: John Wiley & Sons, 2010, 360p.

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. Introdução aos Métodos Cromatográficos, 7ª ed. Editora da UNICAMP. Campinas - SP, 1997.

DANDAWATE, PR., VYAS, A., AHMAD, A., BANERJEE, S., DESHPANDE, J., SWAMY, KV., JAMADAR, A., DUMHE-KLAIRE, AC., PADHYE, S., SARKAR, FH. Inclusion Complex of Novel Curcumin Analogue CDF and β -Cyclodextrin (1:2) and Its Enhanced In Vivo Anticancer Activity Against Pancreatic Cancer. **Pharmaceutical. Research**, v.29, p.1775-1786, 2012.

DAS, S., KHAN, W., MOHSIN, S., KUMAR, N. Miltefosine loaded albumin microparticles for treatment of visceral leishmaniasis: formulation development and *in vitro* evaluation. **Special Issue: Research Article**. v.22, p.172-179, 2010.

DU, Z., LIU, R., SHAO, W., MAO, X., MA, L., GU, L., HUANG, Z., CHAN, A. S. C., α -Glucosidase inhibition of natural curcuminoids and curcumin analogs. **European Journal of Medicine Chemistry**, v.41, p.213-218, 2006.

FAIÃO-FLORES, F., PARDI, P. C., SANTOS, R. P., RANDO, D. G., SUÁREZ, J. A. P. Q., MARIA, D. A. Antiproliferative and antimetastatic activity of DM-1, sodium 4-[5-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-oxo-penta-1,4-dienyl]-2-methoxyphenolate, in B16F10 melanoma. **Applied Cancer Research**, v.28, p.72-79, 2008.

FAIÃO-FLORES, F., SUAREZ, J. A. Q., SOTO-CERRATO, V., ESPONA-FIEDLER. M., PÉREZ-TOMÁS R., MARIA, D. A. Bcl-2 family proteins and cytoskeleton changes involved in DM-1 cytotoxic effect on melanoma cells. (2013), **doi:10.1007/s13277-013-0666-6**.

FAIÃO-FLORES, F., SUAREZ, J. A. Q., MARIA-ENGLER. S. S., SOTO-CERRATO, V., PÉREZ-TOMÁS R., MARIA, D. A. The curcumin analog dm-1 induces apoptotic cell death in melanoma. (2013), **doi: 10.1007/s13277-013-0653-y**.

FDA. International Conference on Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology; Availability. *Federal Register*. v. 60. p. 11260-11262, March, 1995.

FUCHS, J., PANDIT, B., BHASIN, D., ETTER, J., REGAN, N., ABDELHAMID, D; LI,C; LIN,J. Structure-activity relationship studies of curcumin analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.19, p.2065-2069, 2009.

GLASER, E., TRAMER, E. Über neue Kondensationsprodukte des Vanillins und des Salicylaldehyds mit Aceton und über den Mechanismus dieser Kondensationen. **Journal Praktische. Chemie**, v.116, p.331-346, 1927.

JANKUN, J., ALEEM.A., MALGORZEWICZ. S., SZKUDLAREK. M., ZAVODSZKY. M., DEWITT D. L., FEIG. M., SELMAN, S.H., SKRZYPCZAK-JANKUN. E. Synthetic curcuminoids modulate the arachidonic acid metabolism of human platelet 12-lipoxygenase and reduce sprout formation of human endothelial cells. **Molecular Cancer Therapy**, v.5, p.1371-1382, 2006.

JOSHI, M. D., MÜLLER, R. H., Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. **European of Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.71, p.161, 2009.

KRISHNAMOORTHY, S; HONN, K.V. **Cancer Metastasis Review**, v.25, p.481, 2006.

LEONARDO, G., MARIA, D. A., SANTOS, R. M., SANTOS, R. P., SANTOS, M. A., SUÁREZ J. A. Q., VALDUGA, C. J., “Análise de metabólitos do sal sódico da 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona após injeção em camundongos”. 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, **Águas de Lindóia, SP**, 2010.

LEONARDO, G. Validação de Método Bioanalítico, Farmacocinética e Biodistribuição do DM1 em Camundongos. Universidade Bandeirante de São Paulo, São Paulo, 2010, 80p [Dissertação Mestrado].

LIANG. G., LI. X., CHEN. L., YANG. S., WU.X., STUDER.E., GURLEY. E., HYLEMON.P.B., YE. F., LI.Y., HUIPING. Z. Synthesis and anti-inflammatory activities of mono-carbonyl analogues of curcumin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**.v.18, p.1525–1529, 2008.

LIANG, G., SHAO, L., WANG, Y., ZHAO, C., CHU, Y., XIAO, J., Exploration and synthesis of curcumin analogues with improved structural stability both in vitro and in vivo as cytotoxic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.17, p.2623-2631, 2009.

- 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**. v.26, p.603- 609, 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.
- LUNDBERG, B., The solubilization of lipophilic derivatives of podophyllotoxins in sub-micron sized lipid emulsions and their cytotoxic activity against cancer cells in culture. **International Journal of Pharmaceutics**, v.109, p.73-81, 1994.
- MAITI, K., MUKHERJEE, K., GANTAIT, A., SAHA, B., MUKHERJEE, K., Curcumin–phospholipid complex: Preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v.330, p.155-163, 2007.
- MASUDA, T., JITO, A., ISOBE, J., NAKATANI, N., YONEMORI, S. Anti-oxidative and Anti-Inflammatory curcumin-related phenolics from rhizomes of *curcuma domestica*. **Phytochemistry**, v.32, p.1557-1560, 1993.
- MICHEL, D., CHITANDA, JM., BALOGH, R., YANG, P., SINGH, J., DAS, U., EL-ANEED, A., DIMMOCK, J., VERRALL, R., BADEA, I. Design and evaluation of cyclodextrin-based delivery systems to incorporate poorly soluble curcumin analogs for the treatment of melanoma. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.81, p.548-556, 2012.
- MISHRA,S.; KARMODIYA,K.; SUROLIA,K ; SUROLIA, A. Synthesis and exploration of novel curcumin analogues as anti-malarial agents . **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.16, p.2894-2902, 2008.

MUKERJEE, A., VISHWANATHA, J., Formulation, Characterization and Evaluation of Curcumin-loaded PLGA Nanospheres for Cancer Therapy, **Anticancer Research**, v.29, p.3867-3876, 2009.

OECD 423/2001 - Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento da Comunidade Econômica Européia.

RANG, H.P, DALE, M.M., RITTER, J.M. Farmacologia 3 ed., Rio de Janeiro, Guanabara, 2012.

ROMEIRO, J. G. **Avaliação da Ação Epigenética e da Citotoxicidade de um Derivado da Curcumina Veiculado em uma Nanoemulsão Lipídica em Linhagens Tumoriais**. Universidade Bandeirante de São Paulo, São Paulo, 2011, [Dissertação de Mestrado].

RÖSSNER, S., VESSBY, B., Fat emulsions with added free cholesterol or fatty acid cholesteryl esters. Studies on removal mechanisms in vivo and hydrolysis by lipoprotein lipase in vitro. **Nutrition Metabolism**, v.21, p.349-357, 1977.

SCHAFFAZICK, S. R. ET AL., Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para a administração de fármacos, **Química Nova**, v.26, p.726, 2003.

SHAH, V., MIDHA, K., DIGHE, S., MCGILVERAY, I., SKELLY, J., YACOBI, A., LAYLOFF, T., VISWANATHAN, C., COOK, C., MCDOWALL, R., PITTMAN, K., SPECTOR, S. Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies. **Pharmaceutical Research**, v. 9, p.588, 1992.

SHAHANI, K., SWAMINATHAN, S. K., FREEMAN, D., BLUM, A., MA, L., PANYAM, J., Injectable Sustained Release Microparticles of Curcumin: A New Concept for Cancer Chemoprevention, **Cancer Research**, v.70, p.4443-4452, 2010.

- SIMONI, D., RIZZI, M., RONDANIN, R., BARUCHELLO, R., MARCHETTI, P., INVIDIATA, F. P., LABBOZZETTA, M., POMA, P., CARINA, V., NOTARBARTOLO, M., ALAIMO, A., D'ALESSANDRO, N., Antitumor effects of curcumin and structurally β -diketone modified analogs on multidrug resistant cancer cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.18, p.845-849, 2008.
- SOU, K., INENAGA, S., TAKEOKA, S., TSUCHIDA, E., Loading of curcumin into macrophages using lipid-based nanoparticles. **International Journal Pharmaceutics**, v.352, p.287-293, 2008.
- STEGLICH, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids B. Neises. **Angewandte Chemie International Edition**, v.17, p.522-524, 1978.
- STRICKLEY, R. G. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. **Pharmaceutical Research**, v.21, p.201-230, 2004.
- SUÁREZ, J. A. P. Q., PESEKE, K., KORDIAN, M., CARVALHO, J. E., KOHN, L. K. ANTONIO, M. A., BRUNHARI, H., 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, J. A. Q., MARIA, D. A., RANDO, D. G., JASULIONIS, M. G., SANTOS, M. R. M., SANTOS, R. P., PARDI, P. C., VALDUGA, C. J. Compostos derivados de 4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído, processo de obtenção, composição farmacêutica, uso de um ou mais compostos. PI0803375-7, 2008.
- SUÁREZ, J. A. Q., Propriedades antitumorais da 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil) penta-1,4-dien-3-ona e seus derivados. PI 0602640-0, 2006.

SWEETANA, S., AKERS, M J. Solubility principles and practices for parental dosage development. PDA. **Journal of Pharmaceutical Science & Technology**, v.50, p.330-342, 1996.

UNG,V;FOSHAUG,R; MACFARLANE,S; CHURCHILL,B; DOYLE,T; SYDORA ,B. Oral Administration of Curcumin Emulsified in Carboxymethyl Cellulose Has a Potent Anti-inflammatory Effect in the IL-10 Gene-Deficient Mouse Model of IBD Digestive Diseases and Sciences, 2009.

VALDUGA, C. J., LEONARDO, G., MARIA, D. A., SANTOS, R. P., SANTOS, R. M., SANTOS, M. A., SUÁREZ J. A. Q., "Pharmacokinetic and biodistribution in mice of sodium 4-[5-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-oxo-penta-1,4-dienyl]-2-methoxy-phenolate, a curcumin derivative" - AACR 101st Annual Meeting 2010, Washington, Estados Unidos. **Proceedings of the American Association of Cancer Research**, 2010.

VALDUGA, C. J., SANTOS, M. A.,GONCALVES, I. D., PARDI, P. C., MARQUES, A. S., GUERRIERI, B. C., ROCHA, O. V., MENDES, W. K., SUÁREZ J. A. Q. In vitro and in vivo antitumor studies of a lipophilic curcumin derivative loaded lipid-based nanoemulsion. In: 102nd AACR Annual Meeting 2011, Orlando. **Proceedings of the American Association for Cancer Research**, 2011.

YANG, K., LIN, L., TSENG, T., WANG, S., TSAI, T., Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC–MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v.853, p.183-189, 2007.

WALKER,B.D; KOWALSKI, M; GOH, W.C;KOZARSKY, K;KRIEGER, C;ROSEN,L. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.84, p. 8120-8124, 1987.

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

WIDMER, F., WRIGHT L.C., OBANDO, D, HANDKE, R., GANENDREN, R., ELLIS, D.H., SORRELL, T.C. Hexadecylphosphocholine (miltefosine) has broad-spectrum fungicidal activity and is efficacious in a mouse model of cryptococcosis. **American Society for Microbiology**, v.50, p. 414-421, 2006.

WILKINSON, G. R. Pharmacokinetics: the dynamics of drug absorption, distribution, and elimination. In: Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 10^a ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 3-29.