

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

FERNANDA FRANÇA DE SOUZA

**EFEITO ANTI-PROLIFERATIVO DE CURCUMINA ASSOCIADA Á
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS FUNCIONALIZADAS COM BICAMADA
DE ÁCIDO LÁURICO SOBRE CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO**

SKMEL 37

Goiânia-Goiás, 2011

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

FERNANDA FRANÇA DE SOUZA

**EFEITO ANTI-PROLIFERATIVO DE CURCUMINA ASSOCIADA Á
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS FUNCIONALIZADAS COM BICAMADA
DE ÁCIDO LÁURICO SOBRE CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO**
SKMEL 37

Orientadora: Prof^a Dr^a Lídia Andreu Guillo

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia- ICB/UFG, como requisito para obtenção do título de mestre em Biologia, área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Goiânia-Goiás, 2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG

Souza, Fernanda França de.
S719e Efeito anti-proliferativo de curcumina associada à
nanopartículas magnéticas funcionalizadas com bicamada de
ácido láurico sobre células de melanoma humano skmel 37
[manuscrito] / Fernanda França de Souza. – 2011.
43 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lídia Andreu Guillo.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,
Instituto de Ciências Biológicas, 2011.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

Apêndices.

1. Melanoma. 2. Curcumina. 3. Nanopartículas
magnéticas – Tratamento - Melanoma. I. Título.

CDU: 616-006.81

Aos meus pais pelo incentivo e carinho. Ao meu esposo Roberto pela dedicação, pela paciência, pelo companheirismo e principalmente pela compreensão nos momentos mais difíceis. Te amo muito!

AGRADECIMENTOS

Á Deus por estar sempre presente me dando forças pra sempre seguir em frente.

Aos meus pais pelo amor incondicional.

Ao meu esposo Roberto por estar sempre presente.

Á Profª Drª Lúcia Andreu Guillo por ter me aceitado e me orientado durante essa árdua caminhada.

As amigas de laboratório Débora, Ludimila, Kárita, Érika, Elayne, Iara. Meninas obrigada pelo apoio durante o trabalho, mas em especial, obrigada por tornarem os meus dias muito mais alegres e felizes!! Amo vocês!

Á Drª Emília Celma O. Lima e sua equipe pela síntese das nanopartículas magnéticas.

Aos que de forma direta ou indireta contribuíram para esse trabalho.

Á CAPES, FUNAPE/UFG pelo apoio financeiro.

OBRIGADA Á TODOS!

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Melanoma	4
2.2. Curcumina	6
2.2.1. Atividades das curcumina	9
2.2.1.1. Efeito antiinflamatório	9
2.2.1.2. Efeito antioxidante	10
2.2.2. Curcumina e câncer	10
2.3. Nanopartículas magnéticas	13
3. JUSTIFICATIVA	16
4. OBJETIVOS GERAIS	17
4.1. Objetivos específicos	17
5. MATERIAIS E MÉTODOS	18
6. RESULTADOS	24
7. DISCUSSÃO	32
8. CONCLUSÕES	35
9. REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AP-1- *Activator protein 1*
BSA- *Bovine serum albumin*
DAPI- *4',6-diamidino-2-phenylindole*
Dh- *Hydrodynamic diameter*
DMSA- *Dimercaptosuccinic Acid*
DMSO- *Dimethyl sulfoxide*
DPBS- *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*
DRIFTS- *Infrared spectroscopy and Fourier transform diffuse reflectance*
Fas-L- *Fas ligand*
FBS- *Fetal Bovine Serum*
HeLa- *Células de carcinoma cervical*
HIF-1- [*Hypoxia-inducible factors 1*](#)
HO-1- *Oxygenase-1*
IFN- γ - *Interferon-gamma*
IgG- *Imunoglobulina G*
IL-6- *Interleukin-6*
IL-12- *Interleukin-12*
IL-1 β - *Interleukin-1 beta*
LD₅₀ - *Dose letal mediana*
MEM- *Modified Eagle's medium*
MTT- *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*
NF- κ B- *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
Notch-1- *Notch homolog 1*
PBS- *Phosphate Buffered Saline*
PEG- *Polietilglicol*
pH- *Potencial de hidrogênio*
PLGA- *ácido polilactocoglicólico*
PVA- *Polivenilalcool*
PVP- *Polivinilpirrolidona*
RNA- *Ribonucleic Acid*
SK-MEL- 37- *Células do melanoma humano*
SPION- *Superparamagnetic Iron oxide Nanoparticles*
STAT-3- *Signal transducer and activator of transcription 3*
TNF- α - *Tumor necrosis factor-alpha*
UV- *Ultra-violeta*
XRD- *X-ray diffraction*

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1:** Representação esquemática das várias etapas da carcinogênese. 7
- Figura 2:** *Curcuma longa* L. 9
- Figura 3:** Estrutura química de curcuminóides extraídos de *Curcuma longa* 10
- Figura 4:** Direcionamento de nanopartículas através de campo magnético externo 17

RESULTADOS

- Figura 5:** Entrada das nanopartículas na célula 28
- Figura 6:** Microscopia de fluorescência 29
- Figura 7:** Alterações morfológicas causadas por por curcumina associada a nanopartículas magnéticas 30
- Figura 8:** Alterações morfológicas causadas por por curcumina livre 31

RESUMO

A curcumina surgiu como uma grande promessa para tratamento do câncer e de quimioprevenção com a curcumina, porém sua baixa solubilidade em água e sua biodisponibilidade sistêmica é mínima. Tentativas foram feitas para melhorar a sua solubilidade em soluções aquosas através da incorporação de curcumina em lipossomas ou micelas, mas esses sistemas têm estabilidade baixa. Além disso, as nanopartículas magnéticas têm sido usadas como promissores sistemas de entrega de drogas, pois podem ser funcionalizadas para se tornarem solúveis em água e biocompatíveis. Estudos com curcumina incorporada a nanopartículas magnéticas ainda são escassos. Esse estudo tem por objetivo avaliar o efeito anti-proliferativo de curcumina associada a nanopartículas magnéticas funcionalizadas com bicamada de ácido láurico em células de melanoma humano da linhagem SKMEL 37. Células de melanoma humano foram tratadas em diferentes concentrações e a citotoxicidade foi avaliada por ensaio de MTT. A morfologia das células foi avaliada através de microscopia óptica e de fluorescência. Nossos estudos mostraram que a curcumina incorporada em nanopartículas possui efeito citotóxico em concentrações acima de 40,8 µg/ml ou 111 µM. Já a curcumina livre provocou morte significativa em concentrações acima de 11,5 µM. Observamos também alterações morfológicas típicas do processo de apoptose, como condensação de cromatina, fragmentação nuclear e formação de *Blebs*. Estes achados nos mostram que, tanto sua atividade citotóxica, como ambas as propriedades magnéticas e sua solubilidade em água fazem desta nova formulação com curcumina um composto interessante para uso terapêutico.

Palavras-Chave: Nanopartículas magnéticas, Melanoma, Câncer, Curcumina

ABSTRACT

Curcumin has emerged as a great promise for cancer treatment and chemoprophylaxis with curcumin, but its low solubility in water is minimal systemic bioavailability. Attempts were made to improve its solubility in aqueous solutions by incorporating curcumin in liposomes or micelles, but these systems have low stability. In addition, magnetic nanoparticles have been used as promising drug delivery systems because they can be functionalized to become water soluble and biocompatible. Studies with curcumin incorporated into the magnetic nanoparticles are still scarce. This study aims to evaluate the antiproliferative effect of curcumin combined with magnetic nanoparticles functionalized bilayer of lauric acid in human melanoma cell line SKMEL 37. Human melanoma cells were treated at different concentrations and cytotoxicity was evaluated by MTT assay. The cell morphology was evaluated by light microscopy and fluorescence. Our studies have shown that curcumin has incorporated into nanoparticles cytotoxic effect at concentrations above 40,8 µg/ml or 111 µM. Since free curcumin caused significant death at concentrations above 11.5 µM. We also observed morphological changes typical of apoptosis such as chromatin condensation, nuclear fragmentation and bleb formation. These findings show us that both their cytotoxic activity, as both the magnetic properties and its solubility in water make this new formulation with a curcumin compound interest for therapeutic use.

Keywords: Magnetic nanoparticles, Melanoma, Cancer, Curcumin

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer no Rio de Janeiro (2010), o número de casos novos de câncer de pele não melanoma estimado para o Brasil no ano de 2011 será de 53.410 entre homens e de 60.440 nas mulheres. Estes valores correspondem a um risco estimado de 56 casos novos a cada 100 mil homens e 61 para cada 100 mil mulheres. O câncer de pele não melanoma é o mais incidente em homens na maioria das regiões do Brasil, com um risco estimado de 85/100.000 na Região Sul, 55/100.000 na Região Nordeste, 53/100.000 na Região Sudeste e 25/100.000 na Região Norte; enquanto que na Região Centro-Oeste (44/100.000) é o segundo mais frequente. Nas mulheres é o mais frequente nas regiões Sul (87/100.000), Centro-Oeste (66/100.000), Nordeste (61/100.000) e Norte (28/100.000); enquanto que na Região Sudeste (56/100.000) o mesmo é o segundo mais frequente. Quanto ao melanoma, a incidência é baixa (2.960 casos novos em homens e 2.970 em mulheres), porém sua letalidade é alta. As maiores taxas estimadas encontram-se na região Sul do país. Fatores como cor da pele, histórico de queimaduras solares, fenótipo propenso a desenvolver nevus (CAINI et al., 2009), exposição ao sol, pessoas fumantes e histórico de neoplasia prévia (NAGORE, et al., 2009) são alguns dos principais fatores de risco associados ao melanoma cutâneo.

Um dos maiores problemas na oncologia são os mecanismos de resistência intrínseca a quimioterapia, que envolve o efluxo das drogas (COLIN et al., 1996). O câncer é uma doença hiperproliferativa que normalmente é tratada por radiação e agentes quimioterápicos que são tóxicos, não apenas para células tumorais, mas também para as células normais. Além de serem tóxicos, esses agentes muitas vezes não são muito eficazes no aumento da sobrevida global de pacientes com câncer e podem ser muito caros e, portanto, não são acessíveis para a maioria. Além disso, esses agentes não podem ser usados para prevenção do câncer. A medicina tradicional é geralmente livre de efeitos colaterais deletérios e na maioria das vezes é de baixo custo (YADAV, et. al., 2010).

Curcumina é o ingrediente ativo de uma planta medicinal (*Curcuma Longa Linn*) conhecida popularmente como açafrão. Além de seus conhecidos efeitos como anti-inflamatório e anti-oxidante (ITOKAWA et al., 2008; HATCHER et al., 2008), outras atividades da curcumina incluem a diminuição do nível do colesterol no sangue, supressão de trombose e infarto do miocárdio, supressão dos sintomas associados a diabetes tipo II, artrite reumatóide, reforço na cicatrização de feridas, proteção contra lesões hepáticas, cataratas, previne a toxicidade pulmonar e fibrose, bem como atividade anti-tumoral (ODOT et al., 2004).

As propriedades anticancerígenas da curcumina foram atribuídas à modulação de diversas vias moleculares. A curcumina diminui a expressão do fator de transcrição NF- κ B (AGGARWALL et al., 2006) envolvido na via de sobrevivência da célula (GOEL et al., 2008).

Apesar da grande promessa de que a curcumina seja um componente seguro e eficaz na terapia do câncer e na quimioprevenção, o principal problema encontrado pelos pesquisadores é a reduzida biodisponibilidade da curcumina quando esta é administrada por via oral (SHARMA et al., 2004). Os estudos realizados nas três décadas passadas relacionados com a absorção, biodistribuição, metabolismo e excreção da curcumina revelaram baixa absorção e alto metabolismo hepático da curcumina, o que restringe a sua biodisponibilidade (ANAND et al., 2007). Portanto, o desenvolvimento de um sistema de entrega que permita a administração eficiente da curcumina em um meio aquoso é de suma importância para que se possa aproveitar o potencial deste promissor agente contra o câncer (BISHT et al., 2007).

Os sistemas nanoparticulados vêm apresentando grande potencial no carreamento de drogas, por isso, são cada vez mais investigados a fim de aproveitar seu potencial (MISHRA et al., 2009).

Extensas investigações demonstraram o enorme potencial das nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPION) em uma ampla variedade de aplicações médicas e biológicas (GUPTA et al., 2007) tais como carreamento de drogas, ressonância magnética, técnicas de hipertermia e separação de células, e ainda no reparo tecidual (ARRUEBO et al., 2007). As nanopartículas podem ainda ser funcionalizadas com bicamada de surfactantes como o dextran (BISHT & MAITRA, 2009) e o agente terapêutico

de interesse pode ser incorporado na bicamada desse surfactante (JAIN, 2005). FREITAS et al. (2008) demonstraram em um recente estudo que nanopartículas magnéticas de óxido de ferro revestidas com DMSA, ácido cítrico e ácido láurico não são tóxicas, e que entre as três nanopartículas testadas, apenas as revestidas por ácido láurico induziram uma significativa morte celular via apoptose quando utilizadas em elevadas concentrações, acima de 254 $\mu\text{g/ml}$. Isso sugere que nanopartículas magnéticas revestidas com ácido láurico, DMSA e ácido cítrico podem ser utilizados como carreadoras de drogas no tratamento contra o melanoma humano.

Diante dessa possibilidade, nós verificamos que estudos com curcumina incorporada a nanopartículas magnéticas são ainda inexistentes. Portanto, a finalidade do presente estudo é avaliar o efeito da curcumina associada a nanopartículas magnéticas funcionalizadas com bicamada de ácido láurico em culturas de células do melanoma humano SKMEL 37.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. MELANOMA

O melanoma maligno é um tumor maligno que surge a partir de células melanocíticas e envolve principalmente a pele. Os melanomas também podem surgir nos olhos (conjuntiva úvea e corpo ciliar), meninges e em diversas superfícies de mucosas. Embora os melanomas sejam geralmente muito pigmentados, eles também podem ser amelanóticos. Mesmo pequenos tumores têm uma tendência a metástases e, portanto, têm prognóstico relativamente desfavorável. Os melanomas representam 90% das mortes associadas com tumores cutâneos (GARBE, et al., 2010).

A transformação de melanócitos normais em células malignas envolve uma série de eventos, incluindo a desregulamentação de fatores que restringem o crescimento celular (supressores tumorais) e aumento na função de fatores que promovem o crescimento celular (promotores de tumor). Em melanócitos normais e até mesmo em células de melanoma malignas superficiais, os mecanismos de proliferação celular limitam-se em resposta a estímulos externos. Em contraste, nos melanomas invasivos, as células malignas apresentam um sistema autônomo de multiplicação externa independente de estímulos, resultando em rápido crescimento (SANCHEZ, et al., 2009).

Existem basicamente cinco formas ou tipos histológicos de melanoma: melanoma extensivo superficial, melanoma nodular, melanoma maligno lentigo, melanoma acral lentiginoso e melanoma mucoso lentiginoso (CALIFANO & NANCE, 2009).

Os melanomas malignos podem apresentar um ou dois componentes de acordo com seu padrão de crescimento e estágio de desenvolvimento. Estes componentes são descritos como fase de crescimento radial e fase de crescimento vertical. O melanoma maligno *in situ* e no início do melanoma invasivo apresenta apenas a fase de crescimento radial. O melanoma nodular, por outro lado, mostra apenas uma fase de crescimento vertical. Esta é caracterizada por um elemento expansivo invasivo sem uma notável fase de

crescimento radial. A fase de crescimento radial representa o estágio inicial do melanoma em desenvolvimento e é caracterizada por um prolongado crescimento intraepidermal ou microinvasor. Uma vez que a lesão tenha adquirido uma forma invasora mais agressiva, é considerada como tendo entrado na fase vertical de crescimento. Por isso a fase de crescimento vertical representa um estágio mais avançado no desenvolvimento do melanoma, com o surgimento de células que têm a capacidade de crescimento expansivo, com o predominate componente invasivo, com ou sem atividade mitótica e com distorção na arquitetura da derme capilar. Lesões apenas com fase de crescimento radial, normalmente têm um excelente prognóstico e são virtualmente curáveis pela excisão. Depois que a lesão adquire crescimento vertical, considera-se um potencial metastático e pobre prognóstico (PIRIS, & MIHM, 2009)

Fatores de risco para melanoma incluem: histórico pessoal de melanoma- um paciente com um histórico de melanoma tem claramente um risco maior de desenvolver melanoma subsequente. É comumente citado que 1-8% dos pacientes com história prévia de melanoma irá desenvolver múltiplos melanomas primários; histórico pessoal de câncer de pele não-melanoma- incluindo carcinoma de células basais e carcinoma espinocelular, estão fortemente relacionados à exposição de UV, e, portanto, o risco de melanoma nesses pacientes é aumentado; Idade e sexo- melanoma tende a ocorrer numa idade mediana de 62 anos em homens e 54 anos em mulheres. O risco aumenta com o avanço da idade, especialmente nos homens. Em comparação com a mesma idade nas mulheres, os melanomas nos homens mais velhos são mais susceptíveis ao rápido crescimento e espessura, e são predominantemente nodulares; exposição solar- a exposição solar UV é o mais importante fator de risco ambiental para o melanoma e é o único que é potencialmente modificável. Pessoas que moram em baixas latitudes e em áreas ensolaradas são geralmente as mais expostas e as com pele clara são as mais susceptíveis. Porém, curiosamente, o papel da luz solar no desenvolvimento do melanoma não segue uma relação linear dose-resposta (PSATY, et al., 2010).

2.2. CURCUMINA

Muitos dos agentes conhecidos atualmente na quimioprevenção são extratos de plantas que estão subdivididos em duas classes: (i) agentes bloqueadores, que inibem a etapa de iniciação, impedindo a ativação cancerígena e (ii) os agentes supressores, que inibem a proliferação de células malignas durante as etapas de promoção e progressão da carcinogênese (Fig. 1). Uma classe distinta de agentes quimiopreventivos, incluindo a curcumina, pertencem a ambas as categorias e apresentam múltiplos mecanismos de ação (DUVOIX, et al., 2005)

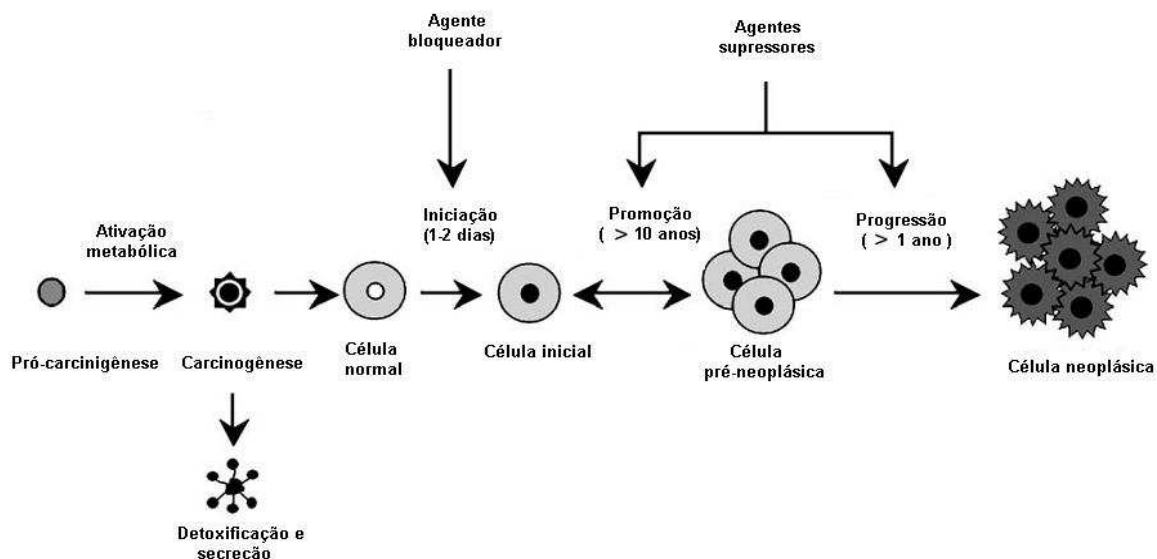


Fig.1: Representação esquemática das várias etapas da carcinogênese. (SURH, Y, 1999) Com modificações.

Curcumina é um corante natural amarelo derivado do rizoma da *Curcuma longa* Linn (Fig. 2), uma planta originária da Índia, popularmente conhecida como acafrão. O uso medicinal dessa planta tem sido bem relatado na medicina Ayurveda por mais de 6000 anos. A curcumina é insolúvel em água e éter, mas é solúvel em etanol, dimetilsulfóxido e outros solventes orgânicos. A curcumina comercial contém três componentes principais:

curcumina (77%), demetóxicurcumina (17%) e bisdemetóxicurcumina (3%), que juntos são referidos como curcuminóides (Fig. 3)(AGGARWAL, et al., 2003).

O complexo curcuminóide é também conhecido como açafrão da Índia, gengibre amarelo, raiz amarela, *Kacha haldi*, Ukon ou amarelo natural. Curcuminóides estão presentes de 3-5% no açafrão. Embora principalmente cultivadas na Índia, sudeste asiático, China, outros países asiáticos e em regiões tropicais, o açafrão-da-Índia também é comum em outras partes do mundo onde é reconhecida por diferentes nomes. A curcumina possui ponto de fusão de 183 °C, sua fórmula molecular é $C_{21}H_{20}O_6$, e peso molecular de 368,37 g/mol (GOEL, et al., 2008).

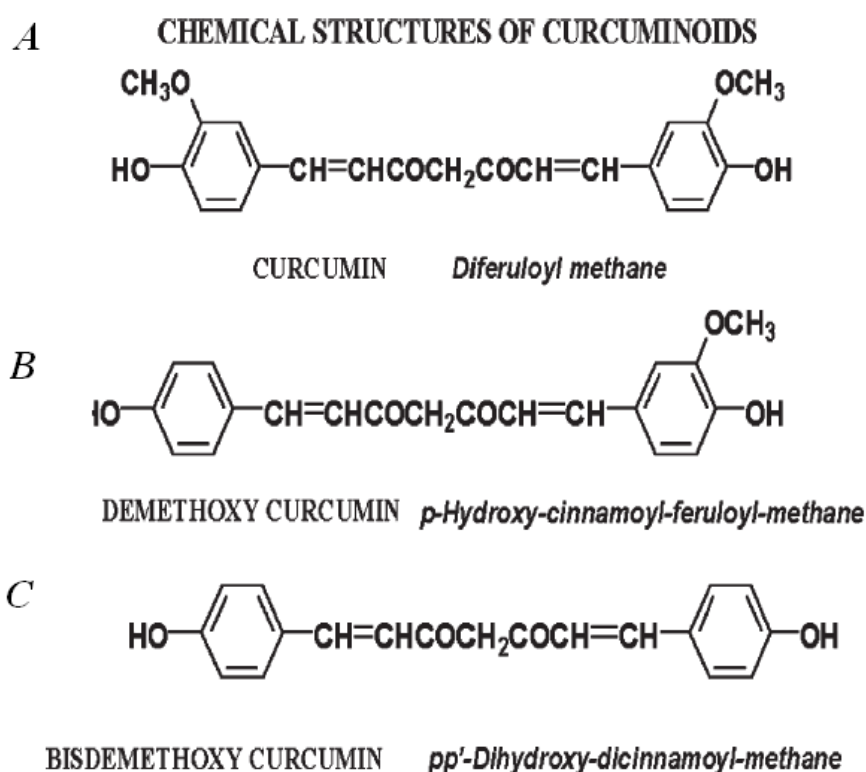


Fig. 3: Estrutura química de curcuminóides extraídos de *Curcuma longa*. **(A)**Curcumina, **(B)** Demetóxicurcumina e **(C)** Bisdemetóxicurcumina. Fonte: Maheshwari, et al., 2006.

Estudos sobre absorção, biodistribuição, metabolismo e eliminação da curcumina mostraram que a baixa absorção, rápido metabolismo e eliminação são as principais razões para a pouca biodisponibilidade deste interessante composto. Estudos recentes demonstram que o bloqueio da metabolização

hepática da curcumina através do uso de outras substâncias contribui para o aumento da biodisponibilidade desse composto. Outra forma é através do uso de nanocarreadores como nanopartículas, lipossomas, micelas e complexos fosfolipídicos que parecem possibilitam um tempo maior de circulação corpórea, melhor permeabilidade e maior resistência a processos metabólicos degradativos (ANAND, et al., 2007).



Fig. 2: *Curcuma longa* L. ([Botanical.com](http://www.botanical.com/botanical/mgmh/t/turmer30), <http://www.botanical.com/botanical/mgmh/t/turmer30>. Acessado em Dezembro de 2010).

2.2.1 ATIVIDADES DA CURCUMINA

2.2.1.1. *Efeito antiinflamatório*

Estudos mostraram que a curcumina inibe o metabolismo do ácido araquidônico, a atividade da ciclooxigenase, lipoxigenase, citocinas (interleucinas e fator de necrose tumoral), fator nuclear kB (NF-kB) e a liberação de esteróides. A curcumina estabiliza membranas lisossômicas e causa desacoplamento da fosforilação oxidativa. Também possui forte atividade captora de radical de oxigênio, o que confere propriedades antiinflamatórias. Em ratos com artrite induzida, a administração de curcumina reduziu significativamente o edema inflamatório em relação ao controle (KOHLI, et al., 2005).

Os efeitos antiinflamatórios da curcumina são parcialmente mediados através da inibição da transcrição do fator NF-kappa B e da proteína ativadora AP-1. Sabe-se que, AP-1 e NF-kappa B agem sinergicamente podendo promover a progressão do tumor. O tratamento de células de glioma com 25µM de curcumina diminui a ligação de AP-1 e NF-kappa B. A curcumina também suprime a ativação de AP-1 e TNF-α em células endoteliais da aorta bovina. O lançamento de citocinas pró-inflamatórias para ativação de células imunológicas exerce um papel importante na resposta inflamatória. A curcumina exerce efeitos inibitórios sobre a expressão de citocinas pró-inflamatórias, TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-12 e IFN-γ estimulando linfócitos do baço, monócitos, macrófagos e células dendríticas (BISHT, et al., 2010).

A curcumina demonstrou benefícios como antiinflamatório, despertando um interesse particular sobre sua utilização em doenças do intestino. A doença de Crohn e a colite ulcerativa são fontes consideráveis de morbidade, e suas incidências vêm aumentando no mundo todo. Muitos estudos em diversos modelos dessas doenças fornecem provas pré-clínicas fortes para o benefício do uso da curcumina. Por exemplo, em camundongos com colite ulcerativa e que possuem resistência a multidrogas, a adição de curcumina á sua dieta reduziu significativamente a inflamação intestinal (EPSTEIN, et al. 2010).

2.2.1.2. Efeito antioxidante

A proteína endotelial heme oxigenase-1 (HO-1) é uma proteína induzida pelo estresse celular. Sua principal ação é a degradação da heme no antioxidante biliverdina e na molécula de monóxido de carbono. A incubação *in vitro* de células endoteliais da aorta bovina com curcumina (5-15 μ M) resultou num aumento de RNAm de HO-1, da expressão da proteína e da atividade enzimática da heme oxigenase dose-tempo dependente. Resultados semelhantes foram encontrados após a incubação de células tubulares proximais renais humanas com curcumina (1-8 μ M). O mecanismo postulado para essas observações envolve as vias NF- κ B e mecanismos da transcrição. O aumento da atividade da heme oxigenase-1 também parece desempenhar um importante papel na citoproteção mediada pela curcumina contra o estresse oxidativo (STRIMPAKOS & SHARMA, 2008).

O potencial antioxidante dos complexos de curcumina foi investigado por outra abordagem. O complexo manganês-curcumina e seu derivado diacetil demonstraram um aumento na atividade da superóxido dismutase, sequestradora de radicais OH $\cdot$ e atividade de limpeza do óxido-nítrico. O complexo de cobre-curcumina também exibiu atividade antioxidante e eliminação de superóxido (ANAND, et al., 2008).

2.2.2. CURCUMINA E CÂNCER

A curcumina inibe o desenvolvimento e a progressão do câncer, atuando em várias etapas da via de malignidade. A curcumina possui ambas atividades como agente bloqueador, inibindo a iniciação do câncer, quanto como agente supressor, impedindo a proliferação de células malignas durante a promoção e progressão da carcinogênese. Uma atividade interessante da curcumina é a capacidade de exercer efeito radioprotetor em células normais e efeito radiosensível em células de câncer. Embora o mecanismo pelo qual a curcumina exerce estes efeitos opostos ainda não tenha sido elucidado, tem-se sugerido que a curcumina possui a habilidade de reduzir o estresse oxidativo e de inibir a transcrição de genes relacionados á respostas ao estresse oxidativo e as respostas inflamatórias, que podem proteger a célula contra os efeitos da radiação, enquanto que a atividade radiosuscetível pode ser devido a hipersensibilização de genes responsáveis pela morte celular (HATCHER, *et al.*, 2008).

A transcrição de proteínas ativadoras de fatores (AP)-1, fator nuclear Kappa B (NF- κ B), sinais transdutores e ativadores da transcrição (STAT)-3, β -catenina, fator indutor de hipóxia (HIF)-1 e Notch-1 são upregulados na maioria dos cânceres. Estes estão envolvidos na proliferação celular, invasão celular, metástases, angiogênes e resistência a quimioterapia e radioterapia. O fator de transcrição NF- κ B é constitutivamente expresso em quase todos os tipos de cânceres e suprime a apoptose em uma grande variedade de tumores. A constitutiva expressão de NF- κ B tem sido relatada em linhas de células cancerosas humanas em cultura, em tumores mamários induzidos em ratos e nas biópsias de pacientes com câncer. Varios estudos demonstraram que a curcumina inibe a ativação de NF- κ B por indutores, tais como o TNF, o peróxido de hidrogênio, o éster forbol, a fumaça de cigarro condensada, a interleucina-1, 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato e drogas anti-câncer (KUNNUMAKKARA, *et al.*, 2008).

Embora a indução de morte celular pela curcumina seja principalmente por apoptose, outros tipos de mecanismos responsáveis pela morte celular induzida pela curcumina têm sido descritos. Estudos mostraram que a curcumina reduz a proliferação de células cancerosas do cólon humano, sem

apoptose. Outros estudos descrevem ainda que a curcumina induz uma nova via de apoptose, independente de mitocôndria e das caspases, em linfoblastóide humano. Autofagia, designada como morte celular programada II é caracterizada pela formação de vacúolos autofágicos no citoplasma e foi a responsável pela morte de células de glioma maligno (REUTER, et al., 2008).

A progressão do câncer, invasão local e metástases exigem a participação de moléculas produzidas pelo tumor ou através de sua interação com a matriz circundante. Essas moléculas influenciam a interação celular e a aderência. Similar a inibição de fatores angiogênicos, a curcumina tem se mostrado reguladora de proteínas relacionadas à adesão celular, tais como β -catenina, E-caderina, e proteínas inibidoras da produção de citocinas relevantes para o crescimento do tumor, como TNF- α e interleucina-1. Além disso, a curcumina demonstrou reduzir a expressão de moléculas da superfície membranar, como a molécula-1 de adesão intracelular, molécula-1 de adesão vascular, e E-selectina, que desempenha papel na adesão celular (DAS, et al., 2010).

As drogas quimioterápicas são mais eficazes quando administradas combinadas (quimioterapia combinada). A justificativa para o uso de quimioterapia combinada é usar drogas que trabalhem com diferentes mecanismos de ação, diminuindo assim a probabilidade de resistência do câncer. Estudos descobriram que a curcumina combinada com o chá verde tem seu efeito inibitório aumentado contra a carcinogênese oral em hamsters na fase pós-iniciação e esta inibição pode estar relacionada à supressão da proliferação celular, a indução da apoptose e a inibição da angiogênese. Outro produto natural isolado de plantas, o Taxol, é um agente anticancerígeno bom, mas sua desvantagem é o limite da dose, devido sua toxicidade. Portanto, uma combinação de Taxol com curcumina poderia ser potencial para aplicações clínicas. Estudos demonstraram que a combinação de curcumina aumenta os efeitos anticancerígenos do Taxol em células HeLa (REUTER, ET AL., 2008).

A curcumina mostrou ter efeito diferencial em células normais como células endoteliais, linfócitos, hepatócitos, fibroblastos, timócitos e células epiteliais mamárias. O porque da curcumina matar células tumorais e não matar células normais ainda não foi totalmente compreendido, mas diversas razões têm sido sugeridas. Primeiro, a absorção e métodos espectroscópicos

de fluorescência mostraram que a absorção de curcumina é maior em células tumorais. Segundo, os níveis de glutathione em células tumorais tendem a ser inferiores do que em células normais, aumentando assim a sensibilidade das células tumorais à curcumina. E terceiro, a maioria das células tumorais, mas não as células normais, expressam constitutivamente NF- κ B ativo que media sua sobrevivência. A curcumina pode suprimir a sobrevivência e proliferação das células tumorais através da supressão de produtos gênicos NF- κ B (RAVINDRAN, et al., 2009).

2.3. NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

A nanotecnologia têm aberto uma nova era da tecnologia que afeta todos os setores da vida humana. Eletrônica e computadores, móveis, telefones, alimentos e agricultura, indústria de cosméticos, tintas e, claro, saúde. Um nanômetro (nm) equivale a 1×10^{-9} metros e, para comparação, um único fio de cabelo humano tem cerca de 80.000 nm de diâmetro e uma célula vermelha do sangue tem um diâmetro de 7.000 nm. Por definição, nanoescala varia de 100 nm até o tamanho dos átomos (cerca de 0,2 nm). Nesta escala, as propriedades dos materiais são muito diferentes de seus equivalentes em massa. Assim, os nanomateriais possuem uma superfície relativamente maior quando comparado ao material a de tamanho normal e por essa razão, são mais reativos quimicamente. De fato, alguns materiais são inertes e tornam-se reativos somente em sua forma nanométrica (RAFFA, et al., 2010).

Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPION) pertencem à classe de nanopartículas com base em um núcleo de óxido de ferro que podem ser revestidas por material inorgânico (sílica, ouro), ou materiais orgânicos sintético/naturais (fosfolípidos, ácidos graxos, polissacarídeos, polímeros naturais como dextran ou quitosana, polímeros biodegradáveis como polietilglicol (PEG), polímeros não biodegradáveis como poli-alcóol-vinílico (PVA), peptídeos e outros tensioativos. Estes SPIONs muitas vezes são classificados pela sua dimensão, o que inclui o núcleo de óxido de ferro e o revestimento/funcionalização, chamado de diâmetro hidrodinâmico. A maior parte dessa classe pode ser usada por via oral e é composta por nanopartículas de tamanhos entre 300nm e 3,5 nm. As SPIONs mais usados estão entre 60-150 nm e são usados como agentes de ressonância magnética ou como sistemas de entrega de drogas (HOFMANN-AMTENBRINK, et al., 2010).

Para que as nanopartículas superparamagnéticas tenham aplicações biológicas, elas devem primeiramente serem estabilizadas contra a absorção não-específica pelo sistema reticuloendotelial. Devido à sua grande área de superfície, quando exposta a uma resposta fisiológica, as nanopartículas tendem a interagir com proteínas plasmáticas, causando aumento no tamanho, o que muitas vezes resulta em aglomeração grave. Elas também podem ser

consideradas como intrusas pelo sistema imunológico inato e serem prontamente reconhecidas e endocitadas pelos macrófagos. Em ambos os casos, as partículas serão removidas da circulação, perdendo sua função, levando a uma drástica redução da eficiência terapêutica e de diagnósticos baseados em nanopartículas. Para diminuir a aglomeração de plasma e para fugir do sistema reticuloendotelial por mais tempo, as nanopartículas podem ser revestidas com um surfactante (XU & SUN, 2009).

A adição do surfactante é conseguida através da adsorção de moléculas anfifílicas que contêm tanto um segmento hidrofóbico quanto um componente hidrofílico. O segmento hidrofóbico forma uma estrutura de dupla camada com a cadeia do hidrocarboneto original, enquanto os grupos hidrofílicos são expostos para o exterior das nanopartículas, em contato com a água. Existem vários tipos de materiais que podem ser escolhidos para o revestimento de nanopartículas, como polímeros de lipídeos, proteínas, gelatina, dextran, quitosana pullulan, poli (etileno-co-acetato de vinila), polivinilpirrolidona (PVP), PLGA ou poli-álcool-vinílico (PVA). Outras moléculas especiais tais como ácido 2,3-bifuncional dimercaptosuccinico (DMSA), ácido láurico, dopamina e silanos também são utilizadas na funcionalização das nanopartículas a fim de aumentar sua biocompatibilidade (HAO, et al., 2010).

O uso efetivo de nanopartículas magnéticas em aplicações biomédicas, tais como em sistemas de entrega direcionados depende de uma série de fatores relacionados ao tamanho e ao magnetismo das nanopartículas biocompatíveis. Parâmetros como as propriedades físico-químicas das drogas carregadas, intensidade do campo e da geometria, profundidade do tecido alvo, taxa de fluxo sanguíneo e suprimento vascular, são fatores que desempenham um importante papel na determinação da eficácia do método de entrega da droga. O aumento da magnetização é vantajoso pois facilita a manipulação dos sistemas de distribuição de drogas. As nanopartículas devem ser pequenas para que possam ser superparamagnéticas, a fim de evitar a aglomeração após a interrupção do campo magnético e ser capaz de permanecer na circulação, não sendo removida por filtros naturais do corpo como o fígado e o sistema imunológico. Nanosistemas superparamagnéticos são preferidos devido à sua capacidade de se tornar magnetizado após a exposição a um

campo magnético, mas não retêm o magnetismo quando o campo é desligado (CHOMOUCKA, et al., 2010).

A quimioterapia e a radioterapia são as opções atuais de tratamentos para a maioria dos cânceres, porém, os efeitos colaterais são bastante comuns devido ao caráter sistemático desses tratamentos. Sistemas de entregas de drogas, que têm como alvo células cancerosas, oferecem uma solução promissora para maximizar a eficiência da quimioterapia e da radioterapia, reduzindo seus efeitos colaterais, posologia e custo. Transportadores magnéticos carregados com agentes anti-câncer são administrados por via intravenosa ou intra-arterial e são aleatoriamente distribuídos pela corrente sanguínea. Quando um campo externo de alto gradiente magnético é aplicado na área desejada (Fig. 4), por exemplo, sitio de tumores sólidos, a droga/complexo carreador é direcionada e acumulada no local. Posteriormente a droga pode ser liberada através de clivagem enzimática ou alterações fisiológicas, como pH, pressão osmótica ou temperatura. Dessa forma, drogas citotóxicas estarão concentradas em órgãos específicos. Outra vantagem do uso de drogas em carreadores magnéticos é que a ressonância magnética pode ser usada para rastrear a distribuição e captação dessas partículas (LIN, et al.; 2008).

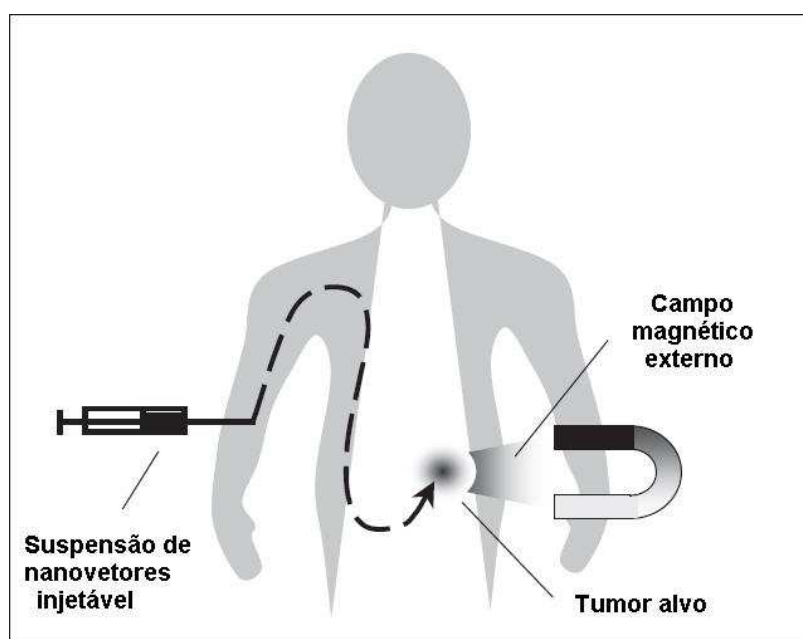


Fig.4: Direcionamento de nanopartículas através de campo magnético externo. Fonte: Douziech-Eyrolles, et al., 2007

3. JUSTIFICATIVA

A elevada taxa de letalidade do melanoma humano e a falta de métodos terapêuticos tradicionais mais eficientes levam à busca por terapias alternativas para o tratamento desta doença. Estudos realizados apontam a curcumina como um possível agente eficaz na terapia do câncer e na quimioprevenção.

O uso de plantas medicinais para o tratamento de muitas doenças está associado à medicina popular em diferentes partes do mundo. Produtos naturais de algumas plantas, fungos, bactérias e outros organismos, continuam a serem utilizados em produtos farmacêuticos preparados quer como compostos puros ou como extratos. Há uma grande variedade de compostos que pode ser extraído e caracterizado a partir de plantas dentre eles a curcumina (IWU et al., 1994).

Curcumina é o principal composto derivado do rizoma da planta *Curcuma longa*. Possui atividades anti-inflamatórias, anti-microbianas, antiviral, anti-fúngica, antioxidante e ferida atividades de cura (AGGARWAL E SHISHODIA, 2006). Curcumina foi mostrado modular a resposta do macrófagos, células natural killer, linfócitos T e As células dendríticas (JAGETIA & AGGARWALL, 2007).

Apesar de seu promissor potencial terapêutico, a curcumina possui alta insolubilidade e baixa biodisponibilidade em meio aquoso, portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de sistemas de entrega, como nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, que permitam que níveis eficientes deste fitoquímico sejam incorporados pelas células para que sua ação quimioterápica seja eficaz.

4. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a atividade anti-proliferativa e a citotoxicidade da curcumina associada à nanopartículas magnéticas funcionalizadas com bicamada de ácido láurico em culturas de células do melanoma humano, da linhagem SKMEL 37.

4.1. Objetivos específicos:

- Avaliar o efeito anti-proliferativo de curcumina associada a nanopartículas magnéticas funcionalizadas com bicamada de ácido láurico na proliferação de células da linhagem SKMEL 37 através do ensaio de MTT.
- Evidenciar a entrada e a liberação da curcumina associada as nanopartículas magnéticas na célula através de microscopia de fluorescência.
- Observar a ocorrência de alterações morfológicas e a presença de corpos apoptóticos nas células tratadas com curcumina através de microscopia óptica e de fluorescência.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Síntese, caracterização e funcionalização de curcumina associada com nanopartículas magnéticas funcionalizadas com bicamada de ácido dodecanóico (láurico)

Nanopartículas magnéticas foram sintetizadas e caracterizadas pela Prof^a Dr^a. Emilia C. D. Lima e seus colegas do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, BRASIL.

Preparação das nanopartículas de magnetita

Nanopartículas magnéticas de magnetita foram sintetizadas a partir da coprecipitação em meio alcalino de íons Fe(II) e Fe(III) (proporção molar 1:2) sob agitação vigorosa (VAN EWIJK, et al., 1999). O precipitado negro de magnetita foi sedimentado com o auxílio de um magneto e o sobrenadante foi retirado. As nanopartículas foram lavadas várias vezes com água destilada.

Funcionalização das nanopartículas de magnetita com bicamadas de ácido láurico

A funcionalização das nanopartículas com bicamadas de ácido láurico foi realizada em uma única etapa, a partir da adição de ácido láurico sobre a magnetita, previamente dispersa em água destilada, e aquecimento a 70-75° C em pH 8, sob agitação por dez minutos. A funcionalização foi evidenciada pela dispersão espontânea das nanopartículas em meio aquoso (BICA et al., 2007). A suspensão coloidal aquosa de nanopartículas funcionalizadas foi dialisada por 48 h para remoção de íons laurato livres. Para remoção de grandes agregados, a suspensão foi centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos.

Preparação da formulação de curcumina

Uma alíquota de solução de curcumina em dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionada a uma alíquota da suspensão coloidal. A mistura permaneceu sob agitação por aproximadamente 20 h. Após a agitação, as nanopartículas foram isoladas do sobrenadante, que continha curcumina não associada, através de separação magnética com o auxílio de uma lã metálica e de um magneto. As nanopartículas foram lavadas uma vez e redispersas em água deionizada.

Caracterização físico-química das nanopartículas

Determinação de ferro. Quantidade total de ferro nas amostras foi obtida por espectroscopia de absorção atômica usando um espectrofotômetro Perkin-Elmer 5000. Para determinação de Fe(II) foi utilizado o método da orto-fenantrolina (CLESCERI, et al., 1995) cujas medidas de absorvância foram obtidas em um espectrofotômetro Biospectro SP-220.

Difração de raios X (DRX). Os difratogramas de raios X foram obtidos equipamento XRD 6000 da Shimadzu (Cu-Ka, $\lambda = 0,1504$ nm), na faixa de 15°-80° graus 2 θ . O diâmetro médio das nanopartículas foi estimado usando a fórmula de Debye-Scherrer (CULLITY & STOCK, 2001). Os dados foram refinados pelo software XRD 6000 – Basic Process e o parâmetro de rede foi calculado com o software Unit Cell.

Espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier e reflectância difusa (DRIFTS). Bandas referentes às absorções características de óxido de ferro, ácido láurico e curcumina foram observadas nos espectros obtidos entre 4000 e 400 cm^{-1} em um espectrofotômetro FTIR Bomem.

Isoterma de adsorção de curcumina. Alíquotas de volumes variados de uma solução de curcumina em DMSO foram adicionadas em alíquotas com

volume fixo da suspensão coloidal de nanopartículas funcionalizadas. As formulações, com diferentes quantidades de curcumina, permaneceram sob agitação por 20 h. O sobrenadante foi retirado e analisado em um espectrofotômetro Biospectro SP-220 e a quantidade de curcumina associada foi calculada.

Determinação do potencial zeta (ζ). Potencial ζ das nanopartículas foi medido após a associação da curcumina em uma faixa de pH variando de 1 a 10. Os valores foram calculados usando medidas de mobilidade eletroforética em um equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments).

Estabilidade coloidal em meio de cultura celular. Para avaliar o efeito da adição de proteína ao meio de cultura, foram empregadas duas proteínas: soro fetal bovino (FBS) e albumina de soro bovino (BSA). A adição de cada uma das proteínas variou de 5% a 20% (v/v) e medidas de diâmetro hidrodinâmico (Dh) foram realizadas por um período de 72 h. As medidas de Dh foram obtidas por medidas de espalhamento dinâmico de luz em um equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments).

Cultura e manutenção das linhagens celulares

A linhagem celular de melanoma humano SK-MEL-37 estabelecida a partir dos nódulos melanoma metastático foi generosamente doado pelo Dr. LJ Velha (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, NY, EUA). A linhagem de melanoma humano SKMEL-37 encontra-se estocada a baixa temperatura. As células foram descongeladas em um banho a 37 °C, adicionando-se logo em seguida meio MEM contendo 10% de soro. Segue-se uma centrifugação a 80 x g por 4 minutos desprezando-se a seguir o sobrenadante. Ressuspende-se gentilmente em meio MEM (Sigma, St. Louis, MO), contendo 10% de soro fetal

bovino (Cultilab, Campinas, Brasil). As células foram mantidas em frascos de 25cm² (Nunc Brand Products) a 37°C em incubadora com 5% de CO₂. Ao atingirem a confluência, as células foram removidas com solução de tripsina/EDTA e semeadas em novos frascos até atingirem novamente a confluência e número suficiente para os experimentos.

Tratamento das células

Para os experimentos, as células foram semeadas em microplacas de 24 poços em uma concentração de 6.000 células / mL e incubadas por 18 h para a aderência. Em seguida, alíquotas diferentes da curcumina associada a nanopartículas magnéticas com as concentrações crescentes seguintes: 10,2 µg/ml ou 28 µM (20,42 µg-ferro/ml), 20,4 µg/ml ou 56 µM (40,85 µg-ferro/ml), 40,8 µg/ml ou 111 µM (81,7 µg-ferro/ml), 61,2 µg/ml ou 167 µM (122,55 µg-ferro/ml), 122,4 µg/ml ou 333 µM (245,1 µg/ml) e 204 µg/ml ou 554 µM (408,5 µg/ml) foram adicionados diretamente ao meio e as placas foram incubadas por 48h a 37 °C. Para fins de comparação, as células também foram tratadas por 48h a 37 °C com curcumina livre e as concentrações utilizadas foram de 50 µM, 25 µM e 12,5 µM, 6,25 µM, 3.125 µM, 1,562 µM. Curcumina livre estava diluída em etanol. O etanol foi testado e não causou nenhuma alteração celular. A fim de verificar que o efeito anti-proliferativo era realmente devido a curcumina, as células foram tratadas com nanopartículas magnéticas sem curcumina incorporada nas concentrações de ferro seguintes: 48 µg/ml, 129 µg/ml, 258 µg/ml, 419 µg/ml, 677 µg/ml, 918 µg/ml. Para controle positivo, usou-se Doxorubicina Cloridrato diluído em água Milli-Q (Pfizer, Itália) na concentração de 100 µM. As concentrações estoque da curcumina associada a nanopartículas e da curcumina livre são, respectivamente, 4,08 mg / ml e 10 mM. A concentração estoque de ferro das nanopartículas magnéticas com curcumina incorporada e sem curcumina são, respectivamente, 8,17 mg / ml e 16,1 mg / ml.

Teste de viabilidade celular : MTT

A viabilidade celular foi determinada pela capacidade das células vivas de reduzir o corante amarelo 3 (4,5-dimetil-2-tiazolil) 2,5-difenil-2H-tetrazólio brometo (MTT) a um produto púrpura chamado formazan. Para o experimento, as células foram semeadas em placas de 24 poços e incubadas. Após 24h, as células foram tratadas nas concentrações previamente definidas e incubadas por 48h á 37°C e 5% de CO₂. Ao término do período de incubação, o meio foi retirado e substituído por meio fresco. O MTT foi adicionado na proporção de 0,5 mg/ml e a placa foi novamente incubada á 37°C p or duas horas. O produto formazan foi dissolvido em 300 µL de metanol e a absorbância foi medida usando um multiplate leitor (ELx 800, Bio-Tek Instruments , Inc.) em 570 nm.

Alterações morfológicas (microscopia óptica e de fluorescência)

Absorção das nanopartículas

As células (1×10^5) foram semeadas em placas de poliestireno (Nunc Brans Products, EUA) de 35 mm de diâmetro e mantidas sob condições de cultivo. Após 24 horas, as células foram tratadas com uma concentração de 37 µg/ml (100µM) de curcumina incorporada a nanopartículas magnéticas e 100 µM de curcumina livre para comparação. 20 minutos depois, as células foram lavadas duas vezes com DPBS + Ca, e na última lavagem, a solução de DPBS era mantida na placa. As células foram fotografadas em um microscópio de fluorescência (Nikon E6000 Eclipse), a fim de observar a entrada de nanopartículas e da curcumina livre na célula.

Alterações no núcleo

As células (1×10^5) foram semeadas em placas de poliestireno (Nunc Brans Products, EUA) de 35 mm de diâmetro e mantidas sob condições de cultivo. Após aderência, foi colocado o DAPI e aguardou-se 24 horas.

Posteriormente as células foram tratadas com as nanopartículas magnéticas com curcumina incorporada na concentração de 37 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (100 μM). Após 24 horas as células foram lavadas duas vezes com DPBS, e na última lavagem, o DPBS foi mantido na placa. As células foram fotografadas em um microscópio de fluorescência (Nikon E6000 Eclipse), a fim de observar o processo de apoptose.

Alterações morfológicas

A fim de verificar as alterações morfológicas, as células (1 X 10⁵) foram semeadas em placas de poliestireno (Nunc Brans Products, EUA) de 35 mm de diâmetro e mantidas sob condições de cultivo. Após 24h, as células foram tratadas com uma concentração de 37 $\mu\text{g/ml}$ (100 μM) de curcumina incorporada a nanopartículas magnéticas. As alterações morfológicas foram observadas em cinco tempos diferentes, após 2, 10, 18, 24 e 48 horas de tratamento. O mesmo experimento foi feito para a curcumina livre na concentração de 15 μM para comparação.

Análise estatística

Os dados experimentais foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) não paramétrica. Em seguida, foi feito um teste de comparação de TUKEY.

6. RESULTADOS

As células viáveis têm a capacidade de reduzir o corante amarelo (MTT) solúvel em água em formazan, produto de coloração azul e insolúvel em água. Cristais de formazan foram dissolvidos em metanol e quantificados através da medida de absorbância á 570 nm, e os valores encontrados referem-se ao número de células vivas. O efeito da curcumina livre e associada com nanopartículas magnéticas na viabilidade celular foi avaliado. Os gráficos mostram uma redução dose-dependente em células tratadas com curcumina livre e associada as nanopartículas magnéticas, após 48 h de tratamento. Para a curcumina livre foi encontrada uma taxa de mortalidade significativa a partir de 11,5 μM ($p < 0,001$) (Grafico 1). Quanto a curcumina associada com nanopartículas a taxa de morte começa a ser significativa a partir de 40,8 $\mu\text{g/ml}$ ou 111 μM ($p < 0,001$) (Grafico 2). Para confirmar que o efeito citotóxico se deve realmente a curcumina e não ao ferro, foi realizado um MTT com nanopartículas magnéticas sem a curcumina incorporada. Nós descobrimos que as nanopartículas sem curcumina associadas só se tornam tóxicas em concentrações superiores a 419 $\mu\text{g} / \text{ml}$ de ferro ($p < 0,05$) (Grafico 3), um valor muito superior a quantidade de ferro encontrada na concentração mais elevada testada por nós na nanopartícula associada a curcumina.

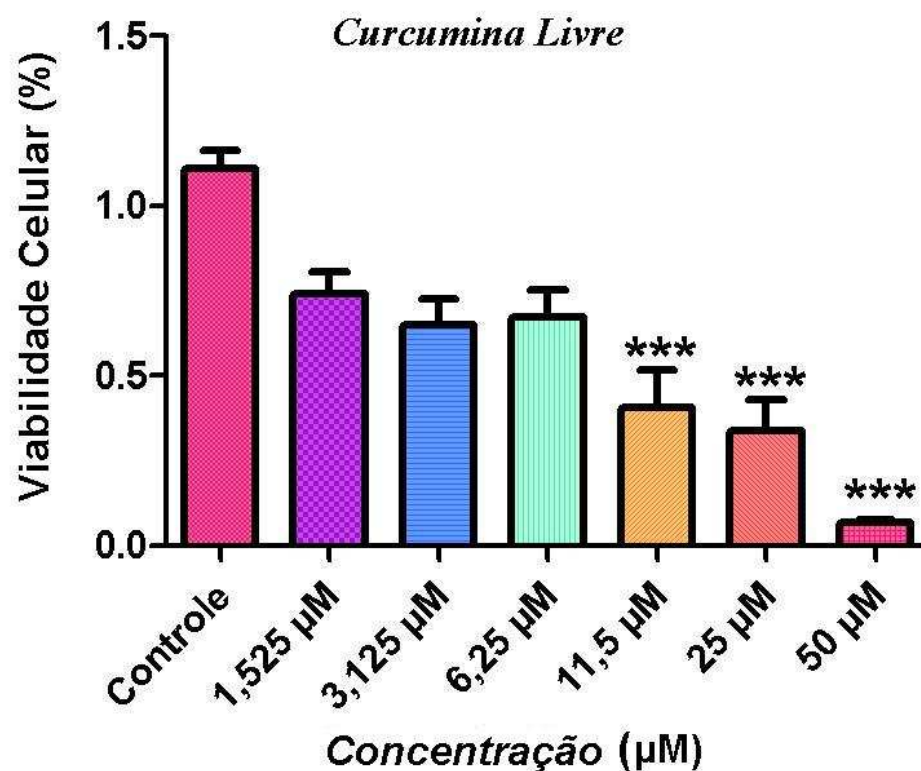


Gráfico 1: Diminuição da viabilidade celular de células do melanoma humano SKMEL 37. As células foram tratadas com curcumina livre nas concentrações mostradas no gráfico durante 48 h. Os asteriscos representam as diferenças significativas entre as células tratadas e não tratadas. Os valores são as médias $\pm$ desvio padrão da média (média $\pm$ SE) de 2 experimentos independentes. Os dados foram analisados por ANOVA e Tukey ($p < 0,001$)

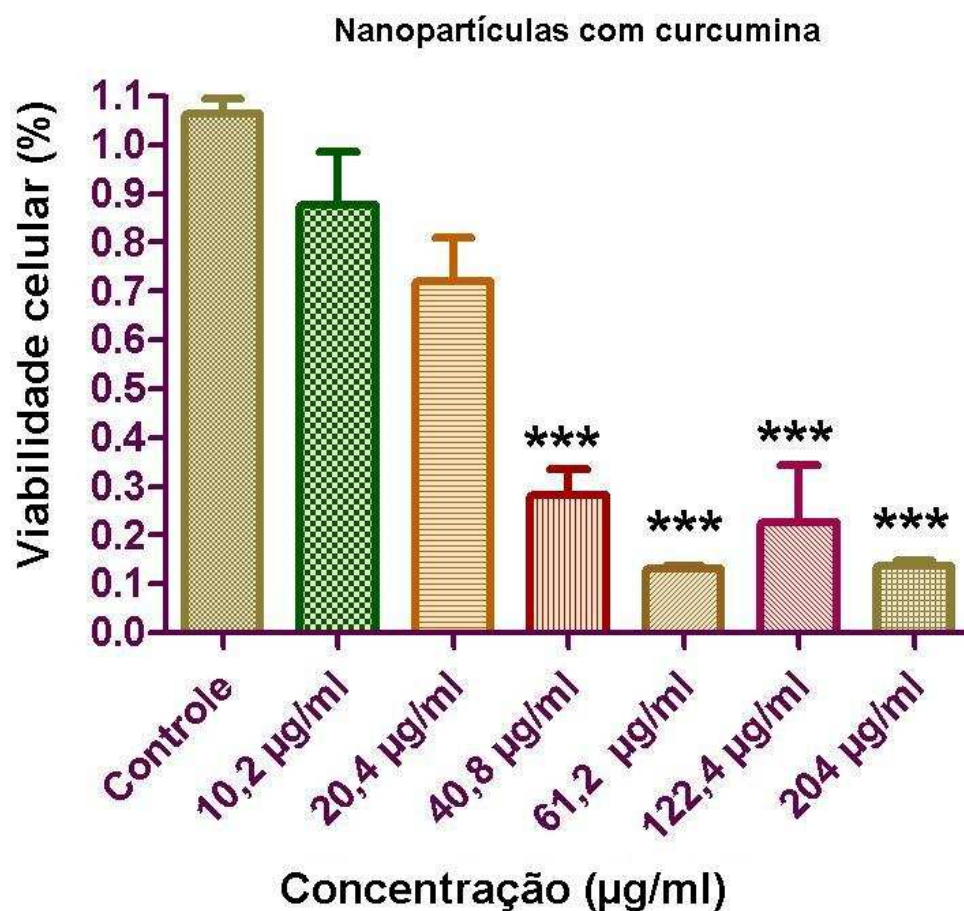


Gráfico 2: **Diminuição da viabilidade celular de células do melanoma humano SKMEL 37.** As células foram tratadas com nanopartículas magnéticas com curcumina incorporada nas concentrações mostradas no gráfico durante 48 h. Os asteriscos representam as diferenças significativas entre as células tratadas e não tratadas. Os valores são as médias $\pm$ desvio padrão da média (média $\pm$ SE) de 2 experimentos independentes. Os dados foram analisados por ANOVA e Tukey ($p < 0,001$)

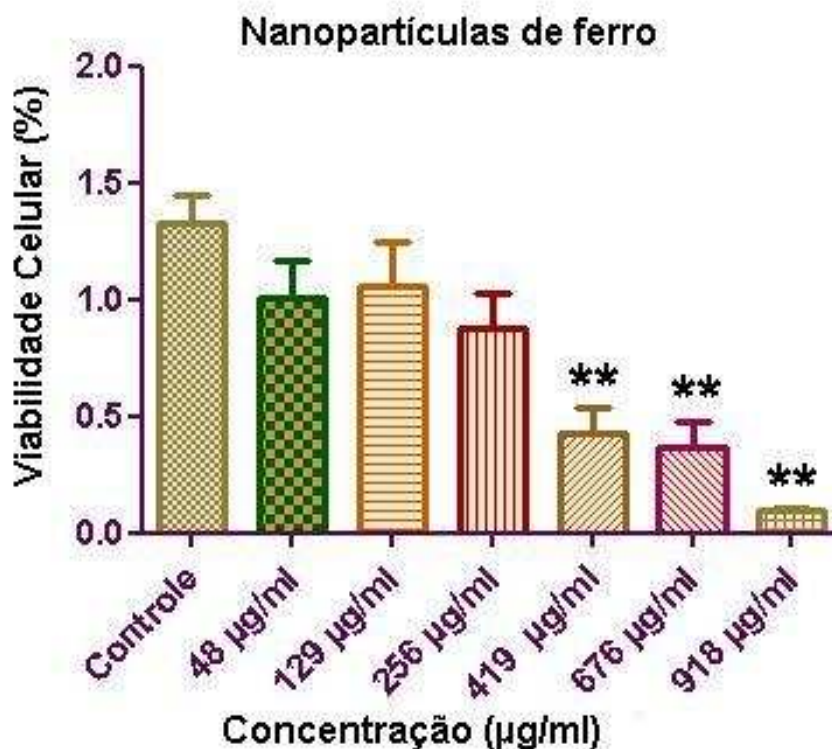


Gráfico 3: **Diminuição da viabilidade celular de células do melanoma humano SKMEL 37.** As células foram tratadas com nanopartículas magnéticas sem curcumina incorporada nas concentrações mostradas no gráfico durante 48 h. Os asteriscos representam as diferenças significativas entre as células tratadas e não tratadas. Os dados foram analisados por ANOVA e Tukey ($p < 0,05$).

A fim de verificarmos se a curcumina livre e a curcumina ligada as nanopartículas eram internalizadas pelas células, e se a curcumina era de fato liberada, realizamos uma microscopia de fluorescência, aproveitando a capacidade de fluorescência que a curcumina tem, sem auxílio de nenhum fluorocromo. Nós encontramos que tanto a curcumina livre quanto a ligada as nanopartículas foram internalizadas pelas células após 20 minutos de tratamento, não causando, no entanto nenhuma toxicidade durante esse

período. Como mostrado na fig. 5, a curcumina encontra-se dispersa no citoplasma e aparentemente entra no núcleo das células de melanoma.

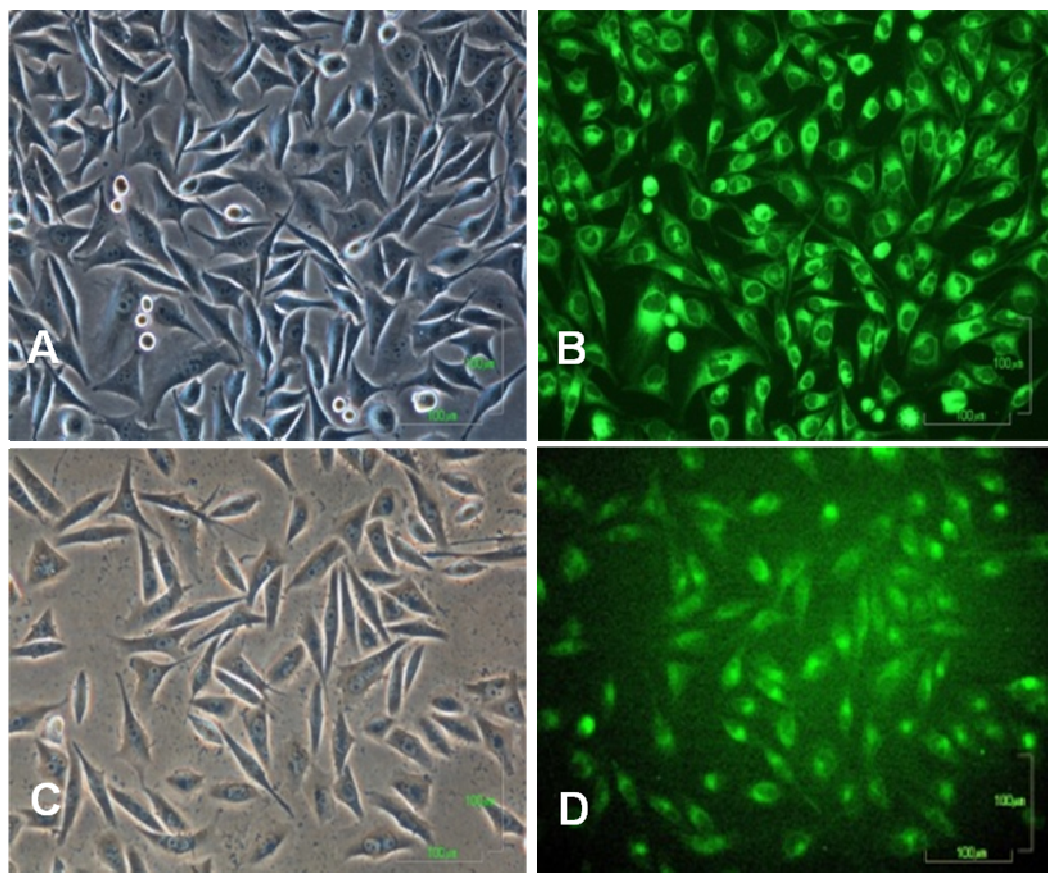


Fig. 5: Entrada das nanopartículas na célula. (A-B) As células foram tratadas com 100 μM de curcumina livre para efeito de comparação. A- Campo claro; B- fluorescência da curcumina. (C-D) As células foram tratadas com 37 $\mu\text{g/ml}$ (100 μM) de curcumina associada á nanopartículas magnéticas. A-Campo claro, B- Observa-se a fluorescência da curcumina, indicando a entrada das nanopartículas na célula. 20X.

Neste estudo, nós tratamos as células por 24 horas com uma concentração de 37 $\mu\text{g/ml}$ (100 μM) de curcumina associada com nanopartículas magnéticas. Após 24 horas de tratamento foi observada por microscopia de fluorescência e DAPI que a curcumina associada com

nanopartículas magnéticas induziu a condensação da cromatina e fragmentação nuclear (Fig. 6), que são características típicas da morte celular programada.

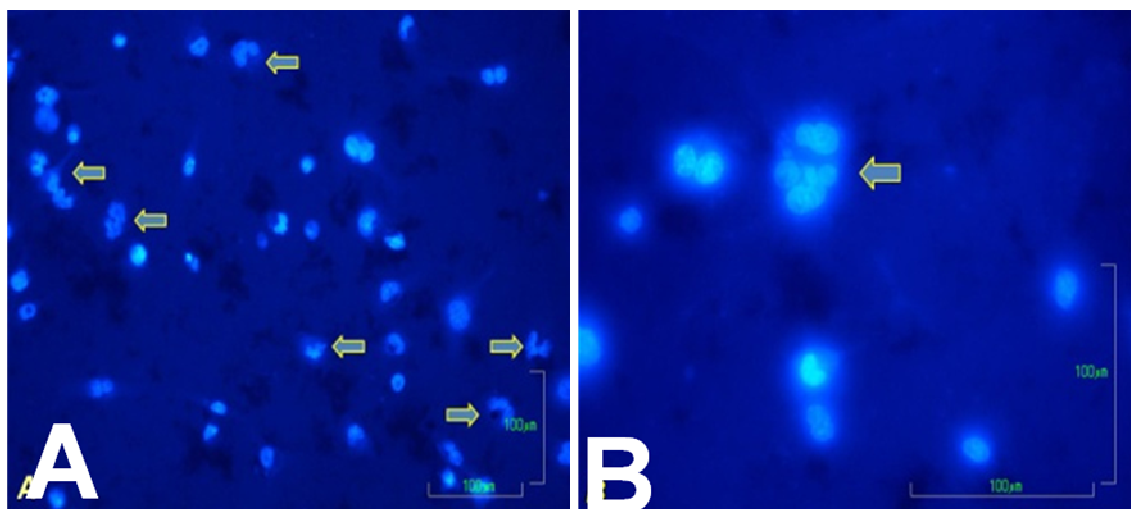


Fig. 6: Microscopia de fluorescência. Células de melanoma humano SKMEL37 foram incubadas com 37 $\mu\text{g/ml}$ ($100\mu\text{M}$) de curcumina associada a nanopartículas magnéticas e monitoradas por 24h. A- 20x. Observam-se vários núcleos apoptóticos (setas). B-40x. Observa-se a condensação da cromatina e a fragmentação nuclear, características da apoptose (seta).

As células foram tratadas em diferentes tempos, 2, 10, 18, 24 e 48 horas com uma concentração de 37 $\mu\text{g/ml}$ ($100\mu\text{M}$) de curcumina associada a nanopartículas magnéticas e outro grupo foi tratado nos mesmo períodos com 15 μM curcumina livre, para comparação. A evaginação da membrana plasmática foi visível após 18 h de tratamento com curcumina associada com nanopartículas magnéticas (fig. 7). O mesmo pode ser observado nas células tratadas com curcumina livre a partir de 10 horas de tratamento (Fig. 8). A análise por microscopia óptica mostrou que esse fenômeno ocorre principalmente em células em suspensão e/ou durante o processo de distanciamento da superfície de crescimento.

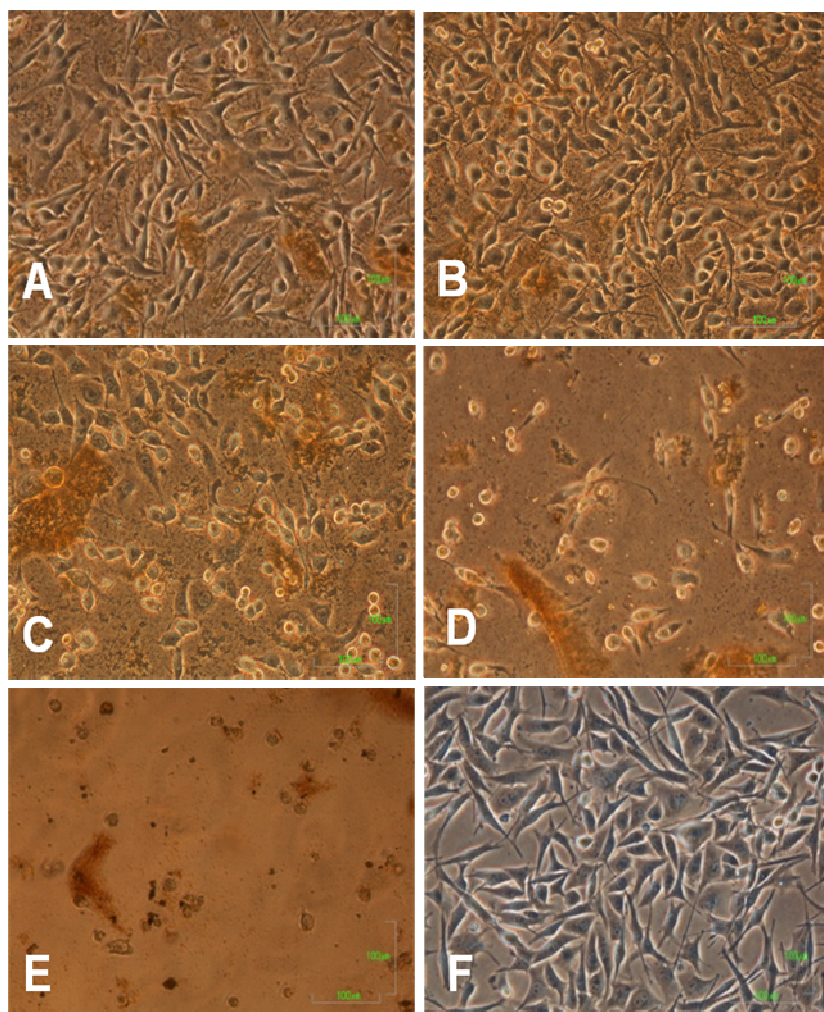


Fig. 7: Alterações morfológicas causadas por curcumina associada a nanopartículas magnéticas. As células foram tratadas em momentos diferentes com uma concentração de $37 \mu\text{g/ml}$ ($100 \mu\text{M}$) de curcumina associada com nanopartículas magnéticas. A partir de 18 horas de tratamento observou-se a evaginação da membrana plasmática de algumas células. Com o tempo cada vez maior, houve uma diminuição na densidade das células aderidas. O controle permaneceu inalterado durante todo o experimento. A-2 horas; B-10 horas; C-18 horas; D-24 horas; E-48 horas; F-Controle. 20x

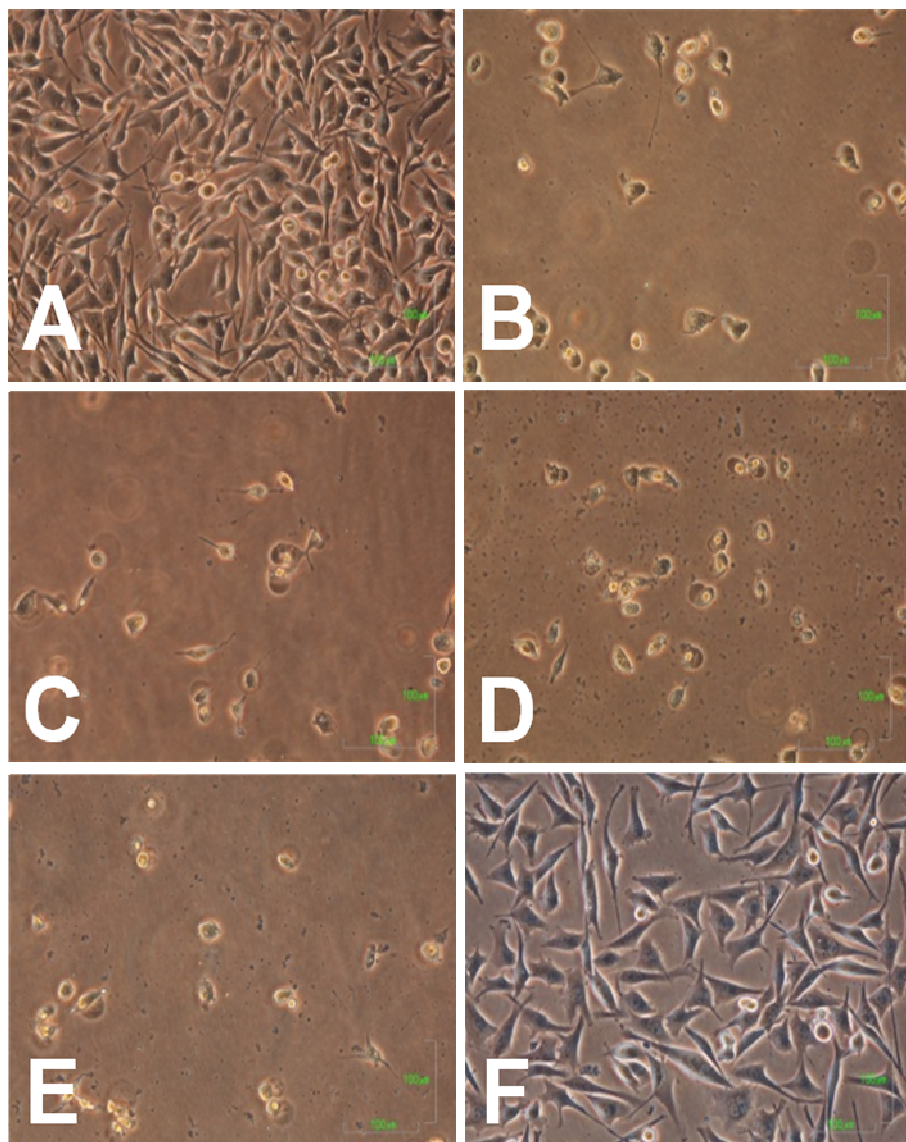


Fig. 8: Alterações morfológicas causadas por curcumina livre. As células foram tratadas em momentos diferentes em uma concentração de 15 μ M de curcumina livre. Após 10 horas de tratamento observou-se a evaginação da membrana plasmática de algumas células. Com o tempo cada vez maior, houve uma diminuição na densidade das células aderidas. O controle permaneceu inalterado durante todo o experimento. A-2 horas; B-10 horas; C-18 horas; D-24 horas; E-48 horas; F-Controle. 20x.

7. DISCUSSÃO

Neste trabalho pretendeu-se avaliar os efeitos citotóxicos da curcumina associada à nanopartícula magnética. De um modo geral as nanopartículas induziram fenômenos de citotoxicidade de um modo dependente da concentração e do tempo de exposição.

Nossos estudos demonstraram que as nanopartículas magnéticas são endocitadas tão rapidamente quanto a curcumina livre e seu conteúdo é de fato liberado no citoplasma. A fluorescência da curcumina encapsulada em nanopartículas magnéticas parece desaparecer mais rapidamente que a da curcumina livre com o passar do tempo, o que está em concordância com os estudos de ANAND, *et al.*, (2010). Nanocarreadores como nanopartículas magnéticas têm duas principais vias de interiorização: a fagocitose ou a outras vias endocíticas (clatrina e a endocitose calveolae-mediada). Notavelmente, dependendo das características físico-químicas da droga, o caminho de interiorização, bem como o destino intracelular do nanocarreador, é uma questão chave para a droga ser eficiente. A liberação da droga no ambiente enzimático de lisossomos, ou diretamente no citoplasma da célula pode ter um impacto importante sobre a atividade farmacológica (FERREIRA, 2009; HILLAIREU & COUVREUR, 2009).

O efeito da curcumina livre e associada com nanopartículas magnéticas na viabilidade celular foi avaliado. Os gráficos mostraram uma redução dose-dependente das células tratadas com curcumina livre e associada a nanopartículas magnéticas, após 48 h de tratamento. Para a curcumina livre encontrou-se a taxa de mortalidade significativa a partir de 11,5 μM ($p < 0,001$). Estudos sobre o crescimento de células SK-MEL-37 demonstraram os efeitos

citotóxicos de curcumina livre na faixa de concentração de 5 a 20 μM (RABELO, *et al.*, 2002). A curcumina associada à nanopartículas magnéticas também causou morte celular significativa na concentração a partir de 40.8 $\mu\text{g/ml}$ ou 111 μM . A curcumina pode aparentemente suprimir de forma eficaz a proliferação de uma variedade de tumores celulares (DELETTRE, *et al.*, 2006). No entanto, o modo de ação da curcumina ainda não é definitivo, apenas indiretamente inferido. Uma série de estudos têm indicado que a curcumina atua inibindo o fator de crescimento que promove a proliferação celular, e a supressão do ciclo celular e ativando o processo de apoptose através de mudanças em moléculas sinalizadoras específicas, que podem ser produtos de genes como o NF-kB, p53, JNK, ERK, p38 JAK / STAT, caspase, família Bcl-2 e outros (RASHMI, *et al.*, 2004).

A apoptose é um mecanismo autônomo de morte celular programada, caracterizada morfologicamente por condensação da cromatina nuclear, redução no tamanho da célula, condensação do citoplasma, perda de conexões intercelulares e destacamento das células da superfície de crescimento, formação de projeções de membrana e corpos apoptóticos (GREGORY & POUND, 2011). Neste estudo, após 24 horas de tratamento com uma concentração de 37 $\mu\text{g/ml}$ de curcumina associada com nanopartículas magnéticas, observou-se uma condensação da cromatina e fragmentação nuclear. Estes resultados estão de acordo com estudos realizados por JIA, *et al.* (2009) que apresentaram características de apoptose induzida por curcumina.

Nossos estudos demonstraram que após 18 horas de tratamento com curcumina associada a nanopartículas magnéticas pôde-se observar a evaginação da membrana plasmática. O mesmo ocorreu com as células

tratadas com curcumina livre a partir de 10 horas de tratamento. A formação de projeções periféricas, ou *Blebs*, é uma característica clássica da apoptose (WYLLIE, *et al.*, 1980), indicando mais uma vez que a curcumina causa morte celular programada.

A apoptose desempenha um papel importante no controle da morte celular quando o dano ao DNA é irreparável. Existem basicamente duas vias principais que induzem a apoptose: a via intrínseca e a via extrínseca (JUN-JIE, *et al.*, 2011). A via extrínseca (também conhecida como via receptor de morte) é desencadeada pelo receptor de morte FAS (REUTER, *et al.*, 2008). Na via intrínseca, há uma outra estratégia independente do receptor de morte FAS, na qual as mitocôndrias possuem um papel central (HATCHER, *et al.*, 2008). Como na via extrínseca a apoptose é mediada por um receptor e nanopartículas não possuem ligantes específicos, é bem provável que a curcumina quando liberada no interior da célula cause um estresse intracelular, desencadeando a apoptose por meio da via intrínseca. A via intrínseca é ativada por estresse intracelular como a deprivação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes. Os sinais que são transduzidos em resposta a estes insultos convergem principalmente para a mitocôndria (GRIVICICH, *et al.*, 2007).

O grande problema na oncologia é a resistência dos agentes quimioterápicos. A curcumina inibe o desenvolvimento e a progressão do câncer, atuando em diversas etapas do percurso de malignidade. Sua baixa solubilidade é um fator limitante para o uso desse composto como uma medicina herbal. Assim, o uso de um nanocarreador desenvolvido por nós neste trabalho é realmente importante. O fato dessas nanopartículas serem magnéticas, fará com que o complexo carreador-droga seja levado a locais específicos, liberados e acumulados mediante aplicação de um campo magnético externo. O uso deste novo agente quimioterápico proposto neste estudo, como uma terapia alternativa fará com que o tratamento torne-se direcionado, o que reduzirá os efeitos colaterais, a posologia e principalmente custo.

8. CONCLUSÕES

- A curcumina livre e a curcumina incorporada a nanopartícula magnética são endocitadas. A curcumina contida nas nanopartículas foi liberada no citoplasma da célula, mostrando que essa nova formulação funciona como um sistema de entrega de drogas.
- Através do teste de viabilidade de células (MTT) foi possível observar o efeito citotóxico da curcumina associada á nanopartículas magnéticas, o que as torna um possível agente terapêutico.
- As nanopartículas magnéticas sem curcumina incorporada possuem efeito citotóxico apenas em concentrações superiores a 419 µg de ferro/ml, valor altamente superior á concentração de ferro contida nas concentrações utilizadas por nós durante os tratamentos, demonstrando que a citotoxicidade deve-se a curcumina e não ao ferro.
- Fragmentação nuclear, condensação da cromatina e formação de *Blebs* são alguns dos eventos característicos que precedem a apoptose. Esses eventos foram observados em células tratadas sugerindo que a morte celular ocorre por apoptose.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AGGARWAL S.; ICHIKAWA H.; TAKADA Y.; SANDUR S. K.; SHISHODIA S.; AGGARWAL B.B.. Curcumin (Diferuloyl methane) down regulates expression of cell proliferation, antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of I κ Ba kinase and Akt activation. **Mol Pharmacol.**, vol. 7, n. 69, p 195–206, 2006.

AGGARWAL, B.B., SHISHODIA, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. **Biochem. Pharmacol.**, vol. 71, p 1397–1421, 2006.

ANAND, P.; KUNNUMAKKARA, A. B.; NEWMAN, R. A.; AGGARWAL, B. B. Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. **Molecular Pharmaceutics**, vol. 4, p 807–818, 2007.

ANAND, P.; THOMAS, S.G.; KUNNUMAKKARA, A. B.; SUNDARAM, C.; HARIKUMAR, K. B.; SUNG, B.; THARAKAN, S. T.; MISRA, K.; PRIYADARSINI, I. K.; RAJASEKHARAN, K. N.; AGGARWAL, B. B. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. **Biochemical pharmacology**, vol. 76, p 1590 – 1611, 2008.

ANAND, P.; NAIR, H.B.; SUNG, B.; KUNNUMAKKARA, A. B.; YADAV, V.R.; TEKMAL, R.R.; AGGARWAL, B.B. Design of curcumin-loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity in vitro and superior bioavailability in vivo. **Biochemical Pharmacology**, vol. 79, n. 3, p 330-338, 2010.

ARRUEBO M.; RODRIGO F.; IBARRA M.R.; SANTAMARÍA J. Magnetic Nanoparticles for drug delivery. **Nanotoday**, vol. 2 n. 3, p 22–32, 2007.

BICA, D.; VEKAS, L.; AVDEEV, M.V.; MARINICA, O.; SOCOLIUC, V.; BALASOIU, M.; GARAMUS, V.M. **J Magn Magn Mater.**, vol. 311, p 17-21, 2007.

BISHT, S. AND MAITRA, A. Dextran–doxorubicin/chitosan nanoparticles for solid tumor therapy. **Advanced Review**, vol. 1, p 415-125, 2009.

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

BISHT, K; WAGNER, K. H.; BULMER, A. C. Curcumin, resveratrol and flavonoids as anti-inflammatory, cyto- and DNA-protective dietary compounds. **Toxicology**. vol. 1, p 88-100, 2010.

CAINI, S.; GANDINI, S.; SERA, F.; RAIMONDI, S.; FARGNOLI, M.C.; BONIOL, M.; ARMSTRONG, M.B. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma according to anatomical site and clinico- pathological variant. **Eur J Cancer**, vol 45, n. 17, p 3054-3063, 2009.

CALIFANO, J and NANCE, M. Malignant Melanoma. **Facial Plast Surg Clin**, vol.17, p 337–348, 2009.

CHOMOUCKA, J.; [DRBOHLAVOVA, J.](#); [HUSKA, D.](#); [ADAM, V.](#); [KIZEK, R.](#); [HUBALEK, J.](#) Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. **Pharmacological Research**, vol. 62, p 144–149, 2010.

CLESCERI, L.S.; GREENBERG, A.E.; EATON, A.D. Editors, in *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20th ed. Washington: APHA/AWWA/WEF;

[COLIN, M.](#); [MADOULET, C.](#); [WARREN, L.](#); [JARDILLIER, J.C.](#) Alterations of vinblastine influx in multidrug resistant lymphoblastic leukemic CEM cells. **Anticancer Res.**; vol. 16, p 407–12, 1996.

CULLITY, B.D.; STOCK, S.R. *in Elements of X-ray diffraction*. 3rd ed. Upper Saddle River: Prentice Hall; 2001

DAS, T.; GAURISANKAR, S.A.; SAHA, B.; DAS, K. Multifocal signal modulation therapy of cancer: ancient weapon, modern targets. **Mol Cell Biochem** , vol. 336, p 85–95, 2010.

DELETTRE, C.; YUSTE, V. J.; MOUBARAK, R. S.; BRAS, M.; ROBERT, N.; SUSIN, S. A. Identification and Characterization of AIFsh2, a Mitochondrial Apoptosis-inducing Factor (AIF) Isoform with NADH Oxidase Activity J. Biol. Chem. 281, 18507-18518 (2006).

DOUZIECH-EYROLLES, L.; MARCHAIS, H.; HERVÉ, K.; MUNNIER, E.; SOUCÉ, M.; CLAUDE, L.; DUBOIS, P.; CHOURPA, I. Nanovectors for anticancer agents based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, vol.2, n.4, p 541–550, 2007.

DUVOIX, A.; BLASIUS, R.; DELHALLE, S.; SCHNEKENBURGER, M.; MORCEAU, F.; HENRY, E.; DICATO, M.; DIEDERICH, M.. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. **Cancer Letters**, vol. 223 p 181–190, 2005.

EATON, A. D.; CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E.; FRANSON, M. A. H. Standard methods for the examination of water and wastewater. 19. ed. Washington: APHA, 1995.

EPSTEIN, J.; SANDERSON, I. R.; MACDONALD, T. T. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. **British Journal of Nutrition**, vol. 103, p 1545–1557, 2010.

FERREIRA, L. S. Nanoparticles as tools to study and control stem cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, vol. 108, p 746-752, 2009.

FREITAS, E.R.L.; SOARES, P.R.O.; SANTOS, R.P.; SANTOS, R.L.; SILVA, J.R.; PORFIRIO, L.P.; BÁO, S.N.; LIMA, E C.O.; MORAIS, P.C.; GUILLO, L.A. *In Vitro* Biological Activities of Anionic γ -Fe₂O₃ Nanoparticles on Human Melanoma Cells. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, vol. 8, n. 5. 2008

GARBE, C.; PERIS, K.; HAUSCHILD, A.; SAIAG, P.; MIDDLETON, M.; SPATZ, A.; GROB, JEAN-JACQUES; M., NEWTON-BISHOP, J.; GOEL, A.; KUNNUMAKKARA, A. B.; AGGARWAL, B. B. Curcumin as “Curecumin”: From kitchen to clinic. **Biochemical pharmacology**, vol. 75, p 787–809, 2008.

GREGORY, C. D.; POUND, J. D. Cell death in the neighbourhood: direct microenvironmental effects of apoptosis in normal and neoplastic tissues. **J Pathol.**, vol. 223, p 177-194, 2011.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, vol. 53, n. 3, p 335-343.2007.

GUPTA, A.K.; GALKAR, R.R.N.; AIDYA, V.D.V.; GUPTA, M. Recent advances on surface engineering of magnetic iron oxide nanoparticles and their biomedical applications. **Nanomed.**, vol. 2, n.1, p 22-39, 2007.

HAO, R.; XING, R.; XU, Z.; HOU, Y.; GAO, S.; SUN, S. Synthesis, Functionalization, and Biomedical Applications of Multifunctional Magnetic Nanoparticles. **Adv. Mater.**vol., 22, p 2729–2742, 2010.

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

HILLAIREAU, H.; COUVREUR, P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. **Cellular and Molecular Life Sciences**, vol. 66, p 2873-2896, 2009.

HOFMANN-AMTENBRINKA, M.; HOFMANNB, H.; MONTETC, X. Superparamagnetic nanoparticles – a tool for early diagnostics. **Swiss Med Wkly**, vol. 140, p E1- E9, 2010.

Instituto nacional do Câncer. Estimativa 2010 Incidência de câncer no Brasil. <
<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010/estimativa20091201.pdf>> Acessado em: 28/12/2011.

ITOKAWA, H.; SHI, Q.; AKIYAMA, T.; MORRIS-NATSCHKE ,S.L.; LEE, K.H. Recent advances in the investigation of curcuminoids. **Chinese Medicine.**, vol. 3, n.11, 2008.

IWU, M.M.; JACKSON, J.E.; SCHUSTER, B.G. Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. **Parasitol Today**, vol. 10, p 6568, 1994.

JAIN, T.K.; MORALES , M.A.; SAHOO, S.K.; LESLIE-PELECKY, D.L.; LABHASETWAR, V. Iron oxide nanoparticles for sustained delivery of anticancer agents. **Molecular Pharmaceutics**, vol. 2, n 3, p 194-205, 2005.

JIA, Y.; LIA, L.; QINA, Z.H.; LIANGA, Z.Q. Autophagic and apoptotic mechanisms of curcumin-induced death in K562 cells. **Journal of Asian Natural Products Research.**, vol. 111, p 918-928, 2009.

JAGETIA, G.C., AGGARWALL, B.B., “Spicing up” of the immune system by curcumin. **J. Clin. Immunol.**, vol. 27, 19–35,2007.

JUN-JIE,L.; MOU, L.; JIA-YING, Y.; BO, L.; JIN-KU, B. Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics. **Cancer Letters**, vol. 300, p 105-114, 2011.

KHALAFALLA, S. E.; REIMERS, G. W. Preparation of dilution-stable aqueous magnetic fluids. **IEEE Transactions on Magnetism**, v. MAG-16, n. 2, p. 178-183,1980.

KOHLI, K.; ALI, J.; ANSARI, M.J.; RAHEMAN, Z: Curcumin: a natural antiinflammatory agent. **Indian J Pharmacol**, vol. 37, p 141-147, 2005.

KUNNUMAKKARA, A.B.; ANAND, P.; AGGARWAL, B.B. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. **Cancer Letters**, vol. 269, p199–225, 2008.

LIN, M. M.; KIM, D. K.; AJ, E. H.; ALICIA, J. DOBSON, J.. Development of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONS) for Translation to Clinical Applications. **Ieee Transactions on Nanobioscience**, vol. 7, n. 4, p 298-305, 2008.

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

MISHRA, B.; PATEL, B.B.; TIWARI, S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. **Nanomedicine**, vol. 6, n. 1, p 9-24, 2009.

NAGORE, E.; HUESO, L.; BOTELLA-ESTRADA, R.; ALFARO-RUBIO, A.; SERNA, I.; GUALLAR, J.P.; GONZÁLEZ, I.; RIBES, I.; GUILLEN, C. Smoking, sun exposure, number of nevi and previous neoplasias are risk factors for melanoma in older patients (60 years and over). **Journal compilation European Academy of Dermatology and Venereology**, vol. 24, n. 1, p 50-57, 2009.

ODOT, J.; ALBERT, P.; CARLIER, A.; TARPIN, M.; DEVY, J. Madoulet C. *In vitro* and *in vivo* anti-tumoral effect of curcumin against Melanoma cells. **Int. J. Cancer.**, vol. 111, p 381–387, 2004

PIRIS, A.; MIHM, M. C. Progress in Melanoma Histopathology and Diagnosis. **Hematol Oncol Clin**, vol. 23, p 467-480, 2009.

PSATY, E. L.; SCOPE, A.; HALPERN, A. C.; MARGHOOB, A. A. Defining the patient at high risk for melanoma. **International Journal of Dermatology**, vol. 49, p 362–376, 2010.

RABELO, A. S., BRETAS, M. L., GUILLO, L. A. (2002), Ensaio da citotoxicidade da curcumina. Paper presented at VI Reunião Regional da SBBq. Anais eletrônicos da VI Reunião Regional da SBBq (CD-ROM), Fortaleza, Brazil.

RAFFA, V.; VITTORIO, O.; RIGGIO, C.; CUSCHIERI, A. Progress in nanotechnology for healthcare. **Minimally Invasive Therapy**, vol. 19, p 127-135, 2010.

RASHMI, R.; KUMAR, S.; KARUNAGARAN, D. Ectopic expression of Bcl-XL or Ku70 protects human colon cancer cells (SW480) against curcumin-induced apoptosis while their down-regulation potentiates it. **Carcinogenesis**, vol. 25, p 1867-1877, 2004.

RAVINDRAN, J.; PRASAD, S.; AGGARWAL, B. B. Curcumin and Cancer Cells: How Many Ways Can Curry Kill Tumor Cells Selectively? **The AAPS Journal**, vol. 11p 495-510, 2009.

REUTER, S.; EIFES, S.; DICATO, M.; AGGARWAL, B. B.; DIEDERICH, M.. Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. **Biochemical pharmacology**, vol. 76, p 1340 – 1351, 2008.

SANCHEZ, R.; IVAN, D.; ESMAELI, B.. Eyelid and Periorbital Cutaneous Malignant Melanoma. **International Ophthalmology Clinics**, vol. 49, n. 4, p 25–43, 2009.

SHARMA, R.A.; EUDEN, S.A.; PLATTON, S.L.; COOKE, D.N.; SHAFAYAT, A.; HEWITT, H.R.; [MARCZYLO, T.H.](#); [MORGAN, B.](#); [HEMINGWAY, D.](#); [PLUMMER, S.M.](#); [PIRMOHAMED, M.](#); [GESCHER, A.J.](#); [STEWART, W.P.](#) Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. **Clin Cancer Res.** vol.10, p 6847-6854, 2004.

STRIMPAKOS, A.S.; SHARMA, R.A. Curcumin: Preventive and Therapeutic Properties in Laboratory Studies and Clinical Trials. **Antioxidants & redox signaling**, Volume 10, Number 3, p 512- 545, 2008.

SURH, Y. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. **Mutat. Res.**, vol. 428, p 305–327, 1999.

VAN EWIJK, G.A.; VROEGE, G.J.; PHILIPSE, A.P. "Convenient preparation methods for magnetic colloids". **J Magn Magn Mater.**, vol. 201, p 31-33, 1999.

XU, C.; SUN, S. Superparamagnetic nanoparticles as targeted probes for diagnostic and therapeutic applications. **NIH Public Access Author Manuscript** vol. 29, p 5583–5591, 2009.

[WYLLIE, A.H.](#); [KERR, J.F.](#); [CURRIE, A.R.](#) Cell death: the significance of apoptosis. **Int Rev Cytol.**, vol. 68, p 251-306, 1980.

YADAV, V.R.; SAHDEO, P.; KANNAPPAN, R.; RAVINDRAN, J.; CHATURVEDI, M. M.; VAAHTERA, L.; PARKKINEN, J.; AGGARWAL, B. B. Cyclodextrin-complexed curcumin exhibits anti-inflammatory and antiproliferative activities superior to those of curcumin through higher cellular uptake. **Biochemical Pharmacology**, vol. 80, p 1021–1032, 2010.

