

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados Contendo Ácido Cumárico e
Cumarina, Principais Metabólitos Secundários Presentes na *Mikania glomerata*

TICIANE KRAPF BOSCHETTI

PORTO ALEGRE, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados Contendo Ácido Cumárico e Cumarina, Principais Metabólitos Secundários Presentes na *Mikania glomerata*

Dissertação apresentada por **Ticiane Krapf Boschetti** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck

Porto Alegre, 2015.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 27 de maio de 2015, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof.^a Cristiane De Bona da Silva, Dra.
PPGCF/UFSM

Prof. Helder Ferreira Teixeira, Dr.
PPGCF / UFRGS

Prof.^a Irene Clemes Kulkamp Guerreiro, Dra.
PPGCF / UFRGS

CIP - Catalogação na Publicação

Krapf Boschetti, Ticiane
Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados
Contendo Ácido Cumárico e Cumarina, Principais
Metabólitos Secundários Presentes na Mikania Glomerata
/ Ticiane Krapf Boschetti. -- 2015.
101 f.
Orientador: Ruy Carlos Ruver Beck.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2015.

1. nanocápsulas de núcleo lipídico. 2. cumarina. 3.
ácido cumárico. 4. validação de metodologia. 5.
secagem por aspersão. I. Ruver Beck, Ruy Carlos,
orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório 405 do Departamento de Produção e Controle de Medicamentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na cidade de Porto Alegre, com financiamento da CAPES, CNPq e FAPERGS.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades e me mostrar os caminho nas horas incertas.

Aos meus pais Isac e Fátima, pelos valores que me ensinaram, pelo carinho e dedicação e por estarem sempre ao meu lado me incentivando e apoiando minhas decisões.

Ao meu esposo e companheiro Eziquiel por estar ao meu lado, me encorajando e me apoiando em todos os momentos.

Às minhas irmãs Taísa e Laura pela amizade e cumplicidade.

A toda minha família pelo carinho e incentivo.

À Elveni e ao Arno (*in memoriam*) por me incentivarem a seguir estudando e receberem com entusiasmo a notícia da aprovação no mestrado. Saudades eternas!

Ao professor Ruy Carlos Ruver Beck pela paciência, orientação e dedicação na construção deste trabalho.

Aos colegas de laboratório pelas contribuições, convivência e amizade. Em especial à colega Edilene Gadelha de Oliveira pela amizade e colaboração direta na construção desta dissertação.

Às professoras Sílvia Guterres e Adriana Pohlmann.

Aos meus colegas de trabalho na Farmácia Municipal de Butiá onde trabalho, por tomarem conta da farmácia quando precisei estar no laboratório.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

RESUMO

Objetivos: O objetivo deste trabalho foi preparar suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo cumarina e ácido cumárico ou somente ácido cumárico e secá-las por aspersão utilizando a lactose como adjuvante de secagem, bem como realizar a caracterização físico-química das formulações obtidas e propor a sua aplicação para diferentes vias de administração. **Métodos:** As suspensões de nanocápsulas foram preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado e foram caracterizadas em termos de determinação do diâmetro de partículas, índice de polidispersão, pH, potencial zeta, teor e eficiência de encapsulação e morfologia por microscopia eletrônica de transmissão. Levando em consideração a instabilidade das suspensões poliméricas e a possibilidade de administração intrapulmonar de pós, foi empregada a técnica de secagem por aspersão utilizando a lactose como adjuvante de secagem na proporção de 10% (p/v). Os pós obtidos foram caracterizados em termos de rendimento, análise morfológica e determinação do tamanho de partículas por microscopia eletrônica de varredura, desaglomeração, teor de umidade e teor das substâncias ativas. **Resultados e conclusões:** As suspensões de nanocápsulas apresentaram características físico-químicas e nanotecnológicas desejáveis aos sistemas nanoestruturados. Os pós de nanocápsulas obtidos a partir do método de secagem por aspersão apresentaram bom rendimento e baixo teor de umidade, indicando sucesso na operação de secagem. O diâmetro médio obtido para os pós coincide com a faixa ideal de tamanho para adequada deposição pulmonar, sendo essa uma das propostas para aplicação destes pós. Outra possível aplicação viável destes sistemas nanoestruturados seria por meio de vias de administração das próprias suspensões de nanocápsulas ou desenvolvimento de formulações tópicas espessadas com agentes gelificantes contendo as suspensões.

Palavras chave: nanocápsulas de núcleo lipídico, cumarina, ácido cumárico, secagem por aspersão, pós.

ABSTRACT

Objectives: The aim of this work was to prepare suspensions of lipid core nanocapsules containing coumarin and coumaric acid or only coumaric acid and spray dry them using lactose as a drying adjuvant, as well as to perform the physicochemical characterization of the formulations obtained and propose their application for different routes of administration. **Methods:** The polymeric nanocapsule suspensions were prepared by interfacial deposition of preformed polymer and they were characterized in terms of size, polydispersity index, pH, zeta potential, drug content, encapsulation efficiency and morphology by Transmission Electron Microscopy. Considering the instability of polymeric suspensions and the possibility of intrapulmonary administration of powders It was used to spray drying technique using lactose at 10% (w/v). The powders were characterized in terms of yield, morphological analysis and determination of particle size by Scanning Electron Microscopy, deagglomeration, humidity and drug content. **Results and conclusions:** The nanocapsules suspensions presented physicochemical and nanotechnological characteristics desirable to the nanostructured systems. The dry powders showed good yield and low water content, indicating success in the drying operation. The average diameter obtained for powders coincides with optimal size range suitable for pulmonary deposition. Another possible viable application of these nanostructured systems would be administration routes to nanocapsules suspensions themselves or development of topical formulations thickened with gelling agents containing the suspensions.

Keywords: lipid-core nanocapsules, coumarin, coumaric acid, spray drying, powders.

LISTA DE ABREVIATURAS

DP	desvio padrão
DPR	desvio padrão relativo
LD	difração de raio laser
LD	limite de detecção
LNC – SD	pó seco por aspersão sem substância ativa
LNC AC – SD	pó seco por aspersão contendo o ácido cumárico.
LNC AC	nanocápsula de núcleo lipídico contendo ácido cumárico
LNC ACC – SD	pó seco por aspersão contendo o ácido cumárico e a cumarina
LNC ACC	nanocápsula de núcleo lipídico contendo ácido cumárico e cumarina
LNC Br	nanocápsula branca (sem substância ativa)
LNC	nanocápsula de núcleo lipídico
LQ	limite de quantificação
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
PCS	espectroscopia de correlação de fótons
PDI	índice de polidispersão

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	A: cromatograma da formulação LNC Br, B: cromatograma de amostra da curva-padrão na concentração de 15 µg/mL, C: cromatograma da quantificação de ácido cumárico e cumarina na LNC.....	34
Figura 2	Curva analítica média para quantificação do ácido cumárico e da cumarina nas nanocápsulas poliméricas. A: ácido cumárico, B: cumarina.	35
Figura 3	Estrutura química da 2 <i>H</i> -1-benzopirran-2-ona (MM=146,15 g/mol).	42
Figura 4	Estrutura química do ácido <i>para</i> -cumárico MM = 164.16 g/mol).	43
Figura 5	Distribuição de tamanho das partículas por volume, obtida por difração de laser (n=3). A: LNC sem fármaco (LNC Br); B: LNC contendo ácido cumárico e cumarina (LNC ACC).....	55
Figura 6	Distribuição de tamanho das partículas, obtida por espectroscopia de correlação de fótons (n=3). A: LNC Br; B: LNC ACC.	57
Figura 7	Microscopia Eletrônica de Transmissão. A: LNC Br; B: LNC ACC [barra = 1 µm (20.000X)]. C: LNC Br; D: LNC ACC [barra = 0,2 µm (100.000X)].	59
Figura 8	Microscopia Eletrônica de Varredura. A: LNC-SD (2000 X); B: LNC-SD (10000 X). C: LNC ACUM-SD (2000 X); D: LNC ACUM-SD (10000 X).	61
Figura 9	Fotomicrografia da superfície das micropartículas revestidas com nanocápsulas (40000 X). Sugere-se que áreas destacadas indicam a presença de nanocápsulas.	62
Figura 10	Distribuição de tamanho das partículas obtida pelas imagens de MEV. A: LNC-SD; B: LNC ACC-SD.....	63
Figura 11	Distribuição de tamanho das partículas (µm) por número (%) após 2h. A: LNC-SD; B: LNC ACC-SD.....	64
Figura 12	Distribuição de tamanho das partículas por volume, obtida por difração de laser (n=3). A: LNC Br; B: LNC AC	78
Figura 13	Distribuição de tamanho das partículas, obtida por espectroscopia de correlação de fótons (n=3). A: LNC Br; B: LNC AC.	80

Figura 14	Microscopia Eletrônica de Transmissão. A: LNC Br; B: LNC AC [barra = 1 μm (20.000X)]. C: LNC Br; D: LNC AC [barra = 0,2 μm (100.000X)].	82
Figura 15	Microscopia Eletrônica de Varredura. A: LNC-SD (1000 X); B: LNC-SD (10000 X). C: LNC AC-SD (1000 X); D: LNC AC-SD (10000 X). A e C, barra = 10 μm ; B e D, barra = 1 μm	84
Figura 16	Fotomicrografia da superfície das micropartículas (20000 X). A: LNC-SD, B: LNC AC-SD. Sugere-se que áreas destacadas indicam a presença de nanocápsulas.	85
Figura 17	Distribuição de tamanho das partículas obtida pelas imagens de MEV. A: LNC-SD; B: LNC AC-SD.	85
Figura 18	Distribuição de tamanho das partículas (μm) por número (%) após 2h. A: LNC-SD; B: LNC AC-SD.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros cromatográficos utilizados na validação da metodologia analítica.....	30
Tabela 2	Preparação dos níveis de concentração da curva analítica para quantificação de cumarina e ácido cumárico.	31
Tabela 3	Preparação dos níveis de concentração para exatidão.....	33
Tabela 4	ANOVA da linearidade do método analítico para quantificação de ácido cumárico (A) e cumarina (B) nas formulações.	36
Tabela 5	Avaliação do DPR intra e inter-dia do método analítico para extração de ácido cumárico e cumarina na LNC.....	37
Tabela 6	Recuperação em % para ácido cumárico.....	37
Tabela 7	Recuperação em % para cumarina.....	38
Tabela 8	Limites de detecção e quantificação do método analítico.	38
Tabela 9	Diâmetro médio e Span das suspensões de LNC, obtidas por difração de laser.....	55
Tabela 10	Diâmetro médio e índice de polidispersão das suspensões de LNC, obtidas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS, n=3).	57
Tabela 11	pH das suspensões de nanocápsulas com e sem as substâncias ativas.....	58
Tabela 12	Rendimento do processo de secagem para as suspensões.	60
Tabela 13	Distribuição de tamanho das partículas.	62
Tabela 14	Distribuição de tamanho das partículas (por número) após 2h.	64
Tabela 15	Perda por dessecação obtida para os pós.....	65
Tabela 16	Diâmetro médio e Span das suspensões de LNC, obtidas por difração de laser.....	79
Tabela 17	Diâmetro médio e índice de polidispersão das suspensões de LNC, obtidas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS, n=3).	80
Tabela 18	pH das suspensões de nanocápsulas com e sem ácido cumárico	81
Tabela 19	Rendimento do processo de secagem para as suspensões.	83
Tabela 20	Distribuição de tamanho das partículas.	85
Tabela 21	Distribuição de tamanho das partículas (por número) após 2h.	86
Tabela 22	Perda por dessecação obtida para os pós.....	87

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	21
2	OBJETIVOS.....	23
2.1	Objetivo geral	23
2.2	Objetivos específicos	23
3	VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DOSEAMENTO CUMARINA E ÁCIDO CUMÁRICO EM NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO.....	25
3.1	Introdução e objetivo	25
3.2	Revisão bibliográfica	25
3.3	Materiais e métodos.....	28
3.3.1	Materiais.....	28
3.3.1.1	Matérias primas.....	28
3.3.1.2	Solventes.....	28
3.3.1.3	Aparelhos e equipamentos.....	29
3.3.1.4	Outros materiais	29
3.3.2	Métodos.....	29
3.3.2.1	Preparação das nanocápsulas contendo cumarina e ácido cumárico.....	29
3.3.2.2	Validação do método analítico para quantificação da cumarina e ácido cumárico em nanocápsulas poliméricas	30
3.3.2.2.1	Especificidade	30
3.3.2.2.2	Linearidade.....	31
3.3.2.2.3	Precisão	31
3.3.2.2.4	Limite de detecção e limite de quantificação	32
3.3.2.2.5	Exatidão	32
3.4	Resultados e discussão	33
3.4.1	Especificidade	33
3.4.2	Linearidade	34
3.4.3	Precisão	36
3.4.4	Exatidão	37

3.4.5	Limites de detecção e quantificação	38
3.5	Conclusão	39
4	DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO DE CONTENDO ÁCIDO CUMÁRICO E CUMARINA E DO SEU RESPECTIVO PÓ SECO POR ASPERSÃO	41
4.1	Introdução e objetivos	41
4.2	Revisão bibliográfica	41
4.2.1	<i>Mikania glomerata</i>	41
4.2.2	Cumarina e ácido cumárico.....	43
4.2.3	Nanopartículas poliméricas e nanocápsulas de núcleo lipídico.....	44
4.2.4	Secagem por aspersão	46
4.3	Materiais e métodos	48
4.3.1	Materiais.....	48
4.3.1.1	Matérias primas.....	48
4.3.1.2	Solventes.....	48
4.3.1.3	Aparelhos e equipamentos.....	49
4.3.1.4	Outros materiais	49
4.3.2	Métodos.....	50
4.3.2.1	Preparação das nanocápsulas contendo ácido cumárico e cumarina.....	50
4.3.2.2	Preparação dos pós através da secagem por aspersão	50
4.3.2.3	Caracterização das suspensões de nanocápsulas	51
4.3.2.3.1	Determinação do perfil granulométrico por difração de laser	51
4.3.2.3.2	Tamanho das partículas, índice de polidispersão e potencial zeta	51
4.3.2.3.3	Determinação do pH	51
4.3.2.3.4	Análise morfológica das nanocápsulas	52
4.3.2.3.5	Doseamento e eficiência de encapsulação	52
4.3.2.4	Caracterização dos pós de nanocápsulas.....	53
4.3.2.4.1	Rendimento	53
4.3.2.4.2	Análise morfológica e determinação do tamanho das partículas	53
4.3.2.4.3	Estudo de desaglomeração.....	53
4.3.2.4.4	Doseamento do ácido cumárico e da cumarina nos pós.....	53

4.3.2.4.5	Perda por dessecação para os pós.....	54
4.4	Resultados e discussão	54
4.4.1	Desenvolvimento das suspensões de nanocápsulas contendo cumarina e ácido cumárico	54
4.4.1.1	Tamanho das partículas, índice de polidispersão e potencial zeta	54
4.4.1.2	Determinação do pH	58
4.4.1.3	Análise morfológica das nanocápsulas	59
4.4.1.4	Doseamento e eficiência de encapsulação	60
4.4.2	Caracterização dos pós de nanocápsulas	60
4.4.2.1	Rendimento.....	60
4.4.2.2	Análise morfológica e distribuição de tamanho das partículas.....	61
4.4.2.3	Estudos de desaglomeração	63
4.4.2.4	Perda por dessecação para os pós.....	65
4.4.2.5	Doseamento de ácido cumárico e cumarina nos pós.....	65
4.5	Conclusão	66
5	DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO CONTENDO ÁCIDO CUMÁRICO E DO SEU RESPECTIVO PÓ SECO POR ASPERSÃO	69
5.1	Introdução e objetivos	69
5.2	Revisão bibliográfica	69
5.2.1	Nanotecnologia e nanocápsulas de núcleo lipídico	69
5.2.2	Secagem por aspersão	70
5.2.3	Via de administração pulmonar	70
5.3	Materiais e métodos	72
5.3.1	Materiais.....	72
5.3.1.1	Matérias primas.....	72
5.3.1.2	Solventes.....	72
5.3.1.3	Aparelhos e equipamentos.....	72
5.3.1.4	Outros materiais	73
5.3.1.5	Outros materiais	73
5.3.2	Métodos.....	74
5.3.2.1	Preparação das nanocápsulas contendo ácido cumárico	74

5.3.2.2	Preparação dos pós através da secagem por aspersão	74
5.3.2.3	Caracterização das suspensões de nanocápsulas	74
5.3.2.3.1	Determinação do perfil granulométrico por difração de laser	74
5.3.2.3.2	Tamanho das partículas, índice de polidispersão e potencial zeta	75
5.3.2.3.3	Determinação do pH	75
5.3.2.3.4	Análise morfológica das nanocápsulas	75
5.3.2.3.5	Doseamento e eficiência de encapsulação	76
5.3.2.4	Caracterização dos pós obtidos a partir nanocápsulas	76
5.3.2.4.1	Rendimento	76
5.3.2.4.2	Análise morfológica e determinação do tamanho das partículas	76
5.3.2.4.3	Estudo de desaglomeração	77
5.3.2.4.4	Perda por dessecação para os pós	77
5.3.2.4.5	Doseamento do ácido cumárico nos pós	77
5.4	Resultados e discussão	78
5.4.1	Desenvolvimento das suspensões de nanocápsulas contendo ácido cumárico	78
5.4.1.1	Determinação do perfil granulométrico por difração de laser	78
5.4.1.2	Tamanho das partículas, índice de polidispersão e potencial zeta	79
5.4.1.3	Determinação do pH	81
5.4.1.4	Análise morfológica das nanocápsulas	81
5.4.1.5	Doseamento e eficiência de encapsulação	82
5.4.2	Caracterização dos pós secos por aspersão	83
5.4.2.1	Rendimento	83
5.4.2.2	Análise morfológica e distribuição de tamanho das partículas	83
5.4.2.3	Estudos de desaglomeração	86
5.4.2.4	Perda por dessecação para os pós	87
5.4.2.5	Doseamento de ácido cumárico nos pós	88
5.5	Conclusão	88
6	DISCUSSÃO	89
7	CONCLUSÃO	93
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

1 INTRODUÇÃO GERAL

O uso de plantas como medicamento é provavelmente tão antigo quanto o aparecimento do próprio homem. A preocupação com a cura de doenças sempre se fez presente ao longo da história da humanidade. Muitas plantas medicinais têm sido utilizadas em todo o mundo, como uma espécie de tratamento de várias doenças através de mecanismos ainda desconhecidos. Observa-se nas últimas décadas a revalorização do emprego de preparações fitoterápicas. Assim, alguns grupos farmacêuticos passaram a desenvolver esforços voltados para o aprimoramento de medicamentos fitoterápicos e sua produção em escala industrial (TUROLLA E NASCIMENTO, 2006).

O gênero *Mikania* lidera a venda de produtos naturais em todo o mundo, sua distribuição principal é na América do Sul, mas algumas espécies são encontradas na Ásia, América do Norte e África (RUFATTO *et al.*, 2012). *Mikania glomerata* e *Mikania laevigata* são popularmente conhecidas como guaco e são usadas na medicina popular para tratar doenças respiratórias, principalmente asma e bronquite devido as suas propriedades broncodilatadoras (FREITAS *et al.*, 2008). Cumarina e ácido cumárico são partes do fitocomplexo que é responsável pelas atividades terapêuticas das espécies de guaco (SANTOS *et al.*, 2006).

Num contexto geral, o interesse na utilização de extratos de plantas para fins medicinais aumentou nos últimos anos (SILVA *et al.*, 2012). Essa procura por medicamentos de origem vegetal tem conduzido a um renovado interesse farmacêutico em cumarinas, pelo fato dessas substâncias mostrarem atividades farmacológicas potentes e relevantes e serem de baixa toxicidade para mamíferos (HOULT e PAYÁ, 1996).

A aplicação da nanotecnologia em diferentes áreas do conhecimento tem se tornado cada vez mais comum. Na área da saúde, mais especificamente na produção de medicamentos, a utilização dos conhecimentos acerca desta ciência em ascensão, possibilita retomar e utilizar de uma forma inovadora fármacos tradicionalmente empregados na terapêutica (SUPHYA *et al.*, 2012). Neste contexto, o trabalho une o vasto conhecimento existente na fitoterapia e a aplicabilidade de ativos naturais na nanotecnologia.

Na área da nanotecnologia, há crescente no desenvolvimento de carreadores biodegradáveis, capazes de controlar a liberação de fármacos proporcionando um

maior efeito terapêutico com o mínimo de toxicidade devido à liberação controlada em sítios de ação específicos (VENTURINI *et al.*, 2011). Dentre estes carreadores destacam-se as nanocápsulas que são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido a parede polimérica (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003)

Há alguns anos, foi proposto pelo nosso grupo de pesquisa um novo tipo de nanocápsulas: as nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) em que o núcleo oleoso é formado por uma dispersão de um líquido lipídico e um lípido sólido (monoestearato de sorbitano). Este núcleo é rodeado por uma parede polimérica e a interface água-partícula é estabilizada com polissorbato 80 (POHLMANN *et al.*, 2013). A partir de então, diversos trabalhos têm demonstrado as potencialidades destes sistemas coloidais, como: estabilizar substâncias fotolábeis (OURIQUE *et al.*, 2010), controlar a liberação de fármacos (FONTANA *et al.*, 2009), melhorar sua eficácia (ZANOTTO-FILHO *et al.*, 2013), aumentar a biodistribuição cerebral de diferentes substâncias (FROZZA *et al.*, 2010), reduzir efeitos colaterais (POHLMANN *et al.*, 2002).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa relatou a co-encapsulação, em nanocápsulas de núcleo lipídico, dois ativos naturais: a curcumina e o resveratrol. Os resultados evidenciaram que a encapsulação melhorou a atividade antioxidante *in vitro* desses polifenóis (CORADINI *et al.*, 2014). Trabalhos prévios também demonstraram a eficácia terapêutica da curcumina nanoencapsulada no tratamento de gliomas (ZANOTTO-FILHO *et al.*, 2013), bem como sua atividade tripanocida (GRESSIER *et al.*, 2015), entre outros. Estes estudos evidenciam as potencialidades e a aplicabilidade de ativos naturais nanoencapsulados para o tratamento de várias doenças, estimulando o desenvolvimento de novas formulações.

Porém, estes sistemas coloidais aquosos apresentam algumas desvantagens, entre elas estão: a instabilidade físico-química devido à hidrólise do polímero, a perda do fármaco para a fase dispersante, a sedimentação e/ou aglomeração das partículas. Com o objetivo de superar estas desvantagens, a técnica de secagem por aspersão tem sido proposta para secar suspensões de nanocápsulas usando um adjuvante de secagem (MULLER *et al.*, 2000; BECK *et al.*, 2006). Neste cenário, este trabalho propõe a secagem das nanocápsulas contendo curcumina e ácido cumárico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver formulações nanoestruturadas contendo dois metabólitos secundários majoritários da *Mikania glomerata*, a cumarina e o ácido cumárico potencialmente aplicáveis pelas vias oral e tópica, empregando as técnicas de deposição interfacial do polímero pré-formado e secagem por aspersão.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir e caracterizar nanocápsulas contendo cumarina e ácido cumárico;
- Produzir e pós a partir da suspensão de nanocápsulas aplicando a secagem por aspersão;
- Realizar a caracterização físico-química dos pós;
- Validar método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação dos níveis de cumarina e ácido cumárico nas nanopartículas e nos pós.

3 VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DOSEAMENTO CUMARINA E ÁCIDO CUMÁRICO EM NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO

3.1 Introdução e objetivo

As nanopartículas poliméricas são sistemas coloidais vesiculares ou matriciais contendo um polímero no sistema. As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; VENTURINI *et al.*, 2011).

Neste trabalho, foram desenvolvidas formulações nanoestruturadas contendo cumarina e ácido curárico ou somente ácido cumárico, a fim de propor possíveis vias de administração para estas formulações. Para isso, inicialmente é fundamental que se tenha um método analítico adequado para conduzir os estudos de desenvolvimento.

O bom desempenho de qualquer técnica analítica depende crucialmente de dois parâmetros: a qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no seu processamento. A validação é uma forma de assegurar a aplicabilidade e o alcance de um método durante as operações de rotina de um laboratório. (RIBEIRO *et al.*, 2008).

Este capítulo tem como objetivo desenvolver e validar um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação simultânea dos níveis de cumarina e ácido cumárico encapsulado em nanocápsulas de núcleo lipídico, visando comprovar que os métodos de extração e doseamento dos fármacos são adequados. A validação foi realizada segundo os critérios preconizados pelo ICH (ICH, 2005) e pela resolução da ANVISA (BRASIL, 2003).

3.2 Revisão bibliográfica

O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos (ICH, 2005; ANVISA - BRASIL, 2003). A validação deve garantir, por meio de estudos

experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, precisão, exatidão, sensibilidade, limite de quantificação, adequados à análise (ANVISA - BRASIL, 2003).

A especificidade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. A especificidade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, presentes. Ela também garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (RIBANI *et al.*, 2004; ANVISA - BRASIL, 2003).

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ANVISA - BRASIL, 2003; ICH, 2005). A relação matemática entre a concentração e o sinal medido, pode ser expressa como uma equação da reta, chamada de curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004). A estimativa dos coeficientes de uma curva analítica pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear. Além dos coeficientes de regressão a e b , também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação r . Quanto mais próximo de 1,0 for o r , menor será dispersão do conjunto de pontos experimentais. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (JENKE, 1998; RIBANI *et al.*, 2004).

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão usualmente é avaliada através da estimativa do desvio padrão relativo (DPR) também conhecido como coeficiente de variação (CV). O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% (ANVISA - BRASIL, 2003).

A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetibilidade (precisão intra-dia); precisão intermediária (precisão inter-dia);

reprodutibilidade (avalia mudança de condições, como operador, local, equipamentos, etc) (RIBANI *et al.*, 2004; ANVISA - BRASIL, 2003).

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. O ICH estabelece que um mínimo de nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração deve ser obedecido. Por exemplo, em triplicata para três níveis de concentração. Esta recomendação é também adotada pela ANVISA (ICH - 2005; ANVISA, BRASIL, 2003).

O ensaio de recuperação constitui o método mais utilizado para verificar a exatidão e consiste na "fortificação" da amostra, ou seja, na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse seguida pela determinação da concentração do analito adicionado. A recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra. A exatidão é expressa como erro sistemático percentual, inerente ao processo. O erro sistemático ocorre pela perda da substância devido à baixa recuperação da extração, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra, entre outros (BRITO *et al.*, 2003 RIBANI *et al.*, 2004).

O limite de detecção corresponde a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Enquanto que o limite de detecção corresponde a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA - BRASIL, 2003; ICH, 2005).

A literatura relata vários métodos para quantificação de cumarina e compostos fenólicos em extratos de planta. Celeghini e colaboradores 2011, desenvolveram um método para quantificação de cumarina em extratos hidroalcoólicos de *Mikania glomerata*. . Em trabalho posterior, Bertolucci e colaboradores (2009) validaram um método para quantificação de derivados do ácido cinâmico e diterpenos caurânicos em *Mikania Laevigata* e *Mikania glomerata* por cromatografia líquida de fase reversa com detector UV-DAD em três comprimentos de onda diferentes. Zhang e colaboradores (2013) desenvolveram um método para validação simultânea de 14 compostos fenólicos presentes em 89

variedades de uva chinesa, por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando detector UV-DAD.

Dado o exposto, é possível perceber que existem métodos já relatados para a quantificação destas substâncias ativas naturais em extratos de plantas, porém ainda não existe relato na literatura de método analítico para quantificação simultânea da cumarina e do ácido cumárico encapsulados em nanopartículas poliméricas, foco do presente capítulo.

3.3 Materiais e métodos

3.3.1 Materiais

3.3.1.1 Matérias primas

- Ácido *para*-cumárico (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil);
- Cumarina (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil);
- Monoestearato de sorbitano – Span 60 ® (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil);
- Óleo de semente de uva (Delaware, Porto Alegre – RS, Brasil);
- Polissorbato 80 – Tween 80 ® (Henrifarma, São Paulo – SP, Brasil);
- Poli(ϵ -caprolactona) Mn 80.000 Da (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil).

3.3.1.2 Solventes

- Acetonitrila grau CLAE (Tédia Brazil, Rio de Janeiro – RJ, Brasil);
- Acetona p.a. (Vetec, Duque de Caxias – RJ, Brasil);
- Água MilliQ ® (Destilador/deionizador Milli-Q - Millipore, Billerica – MA, EUA);
- Ácido acético glacial p.a. (LabSynth, Diadema – SP, Brasil);

3.3.1.3 Aparelhos e equipamentos

- Balança analítica BEL Engineering (Piracicaba – SP, Brasil);
- Banho de aquecimento Multi Stirrer (Velp Scientifica – Nova Iorque, EUA);
- Centrífuga modelo 5417R (Eppendorff, São Paulo – SP, Brasil);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) (Shimazu® - Tóquio, Japão):
 - Auto-injetor (LC-20A Prominence)
 - Detector UV-Vis
 - Bomba S-200
 - Software: Lab Solutions®
- Evaporador rotatórioRII (Büchi®, Flawil – Suíça);
- Lavadora ultrassônica 1400A Ultracleaner, (Unique, Indaiatuba - SP, Brasil).

3.3.1.4 Outros materiais

- Membranas de polivideno HVLP 0,45 mm (Millipore, Billerica – MA, EUA);
- Coluna Luna C18(2) 150 X 4,6 mm, 5 µm, 100Å (Phenomenex, Torrance – CA, EUA);
- Grids de cobre com revestimento carbono-formvarm (Electron Microscopy Science, Hatfield – PA, EUA);
- Pré-coluna (Phenomenex, Torrance – CA, EUA).

3.3.2 Métodos

3.3.2.1 Preparação das nanocápsulas contendo cumarina e ácido cumárico

As nanocápsulas de núcleo lipídico foram preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado (VENTURINI *et al.*, 2011). A fase orgânica contendo as substâncias ativas, óleo de semente de uva, polímero e Span 60[®] foi primeiramente dissolvida em acetona e posteriormente vertida na fase aquosa contendo Tween 80[®] sob agitação magnética.

3.3.2.2 Validação do método analítico para quantificação da cumarina e ácido cumárico em nanocápsulas poliméricas

Para validação do método analítico, foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação. Os parâmetros cromatográficos utilizados na validação da cumarina e ácido cumárico nas nanopartículas foram baseados no trabalho realizado por Celeghini e colaboradores (2001), com algumas adaptações. Foi necessária a acidificação da fase móvel a fim de corrigir o “rabeamento” do pico do ácido cumárico (STÖCKIGT *et al.*, 2002) e a substituição do tipo de coluna devido a disponibilidade de colunas no laboratório. Os parâmetros cromatográficos utilizados na validação estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 — Parâmetros cromatográficos utilizados na validação da metodologia analítica.

Parâmetros	Condições
Detecção	UV (λ 274 nm)
Fluxo	1,0 mL/min.
Coluna	Luna C18(2) (150mm x 4.6 mm, 5 μ m, Phenomenex)
Fase móvel	ACN:H ₂ O acidificada com 0,1% (v/v) de ácido acético glacial (40:60 v/v)
Volume de Injeção	20 μ L
Tempo de retenção dos picos	\approx 2,8 min para o ácido cumárico e \approx 5,2 min para a cumarina.

Fonte: Próprio autor (2015).

3.3.2.2.1 Especificidade

Para avaliação da especificidade uma formulação de nanocápsulas branca foi submetida ao processo de extração e analisado por CLAE. A formulação branca foi comparada com aquelas contendo ácido cumárico e cumarina.

3.3.2.2.2 Linearidade

Para avaliar a linearidade, cinco níveis de concentração foram avaliados em dois dias diferentes, sendo duas curvas preparadas no mesmo dia e outra em dia consecutivo, obtendo-se assim três curvas analíticas. Os níveis de concentração construídos foram: 5, 10, 15, 20 e 30 $\mu\text{g/mL}$. Foram pesados exatamente, cerca de 0,0125 g de cumarina e ácido *p*-cumárico em balão volumétrico de 25 mL contendo acetonitrila. O balão foi submetido a banho ultrassom por 10 minutos e a seguir foi completado o volume com acetonitrila, obtendo-se uma concentração de 0,5 mg/mL. A partir dessa solução-mãe, alíquotas foram tomadas e diluídas com a fase móvel para obtenção dos cinco níveis de concentração, conforme Tabela 3.2. Após a preparação das soluções de concentrações diferentes, essas foram filtradas em filtro 0,45 μm (Millipore Millex-HV) para vials âmbar e então submetidas ao doseamento por CLAE, de acordo com o método descrito anteriormente (item 3.3.2.2).

Tabela 2 — Preparação dos níveis de concentração da curva analítica para quantificação de cumarina e ácido cumárico.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Volume de solução- mãe (μL)	Balão volumétrico (mL)
5	100	10
10	200	10
15	300	10
20	400	10
30	600	10

Fonte: Próprio autor (2015).

3.3.2.2.3 Precisão

Neste trabalho a precisão foi determinada quanto a repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade para as duas substâncias ativas. Para isso, seis

soluções-amostra referentes a concentração de 15 µg/mL foram obtidas e injetadas para avaliar a repetibilidade. Outras seis soluções-amostra também de 15 µg/mL foram preparadas em dias diferentes e a seguir foram injetadas para determinar a precisão intermediária. Para verificar a precisão do método foi calculado o desvio padrão relativo (DPR) intra-dia e inter-dia. A análise estatística foi utilizada para as medidas inter-dia, através do software Graphpad prism 5.

3.3.2.2.4 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção foi determinado matematicamente pela equação (1).

$$LD = 3,3 X s/S \quad (1)$$

Equação (1). Onde: **s** representa a média dos desvios padrão do intercepto com o eixo do Y e **S** representa o coeficiente angular da curva analítica média (ANVISA - BRASIL, 2003).

O limite de quantificação foi calculado pela equação (2).

$$LQ = 10 X s/S \quad (2)$$

Equação (2). Onde: **s** representa a média dos desvios padrão do intercepto com o eixo do Y e **S** representa o coeficiente angular da curva analítica média (ANVISA - BRASIL, 2003).

3.3.2.2.5 Exatidão

Para avaliação da exatidão, pesou-se exatamente, cerca de 0,0125 g de cumarina e ácido *p*-cumárico em balão volumétrico de 25 mL contendo acetonitrila. Submeteu-se a banho ultrassom por 10 minutos e completou-se o volume com acetonitrila, obtendo-se uma concentração de 0,5 mg/mL. A seguir foram preparados três níveis de concentração em triplicata, utilizando a amostra em concentração conhecida, fortificada com concentrações diferentes de solução mãe em balão volumétrico de 5 mL, conforme a Tabela 3.

Tabela 3 — Preparação dos níveis de concentração para exatidão.

Volume de amostra b.v. 5 mL	Volume de solução mãe b.v. 5 mL	Concentração teórica amostra ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração teórica solução mãe ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração teórica total ($\mu\text{g/mL}$)
75 μL	37,5 μL	7,5	3,75	11,25 (7,5 + 50%)
75 μL	75 μL	7,5	7,5	15 (7,5 + 100%)
75 μL	112,5 μL	7,5	11,25	18,75 (7,5 + 150%)

Fonte: Próprio autor (2015).

3.4 Resultados e discussão

3.4.1 Especificidade

De acordo como descrito no item 3.2.2.2.1 da metodologia, os cromatogramas de formulações brancas e formulações contendo os ativos foram comparadas a fim de avaliar se os componentes da formulação interferiam nos picos de ácido cumárico e cumarina. Os resultados estão demonstrados na Figura 1.

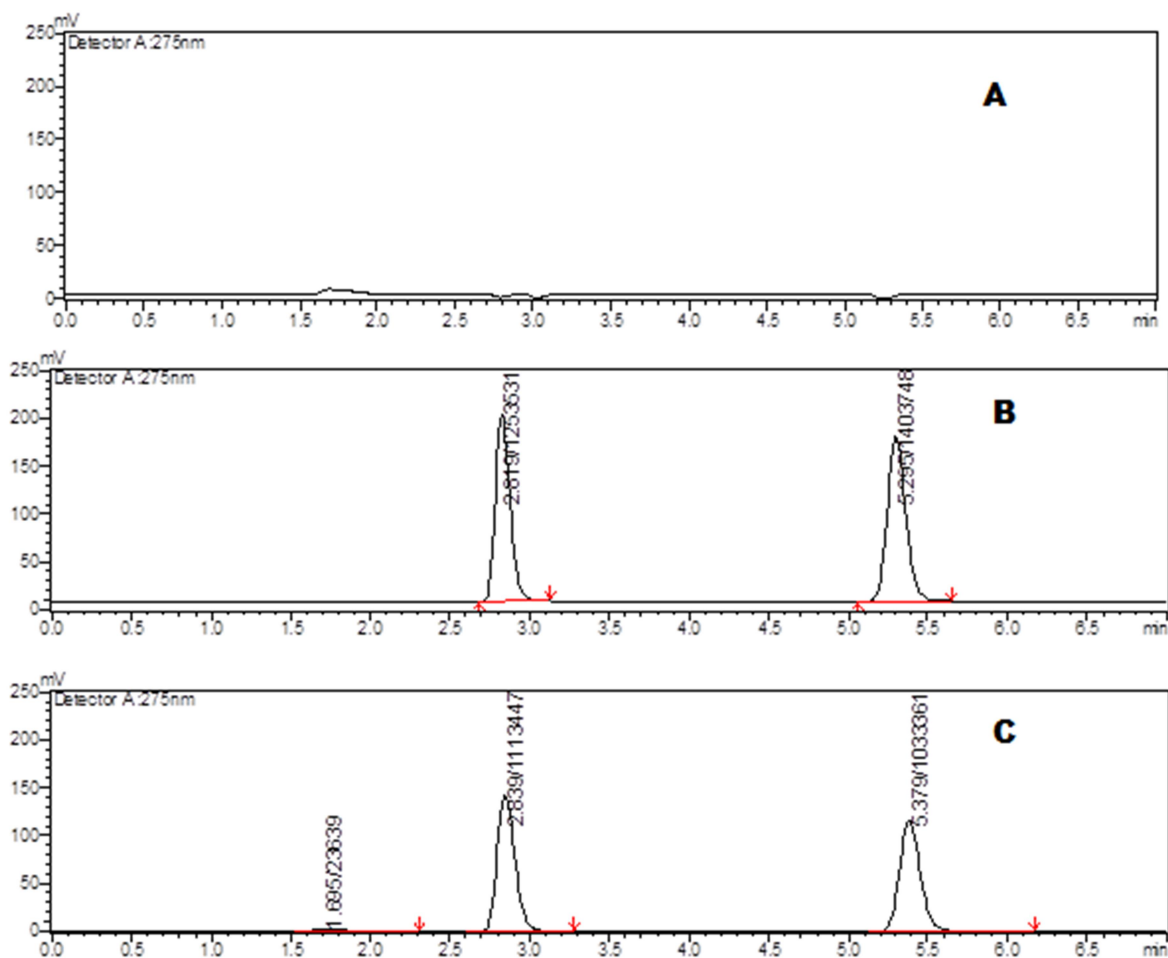


Figura 1 — **A:** cromatograma da formulação LNC Br, **B:** cromatograma de amostra da curva-padrão na concentração de 15 µg/mL, **C:** cromatograma da quantificação de ácido cumárico e cumarina na LNC.

Fonte: Próprio autor (2015).

A análise dos cromatogramas demonstrados na figura acima permite afirmar que os componentes da formulação não interferiram na quantificação do fármaco, confirmando a especificidade do método analítico.

3.4.2 Linearidade

As curvas analíticas obtidas para ácido cumárico e cumarina estão apresentadas na Figura 2.

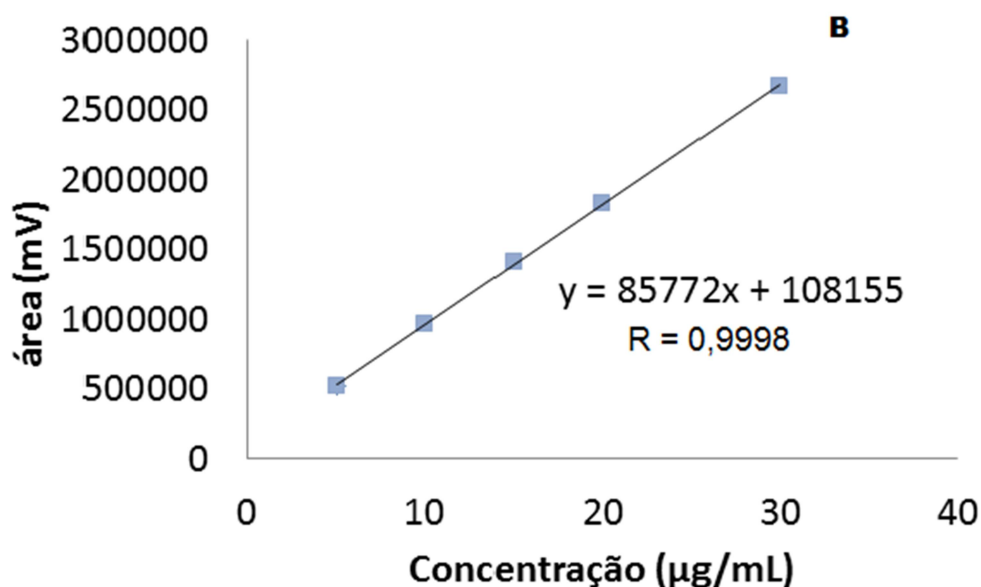
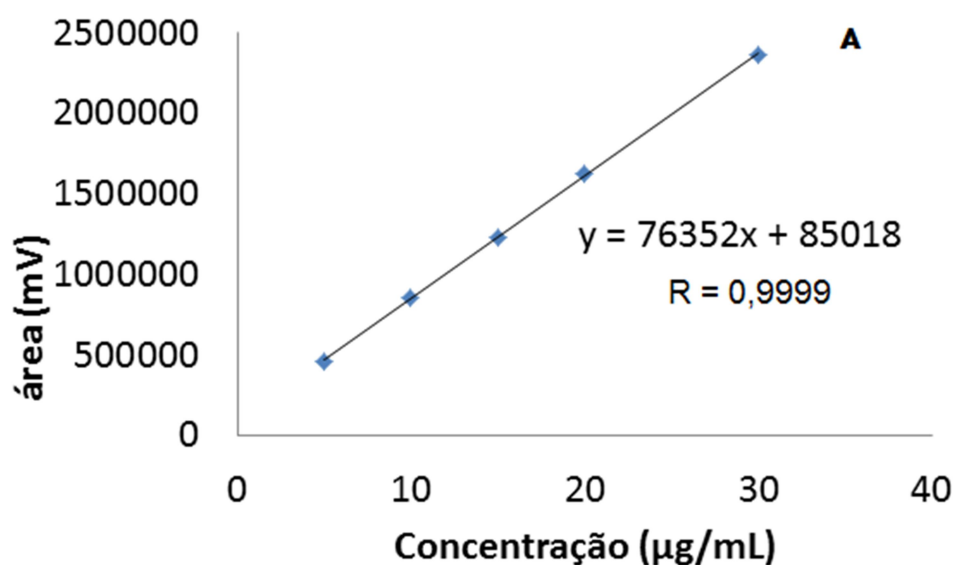


Figura 2 — Curva analítica média para quantificação do ácido cumárico e da cumarina nas nanocápsulas poliméricas. **A**: ácido cumárico, **B**: cumarina.

Fonte: Próprio autor (2015).

A curva analítica do ácido cumárico apresentou coeficiente angular igual a 76352 e intersecção no eixo y igual a 85018. Enquanto que a curva analítica da cumarina exibiu um coeficiente angular igual a 85772 e intersecção no eixo y igual a 108155. Os erros padrões médios para as áreas dos picos de injeções foram menores do que 5%, mostrando boa repetibilidade da curva analítica. Ambos os coeficientes de correlação foram superiores a 0,99 (0,9999 para o ácido cumárico e 0,9998 para a cumarina), que é o valor mínimo preconizado pelos órgãos oficiais

(ANVISA, 2003), indicando que a resposta do método é linearmente proporcional à concentração do analito.

A linearidade foi comprovada através da avaliação estatística por Análise de Variância (ANOVA) com intervalo de confiança de 95%. Os resultados da análise estatística estão exibidos na Tabela 4.

Tabela 4 — ANOVA da linearidade do método analítico para quantificação de ácido cumárico (**A**) e cumarina (**B**) nas formulações.

FONTE DE VARIACÃO	gl	SOMA DOS QUADRADOS	VARIÂNCIA	F calculado	F tabelado
Entre	4	6,22878E+12	1,55719E+12	671,3671	3,48
Regressão linear	1	6,2267E+12	6,2267E+12	2684,5719	4,96
Desvio de linearidade	3	2,08E+09	693005376,7	0,2988	3,71
Resíduo	10	23194372114	2319437211		
Total	14	6,25197E+12			

FONTE DE VARIACÃO	gl	SOMA DOS QUADRADOS	VARIÂNCIA	F calculado	F tabelado
Entre	4	8,35742E+12	2,08936E+12	2154,1094	3,48
Regressão linear	1	8,35461E+12	8,35461E+12	8613,5437	4,96
Desvio de linearidade	3	2,81E+09	935685969,2	0,9647	3,71
Resíduo	10	9699391267	969939126,7		
Total	14	8,36712E+12			

Fonte: Próprio autor (2015).

Analisando os dados da tabela acima, foi possível observar que houve regressão linear significativa e desvio da linearidade não significativo ($p > 0,05$) quando comparados os valores de $F_{\text{calculado}}$ e F_{tabelado} .

3.4.3 Precisão

Conforme descrito anteriormente (item 3.3.2.2.3) foi determinada a precisão intra-dia e inter-dia. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 — Avaliação do DPR intra e inter-dia do método analítico para extração de ácido cumárico e cumarina na LNC.

Formulação LNC	Precisão intra-dia (%)	Precisão inter-dia (%)
Ácido cumárico	1,98	1,66
Cumarina	1,03	0,11

Fonte: Próprio autor (2015).

A análise do DPR intra e inter-dia demonstrou que o método é preciso, pois todos os DPR apresentaram valores inferiores a 5%, conforme preconizado pelos códigos oficiais (ANVISA, 2003). Ainda, a comparação estatística das medidas inter-dia através do teste *t* de Student, adotando um intervalo de confiança de 95%, revelou valores de $p > 0,05$ (igual a 0,1222 para o ácido cumárico e 0,9403 para a cumarina), comprovando não haver diferença significativa das determinações inter-dia.

3.4.4 Exatidão

A exatidão foi determinada utilizando o ensaio de recuperação, conforme descrito no item 3.2.2.2.5. As porcentagens de recuperação estão demonstradas nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6 — Recuperação em % para ácido cumárico.

Concentração Teórica (n = 3)	Concentração Teórica ajustada	Concentração real ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)
7,5 $\mu\text{g/mL}$ + 50%	9,85	9,56	97,09
7,5 $\mu\text{g/mL}$ + 100%	13,60	13,11	96,41
7,5 $\mu\text{g/mL}$ + 150%	17,35	17,22	99,24
Média			97,58
DP			1,48
DPR			1,51

Fonte: Próprio autor (2015).

Tabela 7 — Recuperação em % para cumarina.

Concentração Teórica (n = 3)	Concentração Teórica ajustada	Concentração real (µg/mL)	Recuperação (%)
7,5 µg/mL + 50%	8,85	8,79	99,34
7,5 µg/mL + 100%	12,60	12,57	99,74
7,5 µg/mL + 150%	16,35	16,66	101,93
Média			100,34
DP			1,39
DPR			1,38

Fonte: Próprio autor (2015).

Dado o exposto, podemos afirmar que o método é exato, pois as porcentagens médias de recuperação tanto para ácido cumárico como para cumarina foram próximas a 100%, com coeficientes de variação menores do que 5% entre as médias dos três níveis de concentração. A análise estatística por ANOVA entre essas médias, adotando um intervalo de confiança de 95%, resultou em valores de $p > 0,05$ (igual a 0,1535 para ácido cumárico e 0,2505 para cumarina), mostrando não haver diferença significativa entre valores de recuperação.

3.4.5 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram calculados baseados nos parâmetros da curva analítica, utilizando o desvio padrão do intercepto com o eixo Y e o coeficiente angular da curva analítica. Esses valores foram aplicados nas Equações 1 e 2, respectivamente. Os resultados estão exibidos na Tabela 8.

Tabela 8 — Limites de detecção e quantificação do método analítico.

	Ácido cumárico	Cumarina
LD (µg/mL)	1,28	1,30
LQ (µg/mL)	3,87	3,94

Fonte: Próprio autor (2015).

3.5 Conclusão

Os resultados apresentados neste capítulo demonstram que o método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV pode ser uma ferramenta útil para a quantificação simultânea de ácido cumárico e cumarina em nanocápsulas de núcleo lipídico. Foi possível verificar que o método proposto apresentou precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, especificidade, e recuperação adequadas à análise.

A validação da metodologia deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método é capaz de garantir a confiabilidade dos resultados, através dos parâmetros validados. Assim sendo, foi possível afirmar que a metodologia descrita neste capítulo está validada para a finalidade a qual e destina.

4 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO DE CONTENDO ÁCIDO CUMÁRICO E CUMARINA E DO SEU RESPECTIVO PÓ SECO POR ASPERSÃO

4.1 Introdução e objetivos

A nanotecnologia tem sido proposta como uma nova estratégia para a administração, a liberação e a vetorização de fármacos em sítios específicos de ação. Dentre os principais nanocarreadores estão as nanocápsulas poliméricas, constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo, geralmente oleoso, contendo um tensoativo na interface partícula/fase aquosa (GUTERRES *et al.*, 2007).

Apesar de estes sistemas possuírem inúmeras vantagens, a limitada estabilidade físico-química das suspensões de nanopartículas é considerada uma desvantagem. Sendo assim, a secagem por aspersão representa uma alternativa para transpor problemas de instabilidade ou, ainda, para desenvolver sistemas microparticulados de administração intrapulmonar de fármacos (DOMINGUES *et al.*, 2008; OURIQUE *et al.*, 2014).

Considerando o exposto, o objetivo deste capítulo foi desenvolver e caracterizar suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo ácido cumárico e cumarina, dois metabólitos secundários presentes na *M. glomerata*. Após o desenvolvimento das suspensões, as mesmas foram secas por aspersão mediante o emprego da lactose como adjuvante de secagem, propondo a sua aplicação para diferentes vias de administração. Também foi realizada a validação do método analítico para quantificação do ácido cumárico e da cumarina nos pós, com base no método descrito no Capítulo 1 desta dissertação.

4.2 Revisão bibliográfica

4.2.1 *Mikania glomerata*

A *Mikania glomerata*, conhecida como “guaco”, é usada na medicina popular brasileira para várias condições inflamatórias e alérgicas, particularmente do sistema

respiratório (FREITAS *et al.*, 2008). Segundo Silva *et al.* (2012) o guaco é usado como broncodilatador natural e eficaz, expectorante e supressor da tosse.

O xarope de guaco, produzido com o extrato fluido hidroalcoólico, é uma forma farmacêutica frequentemente utilizada na terapêutica para doenças das vias aéreas superiores (SILVA *et al.*, 2012). Além do xarope, outras formas farmacêuticas produzidas a partir do extrato seco do guaco, como as cápsulas, integram a relação nacional de medicamentos do componente básico da assistência farmacêutica do Sistema Único de Saúde (RENAME, 2012).

A classe mais característica de compostos presentes no gênero *Mikania* são as cumarinas e derivados, frequentemente responsáveis pela atividade farmacológica. Uma grande variedade de atividades biológicas é atribuída a estes compostos, tais como: atividade antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, anti-espasmódica, anti-tumoral, anticoagulante, broncodilatadora e antioxidante (RUFATTO *et al.*, 2012). A cumarina, 2H-1-benzopiran-2-ona, é um dos principais constituintes de *Mikania glomerata* e aparentemente está envolvida no efeito broncodilatador desta planta. Além da cumarina (2H-1-benzopiran-2-ona), a dihidrocumarina (3,4-Dihydro-2H-1-benzopiran-2-ona) e o ácido cumárico foram identificados em extratos de *M. glomerata* (VIDAL *et al.*, 2006) e *M. laevigata* (OLIVEIRA *et al.*, 1984).

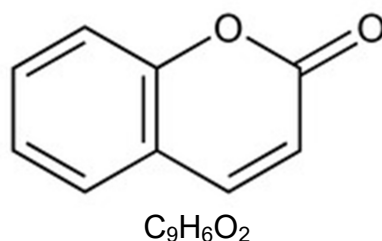


Figura 3 — Estrutura química da 2H-1-benzopiran-2-ona (MM=146,15 g/mol).

Fonte: RUFATTO *et al.*, 2012.

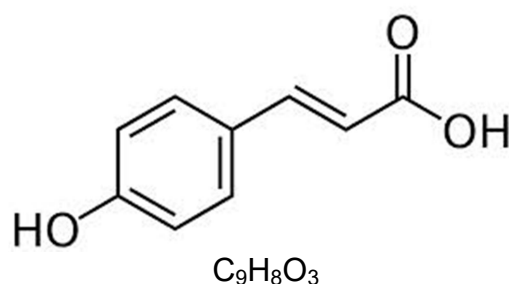


Figura 4 — Estrutura química do ácido *para*-cumárico (MM = 164,16 g/mol).

Fonte: OLIVEIRA *et al.*, 2011.

4.2.2 Cumarina e ácido cumárico

A cumarina (1,2-benzopirona, 2H-1-benzopiran-2-ona), é um sólido cristalino branco que apresenta peso molecular de 146,15g/mol, ponto de fusão entre 68 a 70°C e ponto de ebulição entre 297 a 299°C. Consiste em um anel aromático fundido com um anel lactônico condensado (LAKE, 1999). É muito solúvel em etanol, clorofórmio, éter dietílico e óleos e é ligeiramente solúvel em água (COHEN, 1979).

A cumarina é um dos principais metabólitos secundários do guaco, sendo responsável pelo seu efeito broncodilatador (ABREU *et al.*, 2007). Tal efeito ocorre devido ao relaxamento da musculatura lisa do pulmão promovido pela cumarina (LEITE *et al.*, 1993).

Estudos farmacocinéticos em seres humanos demonstraram que a cumarina é completamente absorvida a partir do trato gastrointestinal após administração oral, sofrendo extenso metabolismo de primeira passagem no fígado, sendo que apenas 2 a 6% atinge a circulação sistêmica intacta. A eliminação da cumarina da circulação sistêmica é rápida, com meia vida de aproximadamente 1,5 horas. Na maioria dos seres humanos, a cumarina é extensivamente metabolizada a 7 hidroxycumarina (7 HC), sendo a isoforma P-450 (CYP) do citocromo a responsável pela hidroxilação no fígado humano (LAKE, 1999).

O ácido *para*-cumárico é um ácido hidroxicinâmico, com um grupo hidroxila no carbono 4 do anel benzênico. Existem três isoformas deste ácido, cujas diferenças advêm da posição do grupo hidroxila, sendo o ácido *p*-cumárico o mais abundante. Este composto é um sólido cristalino de cor bege, com massa molar de 164,16 g/mol, ponto de ebulição de 210 a 213°C e possui uma densidade de 1,3. É

ligeiramente solúvel em água, mas muito solúvel em etanol e em dietil éter (MAO *et al.*, 2013).

Compostos fenólicos como o ácido cumárico são responsáveis por muitas atividades, incluindo atividade antioxidante e anti-úlcero-gênica (VIKRAM *et al.*, 2014). Também são consistentemente associados à redução no risco de doenças cardiovasculares, câncer e outras doenças crônicas, devido a sua capacidade em sequestrar radicais livres e metais pró-oxidantes (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Ibrahim *et al.*, (2012) relataram atividade anti-inflamatória, analgésica e antimicrobiana em extratos de *Salvia bicolor*, relacionadas a presença de ácidos fenólicos como o ácido *p*-cumárico.

Ensaio em animais com infusão gástrica *in situ* de ácidos hidroxicinâmicos isolados (ácidos ferúlico, *p*-cumárico e cafeico) indicam que a absorção inicia no estômago, onde uma pequena parcela é absorvida intacta, enquanto a maior parte é metabolizada e absorvida no cólon. Após a absorção, os ácidos hidroxicinâmicos livres podem sofrer ação de enzimas da fase II na mucosa intestinal e posteriormente no fígado ou outros tecidos, formando conjugados sulfatados, glicuronados e/ou metilados, pela ação das sulfotransferases, UDP-glicotransferases e catecol-*o*-metiltransferases, respectivamente. Estas conjugações representam um processo metabólico de detoxificação comum a muitos xenobióticos, que facilita a eliminação biliar e urinária pelo aumento da hidrofiliabilidade dos compostos (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

4.2.3 Nanopartículas poliméricas e nanocápsulas de núcleo lipídico

Percebe-se crescente interesse na aplicação da nanotecnologia em diferentes setores industriais visando o aprimoramento de produtos e processos. Nos últimos 30 anos, a nanotecnologia farmacêutica tem sido destinada à produção de novos carreadores para melhorar os benefícios terapêuticos de fármacos (JORNADA *et al.*, 2012). Esses nanocarreadores são capazes de controlar a liberação de fármacos em sítios específicos e sua velocidade de liberação da forma farmacêutica (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; VENTURINI *et al.*, 2011).

Nanopartículas poliméricas têm sido extensivamente estudadas como transportadores de fármacos no campo farmacêutico e apresentam tamanho na

faixa de 10 - 1000 nm (MORA-HUERTAS *et al.*, 2009) Estes sistemas têm várias vantagens, incluindo a liberação controlada e sustentada do ativo, proporcionando um tratamento mais eficaz e menos tóxico do que quando se utiliza a opção convencional (CONTRI *et al.*, 2014).

O termo nanopartícula polimérica inclui as nanocápsulas e nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural. As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, que pode ser líquido ou semissólido à temperatura ambiente, o fármaco pode estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas, não possuem óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica sólida, onde o fármaco pode estar retido ou adsorvido (VAUTHIER & BOUCHEMAL, 2008; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Dentre os métodos de preparação das nanopartículas relatados na literatura, estão a polimerização *in situ* de monômeros dispersos e a precipitação de polímeros pré-formados (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Adaptações quali-quantitativas nas formulações possibilitaram a produção de nanocápsulas de núcleo lipídico. Este método consiste em verter a fase orgânica contendo um solvente miscível com água, polímero, óleo, tensoativo de baixa hidrofília e fármaco sobre a fase aquosa contendo um tensoativo hidrofílico. Assim, o polímero insolúvel no óleo e na fase aquosa precipita na interface óleo/água, formando as partículas (GUTERRES *et al.*, 2007). Dentre os polímeros empregados na produção de nanocápsulas, destaca-se a poli (ϵ -caprolactona), um polímero biodegradável e biocompatível, útil para encapsular uma vasta variedade de fármacos (SINHA *et al.*, 2004; POHLMANN *et al.*, 2013).

As nanocápsulas de núcleo lipídico são uma classe de nanocápsulas, na qual o núcleo oleoso é formado por uma dispersão de um lipídeo líquido e um lipídeo sólido (monoestearato de sorbitano). Esse núcleo oleoso é envolto por uma parede polimérica e a interface água-partículas é estabilizada pelo tensoativo hidrofílico, geralmente o polissorbato 80 (POHLMANN *et al.*, 2013 ; JORNADA *et al.*, 2012). VENTURINI *et al.*, 2012, otimizaram a produção a produção de uma suspensão de nanocápsulas de núcleo lipídico, usando como polímero a poli(ϵ -caprolactona). Estas formulações podem ser úteis como produtos intermediários para a produção de farmacêuticas de uso pulmonar, implantes, dispersões aquosas intravenosas, assim como podem ser administradas pela via oral (FONTANA *et al.*, 2014).

Diversos estudos têm demonstrado as vantagens destes sistemas, como: redução da irritação cutânea provocada por medicamentos de uso tópico (CONTRI *et al.*, 2014), diminuição da toxicidade gastrointestinal (DOMINGUES *et al.*, 2008), aumento da biodisponibilidade de fármacos (FONTANA *et al.*, 2014), diminuição dos efeitos colaterais de certos fármacos, proteção de fármacos degradáveis no trato gastrointestinal (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003), melhora na estabilidade química de moléculas ativas, controle da penetração/permeação na pele (POHLMANN *et al.*, 2013), maior eficácia em tratamentos no sistema nervoso central devido a transposição da barreira hematoencefálica (ZANOTTO-FILHO *et al.*, 2013).

4.2.4 Secagem por aspersão

A secagem por aspersão tem sido frequentemente utilizada na obtenção de produtos tecnológicos intermediários destinados à produção de diversos tipos de formas farmacêuticas. O processo de secagem por aspersão consiste de três etapas fundamentais. Na primeira fase, o fluído é disperso como gotículas, produzindo uma grande área superficial. Na segunda, ocorre contato destas com uma corrente de ar aquecido, havendo transferência de calor. Na terceira etapa acontece a evaporação do solvente e a formação da partícula sólida (VEHRING *et al.*, 2007).

Devido principalmente à fase aquosa, das suspensões coloidais, elas são bastante suscetíveis a alterações físico-químicas e à contaminação microbiológica durante o armazenamento. Nesse sentido, a secagem por aspersão (spray-drying) foi proposta por nosso grupo de pesquisa para a conversão desses sistemas dispersos aquosos em sistemas sólidos microparticulados, empregando um adjuvante de secagem (MULLER *et al.*, 2000). O uso de um adjuvante de secagem é necessário nesse processo, a ausência de tal componente impossibilita a secagem das suspensões, devido à forte aderência do produto sobre as paredes do spray-dryer (MULLER *et al.*, 2000).

Excipientes como lactose e leucina estão tipicamente incluídos no processo de secagem, atuando como adjuvantes que protegem a integridade estrutural das nanopartículas poliméricas pela exposição à alta temperatura. Também ocupam o espaço intersticial entre as nanopartículas, evitando a fusão irreversível

interpartículas após aquecimento acima da temperatura de transição vítrea (WANG *et al.*, 2012).

Apesar da secagem por aspersão ser uma técnica bem estabelecida, a concepção dos parâmetros do processo para produção de pós com alto rendimento e melhor custo ainda é um grande desafio. Um dos parâmetros de maior importância é a temperatura do ar de entrada, sendo determinante na qualidade do produto obtido. Esta deve estar acima do ponto de ebulição do solvente utilizado. Ainda que a temperatura de entrada possa ser consideravelmente elevada, os sólidos em cada partícula nunca são aquecidos acima da temperatura de saída (HASSAN & LAU, 2010; OLIVEIRA & PETROVICK, 2010). O controle da temperatura e da taxa de alimentação são importantes para evitar o alto teor de umidade ou baixos rendimentos de pó (BECK *et al.*, 2006).

Este método apresenta vantagens, pois é rápido e realizado em uma única etapa, é aplicável a materiais sensíveis ao calor e apresenta uma fácil transposição industrial (MULLER *et al.*, 2000). Também permite controlar a uniformidade e o tamanho das partículas do produto pela manipulação das variáveis do processo. Em geral, as partículas resultantes apresentam forma esférica uniforme e uma rápida dissolução, devido à grande área específica (OLIVEIRA & PETROVICK, 2010).

A secagem por aspersão tem sido utilizada frequentemente na obtenção de produtos tecnológicos intermediários destinados à produção de diversos tipos de formas farmacêuticas. Nosso grupo de pesquisa foi pioneiro, ao demonstrar pela primeira vez o uso da técnica de *spray-drying* para a secagem de nanopartículas poliméricas (MULLER *et al.*, 2000).

Esta técnica também vem sendo amplamente utilizada para desenvolver sistemas microparticulados de administração intrapulmonar de fármacos. CRUZ e colaboradores (2011) desenvolveram micropartículas de alendronato de sódio para administração pulmonar e relataram aumento de 3,5 vezes na biodisponibilidade após administração pulmonar em comparação a administração por via oral.

Ourique e colaboradores (2014) produziram lipossomas contendo N-acetilcisteína secos por aspersão utilizando lactose (10% p/v) como adjuvante de secagem, para administração pulmonar. O trabalho demonstrou que o pó contendo o fármaco encapsulado teve melhor atividade antioxidante *in vitro* do que as formulações líquidas e sólidas contendo o fármaco não encapsulado, o que faz com

que este pó seja um bom candidato para o tratamento de doenças pulmonares associadas ao stress oxidativo.

De acordo com o contexto apresentado nesta revisão, o propósito deste trabalho foi preparar suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo cumarina e ácido cumárico ou somente ácido cumárico e secá-las por aspersão utilizando a lactose como adjuvante de secagem. Bem como propor a aplicação das formulações produzidas para diferentes vias de administração.

4.3 Materiais e métodos

4.3.1 Materiais

4.3.1.1 Matérias primas

- Ácido *para*-cumárico (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil);
- Cumarina (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil);
- Lactose (LH 201, DFE Pharma, Borculo, Países Baixos);
- Monoestearato de sorbitano – Span 60[®] (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil);
- Óleo de semente de uva (Delaware, Porto Alegre – RS, Brasil);
- Polissorbato 80 – Tween 80[®] (Henrifarma, São Paulo – SP, Brasil);
- Poli (ϵ -caprolactona) Mn 80.000 Da (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil);

4.3.1.2 Solventes

- Acetonitrila grau CLAE (Tédia Brazil, Rio de Janeiro – RJ, Brasil);
- Acetona Acetona p.a. (Vetec, Duque de Caxias – RJ, Brasil);
- Água MilliQ[®] (Destilador/deionizador Milli-Q - Millipore, Billeria – MA, EUA);
- Ácido acético glacial p.a. (LabSynth, Diadema – SP, Brasil);

4.3.1.3 Aparelhos e equipamentos

- Balança analítica BEL Engineering (Piracicaba – SP, Brasil);
- Banho de aquecimento Multi Stirrer (Velp Scientifica – Nova Iorque, EUA);
- Centrífuga modelo 5417R (Eppendorff, São Paulo – SP, Brasil);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) (Shimazu® - Tóquio, Japão):
 - Auto-injetor (LC-20A Prominence)
 - Detector UV-Vis
 - Bomba S-200
 - Software: Lab Solutions®
- Coluna Luna C18(2) 150 X 4,6 mm, 5 µm, 100Å (Phenomenex, Torrance – CA, EUA);
- Evaporador rotatório Rotavapor®, RII (Büchi®, Flawil – Suíça);
- Lavadora ultrassônica Unique - 1400A Ultracleaner, (Unique, Indaiatuba - SP, Brasil);
- Mastersizer 2000® (Malvern Instruments - Worcestershire, Reino Unido);
- Microscópio Eletrônico de Varredura (Jeol JSM-6060, Tóquio, Japão);
- Microscópio Eletrônico de Transmissão JEM-1200 ExII (Jeol, Tóquio, Japão)
- Mini Spray Dryer Büchi B-290 (Büchi®, Flawil – Suíça) ;
- Potenciômetro DM 22 (Digimed, Campo Grande – SP, Brasil);
- Termo balança (analisador de umidade) MB25 OHAUS® (Heuwinkelstrasse – Suíça);
- Zetasizer ® modelo ZEN 3600 (Malvern instruments, Southborough - MA, EUA);

4.3.1.4 Outros materiais

- Filtros 0,45 µm (Millipore, Billerica – MA, EUA);
- Ultrafree-MC 10,000 MW (Millipore, Billerica – MA, EUA).

4.3.2 Métodos

4.3.2.1 Preparação das nanocápsulas contendo ácido cumárico e cumarina

As nanocápsulas de núcleo lipídico foram preparadas pelo método de precipitação do polímero pré-formado, descrito por Venturini e colaboradores (2011). Para preparação da fase orgânica foram pesados 0,005 g de cumarina; 0,005 g de ácido cumárico; 0,0383 g de monoestearato de sorbitano e medidos 160 µL de óleo de semente de uva. Estes componentes foram solubilizados em 27 mL de acetona durante uma hora em banho a 40 °C, a seguir a fase orgânica foi lentamente injetada numa fase aquosa contendo 54 mL de água e 0,0766 g de polissorbato 80. Posteriormente foram removidos o solvente orgânico e a água em evaporador rotatório até obtenção de um volume final de 10 mL, resultando em uma suspensão de nanocápsulas com concentração de 0,5 mg/mL para ambas as substâncias ativas. Foram preparados 3 lotes para a formulação, os quais foram completamente caracterizados em triplicata. Também foram preparadas nanocápsulas brancas, sem a adição das substâncias ativas. Para a posterior produção dos pós, quando necessário, foi realizada a preparação de volumes maiores da suspensão, mantendo a mesma proporção de todos os componentes.

4.3.2.2 Preparação dos pós através da secagem por aspersão

As suspensões de nanocápsulas foram secas no Mini Spray-Dryer Büchi B-290, seguindo os parâmetros propostos por Hoffmeister e colaboradores (2012) com algumas adaptações. Foi adicionada uma concentração de 5% (p/v) de lactose como adjuvante de secagem, às suspensões de nanocápsulas, que foram mantidas em agitação magnética por 10 minutos até a completa dispersão da lactose. A seguir a amostra foi levada ao Mini Spray Dryer para a secagem, empregando os seguintes parâmetros: temperatura de entrada 120 °C, fluxo de amostra igual a 5,45 mL por minuto, fluxo de ar igual a 600 L por minuto e temperatura de saída entre 61 a 66 °C. Foram preparados três lotes da formulação, que foram caracterizados em triplicata. Formulações sem a adição de ácido cumárico e cumarina também foram preparadas.

4.3.2.3 Caracterização das suspensões de nanocápsulas

4.3.2.3.1 Determinação do perfil granulométrico por difração de laser

O perfil granulométrico das nanocápsulas foi determinado por difração de laser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). As amostras foram colocadas diretamente na unidade de dispersão por via úmida do equipamento, sem tratamento prévio.

O índice de refração utilizado para as análises foi igual a 1,140 e a obscuração obtida para todas as amostras ficou entre 2 a 2,5%. Os resultados de tamanho das partículas (μm) foram expressos em volume (%) e foram avaliados os seguintes parâmetros: D4,3 e Span. Essa técnica é utilizada para garantir que o tamanho de partícula das formulações apresenta-se em escala submicrométrica (VENTURINI *et al.*, 2011).

4.3.2.3.2 Tamanho das partículas, índice de polidispersão e potencial zeta

O tamanho das partículas e o índice de polidispersão foram determinados a 25 °C por espectroscopia de correlação de fótons (Zetasizer Nano ZS Malvern Instruments), após a diluição prévia das nanopartículas com água ultrapura (1:500). Os valores de potencial zeta foram estimados com base na mobilidade eletroforética utilizando o mesmo equipamento, a 25 °C, após a diluição (1:500) das amostras em uma solução aquosa de cloreto de sódio a 10 mM.

4.3.2.3.3 Determinação do pH

O pH das formulações foi determinado utilizando um potenciômetro DM22 – (Digimed, Campo Grande – SP, Brasil), previamente calibrado com solução tampão pH 4,0 e 7,0. As medidas foram realizadas em triplicata diretamente na suspensão, sendo o resultado correspondente a média das três repetições para cada lote.

4.3.2.3.4 Análise morfológica das nanocápsulas

A análise foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão, utilizando o microscópio JEM 1200 ExII (JEOL, Japão) a 120 Kv, no Centro de Microscopia da UFRGS. Para esta análise, as suspensões foram diluídas em água ultrapura (1:10 v/v) e colocadas em grids de cobre com revestimento carbono-formvarm. Uma solução de acetato de uranila (2% p/v) foi utilizada como um contraste.

4.3.2.3.5 Doseamento e eficiência de encapsulação

O doseamento da cumarina e do ácido cumárico nas nanocápsulas foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando o método validado descrito no capítulo 1 desta dissertação. A fase móvel foi composta de acetonitrila/água acidificada com 0,1% de ácido acético (v/v), na proporção (40:60 v/v), sob um fluxo de 1 mL/min, o volume de injeção foi de 20 µL, e o comprimento de onda utilizado para detecção foi de 275 nm. A suspensão de nanocápsulas foi diluída a uma concentração teórica equivalente ao ponto médio da curva analítica (15 µg/mL).

Para a determinação da eficiência de encapsulação a concentração total das moléculas ativas foi determinada da mesma forma que os demais doseamentos. Entretanto, a fração não encapsulada foi determinada utilizando a técnica de Ultrafiltração-centrifugação. Uma alíquota da amostra foi colocada em Ultrafree 10,000 MW (Millipore, Billerica – MA, EUA) e centrifugada a 6000 rpm por 10 minutos. Após, a quantidade de substância não encapsulada foi determinada pela injeção do ultrafiltrado no sistema cromatográfico, conforme método descrito no Capítulo 1. A determinação da eficiência de encapsulação foi calculada pela diferença entre as concentrações de ácido cumárico e cumarina total e livre (ultrafiltrada) (VENTURINI *et al.*, 2011).

4.3.2.4 Caracterização dos pós de nanocápsulas

4.3.2.4.1 Rendimento

O rendimento do processo de secagem foi calculado pela razão entre o peso obtido experimentalmente, após a secagem, e a soma dos pesos de todos os componentes sólidos da formulação. Os resultados foram expressos em porcentagem e representam a média de três lotes.

4.3.2.4.2 Análise morfológica e determinação do tamanho das partículas

A análise morfológica das partículas, quanto a forma e superfície, foi realizada por microscopia eletrônica de varredura a 10 kV. Para isso as amostras foram previamente metalizadas com ouro e fixadas em stubs de alumínio. Esse experimento foi realizado no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS utilizando o microscópio (JEOL JSM-6060, Japão). As imagens foram analisadas utilizando o software ImageJ (versão 1.44u), a fim de determinar a distribuição de tamanho das partículas e o seu diâmetro médio. Para isso foram contadas e medidas em torno de 300 a 350 partículas.

4.3.2.4.3 Estudo de desaglomeração

O tamanho médio das partículas após a redispersão em água foi analisado por difração de raio laser utilizando o equipamento Mastersizer® 2000, usando a mesma técnica de monitorização do tamanho, descrita no item 4.3.2.3.1. Os resultados foram expressos como diâmetro médio de partícula (em número) após 2 h.

4.3.2.4.4 Doseamento do ácido cumárico e da cumarina nos pós

Uma alíquota de 0,13 g de pó foi pesada, transferida para um balão volumétrico de 5 mL e colocada em contato com o solvente extrator (acetoneitrila)

durante 30 minutos. A seguir a amostra foi sonicada por 40 minutos e posteriormente centrifugada a 3600 rpm durante 15 minutos. Foi realizada uma nova diluição para se obter uma concentração teórica equivalente ao ponto médio da curva analítica (15 µg/mL). Uma alíquota foi filtrada e transferida para um vial e analisada por CLAE, seguindo os mesmos parâmetros do doseamento da LNC. Previamente, foi validado o método de extração para o pó.

4.3.2.4.5 Perda por dessecação para os pós

A determinação da perda por dessecação foi baseada nos parâmetros descritos na Farmacopeia Brasileira – 5ª edição (2010). Foram pesados 1 g de pó em uma termo balança por infravermelho (MB25 - OHAUS), a amostra foi aquecida a 105 °C durante 5 minutos, o percentual de umidade foi calculado pelo equipamento pela diferença entre massa final (anidra) e a massa inicial.

4.4 Resultados e discussão

4.4.1 Desenvolvimento das suspensões de nanocápsulas contendo cumarina e ácido cumárico

A seleção das matérias primas utilizadas na preparação das nanocápsulas foi baseada no trabalho de Coradini e colaboradores (2014), onde foi relatada a co-encapsulação da curcumina e do resveratrol em nanocápsulas de núcleo lipídico, utilizado como material oleoso, o óleo de semente de uva para formação do núcleo da partícula. Após a preparação as formulações apresentaram aspecto homogêneo branco leitoso com efeito tyndall, característico de sistemas coloidais. As suspensões que foram preparadas em triplicata e caracterizadas conforme será discutido a seguir.

4.4.1.1 Tamanho das partículas, índice de polidispersão e potencial zeta

Conforme descrito no item 4.3.2.3.1 da metodologia, para assegurar que apenas partículas submicrométricas estavam presentes nas formulações, as

suspensões foram inicialmente analisadas por difração de raio laser (LD), já que esta técnica pode detectar a presença de nano e micropartículas. Os perfis granulométricos das formulações apresentaram distribuição de tamanho monomodal em escala nanométrica, sem partículas micrométricas (Figura 5). A Tabela 9 mostra os diâmetros médios e valores de Span para cada formulação.

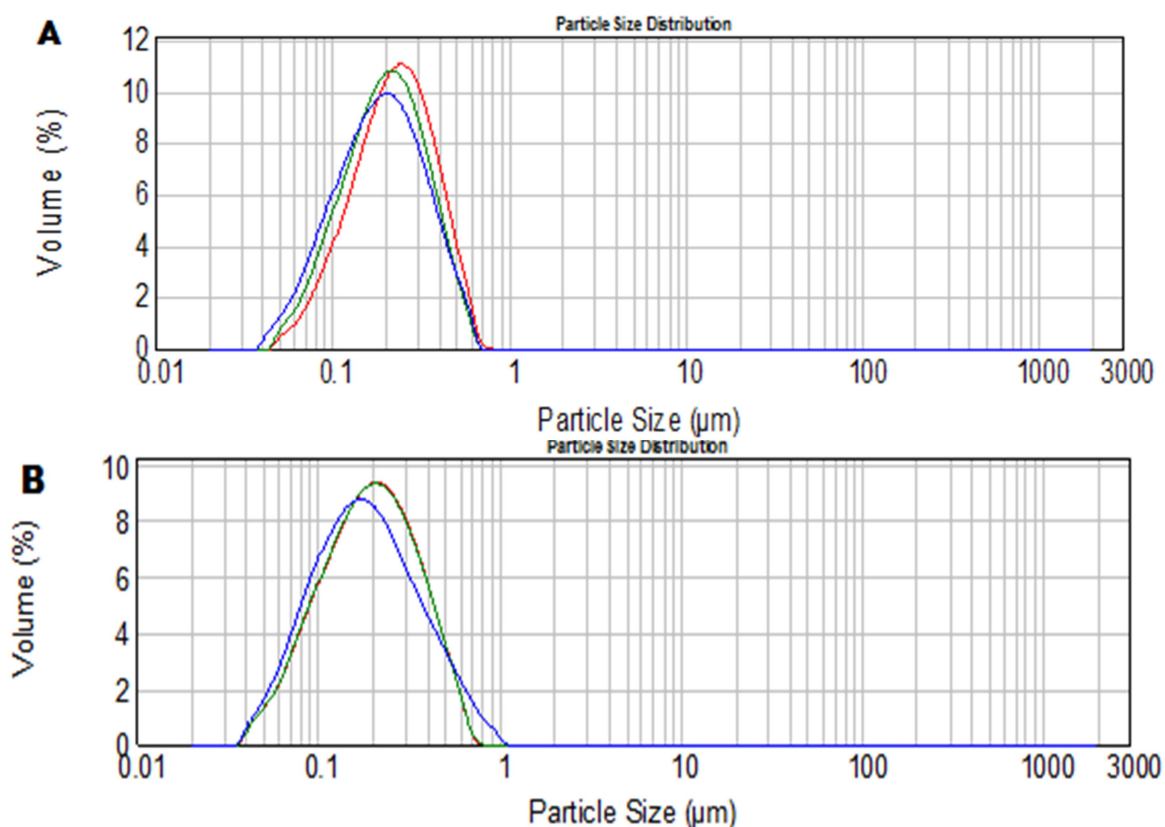


Figura 5 — Distribuição de tamanho das partículas por volume, obtida por difração de laser (n=3). **A**: LNC sem fármaco (LNC Br); **B**: LNC contendo ácido cumárico e cumarina (LNC ACC).

Fonte: Próprio autor (2015).

Tabela 9 — Diâmetro médio e Span das suspensões de LNC, obtidas por difração de laser.

Amostra (n = 3)	D [4,3] (nm)	Span
	Difração de laser	
LNC Br	228 ± 17,47	1,50 ± 0,10
LNC ACC	225 ± 1,00	1,82 ± 0,21

Fonte: Próprio autor (2015).

Analisando os dados da tabela acima, é possível verificar que pela técnica de difração de raio laser, as nanocápsulas brancas apresentaram um diâmetro médio de $228 \pm 17,47$ nm. Enquanto que as nanocápsulas contendo as substâncias ativas exibiram um diâmetro médio de $225 \pm 1,00$ nm. A proximidade entre os diâmetros das nanocápsulas com e sem os fármacos permite concluir que esta concentração de substâncias ativas encapsuladas não interfere no tamanho das partículas. Em trabalho realizado por Venturini e colaboradores (2011) visando a otimização na produção de nanocápsulas de núcleo lipídico, ficou comprovado que os parâmetros que mais interferem no diâmetro das partículas são a natureza e concentração do óleo utilizado na fase orgânica bem como a concentração de polímeros utilizada. O estudo demonstrou que o uso de alta concentração de polímero na fase orgânica, leva à formação de uma pequena população micrométrica de cápsulas, provavelmente devido ao aumento da viscosidade da solução de acetona.

Quanto aos valores de Span obtidos pela técnica de difração de raio laser, foi possível verificar que a distribuição de tamanho tanto para as suspensões sem adição de ativos, quanto aquelas contendo as duas substâncias ativas, apresentam uma distribuição relativamente homogênea para as populações de partículas (HOFFMEISTER *et al.*, 2012). O valor do Span é um indicativo da amplitude da distribuição granulométrica, uma vez que quanto menor os valores de Span, mais estreita é a distribuição, ou seja, menor será a faixa de tamanho das partículas (dos SANTOS *et al.*, 2012).

O diâmetro das partículas também foi analisado através da técnica de espectroscopia de correlação de fótons (PCS). Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 10 e na Figura 6. As suspensões de nanocápsulas brancas apresentaram um diâmetro médio de $95 \pm 0,36$ nm, ao passo que as formulações contendo as substâncias ativas apresentaram um diâmetro médio de $102 \pm 0,74$ nm. A formulação branca apresentou índice de polidispersão igual a $0,087 \pm 0,019$, enquanto que aquela contendo ácido cumárico e cumarina mostrou um índice de polidispersão igual a $0,124 \pm 0,009$. Os valores obtidos para índices de polidispersão inferiores a 0,15 confirmam uma distribuição de tamanho estreita (CORADINI *et al.*, 2014). Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 10 e na Figura 6.

Tabela 10 — Diâmetro médio e índice de polidispersão das suspensões de LNC, obtidas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS, n=3).

Amostra (n = 3)	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão (PDI)
LNC branca	95 ± 0,36	0,087 ± 0,019
LNC ácido cumárico + cumarina	102 ± 0,74	0,124 ± 0,009

Fonte: Próprio autor (2015).

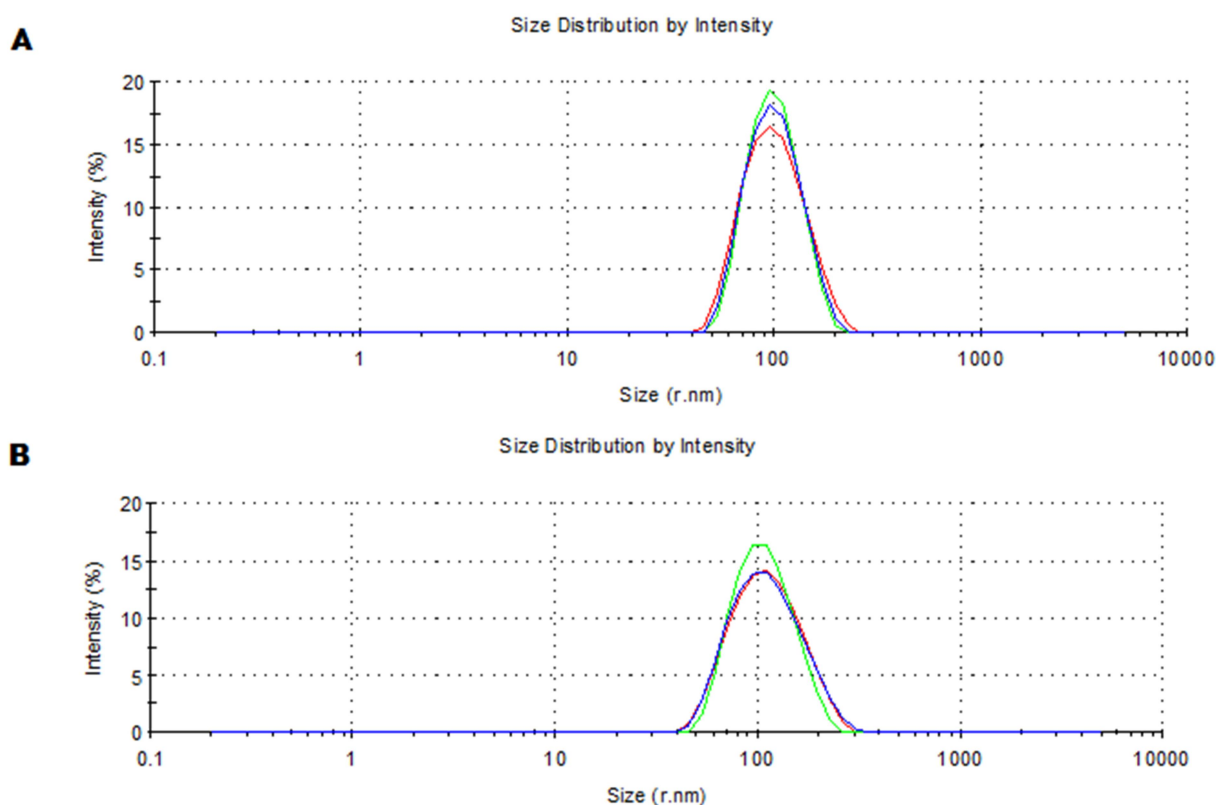


Figura 6 — Distribuição de tamanho das partículas, obtida por espectroscopia de correlação de fótons (n=3). **A**: LNC Br; **B**: LNC ACC.

Fonte: Próprio autor (2015).

Ainda, foi estimado o potencial zeta para as formulações, com base na mobilidade eletroforética das suspensões de nanocápsulas. A formulação sem as substâncias ativas apresentou um potencial zeta igual a $-8,13 \pm 0,10$ mV, à medida que a suspensão contendo ácido cumárico e cumarina exibiu um potencial zeta igual a $-6,58 \pm 0,10$ mV.

O potencial zeta pode assumir valores positivos ou negativos e reflete o potencial elétrico da superfície, estando diretamente ligado à estabilidade das partículas, assim quanto mais distanciado de zero, melhor é a estabilidade física do sistema (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; dos SANTOS *et al.*, 2012). Os valores de potencial zeta obtidos neste trabalho estão próximos aos relatados por CORADINI e colaboradores (2014), que encapsularam dois polifenóis em uma mesma partícula. Os autores relatam que, apesar de terem obtido valores de potencial zeta próximos da neutralidade em suas formulações, as partículas apresentaram estabilização estérica devido à presença de um polímero não iônico na interface partícula / água.

4.4.1.2 Determinação do pH

Além da caracterização em termos de tamanho de partícula, distribuição de tamanho (índice de polidispersão) e potencial zeta, foi determinado o pH das formulações. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 11.

Tabela 11 — pH das suspensões de nanocápsulas com e sem as substâncias ativas

Amostra (n=3)	pH
LNC Br	6,18 ± 0,06
LNC ACC	4,42 ± 0,02

Fonte: Próprio autor (2015).

O pH fornece informações relevantes sobre a estabilidade de suspensões. Um aumento da acidez, em função do tempo, indica que pode estar ocorrendo degradação dos componentes, principalmente do polímero (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; GUTERRES *et al.*, 2007). Analisando os resultados da Tabela 11, é possível perceber que o pH da suspensão LNC Br apresentou valor próximo da neutralidade, enquanto que o pH da suspensão LNC ACC apresentou valor um pouco mais ácido, isso pode ser explicado devido a presença do ácido cumárico na formulação.

4.4.1.3 Análise morfológica das nanocápsulas

O tamanho das partículas é um dos aspectos mais importantes a serem controlados no desenvolvimento de nanopartículas. A microscopia eletrônica de transmissão além de permitir visualizar a morfologia das partículas é útil para fornecer ideia do tamanho da partícula. Trabalho realizado por dos SANTOS e colaboradores (2012), relatou que observando as imagens obtidas pela microscopia, é possível visualizar nanopartículas, com tamanhos na mesma ordem de grandeza dos valores obtidos pelos métodos de PCS e LD. A Figura 7 apresenta imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão para as nanocápsulas brancas e com as substâncias ativas.

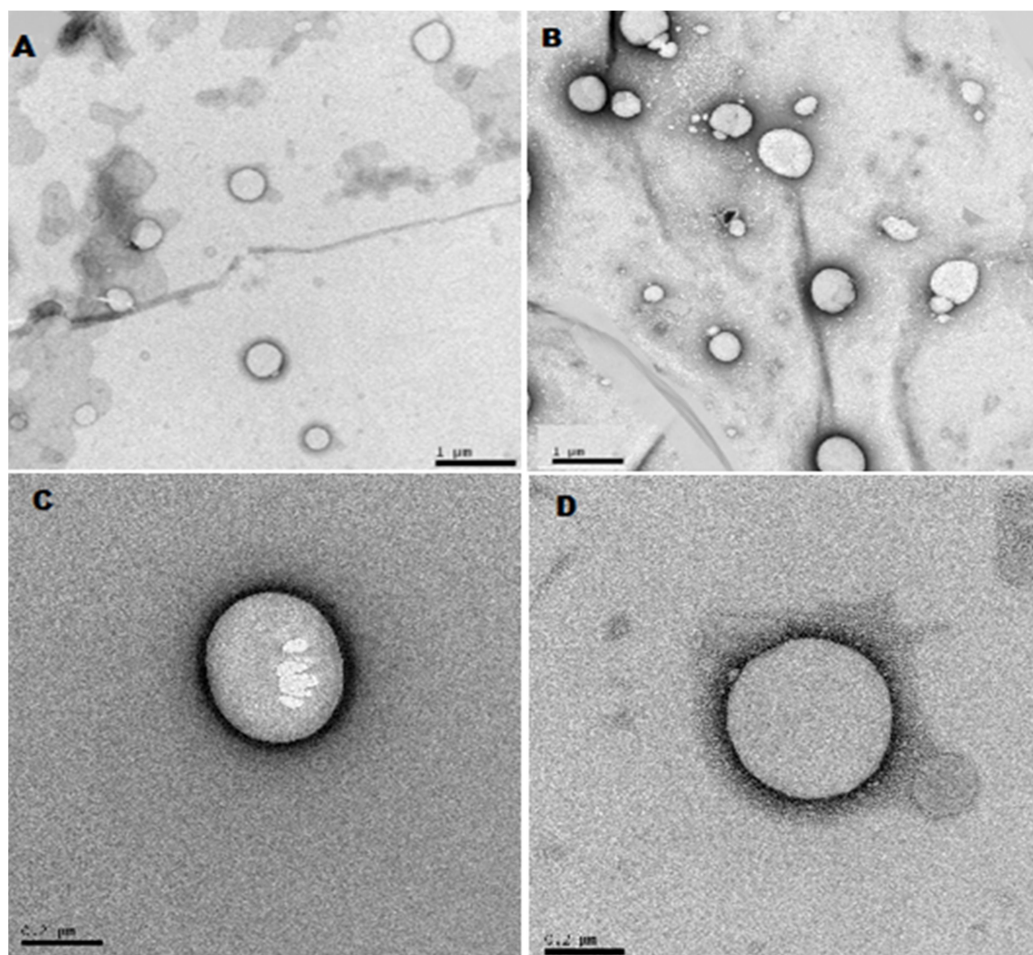


Figura 7 — Microscopia Eletrônica de Transmissão. **A:** LNC Br; **B:** LNC ACC [barra = 1 µm (20.000X)]. **C:** LNC Br; **D:** LNC ACC [barra = 0,2 µm (100.000X)].

Fonte: Próprio autor (2015).

4.4.1.4 Doseamento e eficiência de encapsulação

As nanocápsulas de núcleo lipídico contendo os fármacos apresentaram teores de $94,27 \pm 1,37\%$ e $85,48 \pm 3,43\%$ para ácido cumárico e cumarina respectivamente. DRAGOJEVIC e colaboradores (2011) relatam a falta de estudos sistemáticos para avaliação da estabilidade de cumarinas em meio aquoso e demonstram a degradação de dímeros de cumarinas em solução aquosa. A leve redução no teor de cumarina nas nanocápsulas pode ser indício de pequena degradação em suspensão aquosa. A eficiência de encapsulação foi igual a $55,71 \pm 0,35\%$ para o ácido cumárico e $51,00 \pm 0,5\%$ para cumarina.

4.4.2 Caracterização dos pós de nanocápsulas

4.4.2.1 Rendimento

As suspensões foram submetidas à secagem por aspersão utilizando lactose como adjuvante de secagem, para obtenção de pós, produtos intermediários com melhor estabilidade físico-química do que as suspensões. O rendimento do processo de secagem para as formulações brancas (LNC-SD) e para as formulações contendo as substâncias ativas (LNC ACC-SD) foi calculado por diferença de massa entre os valores teórico e experimental. Os resultados obtidos para o rendimento estão demonstrados na Tabela 12.

Tabela 12 — Rendimento do processo de secagem para as suspensões.

Amostra (n=3)	Rendimento do processo (%)
LNC-SD	$63,20 \pm 2,60$
LNC ACC-SD	$57,93 \pm 5,52$

Fonte: Próprio autor (2015).

Os valores de rendimento obtidos neste trabalho estão próximos aos rendimentos obtidos em trabalhos prévios, que utilizaram a lactose como adjuvante de secagem. Hoffmeister e colaboradores (2012) relataram rendimentos de $52 \pm 8\%$ no processo de secagem de suspensões de nanocápsulas contendo melatonina. Por

outro lado, OURIQUE e colaboradores (2014) obtiveram rendimentos próximos a 70% para o processo de secagem de lipossomas contendo N-acetilcisteína.

4.4.2.2 Análise morfológica e distribuição de tamanho das partículas

A Figura 4.4 mostra as fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para os pós de nanocápsulas brancas (LNC-SD) e com fármaco (LNC ACC-SD). A secagem por aspersão resulta em partículas de forma esférica uniforme (OLIVEIRA & PETROVICK, 2009). Em trabalhos prévios publicados pelo nosso grupo de pesquisa, a análise morfológica dos pós por microscopia eletrônica de varredura demonstrou que as partículas apresentavam forma esférica após o processo de secagem (BECK *et al.*, 2008; DOMINGUES *et al.*, 2008; HOFFMEISTER *et al.*, 2012; OURIQUE *et al.*, 2014).

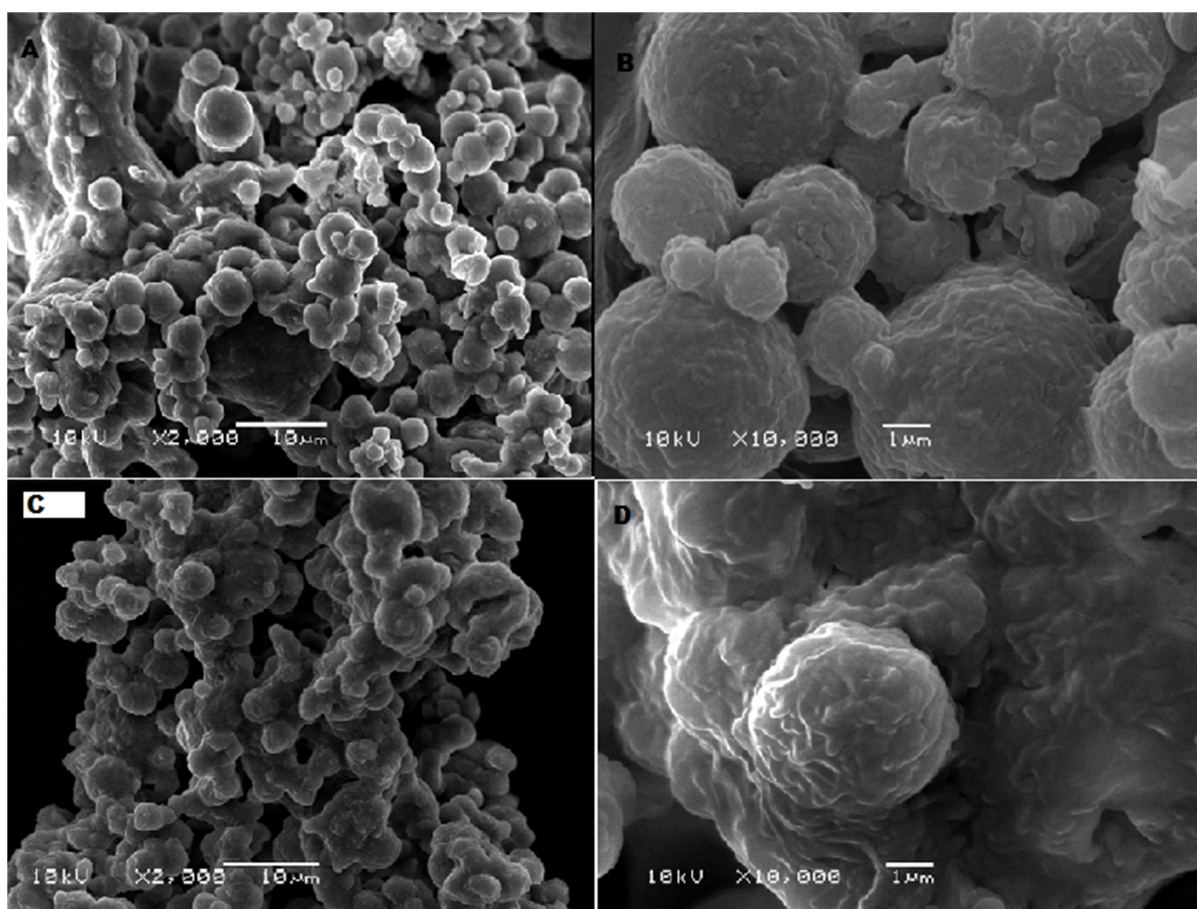


Figura 8 — Microscopia Eletrônica de Varredura. **A:** LNC-SD (2000 X); **B:** LNC-SD (10000 X). **C:** LNC ACUM-SD (2000 X); **D:** LNC ACUM-SD (10000 X).

Fonte: Próprio autor (2015).

Analisando as fotomicrografias obtidas no aumento de 10000 X, é possível visualizar a presença de microaglomerados esféricos com superfície irregular. Beck e colaboradores (2006 e 2008) e posteriormente Domingues e colaboradores (2008) produziram micropartículas nanorrevestidas e relataram que micropartículas revestidas com nanopartículas geralmente apresentam superfície irregular. A partir desses dados é possível inferir que parte das nanocápsulas contendo as substâncias ativas podem estar adsorvidas sobre a superfície da micropartícula (Figura 9). Tewa-Tagne e colaboradores (2007) relataram que as nanocápsulas também podem estar dentro da matriz de lactose.

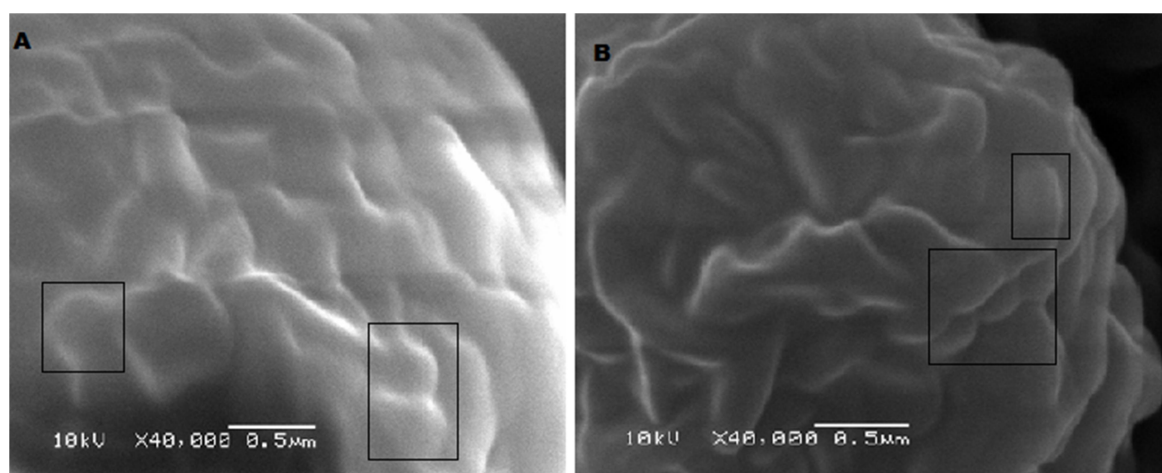


Figura 9 — Fotomicrografia da superfície das micropartículas revestidas com nanocápsulas (40000 X). Sugere-se que áreas destacadas indicam a presença de nanocápsulas.

Fonte: Próprio autor (2015).

Além disso, a partir das imagens obtidas por microscopia de varredura, foi determinado o tamanho das partículas utilizando o software ImageJ (versão 1.44u). Os resultados são exibidos na Tabela 13 e Figura 10.

Tabela 13 — Distribuição de tamanho das partículas.

Amostra	D _{0,1} (μm)	D _{0,5} (μm)	D _{0,9} (μm)	D _{IM} (μm)	PDI
LNC-SD	0,44	2,81	6,06	2,80 ± 1,34	0,05
LNC ACC-SD	0,47	2,74	5,95	2,79 ± 0,94	0,34

Fonte: Próprio autor (2015).

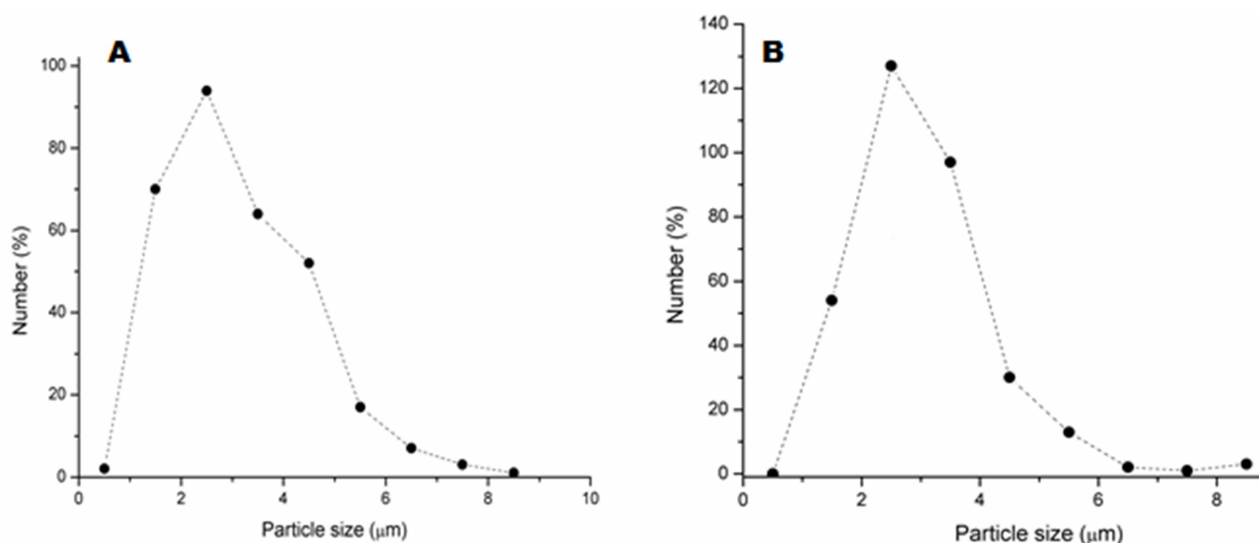


Figura 10 — Distribuição de tamanho das partículas obtida pelas imagens de MEV. **A:** LNC-SD; **B:** LNC ACC-SD.

Fonte: Próprio autor (2015).

Analisando os valores demonstrados na Tabela 13 pode-se verificar que os pós obtidos a partir das nanocápsulas brancas apresentaram um diâmetro médio de $2,80 \pm 1,34 \mu\text{m}$, enquanto que aqueles contendo as substâncias ativas exibiram um diâmetro médio igual a $2,79 \pm 0,94 \mu\text{m}$. Os baixos valores de índice de polidispersão obtidos ($0,05$ para LNC-SD e $0,34$ para LNCACUM-SD) demonstram uma estreita faixa de distribuição de tamanho, indicando um produto pulverulento homogêneo. Além disso, dados da literatura relatam que diâmetros aerodinâmicos entre 1 e $5 \mu\text{m}$ são ideais para uma deposição eficiente na região alveolar (BAILEY & BERKLAND, 2009; PATTON & BYRON, 2007; MUSANTE *et al.*, 2002). Desta maneira, é possível sugerir que os pós obtidos podem potencialmente úteis para administração intrapulmonar de fármacos. Entretanto, experimentos adicionais deverão ser conduzidos para confirmar os diâmetros aerodinâmicos dos pós desenvolvidos neste estudo.

4.4.2.3 Estudos de desaglomeração

Para se avaliar o perfil de desaglomeração das partículas, uma amostra da formulação branca (LNC-SD) foi analisada no equipamento Mastersizer 2000[®] por via úmida e o diâmetro foi medido em tempos pré-determinados. Posteriormente as

amostras contendo as substâncias ativas (LNCACUM-SD, n=3) foram analisadas da mesma forma, a fim de verificar sua redispersão em água.

A partir deste estudo foi possível observar uma desaglomeração muito lenta ou quase inexistente dos agregados micrométricos após 2 horas, podendo se observar apenas a presença de populações micrométricas, mesmo a lactose sendo um suporte de secagem hidrossolúvel que possibilitaria uma fácil redispersão das partículas em água (GUTERRES *et al.*, 2009). Esse fato é um indicio da necessidade de uma possível adaptação na formulação, como a adição de um agente formador de poros (GAD *et al.*, 2012; PATEL & CHEN 2008; CRUZ *et al.*, 2011). Os resultados do estudo de redispersão estão demonstrados na Tabela 14 e Figura 11.

Tabela 14 — Distribuição de tamanho das partículas (por número) após 2h.

Amostra (n=3)	D0,1 (µm)	D0,5 (µm)	D0,9 (µm)	SPAN	D [4,3] (µm)
LNC ACC- SD	1,21 ± 0,05	1,74 ± 0,13	3,45 ± 0,53	1,28 ± 0,20	8,18 ± 2,62

Fonte: Próprio autor (2015).

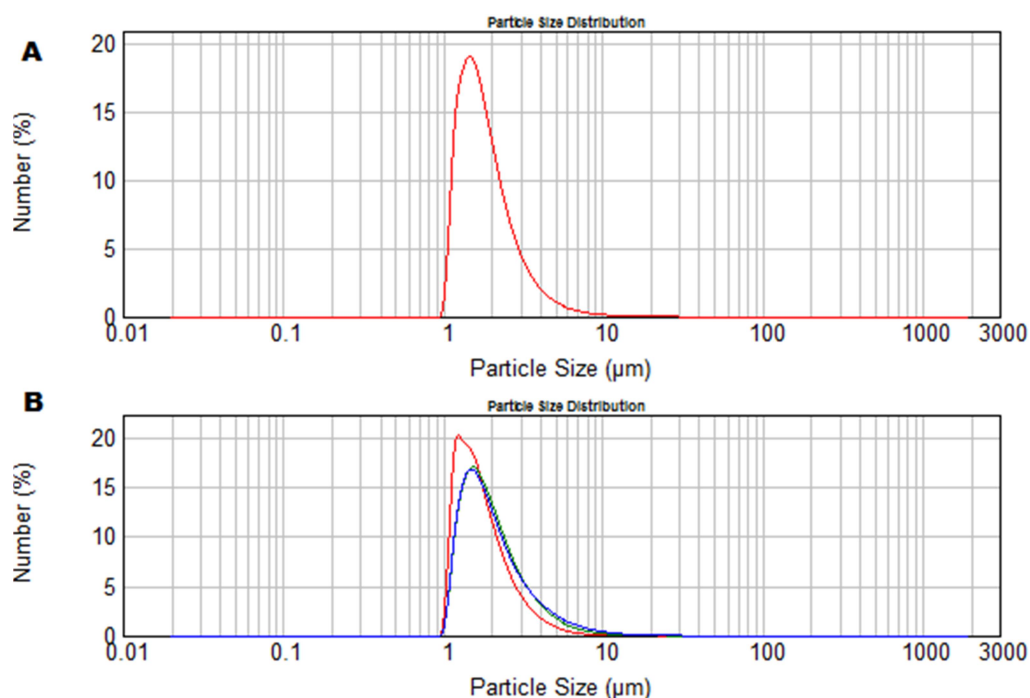


Figura 11 — Distribuição de tamanho das partículas (µm) por número (%) após 2h. **A:** LNC-SD; **B:** LNC ACC-SD.

Fonte: Próprio autor (2015).

O diâmetro médio da formulação LNC ACC-SD após duas horas de desaglomeração foi igual a $8,18 \pm 2,62 \mu\text{m}$ com valor de Span de $1,28 \pm 0,20$ indicando uma distribuição de tamanho relativamente homogênea. Enquanto que a formulação LNC-SD apresentou um diâmetro médio de $9,76 \mu\text{m}$ e Span igual a 1,117.

4.4.2.4 Perda por dessecação para os pós

Os resultados obtidos para a perda por dessecação dos pós estão exibidos na Tabela 15.

Tabela 15 — Perda por dessecação obtida para os pós.

Amostra	Perda por dessecação (%)
LNC-SD	1,00
LNC ACC-SD	$1,08 \pm 0,14$

Fonte: Próprio autor (2015).

Os resultados obtidos para perda por dessecação indicam que as suspensões de nanocápsulas foram secas eficientemente, visto que os pós apresentaram teor de umidade inferior a 2%.

4.4.2.5 Doseamento de ácido cumárico e cumarina nos pós

Previamente à determinação do teor de ácido cumárico e cumarina nos pós de nanocápsulas, foi validado um método para sua extração dos pós. A metodologia de extração foi baseada no trabalho realizado por Fontana e colaboradores (2014), onde os autores dissolveram a formulação em acetonitrila e sonicaram a amostra durante uma hora.

Foram realizadas pequenas adaptações nessa metodologia. Inicialmente o pó foi deixado em contato com o solvente por meia hora, a seguir a amostra foi sonicada durante 40 minutos, posteriormente centrifugada a 3600rpm por 15

minutos. O sobrenadante foi coletado e diluído a uma concentração teórica de 15 µg/mL, filtrado em membrana hidrofílica de 0,45 µm para vials e analisado em cromatógrafo líquido de alta eficiência seguindo os mesmos parâmetros descritos no capítulo 1 dessa dissertação.

Foi observado um teor de $97,02 \pm 2,54$ para o ácido cumárico e $16,82 \pm 0,52\%$ para cumarina. O doseamento demonstrou não haver perda de ácido cumárico durante o processo de secagem, porém houve uma redução drástica no teor de cumarina. Radünz e colaboradores (2012) avaliaram o rendimento extrativo de cumarina em folhas de guaco submetidas a diferentes temperaturas de secagem. Os autores constataram elevada perda no teor de cumarina durante a secagem com ar aquecido a 80°C e concluíram que esta perda pode ser explicada devido a sua desnaturação, visto que temperatura atingida na massa seca foi superior a temperatura de fusão na faixa de 68 a 70°C. Assim, podemos inferir que pode ter ocorrido a perda de teor da cumarina pelo mesmo motivo, já que a temperatura de saída na torre de secagem do Spray Dryer também foi muito próxima à temperatura de fusão da cumarina.

4.5 Conclusão

As suspensões de nanocápsulas obtidas pela deposição interfacial do polímero pré-formado apresentaram características físico-químicas nanotecnológicas que estão de acordo com o método e matérias primas utilizadas na elaboração de formulações similares. As nanocápsulas apresentaram distribuição de tamanho monomodal estrita, confirmada por baixos valores de índice de polidispersão.

Os pós de nanocápsulas obtidos a partir do método de secagem por aspersão empregando a lactose como adjuvante de secagem apresentaram bom rendimento e baixo teor de umidade, indicando sucesso na operação de secagem. Ainda, apresentaram distribuição de tamanho entre 1 e 5 µm, cuja faixa de diâmetro para esta técnica de secagem. O diâmetro médio obtido pelas imagens de microscopia, aplicando o software ImageJ foi de $2,80 \pm 1,34$ µm, estando dentro da faixa ideal de tamanho para adequada deposição pulmonar, umas das propostas para aplicação destes pós, devido as propriedades farmacológicas do ácido cumárico e da cumarina.

Entretanto, o doseamento revelou uma drástica redução no teor da cumarina após a operação de secagem, por esse motivo foi descartada a viabilidade de aplicação pulmonar dos pós contendo cumarina e ácido cumárico a partir da técnica proposta. Por outro lado, a literatura relata possíveis vias de administração das próprias das suspensões de nanocápsulas, que apresentaram propriedades físico-químicas adequadas ao perfil nanotecnológico e poderiam ser futuramente utilizadas para desenvolvimento de formulações tópicas espessadas com agentes gelificantes.

5 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO CONTENDO ÁCIDO CUMÁRICO E DO SEU RESPECTIVO PÓ SECO POR ASPERSÃO

5.1 Introdução e objetivos

A administração pulmonar de nanopartículas terapêuticas tem ganhado importância devido ao seu potencial em melhorar a biodisponibilidade. Fato atribuído à capacidade única de nanopartículas de fugir da fagocitose e dos mecanismos de depuração mucociliar nos pulmões (WANG *et al.*, 2012).

A secagem por aspersão é uma técnica comumente usada para produzir pós com propriedades adequadas para administração pulmonar, a partir de soluções, emulsões ou suspensões. Neste contexto, o objetivo deste capítulo foi produzir e caracterizar suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo ácido cumárico, bem como secar por aspersão as suspensões, caracterizar os pós resultantes e propor a administração destes pós pela via pulmonar.

5.2 Revisão bibliográfica

5.2.1 Nanotecnologia e nanocápsulas de núcleo lipídico

A nanotecnologia tem emergido rapidamente como um importante campo de pesquisa. Dessa forma, seu emprego tem sido proposto como uma estratégia no desenvolvimento de nanopartículas para a administração, a liberação e a vetorização de fármacos em sítios específicos de ação (GUTERRES, 2007).

Dentre os tipos de nanopartículas, tem se destacado a produção de nanocápsulas de núcleo lipídico. Estas são compostas por uma dispersão de monoestearato de sorbitano e um material oleoso, formando um núcleo, envolto por uma parede polimérica.

5.2.2 Secagem por aspersão

A secagem por aspersão é uma técnica frequentemente utilizada na indústria farmacêutica e de alimentos visando a microencapsulação de polifenóis e outros compostos termolábeis (SAIKIA *et al.*, 2015). Nesta técnica a amostra contendo as substâncias de interesse é atomizada e as gotículas são rapidamente secas numa câmara aquecida, originados produtos pulverulentos com distribuição de tamanho homogênea (HASSAN & LAU, 2010).

5.2.3 Via de administração pulmonar

O pulmão é um órgão diretamente acessível a partir do exterior. Assim, a terapia de inalação representa uma via de aplicação atrativa para a administração direcionada de medicamentos. A aplicação local de agentes terapêuticos no aparelho respiratório tem várias vantagens sobre outras vias de administração, como o aumento da seletividade, concentração local elevada e uma menor exposição sistêmica. Por isso emergiu como uma abordagem prevalente no tratamento de doenças respiratórias (BECK-BROICHSITTER *et al.*, 2011).

A inalação também representa uma via alternativa não invasiva para a administração sistêmica de fármacos. O epitélio pulmonar possui uma atividade enzimática mais baixa em comparação com a via oral, grande área superficial alveolar e sua fina barreira de contato ar-sangue, permite uma rápida absorção de macromoléculas a partir dos alvéolos (PATTON & BYRON, 2007).

Atualmente a pesquisa tem alcançado grandes progressos no desenvolvimento de tecnologias de administração pulmonar de medicamentos, tanto em termos de design de inaladores como em avanços no desenvolvimento de partículas. Aerossóis terapêuticos são modalidades de tratamento eficazes para doenças respiratórias locais como asma brônquica, doença pulmonar obstrutiva crônica ou hipertensão (BECK-BROICHSITTER *et al.*, 2012).

A deposição de partículas nos pulmões ocorre através de três mecanismos: impactação inercial, sedimentação, ou difusão. Partículas maiores do que 10 µm de diâmetro são geralmente sujeitas a impactação inercial na região da faringe e da sedimentação na região brônquica, nestes locais o efeito terapêutico sistêmico é

pequeno. Por outro lado, partículas com diâmetros substancialmente menores que 1 μm , são mais prováveis de alcançar a região alveolar, mas não são suscetíveis a deposição e são exaladas. Já as partículas com diâmetros aerodinâmicos entre 1 e 5 μm não sofrem deposição na boca e garganta e eficientemente se depositam na região alveolar (BAILEY & BERKLAND, 2009; PATTON & BYRON, 2007; MUSANTE *et al.*, 2002).

Apesar de sua grande área superficial, conforme mencionado anteriormente, o trato respiratório fornece barreiras substanciais que precisam ser ultrapassadas para uma aplicação pulmonar bem sucedida, essas barreiras correspondem ao muco e enzimas catabólicas na região traqueobrônquica e macrófagos na região alveolar. Nanopartículas são capazes de fugir dos mecanismos de depuração mucociliar e fagocíticos resultando em maior permanência do fármaco no pulmão e consequente aumento da biodisponibilidade (WANG *et al.*, 2012).

A este respeito, nano-carreadores poliméricos oferecem novos conceitos para o desenvolvimento de ferramentas terapêuticas otimizadas em pesquisa pulmonar. Por isso são geralmente preferidos como sistemas de liberação pulmonar controlada devido a sua retenção prolongada no pulmão (BECK-BROICHSITTER *et al.*, 2012).

Muitos trabalhos têm desenvolvido micropartículas carregadas com nanopartículas para aplicação pulmonar. Al-Qadi e colaboradores (2011) desenvolveram microesferas carregadas com nanopartículas de polissacarídeo para administração pulmonar, utilizando manitol como adjuvante de secagem. Os resultados indicaram que o sistema desenvolvido tem um grande potencial para entrega de macromoléculas no pulmão, tais como proteínas e ácidos nucleicos.

Gad e colaboradores (2012) produziram partículas nanoestruturadas de ácido para-amino-salicílico, secas por aspersão para administração pulmonar. Esses sistemas mostraram potencial para a entrega pulmonar, podendo ser utilizadas para o tratamento de tuberculose.

Ainda, Wu e colaboradores (2013) elaboraram partículas de multifuncionais de tacrolimus secas por aspersão para inalação. As formulações apresentam um grande potencial para entrega de drogas imunossupressoras diretamente no trato pulmonar de pacientes com transplante de pulmão, reduzindo significativamente os seus efeitos colaterais sistêmicos.

5.3 Materiais e métodos

A parte de materiais e métodos descrita nesse capítulo segue aquela descrita no segundo capítulo dessa dissertação, porém foram produzidas formulações contendo apenas o ácido cumárico.

5.3.1 Materiais

5.3.1.1 Matérias primas

- Ácido *para*-cumárico (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil);
- Cumarina (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil);
- Lactose (LH 201, DFE Pharma, Borculo, Países Baixos);
- Monoestearato de sorbitano – Span 60® (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil);
- Óleo de semente de uva (Delaware, Porto Alegre – RS, Brasil);
- Polissorbato 80 – Tween 80® (Henrifarma, São Paulo – SP, Brasil);
- Poli (ϵ -caprolactona) Mn 80.000 Da (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil);

5.3.1.2 Solventes

- Acetonitrila grau CLAE (Tédia Brazil, Rio de Janeiro – RJ, Brasil);
- Acetona Acetona p.a. (Vetec, Duque de Caxias – RJ, Brasil);
- Água MilliQ® (Destilador/deionizador Milli-Q - Millipore, Billeria – MA, EUA);
- Ácido acético glacial p.a. (LabSynth, Diadema – SP, Brasil);

5.3.1.3 Aparelhos e equipamentos

- Balança analítica BEL Engineering (Piracicaba – SP, Brasil);
- Banho de aquecimento Multi Stirrer (Velp Scientifica – Nova Iorque, EUA);
- Centrífuga modelo 5417R (Eppendorff, São Paulo – SP, Brasil);

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) (Shimazu® - Tóquio, Japão):
 - Auto-injetor (LC-20A Prominence)
 - Detector UV-Vis
 - Bomba S-200
 - Software: Lab Solutions®
- Coluna Luna C18(2) 150 X 4,6 mm, 5 µm, 100A (Phenomenex, Torrance – CA, EUA);
- Evaporador rotatório Rotavapor®, RII (Büchi®, Flawil – Suíça);
- Lavadora ultrassônica Unique - 1400A Ultracleaner, (Unique, Indaiatuba - SP, Brasil);
- Mastersizer 2000® (Malvern Instruments - Worcestershire, Reino Unido);
- Microscópio Eletrônico de Varredura (Jeol JSM-6060, Tóquio, Japão);
- Microscópio Eletrônico de Transmissão JEM-1200 ExII (Jeol, Tóquio, Japão);
- Mini Spray Dryer Büchi B-290 (Büchi®, Flawil – Suíça);
- Potenciômetro DM 22 (Digimed, Campo Grande – SP, Brasil);
- Termo balança (analisador de umidade) MB25 OHAUS® (Heuwinkelstrasse – Suíça);
- Zetasizer ® modelo ZEN 3600 (Malvern instruments, Southborough - MA, EUA);

5.3.1.4 Outros materiais

- Filtros 0,45 µm (Millipore, Billeria – MA, EUA);
- Ultrafree-MC 10,000 MW (Millipore, Billeria – MA, EUA).

5.3.1.5 Outros materiais

- Filtros 0,45 µm (Millipore Millex-HV);
- Ultrafree-MC 10,000 MW (Millipore-EUA).

5.3.2 Métodos

5.3.2.1 Preparação das nanocápsulas contendo ácido cumárico

As nanocápsulas de núcleo lipídico foram preparadas pelo mesmo método descrito no segundo capítulo dessa dissertação. Para preparação da fase orgânica foram pesados 0,005 g de ácido cumárico; 0,0383 g de monoestearato de sorbitano e medidos 160 μ L de óleo de semente de uva. Estes componentes foram solubilizados em 27 mL de acetona durante uma hora em banho a 40 °C, a seguir a fase orgânica foi lentamente injetada sobre uma fase aquosa contendo 54 mL de água e 0,0766 g de polissorbatos 80. Posteriormente foram removidos o solvente orgânico e a água em evaporador rotatório até obtenção de um volume final de 10 mL, resultando em uma suspensão de nanocápsulas com concentração de 0,5 mg/mL de ácido cumárico. Foram preparados 3 lotes para a formulação, os quais foram completamente caracterizados em triplicata.

5.3.2.2 Preparação dos pós através da secagem por aspersão

Da mesma forma como descrito no segundo capítulo, as suspensões de nanocápsulas foram secas por aspersão. Às suspensões de nanocápsulas foi adicionada uma concentração de 5% (p/v) de lactose como adjuvante de secagem. Estas foram mantidas em agitação magnética por 10 minutos até a completa dispersão da lactose. A seguir a amostra foi levada ao Mini Spray Dryer Büchi B-290 para a secagem, empregando os seguintes parâmetros: temperatura de entrada 120 °C, fluxo de amostra igual a 5,45 mL por minuto, fluxo de ar igual a 600 L por minuto e temperatura de saída entre 61 a 66 °C.

5.3.2.3 Caracterização das suspensões de nanocápsulas

5.3.2.3.1 Determinação do perfil granulométrico por difração de laser

O perfil granulométrico das nanocápsulas foi determinado por difração de laser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). As amostras

foram colocadas diretamente na unidade de dispersão por via úmida do equipamento, sem tratamento prévio.

O índice de refração utilizado para as análises foi igual a 1,140 e a obscuração obtida para todas as amostras ficou entre 2 a 2,5%. Os resultados de tamanho das partículas (μm) foram expressos em volume (%) e foram avaliados os seguintes parâmetros: D4,3 e Span. Essa técnica é utilizada para garantir que o tamanho de partícula das formulações apresenta-se em escala submicrométrica (VENTURINI *et al.*, 2011).

5.3.2.3.2 Tamanho das partículas, índice de polidispersão e potencial zeta

O tamanho das partículas e o índice de polidispersão foram determinados a 25 °C por espectroscopia de correlação de fótons (Zetasizer Nano ZS Malvern Instruments), após a diluição prévia das nanopartículas com água ultrapura (1:500), da mesma forma como descrito no capítulo 2. Os valores de potencial zeta foram estimados com base na mobilidade eletroforética utilizando o mesmo equipamento, a 25 °C, após a diluição (1:500) das amostras em uma solução aquosa de cloreto de sódio a 10 mM.

5.3.2.3.3 Determinação do pH

O pH das formulações foi determinado utilizando um potenciômetro DM22 (Digimed, Campo - SP) previamente calibrado com solução tampão pH 4,0 e 7,0. As medidas foram realizadas em triplicata diretamente na suspensão, sendo o resultado correspondente a média das três repetições para cada lote.

5.3.2.3.4 Análise morfológica das nanocápsulas

A análise foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão, utilizando o microscópio JEM 1200 ExII (JEOL, Japão) a 120 Kv, no Centro de Microscopia da UFRGS. Para esta análise, as suspensões foram diluídas em água ultrapura (1:10 v/v) e colocadas em grids de cobre com revestimento carbono-formvarm. Uma solução de acetato de uranila (2% p/v) foi utilizada como um contraste.

5.3.2.3.5 Doseamento e eficiência de encapsulação

O doseamento do ácido cumárico nas nanocápsulas foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando o método validado descrito no capítulo 1 desta dissertação. A fase móvel foi composta de acetonitrila/água acidificada com 0,1% de ácido acético (v/v), na proporção (40:60 v/v), sob um fluxo de 1 mL/min, o volume de injeção foi de 20 µL, e o comprimento de onda utilizado para detecção foi de 275 nm. A suspensão de nanocápsulas foi diluída a uma concentração teórica equivalente ao ponto médio da curva analítica (15 µg/mL).

Para a determinação da eficiência de encapsulação a concentração total do ácido cumárico foi determinada da mesma forma que os demais doseamentos. Entretanto, a fração não encapsulada foi determinada utilizando a técnica de Ultrafiltração-centrifugação. Uma alíquota da amostra foi colocada em Ultrafree 10,000 MW (Millipore, Billerica – MA, EUA) e centrifugada a 6000 rpm por 10 minutos. Após, a quantidade de substância não encapsulada foi determinada pela injeção do ultrafiltrado no sistema cromatográfico, conforme método descrito no Capítulo 1. A determinação da eficiência de encapsulação foi calculada pela diferença entre as concentrações de ácido cumárico total e livre (ultrafiltrada) (VENTURINI *et al.*, 2011).

5.3.2.4 Caracterização dos pós obtidos a partir nanocápsulas

5.3.2.4.1 Rendimento

O rendimento do processo de secagem foi calculado pela razão entre o peso obtido experimentalmente, após a secagem e a soma dos pesos de todos os componentes sólidos da formulação. Os resultados foram expressos em porcentagem e representaram a média dos três lotes.

5.3.2.4.2 Análise morfológica e determinação do tamanho das partículas

A análise morfológica das partículas, quanto a forma e superfície, foi realizada por microscopia eletrônica de varredura a 10 kV. Para isso as amostras foram previamente metalizadas com ouro e fixadas em stubs de alumínio. Esse

experimento foi realizado no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS utilizando o microscópio (JEOL JSM-6060, Japão). As imagens foram analisadas utilizando o software ImageJ (versão 1.44u), a fim de determinar a distribuição de tamanho das partículas e o seu diâmetro médio. Foram contadas e medidas mais de 300 partículas.

5.3.2.4.3 Estudo de desaglomeração

O tamanho médio das partículas após a redispersão em água foi analisado por difração de raio laser utilizando o equipamento Mastersizer® 2000, usando a mesma técnica de monitorização do tamanho (descrita no item 5.3.2.3.1). Os resultados foram expressos como diâmetro médio de partícula (em número) após 2 h.

5.3.2.4.4 Perda por dessecação para os pós

A determinação da perda por dessecação foi baseada nos parâmetros descritos na Farmacopeia Brasileira – 5ª edição (2010). Foram pesados 1 g de pó em uma termo balança por infravermelho (MB25 - OHAUS). A amostra foi aquecida a 105 °C durante 5 minutos e o percentual de umidade foi calculado pelo equipamento pela diferença entre massa final (anidra) e a massa inicial.

5.3.2.4.5 Doseamento do ácido cumárico nos pós

Uma alíquota de 0,13 g de pó foi pesada, transferida para um balão volumétrico de 5 mL e colocada em contato com o solvente extrator (acetonitrila) durante 30 minutos. A seguir a amostra foi sonicada por 40 minutos e posteriormente centrifugada a 3600 rpm durante 15 minutos. Foi realizada uma nova diluição para se obter uma concentração teórica equivalente ao ponto médio da curva analítica (15 µg/mL). Uma alíquota foi filtrada e transferida para um vial e analisada por CLAE, seguindo os mesmos parâmetros do doseamento da LNC. Previamente, foi validado o método de extração para o pó.

5.4 Resultados e discussão

5.4.1 Desenvolvimento das suspensões de nanocápsulas contendo ácido cumárico

5.4.1.1 Determinação do perfil granulométrico por difração de laser

Conforme descrito no item 5.3.2.3.1 da metodologia, o perfil granulométrico das formulações foi analisado por difração de raio laser (LD). Visando garantir apenas a presença de populações nanométricas nas suspensões. Uma vez que esta técnica pode detectar a presença de nano e micropartículas.

Da mesma forma que para as formulações contendo cumarina e ácido cumárico, desenvolvidas no segundo capítulo, os perfis granulométricos das nanonápsulas de ácido cumárico, revelaram distribuição de tamanho monomodal em escala nanométrica, sem partículas micrométricas (Figura 12 e Tabela 16).

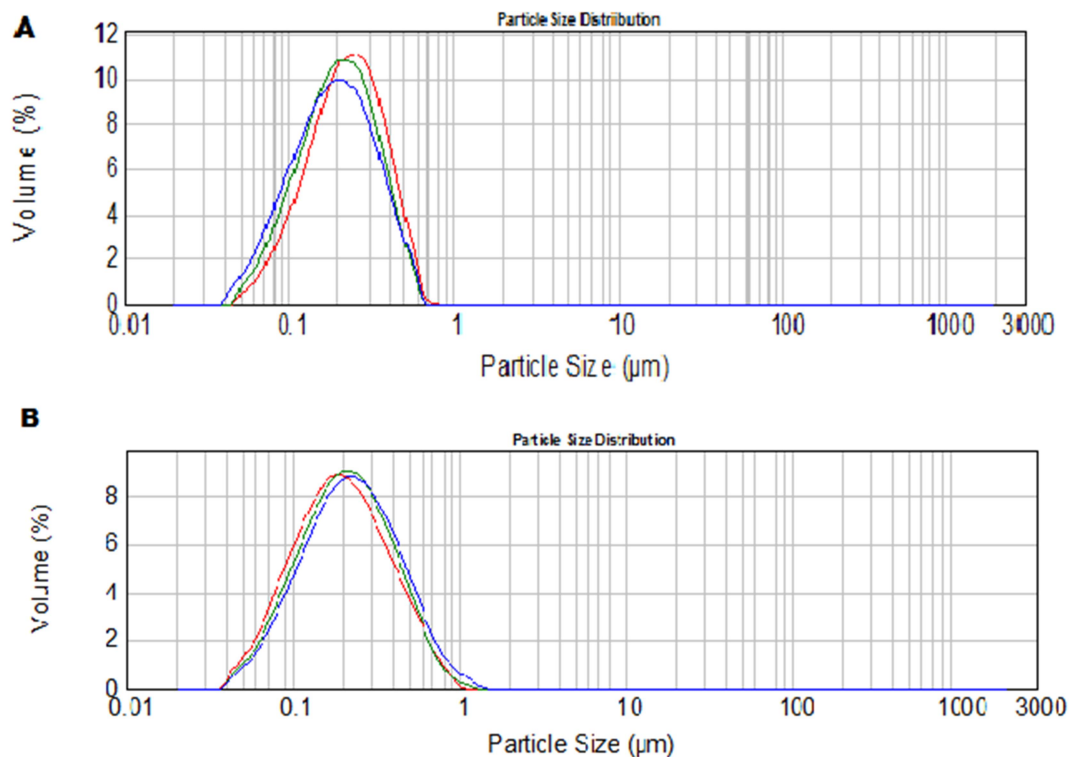


Figura 12 — Distribuição de tamanho das partículas por volume, obtida por difração de laser (n=3). **A:** LNC Br; **B:** LNC AC

Fonte: Próprio autor (2015).

Tabela 16 — Diâmetro médio e Span das suspensões de LNC, obtidas por difração de laser.

Amostra (n = 3)	D [4,3] (nm)	Span
	Difração de laser	
LNC Br	228 ± 17,47	1,50 ± 0,10
LNC AC	256 ± 18,77	1,92 ± 0,06

Fonte: Próprio autor (2015).

Os dados apresentados na tabela acima demonstraram um diâmetro médio de $228 \pm 17,47$ nm para as nanocápsulas brancas. Ao passo que, as suspensões contendo ácido cumárico exibiram um diâmetro médio de $256 \pm 18,77$ nm.

As nanocápsulas brancas e aquelas contendo a substância ativa apresentaram valores de Span iguais a $1,50 \pm 0,10$ e $1,92 \pm 0,06$ respectivamente. Os valores de Span, obtidos pela técnica de difração de raio laser, indicam uma distribuição granulométrica homogênea e estreita para as populações de partículas.

5.4.1.2 Tamanho das partículas, índice de polidispersão e potencial zeta

O diâmetro das partículas foi analisado através da técnica de espectroscopia de correlação de fótons (PCS). As suspensões de nanocápsulas brancas apresentaram um diâmetro médio de $95 \pm 0,36$ nm, enquanto que as formulações contendo ácido cumárico apresentaram um diâmetro médio de $108 \pm 2,79$ nm. O índice de polidispersão (PDI) para nanocápsulas brancas foi igual a $0,087 \pm 0,019$, enquanto aquelas contendo ácido cumárico apresentaram PDI igual a $0,125 \pm 0,027$. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 17 e na Figura 13.

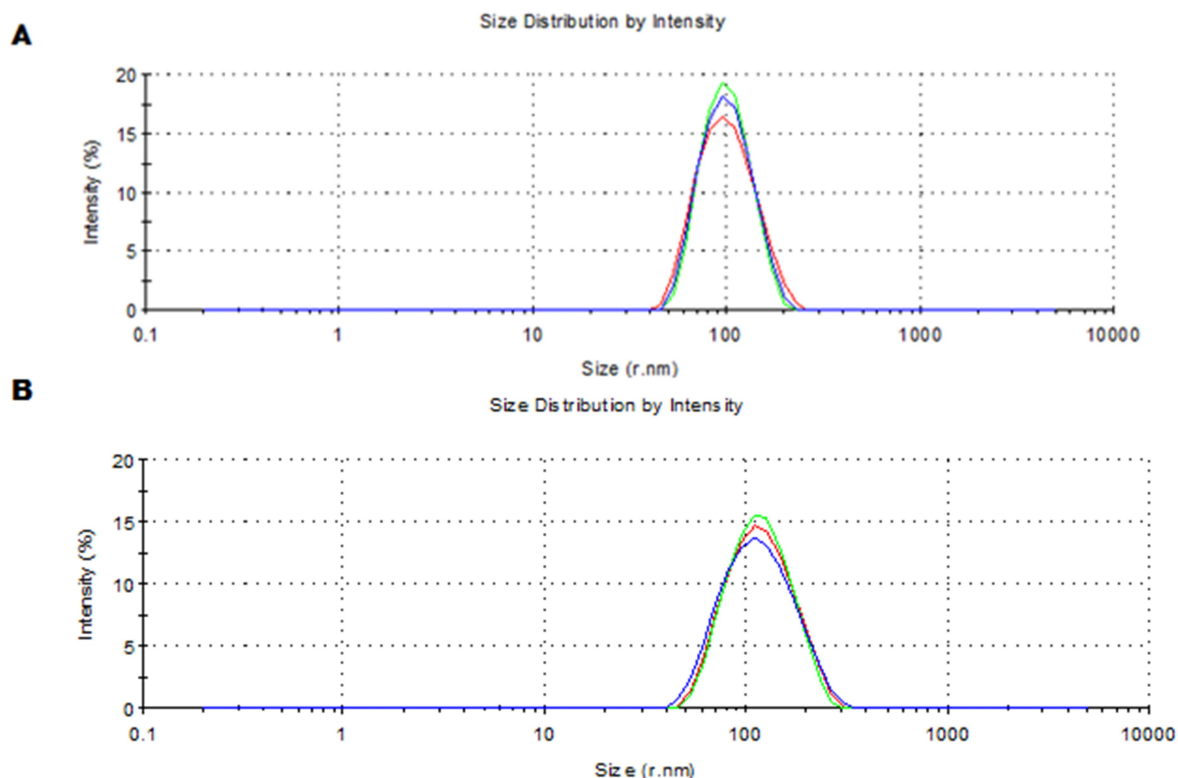


Figura 13 — Distribuição de tamanho das partículas, obtida por espectroscopia de correlação de fótons (n=3). **A:** LNC Br; **B:** LNC AC.

Fonte: Próprio autor (2015).

Tabela 17 — Diâmetro médio e índice de polidispersão das suspensões de LNC, obtidas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS, n=3).

Amostra (n = 3)	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão (PDI)
LNC Br	95 ± 0,36	0,087 ± 0,019
LNC AC	108 ± 2,79	0,125 ± 0,027

Fonte: Próprio autor (2015).

Ainda, foi estimado o potencial zeta, com base na mobilidade eletroforética das suspensões de nanocápsulas. A formulação sem a substância ativa apresentou um potencial zeta igual a $-8,13 \pm 0,10$ mV. À medida que a suspensão contendo ácido cumárico exibiu um potencial zeta igual a $-12,27 \pm 1,96$ mV.

5.4.1.3 Determinação do pH

Além da caracterização em termos de tamanho de partícula, distribuição de tamanho (índice de polidispersão) e potencial zeta, foi determinado o pH das formulações. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 18.

Tabela 18 — pH das suspensões de nanocápsulas com e sem ácido cumárico

Amostra (n=3)	pH
LNC Br	6,18 ± 0,06
LNC AC	4,18 ± 0,05

Fonte: Próprio autor (2015).

5.4.1.4 Análise morfológica das nanocápsulas

A fim de verificar a morfologia das nanocápsulas, conforme descrito no item 5.3.2.3.4 de metodologia, as suspensões foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão. A Figura 14 apresenta as fotomicrografias obtidas para as nanocápsulas brancas e com ácido cumárico.

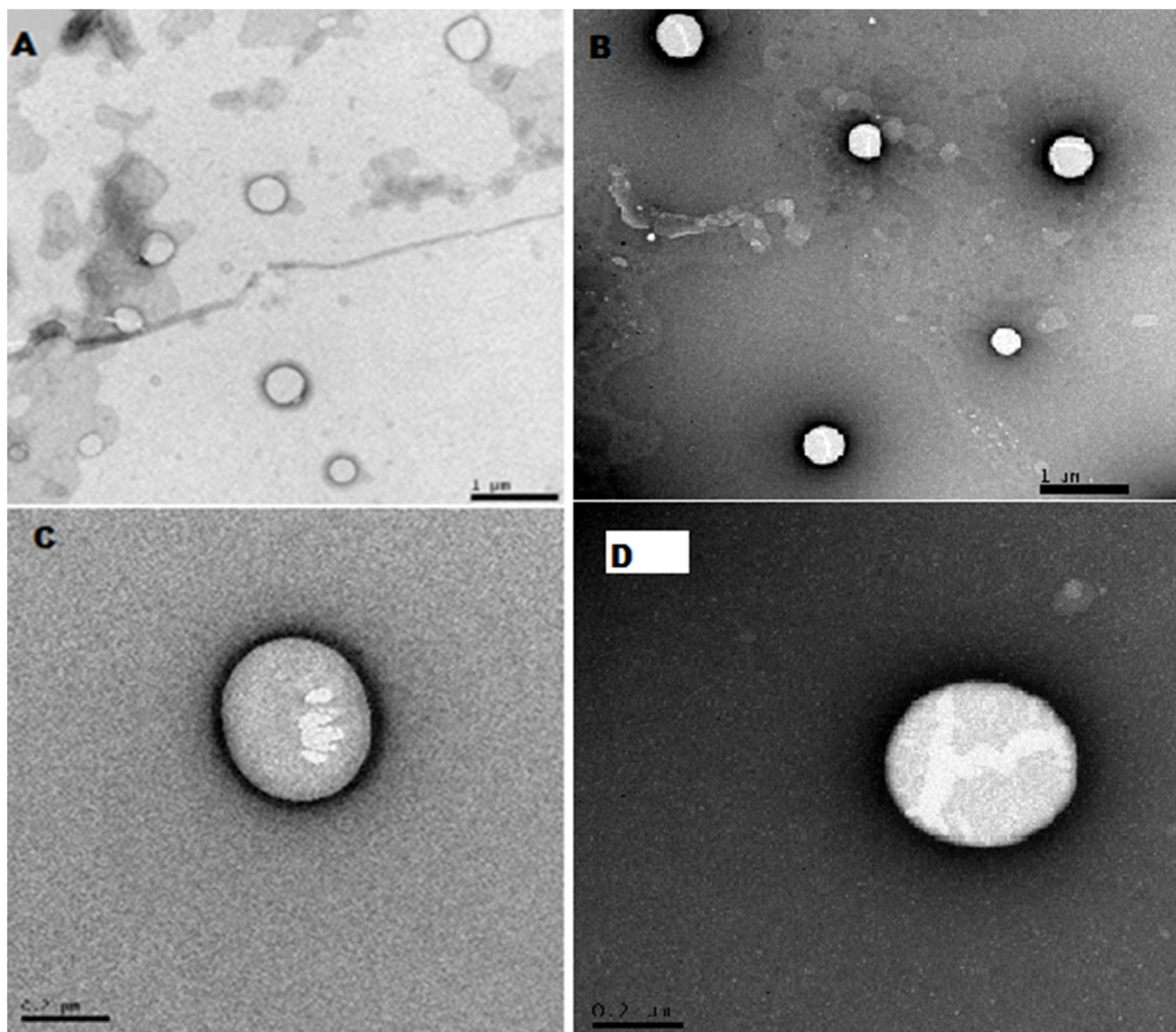


Figura 14 — Microscopia Eletrônica de Transmissão. **A:** LNC Br; **B:** LNC AC [barra = 1 µm (20.000X)]. **C:** LNC Br; **D:** LNC AC [barra = 0,2 µm (100.000X)].

Fonte: Próprio autor (2015).

5.4.1.5 Doseamento e eficiência de encapsulação

O teor de ácido cumárico doseado nas nanocápsulas de núcleo lipídico foi igual a $94,86 \pm 2,22\%$. A eficiência de encapsulação deste ativo foi igual a $55,83 \pm 0,62\%$. Comparando a eficiência de encapsulação do ácido cumárico obtida na formulação contendo as duas substâncias ativas co-encapsuladas (descrita capítulo 2) com a obtida para a suspensão contendo apenas o ácido cumárico, é possível afirmar que a presença da cumarina não interfere na taxa de associação do ácido cumárico.

5.4.2 Caracterização dos pós secos por aspersão

5.4.2.1 Rendimento

Após o processo de secagem das suspensões foi determinado o rendimento para os pós obtidos a partir das nanocápsulas brancas (LNC-SD) e das nanocápsulas contendo ácido cumárico (LNCAC-SD). O rendimento foi calculado pela diferença de massa entre os valores teórico e experimental. Os resultados obtidos para o rendimento estão demonstrados na Tabela 19.

Tabela 19 — Rendimento do processo de secagem para as suspensões.

Amostra (n=3)	Rendimento do processo (%)
LNC-SD	63,20 ± 2,60
LNCAC-SD	59,78 ± 4,54

Fonte: Próprio autor (2015).

Os valores de rendimento obtidos neste trabalho estão próximos aos rendimentos obtidos em trabalhos prévios, que utilizaram a lactose como adjuvante de secagem (HOFFMEISTER *et al.*, 2012)

5.4.2.2 Análise morfológica e distribuição de tamanho das partículas

A Figura 15 mostra as fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para os pós secos por aspersão a partir de nanocápsulas brancas (LNC-SD) e com ácido cumárico (LNC AC-SD).

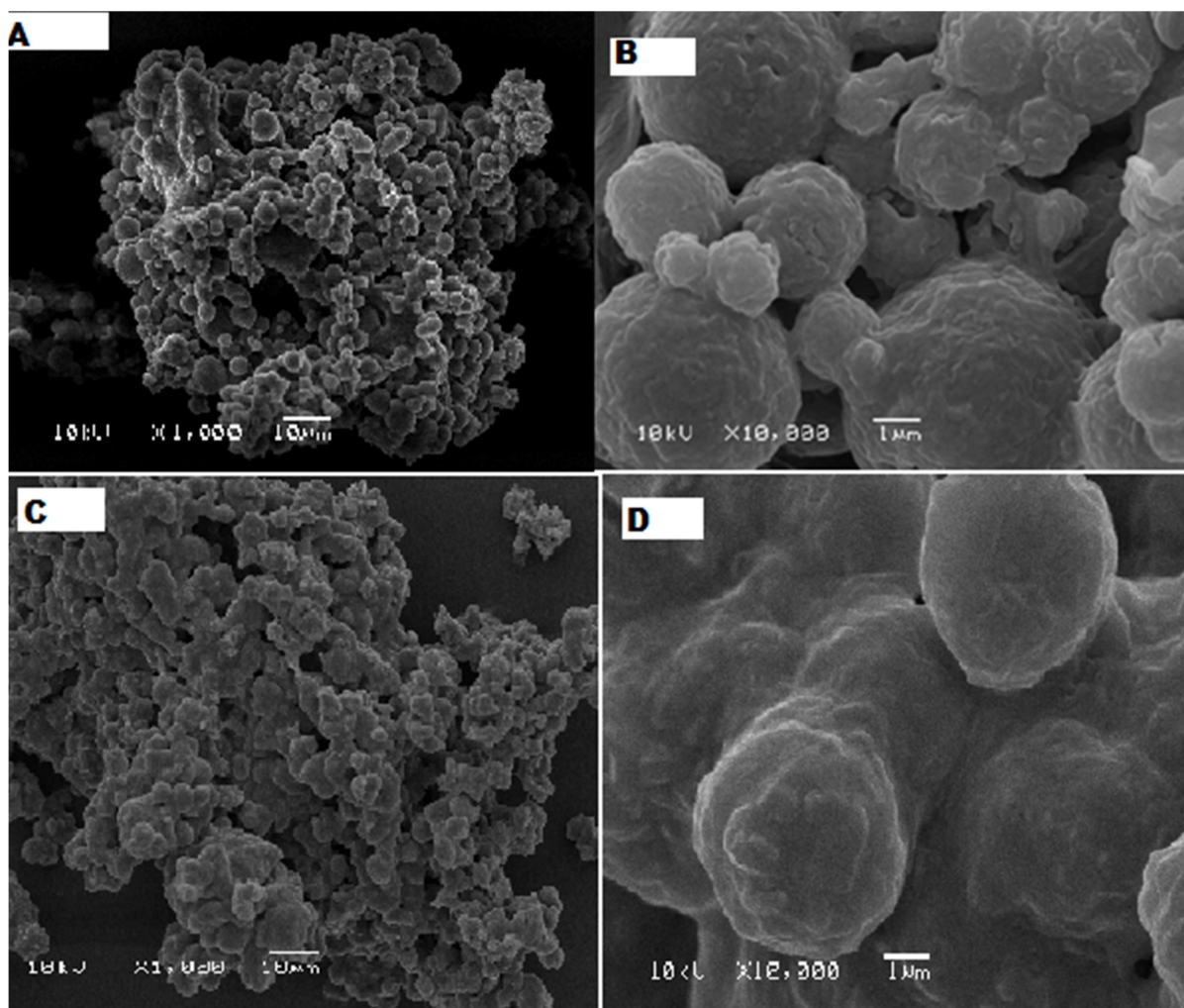


Figura 15 — Microscopia Eletrônica de Varredura. **A:** LNC-SD (1000 X); **B:** LNC-SD (10000 X). **C:** LNC AC-SD (1000 X); **D:** LNC AC-SD (10000 X). A e C, barra = 10 µm; B e D, barra = 1µm.

Fonte: Próprio autor (2015).

A análise das características morfológicas dos pós secos por aspersão através da microscopia eletrônica de varredura (Fig. 15) mostrou a presença de partículas esféricas com superfície irregular para todas as formulações. Dados presentes na literatura relatam que as nanocápsulas contendo a substância ativa podem estar revestindo a superfície da micropartícula (BECK *et al.*, 2006; BECK *et al.*, 2008) ou também podem estar dentro da matriz de lactose (TEWA-TAGNE *et al.*, 2007). A imagem apresentada na figura 16 sugere a presença de nanocápsulas na superfície da micropartícula.

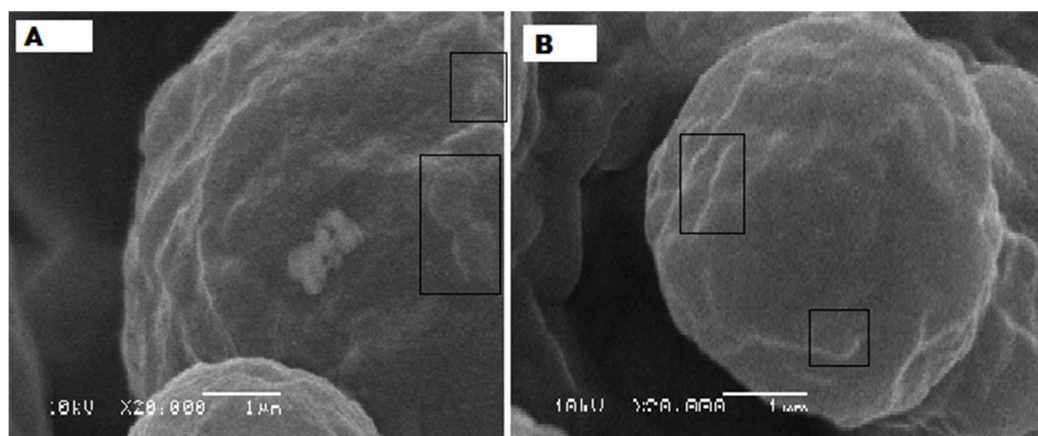


Figura 16 — Fotomicrografia da superfície das micropartículas (20000 X). **A:** LNC-SD, **B:** LNC AC-SD. Sugere-se que áreas destacadas indicam a presença de nanocápsulas.

Fonte: Próprio autor (2015).

A partir das imagens obtidas por microscopia de varredura, foi determinado o tamanho das partículas utilizando o software ImageJ (versão 1.44u). Os resultados estão exibidos na Tabela 20 e Figura 17.

Tabela 20 — Distribuição de tamanho das partículas.

Amostra	D0,1 (μm)	D0,5 (μm)	D0,9 (μm)	D _{IM} (μm)	Span
LNC-SD	0,44	2,81	6,06	2,80 \pm 1,34	0,05
LNC AC-SD	6,06	5,95	7,60	3,77 \pm 1,10	0,29

Fonte: Próprio autor (2015).

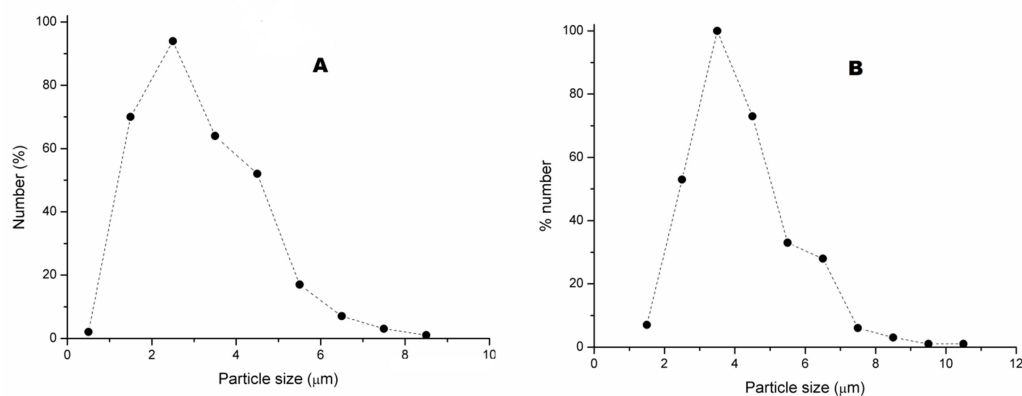


Figura 17 — Distribuição de tamanho das partículas obtida pelas imagens de MEV. **A:** LNC-SD; **B:** LNC AC-SD.

Fonte: Próprio autor (2015).

A análise dos resultados apresentados na tabela 20 indicou diâmetro médio de $2,80 \pm 1,34 \mu\text{m}$ para a formulação LNC-SD, enquanto a formulação LNC AC-SD exibiu um diâmetro médio igual a $3,77 \pm 1,10 \mu\text{m}$. Os baixos valores de Span obtidos (0,05 para LNC-SD e 0,29 para LNC AC-SD) indicam uma boa homogeneidade em termos de distribuição de tamanho das partículas. Além do mais, os diâmetros obtidos indicam que os pós podem ser utilizados para administração intrapulmonar de fármacos (OURIQUE *et al.*, 2014).

5.4.2.3 Estudos de desaglomeração

Para avaliar o perfil de desaglomeração das partículas, uma amostra do pó obtido a partir das nanocápsulas brancas (LNC-SD) foi analisada no equipamento Mastersizer 2000[®] por via úmida e o diâmetro foi medido em tempos pré-determinados. Posteriormente amostras de pó contendo o ácido cumárico (LNC AC-SD, n=3) foram analisadas da mesma forma, a fim de verificar sua redispersão em água. Este estudo permitiu observar apenas a presença de populações micrométricas após um tempo de desintegração de duas horas. Os resultados dos estudos de desaglomeração estão demonstrados na Tabela 21 e Figura 18.

Tabela 21 — Distribuição de tamanho das partículas (por número) após 2h.

Amostra (n=3)	D0,1 (μm)	D0,5 (μm)	D0,9 (μm)	SPAN	D [4,3] (μm)
LNCAC-SD	$1,15 \pm 0,05$	$1,58 \pm 0,10$	$2,80 \pm 0,29$	$1,04 \pm 0,09$	$10,99 \pm 5,44$

Fonte: Próprio autor (2015).

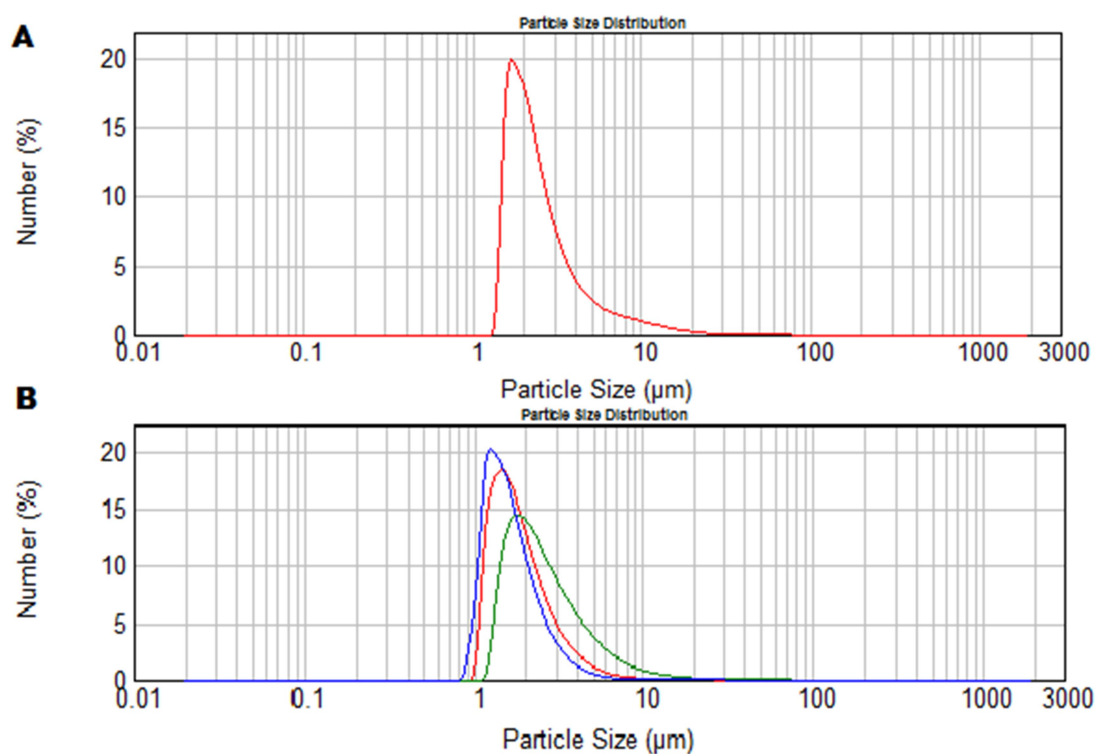


Figura 18 — Distribuição de tamanho das partículas (μm) por número (%) após 2h. A: LNC-SD; B: LNC AC-SD.

Fonte: Próprio autor (2015).

O diâmetro médio da formulação LNCAC-SD após duas horas de desaglomeração foi igual a $10,99 \pm 5,44 \mu\text{m}$ com valor de Span de $1,04 \pm 0,09$ indicando uma distribuição de tamanho relativamente homogênea. Enquanto que a formulação LNC-SD apresentou um diâmetro médio de $9,76 \mu\text{m}$ e Span igual a 1,117.

5.4.2.4 Perda por dessecação para os pós

Os resultados obtidos para a perda por dessecação dos pós estão exibidos na Tabela 22.

Tabela 22 — Perda por dessecação obtida para os pós.

Amostra	Perda por dessecação (%)
LNC-SD	1,00
LNCAC-SD	$0,58 \pm 0,11$

Fonte: Próprio autor (2015).

Os resultados apresentados na tabela acima indicam que as suspensões de nanocápsulas foram secas eficientemente, visto que os pós apresentaram teor de umidade inferior a 2%.

5.4.2.5 Doseamento de ácido cumárico nos pós

Com a finalidade de extrair o ácido cumárico da formulação, o pó foi deixado em contato com o solvente por meia hora, a seguir a amostra foi sonicada durante 40 minutos, posteriormente centrifugada a 3600 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e diluído a uma concentração teórica de 15 µg/mL, filtrado em membrana hidrofílica de 0,45 µm para vials e analisado em cromatógrafo líquido de alta eficiência seguindo os mesmos parâmetros descritos no capítulo 1 dessa dissertação. Foi observado um teor de ácido cumárico igual a $97,53 \pm 2,96\%$.

5.5 Conclusão

As nanocápsulas de núcleo lipídico contendo ácido cumárico apresentaram propriedades físico-químicas adequadas a um nanomaterial. Além disso, os pós obtidos a partir das suspensões de nanocápsulas contendo ácido cumárico a partir do método de secagem por aspersão apresentaram bom rendimento e baixo teor de umidade.

Adicionalmente, o diâmetro médio igual a $3,77 \pm 1,10$ µm obtido para os pós indica a viabilidade de aplicação intrapulmonar, uma vez que as partículas com diâmetros aerodinâmicos entre 1 e 5 µm se depositam eficientemente na região alveolar. Estudos posteriores para avaliação da deposição pulmonar *in vitro* deverão ser realizados, considerando principalmente as propriedades anti-inflamatória e antimicrobiana do ácido cumárico, importantes para o tratamento de doenças respiratórias.

6 DISCUSSÃO

Como apresentado no primeiro capítulo dessa dissertação, o qual abordou a validação de método para doseamento de cumarina e ácido cumárico em nanocápsulas de núcleo lipídico, seguindo os critérios preconizados pelo ICH (ICH, 2005) e pela resolução da ANVISA (BRASIL, 2003), é possível afirmar que a metodologia foi validada para a finalidade a qual e destina. A especificidade do método comprovou que os componentes da formulação não interferiram na quantificação do fármaco.

Tal método também mostrou ser linear revelando coeficientes de correlação superiores a 0,99 (0,9999 para o ácido cumárico e 0,9998 para a cumarina). A linearidade foi comprovada através da avaliação estatística por Análise de Variância (ANOVA) com intervalo de confiança de 95%. Constatou-se que houve regressão linear significativa e desvio da linearidade não significativo ($p > 0,05$) quando comparados os valores de $F_{\text{calculado}}$ e F_{tabelado} .

Outrossim, a metodologia provou precisão e exatidão. A análise do DPR intra e inter-dia demonstrou que o método é preciso, pois todos os DPR apresentaram valores inferiores a 5%. Ainda, a comparação estatística das medidas inter-dia comprovou não haver diferença significativa das determinações inter-dia.

O ensaio de recuperação revelou a exatidão do método. As porcentagens médias de recuperação para ácido cumárico e para cumarina foram próximas a 100%, com coeficientes de variação menores do que 5% entre as médias dos três níveis de concentração. A análise estatística por ANOVA entre essas médias, adotando um intervalo de confiança de 95%, resultou em valores de $p > 0,05$, mostrando não haver diferença significativa entre valores de recuperação.

Ainda, conforme o conteúdo discutido no segundo e terceiro capítulos, referentes ao desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo cumarina e ácido cumárico (segundo capítulo) ou somente ácido cumárico (terceiro capítulo), verificou-se que ambas as suspensões apresentaram características físico-químicas nanotecnológicas adequadas a um nanomaterial. As duas revelaram distribuição de tamanho monomodal em escala nanométrica, sem partículas micrométricas pela metodologia de determinação do perfil granulométrico por difração de laser (LD). Os valores de Span obtidos nesta mesma técnica

indicaram uma distribuição granulométrica homogênea e estreita para as populações de partículas.

O diâmetro das partículas, determinado através da técnica de espectroscopia de correlação de fótons (PCS), demonstrou que ambas as suspensões de nanocápsulas apresentaram diâmetros compatíveis à escala nanométrica e baixo índice de polidispersão (PDI). Além disso, a análise morfológica das nanocápsulas por microscopia eletrônica de transmissão revelou que observando as imagens obtidas pela microscopia, foi possível visualizar nanopartículas, com tamanhos na mesma ordem de grandeza dos valores obtidos pelos métodos de PCS e LD.

O potencial zeta, estimado com base na mobilidade eletroforética das suspensões de nanocápsulas, exibiu resultados próximos aos relatados por CORADINI e colaboradores (2014) que encapsularam dois polifenóis em uma mesma partícula. Os autores relatam que apesar de terem obtido valores de potencial zeta próximos da neutralidade em suas formulações, as partículas apresentaram estabilização estérica devido à presença de um polímero não iônico na interface partícula / água.

O teor do ácido cumárico determinado tanto nas nanocápsulas contendo ácido cumárico e cumarina como naquelas contendo apenas o ácido cumárico foi próximo a 95%. Já o teor de cumarina nas nanocápsulas contendo cumarina e ácido cumárico resultou valor próximo a 85%. A leve redução no teor de cumarina nas nanocápsulas pode ser indício de pequena degradação em suspensão aquosa.

O segundo e terceiro capítulos dessa dissertação também abordaram o processo de secagem das suspensões de nanocápsulas por aspersão, utilizando lactose como adjuvante de secagem, uma vez que os pós são considerados produtos intermediários com melhor estabilidade físico-química do que as suspensões. Após o processo de secagem foi calculado o rendimento, pela diferença de massa entre os valores teórico e experimental. Obteve-se um rendimento de $57,43\% \pm 5,52$ para os pós obtidos a partir das nanocápsulas contendo cumarina e ácido cumárico, já para os pós obtidos das suspensões de nanocápsulas contendo apenas o ácido cumárico o rendimento obtido foi de $59,78\% \pm 4,54$. Esses valores estão próximos aos rendimentos obtidos em trabalhos prévios, que utilizaram a lactose como adjuvante de secagem (HOFFMEISTER *et al.*, 2012).

A análise das características morfológicas dos pós secos por aspersão foi determinada através da microscopia eletrônica de varredura. As imagens obtidas

mostraram a presença de partículas esféricas com superfície irregular para todas as formulações. O estudo das imagens permitiu sugerir a presença de nanocápsulas revestindo a superfície da micropartícula. Dados presentes na literatura já relataram essa possibilidade (BECK *et al.*, 2006; BECK *et al.*, 2008).

O tamanho das partículas foi determinado utilizando o software ImageJ (versão 1.44u) a partir das imagens obtidas por microscopia de varredura. Os pós obtidos a partir das nanocápsulas contendo ácido cumárico e cumarina exibiram um diâmetro médio igual a $2,79 \pm 0,94 \mu\text{m}$ enquanto que aqueles obtidos a partir das nanocápsulas contendo apenas ácido cumárico apresentaram um diâmetro médio de $3,77 \pm 1,10 \mu\text{m}$. Dados da literatura relatam que diâmetros aerodinâmicos entre 1 e $5 \mu\text{m}$ são ideais para uma deposição eficiente na região alveolar (BAILEY & BERKLAND, 2009; PATTON & BYRON, 2007; MUSANTE *et al.*, 2002). Desta maneira, é possível sugerir que os pós obtidos podem ser potencialmente úteis para administração intrapulmonar de fármacos. Entretanto, experimentos adicionais deverão ser conduzidos para confirmar os diâmetros aerodinâmicos dos pós desenvolvidos neste estudo. Adicionalmente o estudo de desaglomeração para avaliar o perfil de desagloeração das partículas permitiu observar apenas a presença de populações micrométricas após um tempo de desintegração de duas horas.

A determinação da perda por dessecação para ambos os pós indica que as suspensões de nanocápsulas foram secas eficientemente, visto que os pós apresentaram teor de umidade inferior a 2%. O teor obtido no pó contendo os dois ativos foi de $97,02 \pm 2,54\%$ para o ácido cumárico e $16,82 \pm 0,52\%$ para cumarina. O doseamento demonstrou não haver perda de ácido cumárico durante o processo de secagem, porém houve uma redução importante no teor de cumarina. Em trabalho realizado por Radünz e colaboradores (2012) foi observada uma perda elevada no teor de cumarina durante a secagem com ar aquecido a 80°C , durante o processo a temperatura atingida na massa seca foi superior à temperatura de fusão na faixa de 68 a 70°C . A perda de teor da cumarina no pó pode ser explicada pelo mesmo motivo, uma vez que a temperatura de saída na torre de secagem do Spray Dryer também foi muito próxima à temperatura de fusão da cumarina. O teor de ácido cumárico nos pós obtidos a partir das nanocápsulas contendo apenas esse ativo foi igual a $97,53 \pm 2,96\%$, indicando a viabilidade de uso desses pós no desenvolvimento de formulações para administração pulmonar.

7 CONCLUSÃO

O método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV pode ser uma ferramenta útil para a quantificação simultânea de ácido cumárico e cumarina em nanocápsulas de núcleo lipídico. Foi possível verificar que o método proposto apresentou especificidade, linearidade, precisão e exatidão adequadas à análise. Assim sendo, é possível afirmar que a metodologia está validada para a finalidade a qual se destina.

Tanto as suspensões de nanocápsulas contendo ácido cumárico e cumarina, como aquelas contendo apenas ácido cumárico, mostraram características físico-químicas nanotecnológicas que estão de acordo com o método e matérias primas utilizadas na elaboração de formulações similares. Ambas apresentaram distribuição de tamanho monomodal estreita, confirmada por baixos valores de índice de polidispersão, podendo ser futuramente utilizadas para desenvolvimento de formulações tópicas espessadas com agentes gelificantes.

Além disso, os pós obtidos a partir das suspensões de nanocápsulas contendo ácido cumárico a partir do método de secagem por aspersão apresentaram bom rendimento e baixo teor de umidade. Adicionalmente, o diâmetro médio igual a $3,77 \pm 1,10 \mu\text{m}$ obtido para os pós indica a viabilidade de aplicação intrapulmonar, uma vez que as partículas com diâmetros aerodinâmicos entre 1 e 5 μm se depositam eficientemente na região alveolar. Estudos posteriores para avaliação da deposição pulmonar *in vitro* deverão ser realizados, considerando principalmente as propriedades anti-inflamatória e antimicrobiana do ácido cumárico, importantes para o tratamento de doenças respiratórias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, A. S.; SANTOS A. R.; KAISER, C. R. Determinação de Cumarina em Extratos de Guaco Comercial: Um Estudo de Caso sobre o Controle de Qualidade de Fitoterápicos. **Revista Fitos**. V.3 (01), p. 60 – 66, 2012.

AL-QADI, S.; GRENHAB, A.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C. Microspheres loaded with polysaccharide nanoparticles for pulmonary delivery: Preparation, structure and surface analysis. **Carbohydrate Polymers**. V. 86, p. 25 – 34, 2011.

BAILEY, M. M.; BERKLAND, C. J. Nanoparticle Formulations in Pulmonary Drug Delivery. **Medicinal Research Reviews**. V. 29 (1), p. 196 – 212, 2009.

BECK, R. C. R.; HAAS, S. E.; GUTERRES, S. S. Nanoparticle-coated organic-inorganic microparticles: experimental design and gastrointestinal tolerance. **Química Nova**. V. 29 (5), p. 990 – 996, 2006.

BECK, R. C. R.; LIONZO, M. I. Z.; COSTA, T. M. H.; BENVENUTTI, E. V.; RÉ, M. I.; GALLAS, M. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Surface morphology of spray-dried nanoparticle-coated microparticles designed as an oral drug delivery system. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. V. 25 (2), p. 389 – 398, 2008.

BECK-BROICHSITTER, M.; SCHMEHL, T.; SEEGER, W.; GESSLER, T. Evaluating the Controlled Release Properties of Inhaled Nanoparticles Using Isolated, Perfused, and Ventilated Lung Models. **Journal of Nanomaterials**. V. 2011, Article ID 163791, 16 pages.

BECK-BROICHSITTER, M.; SCHWEIGER, C.; *et al.* Characterization of novel spray-dried polymeric particles for controlled pulmonary drug delivery. **Journal of Controlled Release**. V. 158, p. 329 – 335, 2012.

BERTOLUCCI, S. K. V.; PEREIRA, A. B. D.; PINTO, J. E. B.P.; RIBEIRO, J. A. A.; OLIVEIRA, A. B.; BRAGA, F. C. Development and Validation of an RP-HPLC Method for Quantification of Cinnamic Acid Derivatives and Kaurane-Type Diterpenes in *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*. **Planta Med**. V. 75, p. 280 – 285, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

BRITO, N. M.; AMARANTE JR., O. P.; POLESE, P.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**. V. 13, p. 129 – 146, 2003.

CELEGHINI, R. M. S.; VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M. Extraction and Quantitative HPLC Analysis of Coumarin in Hydroalcoholic Extracts of *Mikania*

glomerata Spreng. (“guaco”) Leaves. **Journal of Brazilian Chemical Society**. V. 12 (6), p. 706 – 709, 2001.

COHEN, A. J. Critical review of the toxicology of coumarin with special reference to interspecies differences in metabolism and hepatotoxic response and their significance to man. **Food and Chemical Toxicology** 17. V. 17, p. 277 – 289, 1979.

CONTRI, R. V.; FRANK, L. A.; KAISER, M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. The use of nanoencapsulation to decrease human skin irritation caused by capsaicinoids. **International Journal of Nanomedicine**. V. 9, p. 951 – 962, 2014.

CORADINI, K.; LIMA F. O.; OLIVEIRA, C. M.; *et al.* Co-encapsulation of resveratrol and curcumin in lipid-core nanocapsules improves their in vitro antioxidant effects. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. V. 88 (1), p. 178 – 185, 2014.

CRUZ, L.; FATTAL, E.; TASSO, L.; *et al.* Formulation and in vivo evaluation of sodium alendronate spray-dried microparticles intended for lung delivery. **Journal of Controlled Release**. V. 152, p. 370–375, 2011.

DOMINGUES G. S.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R. Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. **Química Nova**. V. 31 (8), p. 1966 – 1972, 2008.

DRAGOJEVIC, S.; SUNJIC, V.; MIHALJEVIC, V. B.; *et al.* Determination of aqueous stability and degradation products of series of coumarin dimers. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. V. 54, p. 37 – 47, 2011.

FARMACOPEIA BRASILEIRA 5ª EDIÇÃO, 2010.

FONTANA, M. C.; BECKENKAMP, A.; BUFFON, A.; BECK, R. C. Controlled release of raloxifene by nanoencapsulation: effect on in vitro antiproliferative activity of human breast cancer cells. **International Journal of Nanomedicine**. V. 9, p. 2979–2991, 2014.

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.

FREITAS, T. P.; SILVEIRA, P. C.; ROCHA, L. G.; REZIN, G. T.; ROCHA, J.; ZANETTE, V. C.; ROMÃO, P. T.; DAL-PIZZOL, F.; PINHO, R. A.; ANDRADE, V. M.; STRECK, E. L. Effects of *Mikania glomerata* Spreng. and *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker (Asteraceae) Extracts on Pulmonary Inflammation and Oxidative Stress Caused by Acute Coal Dust Exposure. **Journal of medicinal food**. V. 11 (4), p. 761 – 766, 2008.

GAD, S.; TAJBER, L.; CORRIGAN, O. I.; HALY, A. M. Preparation and characterisation of novel spray-dried nano-structured para-aminosalicylic acid particulates for pulmonary delivery: impact of ammonium carbonate on morphology, chemical composition and solid state. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. V. 64, p. 1264–1274, 2012.

GRESSLER, L. T.; OLIVEIRA, C. B.; CORADINI, K. Trypanocidal activity of free and nanoencapsulated curcumin on *Trypanosoma evansi*. **Parasitology**. V. 142 (3), p. 439 – 448, 2015.

GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R. Spray-drying technique to prepare innovative nanoparticulated. **Brazilian Journal of Physics**. V. 39 (1A), p. 205 – 209, 2009.

GUTERRES, S. S.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R. Preparação e aplicações de nanopartículas para liberação controlada de fármacos. In: MORALES, M. M. (Org.). **Terapias Avançadas: células tronco, terapia gênica e nanotecnologia aplicada a saúde**. São Paulo: Atheneu, 2007. P. 247 – 264.

HASSAN, M. S.; LAU, R. Effect of Particle Formulation on Dry Powder Inhalation Efficiency. **Current Pharmaceutical Design**. V. 16 (21), p. 2377 – 2387, 2010.

HOFFMEISTER, C. R. D.; DURLI, T.R.; SCHAFFAZICK, S. R.; *et al.* Hydrogels containing redispersible spray-dried melatonin-loaded nanocapsules: a formulation for transdermal-controlled delivery. **Nanoscale Research Letters**. V. 7 (251), p. 1 – 13, 2012.

IBRAHIM, T. A. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts from *Salvia bicolor* Desf. Growing in Egypt. **Molecules**. V. 17 (10), p. 11315 – 11334, 2012.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH); Validation of Analytical Procedures: text and methodology Q2(R1), 2005.

JENKE, D. R. Chromatographic Method Validation: A Review of Current Practices and Procedures. Part II. Guidelines for Primary Validation Parameters. **Instrumentation Science & Technology**. V. (1), p. 19 – 35, 1998.

JORNADA, D. S.; FIEL, L. A.; BUENO, K.; *et al.* Lipid-core nanocapsules: mechanism of self-assembly, control of size and loading capacity. **Soft Matter**. V. 8, p. 6646 – 6655, 2012.

LAKE, B. G. Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevance for Human Risk Assessment. **Food and Chemical Toxicology**. V. 37, p. 423 – 453, 1999.

LEITE, M. G. R.; SOUZA, C.L.; SILVA, M. A. M.; *et al.* Estudo farmacológico comparativo de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco), *Justicia pectoralis* Jacq

(anador) e *Torresea cearensis* (cumaru). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V. 74, p. 12 – 15, 1993.

MAO, W.; SCHULER M. A.; BERENBAUM, M. R. (2013). Honey constituents up-regulate detoxification and immunity genes in the western honey bee *Apis mellifera*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. V. 110, p.8842, 2013.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 385, p. 113 – 142, 2010.

MULLER, C.R.; BASSANI, V.L.; POHLMANN, A.R.; MICHALOWSKI, C.B.; PETROVICK, P.R.; GUTERRES, S.S. Preparation and characterization of spray-dried polymeric nanocapsules. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. V. 26, p. 343– 347, 2000.

MUSANTE, C. J.; SCHROETER, J.D.; ROSATI, J. A.; CROWDER, T. M.; HICKEY, A. J.; MARTONEN, T. B. Factors affecting the deposition of inhaled porous drug particles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. V. 91 (7), p. 1590 –1600, 2002.

OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. *et al.*, 2011. **Química Nova**. V. 6, p. 105 – 1056, 2011.

OLIVEIRA, F.; ALVARENGA, M. A.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. Isolamento e identificação de componentes químicos de *Mikania glomerata* Sprengel e de *Mikania laevigata* Schultz Bip. Ex Baker. **Revista de farmácia e bioquímica da Universidade de São Paulo**. V. 2, p. 169 – 183, 1984.

OLIVEIRA, O. V.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V. 20 (4), p. 641 – 650, 2010.

OURIQUE, A. F.; CHAVES, P. S.; SOUTO, G. D.; *et al.* Redispersible liposomal-N-acetylcysteine powder for pulmonary administration: Development, in vitro characterization and antioxidant activity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. V. 65, p. 174 – 182, 2014.

OURIQUE, A. F.; AZOUBEL, S.; FERREIRA, C. V.; SILVA, C. B.; MARCHIORI, M. C. L.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Lipid-Core Nanocapsules as a Nanomedicine for Parenteral Administration of Tretinoin: Development and *In Vitro* Antitumor Activity on Human Myeloid Leukaemia Cells. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. V. 6 (3), p. 214 – 223, 2010.

PATEL, K. C.; CHEN, X. D. Drying of aqueous lactose solutions in a single stream dryer. **Food and Bioproducts Processing**. V. 86, p. 185 – 197, 2008.

PATTON, J. S.; BYRON, P. R. Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs. **Nature reviews**. V. 6, p. 67 – 64, 2007.

PEREIRA, C. A. C.; VIANNA, F. F.; CUKIER, A.; *et al.* Efficacy and safety of two dry-powder inhalers for the administration of mometasone furoate in asthma patients. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. V. 36 (4), p. 410 – 416, 2010.

POHLMANN, A. R.; FONSECA, F. N.; PAESE, K.; *et al.* Poly(ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**. V. 10 (5), p. 623 – 638, 2013.

POHLMANN, A. R.; WEISS, V.; MERTINS, O.; *et al.* Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. V. 16, p. 305 – 312, 2002.

RADÜNZ, L.L.; MELO, E.C.; BARBOSA, L.C.A.; ROCHA, R.P.; BERBERT, P.A. Rendimento extrativo de cumarina de folhas de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) submetidas a diferentes temperaturas de secagem. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. V.14 (3), p. 453 – 457, 2012.

RENAME 2012, Relação Nacional de Medicamentos Essenciais. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/anexos_rename_2012_pt_533_11_06_2012.pdf. Acessado em 21/05/2013.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F., MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química. Nova**. V. 27 (5), p. 771 – 780, 2004.

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química. Nova**. V. 31 (1), p. 164-171, 2008.

RUFATTO, L. C.; GOWER A.; SCHWAMBACH S. M. Genus *Mikania*: chemical composition and phytotherapeutical activity. **Brazilian journal of Pharmacognosy**. V. 22(6), p. 1384 – 1403, 2012.

SAIKIA, S.; MAHNOT, N. K.; MAHANTA, C. L. Optimisation of phenolic extraction from *Averrhoa carambola* pomace by response surface methodology and its microencapsulation by spray and freeze drying. **Food Chemistry**. V. 171, p. 144 - 152, 2015.

SANTOS G. S.; PEREIRA, G. G.; BENDER, E. A.; *et al.* Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas destinadas à aplicação tópica de dapsona. **Química. Nova**. V. 35 (7), p. 1388 – 1394, 2012.

SANTOS, S. C.; KRUEGER, C. L.; STEIL, A. A.; KREUGER, M. R.; BIAVATTI, M. W.; JUNIOR, A. W. LC Characterisation of Guaco Medicinal Extracts, *Mikania laevigata* and *M. glomerata*, and their Effects on Allergic Pneumonitis. **Planta Med.** V. 72, p. 679 – 684, 2006.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos. **Química Nova.** V. 26 (5), p. 726 – 737, 2003.

SILVA, L. S.; DA SILVA, L. S.; BRUMANO, L.; *et al.* Preparation of Dry Extracts of *Mikania glomerata* Sprengel (Guaco) and Determination of Its Coumarin Levels by Spectrophotometry and HPLC – UV. **Molecules.** V. 17, p. 10344 – 10354, 2012.

SINHA, V. R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMRIA., TREHAN, A. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics.** V. 18, p. 1 – 23, 2004.

STÖCKIGT, J.; SHELUDKO, Y.; UNGER, M.; *et al.* High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic-electrospray ionization mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. **Journal of Chromatography A.** V. 967, p. 85 – 113, 2002.

SUPHYA P. M. S.; RANKITA M. M. S.; SANJEEB K. S. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.** V. 8, p. 147–166, 2012.

TEWA-TAGNE, P.; DEGOBERT, G.; BRIANÇON, S.; BORDES, C.; *et al.* Spray-drying nanocapsules in presence of colloidal silica as drying auxiliary agent: formulation and process variables optimization using experimental designs. **Pharmaceutical Research.** V. 24 (4), p. 650 – 661, 2007.

TUROLLA, M. S. R., NASCIMENTO, E. S. Toxicological information of some herbal medicines used in Brazil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.** V. 42 (2), P. 289 – 306, 2006.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. **Pharmaceutical Research.** V. 26 (5), p. 1025 – 1056, 2008.

VEHRING, R.; FOSS, W.; LECHUGA-BALLESTEROS. D. Particle formation in spray drying. **Journal of Aerosol Science.** V. 38, p. 728 –746, 2007.

VENTURINI C. G.; JÄGER, E.; OLIVEIRA, C. P.; BERNARDI, A.; *et al.* Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.** V.375, p. 200 – 208, 2011.

VIDAL, L. H. I.; FONSECA, E. P.; BORDIN, I. Qualidade de mudas de guaco produzidas por estaquia em casca de arroz carbonizada com vermicomposto. **Hortic. Bras.** V. 24, p. 26 – 30, 2006.

VIKRAM, P.; CHIRUVELLA, K. K.; RIPAIN, I. A. H.; ARIFULLAH, M. A recent review on phytochemical constituents and medicinal properties of kesum (*Polygonum minus* Huds). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.** V. 4(6), p. 430 – 435, 2014.

WANG, Y.; KHO, K.; CHEOW, W. S.; HADINOTO, K. A comparison between spray drying and spray freeze drying for dry powder inhaler formulation of drug-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics.** V. 424, p. 98 – 106, 2012.

WU, X.; HAYES JR, D.; Zwischenberger, J. B.; KUHN, R. J.; MANSOUR, H. M. Design and physicochemical characterization of advanced spray-dried tacrolimus multifunctional particles for inhalation. **Drug Design, Development and Therapy.** V. 7, p. 59 – 72, 2013.

ZANOTTO-FILHO, A.; CORADINI, K.; BRAGANHOL, E.; *et al.* Curcumin-loaded lipid-core nanocapsules as a strategy to improve pharmacological efficacy of curcumin in glioma treatment. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.** V. 83 (2), p. 156 – 167, 2013.

ZHANG, A.; WAN, L.; WU, C.; FANG, Y.; *et al.* Simultaneous Determination of 14 Phenolic Compounds in Grape Canes by HPLC-DAD-UV Using Wavelength Switching Detection. **Molecules.** V. 18, p. 14241 – 14257, 2013.