

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Mariana Heldt Motta

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCARREADORES A BASE DE
PIPERINA: INFLUÊNCIA DO POLÍMERO E CITOTOXICIDADE *IN
VITRO – IN VIVO***

Santa Maria, RS
2016

Mariana Heldt Motta

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCARREADORES A BASE DE PIPERINA:
INFLUÊNCIA DO POLÍMERO E CITOTOXICIDADE *IN VITRO* – *IN VIVO***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Profa. Dra. Cristiane de Bona da Silva
Co-orientadora: Dra. Cristiane Franco Codevilla

Santa Maria, RS
2016

Mariana Heldt Motta

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCARREADORES A BASE DE PIPERINA:
INFLUÊNCIA DO POLÍMERO E CITOTOXICIDADE *IN VITRO* – *IN VIVO***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovado em 16 de dezembro de 2016:

Cristiane de Bona da Silva, Dra (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Cristiane Franco Codevilla, Dra (UFSM)
(Co-orientador)

Fernanda Cramer Flores, Dra (URI)

Scheila Rezende Schaffazick, Dra (UFSM)

Santa Maria, RS
2016

*Aos meus pais e minha irmã, pelo amor,
apoio e confiança
a mim sempre dedicados.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pela dedicação, amor, confiança e apoio em todas as horas, me incentivando a buscar sempre o conhecimento e lutar pelos meus sonhos.

À minha irmã e cunhado, Bi e Lucas, pelo estímulo a seguir meus objetivos e pelos finais de semana, junto aos meus pais, de muita alegria e carinho.

À minha orientadora, Cris, por quem tenho enorme admiração, e agradeço pela oportunidade a mim conferida desde a graduação para fazer parte deste Laboratório. Pelos ensinamentos, conselhos, exemplo de ética profissional, amizade e carinho com que tem sempre conosco.

À minha co-orientadora, Cris Codevilla, pela disponibilidade em co-orientar este trabalho, pelos ensinamentos e contribuições, sempre disposta a ajudar.

À minha IC Aline, presente mais mara que o mestrado me deu, pelo carinho, amizade e ajuda constante (não me esqueço dos bilhetes e presentinhos hehe). Pela dedicação, paciência e pró-atividade, sei que serás uma excelente pesquisadora.

À minha companheira fiel, Nadi, pela amizade, conversas e risadas. Pelas festa do CE e pelas copafarmas, onde eu me sentia em casa no 902. Pelas caronas divertidas e com muita músicas no “preti”.

Às minhas “Rebeldes” restantes (Ju e Thami), por me acompanharem nessa etapa, me apoiarem e me fazerem rir no dia-a-dia do laboratório, por mais difícil ou cansativo que tenha sido o nosso dia.

À minha melhor amiga, Jé, por estar sempre ao meu lado, me apoiando e feliz pelas minhas conquistas nesses 10 anos de amizade. E claro, pela companhia no axé e na ginástica, que eram a minha distração, onde voltamos a nos ver todos os dias, conversar e matar a saudade como no CTISM, nos velhos tempos.

Ao Lab mais Mara (Rose, Tati, Raquel, Jéssica, Lara, Sílvia, Bruna e Camila), pela convivência diária, conversas, troca de experiências, rodas de mate, café, pela ajuda que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Às amigas, Ana, Fê, Ro, Andréia G. e Ju Lima, que passaram pelo Lab e que também deixaram sua marca e amizade. Lembro com muito carinho, vocês também foram muito importantes nessa minha caminhada que começou já na graduação. Especialmente a Ro, que me inspirou e estimulou a seguir a área da pesquisa, meu muito obrigada por todo o aprendizado.

Às vizinhas, Pri, Lara, Laís, Ju, Su e Luana, pela convivência, conversas, mates e risadas.

Às minhas amigas “Pretis”, May e Lari, pela amizade apesar da distância.

Aos demais familiares e amigos que sempre estiveram me apoiando e torcendo pelo meu sucesso.

À Dra. Daniele Rubert Nogueira Libreloto, pelo auxílio e análises da citotoxicidade nas células.

Ao Prof. Dr. Félix Alexandre Antunes Soares, em especial a Marina e a Daniele, pelo auxílio e experimento de citotoxicidade em *C. elegans*.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

À CAPES, órgão financiador de bolsas de estudo.

À Universidade Federal de Santa Maria pelas oportunidades oferecidas.

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE NANOCARREADORES A BASE DE PIPERINA: INFLUÊNCIA DO POLÍMERO E CITOTOXICIDADE *IN VITRO* – *IN VIVO*

AUTOR: Mariana Heldt Motta

ORIENTADOR: Profa. Dra. Cristiane de Bona da Silva

CO-ORIENTADOR: Dra. Cristiane Franco Codevilla

O trabalho em questão objetivou o desenvolvimento de nanoemulsões e suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo piperina a fim de estudá-las frente à fotodegradação e citotoxicidade. Para a quantificação da piperina nas nanoestruturas, primeiramente foi validada uma metodologia analítica por cromatografia líquida, onde o método mostrou-se específico, linear, preciso, exato e robusto. As nanoemulsões e suspensões de nanocápsulas contendo o bioativo (1,0 mg/mL) foram preparadas pelos métodos de emulsificação espontânea e deposição interfacial do polímero pré-formado, respectivamente. Para a caracterização físico-química das formulações, foram avaliados diâmetro médio das partículas, índice de polidispersão, pH, potencial zeta, teor de bioativo e eficiência de encapsulamento. Como resultados, as nanoestruturas apresentaram tamanho nanométrico (170 a 210 nm), índice de polidispersão abaixo de 0,12, pH levemente ácido (5,8 a 6,4), potencial zeta negativo (-6,3 a -12,4 mV), teor de piperina e eficiência de encapsulamento próximos a 100%. Com relação a estabilidade, os valores de pH e o teor de bioativo sofreram alterações durante o período de 90 dias de armazenamento. O estudo de fotodegradação da piperina frente à luz UVA ratificou a capacidade dos sistemas nanoestruturados em auxiliar na fotoproteção de substâncias, e demonstrou uma maior proteção para as nanocápsulas comparada às nanoemulsões. Para realização do estudo de liberação *in vitro* em meio gastrointestinal simulado, foi empregado o método de difusão em sacos de diálise. As nanoestruturas apresentaram uma liberação menor do bioativo nos diferentes tempos de análise em comparação ao bioativo não encapsulado. Com relação aos ensaios de citotoxicidade *in vitro*, a avaliação da atividade antitumoral foi realizada por MTT em células HepG2, HT-29 e fibroblastos. A toxicidade da piperina frente à células cancerígenas mostrou-se maior quando esta foi associada às nanoestruturas, do que na forma livre (não associada aos nanocarreadores), e ainda, uma maior viabilidade celular em relação aos fibroblastos. O ensaio *in vivo*, realizado com *C. elegans*, avaliou a toxicidade e a sobrevivência à juglone (capacidade antioxidante). Os batimentos faríngeos não foram afetados e a defecação não apresentou alteração apenas nas formulações sem a presença de bioativo, confirmando a ingestão da piperina pelo verme e a não toxicidade das partículas. Em relação ao ensaio de sobrevivência frente à juglone, as nanoemulsões contendo piperina e o bioativo em solução apresentaram diminuição significativa na taxa de mortalidade em comparação ao grupo controle, apresentando ação antioxidante, visto que protegeram o dano oxidativo (geração de superóxido) causado pela juglone. Ao contrário das nanocápsulas, as quais não demonstraram efeito, provavelmente pela limitação da parede polimérica, diminuindo a liberação do bioativo e a consequente ação desejada para este experimento.

Palavras-chave: Nanotecnologia. Piperina. Fotodegradação. Citotoxicidade. Antioxidante.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF PIPERINA-BASED NANOCARRIERS: INFLUENCE OF POLYMER AND *IN VITRO* - *IN VIVO* CYTOTOXICITY

AUTHOR: Mariana Heldt Motta
ADVISOR: Profa. Dra. Cristiane de Bona da Silva
CO-ADVISOR: Dra. Cristiane Franco Codevilla

This study aimed the development of nanoemulsions and polymeric nanocapsule suspensions containing piperine, in order to study their considering photodegradation and cytotoxicity. To quantify piperine at the nanostructures, at first, a liquid chromatography analytical methodology was validated. The method was specific, linear, precise, exact and robust. The nanoemulsions and nanocapsules containing the bioactive (1.0 mg/mL) were prepared by the spontaneous emulsification method and the interfacial deposition of pre-formed polymer, respectively. For the physic-chemical characterization of formulations, the average diameter of particles, the polydispersion index, pH, zeta potential, bioactive concentration and the encapsulating efficiency were evaluated. The nanostructures presented nanometric size (170 to 210 nm), polydispersion index below 0.12, acid pH (5.8 to 6.4), negative zeta potential (-6.3 to -12.4 mV), piperine concentration and encapsulating efficiency close to 100%. About stability, pH values and the bioactive concentration were affected during the 90 days period, of storage. The photodegradation study of piperine against the UVA light ratified the nanostructures systems capacity in supporting the photoprotection of substances, and showed a higher protection for the nanocapsules when compared to the nanoemulsions. A release study was conducted using gastrointestinal simulated media, it was applied a method of diffusion in dialysis bags. The nanostructures showed a lower release among the different analysis times in comparison non-encapsulated bioactive. For the cytotoxicity *in vitro* assays, the evaluation of anti tumor activity has been done through MTT in HepG2, HT-29 and fibroblasts cells. The toxicity of piperine to cancer cells was shown to be greater when it was associated with nanostructures, than in the free form (not associated to the nanocarriers), and also, to a higher cellular viability related to the fibroblasts. The *in vivo* assay, carried out with *C. elegans*, evaluated the toxicity and the survivability in juglone (antioxidant capacity). Faringeos beatings were not affected and the defecation was not affected only in the formulations without the bioactive presence, confirming the ingestion of piperine by the worm and the non-toxicity of the particles. For the survivability study against the juglone, the nanoemulsions containing piperine and the bioactive in solution presented the significant lowering of mortality taxes in comparisons to the control group, showing antioxidant action, since they protected the oxidative damage (caused by the superoxide), caused by the juglone. Contrary to nanocapsules, which didn't showed effect, probably because because of polymeric wall limitation, reducing the bioactive release and the further desired action for this experiment.

Keywords: Nanotechnology. Piperine. Photodegradation. Cytotoxicity. Antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - Estrutura química da piperina..... 20

RESULTADOS

Figura 2 – Cromatogramas obtidos por CLAE: a) para a formulação sem o bioativo (NE); b) solução metanólica de piperina (20,0 µg/mL) e c) nanoemulsão contendo piperina (P-NE) (20,0 µg/mL)..... 38

Figura 3 - Distribuição do tamanho de gotícula/partícula das nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo piperina (1,0 mg/mL), analisadas por espectroscopia de correlação de fótons. (A) P-NE, (B) NE, (C) P-NC e (D) NC..... 41

Figura 4 - Distribuição do tamanho de gotícula/partícula das nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo piperina (1,0 mg/mL), analisadas por difração a laser. (A) P-NE e (B) P-NC..... 42

Figura 5 - Distribuição do potencial zeta das nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo (1,0 mg/mL) ou não piperina, analisadas através da mobilidade eletroforética. (A) P-NE, (B) NE, (C) P-NC e (D) NC..... 45

Figura 6 - Tamanho médio das gotículas/partículas das nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões contendo piperina (P-NC e P-NE) ou sem a presença do mesmo (NC e NE) determinados no estudo de estabilidade..... 46

Figura 7 - Índices de polidispersão das suspensões de nanocápsulas e nanoemulsões contendo piperina (P-NC e P-NE) e suas respectivas formulações brancas (NC e NE) determinados durante o estudo de estabilidade..... 46

Figura 8 – Valores de pH das suspensões de nanocápsulas e nanoemulsões contendo piperina (P-NC e P-NE) e suas respectivas formulações sem o bioativo (NC e NE) determinados durante o estudo de estabilidade..... 47

Figura 9 - Teor de piperina das suspensões de nanocápsulas e nanoemulsões (P-NC e P-NE) determinados durante o estudo de estabilidade..... 48

Figura 10 - Teor residual de piperina em função do tempo após exposição da solução metanólica do bioativo (P-S), nanocápsula polimérica (P-NC) e nanoemulsões (P-NE) à luz UVA..... 49

Figura 11 – Perfil de liberação *in vitro* da piperina a partir das suspensões de nanocápsulas (P-NC), das nanoemulsões (P-NE) e solução metanólica (P-S)..... 51

Figura 12 - Citotoxicidade de diferentes concentrações das nanoestruturas (P-NE e P-NC) e piperina livre (P-S): a) linhagem celular 3T3; b) linhagem celular HepG2 e c) linhagem celular HT-29, todos pelo ensaio MTT após 24 horas de incubação. Dados expressos como média da triplicata \pm DPR	53
Figura 13 - Efeito do tratamento com piperina 50 μ M em <i>C. elegans</i> na análise dos batimentos faríngeos e do ciclo de defecação. Análise de uma via (ANOVA) seguido do teste de Bonferroni.....	55
Figura 14 - Efeito do tratamento com piperina 50 μ M/2 h em <i>C. elegans</i> no ensaio de sobrevivência da juglone. Os vermes foram expostos à 200 μ M de juglone por 1 h e a porcentagem de sobrevivência foi analisada após 24h de exposição. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ (comparado com grupo controle positivo) # $p < 0,05$ (comparado à piperina livre). Análise de uma via (ANOVA) seguido de teste de Bonferroni.....	56

LISTA DE TABELAS

MATERIAL E MÉTODOS

TABELA 1 - Condições experimentais utilizadas em cada passo da liberação gastrointestinal simulada.....	33
---	----

RESULTADOS

TABELA 2 - Resultados da precisão do método analítico por CLAE (repetibilidade e precisão intermediária) para a quantificação da piperina em nanoemulsões.....	39
TABELA 3 - Resultados obtidos para o ensaio de exatidão do método analítico por CLAE para a quantificação da piperina em nanoemulsões (n = 3).....	39
TABELA 4 - Análise da robustez do método analítico por CLAE para a quantificação da piperina em nanoemulsões.....	40
TABELA 5 - Características físico-químicas das nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões de piperina (P-NC e P-NE) e suas respectivas formulações sem o bioativo (NC e NE) (n = 3, média ± desvio padrão).....	41
TABELA 6 - Parâmetros de constante de velocidade de degradação (k), tempo de meia vida ($t_{1/2}$) e coeficiente de correlação (r) para solução metanólica de piperina (P-S), suspensão de nanocápsulas (P-NC) e nanoemulsões contendo piperina (P-NE) após o estudo de fotodegradação frente à luz UVA.....	49

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1	PIPERINA.....	19
3.1.1	Potencial antioxidante.....	21
3.1.2	<i>Piper nigrum</i> e a terapia anticancerígena.....	22
3.2	SISTEMAS NANOESTRUTURADOS COMO CARREADORES DE FÁRMACOS.....	23
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1	MATERIAL.....	27
4.2	MÉTODOS.....	27
4.2.1	Preparação das nanoemulsões e suspensões de nanocápsulas.....	27
4.2.2	Validação do método analítico.....	28
4.2.2.1	<i>Preparação das amostras.....</i>	28
4.2.2.2	<i>Preparação da solução de referência.....</i>	29
4.2.2.3	<i>Especificidade.....</i>	29
4.2.2.4	<i>Linearidade e coeficientes de detecção e quantificação.....</i>	29
4.2.2.5	<i>Precisão.....</i>	30
4.2.2.6	<i>Exatidão.....</i>	30
4.2.2.7	<i>Robustez.....</i>	30
4.2.3	Caracterização físico-química das nanoestruturas e avaliação da estabilidade.....	30
4.2.3.1	<i>Determinação do pH.....</i>	30
4.2.3.2	<i>Determinação do perfil granulométrico.....</i>	30
4.2.3.3	<i>Determinação do diâmetro médio das gotículas/partículas e do índice de polidispersão.....</i>	31
4.2.3.4	<i>Determinação do potencial zeta.....</i>	31
4.2.3.5	<i>Determinação do teor de bioativo.....</i>	31
4.2.3.6	<i>Determinação da eficiência de encapsulamento.....</i>	31
4.2.4	Estudo da proteção da piperina frente à fotodegradação.....	31
4.2.5	Liberação em sacos de diálise em meio gastrointestinal simulado.....	32

4.2.6	Ensaio de citotoxicidade para avaliação da atividade antitumoral.....	33
4.2.7	Ensaio <i>in vivo</i> com <i>Caenorhabditis elegans</i>.....	34
4.2.7.1	<i>Cepas e manutenção de C. elegans.....</i>	34
4.2.7.2	<i>Tratamento.....</i>	34
4.2.7.3	<i>Taxa de batimento faríngeo.....</i>	34
4.2.7.4	<i>Ensaio de Ciclo de Defecação.....</i>	35
4.2.7.5	<i>Exposição ao estresse oxidativo agudo.....</i>	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	37
5.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOESTRUTURAS.....	40
5.3	ESTABILIDADE FRENTE AO ARMAZENAMENTO.....	45
5.4	ESTUDO DA PROTEÇÃO DA PIPERINA FRENTE À FOTODEGRADAÇÃO.....	48
5.5	LIBERAÇÃO EM SACOS DE DIÁLISE EM MEIO GASTROINTESTINAL SIMULADO.....	50
5.6	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL.....	52
5.7	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE <i>IN VIVO</i> COM <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i> ..	54
6	CONCLUSÕES.....	58
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Piper* é encontrado em diversas regiões do mundo, utilizado devido as suas diversas propriedades farmacológicas, incluindo anticancerígena, imunomoduladora, antioxidante e anti-inflamatória (MEGHWAL; GOSWAMI, 2013). *Piper nigrum* é a espécie mais conhecida, denominada popularmente no Brasil como pimenta do reino (SRINIVASAN, 2008; POLOVKA; SUHAJ, 2010; BUTT et al., 2013). Dentre os diferentes tipos de pimentas do reino, encontra-se a pimenta preta, mais comercializada e utilizada na culinária, fórmulas medicinais e produtos estéticos (SRINIVASAN, 2005; DE-SOUZA et al., 2005). Os constituintes dos grãos da pimenta preta são diversos, destacando-se o alcaloide piperina, seu principal metabólito (FERREIRA et al., 2012; BUTT et al., 2013). A piperina é uma amida, cristalina, de coloração amarela e insolúvel em água (McNAMARA; RANDALL; GUNTHORPE, 2005). Além disso, tem como característica físico-química desfavorável sua sensibilidade à luz (BUTT et al., 2013).

A nanotecnologia vem sendo amplamente estudada devido às várias vantagens que pode oferecer às formulações, na tentativa de contornar os obstáculos apresentados por algumas substâncias ativas. Entre os nanocarreadores que apresentam atual interesse na área farmacêutica, estão as nanocápsulas, as nanoesferas e as nanoemulsões. Esses sistemas nanoestruturados apresentam diâmetro de partícula inferior a 1 μm e conferem vantagens, como o direcionamento da substância ativa no local específico de ação, aumentando o efeito terapêutico e/ou diminuindo os efeitos adversos, além da melhora da biodisponibilidade oral (COUVREUR et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003; CHARCOSSET; FESSI, 2005; RAWAT; SINGH; SARAF, 2006), podendo, também, promover a liberação controlada da mesma (MISHRA; BHAVESH; TIWARI, 2010). Adicionalmente, as nanoestruturas podem conferir o aumento da estabilidade química das substâncias ativas associados, como por exemplo, protegendo-os da luz (OURIQUE et al., 2008; FONTANA et al., 2009; SAVIAN et al., 2015). Tendo em vista as vantagens apresentadas pelos sistemas nanoestruturados, associado à fotoinstabilidade da piperina, este trabalho objetivou o desenvolvimento de nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo este bioativo. Além disso, a ausência de trabalhos relacionados ao proposto neste estudo, demonstrando as atividades farmacológicas da piperina quando associada a sistemas nanoestruturados, este estudo propôs-se, também, avaliar a citotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, e a atividade antioxidante da piperina associada aos nanocarreadores em comparação com o bioativo não associado.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho consistiu no desenvolvimento de nanoemulsões e suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo piperina e sua avaliação frente à fotodegradação e citotoxicidade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar nanoemulsões e suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo piperina;
- Validar metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a determinação da piperina nas nanoemulsões e suspensões de nanocápsulas; Avaliar as características físico-químicas das formulações quanto ao: diâmetro médio de gotículas/partículas, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, teor de bioativo e eficiência de encapsulamento;
- Avaliar a estabilidade das formulações em um período de 90 dias de armazenamento;
- Avaliar a fotoestabilidade da piperina incorporada aos sistemas nanoestruturados frente à radiação UVA;
- Avaliar a liberação *in vitro* do bioativo a partir dos nanocarreadores, utilizando o método de difusão em sacos de diálise, em meio gastrointestinal simulado;
- Avaliar a citotoxicidade da piperina associada e não associada aos nanocarreadores em linhagens tumorais de câncer hepático e colorretal, e de fibroblastos (não tumoral);
- Avaliar a capacidade antioxidante e a toxicidade da piperina associada e não associada, *in vivo*, utilizando modelo *C. elegans*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PIPERINA

O gênero *Piper* pertencente à família Piperaceae, possui cerca de 2000 espécies, encontradas pelas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Vem sendo utilizado tanto na medicina tradicional, para o tratamento de gripe, dores musculares, cansaço, quanto na medicina moderna, no tratamento de câncer, como antioxidante, anti-inflamatório, entre outros (PARMAR et al., 1997; MEGHWAL; GOSWAMI, 2013). Devido às suas diversas atividades, as espécies de *Piper* vêm sendo estudadas fitoquímica e farmacologicamente, com um grande interesse por parte das indústrias farmacêuticas (SILVA; MACHADO, 1999).

Piper nigrum é a espécie mais conhecida, originária da Índia, e também cultivada no Paquistão, América do Sul, África, Ásia, além do Brasil, onde é denominada popularmente como pimenta do reino (SZALLASI, 2005; SRINIVASAN, 2008; POLOVKA; SUHAJ, 2010; BUTT et al., 2013). Dentre as principais pimentas do reino comercializadas, encontram-se a pimenta branca, verde e preta (GU et al., 2013), todas procedentes da espécie *Piper nigrum*, porém, diferenciadas pelo período de colheita e processamento empregado (MEGWAL; GOSWAMI, 2013).

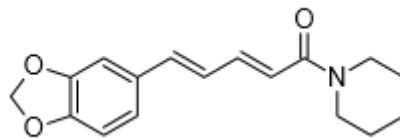
A pimenta preta é uma das especiarias mais utilizadas e comercializadas no mundo (GU et al., 2013; GULZAR et al., 2013), tornando-se ingrediente para a culinária, perfumaria, fórmulas medicinais e produtos estéticos (SRINIVASAN, 2005; DE-SOUZA et al., 2005; MEGHWAL; GOSWAMI, 2013). Os grãos de pimenta são ricos em vitaminas A e K, fibras dietéticas e minerais, como ferro, cálcio, potássio, magnésio, manganês, fósforo e β -caroteno. Apresentam também ácidos fenólicos e antioxidantes (BUTT et al., 2013), além de terpenos, esteróides, lignanas, flavonas e alcalóides (MUSENGA et al., 2007; MURTHY; BHATTACHARYA, 2008), como a chavicina, piridina, piperidina e piperina (SHAIKH; BHOSALE; SINGHAL, 2006).

Outros produtos constituintes da pimenta preta são as oleorresinas e o óleo essencial de pimenta. A oleorresina é responsável pelo sabor, o óleo envolvido com o aroma e o alcaloide piperina por transmitir a pungência, ou seja, o grau de ardência da pimenta (ZACHARIAH et al., 2010).

A piperina (Figura 1) foi isolada pela primeira vez a partir da espécie *Piper nigrum*, por um químico dinamarquês, em 1820 (FERREIRA et al., 2012; BUTT et al., 2013). Primeira amida isolada, piperina (1-piperoyl-piperidine), é o principal alcaloide constituinte da pimenta

preta, sendo o principal metabólito secundário desta espécie. É responsável pelo gosto picante da pimenta preta e está presente na concentração de 50-90 g por kg de pimenta preta (THIEL, 2014). É caracterizada por ser uma substância cristalina de coloração amarela, com ponto de fusão entre 128-130 °C (McNAMARA; RANDALL; GUNTHORPE et al., 2005). Insolúvel em água, a piperina atua como base fraca. Além disso, tem como importante característica a instabilidade frente à luz, sendo altamente sensível à mesma (BUTT et al., 2013).

Figura 1 – Estrutura química da piperina



Apresenta várias propriedades farmacológicas, como antipirética, analgésica e anti-inflamatória (GUPTA et al., 2000; BUKHARI et al., 2013; TASLEEM et al., 2014), antidepressiva (LEE et al., 2005; LI et al., 2007) e antiansiedade (SINGH e SINGH, 2002), antiasmática, imunomoduladora, estimuladora, antitumoral (DARSH; DORESWANY, 2004; SUNILA e KUTTAN, 2004), antimicrobiana (YANG et al., 2002) e antiulcerosa (BAI; XU, 2000). Além disso, hepatoprotetora (DESAI et al., 2008), antitireoidiana (PANDA e KAR, 2003) e antimetastática (PRADEEP e KUTAAN, 2002).

Além destas, apresenta atividade antioxidante, tanto em condições *in vivo* quanto *in vitro*, promovendo a proteção a danos oxidativos causados por radicais livres e espécies reativas de oxigênio (SELVENDIRAN; BANU; SAKTHISEKARAM, 2004), além da capacidade neuroprotetora (CHOMPATHOMPIKUNLERT; WATTANARTHORN; MUCHIMAPURA, 2010).

Dentre as diversas propriedades farmacológicas da piperina, merece destaque o impedimento do desenvolvimento de tumores (SELVENDIRAN; BANU; SAKTHISEKARAM, 2004), provavelmente pela sua ação anti-inflamatória (YING et al., 2013) e sua capacidade de interferir na angiogênese (DOUCETTE et al., 2013). Além disso, estudos recentes mostram o efeito citotóxico da piperina frente a células cancerígenas humanas e de ratos (LAI et al., 2012; SAMYKUTTY et al., 2013).

Na literatura, descreve-se o aumento da biodisponibilidade de diversos fármacos quando co-administrados com a piperina, tais como propanolol, fenitoína, nevirapina, esparteína, nimesulida, pirazinamida, carbamazepina, teofilina e as combinações para o tratamento da

Doença de Alzheimer, assim como potenciador da biodisponibilidade de outros bioativos, no caso da curcumina, bem explorada na literatura. Este efeito promove maior concentração plasmática dos fármacos, aumentando sua eficácia devido à inibição do metabolismo hepático (BADMAEV; MAJEED; PRAKASH, 2000), pelo aumento da absorção e inibição do transportador glicoproteína-P (BHARDWAJ et al., 2002) e do citocromo P450 (VOLAK et al., 2008).

3.1.1 Potencial antioxidante

A oxidação é um processo inevitável que ocorre em células do corpo, juntamente com respostas indesejáveis, como a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Essas espécies reativas são descritas amplamente na literatura como o agente causador responsável por várias doenças, incluindo o câncer, a inflamação e o envelhecimento (BUTT et al., 2009). A produção excessiva das ROS diminui a imunidade do corpo, resultando em estresse oxidativo (SEIFRIED et al., 2007).

As especiarias, em sua grande maioria, são conhecidas por possuírem potencial antioxidante devido à presença de moléculas bioativas em sua composição (LIU; NG, 2000). Nesse contexto, o alcaloide piperina se encaixa nessa característica.

A determinação da atividade antioxidante a partir de alguns ensaios *in vitro* gera algumas evidências conclusivas. Kapoor e colaboradores (2009) observaram elevada atividade antioxidante da pimenta preta, seu óleo essencial e das oleorresinas, em comparação a antioxidantes sintéticos. No mesmo sentido, Su e colaboradores (2007) indicaram que a pimenta preta é uma potencial fonte de antioxidantes naturais. Visto isso, os constituintes funcionais da pimenta preta fazem com que ela seja um promissor atenuante do estresse oxidativo. Essas atividades antioxidantes da pimenta preta foram atribuídas à sua forte capacidade de doar hidrogênios, quelar metais e, ainda, a eficácia para eliminar os radicais livres (GULÇIN, 2005).

3.1.2 *Piper nigrum* e a terapia anticancerígena

De acordo com a estimativa, a prevalência de câncer pode ser reduzido (30-40 %) com a melhora dos hábitos alimentares (ANTO et al., 2002; ZHOU et al., 2003). Nesse sentido, alguns estudos indicam que o consumo de alimentos ricos em moléculas bioativas podem diminuir o risco de várias doenças, especialmente o câncer. O consumo de especiarias, como a pimenta, é positivamente correlacionada com a redução de riscos de incidência de câncer em regiões da Ásia e do Mediterrâneo (MOHANDES et al., 1999).

As ações anticancerígenas da pimenta preta incluem a modulação dos sistemas de desintoxicação da fase I e fase II, a inibição da peroxidação lipídica e a melhora do estado antioxidante (SELVENDIRAN; SAKTHISEKARAN, 2004).

Efeitos anticancerígenos positivos da piperina foram evidenciados por Zhou e colaboradores (2003) contra carcinogênese de pulmão induzida por benzopireno em camundongos, devido a sua capacidade de interação com o citocromo P450 do sistema enzimático. Ainda em relação à carcinogênese de pulmão, outros estudos demonstraram que a piperina modula o ciclo mitocondrial do ácido tricarboxílico e enzimas que metabolizam a glutathione em animais (THIRUNAVUKKARASU et al., 2001; VIJAYAKUMAR; SURYA; NALINI, 2004; SURESH; SRINAVASAN, 2006).

Para avaliar o potencial quimiopreventivo da piperina, Vellaichamy e colaboradores (2009) induziram carcinogênese na pele a partir de DMBA (imunossupressor, que atua como iniciador de tumor). Os resultados mostraram que a piperina (50 mg/Kg) foi capaz de modular o sistema de desintoxicação de fase I e II de forma eficaz, além de melhorar a peroxidação lipídica. Da mesma forma, Krishnakumar e colaboradores (2009) apresentaram resultados semelhantes para o câncer bucal em animais.

A piperina (100 µM) também se mostrou citotóxica e impediu o crescimento *in vitro* de células cancerígenas, incluindo células de melanoma B16-F10, células de linfoma ascítico de Dalton e células de carcinoma ascítico de Ehrlich. Além disso, inibiu a expressão de células de fibrossarcoma HT-1080 de metaloproteinase de matriz (MMP)-9, interferindo, deste modo, com a migração e invasão de células tumorais (DOUCETTE et al., 2013).

Ainda, em estudo mais recente, a piperina demonstrou inibir seletivamente o crescimento de linhagens celulares de câncer de mama derivadas de pacientes com tratamento dificultado, bem como daqueles com receptores de estrogênio positivo do câncer de mama. Essa inibição ocorreu a partir de um efeito antiproliferativo e indução da apoptose da caspase-

dependente. A piperina ainda interferiu na atividade de células de câncer de mama (migração e expressão de MMP) que estão associadas à metástase (GREENSHIELDS et al., 2015).

3.2 SISTEMAS NANOESTRUTURADOS COMO CARREADORES DE FÁRMACOS

Os sistemas nanoestruturados apresentam diâmetro de partícula inferior a 1 μm e conferem vantagens, como o direcionamento da substância ativa no local específico de ação, aumentando o efeito terapêutico e/ou diminuindo os efeitos adversos, além da melhora da biodisponibilidade oral (COUVREUR et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003; CHARCOSSET; FESSI, 2005; RAWAT; SINGH; SARAF, 2006), podendo, também, promover a liberação controlada da mesma (MISHRA; BHAVESH; TIWARI, 2010). Adicionalmente a essas vantagens, as nanoestruturas podem conferir o aumento da estabilidade química dos fármacos associados, como por exemplo, protegendo-os da luz (OURIQUE et al., 2008; FONTANA et al., 2009; SAVIAN et al., 2015).

Dentre os principais nanocarreadores estudados no âmbito farmacêutico estão as nanoemulsões e as nanopartículas poliméricas (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007). As nanoemulsões são representadas por um sistema constituído por gotículas de óleo estabilizadas por tensoativos. As nanopartículas poliméricas, classificadas em nanoesferas e nanocápsulas, são definidas como partículas coloidais sólidas (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008; POHLMANN et al., 2013). As nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido. Já as nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo, geralmente oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. (CHARCOSSET; FESSI, 2005; MISHRA; BHAVESH; TIWARI, 2010).

Estes nanocarreadores vem sendo estudados e desenvolvidos para aplicação no tratamento de diversas doenças, entre elas o câncer. Isso se deve, principalmente, pela tentativa de contornar alguns efeitos adversos causados pela terapia convencional, onde a quimioterapia também afeta as células normais, gerando os efeitos colaterais. Fatores como a destruição indiscriminada de células normais, a toxicidade de fármacos quimioterápicos convencionais e o desenvolvimento de resistência a múltiplos fármacos, fazem necessário o emprego de novas tecnologias, como as nanopartículas poliméricas (PÉREZ-HERRERO; MEDARDE-FERNÁNDEZ, 2015).

Os nanocarreadores são capazes de transportar fármacos anticancerígenos, de modo a se acumular nos tumores, evitando os tecidos normais. Assim, atingem uma concentração citotóxica mais elevada nos tumores, reduzindo a toxicidade para o resto do corpo, em relação a fármacos não associados (DANHIER; FERON; PRÉAT, 2010). A angiogênese, característica dos tecidos tumorais, auxilia os nanocarreadores, pois a geração de novos vasos sanguíneos no tumor leva a um aumento na permeabilidade deste local, que somado a dificultada drenagem linfática dos tumores, permite um maior tempo de residência destes sistemas, permitindo a liberação dos agentes quimioterápicos (PÉREZ-HERRERO; MEDARDE-FERNÁNDEZ, 2015).

Como características satisfatórias, os nanocarreadores voltados para a terapia antitumoral devem permanecer na circulação com tempo de meia vida suficiente, evitando os sistemas fagocitário e retículo-endotelial, sendo que quanto menor o tamanho de partícula do nanocarreador, mais eficaz será esse efeito (PÉREZ-HERRERO; MEDARDE-FERNÁNDEZ, 2015).

O emprego de novas tecnologias já tem sido proposto para a associação da piperina, como os sistemas nanoestruturados e microparticulados. Dentre os estudos já relatados na literatura, Moorthi e colaboradores (2012) desenvolveram nanopartículas de Eudragit® E100 contendo curcumina e piperina associadas, visando contornar as limitações da biodisponibilidade oral e o direcionamento às células cancerígenas. Essas nanopartículas foram preparadas pelos métodos de hidratação de película fina, dispersão sólida, polimerização em emulsão e nanoprecipitação com algumas modificações. Dentre os quatro métodos testados, a nanoprecipitação demonstrou resultados mais satisfatórios, com tamanho médio de partículas de 85,43 nm, índice de polidispersão de 0,183 e potencial zeta de +29,7 mV. Foram desenvolvidas, também, nanopartículas de albumina carregadas com piperina e pioglitazona, para o tratamento da diabetes, onde o emprego da piperina visou proteger o estresse oxidativo produzido pela diabetes, reduzir o peso corporal e melhorar a sinalização da insulina. Para a preparação das nanopartículas, o método utilizado foi o de coacervação, resultando em partículas nanométricas, porém, polidispersas e com eficiência de encapsulamento máxima de 77,8 % e 81,5 %, para piperina e pioglitazona, respectivamente (BODDUPALLI et al., 2013). Em outro estudo, Pachauri e colaboradores (2015) desenvolveram nanopartículas de PEG-PLGA contendo piperina, voltadas ao tratamento de câncer, com o intuito de superar a resistência e os efeitos colaterais de alguns fármacos. As nanopartículas foram preparadas pelo método de emulsificação-*evaporação do solvente* e apresentaram tamanho médio de partículas

de, aproximadamente, 132 nm, índice de polidispersão, inferior a 0,1; potencial zeta negativo e eficiência de encapsulamento em torno de 38 %.

Em relação ao sistema microparticulado, foram desenvolvidas microesferas contendo piperina utilizando o método de evaporação de solvente, desenvolvendo três partículas diferentes: microesferas mucoadesivas, convencionais e flutuantes. Em relação ao tamanho, os valores foram de 354,4 μm para as mucoadesivas; 221,6 μm para as convencionais e 114,5 μm para as flutuantes, com eficiência de encapsulamento de 79,21 %; 75,24 % e 75,66 %, respectivamente. As formulações foram avaliadas quanto a proteção hepática e gástrica (antiúlcera) no modelo induzido por paracetamol, e todas apresentaram atividade hepatoprotetora juntamente com a piperina livre. As microesferas flutuantes obtiveram atividade semelhante ao fármaco padrão (silmarina) e superior às mucoadesivas pelo seu tamanho de partícula reduzido, e também maior que as microesferas convencionais, que se comportaram como a piperina livre (BODDUPALLI et al., 2012). Boddupalli e colaboradores (2014) desenvolveram microesferas de piperina associada ao fármaco omeprazol, a partir do método de emulsificação-evaporação do solvente. A farmacocinética foi avaliada, e pode-se observar o aumento da absorção e a diminuição do metabolismo do omeprazol quando administrado junto à piperina nas microesferas gastrorretentivas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

A piperina (95,98%, m/m) foi obtida da GAMA (São Paulo, Brasil); metanol de grau cromatográfico foi adquirido da Tedia (São Paulo, Brasil); água ultrapura foi purificada pelo aparelho MegaPurity Mega RO (Rio de Janeiro, Brasil). Para a preparação das nanopartículas foram utilizados monooleato de sorbitano (Span[®] 80) e o polímero poli(ϵ -caprolactona) (PCL, $M_n = 70,000 - 90,000$) obtidos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil); triglicerídeos de cadeia média (TCM) adquiridos da Delaware (Porto Alegre, Brasil), polissorbatato 80 (Tween[®] 80) da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil) e acetona da Química Moderna (São Paulo, Brasil). Para o ensaio de liberação foram utilizadas as enzimas pepsina 1:10.000 Dinâmica (São Paulo, Brasil); pancreatina porcine e sais biliares bovino e ovino da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil) e bicarbonato de sódio P.A da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Para o ensaio *in vivo* em *C. elegans* foram utilizados: o meio de crescimento NGM composto por NaCl da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), Bactoagar e Bactopectona da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil); o meio LB para *E. coli* OP50 contendo Luria Broth da Himedia (Curitiba, Paraná); sais para a preparação dos tampões: KH_2PO_4 e Na_2HPO_4 da Synth (São Paulo, Brasil), $CaCl_2$ e $MgSO_4$ da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil); juglone (naftoquinona 5-hidroxi-1,4 – IUPAC) da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparação das nanoemulsões e suspensões de nanocápsulas

As nanoemulsões e as suspensões de nanocápsulas foram preparadas, em triplicata, pelo método de emulsificação espontânea (BOUCHEMAL et al., 2004) e deposição interfacial do polímero pré-formado (FESSI et al., 1988), respectivamente.

Para as nanocápsulas, primeiramente foram pesados os constituintes da fase orgânica, composta pelo óleo (TCM – 0,4 g), o tensoativo de baixo EHL (Span[®] 80 – 0,1925 g), o polímero (PCL – 0,25 g), o bioativo (piperina – 0,0104 g) e o solvente miscível em água (acetona – 67 mL). A fase foi aquecida para dissolução dos componentes, à 40 °C, por uma hora. Na sequência, essa fase foi injetada em uma fase aquosa, composta por um tensoativo de alto EHL (Tween[®] 80 – 0,1925 g) e água ultrapura (134 mL), sob constante agitação magnética,

mantida por 10 minutos após a adição das fases. Após, a formulação foi levada ao evaporador rotatório à 40 °C, para eliminação do solvente orgânico e ajuste do volume final (25 mL) e da concentração de piperina (1,0 mg/mL). Para a preparação das nanoemulsões, o polímero foi omitido da formulação. As formulações foram denominadas nanoemulsões e nanocápsulas contendo piperina (P-NE e P-NC, respectivamente). Para comparação, formulações sem piperina foram preparadas e avaliadas (NE e NC). Todas as formulações foram preparadas em triplicata e armazenadas em frascos de vidro âmbar, mantidas sob proteção da luz e temperatura ambiente.

4.2.2 Validação do método analítico

Para realização das análises foi utilizado um cromatógrafo a líquido Agilent (Califórnia, EUA), composto de uma bomba, detector, central de controle e injetor automático. Os dados foram analisados a partir do programa OpenLab, versão A.01.05. Para determinação da pureza do pico, outro cromatógrafo foi utilizado (Shimadzu LC-20A, Kyoto, Japão), equipado com bomba LC-20AT, detector SPD-M20A PDA e sistema controlador CBM-20A. Como fase estacionária utilizou-se uma coluna Gemini[®] Phenomenex C-18 (150 x 4,6 mm, 5 µm juntamente a uma pré-coluna Phenomenex[®] C-18 (4,0 x 3,0 mm, 5µm). A fase móvel foi composta por metanol:água (70:30, v/v). O equipamento foi operado à temperatura ambiente, empregando fluxo isocrático de 1,0 mL/min. Para detecção, o comprimento de onda utilizado foi de 343 nm.

4.2.2.1 Preparação das amostras

Para completa extração da piperina das nanoemulsões, uma alíquota de 400 µL foi diluída em balão volumétrico de 20 mL com metanol, e agitada a 1100 rpm, por 30 minutos. Após, o balão foi aferido, para obtenção de uma concentração de 20 µg/mL. Para análise no cromatógrafo, as amostras foram previamente filtradas em membrana de celulose regenerada (0,45 µm) e realizadas em triplicata. O mesmo foi realizado para as amostras de suspensões de nanocápsulas, diferindo apenas o tempo de agitação para 40 minutos.

4.2.2.2 *Preparação da solução de referência*

A solução estoque foi preparada, pesando-se, exatamente, 26 mg de piperina, transferida para um balão volumétrico de 25 mL, diluída em metanol, para obtenção de uma concentração de 1,0 mg/mL. A partir desta, uma alíquota de 400 µL foi diluída a 20 mL contendo metanol para obtenção da solução padrão (20 µg/mL).

Dentre os parâmetros estudados na validação do método analítico estão: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez (ICH, 2005).

4.2.2.3 *Especificidade*

Para a determinação da especificidade do método, foram utilizadas formulações de nanoemulsão e de suspensões de nanocápsulas sem a presença do bioativo, contendo os demais excipientes. Para isso, as amostras foram submetidas ao mesmo processo de extração das amostras contendo o bioativo (4.2.2.1), injetadas no cromatógrafo e analisadas quanto a possível interferência dos constituintes da formulação.

4.2.2.4 *Linearidade e coeficientes de detecção e quantificação*

A construção da curva analítica se deu a partir da retirada de alíquotas equivalentes para a obtenção de concentrações de 5, 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL. Essas soluções foram preparadas a partir da diluição das alíquotas em metanol. A partir disso, três curvas analíticas independentes foram construídas e a linearidade foi obtida pelo estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, e analisadas por análise de variância (ANOVA).

A partir da curva analítica, os limites de detecção e quantificação foram calculados, seguindo as equações 1 e 2:

$$LD = 3,3 \times DP / S \quad (1)$$

$$LQ = 10 \times DP / S \quad (2)$$

Onde DP = desvio padrão do intercepto e S = inclinação da curva analítica

4.2.2.5 Precisão

A precisão foi obtida a partir da análise da repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi avaliada, analisando-se seis amostras distintas de 20 µg/mL, realizada no mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais. Para a precisão intermediária foi realizada a análise de três amostras de mesma concentração (20 µg/mL), em três dias diferentes. Os resultados foram avaliados e expressos em relação ao desvio padrão relativo (DPR, %).

4.2.2.6 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo teste de recuperação, calculando-se quanto de piperina adicionada à amostra foi recuperada (n = 3). Para o teste, três amostras contendo nanoemulsões foram extraídas em metanol, obtendo-se a concentração de 10 µg/mL de piperina. A essas amostras foram acrescentadas concentrações conhecidas da solução estoque, a fim de obter concentrações de 16, 20 e 24 µg/mL de bioativo, correspondentes a 80, 100 e 120 % da concentração usual de análise (20 µg/mL).

4.2.2.7 Robustez

A robustez do método foi avaliada, a partir das médias dos teores encontrados, variando-se os parâmetros: comprimento de onda (341 e 345 nm), proporção da fase móvel (65:35 e 75:25, metanol:água) e troca de equipamento (Schimadzu LC-20A, Kyoto, Japão).

4.2.3 Caracterização físico-química das nanoestruturas e avaliação da estabilidade

Após a preparação, as nanoemulsões e nanocápsulas contendo piperina foram avaliadas de acordo com as seguintes características físico-químicas:

4.2.3.1 Determinação do pH: as medidas de pH foram realizadas em potenciômetro (Seven Easy, Metler Toledo, Brasil) previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0, diretamente nas amostras.

4.2.3.2 Determinação do perfil granulométrico: o perfil granulométrico das amostras foi avaliado por difração à laser (Mastersizer® 3000E, Malvern Instruments). As análises foram

realizadas em água (índice de refração 1,33) e agitação de 1750 rpm. Para a análise dos resultados foi utilizada a Teoria de Mie, onde para cada formulação utilizou-se o índice de refração do material mais externo da gotícula/partícula, TCM (1,46) para as nanoemulsões e PCL (1,590) para as suspensões de nanocápsulas.

4.2.3.3 Determinação do diâmetro médio das gotículas/partículas e do índice de polidispersão: as amostras foram dispersas em água ultra-pura (diluição 1:500, v/v), para posterior análise do diâmetro médio e da polidispersão, por espectroscopia de correlação de fótons (Zetasizer® Nanoseries, Malvern Instruments).

4.2.3.4 Determinação do potencial zeta: as amostras foram dispersas em solução de NaCl 10 mM, na proporção 1:500 (v/v), para posterior análise do potencial zeta (Zetasizer® Nanoseries, Malvern Instruments).

4.2.3.5 Determinação do teor de piperina: o teor do bioativo nas formulações foi determinado por CLAE, a partir da metodologia validada conforme descrito no item 4.2.2, de acordo com os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão e exatidão (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

4.2.3.6 Determinação da eficiência de encapsulamento: foi determinada pela técnica de ultrafiltração-centrifugação (Amicon® 10.000 MW, Millipore) em microcentrífuga (Sigma Aldrich), a 2.200 xG, durante 30 minutos. Foi calculada a partir do teor de bioativo total e livre, pela diferença entre a concentração total de piperina e a concentração encontrada no ultrafiltrado (concentração não associada).

Adicionalmente, a estabilidade da piperina associada aos nanocarreadores foi realizada a temperatura ambiente. As amostras foram armazenadas em frascos de vidro âmbar e avaliadas no tempo zero (logo após a preparação) e por um período de 90 dias. Os parâmetros pH, diâmetro médio das gotículas/partículas, índice de polidispersão, potencial zeta e teor de piperina foram monitorados durante o estudo.

4.2.4 Estudo da proteção da piperina frente à fotodegradação

A estabilidade da piperina frente à fotodegradação foi realizada pela exposição das formulações (nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas) à luz ultravioleta artificial UVA

(Lâmpada UVA Black Light (BLB) 30W). As amostras (1,0 mL) foram acondicionadas, individualmente, em cubetas plásticas translúcidas (Brand® ultra-micro UV-Cuvettes, 12,5 mm×45 mm×12,5 mm), e dispostas em uma câmara espelhada, em uma distância de 14 cm. Em tempos pré-determinados, a cubeta da amostra correspondente foi retirada, e uma alíquota de 400 µL diluída em metanol, a fim de avaliar a concentração de bioativo degradada. Com o intuito de verificar a interferência do nanocarreador, uma solução de piperina (1,0 mg/mL) foi preparada em metanol. As análises foram realizadas em triplicata, e as amostras quantificadas por CLAE, de acordo com metodologia previamente validada. Para confirmação da degradação apenas pela presença da luz UVA, e não pela influência da temperatura, cubetas das amostras foram expostas ao tempo total do experimento, cobertas por papel alumínio.

Os resultados obtidos foram analisados para se estabelecer a cinética de degradação da piperina nas formulações, calculando-se a respectiva constante de degradação (k) e o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) (SAVIAN et al., 2015).

4.2.5 Liberação em sacos de diálise em meio gastrointestinal simulado

O ensaio da liberação *in vitro* da piperina a partir das nanoestruturas foi realizado pela técnica de difusão em sacos de diálise (MWCO = 12,000 a 14,000 Da, Sigma-Aldrich Corporation, MO, USA), obedecendo a condição *sink*, utilizando um fluido gastrointestinal simulado. As soluções utilizadas para variação do pH, as enzimas para simulação do trato, assim como o período de tempo em cada etapa, encontram-se descritos na Tabela 1. Iniciando pela etapa esôfago-estômago, foi utilizada uma solução de 25 mg/mL de pepsina preparada em HCl 0,1 M, que foi adicionada igualmente (50 µL) durante a fase gástrica, com duração de 90 minutos. As mudanças de pH para acidificar o meio durante esta fase foram feitas adicionando quantidades conhecidas de HCl 0,1 M. Na etapa duodeno, foi preparada solução contendo 2 g/L de pancreatina e 12 g/L de sais biliares diluídos em bicarbonato de sódio 0,1 M, adicionando ao início desta etapa 250 µL desta solução, e ajustado o pH. Na etapa final, referente ao íleo, um novo aumento do pH foi necessário para se chegar ao final do processo com um valor de 6,5, utilizando bicarbonato de sódio 0,1 M, totalizando o tempo de experimento de 190 minutos (MADUREIRA et al., 2011). Para o ensaio, sacos de diálise contendo alíquotas de 1,0 mL das amostras de suspensões de nanocápsulas poliméricas e das nanoemulsões (1,0 mg/mL) foram colocados em béqueres contendo o meio inicial do experimento (150 mL de água ultrapura + 50 µL de pepsina), e mantidos sob agitação constante durante todo o experimento, a uma

temperatura de 37 °C. Para comparação, uma solução metanólica de piperina livre (1,0 mg/mL) foi avaliada. Em tempos pré-estabelecidos, alíquotas de 1,0 mL do meio foram coletadas e o mesmo volume de meio fresco foi repostado. A concentração da piperina liberada em cada tempo foi analisada por CLAE.

Tabela 1 - Condições experimentais utilizadas em cada passo da liberação gastrointestinal simulada

Etapa	Enzima	pH	Tempo (min)
Esôfago-Estômago	Pepsina	4,6	10
		3,8	10
		2,8	20
		2,3	20
		2,0	20
Duodeno	Pancreatina + Sais Biliares	5,0	20
Íleo	---	6,5	90

4.2.6 Ensaios de citotoxicidade para avaliação da atividade antitumoral

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados utilizando linhagens de células tumorais de diferentes origens (HepG2 – câncer hepático e HT-29 – câncer colorretal) e também uma linhagem não-tumoral (3T3 – fibroblastos) como controle negativo da atividade antitumoral. Para a determinação da atividade citotóxica e antiproliferativa foi utilizado o ensaio de viabilidade celular MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio), seguindo procedimentos previamente descritos (NOGUEIRA et al., 2013; NOGUEIRA et al., 2014). As células foram mantidas em estufa a 37 °C com 5 % de CO₂ em meio DMEM (Meio Eagle Dulbecco Modificado). Quando foi obtida uma confluência aproximada de 80 %, foram tratadas com uma solução de tripsina/EDTA, contadas em microscópio óptico, ajustadas à densidade celular de 1 x 10⁵ células/mL, transferidas para placas de 96 poços e incubadas durante 24 h. As células foram tratadas com concentrações crescentes das amostras e, após 24 h de incubação, foram realizados os ensaios de viabilidade celular para determinar a atividade antitumoral.

Ainda, a atividade da piperina associada e não associada aos nanocarreadores foi avaliada em meio levemente ácido (pH ~ 6,6), característico do espaço extracelular do tecido

tumoral. Para isso, o meio de cultivo celular foi acidificado com tampão HEPES 1 M pH 6,2 (NOGUEIRA et al., 2013).

4.2.7 Ensaio *in vivo* com *Caenorhabditis elegans*

4.2.7.1 Cepas e manutenção de C. elegans

A cepa tipo selvagem de *C. elegans* N2 (var. Bristol) foi fornecida pelo Caenorhabditis Genetics Center (Universidade de Minnesota, EUA). A cepa foi mantida a 20 °C em meio de crescimento de nematódeos (NGM) em placas semeadas com *Escherichia coli* OP50 como fonte de alimento (BRENNER, 1974).

4.2.7.2 Tratamento

Os nematódeos adultos jovens foram expostos em placas de petri, a 50 µM de solução de piperina não associada (P-S), suspensões de nanocápsulas contendo piperina (P-NC), nanoemulsão contendo piperina (P-NE) ou veículo durante 2 h a 20 °C. Para a solução (P-S), o bioativo foi dissolvido em metanol (concentração final de 1 %) e ambos os nanocarreadores (P-NC e P-NE) foram diluídos em água. Os tratamentos foram realizados com cerca de 1000 vermes por grupo em tampão M9 (42 mM de Na₂HPO₄, KH₂PO₄ 22 mM, 8,6 mM de NaCl e 1 mM de MgSO₄). Os vermes foram então lavados três vezes e transferidos para placas NGM semeados com *E. coli*. OP50. Após 24 h a 20 °C, as avaliações foram realizadas. Como controle para os nanocarreadores, as nanoemulsões e suspensões de nanocápsulas sem a presença da piperina também foram avaliadas. O tratamento foi realizado tanto agudo quanto crônico.

4.2.7.3 Taxa de batimento faríngeo

O número de batimentos faríngeos em um intervalo de 10 s (HUANG et al., 2004) foi medida com um microscópio Nikon E200 (Tóquio, Japão). As análises foram realizadas em três ensaios independentes com dez vermes por grupo. Os resultados foram expressos como batimentos faríngeos/minuto.

4.2.7.4 Ensaio Ciclo de Defecação

As frequências de defecação foram realizadas a partir da observação da duração entre os passos BPC (a contração do músculo posterior do corpo) de três defecações consecutivas (MIGLIORI et al., 2011) em um microscópio Nikon E200 (Tóquio, Japão). As análises foram realizadas em três ensaios independentes com dez vermes por grupo. Os resultados foram expressos como ciclo de defecação (s).

4.2.7.5 Exposição ao estresse oxidativo agudo

Para executar o ensaio de resposta ao estresse oxidativo agudo, vermes previamente expostos a P-S, P-NE, P-NC ou ao veículo por 2 h foram retirados dos seus tratamentos e imediatamente expostos a Juglone (naftoquinona 5-hidroxi-1,4 – IUPAC) na concentração final de 200 μ M durante uma hora (CL50), a 20 °C. Os vermes foram lavados e transferidos para placas NGM semeados com *E. coli* OP50 e, 24 h mais tarde, 100 nematoides por grupo foram avaliados quanto a viabilidade, em um microscópio Nikon E200 (Tóquio, Japão). Os animais que reagiram a um estímulo mecânico foram classificados como vivos, e os animais não-respondentes foram classificados como mortos. As análises foram realizadas em três ensaios independentes. Os resultados foram expressos como percentual de sobreviventes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

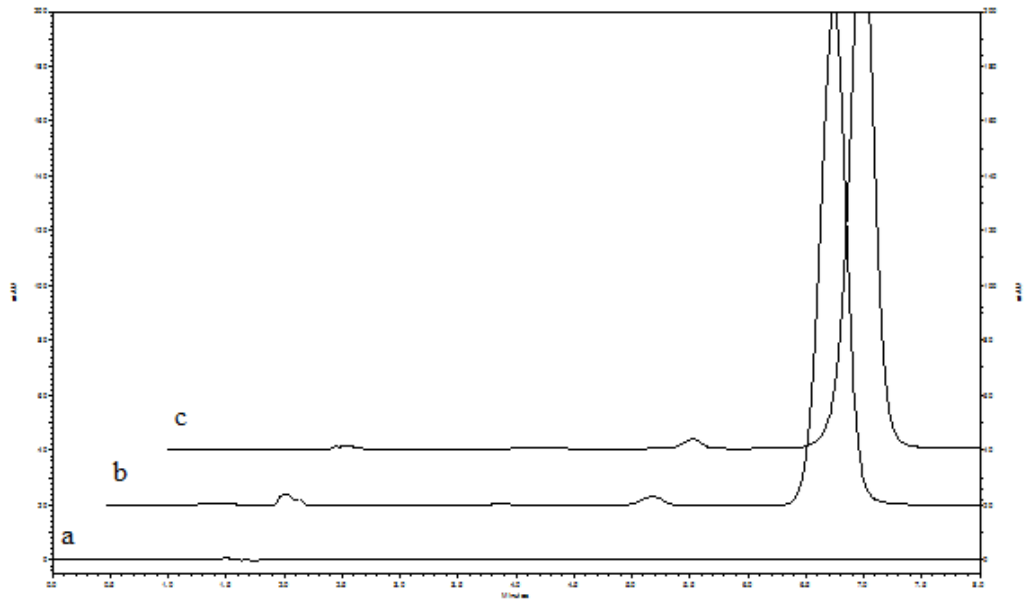
Para se desenvolver uma metodologia analítica para quantificação de fármacos incorporados a nanocarreadores, é necessário garantir que este seja capaz de extrair totalmente o fármaco do sistema no qual está inserido. Para tal, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) está entre um dos métodos mais estudados para a análise de fármacos nanoestruturados (SANTOS et al., 2012; HÄRTER et al., 2015).

Inicialmente, para a escolha da fase móvel ideal, alguns testes foram realizados, com o objetivo de encontrar um sistema eluente simples e de baixo custo. Além disso, que fosse exclusivo para a piperina, diferentemente dos já relatados na literatura (MOORTHI et al., 2013; DE MEY et al., 2014; GOWDA et al., 2014). Utilizando como solvente de escolha o metanol, pelo seu menor custo em relação aos demais, metanol 100 % e metanol:água em diferentes proporções (95:5, 80:20 e 70:30, v/v) foram testados. O uso do metanol 100 % e um fluxo 0,5 mL/min resultou em um tempo de retenção baixo, muito próximo ao volume morto (3,92 minutos). Resultado semelhante foi encontrado para a proporção 95:5. As proporções de 80:20 e 70:30 proporcionaram resultados semelhantes, com um tempo de retenção de, respectivamente, 6,29 e 6,27 minutos e os pratos teóricos com valores adequados (4016 e 3303). Porém, a resolução e a assimetria foram melhores para a proporção 70:30 (4,15 e 0,81, respectivamente), além de proporcionar uma menor quantidade de solvente orgânico, resultando em menor custo.

A partir dos resultados, a fase móvel escolhida foi a composta por metanol:água (70:30, v/v), mostrando-se adequada para a análise, apresentando um tempo de retenção em torno de 6,3 minutos, pico bem resolvido, assimetria e pratos teóricos satisfatórios. Para a validação do método, empregou-se a nanoemulsão contendo piperina e a nanoemulsão sem o bioativo.

No que se refere à especificidade, o método mostrou-se específico para a análise da piperina, sem a interferência dos excipientes da formulação ou solvente no pico cromatográfico do bioativo. Na Figura 2, a sobreposição da piperina livre (P-S) e da formulação com e sem piperina (P-NE e NE), ratifica a ausência de outros picos no mesmo tempo de retenção do bioativo.

Figura 2 - Cromatogramas obtidos por CLAE: a) nanoemulsão sem o bioativo (NE); b) solução metanólica de piperina (20,0 µg/mL) e c) nanoemulsão contendo piperina (P-NE) (20,0 µg/mL).



Com relação à análise da linearidade, as curvas foram submetidas à análise de variância (ANOVA), obtendo adequado coeficiente de correlação ($r = 0,9999$; $y = 258166x - 103392$), regressão linear significativa ($F_{\text{calculado}} = 29462,98 > F_{\text{tabelado}} = 4,75$) e sem desvio de linearidade ($F_{\text{calculado}} = 2,66 < F_{\text{tabelado}} = 3,26$), demonstrando que o método em questão é linear na faixa de concentração de 5 a 50 µg/mL. Os valores de LQ e LD também foram calculados e correspondem a 1,26 µg/mL e 0,41 µg/mL, respectivamente.

Os resultados da precisão (repetibilidade e precisão intermediária) estão descritos na Tabela 2. Os valores de desvio padrão relativo (DPR) encontrados foram de 0,38 % e 1,11 % para repetibilidade e precisão intermediária, respectivamente, demonstrando que a metodologia em questão é precisa dentro da faixa de concentração analisada. A exatidão foi avaliada pelo teste de recuperação do analito, sendo a recuperação média encontrada para este ensaio de $101,35 \pm 0,80$ %, evidenciando que o método é exato (Tabela 3).

Tabela 2 - Resultados da precisão do método analítico por CLAE (repetibilidade e precisão intermediária) para a quantificação da piperina em nanoemulsões

	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g/mL}$)	Teor (%)	DPR (%)
Intra-dia (n = 6)	20,0	19,99 \pm 0,08	99,99 \pm 0,38	0,38
Inter-dia				
Dia 1 (n = 3)	20,0	19,99 \pm 0,05	99,96 \pm 0,25	0,25
Dia 2 (n = 3)	20,0	19,68 \pm 0,17	98,42 \pm 0,83	0,85
Dia 3 (n = 3)	20,0	19,98 \pm 0,27	99,92 \pm 1,36	1,36
Média (n = 9)	20,0	19,89 \pm 0,22	99,43 \pm 1,11	1,11

Tabela 3 - Resultados obtidos para o ensaio de exatidão do método analítico por CLAE para a quantificação da piperina em nanoemulsões (n = 3)

Amostra	Concentração adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)
R1	6,03 \pm 0,10	15,89 \pm 0,10	100,59 \pm 1,68
R2	10,22 \pm 0,14	20,08 \pm 0,14	102,19 \pm 1,39
R3	14,18 \pm 0,06	24,04 \pm 0,06	101,27 \pm 0,40
		Recuperação média (%)	101,35 \pm 0,80
		DPR	0,79

R1, R2 e R3: amostras acrescidas da solução de referência.

Os resultados obtidos para a robustez do método analítico estão presentes na Tabela 4. As pequenas variações no comprimento de onda, proporção da fase móvel e mudança de equipamento não afetaram o método cromatográfico desenvolvido, indicando a robustez do mesmo.

Tabela 4 - Análise da robustez do método analítico por CLAE para a quantificação da piperina em nanoemulsões

Condições	Pratos teóricos	Fator de cauda	Tempo de retenção	Teor de piperina (%)	DPR (%)
Condições recomendadas*	3373,7	0,33	6,01	100,01 ± 0,71	0,71
<i>Fase Móvel (v/v)</i>					
65:35	3824	0,82	10,02	99,81 ± 0,28	0,28
75:25	3425	0,02	4,40	100,02 ± 0,98	0,98
<i>λ (nm)</i>					
341	3390,3	0,33	6,00	99,57 ± 0,64	0,65
345	3394,3	0,33	5,99	99,46 ± 0,33	0,34
<i>Equipamento</i>					
HPLC Shimadzu	4978,9	1,17	5,80	99,41 ± 1,08	1,08

*: fluxo de 1,0 mL/min; detecção UV a 343 nm; Cromatógrafo a líquido HPLC Agilent 1260.

5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOESTRUTURAS

Após a preparação, as formulações foram avaliadas macroscopicamente, apresentando um aspecto leitoso, opalescente, com reflexo azulado (efeito *Tyndall*), conhecido como o movimento Browniano dos sistemas coloidais. Os resultados referentes à caracterização das nanoestruturas estão expressos na Tabela 5.

Tabela 5 - Características físico-químicas das nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões de piperina (P-NC e P-NE) e suas respectivas formulações sem o bioativo (NC e NE) (n = 3, média \pm desvio padrão)

Formulação	Concentração de piperina (mg/mL)	E. E (%)*	Tamanho de gotícula/partícula (nm)	PDI**	Potencial zeta (mV)	pH
P-NC	0,98 \pm 0,01	99,2 \pm 0,1	203 \pm 2	0,11 \pm 0,01	-12,4 \pm 0,6	6,30 \pm 0,15
NC	---	---	207 \pm 4	0,11 \pm 0,00	-9,3 \pm 1,2	5,87 \pm 0,04
P-NE	0,99 \pm 0,01	98,5 \pm 0,1	182 \pm 2	0,09 \pm 0,04	-6,3 \pm 0,4	6,38 \pm 0,09
NE	---	---	176 \pm 2	0,10 \pm 0,04	-8,5 \pm 0,4	6,27 \pm 0,07

*E. E: Eficiência de Encapsulamento **PDI: índice de polidispersão.

Figura 3 - Distribuição do tamanho de gotícula/partícula das nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo (1,0 mg/mL) ou não piperina, analisadas por espectroscopia de correlação de fótons. (A) P-NE, (B) NE, (C) P-NC e (D) NC

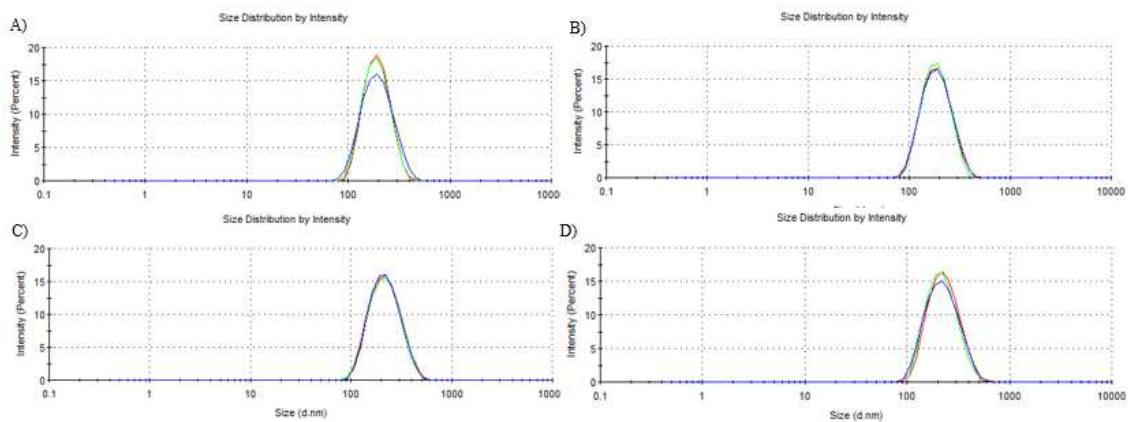
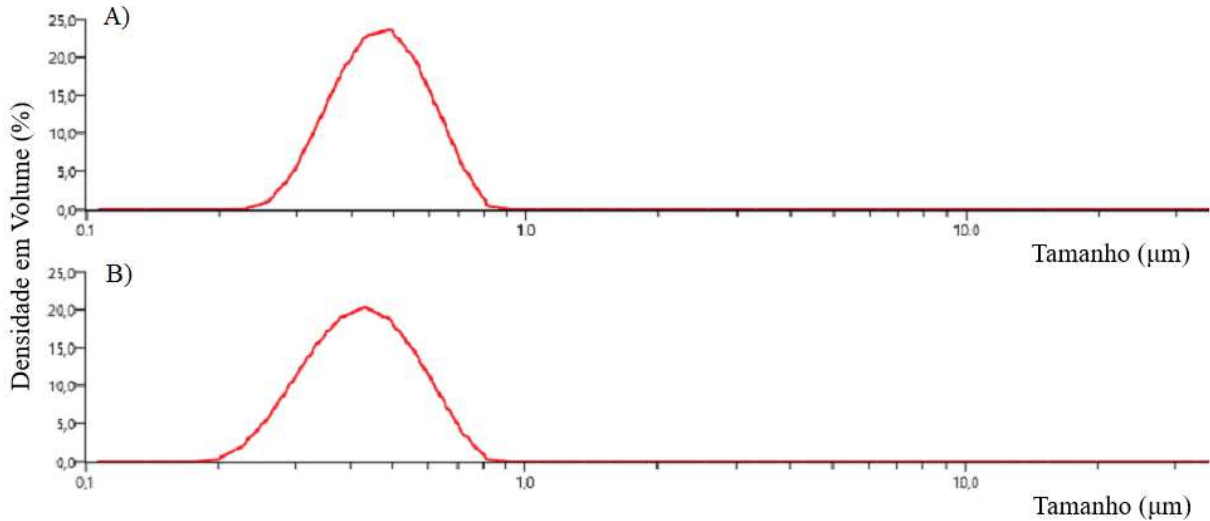


Figura 4 - Distribuição do tamanho de gotículas/partículas das nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo piperina (1,0 mg/mL), analisadas por difração a laser. (A) P-NE e (B) P-NC



As formulações apresentaram tamanho nanométrico (170 – 210 nm) e índice de polidispersão abaixo de 0,12, mostrando a adequada homogeneidade do sistema. A diferença de tamanho entre os nanocarreadores foi significativa ($p < 0,05$), mostrando que a presença do polímero é um fator relevante para o aumento do tamanho das nanocápsulas em relação às nanoemulsões. Esses resultados corroboram com os já relatados na literatura por Ribeiro e colaboradores (2016), onde nanoemulsões contendo tioconazol apresentaram tamanho de partícula menor em comparação as nanocápsulas (182 ± 2 e 207 ± 4 nm, respectivamente). Os resultados de tamanho de gotícula/partícula por difração a laser vem a somar com o anterior, demonstrando uma distribuição nanométrica, com pico unimodal, sem a presença de partículas micrométricas, para ambas formulações. As nanoemulsões e suspensões de nanocápsulas apresentaram valores de Span próximos a unidade (0,628 e 0,739) e D [4;3] de $0,471 \mu\text{m}$ e $0,460 \mu\text{m}$, respectivamente, confirmando a homogeneidade do sistema, sem presença de micropartículas. Pode-se também observar que a adição do bioativo nas formulações não influenciou no acréscimo ou decréscimo do tamanho de partículas ($p > 0,05$), característica esta também apresentada por Savian e colaboradores (2015) empregando o mesmo método de preparação dos nanocarreadores.

O tamanho de partícula nanométrico também foi encontrado em outros trabalhos na literatura, utilizando outras metodologias para encapsulação da piperina. Em 2012, Moorthi e colaboradores testaram quatro métodos para nanoencapsulação de curcumina e piperina, e em

cada um, seis formulações (F1-F6) foram avaliadas, variando alguns parâmetros entre elas. Os métodos testados foram: hidratação de filme, dispersão sólida, polimerização em emulsão e nanoprecipitação. Os três primeiros métodos verificaram o uso de diferentes solventes (acetona e etanol) na preparação das nanopartículas, demonstrando não haver diferença significativa no tamanho de partícula. O aumento do tempo de sonicação foi avaliado para o método de hidratação de filme, mostrando haver diminuição significativa do tamanho, porém sem interferência no PDI e potencial zeta, apresentando como melhor formulação a F5 (acetona, Poloxamer[®] 188 e 10 minutos de sonicação), com tamanho médio de partículas de 321 nm e PDI de 0,537. O uso de diferentes tensoativos também foi avaliado nos métodos de dispersão sólida e polimerização em emulsão, onde o tensoativo aniônico (SLS) foi capaz de diminuir o tamanho de partícula e aumentar o potencial zeta das formulações, em comparação ao tensoativo não-iônico utilizado em cada teste (Poloxamer[®] 188 e Poloxamer[®] 407). Para o método de dispersão sólida, o aumento da viscosidade com alginato de sódio foi avaliada, mostrando um aumento no tamanho de partícula (510 nm), apresentando como melhor formulação a F2 (etanol, SLS) com tamanho de partícula de 158 nm e PDI 0,646. Além da avaliação do tensoativo, o método de polimerização em emulsão avaliou o aumento na velocidade de agitação, demonstrando a diminuição do tamanho de partícula, tendo como formulação a F2 (etanol, SLS e 500 rpm) de 705,6 nm e PDI de 0,750. Todos estes métodos não obtiveram resultados satisfatórios quanto aos critérios de tamanho e índice de polidispersão, por isso a adição de uma fase de filtração foi necessária (0,22 µm ou 0,45 µm). Como demonstrado nos métodos anteriores, o tensoativo aniônico foi a melhor escolha para reduzir a agregação, diminuindo o tamanho de partícula, do que o tensoativo catiônico ou não-iônico. No entanto, devido a obtenção de partículas menores, para evitar a rápida eliminação do fármaco por macrófagos, um revestimento com PEG contendo tensoativos não-iônicos seria essencial. Por isso, no método de nanoprecipitação foi avaliado o efeito do tensoativo aniônico (SLS) e não-iônico (Poloxamer[®] 188) e suas combinações com o polímero catiônico Eudragit[®] E 100. O uso da combinação de SLS e Eudragit[®] E 100 obteve maior potencial zeta que Poloxamer[®] 188 e Eudragit[®] E 100, porém, não foram observadas diferenças significativas no tamanho de partícula e PDI. Para verificar se este método sofria interferência na velocidade de agitação, assim como no método polimerização em emulsão, agitações de 500 e 1000 rpm foram testadas, e observou-se que o aumento da velocidade de agitação não alterou significativamente o tamanho de partícula, PDI e potencial zeta. Das formulações testadas para o método de nanoprecipitação, a F4 (Eudragit[®] E 100, Poloxamer[®] 188 e 1000 rpm) foi a melhor formulação, apresentando tamanho médio de partícula de 85,43 nm e PDI de 0,183. Este último método foi

o mesmo utilizado neste trabalho, bem como a combinação de tensoativos não-iônicos e o polímero (PCL), apresentando características semelhantes de diâmetro médio de partícula e índice de polidispersão, com o tamanho de partícula um pouco menor.

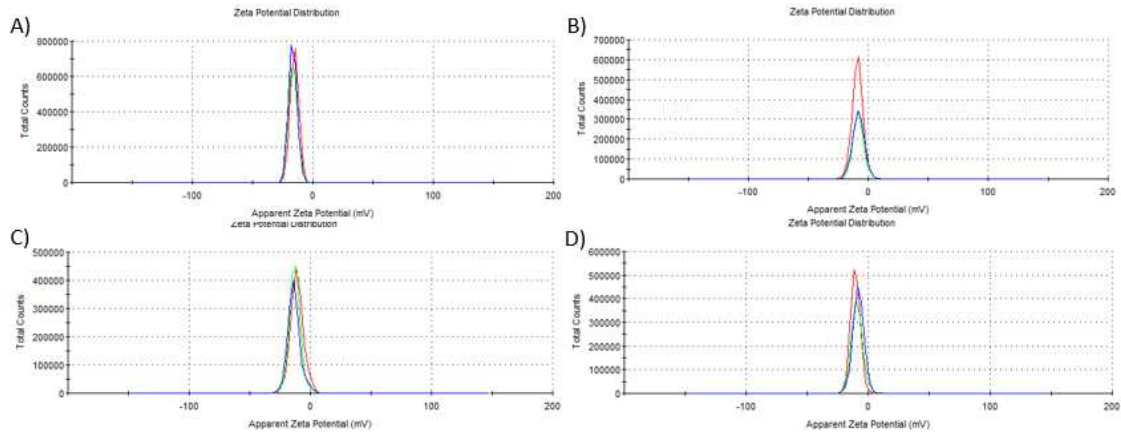
Boddupalli e colaboradores, em 2013, desenvolveram nanopartículas de albumina sérica bovina contendo pioglitazona e piperina, pelo método de coacervação, apresentando valores de diâmetro médio de partículas em torno de 349,4 em pH básico, e 391,5 em pH ácido, e alto índice de polidispersão, conferindo baixa homogeneidade do sistema.

Pachauri e colaboradores em 2015 desenvolveram nanopartículas de PLGA pelo método de emulsificação-evaporação do solvente, utilizando o PVA como tensoativo, e obtiveram partículas homogêneas (PDI 0,037) e com diâmetro médio de 132 nm. Embora a metodologia e os componentes utilizados para o desenvolvimento desta formulação sejam diferentes dos utilizados neste trabalho, as características físico-químicas das partículas se assemelham.

Em relação ao pH, as formulações apresentaram valores ácidos, com diferença significativa entre as nanoestruturas. As nanocápsulas apresentaram valores menores de pH, devido a presença do polímero PCL, que tem em sua estrutura grupos carboxílicos terminais, levando a valores de pH mais baixos (SCHAFFAZICK et al., 2002). Valores de pH ligeiramente maiores foram encontrados para ambos sistemas coloidais, quando o bioativo foi adicionado às formulações, provavelmente pelas características da piperina.

No que se refere ao potencial zeta, as amostras apresentaram valores negativos. No caso das nanoemulsões, isto foi causado pela adsorção de moléculas de polissobato 80 à interface óleo-água, pois mesmo sendo um tensoativo não-iônico, a presença de impurezas, tais como os ácidos graxos, origina gotículas de óleo de carga negativa (SALVIA-TRUJILLO et al., 2015). Em relação às nanocápsulas, a carga negativa está relacionada com a estrutura química do polímero. A presença de piperina nas formulações aumentou o potencial zeta, podendo predizer uma maior estabilidade dos nanocarreadores, visto que grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação entre as partículas (LEGRAND et al., 1999; SCHAFFAZICK et al., 2003). A distribuição do potencial zeta das formulações pode ser observada na Figura 5.

Figura 5 - Distribuição do potencial zeta das nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo (1,0 mg/mL) ou não piperina, analisadas através da mobilidade eletroforética. (A) P-NE, (B) NE, (C) P-NC e (D) NC



No que diz respeito ao teor de bioativo, os nanocarreadores apresentaram valores próximo ao teórico de 1,0 mg/mL, e eficiência de encapsulamento de, aproximadamente, 100 % para ambas formulações.

Quanto a eficiência de encapsulamento, os autores Pachauri e colaboradores (2015) desenvolveram nanopartículas de PEG-PLGA contendo piperina, que apresentou eficiência de encapsulamento em torno de 38 %, resultado este que demonstra a maior eficiência das nossas nanoestruturas em encapsular este mesmo bioativo, com resultados de 98 e 99 %. Valores superiores de 78% e 94% foram apresentados por Boddupalli e colaboradores (2013) e Moorthi (2013), respectivamente, porém ainda significativamente menores que os encontrados neste trabalho.

5.3 ESTABILIDADE FRENTE AO ARMAZENAMENTO

As formulações foram mantidas ao abrigo da luz, durante um período de 90 dias. Nesse tempo foram avaliados o tamanho médio de partículas, índice de polidispersão, potencial zeta, pH e teor de piperina. O comparativo dos resultados estão apresentados nas Figuras 6, 7 e 8.

As características macroscópicas iniciais foram mantidas, sem precipitação, mudança de cor e aspecto.

Em relação ao tamanho médio de gotículas/partículas, as formulações mantiveram suas características iniciais após 90 dias do estudo, sem diferença significativa para os resultados

obtidos ($p>0,05$). O mesmo foi observado para o índice de polidispersão, que se manteve abaixo de 0,15 mostrando a manutenção da homogeneidade dos sistemas.

Figura 6 - Tamanho médio das gotículas/partículas das nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões contendo piperina (P-NC e P-NE) ou sem a presença do mesmo (NC e NE) determinados no estudo de estabilidade

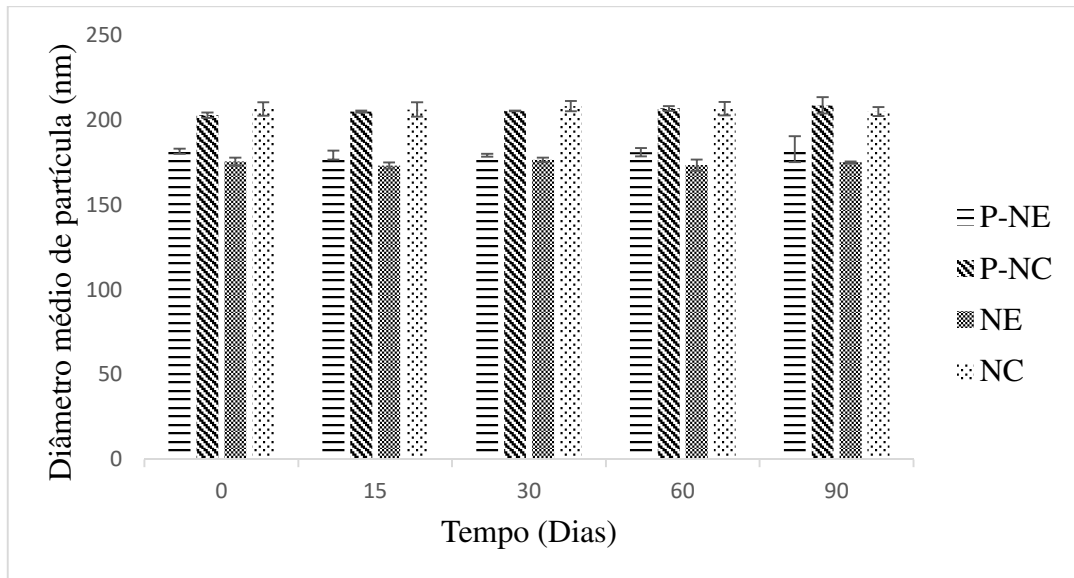
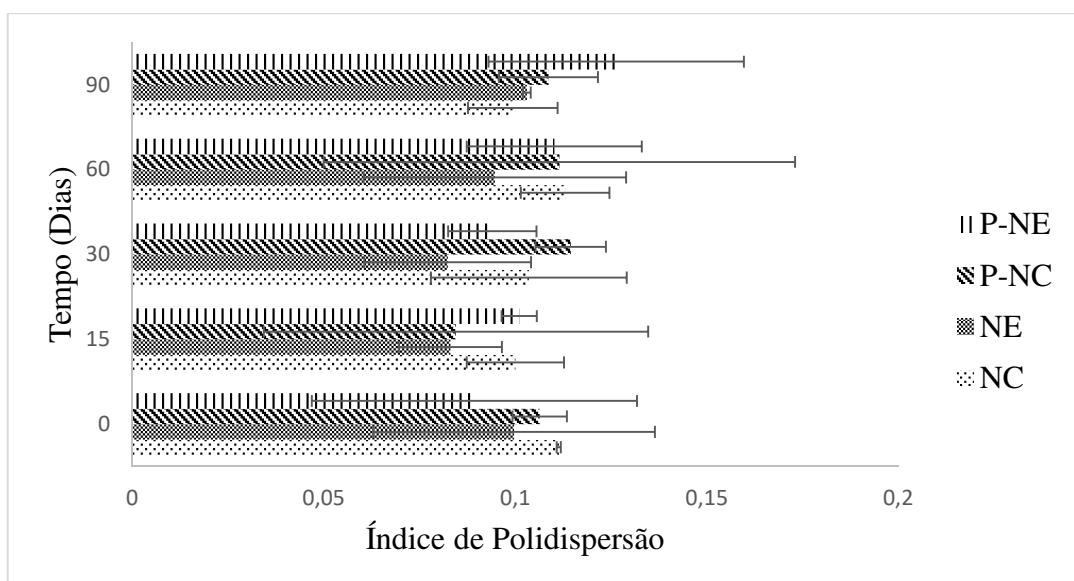
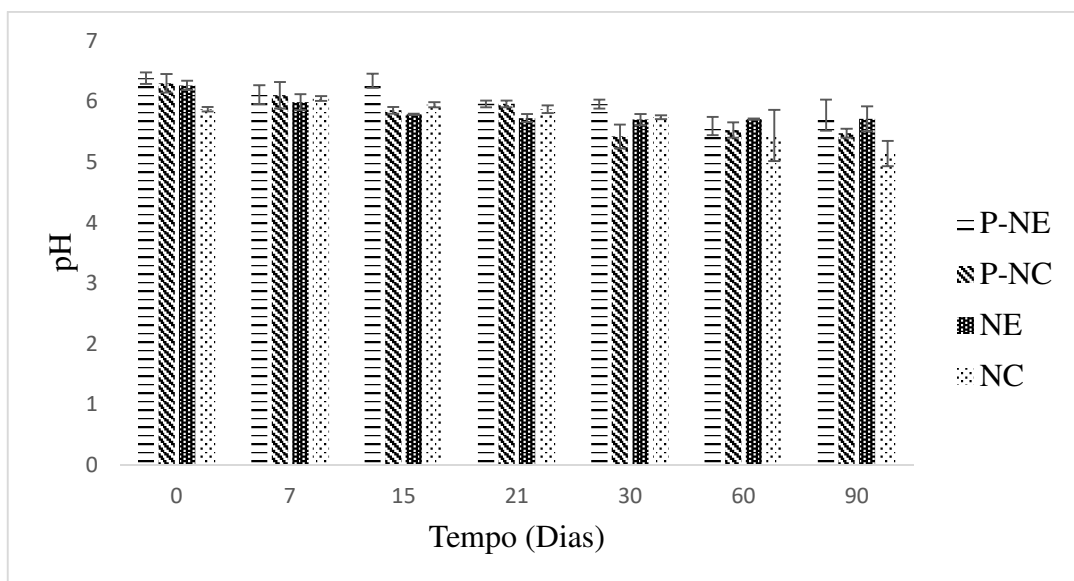


Figura 7 - Índices de polidispersão das suspensões de nanocápsulas e nanoemulsões contendo piperina (P-NC e P-NE) e suas respectivas formulações brancas (NC e NE) determinados durante o estudo de estabilidade



No que diz respeito ao pH das formulações, este apresentou diferença significativa para ambos nanocarreadores ($p < 0,05$), o que já se esperava devido a outros resultados já descritos na literatura (FLORES et al., 2011; HÄRTER, 2013). Os valores encontrados no final do estudo de estabilidade foram menores em relação aos iniciais, o que pode ser explicado pela possível hidrólise causada nas cadeias dos triglicerídeos, culminando no aumento dos ácidos graxos livres presentes no óleo. Ainda, em relação às nanocápsulas, o contato do polímero com a água, pode também causar hidrólise ou ionização dos grupos carboxílicos, que se expõe com o relaxamento das cadeias poliméricas, contribuindo para a diminuição do pH (JAGER et al., 2007).

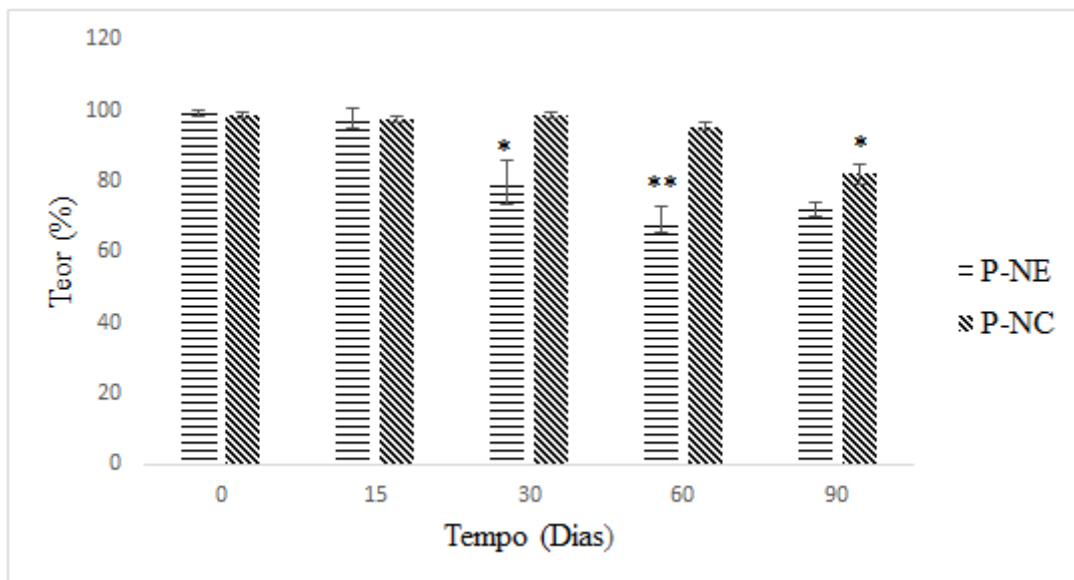
Figura 8 – Valores de pH das suspensões de nanocápsulas e nanoemulsões contendo piperina (P-NC e P-NE) e suas respectivas formulações sem o bioativo (NC e NE) determinados durante o estudo de estabilidade



Um importante parâmetro avaliado durante o estudo de estabilidade foi o teor de piperina, visto a instabilidade da mesma, principalmente frente à luz. No período de 15 dias, ambos nanocarreadores mantiveram-se estáveis sem diferença estatística ($p > 0,05$). As nanoemulsões contendo piperina (P-NE) apresentaram uma diminuição para 79 % e 69 %, da quantidade de bioativo, no acompanhamento de 30 e 60 dias de análise, respectivamente, porém sem diferença significativa ($p > 0,05$) após 90 dias (Figura 9). Em comparação, as suspensões de nanocápsulas demonstraram maior estabilidade, apresentando teor de fármaco a cima de 95 % em 60 dias de estudo. No final dos 90 dias, as suspensões de nanocápsulas apresentaram uma diminuição no teor para 82 %, ainda assim se mostrando em todo o período mais estável que as

nanoemulsões. Com este resultado podemos ressaltar a importância da parede polimérica na proteção da piperina frente a fatores que causam sua instabilidade.

Figura 9 - Teor de piperina das suspensões de nanocápsulas e nanoemulsões (P-NC e P-NE) determinados durante o estudo de estabilidade



5.4 ESTUDO DA PROTEÇÃO DA PIPERINA FRENTE À FOTODEGRADAÇÃO

Mediante a grande instabilidade da piperina frente à luz, este estudo foi conduzido com o intuito de se observar a capacidade de fotoproteção dos nanocarreadores em questão, e de seus componentes. As formulações foram expostas à luz UVA.

As reações de degradação de fármacos ocorrem a velocidades definidas, são de natureza química e dependem de condições como temperatura, concentração dos reagentes, pH, radiação e presença de catalisadores. De acordo com a cinética de reação, são classificadas em reações de ordem zero, primeira e segunda ordem (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001; AULTON, 2005). Em uma reação de segunda ordem, há uma relação linear entre o inverso da concentração residual da substância em estudo, em função do tempo (BRAGA et al., 2014).

Para a determinação da cinética e da ordem de reação, o estudo foi conduzido até que as amostras tivessem apresentado uma degradação de, aproximadamente, 50 %. A partir dos resultados experimentais obtidos, gráficos foram plotados: concentração *versus* tempo (ordem zero), logaritmo da concentração *versus* tempo (primeira ordem) e 1/concentração *versus* tempo (segunda ordem). A escolha da ordem de reação se deu pelo melhor coeficiente de

correlação encontrado. Todas as formulações (suspensões de nanocápsulas (P-NC), nanoemulsões (P-NE), incluindo o fármaco livre (P-S)), apresentaram uma cinética de reação de segunda ordem. Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 6 e Figura 10.

Figura 10 - Teor residual de piperina em função do tempo após exposição da solução metanólica do bioativo (P-S), nanocápsula polimérica (P-NC) e nanoemulsões (P-NE) à luz UVA

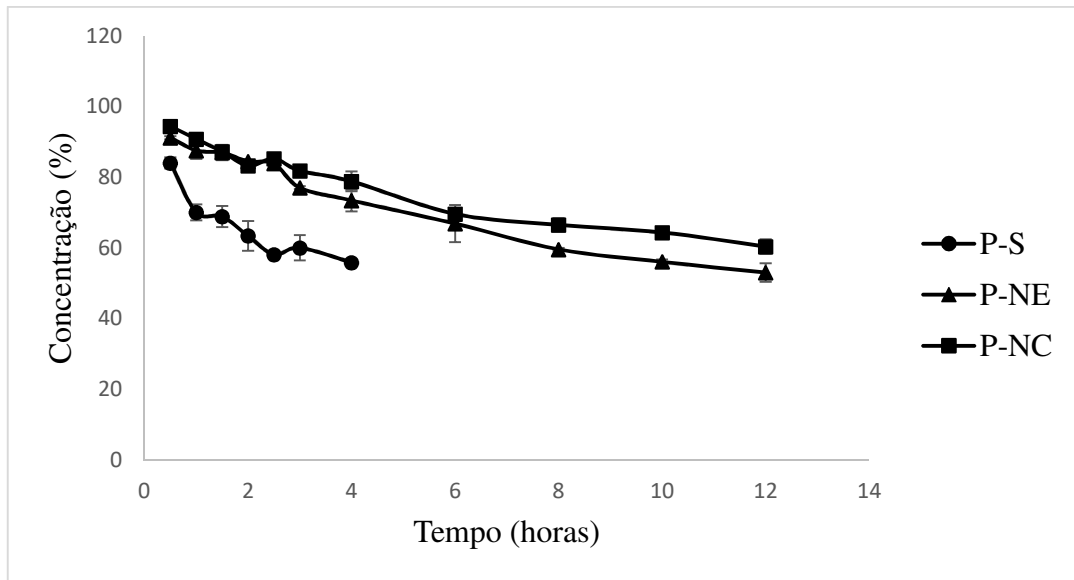


Tabela 6 - Parâmetros de constante de velocidade de degradação (k), tempo de meia vida ($t_{1/2}$) e coeficiente de correlação (r) para solução metanólica de piperina (P-S), suspensão de nanocápsulas (P-NC) e nanoemulsões contendo piperina (P-NE) após o estudo de fotodegradação frente à luz UVA

Formulação	k (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	R
P-S	$0,16 \pm 0,01$	6,25	0,9358
P-NC	$0,06 \pm 0,01$	16,83	0,9888
P-NE	$0,08 \pm 0,01$	12,85	0,9934

*Valores calculados obedecendo cinética de segunda ordem.

Com relação aos resultados obtidos, ambos nanocarreadores (P-NE e P-NC) foram mais efetivos em proteger a piperina quando comparados com a solução metanólica do fármaco livre (P-S). Após 4 h de exposição à luz UVA, as formulações P-NE e P-NC apresentaram um decréscimo no conteúdo de fármaco de 26 % e 21 %, respectivamente, em comparação ao fármaco livre, que obteve em apenas uma hora de exposição, 30 % de degradação, e ao final de

4 h, praticamente 50 % (Figura 10). A partir das 8 h de experimento, as nanocápsulas demonstraram conseguir uma melhor fotoproteção em relação às nanoemulsões, mantendo este resultado até ao fim das 12 h de exposição, apresentando teores de 60 % e 53 %.

Esses resultados podem ser confirmados com base nas constantes de velocidade de degradação (k) (Tabela 6), uma vez que para as suspensões de nanocápsulas e nanoemulsões os valores foram de 0,06 e 0,08 h⁻¹, inferiores ao encontrado para o fármaco livre de 0,16 h⁻¹. A capacidade de proteção das substâncias à luz, conferida pelas nanoestruturas, é bastante conhecida e estudada. Detoni e colaboradores (2012) evidenciaram um aumento da fotoestabilidade do resveratrol quando associado à nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico e outros nanocarreadores. No mesmo sentido, Savian e colaboradores (2015) verificaram redução da fotoinstabilidade do ditranol quando associado à nanopartículas poliméricas de PCL em comparação a solução do fármaco livre.

Para garantir apenas a ação da luz durante o ensaio de fotodegradação, visto que essa reação pode ser acompanhada por reações térmicas, amostras protegidas da luz (controle negativo) foram mantidas durante tempo integral do experimento dentro da câmara espelhada. Essas amostras apresentaram teor de piperina próximo a 100 %, demonstrando não haver influência da temperatura na degradação do bioativo.

5.5 LIBERAÇÃO EM SACOS DE DIÁLISE EM MEIO GASTROINTESTINAL SIMULADO

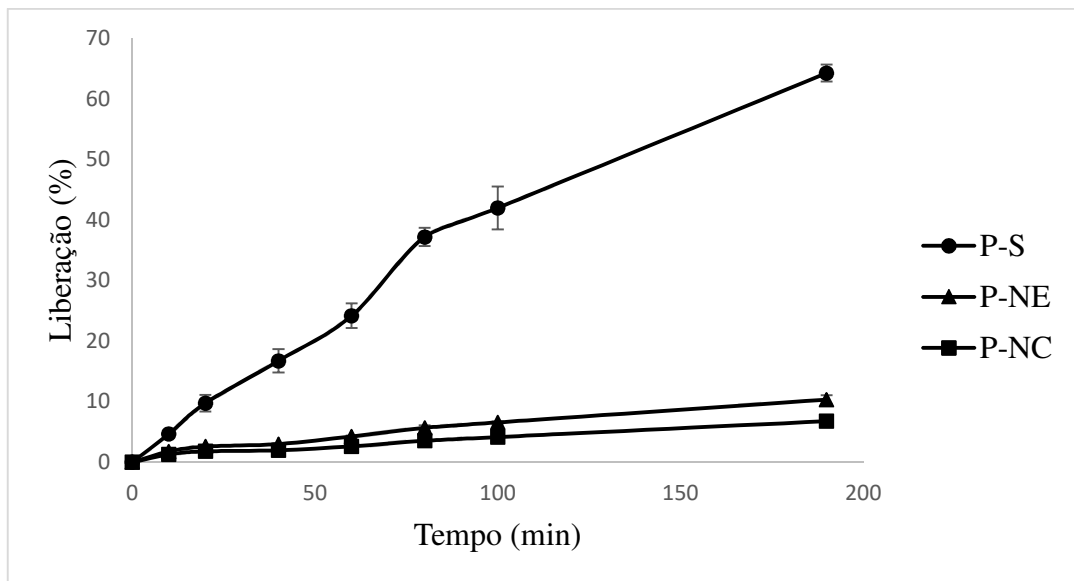
O estudo de liberação *in vitro* da piperina foi realizado a partir da técnica de difusão em sacos de diálise com simulação gastrointestinal, a fim de comparar os sistemas nanoestruturados em relação ao bioativo não associado. Devido a composição do meio de liberação não ser constante, se optou por uma análise de mesma concentração do padrão (20 µg/mL) em cada mudança de pH e composição do meio, para posterior comparação dos resultados correspondentes em cada ponto.

O modelo gastrointestinal pode ser utilizado para testes *in vitro*, pois inclui todos os compartimentos do trato gastrointestinal (da boca ao íleo), além da simulação mecânica nos movimentos peristálticos, a partir da agitação, e o uso de um gradiente de pH no estômago, como ocorre normalmente durante a digestão (MADUREIRA et al., 2011).

Conforme demonstrado (Figura 11), as suspensões de nanocápsulas e as nanoemulsões contendo piperina (P-NC e P-NE) apresentaram uma liberação de 3,53 % e 5,68 %, respectivamente, para a fase esôfago-estômago. Na fase intestinal, período de 3 h e 10 minutos de experimento, esses valores foram de 6,77 % e 10,33 %, ratificando a menor velocidade de

liberação dos sistemas nanoestruturados servindo como forma para a liberação mais lenta e controlada. Em contrapartida, a piperina em solução (P-S) apresentou, na fase inicial, uma liberação significativamente maior (37,17 %), que se estendeu à fase final, liberando em torno de 64,22 % do bioativo, cerca de 6 e 9 vezes mais que quando associado aos nanocarreadores.

Figura 11 - Perfil de liberação *in vitro* da piperina a partir das suspensões de nanocápsulas (P-NC), das nanoemulsões (P-NE) e solução metanólica (P-S)



Em 2015, Pachauri e colaboradores desenvolveram nanopartículas de PEG-PLGA associadas à piperina, onde obtiveram resultados semelhantes aos encontrados nesse trabalho. A formulação apresentou uma liberação biexponencial, com efeito *burst* na fase inicial (primeiras 5 h), provavelmente pela porção de bioativo adsorvido na superfície da partícula e da alta taxa de dissolução do polímero. Após, uma liberação sustentada foi observada, onde possivelmente ocorreu a difusão da piperina do núcleo da partícula e a degradação do polímero PLGA. Além disso, a liberação controlada foi facilitada pela ligação de pontes de hidrogênio entre a piperina e a matriz polimérica, resultado que está de acordo com outros estudos da literatura (YANG et al., 2008; TRIVEDI; KOMPELLA, 2010).

5.6 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL

Os ensaios de viabilidade celular são amplamente utilizados nos dias de hoje, para fins de investigação preliminar da toxicidade de um nanomaterial (HILLEGASS et al., 2010; CONTI et al., 2012). Porém, além dos componentes da formulação, alguns outros cuidados, como a concentração, população e o tipo de nanopartícula devem ser levados em conta (ELSAESSER; HOWARD, 2012; MENDES et al., 2015). Ainda, as propriedades físico-químicas, tais como tamanho de partículas, forma e estrutura da superfície das nanopartículas, também foram reconhecidas por estarem relacionadas à citotoxicidade, no entanto, não tem a devida atenção (MENDES et al., 2015).

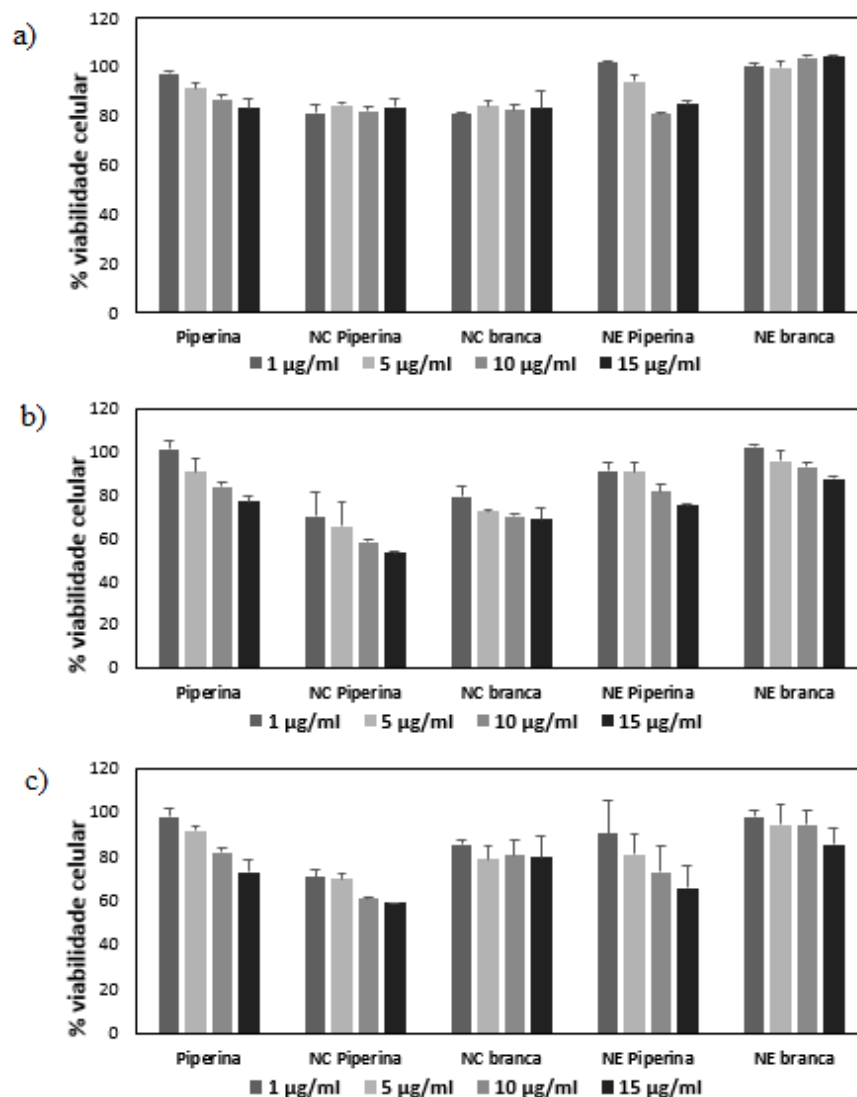
Os resultados dos ensaios de viabilidade demonstraram que após o período de incubação, as nanoestruturas sem a presença do bioativo (NE e NC) apresentaram efeitos tóxicos sobre as células, porém, a viabilidade celular para nanoemulsões e suspensões de nanocápsulas contendo a piperina (P-NE e P-NC) foi proporcionalmente menor em concentrações crescentes, e mais efetiva que a piperina não associada (P-S), em ambas as linhagens de células tumorais (Figura 12). Os resultados mais significativos foram encontrados nas concentrações mais elevadas. Nas células HepG2, a viabilidade determinada pelo ensaio MTT na concentração de 15 µg/mL de piperina, foi reduzida de 77,54 % na P-S para 53,44 % na P-NC, e mantida a atividade na P-NE (75,62 %). Para o ensaio nas células HT-29 na mesma concentração acima utilizada, a piperina livre apresentou viabilidade de 72,90 %, porém, a citotoxicidade das P-NE e P-NC foi mais elevada, com valores de viabilidade de 65,77 % e 59,24 %.

Em relação a linhagem celular não tumoral 3T3, observou-se que foi muito menos sensível aos efeitos antiproliferativos e tóxicos das P-NE e P-NC, com viabilidade celular a cima de 80 %, assim como para o fármaco livre (P-S). A nanoemulsão sem a presença do bioativo (NE) não apresentou citotoxicidade frente às células, porém, este mesmo resultado não foi encontrado para as nanocápsulas, as quais demonstraram uma viabilidade celular de 83 %. Resultados semelhantes foram apresentados por Mendes e colaboradores (2015), onde estes avaliaram a citotoxicidade em fibroblastos de quatro tipos diferentes de partículas, dentre elas nanocápsulas e nanoesferas sem a presença do fármaco. Quando as células foram expostas as nanoesferas e nanocápsulas, uma redução de 17 % e 16 %, respectivamente, foi observada na viabilidade celular, condizendo com os resultados encontrados neste trabalho. Em relação ao tensoativo polissorbato 80 utilizado em nossos nanocarreadores, Valério e colaboradores (2015)

testaram a citotoxicidade de nanopartículas de PEG400 e PCL530 sintetizadas com quatro tensoativos, dentre eles o tensoativo não-iônico empregado neste trabalho. Os resultados obtidos demonstraram uma viabilidade celular reduzida para 80 % em relação à amostra controle, corroborando com os resultados acima mostrados.

Sunila e colaboradores (2004) testaram a citotoxicidade da piperina livre por ensaio de MTT, em células L929 e demonstraram que em uma concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ de piperina, a toxicidade foi de 60 %, resultado que ratifica a importância do encapsulamento do bioativo, visto que mantém a viabilidade de células saudáveis e aumenta a toxicidade frente à linhagem de células cancerígenas.

Figura 12 - Citotoxicidade de diferentes concentrações das nanoestruturas (P-NE e P-NC) e piperina livre (P-S): a) linhagem celular 3T3; b) linhagem celular HepG2 e c) linhagem celular HT-29, pelo ensaio de MTT após 24 h de incubação. Dados expressos como média da triplicata \pm DPR



5.7 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE *IN VIVO* COM *CAENORHABDITIS ELEGANS*

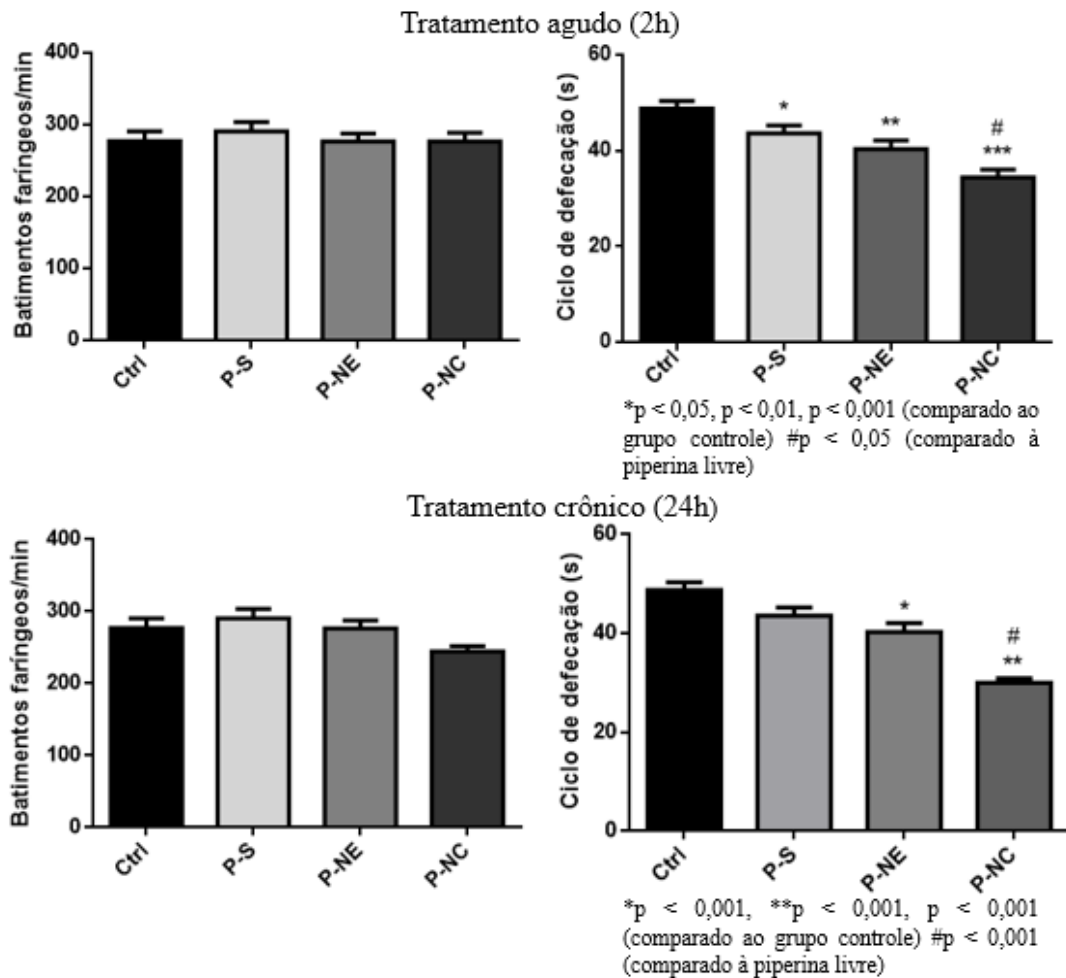
Caenorhabditis elegans são nematoides de vida livre, com papel significativo em estudos *in vivo*, inserido como modelo animal em 1965 por Sidney Brenner. Sua capacidade de crescimento em uma única placa de Petri sobre as bactérias, sua transparência, ciclo de vida rápido (3 dias), fazem deste verme um modelo ideal (GONZALEZ-MORAGAS; ROIG; LAROMAINE, 2015). Esse nematoide é um dos modelos animais mais bem estudados, pois possui seu genoma sequenciado e altamente conservado; um sistema nervoso simples, mas bem caracterizado, contribuindo assim nos últimos anos para a compreensão sobre a patogênese e o tratamento de doenças (MAGLIONI; VENTURA, 2016). Este verme apresenta muitos processos fisiológicos básicos que são conservados em relação aos humanos, permitindo a correspondência e comparação de mecanismos moleculares, visto que possui seu genoma com aproximadamente 72 % de similaridade aos humanos (KALETTA; HENGARTNER, 2006; ANTOSHECHKIN; STERNBERG, 2007; ZHANG et al., 2013).

A alimentação dos *C. elegans* envolve a ingestão de alimentos, digestão, absorção de nutrientes e defecação. A boca de um verme adulto possui seis lábios simétricos em torno de sua abertura, e forma uma cavidade circular de 1 a 3 μm (COLMENARES et al., 2016), tamanho este que sugere facilidade para a captação de nanocarreadores como os estudados neste trabalho. Dois movimentos estão envolvidos no comportamento alimentar deste verme: batimentos faríngeos e peristaltismo. O batimento é um ciclo de contração-relaxamento no qual as partículas e o líquido são aspirados. A defecação é onde ocorre a remoção de materiais não-digeridos a partir do trato digestivo, através da abertura do ânus em ciclos de 50 segundos (GONZALEZ-MORAGAS; ROIG; LAROMAINE, 2015).

O controle dos batimentos faríngeos e defecação foi realizado com a finalidade de avaliar a toxicidade das formulações. A ingestão do alimento, pelos vermes, está relacionada diretamente com os batimentos faríngeos, que não apresentaram alterações durante este experimento, provavelmente não havendo restrição calórica dos vermes. Resultado que também pode ser confirmado quando compara-se o controle às formulações P-NE e P-NC, onde o verme não sofreu alteração dos batimentos faríngeos se alimentando da mesma forma (LAKOWSKI; HEKIMI, 1998). Em relação a defecação, esta é considerada um marcador de toxicidade pelas alterações que podem ocorrer na permeabilidade da barreira intestinal (STEFANELLO et al., 2015). Neste experimento, os resultados obtidos para as P-NE e P-NC foram de diminuição na frequência dos ciclos de defecação, enquanto que as NE e NC não apresentaram mudanças neste

parâmetro (dados não mostrados), indicando que a piperina foi liberada das nanoestruturas e absorvida pelo verme, alterando a defecação apenas nas formulações contendo o bioativo.

Figura 13 – Efeito do tratamento com piperina 50 μ M em *C. elegans* na análise dos batimentos faríngeos e do ciclo de defecação. Análise de uma via (ANOVA) seguido do teste de Bonferroni

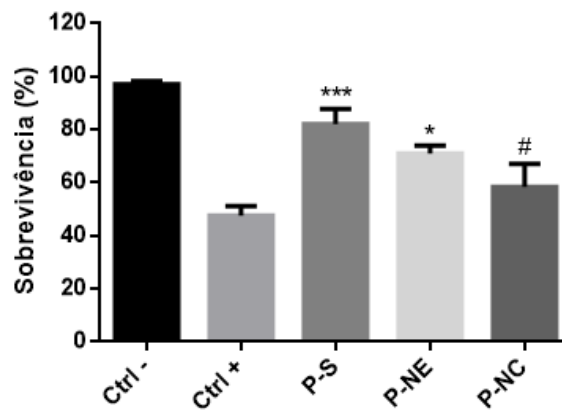


O teste para avaliação da taxa de mortalidade frente a exposição à juglone foi realizado na concentração de 50 μ M de piperina. Os vermes foram previamente expostos à P-S, P-NE e P-NC durante 2 h, e depois foram expostos à juglone. Os vermes pré-tratados com P-S e P-NE apresentaram uma taxa de mortalidade significativamente menor em comparação ao grupo controle positivo, tratado apenas com juglone ($p < 0,05$). Em contrapartida, os vermes tratados com P-NC não obtiveram efeito sobre a taxa de sobrevivência (Figura 14). Esta diferença de resultado encontrado para as nanopartículas pode estar relacionada com a estrutura das mesmas, o que modifica sua liberação no meio em que foram testadas. A presença do polímero nas suspensões de nanocápsulas é um fator limitante para a liberação da piperina, controlando e

liberando mais lentamente a mesma para o meio, possivelmente não visualizando seu resultado no período de tempo do experimento.

Os resultados obtidos para P-NE e P-S são significativos quanto à ação antioxidante da piperina, uma vez que a diminuição da taxa de mortalidade dos vermes por essas formulações, subentende-se a proteção do dano oxidativo (geração de superóxido) causado pela juglone nos vermes.

Figura 14 – Efeito do tratamento com piperina 50 $\mu\text{M}/2$ h em *C. elegans* no ensaio de sobrevivência da juglone. Os vermes foram expostos à 200 μM de juglone por 1 h e a porcentagem de sobrevivência foi analisada após 24 h de exposição. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ (comparado com grupo controle positivo) # $p < 0,05$ (comparado à piperina livre). Análise de uma via (ANOVA) seguido do teste de Bonferroni



6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, foram preparadas nanoemulsões e nanocápsulas de PCL contendo piperina, pelos métodos de emulsificação espontânea e deposição interfacial do polímero pré-formado, respectivamente. Estes nanocarreadores apresentaram características físico-químicas adequadas como: tamanho nanométrico, baixo índice de polidispersão indicando a homogeneidade do sistema; potencial zeta negativo, pH ácido, teor de bioativo próximo ao teórico e eficiência de encapsulamento próxima a 100 %.

Foi validado um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação da piperina associada à nanoemulsões e suspensões de nanocápsulas poliméricas, o qual se mostrou específico, linear, preciso, exato e robusto, com análise simples e rápida.

Quanto à estabilidade, o diâmetro médio das partículas e o índice de polidispersão mantiveram-se sem mudanças significativas. O pH, como já esperado, teve um decréscimo, tornando-se um pouco mais ácido devido as características do polímero e do óleo. Em relação ao teor de piperina, as P-NE e P-NC mantiveram-se estáveis durante 15 e 60 dias, respectivamente.

O ensaio de fotoestabilidade demonstrou que as nanoestruturas promoveram uma menor degradação da piperina frente à luz UVA em comparação com o bioativo não encapsulado, e que as nanocápsulas foram mais eficientes que as nanoemulsões.

Em relação à liberação *in vitro* com meio gastrointestinal simulado, as nanoestruturas contendo a piperina foram capazes de controlar a liberação do bioativo, apresentando uma menor liberação nos diferentes tempos de análise, em comparação a piperina não encapsulada.

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* para avaliação da atividade antitumoral, demonstrou que as P-NE e P-NC apresentaram maior toxicidade para as células cancerígenas HepG2 e HT-29, do que a piperina não associada, e ainda uma maior viabilidade em fibroblastos, assegurando a baixa toxicidade das gotículas/partículas.

A citotoxicidade *in vivo* em *C. elegans* demonstrou que os vermes foram capazes de se alimentar, sem mudança dos batimentos faríngeos e na defecação após contato com as nanoestruturas sem o bioativo e com a piperina nanoencapsulada. Além disso, a associação da piperina às nanoemulsões (P-NE) e a solução do bioativo (P-S) foram capazes de proteger os vermes contra o dano oxidativo causado pela geração de superóxido da juglone, apresentando uma ação antioxidante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; STAINMESSE, S.; FESSI, H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1688-1713, 2006.

ANTO, R. J.; MUKHOPADYAH, A.; DENNING, K.; AGGARWAL, B. B. Curcumin induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release; its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl. **Carcinogenesis**, v. 23, p. 143-150, 2002.

ANTON, N.; BENOIT, J. P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-a review. **Journal of Controlled Release**, 128, P. 185-99, 2008.

ANTOSHECHKIN, I.; STERNBERG, P. W. The versatile worm: genetic and genomic resources for *Caenorhabditis elegans* research. **Nature Reviews Genetics**, n. 8, n. 7, p. 518-532, 2007.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 de junho de 2003.

ASHARANI, P.V.; MUN, G.L.K.; HANDE, M.P.; VALIYAVEETIL, S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. **ACS Nano**, v. 3, p. 279-290, 2009.

AULTON, M.E. Delineamento de Formas Farmacêuticas. Trad George G. Ortega [et al.] 2 ed. Porto Alegre. **Artmed**, 2005.

BADMAEV, V.; MAJEED, M.; PRAKASH, L. Piperine derived from black pepper increases plasma levels of coenzyme Q10 following oral supplementation. **The Journal Nutritional Biochemistry**, v.11, p. 109-113, 2000.

BAI, Y. F.; XU, H. Protective action of piperine against experimental gastric ulcer. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 21, p. 357-359, 2000.

BHARDWAJ, R.K.; GLAESER, H.; BECQUEMONT, L.; KLOTZ, U.; GUPTA, S.K.; FROMM, M.F. Piperine, a major constituent of black pepper, inhibits human P-glycoprotein and CYP3A4. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 302, p.654-650, 2002.

BODDUPALLI, B.M.; RAMANI, R.; SUBRAMANIAM, B.; ANISETTI, R.N. In vitro and in vivo evaluation of hepato protection and anti ulcer activities of piperine gastro retentive microspheres. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. S1237-1240, 2012.

BODDUPALLI, B.M.; MASANA, P.; ANISETTI, R.N.; KALLEM, S.V.; MADIPOJU, B. Formulation and evaluation of Pioglitazone loaded Bovine serum albumin nanoparticles along with Piperine. **SciVerseScienceDirect**, v. 5, p. 212- 215, 2013.

BODDUPALLI, B.M.; ANISETTI, R.N.; RAMMANI, R.; MALOTHU, N. Enhanced pharmacokinetics of omeprazole when formulated as gastroretentive microspheres along with piperine. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, p. S129-S133, 2014.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, p. 241-251, 2004.

BRAGA, M. P.; DALCIN, T. C. S.; ROSA, P.; CODEVILLA, C. F.; SILVA, C. B.; ROLIM, C. M. B.; ADAMS, A. I. H. Assay and photodegradation kinetics of desonide lotion by an LC-UV stability-indicating method. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 37, p. 1968-1984, 2014.

BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 77, n. 1, p. 71-94, 1974.

BUKHARI, I.A.; PIVAC, N.; ALHUMAYYD, M.S.; MAHESAR, A.I.; GILANI, A.H. The analgesic and anticonvulsant effects of piperine in mice. **Journal Physiology Pharmacology**, v. 64, p. 789-794, 2013.

BUTT, M. S.; SULTAN, M. T.; BUTT, M. S.; IQBAL, J. Garlic: nature's protection against physiological threats. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, p. 538-551, 2009.

BUTT, M.S.; PASHA, I.; SULTAN, M.T.; RANDHAWA, M.A.; SAEED, F.; AHMED, W. Black pepper and health claims: a comprehensive treatise black pepper and health claims. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Ration, v. 53, n. 9, p. 37-41, Sept. 2013.

CHARCOSSET, C.; FESSI, H. Preparation of nanoparticles with a membrane contactor. **Journal of Membrane Science**, p.115-120, 2005.

CHONPATHOMPIKUNLERT, P.; WATTANATHORN, J.; MUCHIMAPURA, S. Piperine: The main alkaloid of Thai black pepper protects against neurodegeneration and cognitive impairment in animal model of cognitive deficit like condition of Alzheimer's disease. **Food and Chemical Toxicology: an International Journal** Published for the British Industrial Biological Research Association, Oxford, v. 48, n. 3, p. 798-802, Mar. 2010.

COLMENARES, D.; SUN, Q.; SHEN, P.; YUE, Y.; McCLEMENTS, J.; PARK, Y. Delivery of dietary triglycerides to *Caenorhabditis elegans* using lipid nanoparticles: Nanoemulsion-based delivery systems. **Food Chemistry**, v. 202, p. 451-457, 2016.

CONTI, D. S.; BHARATWAJ, B.; BREWER, D.; DA ROCHA, S. R. P. Propellant-based inhalers for the non-invasive delivery of genes via oral inhalation. **Journal of Controlled Release**, v. 157, n. 3, p. 406-417, 2012.

COUVREUR, P.; BARRAT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier System**, v. 19, p.99-134, 2002.

DANHIER, F.; FERON, O.; PRÉAT, V. To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. **Journal Controlled Release**, v. 148, p. 135-146, 2010.

DARSHAN, S.; DORESWAMY, R. Patented antiinflammatory plant drug development from traditional medicine. **Phytother Res** **18**, p. 23-30, 2004.

DE CHASTEIGNER, S., FESSI, H., CAVÉ, G., DEVISSAGUET, J. P., PUISIEUX, F. Gastro-intestinal tolerance study of a freeze-dried oral dosage form of indomethacin-loaded nanocapsules. **S.T.P. Pharma Sciences**, v. 5, p. 242–246, 1995.

DE MEY, E.; DE MAERE, H.; DEWULF, L.; PAELINCK, H.; SAJEWICZ, M.; FRAEYE, I.; KOWALSKA, T. Assessment of the N-nitrosopiperidine formation risk from piperine and piperidine contained in spices used as meat product additives. **European Food Research Technology**, v. 238, p. 477-484, 2014.

DE SOUZA, E.L.; STAMFORD, T.L.M.; LIMA, E.O.; TRAJANO, V.N.; BARBOSA, J.M. Jr. Antimicrobial effectiveness of spices: an approach for use in food conservation systems. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, p. 549-558, July 2005.

DETONI, C. B.; SOUTO, G. D.; DA SILVA, A. L.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Photostability and skin penetration of different E-resveratrol-loaded supramolecular structures. **Photochemistry and Photobiology**, n. 88, v. 4, p. 913-921, 2012.

DOUCETTE, C.D.; HILCHIE, A.L.; LIWSKI, R.; HOSKIN, D.W. Piperine, a dietary phytochemical, inhibits angiogenesis. **The Journal Nutritional Biochemistry**, v. 24, p. 231-239, 2013.

ELSAESSER, A.; HOWARD, C. V. Toxicology of nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 129–137, 2012.

FERREIRA, W.S.; FRANKLIN, T.N.; LOPES, N.D.; DE LIMA, M.E.F. Piperina, seus Análogos e Derivados: Potencial como Antiparasitários. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 3, p. 208-224, 2012.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P. Procédé de préparation des systèmes colloïdaux d'une substance sous forme de nanocapsules. **European Patent**, 0274961 A1, 1988.

FLORES, F. C.; RIBEIRO, R. F.; OURIQUE, A. F.; ROLIM, C. M. B.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S.; SILVA, C. B. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 968-972, 2011.

FONTANA, M. C.; CORADINI, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. R. Nanoencapsulation as a way to control the release and to increase the photostability of clobetasol propionate: influence of the nanostructured system. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 254–263, 2009.

GONZALEZ-MORAGAS, L.; ROIG, A.; LAROMAINE, A. *C. elegans* as a tool for in vivo nanoparticle assessment. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 219, p. 10-26, 2015.

GOWDA, D.V.; MUGULIL, G.; JADHAV, A. N.; NAGRAJA, P.; SARATHCHANDRAPRAKASH; BABU, U. V.; PARAMESH, R.; DESHPANDE, R. D. RP-HPLC method for determination of piperine, guggulusterone and embelin in ayurvedic formulation *KAISHORAGUGGULU*. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 10, p. 4042-4046, 2014.

GREENSHIELDS, A. L.; DOUCETTE, C. D.; SUTTON, K. M.; MADERA, L.; ANNAN, H.; YAFFE, P. B.; KNICKLE, A. F.; DONG, Z.; HOSKI, D. W. Piperine inhibits the growth and motility of triple-negative breast cancer cells. **Cancer Letters**, v. 357, p. 129-140, 2015.

GU, F.; TAN, L.; WU, H.; FANG, Y.; WANG, Q. Analysis of the blackening of green pepper (*Piper nigrum* Linnaeus) berries. **Food Chemistry**, Barking, v. 138, n. 2/3, p. 797-801, June 2013.

GULZAR, T.; UDDIN, N.; SHAHEEN, B.S.; NAQVI, S.N.S.; BEGUM, S.; TARIQE, R.M. New constituents from the dried fruit of *Piper nigrum* Linn, and their larvicidal potential against the dengue vector mosquito *Aedes aegypti*. **Phytochemistry Letters**, London, v. 6, n. 2, p. 219-223, May 2013.

GUPTA, S.K.; BANSAL, P.; BHARDWAJ, R.K; VELPANDIAN, T. Comparative antinociceptive, anti-inflammatory and toxicity profile of nimesulide vs nimesulide and piperine combination. **Pharmacological Research: the Official Journal of the Italian Pharmacological Society**, London, v. 41, n. 6, p. 657-662, June 2000.

GUTERRES, S.S.; ALVES, M.P.; POHLMANN, A.R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.

GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R. Spray-drying technique to prepare innovative nanoparticulated formulations for drug administration: a brief overview. **Brazilian Journal of Physics**, v. 39, p. 205-209, 2009.

HANSEN, M. et al. New genes tied to endocrine, metabolic, and dietary regulation of lifespan from a *Caenorhabditis elegans* genomic RNAi screen. **PLoS Genetics**, v. 1, p. 119-128, 2005.

HÄRTER, A. P. G. **Nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas contendo tioconazol: Preparação, caracterização e incorporação em géis hidrofílicos**. 2013. Dissertação

(Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

HÄRTER, A. P. G.; MOTTA, M. H.; BARROS, J. G.; RIBEIRO, R. F.; ADAMS, A. I. H.; SCHAFFAZICK, S. R.; SILVA, C. B. Desenvolvimento de um método para a determinação de tioconazol associado a nanocápsulas poliméricas por cromatografia líquida. **Química Nova**, v. 37, n. 6, p. 996-999, 2015.

HILLEGASS, J. M.; SHUKLA, A.; LATHROP, S. A.; MacPHERSON, M. B.; FUKAGAWA, N. K.; MOSSMAN, B. T. Assessing nanotoxicity in cells *in vitro*. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 2, p. 219–231, 2010.

HUANG, C.; XIONG, C.; KORNFELD, K. Measurements of age-related changes of physiological processes that predict lifespan of *Caenorhabditis elegans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 21, p. 8084-8089, 2004.

International Conference on Harmonization (ICH), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2 (R1), 2005.

JÄGER, A., STEFANI, V., GUTERRES, S. S., POHLMANN, A. R. Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 338, p. 297-305, 2007.

KALETTA, T.; HENGARTNER, M. O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 5, p. 387-398, 2006.

KAMIYA, S.; KURITA, T.; MIYAGISHIMA, A.; ITAI, S.; ARAKAWA, M. Physical properties of griseofulvin-lipid nanoparticles in suspension and their novel interaction mechanism with saccharide during freeze-drying. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 74, p. 461-466, 2010.

KAPOOR, I. P. S.; SINGH, B.; SINGH, G.; DE-HELUANI, C. S.; DE-LAMPASONA, M. P.; CATALAN, C. A. N. Chemistry and *In Vitro* Antioxidant Activity of Volatile Oil and Oleoresins of Black Pepper (*Piper nigrum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 5358-5364, 2009.

KHAYATA, N.; ABDELWAHED, W.; CHEHNA, M. F.; CHARCOSSET, C.; FESSI, H. Stability study and lyophilization of vitamin E-loaded nanocapsules prepared by membrane contactor. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 439, p. 254-259, 2012.

KRISHNAKUMAR, N.; MANOHARAN, S.; PALANIAPPAN, P. R.; VENKATACHALAM, P.; MANOHAR, M. G. Chemopreventive efficacy of piperine in 7,12-dimethyl benz [a] anthracene (DMBA)-induced hamster buccal pouch carcinogenesis: An FT-IR study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 2813-2820, 2009.

LACHMAN, L.; DeLUCA, P.; AKERS, M. J. *Testes de estabilidade e fundamentos de*

cinética química. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. Teoria e prática na indústria farmacêutica. **Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian**, 2001.

LAI, L.H.; FU, Q.H.; LIU, Y.; JIANG, K., GUO, Q. M.; CHEN, Q. Y. Piperine suppresses tumor growth and metastasis in vitro and in vivo in a 4T1 murine breast cancer model. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 33, p. 523-530, 2012.

LAKOWSKI, B.; HEKIMI, S. The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 13091-13096, 1998.

LEE, S. A.; HONG, S. S.; HAN, X. H.; HWANG, J. S.; OH, G. J.; LEE, K. S.; LEE, M. K.; HWANG, B. Y.; RO, J. S. Piperine from the fruits of *Piper longum* with inhibitory effect on monoamine oxidase and antidepressant-like activity. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 7, p. 832-835, 2005.

LEGRAND, P.; BARRAT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: a review. **STP Pharma Science**, v. 9, n. 5, p. 411-418, 1999.

LI, S.; WANG, C.; WANG, M.; LI, W.; MATSUMOTO, K.; TANG, Y. Antidepressant like effects of piperine in chronic mild stress treated mice and its possible mechanisms. **Life Sciences**, v. 80, n. 15, p. 1373-1381, 2007.

LIAO, V. H. et al. Curcumin-mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 132, p. 480-487, 2011.

LIU, F.; NG, T. B. Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs. **Life Science**, v. 66, p. 725-735, 2000.

MADUREIRA, A. R.; AMORIM, M.; GOMES, A. M.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 44, p. 465-470, 2011.

MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. **STP Pharmaceutical Sciences**, v. 1, p. 221-241, 1991.

MAGLIONI, S.; VENTURA, N. *C. elegans* as a model organism for human mitochondrial associated disorders. **Mitochondrion**, v. 30, p. 117-125, 2016.

McCLEMENTS, D. J. Edible nanoemulsion: fabrication, properties, and functional performance. **Soft Matter**, v. 7, p. 2291-2316, 2011.

McNAMARA, F. N.; RANDALL, A.; GUNTHORPE, M. J. Effects of piperine, the pungent component of black pepper, at the human vanilloid receptor (TRPV1). **British Journal of Pharmacology**, v. 144, p. 781-790, 2005.

MEGHAWAL, M.; GOSWAMI, T. K. Piper nigrum and Piperine: An Update. **Phytotherapy Research**, v. 27, p. 1121-1130, 2013.

MENDES, L. P.; DELGADO, J. M. F.; COSTA, A. D. A.; VIEIRA, M. S.; BENFICA, P. L.; LIMA, E. M.; VALADARES, M. C. Biodegradable nanoparticles designed for drug delivery: The number of nanoparticles impacts on cytotoxicity. **Toxicology in vitro**, v. 29, p. 1268-1274, 2015.

MIGLIORI, M. L.; SIMONETTA, S. H.; ROMANOWSKI, A.; GOLOMBEK, D. A. Circadian rhythms in metabolic variables in *Caenorhabditis elegans*. **Physiology & Behavior**, v. 103, n. 3-4, p. 315-320, 2011.

MISHRA, B.; BHAVESH, P.B.; TIWARI S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, p. 9-24, 2010.

MOHANDAS, K. M.; DESAI, D. C. (1999). Epidemiology of digestive tract cancer in India v. large and small bowel. **Indian Journal Gastroenterology**, v. 18, p. 118-121, 1999.

MOHAPATRA, B.; KURIAKOSE, S.; MOHAPATRA, S. Rapid green synthesis of silver nanoparticles and nanorods using *Piper nigrum* extract. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 637, p. 119-126, 2015.

MOORTHI, C.; KRISHNAN, K.; MANAVALAN, R.; KATHIRESAN, K. Preparation and characterization of curcumin-piperine dual drug loaded nanoparticles. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 841-848, 2012.

MURTHY, C.T.; BHATTACHARYA, S. Cryogenic grinding of black pepper. **Journal of Food Engineering**, London, v. 85, n. 1, p. 18-28, Mar. 2008.

MUSENGA, A.; MANDRIOLI, R.; FERRANTI, A.; D'ORAZIO, G.; FANALI, S.; RAGGI, M.A. Analysis of aromatic and terpenic constituents of pepper extracts by capillary electrochromatography. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 30, n. 4, p. 612-619, Mar. 2007.

NOGUEIRA, D.R.; TAVANO, L.; MITJANS, M.; PEREZ, L.; INFANTE, M.R.; VINARDELL, M.P. *In vitro* antitumor activity of methotrexate via pH-sensitive chitosan nanoparticles. **Biomaterials**, v. 34, p. 2758-2772, 2013.

NOGUEIRA, D.R.; MORAN, M.C.; MITJANS, M.; PEREZ, L.; RAMOS, D.; LAPUENTE, J.; VINARDELL, M.P. Lysine-based surfactants in nanovesicle formulations: the role of cationic charge position and hydrophobicity in *in vitro* cytotoxicity and intracellular delivery. **Nanotoxicology**, v. 8, p. 404-421, 2014.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R.L. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4619-4626, 2001.

OURIQUE, A. F.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Tretinoin-loaded nanocapsules: preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, p. 1- 4, 2008.

PACHAURI, M.; GUPTA, E. D.; GHOSH, P. C. Piperine loaded PEG-PLGA nanoparticles: Preparation, characterization and targeted delivery for adjuvant breast cancer chemotherapy. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 29, p. 269-282, 2015.

PANDA, S.; KAR, A. Piperine lowers the serum concentrations of thyroid hormones, glucose and hepatic 5'D activity in adult male mice. **Hormone and Metabolic Research**, v. 35, n. 9, p. 523-526, 2003.

PARMAR, V.S.; JAIN, S.C.; BISHT, K.S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O.D.; PRASAD, A.K.; WENGEL, J.; OLSEN, C.E.; BOLL, P.M. Phytochemistry of the genus piper. **Phytochemistry**, New York, v. 46, n.4, p. 597-637, 1997.

PEPPAS, N. A. Analysis of fickian and non-fickian drug release from polymers. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 60, p. 110-111, 1985.

PÉREZ-HERRERO, E.; FERNÁNDEZ-MEDARDE, A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. **European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics**, v. 93, p. 52-79, 2015.

POHLMANN, A. R.; FONSECA, F. N.; PAESE, K.; DETONI, C. B.; CORADINI, K.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S. Poly(ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. **Expert Opinion Drug Deliv**, p. 623-638, 2013.

POLOVKA, M.; SUHAJ, M. The effect of irradiation and heat treatment on composition and antioxidant properties of culinary herbs and spices. A Review. **Food Reviews International**, v. 26, p. 138-161, 2010.

PRADEEP, C.R. & KUTTAN, G. Effect of piperine on the inhibition of lung metastasis induced B16F-10 melanoma cells in mice. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 19, p. 703-708, 2002.

RAWAT, M.; SINGH, D.; SARAF, S. Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 1790-1798, 2006.

RÉ, M.I. Microencapsulation by spray drying. *Drying Technol.* 16, 1195–1236, 1998.

RÉ, M. I. Formulating drug delivery systems by spray drying. **Drying Technology**, v. 24, p. 433-446, 2006.

RIBEIRO, R. F.; MOTTA, M. H.; HÄRTER, A. P. G.; FLORES, F. C.; BECK, R. C. R.; SCHAFFAZICK, S. R.; SILVA, C. B. Spray-dried powders improve the controlled release of antifungal tioconazole-loaded polymeric nanocapsules compared to with lyophilized products. **Materials Science and Engineering: C**, v. 59, p. 875-884, 2016.

SALVIA-TRUJILLO, L.; SUN, Q.; UM, B. H.; PARK, Y.; McCLEMENTS, D. J. *In vitro* and *in vivo* study of fucoxanthin bioavailability from nanoemulsion-based delivery systems: Impact of lipid carrier type. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 293-304, 2015.

SAMYKUTTY, A.; SHETTY, A.V.; DAKSHINAMOORTHY, G.; BARTIK, M.M.; JOHNSON, G.L.; WEBB, B.; ZHENG, G.; CHEN, A.; KALYANASUNDARAM, R.; MUNIRATHINAM, G. Piperine, a bioactive component of pepper spice exerts therapeutic effects on androgen dependent and androgen independent prostate cancer cells. **Plos One**, v. 8, n. 6, 2013.

SANTOS, S. S.; FERREIRA, L. M.; SCHAFFAZICK, S. R.; CRUZ, L. A Simple RP-HPLC Method for the Determination of Clotrimazole from Acrylic Nanocapsule Suspensions. **Latin American of journal Pharmacy**, v. 31, n. 3, p. 462-486, 2012.

SAVIAN, A. L.; RODRIGUES, D.; WEBER, J.; RIBEIRO, R. F.; MOTTA, M. H.; SCHAFFAZICK, S. R.; ADAMS, A. I. H.; ANDRADE, D. F.; BECK, R. C. R.; SILVA, C. B. Dithranol-loaded lipid-core nanocapsules improve the photostability and reduce the *in vitro* irritation potential of this drug. **Materials Science and Engineering: C**, v. 46, p. 69–76, Jan 2015.

SCHAFFAZICK, S.R.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; FREITAS, L. L.; GUTERRES, S. S. Caracterização e Estudo de Estabilidade de Suspensões de Nanocápsulas e de Nanoesferas Poliméricas Contendo Diclofenaco. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 21, n. 2, p. 99-106, 2002.

SELVENDIRAN, K.; SAKTHISEKARAN, D. Chemopreventive effect of piperine on modulating lipid peroxidation and membrane bound enzymes in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis. **Biomedicine Pharmacotherapy**. v. 58, p. 264-267, 2004.

SELVENDIRAM, K.; BANU, S.M.; SAKTHISEKARAM, D. Protective effect of piperine on benzo (a) pyrene-induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. **Clinica Chimica Acta**, v. 350, p. 73-78, 2004.

SHAIKH, J.; BHOSALE, R.; SINGHAL, R. Microencapsulation of black pepper oleoresin. **Food Chemistry**, Barking, v. 94, n. 1, p. 105-110, Jan. 2006.

SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. Mathematical modeling of drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, p. 328-243, 2008.

SILVA, E.M.J.; MACHADO, S.R. Structure and development of the secretory trichomes in leaves of *Piper regnellii* (Miq) C. DC. Var *regnellii* (Piperaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 2, p. 117-124, 1999.

SOSNIK, A.; SEREMETA, K. P. Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. **Advances in Colloid and Interface Science**, 2015.

SRINIVASAN, K. Role of spices beyond food flavoring: nutraceuticals with multiple health effects. **Food Reviews International**, New York, v. 21, p. 167-188, 2005.

SRINIVASAN, K. Reason to Season: Spices as functional food adjuncts with multiple health effects. **Indian Food Industry**, v. 27, p. 36-47, 2008.

STEFANELLO, S. T.; GUBERT, P.; PUNTEL, B.; MIZDAL, C. R.; CAMPOS, M. M. A.; SALMAN, S.M.; DORNELLES, L.; AVILA, D. S.; ASCHNER, M.; SOARES, F. A. A. Protective effects of novel organic selenium compounds against oxidative stress in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 961-967, 2015.

SU, L.; YIN, J. J.; CHARLES, D.; ZHOW, K.; MOORE, J.; YU, L. Total phenolic contents, chelating capacities, and radical-scavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf. **Food Chemistry**, v. 100, p. 990-997, 2007.

SUNILA, E.S. & KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* Linn. and piperine. **Journal Ethnopharmacology**, v. 90, p. 339-346, 2004.

SURESH, D.; SRINIVASAN, K. Influence of curcumin, capsaicin, and piperine on the rat liver drug-metabolizing enzyme system *in vivo* and *in vitro*. **Canadian Journal and Physiology and Pharmacology**, v. 84, p. 1259-1265, 2006.

SZALLASI, A. Piperine: researches discover new flavor in an ancient spice. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 26, n. 9, p. 437-439, 2005.

TAQVI, S.I.; SHAH, A.J.; GILANI, A.H. Blood pressure lowering and vasomodulator effects of piperine. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 52, p. 452-458, 2008.

TASLEEM, F.; AZHAR, I.; ALI, S.NF.; PERVEEN, S.; MAHMOOD, Z. A. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Piper nigrum* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, p. S461-S468, 2014.

TEWA-TAGNE, P.; BRIAÇON, S.; FESSI, H. Preparation of redispersible dry nanocapsules by means of spray-drying: development and characterization. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.30, p. 124-135, 2007.

THIEL, A.; BUSKENS, C.; WOEHRLE, T.; ETHEVE, S.; SCHOENMAKERS, A.; FEHR, M.; BEILSTEIN, P. Black pepper constituent piperine: Genotoxicity studies *in vitro* and *in vivo*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 66, p. 350-357, 2014.

THIRUNAVUKKARASU, C.; SINGH, J. P. V; SELVENDIRAN, K.; SAKTHISEKARAN, D. Chemopreventive efficacy of selenium against N-nitrosodiethylamine-induced hepatoma in albino rats. **Cell Biochemistry and Function**, v. 19, p. 265-271, 2001.

TRIVEDI, R.; KOMPELLA, U. B. Nanomicellar formulations for sustained drug delivery: strategies and underlying principles. **Nanomedicine**, v. 5, n. 3, p. 485-505, 2010.

LAKOWSKI, B.; HEKIMI, S. The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 13091-13096, 1998.

VALÉRIO, A.; CONTI, D. S.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C.; DA ROCHA, S. R. P. Synthesis of PEG-PCL-based polyurethane nanoparticles by miniemulsion polymerization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 135, p. 35-41, 2015.

VELLAICHAMY, L.; BALAKRISHNAN, S.; PANJAMURTHY, K.; MANOHARAN, S.; ALIAS, L. M. Chemopreventive potential of piperine in 7,12 dimethylbenz[a]anthracene induced skin carcinogenesis in Swiss albino mice. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, p. 11-18, 2009.

VIJAYAKUMAR, R. S.; SURYA, D.; NALINI, N. Antioxidant efficacy of black pepper (*Piper Nigrum* L.) and piperine in rats with high fat diet induced oxidative stress. **Redox Report**, v. 9, p. 105-110, 2004.

VOLAK, L.P.; GHIRMAI, S.; CASHMAN, J.R.; COURT, M.H. Curcuminoids inhibit multiple human cytochromes P450, UDP-glucuronosyltransferase, and sulfotransferase enzymes, whereas piperine is a relatively selective CYP3A4 inhibitor. **Drug Metabolism Disposition**, v. 36, p. 1594-1605, 2008.

YANG, X.; ZHU, B.; DONG, T.; PAN, P.; SHUAI, X. Interactions between an anticancer drug and polymeric micelles based on biodegradable polyesters. **Macromolecular Bioscience**, v. 8, n. 12, p. 1116-1125, 2008.

YANG, Y. C.; LEE, S. G.; LEE, H. K.; KIM, M. K.; LEE, S. H.; LEE, H. S. A piperidine amide extracted from *P longum* L. fruit shows activity against *aedes aegypti* mosquito larvae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50(13), p. 3765-7, 2002.

YING, X.; CHEN, X.; CHENG, S.; SCHEN, Y.; PENG, L.; XU, H.Z. Piperine inhibits IL-b induced expression of inflammatory mediators in human osteoarthritis chondrocyte. **International Immunopharmacology**, v. 17, p. 293-299, 2013.

ZACHARIAH, T. J.; SAFEER, A. L.; JAYARAJAN, K.; LEELA, N. K.; VIPIN, T. M.; SAJI, K. V.; SHIVA, K. N.; PARTHASARATHY, V. A.; MAMMOOTTY, K. P. Correlation of metabolites in the leaf and berries of selected black pepper varieties. **Scientia Horticulturae**, v. 123, p. 418-422, 2010.

ZHANG, L. et al. Significant longevity-extending effects of EGCG on *Caenorhabditis elegans* under stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, p. 414-421, 2009.

ZHANG, Y.; ZOU, X.; DING, Y.; WANG, H.; WU, X.; LIANG, B. Comparative genomics and functional study of lipid metabolic genes in *Caenorhabditis elegans*. **BMC Genomics**, v. 14, p. 164, 2013.

ZHOU, S.; GAO, Y.; JIANG, W.; HUANG, M.; XU, A.; PAXTON, J. W. Interactions of herbs with cytochrome P450. **Drug Metabolism Reviews**, v. 35, n. 1, p. 35-98, 2003.