



**FURG**

**Dissertação de Mestrado**

**Efeitos de Curcuminóides Modificados nas  
Propriedades Físico-Químicas de Membranas:  
Correlação com sua Atividade Antioxidante e  
Antitumoral**

---

**Amanda Vicente Marques**

**PPGQTA**

**Rio Grande, RS - Brasil**

**2015**

**Efeitos de Curcuminóides Modificados nas  
Propriedades Físico-Químicas de Membranas:  
Correlação com sua Atividade Antioxidante e  
Antitumoral**

**por**

**Amanda Vicente Marques**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande (RS), como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA.

PPGQTA

Rio Grande, RS – Brasil

2015

Universidade Federal do Rio Grande  
Escola de Química e Alimentos  
Programa de Pós-Graduação em Química  
Tecnológica e Ambiental

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Dissertação de Mestrado

**Efeitos de Curcuminóides Modificados nas  
Propriedades Físico-Químicas de Membranas:  
Correlação com sua Atividade Antioxidante e  
Antitumoral**

elaborada por

**Amanda Vicente Marques**

Como requisito parcial para a obtenção do título de  
**Mestre em Química**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof. Dra. Vânia Rodrigues de Lima (FURG - RS)

---

Prof. Dra. Darlene Correia Flores (FURG - RS)

---

Prof. Dr. Alex Fabiani Claro Flores (FURG - RS)

---

Prof. Dr. Alexandre Luis Parize (UFSC – SC)

Rio Grande, 29 de maio de 2015.

## Agradecimentos

À Deus, pela minha vida, por nunca ter me desamparado e pela força nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora, Vânia Rodrigues de Lima, pela oportunidade que me foi dada em um momento importante, por acreditar no meu trabalho, pela confiança e por todo o suporte e ensinamentos a mim concedidos. Por não ter hora e não medir esforços para fazer de mim uma aluna melhor, desde a graduação. Muito obrigada!

Aos meus pais, irmão e madrinha pelo incentivo.

Ao meu namorado e amigo, Giovani, pelo carinho e apoio nas horas de dificuldade, sempre me motivando, ouvindo e dando força pra seguir em frente.

Aos meus amigos, dos de infância até aqueles cultivados no mestrado, pela parceria, por entender minhas ausências e por me ajudar a relaxar nos momentos necessários.

Ao grupo de pesquisa GIIMM, por ter me acolhido tão bem, dando suporte quando necessário, me ajudando na pesquisa e em diversos procedimentos. Em especial à doutoranda Carla, por ter deixado sua família para me ajudar quando mais precisei.

À minha co-orientadora, Darlene Flores, por ter confiado a mim uma parte de seu trabalho, por ser motivada e dedicada, fazendo com que aumentasse ainda mais a minha vontade de trabalhar e obter bons resultados.

Aos professores membros da banca avaliadora, por aceitar contribuir com o meu trabalho.

Aos professores Daniela Bianchini (UFPEL) pelos ensaios de DSC e Ana Paula Horn (FURG) juntamente de sua aluna de doutorado, Elita Silveira pelos ensaios biológicos.

À Universidade Federal do Rio Grande e à Escola de Química e Alimentos pelo espaço cedido para que fosse possível a realização deste trabalho.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPERGS pelo apoio financeiro.

## Sumário

<b><i>Lista de Figuras</i></b> .....	<b>7</b>
<b><i>Lista de Tabelas</i></b> .....	<b>10</b>
<b><i>Lista de Abreviaturas</i></b> .....	<b>11</b>
<b><i>Resumo</i></b> .....	<b>12</b>
<b><i>Abstract</i></b> .....	<b>14</b>
<b>1. <i>Introdução</i></b> .....	<b>15</b>
<b>2. <i>Referencial Teórico</i></b> .....	<b>18</b>
2.1 <b>Curcumina</b> .....	<b>18</b>
2.2 <b>Curcuminóides Modificados</b> .....	<b>19</b>
2.3 <b>Lipossomos</b> .....	<b>22</b>
2.3.1 <b>Classificação dos Lipossomos</b> .....	<b>25</b>
<b>2.1.1 <i>Aplicações dos Lipossomos como Carreadores de Fármacos</i></b> ....	<b>25</b>
2.4 <b>Técnicas de Caracterização da Dinâmica Molecular de Membranas</b> .....	<b>26</b>
2.4.1 <b>Espectrofotometria de UV- Vis em Membranas</b> .....	<b>26</b>
2.4.2 <b>Calorimetria de Varredura Diferencial</b> .....	<b>27</b>
2.4.3 <b>Infravermelho com Transformada de Fourier</b> .....	<b>28</b>
2.4.4 <b>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear</b> .....	<b>31</b>
<b>3. <i>Objetivos</i></b> .....	<b>32</b>
3.1 <b>Objetivo Geral</b> .....	<b>32</b>
3.2 <b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>32</b>
<b>4. <i>Material e Métodos</i></b> .....	<b>34</b>
4.1 <b>Equipamentos, Materiais e Reagentes</b> .....	<b>34</b>
4.2 <b>Métodos</b> .....	<b>34</b>
4.2.1 <b>Síntese dos Curcuminóides Modificados</b> .....	<b>34</b>
4.2.2 <b>Preparação de Lipossomos</b> .....	<b>35</b>
4.2.3 <b>Ensaio Antioxidante</b> .....	<b>36</b>
4.2.4 <b>Ensaio Antitumorais</b> .....	<b>37</b>
4.2.5 <b>Técnica de FTIR</b> .....	<b>38</b>
4.2.6 <b>Técnica de RMN</b> .....	<b>39</b>
4.2.7 <b>Técnica de DSC</b> .....	<b>39</b>
4.2.8 <b>Técnica de UV- vis</b> .....	<b>39</b>
<b>5. <i>Resultados</i></b> .....	<b>41</b>
5.1 <b><i>Atividade Antioxidante</i></b> .....	<b>41</b>
5.2 <b><i>Atividade Antitumoral por Ensaio de Viabilidade Celular</i></b> .....	<b>43</b>
5.3 <b>Efeito dos Curcuminóides Modificados na Dinâmica Molecular de Lipossomos</b> .....	<b>45</b>

<b>5.3.1</b>	<b>Curcuminóide Modificado PPQ</b> .....	<b>45</b>
5.3.1.2	Interação do curcuminóide modificado PPQ com a Região Polar de Lipossomos de ASO .....	47
5.3.1.3	Interação do Curcuminóide Modificado PPQ com os Metilenos da Cadeia Acil de Lipossomos de ASO .....	49
<b>5.3.2</b>	<b>Curcuminóide Modificado CD2</b> .....	<b>52</b>
5.3.2.1	Efeitos do Curcuminóide Modificado CD2 na Dinâmica Lipídica de Lipossomos.....	52
5.3.2.2	Interação do Curcuminóide Modificado CD2 com a Região Polar de Lipossomos de ASO .....	53
5.3.2.3	Interação do curcuminóide modificado CD2 com os Metilenos da Cadeia Acil de Lipossomos de ASO .....	55
5.3.2.4	Ensaio de Turbidez .....	56
<b>5.3.3</b>	<b>Curcuminóide Modificado CD3</b> .....	<b>57</b>
5.3.3.1	Efeitos do Análogo CD3 na Dinâmica Lipídica de Lipossomos .	57
5.3.3.2	Interação do Curcuminóide Modificado CD3 com a Região Polar de Lipossomos de ASO .....	59
5.3.3.4	Interação do Curcuminóide Modificado CD3 com os Metilenos da Cadeia Acil de Lipossomos de ASO .....	60
5.3.3.5	Ensaio de Turbidez .....	61
<b>5.4</b>	<b>Ensaio de RMN</b> .....	<b>62</b>
<b>6.</b>	<b>Discussão</b> .....	<b>64</b>
<b>7.</b>	<b>Conclusões</b> .....	<b>68</b>
<b>8.</b>	<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>70</b>

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> – Estrutura da curcumina.....	15
<b>Figura 2</b> – Estrutura da demetoxicurcumina (DMC), presente na <i>Curcuma Longa</i> .....	15
<b>Figura 3</b> – Exemplo de curcuminóide modificado com porção 3 - oxo- 1,4 pentadieno.....	16
<b>Figura 4</b> – Estrutura da bis-demetoxicurcumina (BDMC), presente na <i>Curcuma Longa</i> .....	18
<b>Figura 5</b> – Estrutura da diidrocurmina e tetraidrocurcumina.....	19
<b>Figura 6</b> – Possibilidades de modificações na curcumina e exemplos de curcuminóides modificados.....	20
<b>Figura 7</b> – Exemplos de curcuminóides modificados sintetizados na FURG.....	21
<b>Figura 8</b> – Esquema de corte transversal de um lipossomo.....	22
<b>Figura 9</b> – 1- Estrutura da fosfatidilcolina (FC). 2-Esquema geral de fosfolípidios.....	23
<b>Figura 10</b> – Estrutura geral da fosfatidilcolina (FC), onde R representa cadeias hidrocarboneto com 16 a 22 carbonos.....	23
<b>Figura 11</b> – Esquema ilustrativo de corte transversal de um lipossomo que pode conter substância hidrofílica na cavidade aquosa interna e hidrofóbica na bicamada lipídica.....	24
<b>Figura 12</b> – Representação dos lipossomos de acordo com o tamanho e número de lamelas.....	25
<b>Figura 13</b> – Esquema demonstrativo da alteração na turbidez.....	27
<b>Figura 14</b> – Esquema de HATR-FTIR.....	28
<b>Figura 15</b> – Gráfico relacionando tempo de relaxação (T1) e tempo de correlação ( $\tau_c$ ).....	31
<b>Figura 16</b> – Curcuminóides modificados estudados neste trabalho.....	32
<b>Figura 17</b> – Método de preparação de MLVs pelo método de hidratação de vesículas na presença ou na ausência de curcuminóides modificados.....	35

<b>Figura 18</b> –Reação de redução do radical DPPH a difenil-picril-hidrazina.....	36
<b>Figura 19</b> – Propriedades antioxidantes dos três curcuminóides modificados na forma livre, estudadas por ensaio de DPPH.....	41
<b>Figura 20</b> – Teste de DPPH em diferentes concentrações de PPQ.....	42
<b>Figura 21</b> – Resultados de viabilidade celular, referentes à ação dos curcuminóides modificados na sua forma livre e incorporada em lipossomos.....	44
<b>Figura 22</b> – Estrutura do curcuminóide modificado PPQ, ou (3E, 5E)- 3,5 dibenzilideno piperidin-4- ona.....	45
<b>Figura 23</b> – Espectros de HATR-FTIR de lipossomos de ASO puro e na presença de PPQ na razão curcuminóide modificado: ASO de 0,05.....	46
<b>Figura 24</b> – Ampliação dos espectros de HATR-FTIR de fosfatidilcolina presente em lipossomos de ASO puros (linha cheia) e na presença de PPQ (linha tracejada) na região do estiramento assimétrico do grupo colina, $\nu_{as} N^+(CH_3)_3$ .....	47
<b>Figura 25</b> – Ampliação dos espectros de HATR-FTIR de FC presente em lipossomos de ASO puros (linha cheia) e na presença de PPQ (linha tracejada) na região do estiramento assimétrico do grupo fosfato, $\nu_{as} PO_2^-$ .....	48
<b>Figura 26</b> – Ampliação dos espectros de HATR-FTIR (frequência x absorbância) de FC presente em lipossomos de ASO puros e na presença de PPQ na região do estiramento assimétrico dos grupos metilenos, $\nu_s CH_2$ e $\nu_{as} CH_2$ .....	49
<b>Figura 27</b> – Curvas de DSC para lipossomos de ASO puro e na presença dos curcuminóides modificados estudados neste trabalho.....	50
<b>Figura 28</b> – Esquema demonstrativo dos valores de variação de frequência para os estiramentos axiais dos grupos fosfato e metilenos da cadeia hidrofóbica do lipídio, bem como a sua variação de $\Delta H$ , induzidos pela interação com PPQ.....	51
<b>Figura 29</b> – Estrutura do CD2, ou (3E, 5E)- 3,5- dibenzilideno-1- metilpiperidin-4- ona.....	52
<b>Figura 30</b> – Espectros de HATR-FTIR de lipossomos de ASO puro (linha cheia) e na presença de CD2 na razão curcuminóide: ASO de 0,05.....	53
<b>Figura 31</b> – Ampliação dos espectros de HATR-FTIR de FC presente em lipossomos de ASO puros (linha cheia) e na presença CD2 (linha tracejada) na região do estiramento assimétrico do grupo colina.....	54



- Figura 32**– Ampliação dos espectros de HATR-FTIR de FC presente em lipossomos de ASO puros (linha cheia) e na presença CD2 (linha tracejada) na região do estiramento assimétrico do grupo fosfato.....54
- Figura 33**– Ampliação dos espectros de HATR-FTIR de FC presente em lipossomos de ASO puros (linha cheia) e na presença CD2 (linha tracejada) na região do estiramento assimétrico dos grupos metilenos.....55
- Figura 34**– Esquema demonstrativo dos valores de variação de frequência para os estiramentos axiais dos grupos fosfato e metilenos da cadeia hidrofóbica do lipídio, bem como a sua variação de  $\Delta H$ , induzidos pela interação com CD2.....57
- Figura 35**– Estrutura do curcuminóide modificado CD3. (2E, 6E)- 2,6-dibenzilideno cicloexanona.....57
- Figura 36**– Espectros de HATR-FTIR de FC em lipossomos de ASO puro (linha cheia) e na presença de CD3 (linha tracejada), na razão curcuminóide: ASO de 0,05.....58
- Figura 37**– Ampliação dos espectros de HATR-FTIR de FC presente em lipossomos de ASO puro (linha cheia) e na presença CD3 (linha tracejada) na região do estiramento assimétrico do grupo colina.....59
- Figura 38**– Ampliação dos espectros de HATR-FTIR de FC presente em lipossomos de ASO puro (linha cheia) e na presença CD3 (linha tracejada) na região do estiramento assimétrico do grupo fosfato.....59
- Figura 39**– Ampliação dos espectros de HATR-FTIR de FC presente em lipossomos de ASO puro (linha cheia) e na presença CD3 (linha tracejada) na região do estiramento assimétrico dos grupos metilenos lipídicos.....60
- Figura 40**– Esquema demonstrativo dos valores de variação de frequência para os estiramentos axiais dos grupos fosfato, carbonila e metilenos da cadeia hidrofóbica do CD3.....61
- Figura 41**– Curvas referentes à relaxação longitudinal ( $T_1$ ) dos hidrogênios da colina em lipossomos de ASO puro e na presença de cada curcuminóide modificado estudados neste trabalho.....63
- Figura 42** - Estruturas com substituições halogenadas avaliadas em células cancerosas do tipo B16 e L1210 (melanoma e linfoma).....65

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b> – Valores de frequência para picos de HATR-FTIR específicos de FC.....	29
<b>Tabela 2</b> – Efeitos dos curcuminóides modificados na forma livre e incorporada em lipossomos na viabilidade celular .....	43
<b>Tabela 3</b> – Valores de frequência encontrados no espectro de HATR-FTIR para picos específicos de FC na ausência e presença do curcuminóide modificado PPQ .....	46
<b>Tabela 4</b> – Influência do curcuminóide modificado PPQ nos valores de variação de entalpia ( $\Delta H$ ) de lipossomos de Asolecitina de Soja (ASO).....	50
<b>Tabela 5</b> – Valores de frequência encontrados no espectro de HATR-FTIR para picos específicos de FC na ausência e presença dos curcuminóides modificados CD2.....	53
<b>Tabela 6</b> – Influência do curcuminóide modificado CD2 nos valores de variação de entalpia ( $\Delta H$ ) de lipossomos de Asolecitina de Soja (ASO).....	56
<b>Tabela 7</b> – Valores de frequência encontrados no espectro de HATR-FTIR para picos específicos de FC na ausência e presença dos curcuminóides modificados CD3.....	58
<b>Tabela 8</b> – Influência do curcuminóide modificado CD3 nos valores de variação de entalpia ( $\Delta H$ ) de lipossomos de Asolecitina de Soja (ASO).....	61
<b>Tabela 9</b> – Valores de $T_1$ de $^1H$ da colina para lipossomos puros e na presença de cada curcuminóide modificado .....	62

## Lista de Abreviaturas

**AA** – atividade antioxidante

**ASO** – asolecitina de soja

**BDMC** – bis-demetoxicurcumina

**DMC** – demetoxicurcumina

**DMEM** – meio Eagle modificado por Dulbecco

**DSC** – calorimetria de varredura diferencial

**ERNS** – espécies reativas de nitrogênio

**EROs**– espécies reativas de oxigênio

**FBS** – soro fetal bovino

**FTIR** – espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

**HATR-FTIR** – espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada horizontal

**INCA** – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva/ Ministério da Saúde

**LUV** – vesículas unilamelares grandes

**MLV** – vesículas multilamelares grandes

**MTT**– 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio

**RL** – radicais livres

**RMN** – espectroscopia de ressonância magnética nuclear

**SUV**– vesículas unilamelares pequenas

**T<sub>1</sub>** – tempo de relaxação longitudinal

**T<sub>m</sub>** – temperatura de transição de fase

**UV-Vis** – espectrofotometria de ultravioleta visível

**ΔH** – variação de entalpia

**v<sub>as</sub>** – estiramento axial assimétrico

**v<sub>s</sub>** – estiramento axial simétrico

## Resumo

**Título:** Efeitos de Curcuminóides Modificados nas Propriedades Físico-Químicas de Membranas: Correlação com sua Atividade Antioxidante e Antitumoral

**Autora:** Amanda Vicente Marques

**Orientadora:** Profa. Dra. Vânia Rodrigues de Lima

**Co-orientadora:** Prof. Dra. Darlene Correia Flores

O estudo das interações dos curcuminóides modificados com membranas biológicas é importante para compreender e viabilizar estas substâncias como candidatos a fármacos, ao se buscar informações sobre seu modo de ação bem como os efeitos de sua incorporação em sistemas carreadores lipídicos.

Este trabalho apresenta três diferentes curcuminóides modificados (PPQ, CD2 e CD3) que foram estudados quanto às suas atividades biológicas assim como quanto às suas interações com membranas lipossomais. Suas interações com lipossomos de asolecitina de soja (ASO) foram caracterizadas através de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, ressonância magnética nuclear, calorimetria de varredura diferencial e espectrofotometria de ultravioleta visível.

A atividade antioxidante foi avaliada pelo teste de sequestro de radical ater DPPH, e os três curcuminóides modificados apresentaram caráter antioxidante.

A atividade antitumoral foi monitorada via testes de viabilidade celular (MTT) em linhagens de glioma de rato (C6). A incorporação dos curcuminóides modificados em lipossomos reduziu em 35 % (PPQ), 23% (CD2) e 2% (CD3) a viabilidade celular de C6, quando comparado aos curcuminóides modificados livres. Assim, os curcuminóides modificados incorporados em lipossomos de ASO foram mais eficientes do que os na forma livre, no que diz respeito à sua atividade antitumoral.

A investigação dos efeitos dos três curcuminóides modificados na dinâmica molecular de regiões específicas dos lipossomos de ASO, a partir das

técnicas instrumentais utilizadas, indicou que as três substâncias provocam o ordenamento da membrana, na seguinte ordem PPQ>CD2>CD3. Tal ordenamento pode influenciar as respostas observadas nos testes biológicos, visto que uma membrana mais ordenada dificulta a difusão de uma espécie reativa, e que uma célula tumoral costuma apresentar maior fluidez de membrana em relação a uma célula saudável.

**PALAVRAS-CHAVE:** curcuminóides modificados, lipossomos, câncer, FTIR, DSC, UV-Vis.

## Abstract

**Title:** Effects of modified curcuminoids in membranes physico-chemical properties correlated to their antioxidant and antitumoral activities.

**Author:** Amanda Vicente Marques

**Supervisors:** Prof. Dr. Vânia Rodrigues de Lima and Prof. Dr. Darlene Correia Flores

The study of interactions between modified curcuminoids and biological membranes is important to enable these substances as pharmacological drug candidates, as well as to understand their mechanism of action and effects when encapsulated in a lipid carrier, as the liposomes.

In this work, the antioxidant and antitumoral activities of three modified curcuminoids (PPQ, CD2 e CD3) were tested. Furthermore, their interactions with liposomes containing soy asolectin were monitored by Fourier-transform infrared, nuclear magnetic resonance, differential scanning calorimetry and ultraviolet-visible spectroscopy.

The antioxidant activity was evaluated by the scavenging of DPPH radical. The antioxidant activity was detected as 97%, 31% and 9% to free PPQ, CD2 and CD3, respectively.

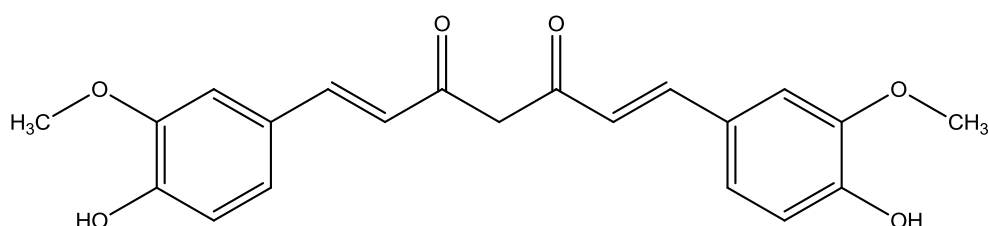
The antitumoral activity was evaluated to free and liposome-loaded modified curcuminoids, through MTT assays on rat glioma cell lines (C6). The liposome-loaded modified curcuminoids showed better antitumoral activity reducing the cellular viability in 87% (PPQ), 45% (CD2) and 5% (CD3) when compared to the free ones.

Characterization of the interaction between modified curcuminoids and ASO liposomes showed that all the active substances ordered the membrane, following the order PPQ > CD2 > CD3. This ordering effect may influence biological responses, since it may difficult reactive species diffusion, and prevent the tumoral cells lipid fluidity.

**KEYWORDS:** modified curcuminoids, liposomes, cancer, FTIR, DSC, UV-Vis.

## 1. Introdução

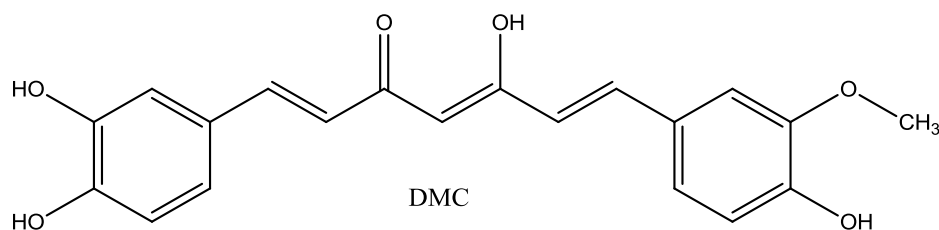
A *Curcuma longa*, conhecida popularmente como açafrão da terra ou gengibre amarelo, é uma planta cultivada em regiões tropicais no sudoeste da Ásia. Seu rizoma, ou raiz, é a parte mais útil da planta para fins culinários e medicinais. É constituído de aproximadamente 77% de curcumina (Figura 1), um polifenol natural que, há séculos, vem sendo utilizado na medicina indígena para tratamento de doenças inflamatórias (Shishodia & Aggarwal, 2005; Maheshwari *et al.*, 2006).



**Figura 1-** Estrutura da curcumina. Adaptado de Padhye (2010).

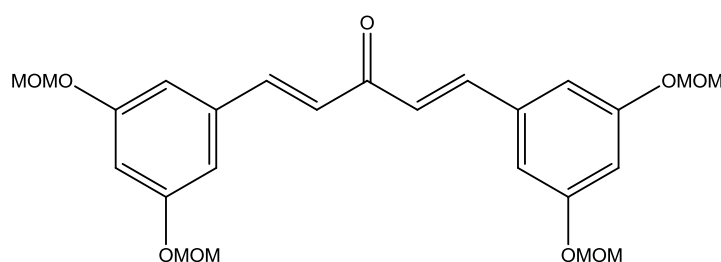
A curcumina é capaz de prevenir e tratar diversos tipos de câncer. Porém, o potencial anticâncer da curcumina é severamente afetado por sua baixa disponibilidade no tecido alvo e rápida metabolização (Padhye S. *et al.*, 2010; Bairwa *et al.*, 2014).

A *Curcuma longa* também apresenta em sua composição os curcuminóides, que são seus metabólitos farmacologicamente ativos. Um exemplo é a demetoxicurcumina (DMC), mostrada na Figura 2.



**Figura 2-** Estrutura da demetoxicurcumina (DMC), presente na *Curcuma Longa*. Adaptado de Bairwa, 2014.

Na última década, tem sido observado um aumento expressivo na obtenção de substâncias análogas estruturalmente à curcumina e aos curcuminóides, bem como na publicação de estudos de sua relação estrutura-atividade. Tais estruturas denominam-se curcuminóides modificados. Os estudos visam à obtenção de curcuminóides modificados, que apresentem estruturas relacionadas a efeitos terapêuticos iguais ou melhores que a curcumina (Bairwa *et al.*, 2014). Um exemplo de curcuminóide modificado encontra-se na Figura 3.



**Figura 3**– Exemplo de curcuminóide modificado com porção 3 - oxo- 1,4 pentadieno. *Adaptado de Yamakoshi, 2010.*

Alguns curcuminóides modificados possuem um caráter estrutural essencial para a toxicidade de células tumorais, onde se destaca a região 3 - oxo- 1,4 pentadieno. Essa porção possui a capacidade de interagir com grupos amino ou hidroxil encontrados em ácidos nucleicos (controladores da atividade celular), frente às cetonas conjugadas presentes na curcumina, que têm pouca ou nenhuma capacidade de interagir (Figura 1) (Yamakoshi *et al.*, 2010; Das *et al.*, 2009). Além disso, estudos com curcuminóides modificados de diferentes estruturas revelam que, quando um grupo amino está presente nessas substâncias, as concentrações utilizadas em estudos de viabilidade celular se tornam menores. Isto indica um aumento da eficiência contra células malignas (Padhye, 2010).

As propriedades antitumorais de uma substância ativa podem estar associadas a um potencial antioxidante, visto que o câncer é associado ao estresse oxidativo (Castelli *et al.*, 1997). Os curcuminóides modificados podem conter em sua estrutura grupos redutores, de caráter antioxidante, como o amino. Assim, torna-se importante a investigação das propriedades



antioxidantes de curcuminóides modificados, juntamente às suas propriedades anti-câncer.

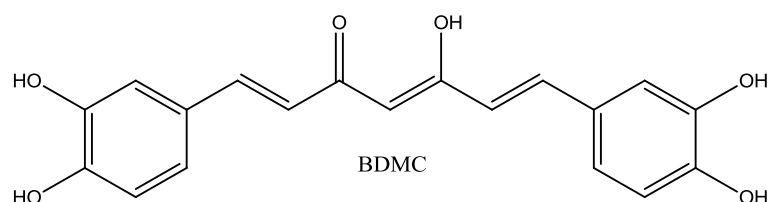
No que diz respeito aos tratamentos convencionais do câncer (radioterapia e quimioterapia), estes utilizam fármacos que possuem como alvo o ciclo celular, atingindo células que se dividem rapidamente. Pelo fato de focalizarem o ciclo, também são atingidas células saudáveis, causando efeitos colaterais (Lopez-Lazaro, 2002). Uma proposta para a redução dos efeitos colaterais é o encapsulamento dos fármacos em carreadores lipídicos, como os lipossomos. As membranas lipossomais permitem o direcionamento e a liberação gradual do fármaco, acarretando em menor toxicidade ao paciente, além de uma maior disponibilidade da substância ativa. Nesse contexto, o estudo das interações de substâncias ativas, tais como os curcuminóides modificados, com membranas biológicas, permite a compreensão dos seus mecanismos de ação antitumoral e antioxidante, bem como a investigação dos materiais adequados para o desenvolvimento de sistema de liberação prolongada de fármacos.

A partir destas informações, ressalta-se a importância da descoberta de novos fármacos de propriedades antitumorais e antioxidantes, bem como o estudo de suas interações com sistemas membranares, devido aos índices atuais de câncer. Estimativas mundiais do projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (Iarc / International Agency for Research on Cancer), da Organização Mundial da Saúde (OMS), indicam que houveram 14,1 milhões de novos casos e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em 2012. Os índices da doença continuarão aumentando nos países em desenvolvimento e crescerá ainda mais em países desenvolvidos se medidas preventivas não forem amplamente aplicadas. Estima-se que em 2030, o índice global será de 21,4 milhões de casos novos e 13,2 milhões de mortes por câncer (INCA, 2012).

## 2. Referencial Teórico

### 2.1 Curcumina

A *Curcuma longa* (cúrcuma, família das Zingiberaceae) há séculos tem sido amplamente utilizada na medicina hindu, para o tratamento de uma variedade de doenças. Estas propriedades medicinais são atribuídas à curcumina, (difluoroilmetano)-(1,7-bis (4-hidroxi- 3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona), presente em 77% na *Curcuma longa* (Figura 1), e aos principais curcuminóides, demetoxicurcumina (DMC, Figura 2), presente em 17% e bis-demetoxicurcumina (BDMC), presente em 3% (Figura 4) (Maheshwari, 2005; Bairwa, 2014). Estas substâncias estão presentes no rizoma da planta.



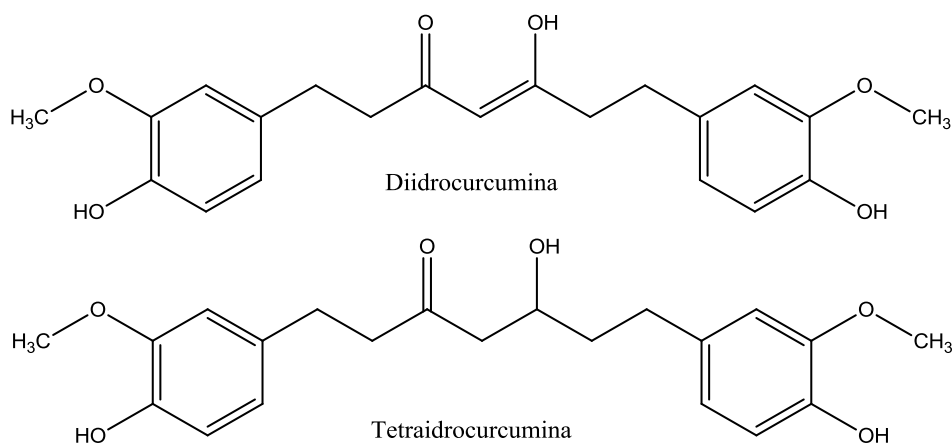
**Figura 4-** Estrutura da bis-demetoxicurcumina (BDMC), presente na *Curcuma Longa*. Adaptado de Bairwa, 2014.

Diversos trabalhos foram publicados relatando a potencialidade farmacológica da curcumina para uma ampla gama de atividades, tais como: anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, cardiovascular e anti-carcinogênica (Satoskar *et al.*, 1986; Kuttan *et al.*, 1986; Sidhu *et al.*, 1998; Negi *et al.*, 1999).

Quanto à sua atividade anticâncer, a curcumina inibiu a proliferação de uma variedade de células tumorais, tais como as de cólon, mama, pele e leucêmicas. A curcumina apresentou capacidade de bloquear a iniciação e promoção dos tumores, além dos processos de angiogênese e metástase (Shishodia *et al.*, 2005).

Apesar de sua considerável atividade biológica, a curcumina possui baixa absorção no intestino. Em pesquisas anteriores (Holder *et al.*, 1978), após ser administrada em ratos por via oral, cerca de 75% foi excretado nas fezes e traços foram detectados na urina. Quando a dosagem foi ministrada por

via intraperitoneal, a curcumina também foi excretada nas fezes e somente cerca de 11% foi encontrado na bile dos roedores. Isto sugeriu que a curcumina possui diferentes metabolitos, sendo transformada em diidrocurcumina e tetraidrocurcumina (Figura 5). Estes ainda podem ser convertidos no organismo a outros produtos.



**Figura 5-** Estrutura da diidrocurmina e tetraidrocurcumina. *Adaptado de Shishodia, 2005.*

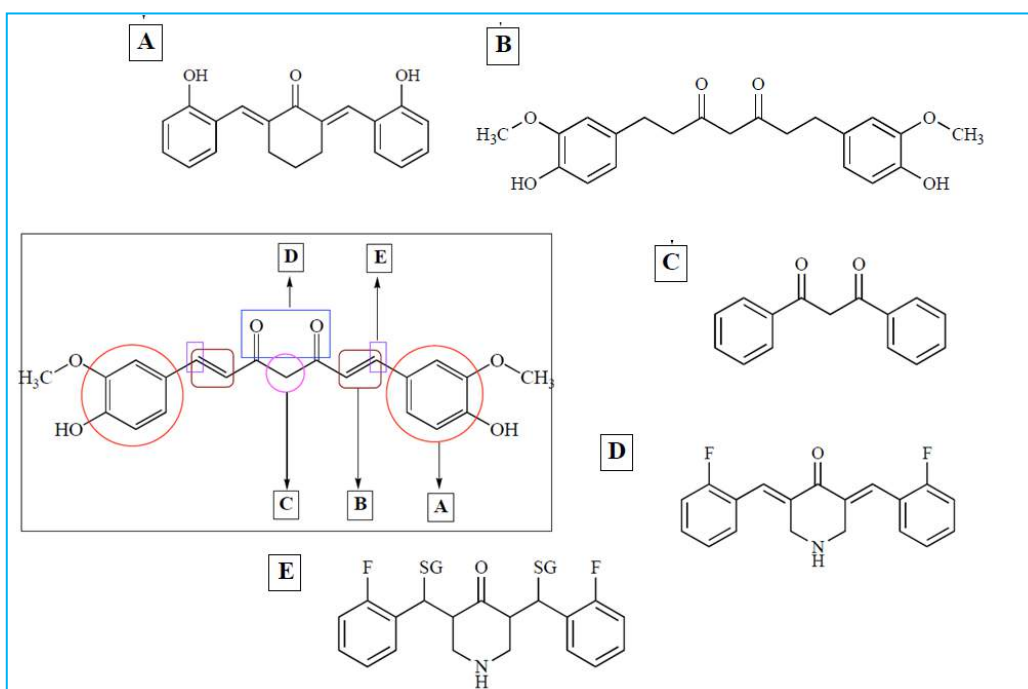
Adicionalmente, a curcumina é pouco solúvel em água ( $\approx 20 \mu\text{g/L}$ , pH 7) e pode sofrer hidrólise em meio aquoso. Para aumentar a sua solubilidade, assim como estabilizá-la, pode-se modificar estruturalmente a curcumina, obtendo-se os curcuminóides modificados. Outra alternativa é encapsular a substância ativa em micro/nano-sistemas de diferentes estruturas, tais como micelas e vesículas. O encapsulamento em membranas lipídicas pode também aumentar a biodisponibilidade do fármaco no organismo (Martins, 2013).

## 2.2 Curcuminóides Modificados

As limitações no uso da curcumina levaram à síntese dos curcuminóides modificados, para não somente melhorar algumas das suas propriedades, como biodisponibilidade e toxicidade, como também aumentar a quantidade de produto disponível para testes (Suárez, 2009).

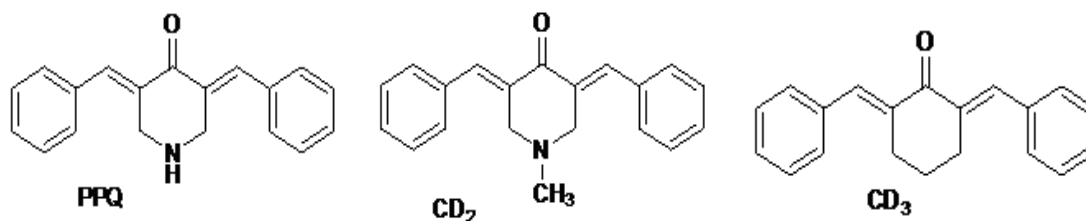
As modificações podem ser feitas em cinco diferentes grupos da estrutura da curcumina, sendo eles: A- arila lateral, B- duplas conjugadas, C- metilenos, D- grupos diceto, E- carbono adjacente. Os exemplos de curcuminóides modificados estruturalmente nestes grupos (A, B, C, D e E) estão apresentados na Figura 6.

Diversas estruturas de curcuminóides modificados já foram testadas quanto às suas propriedades farmacológicas. Por exemplo, os curcuminóides modificados que possuem uma porção ciclohexanona apresentam atividade citotóxica (em células tumorais) e anti-inflamatória melhor do que os que apresentam porções ciclopentanona e cetonas (Nagaraju, 2012; Bairwa, 2013). A relação entre a atividade anti-inflamatória e antitumoral se dá pelo fato de que o excesso de substâncias inflamatórias nos tecidos acarretam no bloqueio da apoptose nas células cancerosas e possibilitando assim o crescimento descontrolado e proliferação do tumor (de Castro *et al.*, 2011).



**Figura 6**– Possibilidades de modificações na curcumina e exemplos de curcuminóides modificados. *Adaptado de Padhye, 2010.*

Na Escola de Química e Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), o Núcleo de Estudo Estrutural e Síntese de Heterociclos, (NEESH) coordenado pelo Prof. Dr. Alex Flores, e no qual a Prof. Dr. Darlene Flores colabora na supervisão, sintetiza e investiga diferentes derivados de curcumina. Cita-se assim, como exemplo, três curcuminóides modificados (Figura 7), que diferem entre si pelos anéis centrais na estrutura. A estrutura (3E, 5E)- 3,5 dibenzilideno piperidin-4-ona, denominada como PPQ, possui anel piperidona. Já a estrutura (3E, 5E)- 3,5 dibenzilideno-1-metilpiperidin-4-ona, denominada como CD2, possui anel *N*-metil piperidona, e a estrutura codificada como CD3, (2E, 6E)- 2,6- dibenzilideno ciclohexanona, possui anel ciclohexanona.



**Figura 7-** Exemplos de curcuminóides modificados sintetizados na FURG.

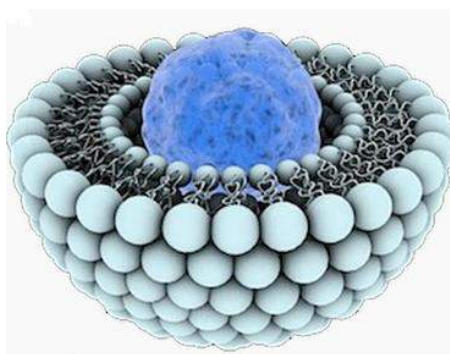
Apesar dos avanços no desenvolvimento de curcuminóides modificados com propriedades vantajosas em relação à curcumina, os primeiros ainda, apresentam baixa biodisponibilidade no organismo.

Este desafio pode ser contornado incorporando essas substâncias em sistemas carreadores. Tais sistemas são responsáveis por prevenir as limitações das propriedades físico-químicas do fármaco encapsulado, melhorando desta forma a farmacocinética, farmacodinâmica e reduzindo os efeitos toxicológicos dos mesmos. Os sistemas carreadores permitem uma liberação controlada do candidato a fármaco além de vetorizá-lo ao alvo específico. Isto permite a administração de menores concentrações da substância ativa, acarretando em uma menor toxicidade no organismo (Santos; Castanho, 2002). Dentre os carreadores lipídicos, os lipossomos vêm sendo estudados como sistemas de liberação controlada de fármaco, prevenindo

efeitos colaterais causados por altas dosagens, além dos problemas de retenção, degradação e baixa solubilidade (Machado *et al.*, 2007).

### 2.3 Lipossomos

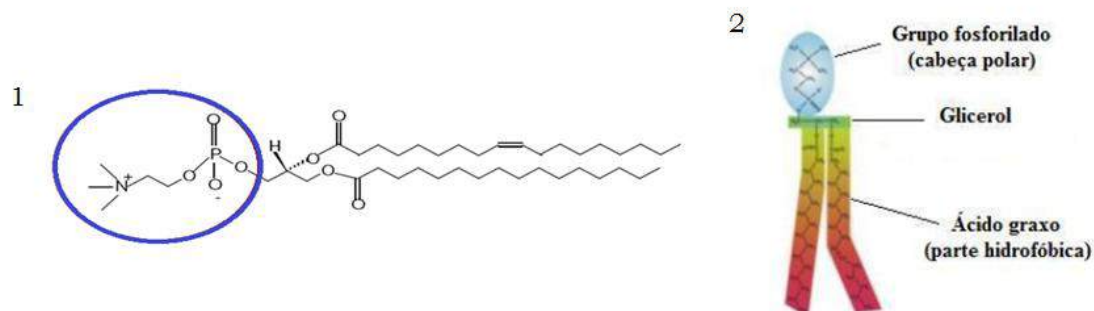
Os lipossomos são definidos como suspensões coloidais de lipídios anfipáticos, que se organizam espontaneamente em estruturas fechadas do tipo concha esférica, podendo conter uma ou mais bicamadas (Figura 8). Podem ser preparados por diversos métodos a partir de associações lipídicas extraídas e purificadas de fontes naturais, ou a partir de lipídios sintéticos, disponíveis comercialmente. A asolecitina de soja (ASO), por exemplo, é constituída de uma mistura de fosfolipídios naturais e possui 25% de fosfatidilcolina (FC), sendo a FC muito utilizada no estudo de preparação de lipossomos. Sua vasta utilização na formulação de lipossomos se dá por ser o fosfolipídio de constituição majoritária na membrana celular, fazendo com que assim, seja menos tóxico no organismo e adequados com o sistema de liberação prolongada de fármaco (Brandl, 1994; Santos, 2002).



**Figura 8-** Esquema de corte transversal de um lipossomo. *Adaptado de [http://worldschoiceproducts.com/index.php?main\\_page=index&cPath=28](http://worldschoiceproducts.com/index.php?main_page=index&cPath=28).*

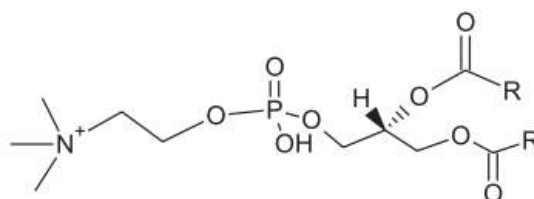
Os fosfolipídios, como a FC, estão entre os diversos tipos de lipídios que podem ser utilizados no preparo dos lipossomos. Estes são compostos por alcoóis esterificados a um grupo glicerol, por sua vez esterificado a ácidos graxos de cadeias longas. O ácido fosfórico presente na parte polar do lipídio

pode ser esterificado a grupos do tipo: amina, serina, colina e glicerol, dando origem aos fosfolipídios mais utilizados nas formulações. Um exemplo de fosfolipídeo (FC) e um esquema geral deste estão apresentados na Figura 9 (Vemuri, 1995; Batista *et al.*, 2007).



**Figura 9-** 1- Estrutura da fosfatidilcolina (FC). 2-Esquema geral de fosfolipídios<sup>1</sup>.

Os fosfolipídios mais utilizados nos estudos de formulações de lipossomos são os que apresentam uma forma cilíndrica como, por exemplo, a FC, o fosfatidilglicerol e a fosfatidilserina. Estes tendem a formar uma bicamada estável em solução aquosa. As FC apresentam alta estabilidade frente às variações de pH ou concentração de sal no meio. Podem ser naturais ou sintéticas, e são constituídas por uma extremidade hidrofóbica composta de cadeias longas de hidrocarbonetos de 16 a 22 carbonos, saturadas ou insaturadas, esterificadas à cabeça polar. Esta é constituída de dois grupos: fosfato e colina (Figura 10) (Batista *et al.*, 2007; Vemuri, 1995).

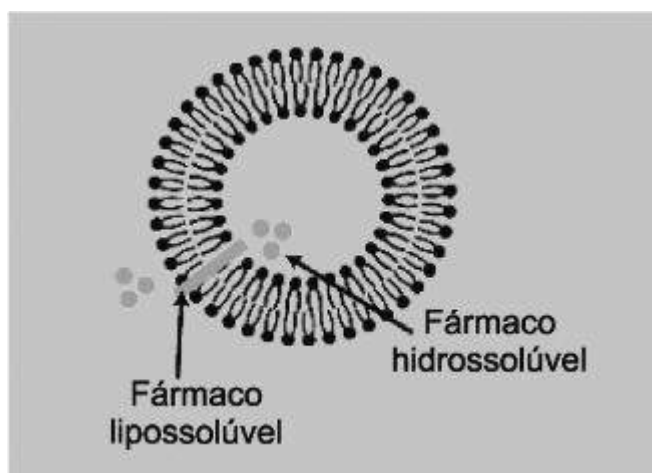


**Figura 10-** Estrutura geral da fosfatidilcolina (FC), onde R representa cadeias hidrocarboneto com 16 a 22 carbonos.

<sup>1</sup> Adaptado de [http://www.optimapharma.de/index.php?option=com\\_content&view=article&id=165%3Aliposom-en-was-sind-liposomen&catid=65%3Aliponasal-heuschnupfen&Itemid=96&lang=en](http://www.optimapharma.de/index.php?option=com_content&view=article&id=165%3Aliposom-en-was-sind-liposomen&catid=65%3Aliponasal-heuschnupfen&Itemid=96&lang=en) Acessado em: 07 de janeiro de 2015.

Os lipossomos são considerados um sistema de liberação controlada de fármacos e substâncias biologicamente ativas devido à sua flexibilidade estrutural que permite variabilidade na fluidez, tamanho e composição. Também apresenta capacidade de encapsular substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas (Figura 11). As substâncias hidrofílicas tendem a estarem localizadas no compartimento aquoso da membrana, ou na região polar lipídica enquanto as substâncias hidrofóbicas tendem a estar localizadas na região acil da cadeia lipídica. Outras propriedades dos lipossomos são a biocompatibilidade, biodegradabilidade e a não-imunogenicidade (Brandl, 1994; Batista *et al.*, 2007).

Atualmente, existem medicamentos lipossomais aprovados ou em fase de teste clínico. Um dos primeiros medicamentos vendido na forma lipossomal tem como nome comercial DOXIL<sup>®</sup>, utilizado no tratamento de Sarcoma de Kaposi. Este é um tipo de câncer que acomete as camadas internas dos vasos sanguíneos. Seu princípio ativo, a doxorubicina, é cardiotoxico e resulta em lesões cumulativas, gerando possível enfraquecimento da capacidade de bombeamento do sangue, comprometendo a circulação do sangue no coração. Na forma encapsulada, seus efeitos colaterais diminuíram e sua meia vida no organismo foi aumentada, tornando assim seu uso mais eficaz e seguro (Rang *et al.*, 2003; Allen *et al.*, 2006).



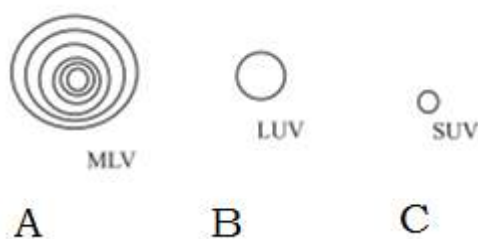
**Figura 11**– Esquema ilustrativo de corte transversal de um lipossomo que pode conter substância hidrofílica na cavidade aquosa interna e hidrofóbica na bicamada lipídica. *Adaptado de Pimentel, 2007.*



Como dito anteriormente, os tipos de lipídios e materiais dos quais os lipossomos podem ser compostos influenciam nas propriedades e estrutura do sistema lipossomal. Desta forma, fatores como o tamanho e número de bicamadas influenciam na eficiência e cinética de liberação de substâncias ativas inseridas no lipossomo. Estes também são critérios para classificação dos lipossomos, conforme descrito a seguir, no item 2.3.1.

### 2.3.1 Classificação dos Lipossomos

Os lipossomos são classificados quanto ao seu tamanho e número de bicamadas lipídicas (lamelas). Os lipossomos que apresentam mais de quatro lamelas são chamados vesículas multilamelares grandes (MLVs / “multilamellar vesicles”, Figura 12 A), podendo variar seu diâmetro entre 400 e 3500 nm. As MLVs apresentam um sistema bem definido e de interpretação mais simples em termos estruturais. Dentre os lipossomos unilamelares, os mais utilizados são as chamadas vesículas unilamelares grandes (LUVs/ “large unilamellar vesicles”, Figura 12 B), de diâmetro superior a 100 nm. Existem ainda as vesículas unilamelares pequenas (SUVs/ “small unilamellar vesicles”, Figura 12 C), com diâmetro entre 20 e 50 nm (Singh, 1983; Lasic, 1998; Santos, 2002).



**Figura 12-** Representação dos lipossomos de acordo com o tamanho e número de lamelas. Cada linha representa uma bicamada lipídica (*Adaptado de Santos; Castanho, 2002*).

Muitos estudos prévios ao desenvolvimento do sistema carreador lipossomal, bem como à sua aplicação terapêutica, são necessários. Neste contexto, deve-se conhecer as interações das membranas lipídicas com o candidato a fármaco/ substância ativa. Estas interações podem ser estudadas através de diversas técnicas instrumentais, tais como as descritas a seguir.

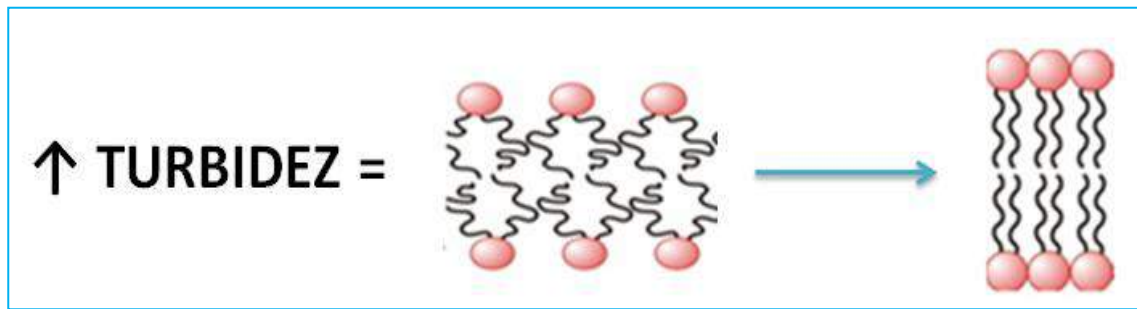
## **2.4 Técnicas de Caracterização da Dinâmica Molecular de Membranas**

Dentre as técnicas instrumentais utilizadas para a caracterização físico-química na dinâmica molecular de membranas podem ser citadas: espectrofotometria de ultravioleta visível (UV-vis), ressonância magnética nuclear (RMN), calorimetria de varredura diferencial (DSC) e infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

### **2.4.1 Espectrofotometria de UV- Vis em Membranas**

Em estudos com membranas, a técnica de espectrofotometria de UV-Vis, pode auxiliar a quantificar substâncias ativas inseridas nas mesmas, bem como medir a turbidez no sistema global.

A turbidez é facilmente determinada por UV-Vis e é extremamente útil no estudo de dispersões de agregados como as vesículas e as micelas. Chorilli e colaboradores (2007) utilizaram medidas de turbidez para avaliar a estabilidade de lipossomos. Através da análise da turbidez do sistema, pode-se também monitorar alterações da ordem molecular de vesículas provocadas por um agente exógeno ao comparar-se, por exemplo, a turbidez em uma suspensão lipossomal pura, com a de um lipossomo contendo uma substância ativa. A turbidez de um fosfolípido pode ser medida, baseando-se no comprimento de onda de absorção máxima ( $\lambda$ ) de 400nm (Yi e MacDonald, 1973). A redução da turbidez indica um aumento na mobilidade do sistema lipossomal, e vice-versa (ver esquema descrito na Figura 13) (Bonassi, 2003; Perkampus, 1992, Korkmaz and Severcan, 2005). Assim sendo, turbidez pode estar relacionada ao estado de fase lipídica. Para complementar as informações sobre os estados de fase das membranas pode-se utilizar a técnica de Calorimetria de Varredura Diferencial (Differential Scanning Calorimetry - DSC).



**Figura 13**– Esquema demonstrativo da alteração na turbidez.

#### 2.4.2 Calorimetria de Varredura Diferencial

Os fosfolipídios podem sofrer a chamada transição de fase principal. Esta é caracterizada pela passagem dos lipídios de uma fase gel (ordenada) para uma fase de cristal-líquido (desordenada), onde as moléculas ficam com movimentos mais livres e os substituintes hidrofílicos inicialmente agrupados tornam-se completamente hidratados. O comprimento e a saturação da cadeia lipídica influenciam o valor da temperatura na qual essa transição ocorre. Sendo assim, diversas membranas compostas por lipídeos distintos podem exibir diferentes níveis de fluidez na mesma temperatura (Frézard, 2005; Lasic, 1998; Batista *et al.*, 2007). Conhecer as transições de fase e fluidez das membranas lipídicas é relevante tanto na preparação quanto nas aplicações farmacológicas das vesículas, pois o comportamento de uma membrana determina as propriedades, tais como permeabilidade, fusão e agregação. Todas essas propriedades afetam a estabilidade dos lipossomos e seu comportamento em sistemas biológicos.

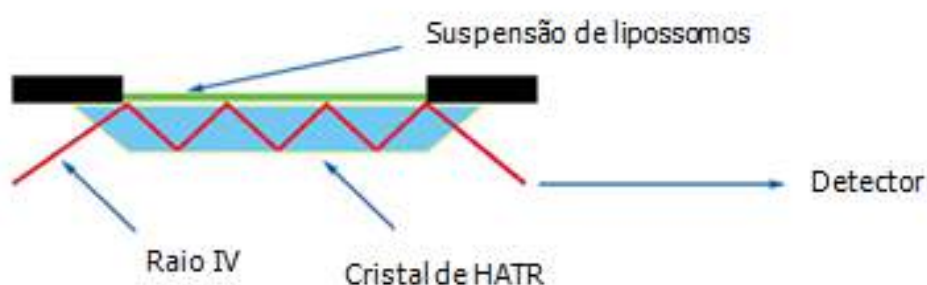
A técnica de DSC é muito utilizada no estudo do comportamento termotrópico de fases de sistemas anfifílicos. Pode-se obter, a partir desta técnica, valores de variação de entalpia ( $\Delta H$ ) da transição de fases de vesículas. A  $\Delta H$  de transição é a energia ou calor, necessário para que a transição de fase se complete (Marsh *et al.*, 1977). A  $\Delta H$  é obtida a partir da integral da área sob o pico da curva de DSC. A partir deste dado, pode-se determinar alterações provocadas por substâncias ativas em parâmetros

termodinâmicos principalmente da região da cadeia acil dos lipossomos (Bonassi, 2003; Azambuja, 2014; Benatti, 1999). Como exemplo de estudos realizados através de DSC, Marques e colaboradores (2013) avaliaram a influência do fármaco isoniazida nos parâmetros termodinâmicos referentes à transições de fase de lipossomos compostos por dimiristoilfosfatidilcolina.

### 2.4.3 Infravermelho com Transformada de Fourier

O uso da técnica de FTIR no modo de refletância total atenuada horizontal (HATR), minimiza os danos causados pelo laser de infravermelho na amostra, pois este é incidido em um cristal (geralmente composto por seleneto de zinco), no qual a amostra está suportada. Assim, o laser penetra pouco na amostra. Um esquema demonstrando uma célula de HATR-FTIR está representado na Figura 14 (Tamm e Tatulian, 1997; Tatulian, 2003; Arsov, 2007).

Analisando a frequência e largura dos picos característicos de modos vibracionais do lipídio, em um espectro de HATR-FTIR, é possível obter dados como: grau de hidratação, ordem molecular de grupos funcionais e também a localização da substância ativa, quando incorporada no lipossomo (Moreno *et al.*, 2009).



**Figura 14**– Esquema de HATR-FTIR.

Os estiramentos axiais ( $\nu$ ) geralmente observados em um espectro de HATR-FTIR de FC são: (a) estiramento assimétrico do grupo fosfato ( $\nu_{as} PO_2^-$ ), (b) estiramento assimétrico do grupo colina ( $\nu_{as} N^+(CH_3)_3$ ), (c) estiramento do

grupo carbonila ( $\nu$  C=O), (d) estiramento simétrico do grupo metileno presente na cadeia acil ( $\nu_s$  CH<sub>2</sub>), (e) estiramento assimétrico do grupo metileno presente na cadeia acil ( $\nu_{as}$ CH<sub>2</sub>). Assim, o espectro de HATR-FTIR de FC mostra bandas de vibração que representam três regiões diferentes do lipídio: a polar, a interfacial e a hidrofóbica (Mantsch *et al.*, 1991). Os estiramentos e as frequências em que se encontram estão apresentados na Tabela 1 (Herec *et al.*, 2007; Manrique-Moreno, *et al.*, 2010).

**Tabela 1-** Valores de frequência de HATR-FTIR para picos específicos avaliados para FC.

Grupo	Frequência (cm <sup>-1</sup> )
N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	970
PO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	1220 - 1260
C=O	1725 - 1740
CH <sub>2</sub> $\nu$	2850
CH <sub>2</sub> $\nu_{as}$	2920

Ao incorporar uma substância ativa na membrana lipídica, pode-se observar possíveis alterações nas bandas de HATR-FTIR referente aos lipídios. As alterações podem ocorrer nos valores de frequência e largura dos picos, fornecendo dados sobre os processos físico-químicos que ocorrem na membrana (Severcan *et al.*, 2005). Por exemplo, efeitos rotacionais, translacionais e/ ou de colisões afetam a largura da banda. Portanto, variações na largura de bandas de grupos específicos de FC fornecem informações sobre a dinâmica do sistema (Lee e Chapman, 1986). Por exemplo, quando ocorre um aumento da largura da banda do lipídio, isto indica um aumento da dinâmica da membrana, ou seja, de sua mobilidade (Toyran e Severcan, 2003).

As alterações na distância entre o grupo colina de uma molécula de lipídio e o grupo fosfato de outra molécula lipídica, intercalados por moléculas de água, podem refletir em variações de intensidade e deslocamentos na

frequência relacionados às bandas de estiramentos da colina (Grdadolnik, Kidric e Hadzi, 1991). Este grupo pode também estar associado à água por interações dipolo, e estes podem ser afetados pela interação de uma molécula exógena incorporada na membrana lipídica (Moreno *et al.*, 2009). Essas alterações foram avaliadas, por exemplo, por Fraceto e colaboradores (2009), que observaram o efeito de dois anestésicos (lidocaína e benzocaína) em membranas sobre as propriedades estruturais e dinâmica de vesículas unilamelares.

Tratando-se do grupo fosfato, a frequência do  $\nu_{as} PO_2^-$  é sensível ao grau de hidratação, e o deslocamento de sua frequência para valores menores indica um aumento do número de ligações de hidrogênio existentes, ou grau de hidratação deste grupo (Chen e Tripp, 2008; Choi *et al.*, 1991).

Quanto ao grupo carbonila, a vibração do  $\nu C=O$  também é um sensor do grau de hidratação da região interfacial do lipídio, influenciado pela polaridade, bem como pelo grau e natureza das interações da ligação de hidrogênio na interface lipídio-água (Manrique-Moreno *et al.*, 2010). O deslocamento desse grupo para valores menores de frequência pode indicar aumento do seu grau de hidratação (Severcan, Sahin e Kazanci, 2005; Korkmaz e Severcan, 2005).

No que diz respeito aos metilenos presentes na cadeia acil, estes são sensíveis à conformação da cadeia lipídica. Analisar as bandas referentes ao seu estiramento axial torna-se útil para o estudo dos estados de fase dos fosfolipídios (Mannock, Lewis e McElhaney, 2010). Por exemplo, quando os lipídios estão em uma fase mais ordenada, como a fase gel, as bandas que correspondem a estes grupos estão presentes em frequências menores (Lewis e McElhaney, 1998; Lee e Chapman, 1986). À medida que o estado de fase desses lipídios torna-se mais móvel, estas bandas tendem a alargar e/ou as suas frequências aumentarem (Mannock, Lewis e McElhaney, 2010). Vale ressaltar que as alterações no grau de liberdade da região hidrofóbica lipídica estão diretamente relacionadas às larguras das bandas referentes aos grupos metilênicos (López-García *et al.*, 1993).

As mudanças na frequência e largura das bandas dos grupos metilenos em questão são consequentes de variações na quantidade de confôrmeros

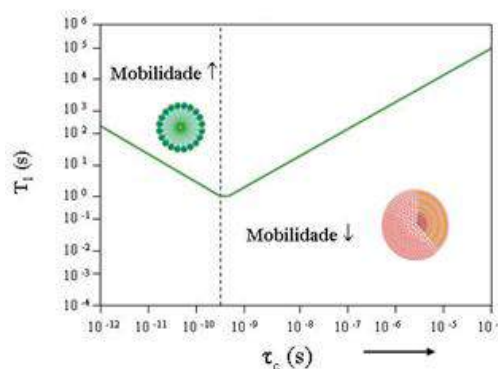
gauche, bem como na liberdade de movimento vibracional ou torção das cadeias acil lipídicas (Casal *et al.*, 1980).

Para correlacionar as informações obtidas com HATR-FTIR sobre a influência de uma substância ativa na dinâmica de grupos lipídicos, como colina e cadeia acil, pode-se também obter-se dados com a técnica de RMN de Hidrogênio.

#### 2.4.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Com a técnica de RMN de próton, através de estudos de tempos de relaxação longitudinal ( $T_1$ ), é possível obter informações tais como o efeito de substâncias ativas na velocidade e ordem molecular de regiões específicas dos lipídios (de Lima *et al.*, 2007). A relaxação longitudinal é a transferência de energia do núcleo excitado para as moléculas mais próximas, que estão vibrando nas frequências apropriadas (Silverstein, Webster, Kumle, 2005). Os valores de  $T_1$  estão relacionados ao tempo de correlação ( $\tau_c$ ), definido como o tempo médio que uma molécula leva para girar em um radiano, sendo um bom parâmetro para se estudar o efeito de uma substância ativa na mobilidade da membrana em função do regime de mobilidade do sistema a ser analisado.

O ponto mínimo da curva mostrada na Figura 15 determina o regime de alta mobilidade e o regime de baixa mobilidade dos materiais analisados. Para as MLVs, o sistema considerado é o de baixa mobilidade, enquanto que para as partículas menores, como micelas e nanopartículas, o sistema considerado é o de alta mobilidade. Na região de baixa mobilidade, o  $T_1$  é diretamente proporcional ao  $\tau_c$ , ou seja, quanto maior for o  $T_1$ , maior será o  $\tau_c$  e, conseqüentemente, menor a mobilidade do sistema (Lasic, 1998).

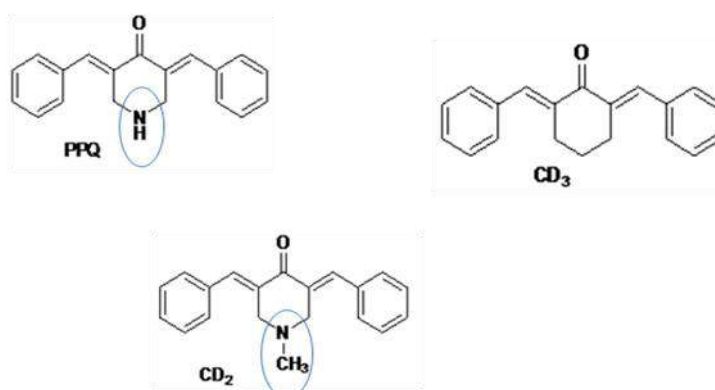


**Figura 15-** Gráfico relacionando tempo de relaxação ( $T_1$ ) e tempo de correlação ( $\tau_c$ ). Adaptado de de LIMA, V. R., 2009.

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivo Geral

- ✓ O objetivo geral deste trabalho é estudar a capacidade antitumoral e antioxidante de três curcuminóides modificados<sup>2</sup> (Figura 16) que diferem estruturalmente, em relação aos seus substituintes. Estudar a influência de cada um dos curcuminóides modificados na dinâmica molecular de lipossomos compostos por asolecitina de soja (ASO), no que diz respeito a ordem, fluidez e mobilidade. Realizar correlações entre a estrutura dos curcuminóides modificados, bem como o efeito da interação com a membrana, em seu potencial biológico. Desta forma, contribuir no estudo de novos sistemas de liberação controlada de fármacos.



**Figura 16**– Curcuminóides modificados estudados neste trabalho.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Incorporar cada um dos curcuminóides modificados descritos anteriormente em lipossomos constituídos de ASO;
- ✓ Avaliar o potencial antitumoral e antioxidante dos curcuminóides modificados;

<sup>2</sup> Os curcuminóides modificados estudados nesse trabalho foram gentilmente doados pela Profa. Dra. Darlene Correia Flores, co-orientadora desse projeto.



- ✓ Avaliar a localização e influência dos curcuminóides modificados na mobilidade molecular e estados de fase dos lipossomos através de:
  - i. ensaios de turbidez, realizados por espectrofotometria de UV-Visível nos lipossomos puros ou contendo um curcuminóide modificado incorporado;
  - ii. medidas de HATR-FTIR;
  - iii. medidas de RMN, por detecção de valores de tempo de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) nos lipossomos puros ou contendo um curcuminóide modificado incorporado, e;
  - iv. medidas de DSC, por detecção de valores de variação de entalpia ( $\Delta H$ ) nos lipossomos puros ou contendo análogo incorporado.

## 4. Material e Métodos

### 4.1 Equipamentos, Materiais e Reagentes

Para o desenvolvimento do presente trabalho, o lipídio – ASO- contendo 25% de FC, tricina e água deuterada/3-(trimetilsilil)- [2,2,3,3-2H4]-1-propiónico de sódio (TSP, 0,05%) foram obtidos da SIGMA-ALDRICH (São Paulo, Brasil). O clorofórmio e o metanol foram obtidos através da SYNTH do Brasil (São Paulo, Brasil). As linhagens de glioma de rato (C6) foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, USA). O 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT) foi obtido da Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA) e soro fetal bovino (FBS) da Gibco BRL, Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA). Os lipídios foram utilizados sem qualquer purificação adicional. Os demais reagentes utilizados são de grau de pureza analítica.

Os materiais e vidrarias utilizados foram compostos por itens de uso convencional no laboratório, como: béquers, erlenmeyers, pipetas, funis simples, provetas, kitassatos, balões volumétricos de 10 mL e 25 mL, suportes, espátulas, eppendorfs, entre outros.

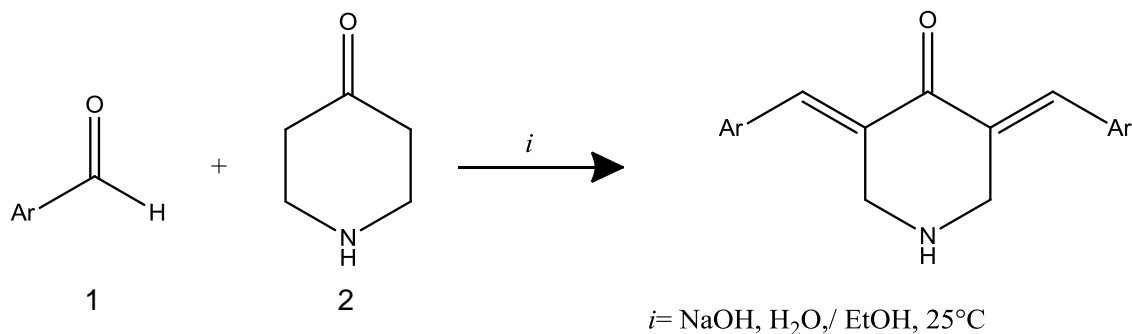
Os equipamentos utilizados neste trabalho foram: placa de aquecimento e agitação magnética modelo 752A Fisatom com potência de 650W (de 120 a 1800 rpm), evaporador rotatório modelo 801A Fisatom de 70W, bomba de vácuo mod. XKM60-11/2HP FAMAC, espectrofotômetro de UV - Visível Shimadzu UV-2550, espectrofotômetro de FTIR Shimadzu – IR Prestige-21 e espectrômetro de RMN Anasazi Instruments (60 MHz), disponíveis na Universidade Federal do Rio Grande - FURG; calorímetro de varredura diferencial TA Instrument 2010 DSC cell (New Castle, DE), disponível na Universidade Federal de Pelotas - UFPEL.

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1 Síntese dos Curcuminóides Modificados

Os curcuminóides modificados foram sintetizados e doados gentilmente pelo grupo de pesquisa Núcleo de Estudo Estrutural e Síntese de Heterociclos (NEESH). Resumidamente, uma solução com 4-piperidona foi

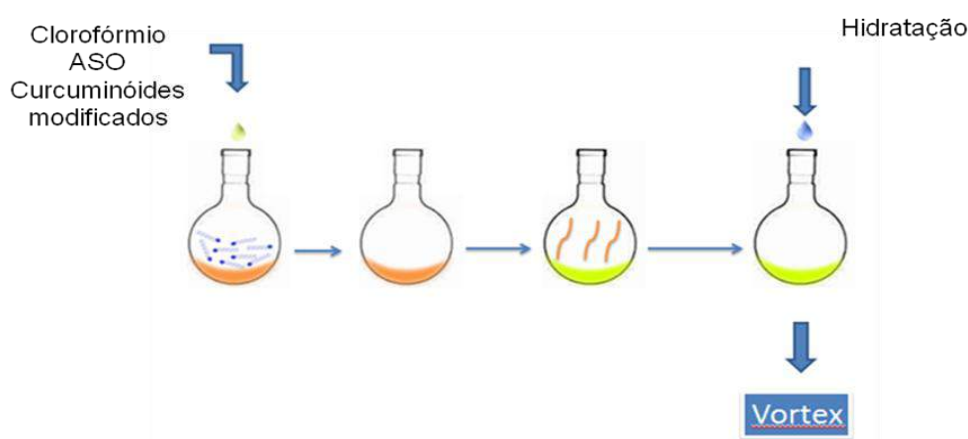
agitada na presença de uma solução de aril aldeído em hidróxido de sódio (segundo a reação de condensação aldólica descrita no Esquema 1). O precipitado formado foi coletado por filtração à vácuo e recristalizado com etanol (YAMAKOSHI *et al.*, 2010).



**Esquema 1** - Reação de condensação aldólica utilizada para a síntese dos curcuminóides modificados usados neste trabalho.

#### 4.2.2 Preparação de Lipossomos

Os lipossomos de Asolecitina de Soja (ASO) do tipo vesículas multilamelares grandes (MLV) foram preparados através do método de hidratação de vesículas (Hope *et al.*, 1986), esquematizado na Figura 17, na ausência e presença dos curcuminóides modificados.

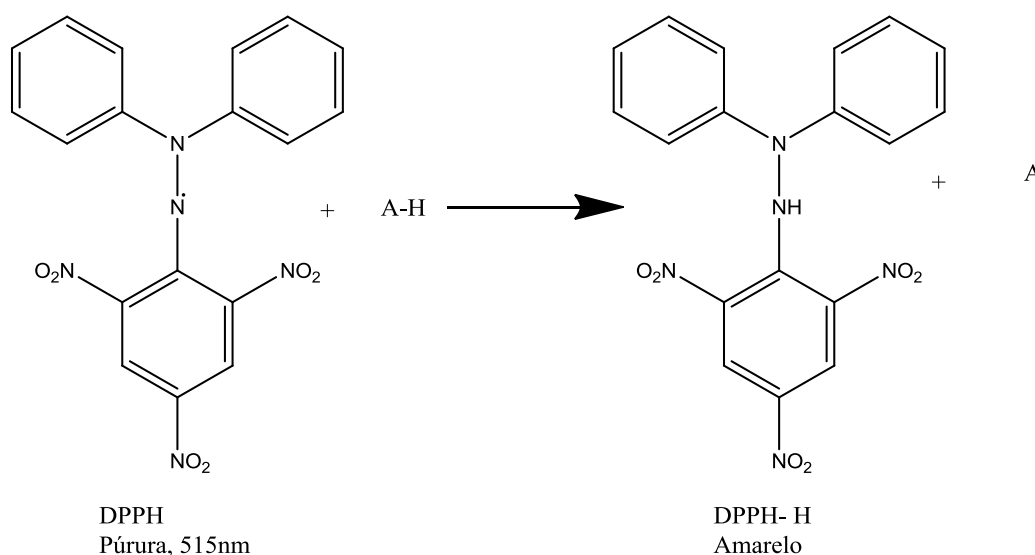


**Figura 17-** Método de preparação de MLVs pelo método de hidratação de vesículas na presença ou na ausência de curcuminóides modificados. *Adaptado de Hope e colaboradores (1986).*

O lipídio e os curcuminóides modificados foram solubilizados em clorofórmio. O solvente foi evaporado através de rotaevaporação, formando um filme lipídico e os traços de solventes foram eliminados através de vácuo (em dessecador) por uma hora. O filme lipídico formado foi hidratado em água e homogeneizado em vórtex (Hope *et al.*, 1986). Foi determinada a concentração de 2,5 mg/mL de curcuminóide modificado para 50mg/mL de ASO (razão curcuminóide modificado: ASO de 0,05), evitando-se assim a saturação de amostra<sup>23</sup>.

### 4.2.3 Ensaio Antioxidante

Para a determinação da atividade antioxidante (AA) dos curcuminóides modificados, foi utilizado o método de sequestro do radical 2,2 difenil 1-picril hidrazila (DPPH<sup>•</sup>). Este método consiste na avaliação da atividade sequestradora do radical citado, de coloração púrpura, que absorve em 515 nm. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R<sup>•</sup>), o DPPH<sup>•</sup> é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente decréscimo da absorbância (Figura 18) (Souza *et al.*).



**Figura 18**– Reação de redução do radical DPPH a difenil-picril-hidrazina.

<sup>3</sup> Testes de incorporação em diferentes concentrações fora feitos, determinando a concentração de 2,5mg/ mL como a concentração máxima de incorporação.

A avaliação foi feita reagindo-se por sessenta minutos uma solução de DPPH  $1 \times 10^{-4}$  M e curcuminóide modificado, onde os curcuminóides foram testados em diferentes concentrações. Os solventes  $\text{CHCl}_3$ : EtOH (1:1) foram usados no preparo das soluções, em função da solubilidade dos curcuminóides modificados. Logo após, as amostras foram submetidas à leitura por Uv- Vis em 515 nm. O valor de absorvância na (s) concentração (ões) testada (s), no tempo de 60 min, foi convertido em porcentagem de atividade antioxidante (AA), determinada pela Equação 1:

$$\%AA = \{[Abs_{\text{controle}} - (Abs_{\text{amostra}} - Abs_{\text{branco}})] \times 100\} / Abs_{\text{controle}}$$

**Equação 1-** Cálculo para obter-se a atividade antioxidante em porcentagem, a partir dos valores de absorvância.

O curcuminóide modificado com melhor AA foi testado em um gradiente de concentrações que variou de 0 a 13 mg/mL, Neste caso, a concentração de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50% ( $IC_{50}$ ), foi determinada usando o programa Microcal Origin 7.5, a partir de uma curva exponencial de primeira ordem, obtida plotando-se na abcissa as concentrações da amostra (mg/ mL) e na ordenada, a porcentagem de AA (Sanchez-Moreno *et al.*, 1998).

#### 4.2.4 Ensaios Antitumorais

##### 4.2.4.1 Cultura Celular

As linhagens celulares de glioma de rato (C6) foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 5% ou 10% de soro fetal bovino, a  $37^\circ\text{C}$  em uma atmosfera úmida contendo 5% de  $\text{CO}_2$ . O curcuminóide modificado livre e incorporado nos lipossomos de ASO (em razão curcuminóide modificado:ASO ,m/m, de 0,05) foram diluídas em DMEM, 5% ou 10% de FBS para obter a concentração de 100  $\mu\text{M}$ . Os experimentos foram realizados em triplicatas.

#### **4.2.4.2 Ensaio de Viabilidade Celular- MTT**

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados monitorando-se a redução colorimétrica do 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT) à formazan. As linhagens celulares C6 foram subcultivadas em placas de 96 poços de cultura de tecidos contendo  $1 \times 10^3$  células por poço, por 24h de cultura. Após este período, as células foram expostas ao tratamento com o curcuminóide modificado livre, ou incorporado em lipossomos de ASO (50mg/mL) em concentração de 100 $\mu$ M. Após 48h de tratamento, o ensaio de MTT foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Foram realizados controles, sendo eles: células de C6 sem tratamento e células de C6 tratadas com lipossomos puros, a fim de confirmar que os efeitos eram apenas dos curcuminóides modificados. Os resultados foram expressos como absorbância a 492 nm.

#### **4.2.4.3 Análise estatística**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e foram submetidos à análise one-way de variância (ANOVA) seguida do teste post-hoc de Tukey-Kramer (para múltiplas comparações). As diferenças entre os valores médios foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ .

#### **4.2.5 Técnica de FTIR**

Os estudos com HATR- FTIR foram realizados em um aparelho Shimadzu IR Prestige-21 (Kyoto, JP) em temperatura ambiente. As amostras analisadas, constaram de lipossomos de ASO puro (150 mg/mL), ou acrescidos de curcuminóide modificado, na razão curcuminóide modificado: ASO de 0,05.

As varreduras foram feitas à temperatura ambiente, de 400 a 4000 nm, com resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$ . Os espectros foram analisados utilizando o software Shimadzu IR solution 1.5. Foram analisados os valores de frequência e alargamentos a 75% da altura dos picos referentes a estiramentos axiais de grupos lipídicos na ausência e na presença dos curcuminóides modificados.

#### 4.2.6 Técnica de RMN

O  $T_1$  de  $^1\text{H}$  do grupo colina lipídico foi medido a 60 MHz, em equipamento Anasazi Instruments (Indianapolis, USA). Os lipossomos contendo 150 mg/mL de ASO, na ausência e na presença dos curcuminóides modificados (na razão curcuminóide modificado: ASO de 0,05) foram analisados em solvente  $\text{H}_2\text{O}$ :  $\text{D}_2\text{O}$  (80: 20, v/v). A referência externa utilizada foi TSP (ácido trimetilsilil propiônico). A sequência de pulsos de recuperação de inversão foi usada para obtenção das medidas de  $T_1$  de  $^1\text{H}$ . A faixa de tempo de correlação ( $\tau$ ) utilizada foi de 0,4 a 12,8 s (de Lima *et al.*, 2010). Os experimentos foram realizados a 21°C.

#### 4.2.7 Técnica de DSC

Os experimentos, com lipossomos de ASO na concentração de 50 mg/mL, na ausência e na presença de curcuminóide modificado (em razão de curcuminóide modificado: ASO igual a 0,05) foram efetuados em aparelho TA Instrument 2010 DSC cell (New Castle, DE). A faixa de temperatura utilizada foi de - 45°C a - 5°C. A faixa de temperatura de análise foi determinada segundo a temperatura de transição de fase dos componentes de ASO. A calibração do aparelho foi realizada com Índio. As varreduras foram efetuadas a 10°C/min, com fluxo de nitrogênio de 50 /50 mL/min. A referência para este ensaio foi uma célula de alumínio vazia (de Lima *et al.*, 2010). Foram avaliadas variações de entalpia ( $\Delta H$ ) dos lipídios induzidas pela presença do curcuminóide modificado. A  $\Delta H$  foi obtida por integração da área sob o pico obtida utilizando o Software Universal 4.0 C (TA Instrument).

#### 4.2.8 Técnica de UV- vis

As medidas da turbidez de lipossomos contendo ASO (50 mg / mL), puros ou na presença de análogo (em razão curcuminóide modificado: ASO de 0,05) foram realizadas a 400 nm por meio de espectroscopia de UV-Vis em um

aparelho Shimadzu UV-2550 (Kyoto, JP). Foram utilizadas células de quartzo com um caminho óptico de 1 cm.

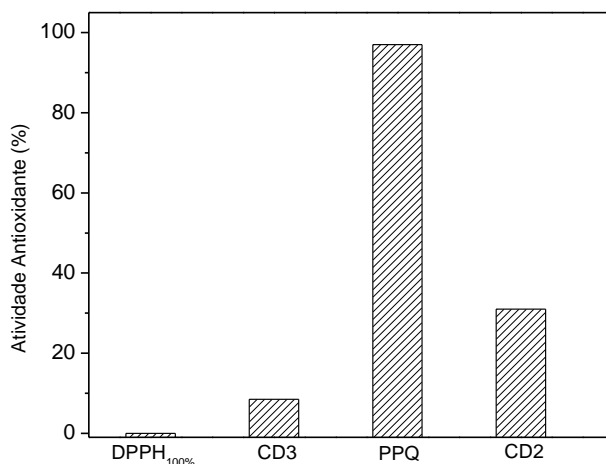


## 5. Resultados

### 5.1 Atividade Antioxidante

Para a determinação da sua atividade antioxidante, os curcuminóides modificados foram submetidos ao ensaio de DPPH, tendo sido testados na sua forma livre.

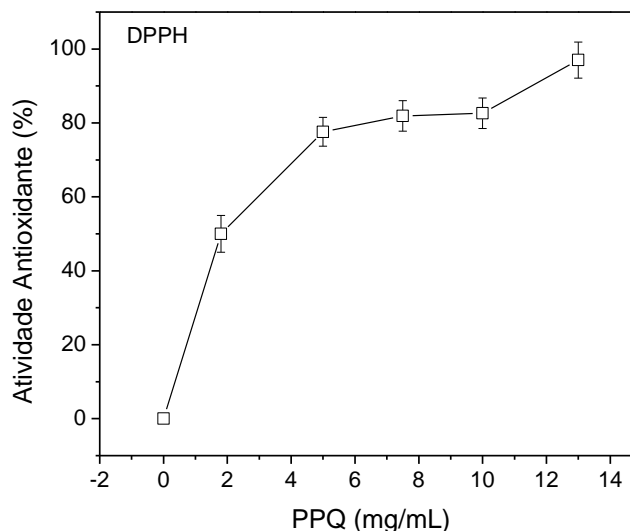
Após testes preliminares, as propriedades antioxidantes de cada curcuminóides modificados (a 13mg/mL) foram comparadas. Obteve-se assim, diferentes percentuais de atividade antioxidante, demonstrados na Figura 19.



**Figura 19-** Propriedades antioxidantes dos três curcuminóides modificados na forma livre, estudadas por ensaio de DPPH.

Esses resultados demonstraram um percentual de atividade antioxidante de 97% para PPQ, 31% para CD2 e 9% para CD3.

Pelo fato do PPQ possuir uma maior capacidade antioxidante em comparação aos outros curcuminóides modificados, esta atividade foi avaliada em função de um gradiente de concentração, de forma a determinar sua IC<sub>50</sub>. As concentrações testadas foram de: 0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 13,0 mg/mL, obtendo-se um valor de IC<sub>50</sub> de aproximadamente 2,0 mg/mL, conforme demonstra a Figura 20.



**Figura 20-** Teste de DPPH em diferentes concentrações de PPQ.

Os três curcuminóides modificados estudados neste trabalho se diferem pela substituição no anel central. O PPQ possui uma substituição nitrogenada, onde o nitrogênio está ligado diretamente a um hidrogênio (4-piperidona). Quanto a CD2, este também possui substituinte nitrogênio no anel, porém esse nitrogênio se encontra ligado a uma metila (N-metil-piperidona), enquanto CD3 não possui nitrogênio no anel, sendo assim uma ciclohexanona (Figura 7).

O maior potencial antioxidante do PPQ em comparação aos outros curcuminóides modificados pode estar relacionado à sua porção -NH. Tal hidrogênio possui ligação fraca com o nitrogênio, sendo liberado mais facilmente, atuando como melhor agente redutor sobre o radical DPPH. Entretanto, o PPQ ainda possui um potencial antioxidante menor que o potencial da curcumina, que possui  $IC_{50}$  de 20  $\mu$ M (Bairwa, 2013). Ainda assim, espera-se que o curcuminóide modificado apresente uma maior biodisponibilidade no organismo que a curcumina, o que o torna promissor.

O ensaio de DPPH também foi realizado em curcuminóides incorporados em lipossomos. Entretanto, devido a interferências dos solventes utilizados na solubilização do DPPH ( $CHCl_3$ :EtOH; 1:1) na estrutura das membranas, os resultados foram inconclusivos. Assim sendo, maiores investigações serão necessárias neste âmbito.

## 5.2 Atividade Antitumoral por Ensaio de Viabilidade Celular

A fim de determinar o efeito dos curcuminóides modificados (PPQ, CD2 e CD3) sobre a viabilidade celular das linhagens de glioma C6, estas foram expostas a cada curcuminóide modificado na forma livre e incorporado em lipossomos de ASO, nos dois casos em concentração de 100  $\mu$ M, pelo período de 48h. No final da incubação foi realizado o ensaio MTT.

Quando as células de glioma C6 foram expostas ao CD3 na forma livre, a redução da viabilidade celular obtida foi de 43%. Para o análogo PPQ, a redução da viabilidade celular obtida, na mesma concentração, foi de 40%. Já o análogo CD2 provocou redução na viabilidade celular de 51%. Tais dados estão mostrados na Figura 21 e descritos na Tabela 2.

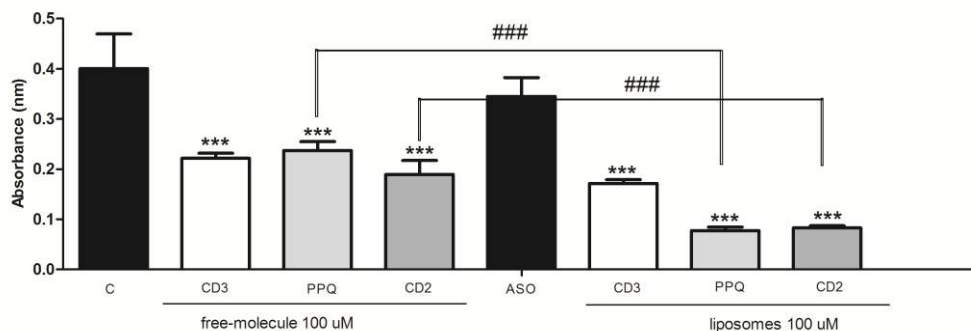
**Tabela 2-** Viabilidade celular de células C6 na presença dos curcuminóides modificados, em forma livre e incorporada em lipossomos.

	Livre (%)	Incorporado (%)	Varição (%)
CD3	43	45	2
PPQ	40	75	35
CD2	51	74	23

Quando as células de glioma C6 foram expostas a lipossomos de ASO contendo os curcuminóides modificados, observou-se uma maior redução da viabilidade celular em comparação ao teste com curcuminóides modificados na sua forma livre. Além disso, pode-se observar na Figura 19, que o lipossomo de ASO puro não apresentou variação significativa na viabilidade celular quando comparado ao controle (somente células).

Em relação aos curcuminóides incorporados, a redução da viabilidade celular obtida para a molécula CD3 incorporada ao lipossomo foi de 45%, um valor aproximado da redução promovida pela molécula livre, (houve uma variação de 2%). Para o análogo PPQ, a redução da viabilidade celular obtida foi de 75%, sendo 35% mais eficiente, em comparação com o efeito promovido

pela molécula livre. Já o curcuminóide modificado CD2 apresentou redução na viabilidade celular de 74%, sendo 23% mais eficiente na redução provocada pela sua forma livre. Estes dados estão descritos na Tabela 2 e representados na Figura 21, e o tempo avaliado foi de 48h.



**Figura 21-** Resultados de viabilidade celular, referentes à ação dos curcuminóides modificados na sua forma livre e incorporada em lipossomos. \*\*\* Teste estatístico que compara as amostras com o controle (C). ### Teste estatístico que compara as amostras entre si (livre e incorporado).

Estudos que avaliaram a atividade citotóxica de curcumina por MTT em células de glioma (GL261) demonstraram uma redução de cerca de 80% na viabilidade celular após adição de 50  $\mu\text{M}$  da substância (Purkayasta *et al.*, 2009). Dentre os curcuminóides modificados estudados, o CD2 alcançou a  $\text{IC}_{50}$  em 100  $\mu\text{M}$ , ou seja, o dobro da concentração de curcumina. Entretanto, na concentração de 100  $\mu\text{M}$  e incorporados em lipossomos, tanto o CD2 como o PPQ tiveram atividade aproximada à da curcumina livre. Desta forma, a incorporação em lipossomos destes curcuminóides modificados em 100  $\mu\text{M}$  induziu a uma eficiência aproximada à da curcumina na redução da viabilidade de células de glioma *in vitro*, e poderá prevenir os efeitos da baixa solubilidade e biodisponibilidade da curcumina no organismo.

Alterações provocadas por substâncias exógenas na ordem da membrana podem influenciar as suas atividades antioxidante e antitumoral, visto que as membranas de células tumorais são mais desorganizadas e fluidas

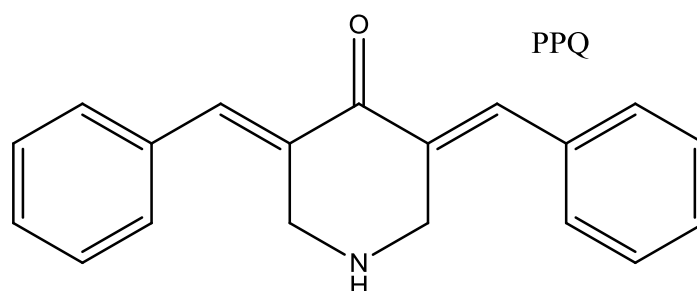
do que as normais (YU et al., 1999). Adicionalmente, a estrutura dos curcuminóides também determina sua interação com a membrana.

Para uma melhor compreensão dos efeitos dos curcuminóides modificados na membrana, suas interações com a mesma foram estudadas e estão apresentadas a seguir.

### 5.3 Efeito dos Curcuminóides Modificados na Dinâmica Molecular de Lipossomos

#### 5.3.1 Curcuminóide Modificado PPQ

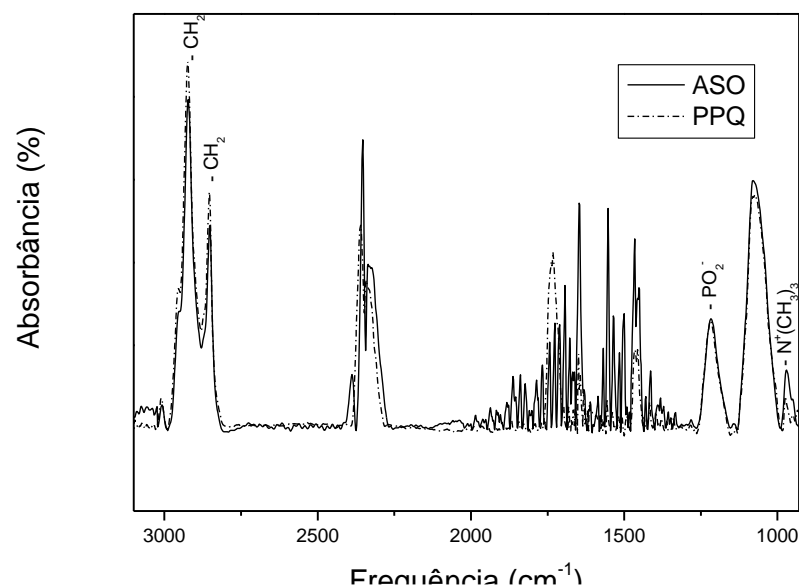
O curcuminóide modificado PPQ tem sua estrutura apresentada no item referente aos Objetivos deste trabalho, bem como na Figura 22.



**Figura 22**– Estrutura do curcuminóide modificado PPQ, ou (3E, 5E)- 3,5 dibenzilideno piperidin-4- ona.

Para identificar os efeitos do curcuminóide modificado PPQ (assim como os dos outros dois curcuminóides modificados) na dinâmica lipídica dos lipossomos de ASO, foram utilizadas as técnicas de HATR-FTIR, RMN, DSC e UV-Vís. As técnicas citadas foram usadas comparando-se a dinâmica entre lipossomos puros (ausência de curcuminóide modificado) e lipossomos contendo o curcuminóide modificado.

Para melhor compreender a influência do PPQ em cada região do lipídio, foram obtidos espectros de HATR-FTIR de ASO puro e na presença de curcuminóide modificado (Figura 23).



**Figura 23-** Espectros de HATR-FTIR de lipossomos de ASO puro (linha cheia) e na presença de PPQ na razão curcuminóide modificado: ASO de 0,05 (linha tracejada).

A influência de PPQ na dinâmica do lipossomo de ASO foi investigada a partir das alterações nos valores de frequência de cada pico específico do lipídio, bem como da alteração na largura da banda a 75% da altura de cada pico.

Na Tabela 3, estão demonstrados os valores encontrados para as frequências dos picos referentes aos estiramentos axiais de grupos específicos dos lipossomos na forma pura e na presença do PPQ. As bandas referentes aos modos vibracionais encontrados nos lipossomos de ASO puro estão de acordo com a literatura para análises de FC (Herec *et al.*, 2007; Manrique-Moreno, *et al.*, 2010, ver Tabela 1).

**Tabela 3–** Valores de frequência encontrados no espectro de HATR-FTIR para cada pico de grupos específicos do lipossomo e as variações provocadas pela incorporação do curcuminóide modificado.

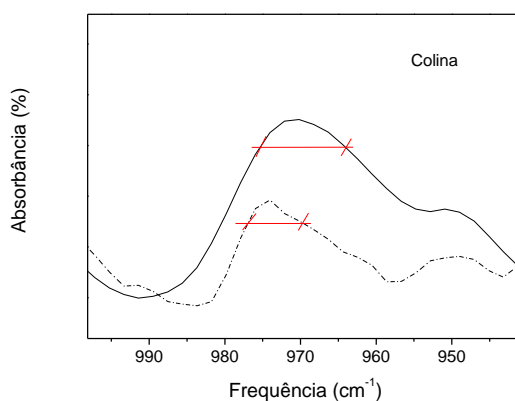
Grupo	$\nu$ (cm <sup>-1</sup> )	$\nu$ (cm <sup>-1</sup> )	$\Delta\nu$ (cm <sup>-1</sup> )
	ASO	ASO + PPQ	
N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	971,20	976,32	5,12
PO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	1219,06	1216,59	2,47
CH <sub>2</sub> ( $\nu_s$ )	2855,37	2852,89	2,48
CH <sub>2</sub> ( $\nu_{as}$ )	2924,19	2923,63	0,56

Para uma melhor interpretação dos resultados, foi considerada a influência da presença do curcuminóide modificado em cada região da membrana, tais como: cabeça polar, região interfacial e a cauda hidrofóbica (cadeia acil). Isto será discutido a seguir, sendo estes resultados de FTIR complementados por respostas observadas através das técnicas de RMN e DSC.

### 5.3.1.2 Interação do curcuminóide modificado PPQ com a Região Polar de Lipossomos de ASO

É importante observar as variações provocadas por moléculas exógenas nos grupos colina e fosfato lipídicos, pois a bicamada lipídica de FC é formada por associações eletrostáticas carregadas positivamente nos grupos *N*-metil, e negativamente nos grupos fosfato (Yeagle e Martin, 1978). Assim, estes dois grupos lipídicos apresentam papel importante na manutenção da configuração da bicamada lipídica e nas propriedades de barreira da membrana.

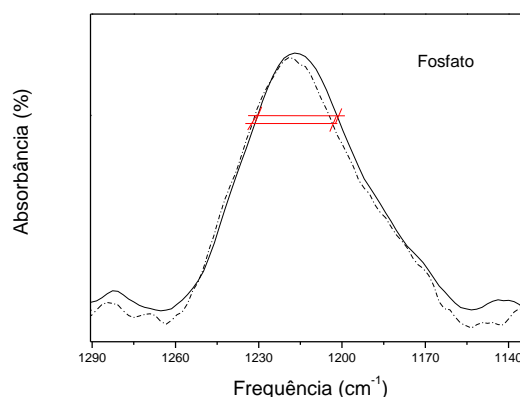
Como podemos observar na Tabela 3, comparando-se o espectro de ASO puro com o espectro de ASO na presença de PPQ, o curcuminóide modificado induziu a uma redução da frequência do pico de  $\nu_{as} N^+(CH_3)_3$  de aproximadamente  $5,12\text{ cm}^{-1}$ . Além da variação de frequência, observou-se também uma redução na largura da banda do grupo colina em  $11,70\text{ cm}^{-1}$ , induzida por PPQ (Figura 24). A redução na largura do pico indica uma redução da mobilidade da membrana nessa região.



**Figura 24-** Ampliação dos espectros de HATR-FTIR de fosfatidilcolina presente em lipossomos de ASO puros (linha cheia) e na presença de PPQ (linha tracejada) na região do estiramento assimétrico do grupo colina,  $\nu_{as} N^+(CH_3)_3$ .

Como demonstra a Tabela 3, a frequência referente ao estiramento axial do grupo fosfato lipídico aumentou em  $2,47\text{ cm}^{-1}$ , após interação com o PPQ. Isto sugere que o PPQ provoca uma diminuição na quantidade de ligações de hidrogênio entre o grupo fosfato lipídico e o grupo amino presente no curcuminóide modificado, ou entre o grupo fosfato lipídico e a água. Desta forma, o resultado indica que o PPQ provoca uma diminuição no grau de hidratação desta região.

A Figura 25 apresenta uma ampliação do espectro de HATR-FTIR mostrado na Figura 21, na região de banda do estiramento axial assimétrico do grupo fosfato. A análise da Figura 25 permitiu detectar-se uma redução em  $5\text{ cm}^{-1}$  na largura da banda de  $\nu_{\text{as}}\text{ PO}_2^-$ . A redução da largura de banda de HATR-FTIR associado ao grupo fosfato, adicionalmente ao comportamento observado para o pico de HATR-FTIR referente ao grupo colina, indica uma diminuição da mobilidade na região polar lipídica provocada pelo PPQ.



**Figura 25-** Ampliação dos espectros de HATR-FTIR de FC presente em lipossomos de ASO puros (linha cheia) e na presença de PPQ (linha tracejada) na região do estiramento assimétrico do grupo fosfato,  $\nu_{\text{as}}\text{ PO}_2^-$ .

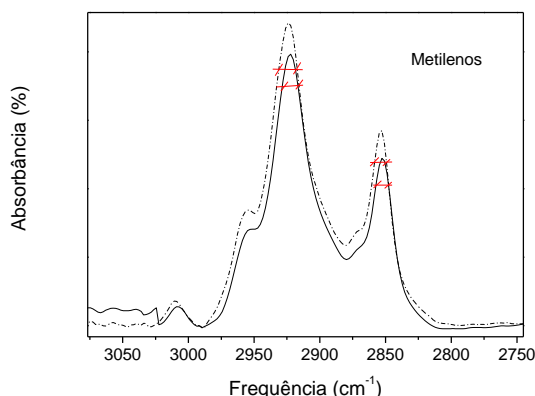
Não foram observadas variações na frequência, tampouco na largura de bandas referentes à região de interface dos lipossomos de ASO, como as do grupo carbonila, induzidas pelo curcuminóide modificado.



### 5.3.1.3 Interação do Curcuminóide Modificado PPQ com os Metilenos da Cadeia Acil de Lipossomos de ASO

Como dito anteriormente, as alterações nas frequências dos  $\nu_s$  CH<sub>2</sub> a 2854,05 cm<sup>-1</sup> e  $\nu_{as}$  CH<sub>2</sub> a 2924,09 cm<sup>-1</sup> lipídicos podem refletir no grau de ordem conformacional, bem como nas conformações trans / gauche das ligações C-H do sistema lipídico. O PPQ teve uma pequena influência no  $\nu_s$  CH<sub>2</sub>, diminuindo sua frequência em 2,48 cm<sup>-1</sup>. Isto indica um discreto ordenamento na membrana, por redução do número de ligações de conformação do tipo gauche. Já a frequência do  $\nu_{as}$  CH<sub>2</sub>, não apresentou alteração com a presença do curcuminóide modificado no sistema lipossomal.

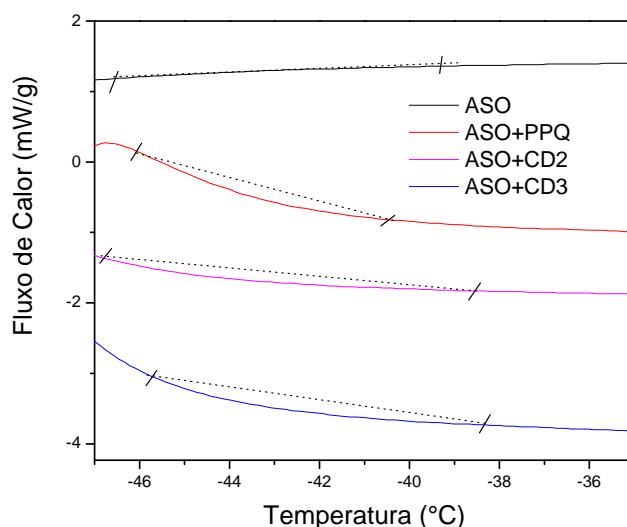
A ampliação do espectro de HATR-FTIR na região da banda do estiramento axial dos metilenos do grupo acil lipídico, em lipossomos puros e na presença de PPQ, está apresentada na Figura 26. Analisando-se a largura dos picos de  $\nu_s$  e  $\nu_{as}$  dos metilenos, observou-se que o PPQ induziu uma redução na largura do pico de  $\nu_s$  CH<sub>2</sub> em aproximadamente 2 cm<sup>-1</sup>, enquanto que, para  $\nu_{as}$  CH<sub>2</sub>, provocou uma redução na largura do pico em 4 cm<sup>-1</sup>. Isto indica que o PPQ provocou um ordenamento na região hidrofóbica do lipossomo, o que está de acordo com as análises de variação de frequência para esta região.



**Figura 26-** Ampliação dos espectros de HATR-FTIR (frequência x absorbância) de FC presente em lipossomos de ASO puros (linha cheia) e na presença de PPQ (linha tracejada) na região do estiramento assimétrico dos grupos metilenos,  $\nu_s$  CH<sub>2</sub> e  $\nu_{as}$  CH<sub>2</sub>.

As informações sobre o efeito de PPQ em parâmetros termodinâmicos dos lipossomos, que reflete sua influência nas cadeias de hidrocarbonetos de ASO,

foram obtidas por DSC. As curvas de DSC de lipossomos de ASO puros e na presença de todos os curcuminóides modificados estão apresentadas na Figura 27.



**Figura 27-** Curvas de DSC para lipossomos de ASO puro e na presença dos curcuminóides modificados estudados neste trabalho.

A partir da análise das curvas de DSC de lipossomos de ASO puros e na presença do PPQ, (Figura 25), foi observada uma transição de fase endotérmica na faixa de -46 a -40 ° C. Este intervalo corresponde ao intervalo negativo típico de fosfatidilcolina insaturada completamente hidratada, como a presente em lipossomos de ASO (Ulrich *et al.*, 1994).

A partir desta transição, foram obtidos valores referentes à variação de entalpia ( $\Delta H$ ) de lipossomos de ASO puros e na presença de PPQ (razão curcuminóide modificado:ASO de 0,05). Estes estão descritos na Tabela 4.

**Tabela 4-** Influência do curcuminóide modificado PPQ nos valores de variação de entalpia ( $\Delta H$ ) da Asolecitina de Soja (ASO).

Amostra	$\Delta H$ (J/g)
ASO	0,17
ASO + PPQ	1,29
Varição	1,12

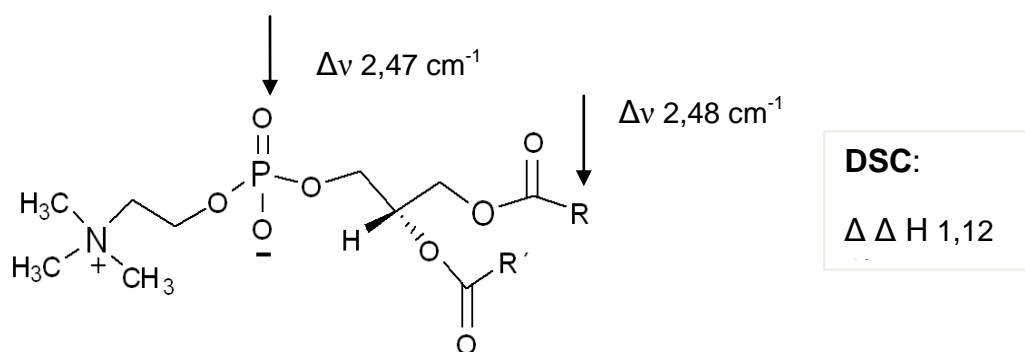
Os resultados descritos na Tabela 4 demonstram que PPQ aumenta o valor de  $\Delta H$  em ASO em cerca de sete vezes, o que indica que PPQ promove um ordenamento na fosfatidilcolina, ou seja, reduz a mobilidade. Tal resultado vai ao encontro dos obtidos através da técnica de HATR- FTIR.

### 5.3.1.4 Ensaio de Turbidez

O efeito do PPQ na turbidez de membranas de ASO foi investigado através de medidas de absorvância do sistema lipossomal a 400 nm. Foi também realizado um ensaio-controle em lipossomos de ASO puros.

Em lipossomos contendo uma razão de PPQ:lipídio de 0,05, observou-se um aumento na turbidez dos lipossomos em aproximadamente 30% (os valores de absorvância variaram de 0,386 em ASO puro, para 0,500 em ASO na presença do PPQ). A redução da turbidez em uma membrana pode ser observada em transições de fases mais ordenadas para mais desordenadas, visto que neste processo ocorrem alterações no índice de refração dos lipídios (Yi e MacDonald, 1973). Sendo assim, o aumento observado no valor de turbidez lipídica após interação com PPQ, indica que este aumentou de forma global a ordem no sistema lipossomal, ou seja, diminuiu a mobilidade da membrana lipídica. Este resultado está suportado pelos resultados obtidos nas análises de HATR-FTIR e estudos de DSC.

A caracterização dos efeitos de PPQ nas propriedades físico-químicas dos lipossomos de ASO sugere que o curcuminóide modificado ordena as regiões polar e hidrofóbica da membrana. Um esquema resumindo os resultados obtidos está demonstrado na Figura 28.

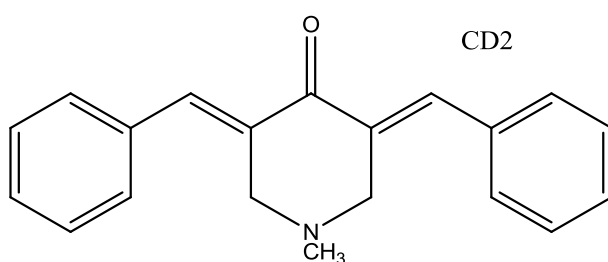


**Figura 28-** Esquema demonstrativo dos valores de variação de frequência para os estiramentos axiais dos grupos fosfato e metilenos da cadeia hidrofóbica do lipídio, bem como a sua variação de  $\Delta H$ , induzidos pela interação com PPQ.

### 5.3.2 Curcuminóide Modificado CD2

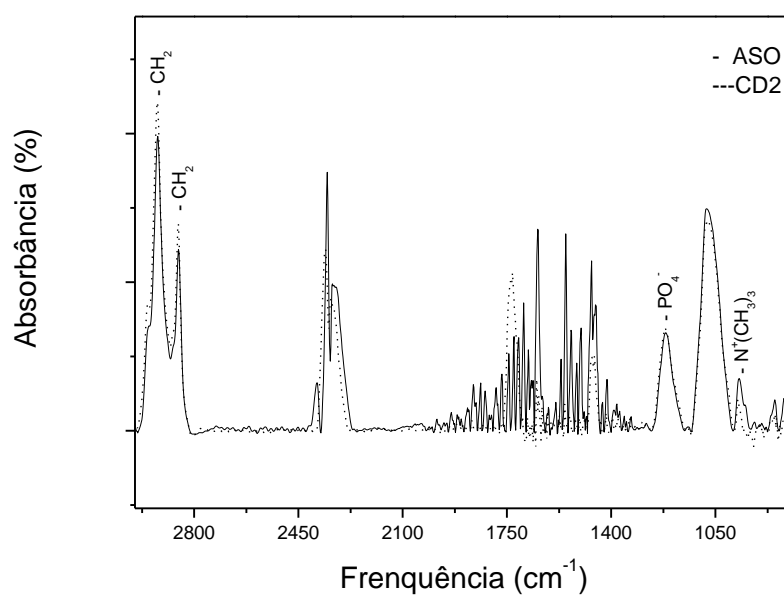
#### 5.3.2.1 Efeitos do Curcuminóide Modificado CD2 na Dinâmica Lipídica de Lipossomos

A estrutura do curcuminóide CD2 ((3E, 5E)- 3,5- dibenzilideno-1 metilpiperidin-4- ona) está apresentada na Figura 29, bem como no item “Objetivos” deste trabalho.



**Figura 29**– Estrutura do CD2, ou (3E, 5E)- 3,5- dibenzilideno-1- metilpiperidin-4- ona.

Os espectros de HATR-FTIR de lipossomos de ASO puro e na presença de curcuminóide modificado CD2 estão apresentados na Figura 30.



**Figura 30**- Espectros de HATR-FTIR de lipossomos de ASO puro (linha cheia) e na presença de CD2 na razão curcuminóide: ASO de 0,05 (linha tracejada).

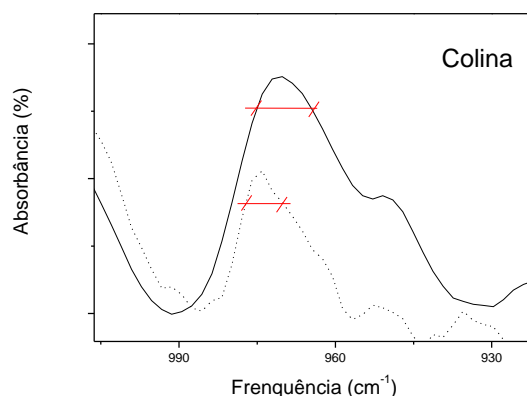
Assim como para PPQ, as alterações na dinâmica molecular provocada pelo curcuminóide modificado CD2 na membrana foram monitoradas a partir do deslocamento da frequência assim como pela variação da largura da banda a 75% da altura de cada pico específico de ASO. Os valores de frequência de grupos lipídicos nos lipossomos puros e na presença de CD2 estão demonstrados na Tabela 5 e serão discutidos em função do efeito do curcuminóide modificado nas diferentes regiões lipídicas.

**Tabela 5**– Valores de frequência para cada pico específico e as variações provocadas pela incorporação do curcuminóide modificado.

Grupo	v (cm <sup>-1</sup> )	v (cm <sup>-1</sup> )	Δ v (cm <sup>-1</sup> )
	ASO	ASO + CD2	
N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	971,204	973,18	2,0
PO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	1219,06	1220,42	1,4
CH <sub>2</sub> v	2855,37	2852,83	2,5
CH <sub>2</sub> v <sub>as</sub>	2924,19	2924,08	0,11

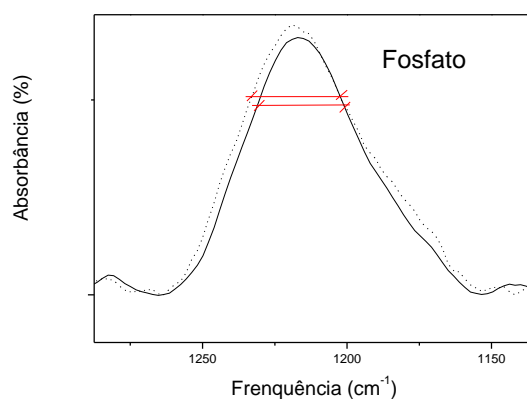
### 5.3.2.2 Interação do Curcuminóide Modificado CD2 com a Região Polar de Lipossomos de ASO

Conforme apresenta a Tabela 5, o CD2 causou variações nos valores de frequência de picos de estiramentos axiais de grupos presentes na região polar da fosfatidilcolina. A presença de CD2 causou uma redução de 2,0 cm<sup>-1</sup> na frequência do pico de estiramento axial do grupo colina, bem como uma redução de 10 cm<sup>-1</sup> ou 10% nos valores na largura (Figura 31). Em relação à largura desta banda, o resultado indica que o CD2 promoveu a redução na mobilidade do grupo colina de ASO.



**Figura 31-** Ampliação dos espectros de HATR-FTIR de FC presente em lipossomos de ASO puros (linha cheia) e na presença CD2 (linha tracejada) na região do estiramento assimétrico do grupo colina.

Comparando-se os valores de frequência para a banda de  $\nu_{as} PO_2^-$  lipídico, após interação com CD2, foi observado que o curcuminóide modificado provocou uma redução de  $1,4\text{ cm}^{-1}$  na frequência do primeiro (ver Tabela 5). Esta redução sugere um discreto aumento de ligações de hidrogênio e, conseqüentemente, do grau de hidratação nesta região. O curcuminóide modificado também provocou o aumento na largura da banda de estiramento axial do grupo fosfato em aproximadamente  $8\text{ cm}^{-1}$  (Figura 32), indicando um aumento da mobilidade nessa região.

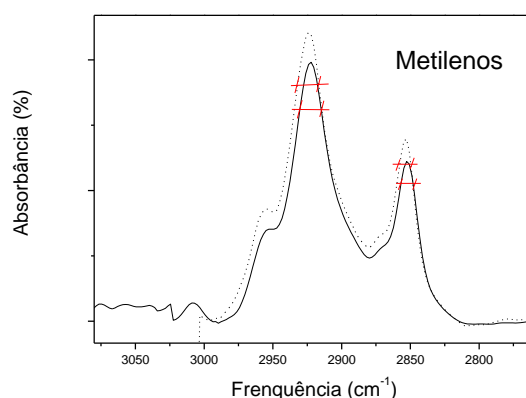


**Figura 32-** Ampliação dos espectros de HATR-FTIR de FC presente em lipossomos de ASO puros (linha cheia) e na presença CD2 (linha tracejada) na região do estiramento assimétrico do grupo fosfato.

Não foram observadas variações na frequência, tampouco na largura de bandas referentes à região de interface dos lipossomos de ASO, como as do grupo carbonila, induzidas pelo CD2.

### 5.3.2.3 Interação do curcuminóide modificado CD2 com os Metilenos da Cadeia Acil de Lipossomos de ASO

A ampliação do espectro de HATR-FTIR na região da banda do  $\nu_s$  CH<sub>2</sub> a 2854,05 cm<sup>-1</sup> está apresentada na Figura 33. O curcuminóide modificado CD2 provocou uma pequena influência no  $\nu_s$  CH<sub>2</sub>, diminuindo o seu valor de frequência em 2,0 cm<sup>-1</sup>. Isto indica um discreto ordenamento na região hidrofóbica da membrana. A incorporação de CD2 não provocou variação na largura do pico referente ao  $\nu_s$  CH<sub>2</sub>. Entretanto, as análises da largura da banda de  $\nu_{as}$  CH<sub>2</sub> a 2924,09 cm<sup>-1</sup> demonstraram que CD2 induziu uma redução na largura do pico em 2,0 cm<sup>-1</sup>, tornando esta região hidrofóbica discretamente mais ordenada.



**Figura 33-** Ampliação dos espectros de HATR-FTIR de FC presente em lipossomos de ASO puros (linha cheia) e na presença CD2 (linha tracejada) na região do estiramento assimétrico dos grupos metilenos.

A curva de DSC de lipossomos de ASO na presença de CD2 está apresentada na Figura 25 (item 5.3.3). Foi observada uma transição endotérmica de fase na faixa de -46 a -38°C.

A partir desta transição, foram obtidos valores referentes à variação de entalpia ( $\Delta H$ ) de lipossomos de ASO puros e na presença de CD2, descritos na Tabela 6.

**Tabela 6-** Influência do curcuminóide modificado (CD2) nos valores de variação de entalpia ( $\Delta H$ ) da Asolecitina de Soja (ASO).

Amostra	$\Delta H$
ASO	0,17  J/g
ASO + CD2	1,7  J/g
Variação	1,53  J/g

Os resultados descritos na Tabela 6 demonstram que CD2 aumenta dez vezes o valor de  $\Delta H$  em ASO, o que indica que CD2 promove um rearranjo molecular na fosfatidilcolina para um estado mais ordenado, ou seja, com menor mobilidade, concordando com os resultados observados por HATR-FTIR.

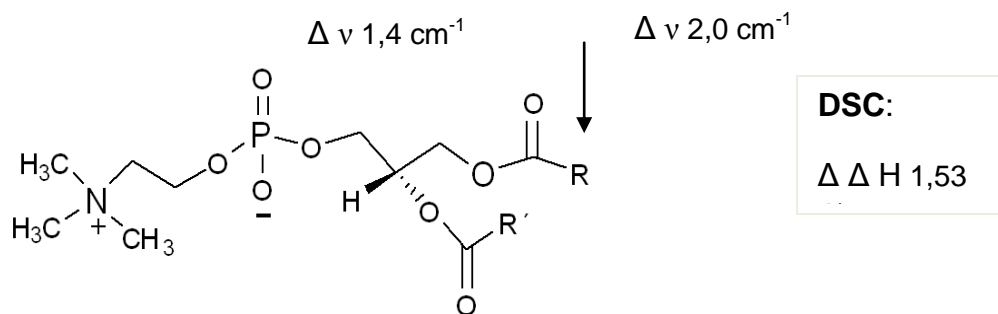
#### 5.3.2.4 Ensaio de Turbidez

A presença de CD2 em membranas provocou o aumento da turbidez inicial dos lipossomos de ASO, visto que o valor de absorvância dos lipossomos contendo ASO puro de 0,386 alterou para 0,622 na presença do curcuminóide modificado.

Sendo assim, o aumento de aproximadamente 60% observado no valor de turbidez, indica que CD2 aumentou a ordem no sistema lipossomal. Este resultado está suportado pelos resultados obtidos nas análises de HATR-FTIR e estudos de DSC.

A partir da caracterização dos efeitos de CD2 nas propriedades físico-químicas dos lipossomos constituídos de ASO sugere-se um ordenamento global na membrana provocado pelo curcuminóide modificado. Um esquema resumido está apresentado abaixo, na Figura 34.



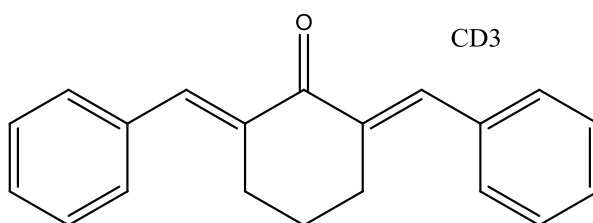


**Figura 34-** Esquema demonstrativo dos valores de variação de frequência para os estiramentos axiais dos grupos fosfato e metilenos da cadeia hidrofóbica do lipídio, bem como a sua variação de  $\Delta H$ , induzidos pela interação com CD2.

### 5.3.3 Curcuminóide Modificado CD3

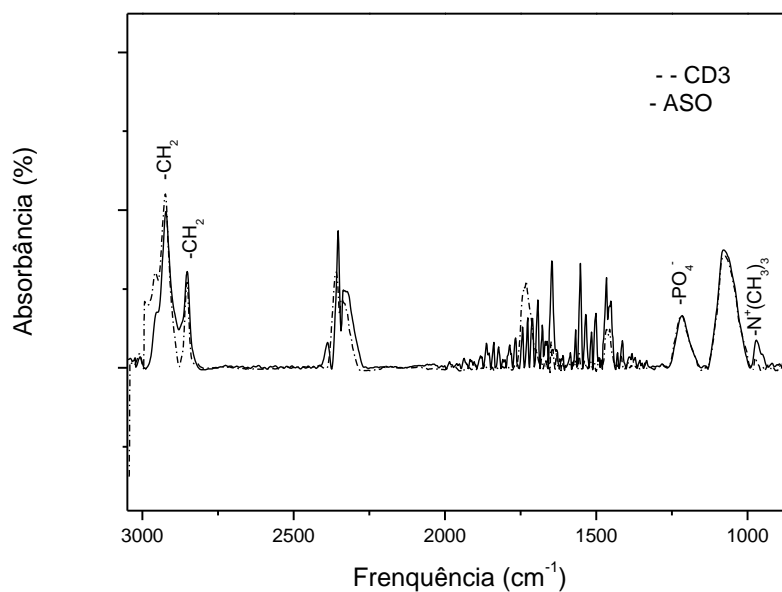
#### 5.3.3.1 Efeitos do Análogo CD3 na Dinâmica Lipídica de Lipossomos

A estrutura do curcuminóide modificado CD3 está apresentada na Figura 35, assim como no item referente aos objetivos deste trabalho.



**Figura 35-** Estrutura do curcuminóide modificado CD3. (2E, 6E)- 2,6- dibenzilideno cicloexanona.

Os espectros de HATR-FTIR dos lipossomos de ASO puro e na presença de CD3 estão demonstrados na Figura 36. Tal como descrito para os demais curcuminóides modificados testados neste trabalho, o efeito do CD3 nos valores de frequência e largura das bandas de estiramentos axiais de grupos lipídicos será abordado em função das diferentes regiões do lipossomo.



**Figura 36-** Espectros de HATR-FTIR de FC em lipossomos de ASO puro (linha cheia) e na presença de CD3 (linha tracejada), na razão curcuminóide: ASO de 0,05.

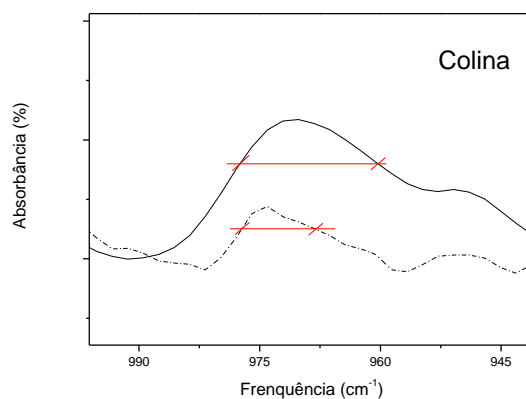
Na tabela 7 são demonstrados valores encontrados para as frequências de HATR-FTIR dos picos de grupos específicos dos lipossomos analisados na forma pura e contendo CD3.

**Tabela 7-** Valores de frequência de HATR-FTIR para cada pico específico dos lipossomos de ASO e as variações provocadas pela incorporação do CD3.

Grupo	$\nu$ (cm <sup>-1</sup> )		$\Delta \nu$ (cm <sup>-1</sup> )
	ASO	ASO + CD3	
N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	971,204	974,96	3,80
PO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	1219,06	1219,77	0,71
CH <sub>2</sub> (v <sub>s</sub> )	2855,37	2855,38	0,01
CH <sub>2</sub> (v <sub>as</sub> )	2924,19	2925,93	1,74

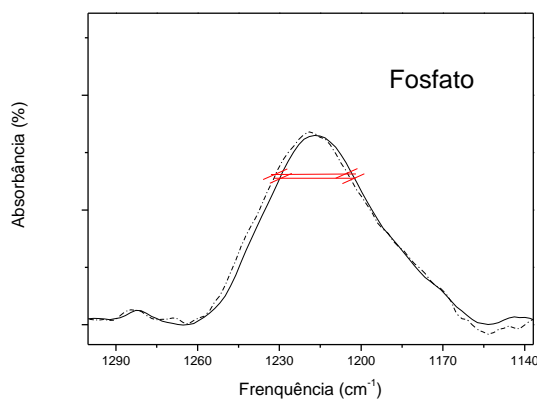
### 5.3.3.2 Interação do Curcuminóide Modificado CD3 com a Região Polar de Lipossomos de ASO

Conforme apresentado na Tabela 7, o CD3 provocou uma redução de  $3,8 \text{ cm}^{-1}$  na frequência do pico de  $\nu_{\text{as}} \text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ , afetando esta região. O curcuminóide modificado provocou também a redução na largura deste pico em  $8,5 \text{ cm}^{-1}$ . A variação na largura indica uma redução na mobilidade desse grupo na FC (Figura 37).



**Figura 37-** Ampliação dos espectros de HATR-FTIR de FC presente em lipossomos de ASO puro (linha cheia) e na presença CD3 (linha tracejada) na região do estiramento assimétrico do grupo colina.

Não foi observada variação nos valores de frequência da banda referente ao  $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$  lipídico após interação com CD3 (ver Tabela 7). Entretanto, o curcuminóide modificado provocou uma redução na largura desta banda em  $1,4 \text{ cm}^{-1}$  (Figura 38), o que indica que ordenou discretamente a região do fosfato lipídico.



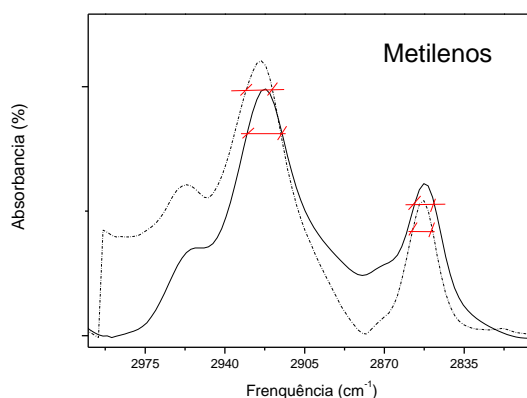
**Figura 38-** Ampliação dos espectros de HATR-FTIR de FC presente em lipossomos de ASO puro (linha cheia) e na presença CD3 (linha tracejada) na região do estiramento assimétrico do grupo fosfato.

Não foram observadas variações na frequência, tampouco na largura de bandas referentes à região de interface dos lipossomos de ASO, como as do grupo carbonila, induzidas pelo curcuminóide modificado CD3.

#### 5.3.3.4 Interação do Curcuminóide Modificado CD3 com os Metilenos da Cadeia Acil de Lipossomos de ASO

Como é possível observar na Tabela 7, não foi observado variação na frequência de banda do  $\nu_s$  CH<sub>2</sub> lipídico após inserção de CD3. Já a banda o  $\nu_{as}$  CH<sub>2</sub> apresentou teve sua frequência reduzida em 1,74 cm<sup>-1</sup> com a presença do curcuminóide modificado. Isto indica um aumento de ligações de hidrogênio nessa região induzida pelo CD3.

A ampliação do espectro de HATR-FTIR na região da banda do  $\nu_s$  CH<sub>2</sub> a 2854,05 cm<sup>-1</sup> lipídico está apresentada na Figura 39. A incorporação de CD3 não provocou alteração na largura do pico. A análise da banda de  $\nu_{as}$  CH<sub>2</sub> lipídico a 2924,09 cm<sup>-1</sup> demonstrou que CD3 induziu uma redução na largura do pico em 2 cm<sup>-1</sup>, indicando uma discreta redução na presença de ligações com conformação gauche no sistema. Isto torna esta região hidrofóbica discretamente mais ordenada.



**Figura 39-** Ampliação dos espectros de HATR-FTIR de FC presente em lipossomos de ASO puro (linha cheia) e na presença CD3 (linha tracejada) na região do estiramento assimétrico dos grupos metilenos lipídicos.

As curvas de DSC referente a lipossomos de ASO puros e contendo CD3 (Figura 25, item 5.3.3) foram analisadas e tiveram seus valores de  $\Delta H$

calculados a partir da transição endotérmica na região de -45 a -38°C. Tais valores estão descritos na Tabela 8.

**Tabela 8-** Influência do curcuminóide modificado (CD3) nos valores de variação de entalpia ( $\Delta H$ ) da Asolecitina de Soja (ASO).

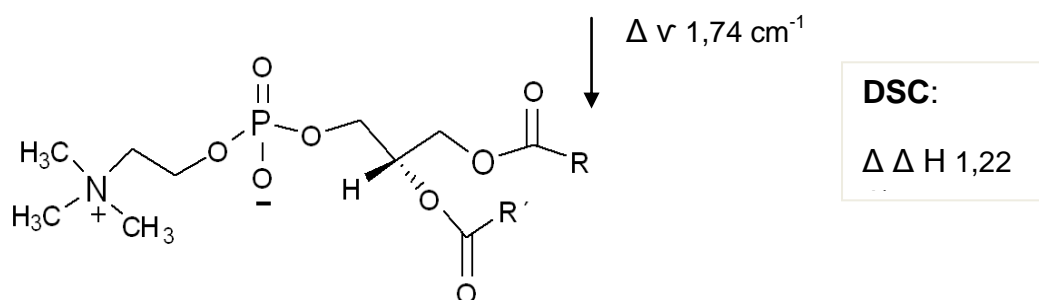
Amostra	$\Delta H$
Aso	0,17  J/g
ASO + CD3	1,39  J/g
Variação	1,22  J/g

O CD3 promoveu um aumento de oito vezes na  $\Delta H$  dos lipossomos de ASO. Isto indica um rearranjo molecular na fosfatidilcolina para um estado mais ordenado, com menor mobilidade.

### 5.3.3.5 Ensaio de Turbidez

Não foi observada variação significativa da turbidez dos lipossomos de ASO na presença de CD3. O valor encontrado para ASO na ausência de curcuminóide modificado foi de 0,386, enquanto para ASO na presença de CD3 foi de 0,378.

A partir das técnicas de caracterização, avaliou-se as influências de CD3 nas propriedades físico-químicas da membrana de ASO, que sugeriu um aumento discreto na ordem do sistema lipossomal. Um esquema resumido está apresentado na Figura 40.



**Figura 40-** Esquema demonstrativo dos valores de variação de frequência para os estiramentos axiais dos grupos fosfato, carbonila e metilenos da cadeia hidrofóbica do CD3.

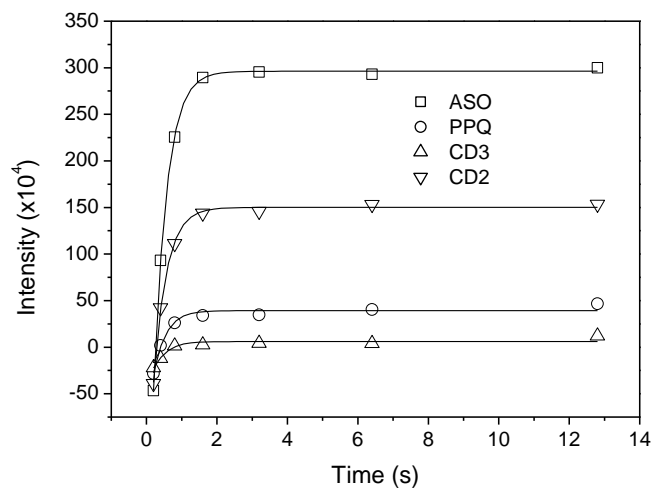
## 5.4 Ensaio de RMN

A caracterização dos lipossomos de ASO na ausência e na presença dos três curcuminóides modificados, isoladamente, foi também efetuada por RMN a fim de confirmar os resultados obtidos pelas demais técnicas. Foram realizadas medidas de  $T_1$  de  $^1\text{H}$ , da região colina dos lipídios, cujas curvas e valores estão apresentados na Figura 40 e Tabela 9, respectivamente.

Não foram observadas variações de  $T_1$  significativas da região colina, após interação com cada um dos curcuminóides modificados estudados. Assim, é possível que os curcuminóides modificados não afetem a rotação ao longo do eixo do grupo colina. A baixa razão de curcuminóide modificado: lipídio, também ter contribuído para a não-detecção de mudanças nos valores pelo aparelho. Assim, maiores investigações serão necessárias através da técnica de RMN, no futuro.

**Tabela 9-** Valores de  $T_1$  de  $^1\text{H}$  da colina para lipossomos contendo cada curcuminóide modificado.

	$T_1$	Varição
<b>ASO</b>	0,3803	-
<b>ASO+PPQ</b>	0,3721	0,0082
<b>ASO+CD2</b>	0,4049	0,0246
<b>ASO+CD3</b>	0,3672	0,0131



**Figura 41-** Curvas referentes à relaxação longitudinal ( $T_1$ ) dos hidrogênios da colina em lipossomos de ASO puro e na presença de cada curcuminóide modificado estudados neste trabalho.

## 6. Discussão

Presentes na estrutura da curcumina, as cetonas conjugadas possuem pouca ou nenhuma capacidade de interagir com grupos amino e hidroxil encontrados nos ácidos nucleicos (Das, 2009). Além disso, a ligação entre as duas dicetonas é quebrada facilmente, o que resulta na baixa biodisponibilidade da curcumina no organismo. Quando essa função 1,3 diceto foi substituída por uma cicloexanona, uma potente inibição da proliferação celular, com valores de  $IC_{50}$  entre 2,6-4,9  $\mu$ M (Padhye, 2010).

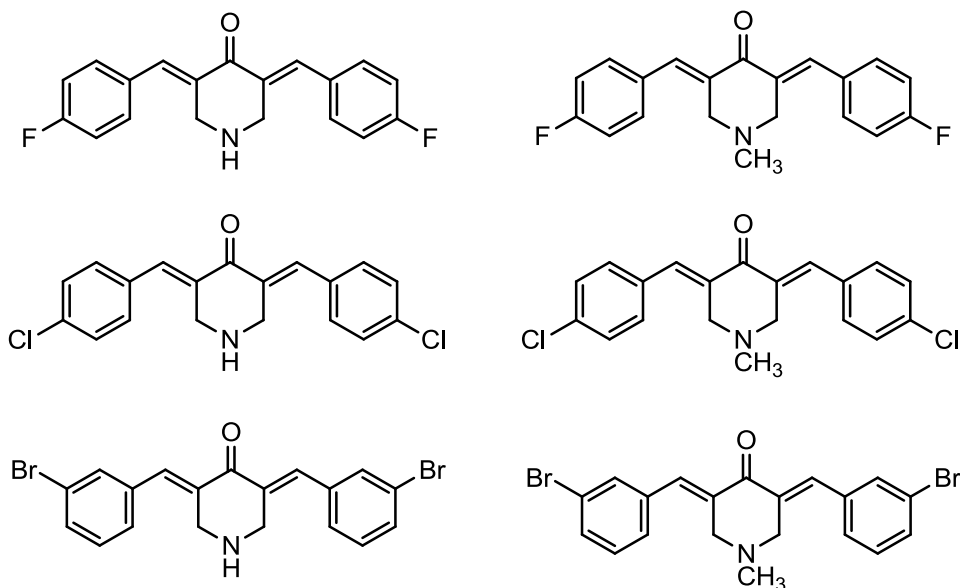
Estudos mostram que a presença do anel cicloexanona influencia diretamente na atividade antitumoral. Quando foi inserido um grupamento nitrogenado no anel central (4-piperidona, PPQ) foi observado morte celular por apoptose em cânceres de pulmão, mama, ovários e células do cancro cervical, com potência dez vezes maior que a da curcumina. Outro efeito notado, apresentado por essa modificação, é a capacidade de estabilização dos microtúbulos em células (Padhye, 2010). Adicionalmente, as substituições *N*-metil tendem a ter atividade aumentada quando comparado ao anel sem substituição (Yadav *et al.*, 2010; Gregory *et al.*, 2013).

Análogos de curcumina com estruturas semelhantes aos aqui estudados foram testados. Foi observado que, quando o nitrogênio presente no anel está substituído, como no caso do *N*-metil, sua propriedade anticâncer era aumentada em 23 vezes para cânceres de células escamosas (pele) e leucemia (Pati *et al.*, 2008).

Estes dados vêm ao encontro dos resultados descritos no presente trabalho, onde foi obtido maior redução na viabilidade de células de glioma (C6), a partir da adição de CD2 (*N*-metil-piperidona), que apresentou redução na viabilidade celular, na sua forma livre, em 51%. Já as moléculas PPQ e CD3 apresentaram redução na viabilidade celular aproximada, no percentual de 40 e 43% respectivamente, o que ressalta a importância da substituição metila no nitrogênio para a atividade antitumoral.

Outras estruturas (Figura 42) análogas às aqui estudadas, porém com substituição de halogênio na cadeia aril lateral, apresentaram maior eficácia na redução da viabilidade celular quando avaliados em câncer do tipo B16 (melanoma) e L1210 (linfoma) (Gregory *et al.*, 2013).





**Figura 42** - Estruturas com substituições halogenadas avaliadas em células cancerosas do tipo B16 e L1210 (melanoma e linfoma). *Adaptado de:* Gregory, 2013.

A diferença entre os resultados relatados por Gregory e colaboradores (2013) e os resultados deste trabalho deve-se aos substituintes halogenados, já que o tamanho do substituinte, assim como sua posição no anel aromático, influencia na potencialidade da molécula como anticarcinogênico (Gregory et al., 2013).

Quando incorporados em lipossomos, observou-se maior atividade antitumoral em todos os três curcuminóides modificados testados, em comparação às suas formas livres.

O PPQ, apesar de ter obtido resultado inferior no teste de viabilidade celular quando livre, quando comparado aos outros curcuminóides modificados, obteve aumento da citotoxicidade em células de glioma (C6) de 35% quando incorporado na membrana. Isso pode dever-se à sua maior interação com a região polar da membrana, estando assim mais disponível para interagir com a célula tumoral. A localização na região polar da membrana foi considerada em função das fortes interações observadas por FTIR nas regiões fosfato, bem como uma menor variação de valores de variação de entalpia ( $\Delta\Delta H$ ) causada pelo PPQ em lipossomos de ASO, quando comparado aos outros curcuminóides modificados.

O aumento do potencial anticâncer de CD2 incorporado em lipossomos, em 23%, quando comparado ao CD2 na forma livre, também foi observado. Esta variação, menor que a observada para o PPQ, pode estar atribuída a uma maior interação deste curcuminóide modificado com a região apolar da membrana, visto que provocou maior variação no  $\Delta H$  em ASO e maior aumento na turbidez do sistema, quando comparado aos outros curcuminóides modificados. Houve também uma menor interação com o grupo fosfato, conforme visto nos resultados de HATR-FTIR. Assim, os resultados sugerem que o CD2 está menos disponível na região polar que PPQ, afetando mais a região hidrofóbica. Essa maior força de interação na região apolar pode ser atribuída a presença do substituinte metila do nitrogênio da piperidona, que o torna menos disponível para ataque à célula tumoral durante o período no qual foram realizados os ensaios.

O curcuminóide modificado CD3, quando incorporado em lipossomos, teve aumentada em 2% a sua atividade antitumoral, quando comparado à sua forma livre. Isto demonstrou uma variação pouco significativa em relação à sua atividade, após ser incorporado em lipossomos. Isto pode dever-se a ausência da substituição nitrogênio no anel ciclohexanona, além de sua maior interação com a membrana na região apolar, resultando em uma variação menor quando comparada aos outros curcuminóides modificados e tornando-o menos disponível e eficiente para a atividade antitumoral.

A atividade antitumoral parece ter forte relação com a atividade antioxidante, visto que o câncer é associado ao estresse oxidativo. O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre a geração de radicais livres e os mecanismos de defesa do corpo, favorecendo o primeiro fator (Dragan *et al.*, 2003). Um mecanismo sugerido para a atividade antioxidante de substâncias ativas é baseado na redução da fluidez de membranas por evitar a difusão de uma espécie reativa (Arora *et al.* 2000). Isto também pode implicar em uma importante capacidade antitumoral, visto que as membranas citoplasmáticas de células tumorais apresentam tipicamente maior fluidez e menor estabilidade quando comparadas à células saudáveis (Arora *et al.*, 2000).

A redução na mobilidade da membrana, efeito observado após interação dos três curcuminóides modificados nos lipossomos estudados, pode vir a ser, um mecanismo de ação adicional no combate a cânceres. Dentre outros

mecanismos existentes, citam-se a inibição da tirosina quinase e captação de radicais livres (pela presença de grupos hidroxila fenólicos) (Matsuda *et al.*, 1994). Os resultados obtidos neste trabalho permitiram sugestões sobre a influência da interação curcuminóide modificado/ sistema carreador na disponibilidade do primeiro para atingir uma eficiente atividade biológica. Dentre os três curcuminóides modificados incorporados em lipossomos, a disponibilidade para as atividades antitumoral/antioxidante parece ter aumentado na seguinte ordem: PPQ>CD2>CD3. A maior eficiência antitumoral destes curcuminóides modificados quando incorporados em lipossomos torna o desenvolvimento de sistemas farmacológicos lipossomais a base destas substâncias promissor.

## 7. Conclusões

Neste trabalho realizou-se o estudo de três curcuminóides modificados quanto aos seus efeitos nas propriedades físico-químicas de membranas e relacionou-se esses efeitos com seu mecanismo antioxidante e antitumoral. Os dados obtidos e conclusões podem ser resumidos como descrito abaixo:

- Os curcuminóides modificados PPQ, CD2 e CD3 apresentaram percentuais de atividade antioxidante de 97, 31 e 9% respectivamente, na concentração de 13 mg/mL
- Quando testados para viabilidade celular em células do tipo C6 (glioma), na concentração de 100 $\mu$ M, na sua forma livre, a redução na viabilidade celular obtida por cada um deles foi de 43% para CD3, 40% para PPQ e 51% para CD2. Quando testados na mesma concentração, porém incorporados em membranas de ASO, potencializaram sua redução na viabilidade celular, com variação de 2% para CD3, 35% para PPQ e 23% para CD2.
- Os três curcuminóides modificados geram aumento de ordem em membranas do tipo ASO, conforme observado através de análises de FTIR, DSC e Turbidez.
- As técnicas utilizadas sugerem que o aumento da potencialidade na redução da viabilidade celular está ligado à estrutura dos curcuminóides, assim como suas interações com a membrana (efeito de ordenamento).
- O aumento da ordem da membrana provocado pelos curcuminóides modificados podem também viabilizar sua disponibilidade em um sistema carreador.

Assim sendo, os dados obtidos neste trabalho contribuíram no estudo das influências da interação substância/membrana ou carreador no mecanismo de ação antioxidante e antitumoral dos curcuminóides modificados. Também permitiram avaliar as disponibilidades para exercerem tais propriedades biológicas quando incorporados em carreadores lipossomais contendo lipídios

de fonte natural. Futuras investigações incluirão o estudo das atividades biológicas e efeitos em membranas de:

- Curcuminóides modificados com substituições na cadeia aril lateral, assim como as posições desses substituintes para fim de comparação com os análogos já estudados neste trabalho (PPQ, CD2 e CD3);
- PPQ, CD2 e CD3 em carreadores lipossomais contendo fontes lipídicas sintéticas (como por exemplo, a dimiristoilfosfatidilcolina).

## 8. Referências Bibliográficas

Allen, Theresa M., et al. "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of lipidic nano-particles in cancer." *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)* 6.6 (2006): 513-523.

Anand, Preetha., et al. "Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature." *Biochemical pharmacology* 76.11 (2008): 1590-1611.

Arsov, Z., et al. "Direct interaction between cholesterol and phosphatidylcholines in hydrated membranes revealed by ATR-FTIR spectroscopy." *Chemistry and physics of lipids* 150.1 (2007): 35-48.

Bairwa, K., et al. "Recent developments in chemistry and biology of curcumin analogues." *RSC advances* 4.27 (2014): 13946-13978.

Batista, C., et al. "Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte." *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 43.2 (2007): 167-179.

Benatti, C. R., et al. "Phase behavior of synthetic amphiphile vesicles investigated by calorimetry and fluorescence methods." *Thermochimica acta* 328.1 (1999): 137-142.

Benzie, I. F. F. "Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences." *International journal of food sciences and nutrition* 47.3 (1996): 233-261.

Bonassi, N. M. "Transição vesícula-micela em misturas de dispersões de vesículas com soluções de micelas." (2003): 87-f.

Brandl, M., et al. "Entrapment of haemoglobin into liposomes by the dehydration-rehydration method: vesicle characterization and in vivo behaviour." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1196.1 (1994): 65-75.

Castelli, F., et al. "Dipalmitoylphosphatidylcholine/linoleic acid mixed unilamellar vesicles as model membranes for studies on novel free-radical scavengers." *Journal of pharmacological and toxicological methods* 37.3 (1997): 135-141.

Chen, C., et al. "An infrared spectroscopic based method to measure membrane permeance in liposomes." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1778.10 (2008): 2266-2272.

Choi, S., et al. "Infrared spectroscopic studies on the phosphatidylserine bilayer interacting with calcium ion: effect of cholesterol." *Biochemistry* 30.35 (1991): 8563-8568.

Chorilli, M., et al. "Estudo da estabilidade de lipossomas compostos de fosfatidilcolina de soja e fosfatidilcolina de soja hidrogenada adicionados ou não de colesterol por método turbidimétrico." *Latin American Journal of Pharmacy* 26.1 (2007): 31.

Das, S., et al. "3, 5-Bis (benzylidene)-4-oxo-1-phosphonopiperidines and related diethyl esters: potent cytotoxins with multi-drug-resistance reverting properties." *ChemMedChem* 4.11 (2009): 1831-1840.

de Castro R., et al. "O Duplo Papel da Inflamação no Surgimento das Lesões Cancerígenas." *Revista Brasileira de Ciências da Saúde* 14.4 (2011): 107-114.

De Lima, V., et al. "Influence of melatonin on the order of phosphatidylcholine-based membranes." *Journal of pineal research* 49.2 (2010): 169-175.

De Lima, V., et al. "Melatonin location in egg phosphatidylcholine liposomes: possible relation to its antioxidant mechanisms." *Journal of pineal research* 43.3 (2007): 276-282.

Faião F., et al. "Antiproliferative and antimetastatic activity of DM-1, sodium 4-[5-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-oxo-penta-1, 4-dienyl]-2-methoxy-phenolate, in B16F10 melanoma." *Appl. câncer res* 28.2 (2008): 72-79.

Ferreira, A., et al. "Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo." *Revista da Associação Médica Brasileira* 43.1 (1997): 61-68.

Fraceto, L., et al. "Interação de anestésicos locais com lipossomas determinada por espectroscopia de infravermelho." *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 27.1 (2009): 27-35.

Gardès-Albert, M., et al. "Membrane lipid peroxidation: pulse and  $\gamma$ -radiolysis in oxyradical research." *Membrane lipid oxidation* 2 (1991): 1-30.

Glienke, W., et al. "Curcumin inhibits constitutive STAT3 phosphorylation in human pancreatic cancer cell lines and downregulation of survivin/BIRC5 gene expression." *Cancer investigation* 28.2 (2009): 166-171.

Grdadolnik, J., et al. "Hydration of phosphatidylcholine reverse micelles and multilayers—an infrared spectroscopic study." *Chemistry and physics of lipids* 59.1 (1991): 57-68.

Gregory, M., et al. "Synthesis, cytotoxicity, and structure–activity insight of NH- and N-methyl-3, 5-bis-(arylidanyl)-4-piperidones." *Medicinal Chemistry Research* 22.11 (2013): 5588-5597.

Henriksson, E., et al. "Differences in estimates of cisplatin-induced cell kill in vitro between colorimetric and cell count/colony assays." *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 42.10 (2006): 320-323.

Holder, G., et al. "The metabolism and excretion of curcumin (1, 7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1, 6-heptadiene-3, 5-dione) in the rat." *Xenobiotica* 8.12 (1978): 761-768.

Hope, M., et al. "Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles." *Chemistry and physics of lipids* 40.2 (1986): 89-107.

Houghton, P., et al. "The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity." *Methods* 42.4 (2007): 377-387.

INCA, Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/index.asp?ID=2> acessado em: 07 fevereiro de 2015).

Inoue, T., et al. "Miscibility of binary phospholipid mixtures under hydrated and unhydrated conditions. I. Phosphatidic acids with different acyl chain length." *Chemistry and physics of lipids* 63.3 (1992): 203-212.

Klajnert, B., et al. "PAMAM dendrimers and model membranes: differential scanning calorimetry studies." *International journal of pharmaceutics* 305.1 (2005): 154-166.

Korkmaz, F., et al. "Effect of progesterone on DPPC membrane: evidence for lateral phase separation and inverse action in lipid dynamics." *Archives of biochemistry and biophysics* 440.2 (2005): 141-147.

Kuttan, R., et al. "Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*)." *Cancer letters* 29.2 (1985): 197-202.

Kwon, G., et al. "Polymeric micelles as new drug carriers." *Advanced Drug Delivery Reviews* 21.2 (1996): 107-116.



Lasic, D., et al. "Novel applications of liposomes." *Trends in biotechnology* 16.7 (1998): 307-321.

Lee, D., et al. "Infrared spectroscopic studies of biomembranes and model membranes." *Bioscience reports* 6.3 (1986): 235-256.

Lima, E., et al. "Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas." *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 37.3 (2001): 293-303.

López-García, F., et al. "Infrared spectroscopic study of the interaction of diacylglycerol with phosphatidylserine in the presence of calcium." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* 1169.3 (1993): 264-272.

Lopez-Lazaro, M. "Flavonoids as anticancer agents: structure-activity relationship study." *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents* 2.6 (2002): 691-714.

Machado, L., et al. "Lipossomas aplicados em farmacologia: uma revisão da literatura." *Estudos de Biologia* (2007): 215-224.

Maheshwari, R., et al. "Multiple biological activities of curcumin: a short review." *Life sciences* 78.18 (2006): 2081-2087.

Mannock, D., et al. "A calorimetric and spectroscopic comparison of the effects of ergosterol and cholesterol on the thermotropic phase behavior and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1798.3 (2010): 376-388.

Manrique-Moreno, M., et al. "Physicochemical interaction study of non-steroidal anti-inflammatory drugs with dimyristoylphosphatidylethanolamine liposomes." *Letters in Drug Design & Discovery* 7.1 (2010): 50-56.

Mantsch, H., et al. "Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy." *Chemistry and physics of lipids* 57.2 (1991): 213-226.

Martins, V., et al. "Estudio de la hidrólisis de curcumina microencapsulada." (2013). *membrane characteristics of HTC cells. Nutr. Cancer*.33, (1999): 100-104.

Marques, A., et al. "Isoniazid interaction with phosphatidylcholine-based membranes." *Journal of Molecular Structure* 1051 (2013): 237-243.

Mertins, O., et al. "Caracterização da pureza de fosfatidilcolina da soja através de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>31</sup>P." *Química nova. São Paulo*. 31.7 (2008): 1856-1859.

Moreno, M., et al. "The membrane-activity of ibuprofen, diclofenac, and naproxen: a physico-chemical study with lecithin phospholipids." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1788.6 (2009): 1296-1303.

Mosmann, T. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *Journal of immunological methods* 65.1 (1983): 55-63.

Nagaraju, G., et al. "The impact of curcumin on breast cancer." *Integrative Biology* 4.9 (2012): 996-1007.

Negi, P., et al. "Antibacterial activity of turmeric oil: a byproduct from curcumin manufacture." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47.10 (1999): 4297-4300.

Padhye, S., et al. "Perspectives on chemopreventive and therapeutic potential of curcumin analogs in medicinal chemistry." *Mini reviews in medicinal chemistry* 10.5 (2010): 372.

Pati, H., et al. "Cytotoxic 3, 5-bis (benzylidene) piperidin-4-ones and N-acyl analogs displaying selective toxicity for malignant cells." *European journal of medicinal chemistry* 43.1 (2008): 1-7.

Perkampus, H. *UV-VIS Spectroscopy and its Applications*. Berlin: Springer-Verlag, 1992.

Purkayastha, S., et al. "Curcumin blocks brain tumor formation." *Brain research* 1266 (2009): 130-138.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmacologia*, 5<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro (Brasil): Elsevier; 2003.

Romero, F., et al. "Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease." *Environmental Health Perspectives* 106.Suppl 5 (1998): 1229.

Santos, N., et al. "Lipossomas: a bala mágica acertou?." *Química Nova* 25.6/B (2002): 1181-1185.

Satoskar, R., et al. "Evaluation of anti-inflammatory property of curcumin (diferuloyl methane) in patients with postoperative inflammation." *International journal of clinical pharmacology, therapy, and toxicology* 24.12 (1986): 651-654.

Schaffazick, S., et al. "Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco." *Acta Farm. Bonaerense* 21.2 (2002): 99-106.

Severcan, F., et al. "Melatonin strongly interacts with zwitterionic model membranes—evidence from Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1668.2 (2005): 215-222.

Shishodia, S., et al. "Curcumin: getting back to the roots." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1056.1 (2005): 206-217.

Sidhu, G., et al. "Enhancement of wound healing by curcumin in animals." *Wound Repair and Regeneration* 6.2 (1998): 167-177.

Singh, K., et al. "Liposomal ophthalmic drug delivery system I. Triamcinolone acetate." *International journal of pharmaceuticals* 16.3 (1983): 339-344.

Sjödin, B., et al. "Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise." *Sports Medicine* 10.4 (1990): 236-254.

Suárez, J. "estratégia de síntese de fenóis e derivados polifuncionais com propriedades antitumorais e baixa toxicidade." *Revista de Pesquisa e Inovação Farmacêutica* 1.1 (2009).

Tamm, L., et al. Tatulian. "Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers." *Quarterly reviews of biophysics* 30.04 (1997): 365-429.

Tatulian, S. "Effect of lipid phase transition on the binding of anions to dimyristoylphosphatidylcholine liposomes." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 736.2 (1983): 189-195.

Toyran, N., et al. "Competitive effect of vitamin D<sub>2</sub> and Ca<sup>2+</sup> on phospholipid model membranes: an FTIR study." *Chemistry and physics of lipids* 123.2 (2003): 165-176.

Vemuri, S., et al. "Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review." *Pharmaceutica Acta Helveticae* 70.2 (1995): 95-111.

Ulrich, A., et al. "Hydration of DOPC bilayers by differential scanning calorimetry." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1191.1 (1994): 225-230.

Vila, A., et al. "Design of biodegradable particles for protein delivery." *Journal of Controlled Release* 78.1 (2002): 15-24.

Wahlström, B., et al. "A study on the fate of curcumin in the rat." *Acta pharmacologica et toxicologica* 43.2 (1978): 86-92.

Yadav, B., et al. "Synthesis and cytotoxic potential of heterocyclic cyclohexanone analogues of curcumin." *Bioorganic & medicinal chemistry* 18.18 (2010): 6701-6707.

Yamakoshi, H., et al. "Structure–activity relationship of C 5-curcuminoids and synthesis of their molecular probes thereof." *Bioorganic & medicinal chemistry* 18.3 (2010): 1083-1092.

Yi, P., et al. "Temperature dependence of optical properties of aqueous dispersions of phosphatidylcholine." *Chemistry and Physics of Lipids* 11.2 (1973): 114-134.

Zanotto-Filho, A., et al. "The curry spice curcumin selectively inhibits cancer cells growth in vitro and in preclinical model of glioblastoma." *The Journal of nutritional biochemistry* 23.6 (2012): 591-601.

Pimentel, L., et al. "Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária." *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 43.4 (2007).