

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
FACULDADE DE FARMÁCIA**

**LUCIANO APARECIDO STECANELLA**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS  
POLIMÉRICAS CONTENDO GRANDISINA**

Goiânia

2011

**LUCIANO APARECIDO STECANELLA**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS  
POLIMÉRICAS CONTENDO GRANDISINA**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.  
Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Martins Lima

Goiânia  
2011

Dedico este trabalho à minha família,  
por compreender minha ausência durante  
a dedicação a este estudo, me  
concedendo a oportunidade para a  
realização deste sonho.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus que me abençoou imensamente ao longo desta caminhada, me dando saúde, fé e perseverança.

À minha família pelo amor, apoio e compreensão.

Aos irmãos da igreja pelas orações.

Aos amigos do FarmaTec pelo incentivo a busca de novos conhecimentos, pela amizade e companheirismo.

A todos os professores que muito contribuíram para esta formação.

À minha orientadora, professora Eliana, pela oportunidade e por toda sua presteza em me auxiliar no decorrer do desenvolvimento deste trabalho.

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para esta conquista.

## RESUMO

A grandisina, uma neolignana tetraidrofurânica obtida das sementes e folhas da planta *Virola surinamensis*, é popularmente utilizada no tratamento de erisipelas, cólicas e dispepsias, e possui ação comprovada contra *Schistosoma mansoni*, *Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani* e *Trypanosoma cruzi*. Apresenta também atividade antinociceptiva, anti-inflamatória e potencial ação quimioprotetora (dose dependente), prevenindo a fragmentação cromossômica induzida pela ciclofosfamida, sendo assim considerada potencial candidata a agente anti-câncer. A encapsulação da grandisina em nanocápsulas poliméricas pode aumentar sua solubilidade em meio aquoso, conseqüentemente, permitindo sua administração por via intravenosa. No presente trabalho foram produzidas nanocápsulas poliméricas contendo grandisina pelo método de nanoprecipitação (ou deposição interfacial de polímero pré-formado). Estas nanocápsulas apresentaram diâmetro médio em torno de 160 nm, Pdl < 0,2, potencial zeta de - 15,73 mV e carga de grandisina de 6,54%, com eficiência de encapsulação (EE%) de 98%. O estudo de estabilidade, realizado por um período de 30 dias sob refrigeração (4°C ± 1°C), mostrou que as características físicas da formulação (coloração, translucência azulada, etc.) foram mantidas em relação à dispersão de nanocápsulas originalmente produzida, não sendo observadas alterações como deposição de resíduos e/ou cristais, formação de grumos, cremagem ou nata sobrenadante, gotículas de óleo aderidas ao vidro, floculação ou separação de fases. Com relação à grandisina encapsulada, durante o estudo de estabilidade, foi verificada uma redução de 6,4% do total encapsulado. O estudo de liberação mostrou rápida liberação nas primeiras 48h (30,45%) e posteriormente manteve-se mais lenta, com 52% após 21 dias de ensaio. As nanocápsulas poliméricas contendo grandisina, obtidas neste trabalho, mostraram ser um potencial sistema de liberação para viabilizar uma forma de administração por via parenteral para esta substância.

**Palavras-chave:** grandisina, nanocápsulas, PLGA

## ABSTRACT

Grandisin, a tetrahydrofuranic lignan produced by *Virola surinamensis* seeds and leaves, is popularly used to treat erysipelas, colic and dyspepsia, and is active against *Schistosoma mansoni*, *Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani* and *Trypanosoma cruzi*. It also antinociceptive, anti-inflammatory and potential for protective (dose dependent) activities, preventing cyclophosphamide induced chromosomal fragmentation, being considered a potential anti-cancer candidate. The encapsulation of grandisin in polymeric nanocapsules can increase its solubility in aqueous media, allowing drug administration by intravenous route. In the present work, polymeric nanocapsules containing grandisin were produced by nanoprecipitation method (or interfacial pre-formed polymer deposition). The average diameter of these nanocapsules were around 160 nm, Pdl < 0,2, zeta potential -15,73 mV and grandisin load of 6,54%, with encapsulation efficiency of (EE%) 98%. Stability study, comprising 30 days under refrigeration ( $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), showed that physicochemical characteristics of the formulation (color, bluish translucency, etc.) were the same as compared to the nanocapsules dispersion originally produced, so there were no alterations such as deposition of residues and/or crystals, lumps formation, creaming or supernatant oil, droplets adhered to the glass, flocculation or phase separation. Regarding encapsulated grandisin, during stability test, there was a reduction of 6,4% of the total encapsulated drug. Drug release study showed quick liberation in the first 48h (30,54%) and then kept slower, because only 52% after 21 days. Polymeric nanocapsules containing grandisin, obtained in this work, showed potential to be a drug release system to administration by intravenous route.

**Keywords:** grandisin, nanocapsule, PLGA

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Diferentes tipos de nanopartículas, (a) núcleo líquido; (b) matriz polimérica; (c) substância ativa em dispersão molecular (Adaptado de MORA-HUERTAS <i>et al.</i> , 2010). .....	18
Figura 2 – Diferentes métodos para a preparação de nanocápsulas (Adaptado de MORA-HUERTAS <i>et al.</i> , 2010). .....	20
Figura 3 – Processo usado para a preparação de nanocápsulas pelo método de nanoprecipitação (Adaptado de MORA-HUERTAS <i>et al.</i> , 2010). .....	23
Figura 4 – Representação esquemática da formação de nanopartículas pelo deslocamento de solvente, baseado no mecanismo de turbulência interfacial, onde $\pi$ e $\gamma$ representam a pressão da superfície e a tensão interfacial, respectivamente (Adaptado de QUINTANAR-GUERRERO <i>et al.</i> , 1998). .....	24
Figura 5 – Estrutura química da grandisina.....	25
Figura 6 – Resultados: (a) curva TG; (b) curva DSC; (c) Sobreposição curvas TG e DSC; (d) derivada TGA .....	41
Figura 7 – Estrutura química da grandisina, com demonstração da posição espacial de seus epímeros.....	42
Figura 8 – Varredura do espectro de absorção: (a) metanol e (b) solução metanólica de grandisina 50 $\mu$ g/mL.....	42
Figura 9 – Cromatograma da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm de 5 $\mu$ m), fase móvel ACN:MeOH na razão de 50:50 (v/v), com fluxo de 1 mL/min.....	43
Figura 10 – Cromatograma da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm de 5 $\mu$ m), fase móvel ACN:MeOH na razão de 70:30 (v/v), com fluxo de 1 mL/min.....	43
Figura 11 – Cromatograma da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm de 5 $\mu$ m), fase móvel ACN:MeOH na razão de 80:20 (v/v), com fluxo de 1 mL/min.....	44
Figura 12 – Cromatograma da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm de 5 $\mu$ m), fase móvel ACN:MeOH na razão de 90:10 (v/v), com fluxo de 1 mL/min.....	44

Figura 13 – Cromatograma da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm de 5 µm), fase móvel ACN:MeOH na razão de 90:10 (v/v), com fluxo de 0,5 mL/min.....	44
Figura 14 – Cromatograma da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm de 5 µm), fase móvel ACN:MeOH:H <sub>2</sub> O na razão de 50:30:20 (v/v), com fluxo de 1,0 mL/min. ....	45
Figura 15 – Cromatograma da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm de 5 µm), fase móvel ACN:MeOH:H <sub>2</sub> O na razão de 40:40:20 (v/v), com fluxo de 1,0 mL/min. ....	45
Figura 16 – Cromatograma da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm de 5 µm), fase móvel ACN:MeOH:H <sub>2</sub> O na razão de 30:50:20 (v/v), com fluxo de 1,0 mL/min. ....	46
Figura 17 – Cromatograma da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm de 5 µm), fase móvel ACN:MeOH:H <sub>2</sub> O na razão de 20:60:20 (v/v), com fluxo de 1,0 mL/min. ....	46
Figura 18 – Cromatograma da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm de 5 µm), fase móvel ACN:MeOH:H <sub>2</sub> O na razão de 10:70:20 (v/v), com fluxo de 1,0 mL/min. ....	46
Figura 19 – Cromatograma da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (100 x 4,6 mm de 5 µm), fase móvel ACN:MeOH:H <sub>2</sub> O na razão de 10:70:20 (v/v), com fluxo de 1,0 mL/min. ....	47
Figura 20 – Cromatograma da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (100 x 4,6 mm de 5 µm), fase móvel ACN:MeOH:H <sub>2</sub> O na razão de 10:70:20 (v/v), com fluxo de 1 mL/min. ....	48
Figura 21 – Curva de calibração da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (100 x 4,6 mm de 5 µm), fase móvel H <sub>2</sub> O:ACN:MeOH na razão de 20:10:70 (v/v), com fluxo de 1 mL/min. ....	48
Figura 22 – Cromatogramas da grandisina (a) e nanocápsulas brancas (b) obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (100 x 4,6 mm de 5 µm), fase móvel H <sub>2</sub> O:ACN:MeOH na razão de 20:10:70 (v/v), com fluxo de 1 mL/min. ....	50
Figura 23 – Cromatograma da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (100 x 4,6 mm de 5 µm), fase móvel ACN:MeOH:H <sub>2</sub> O na razão de 30:40:30 (v/v), volume de injeção de 20 µL, com fluxo de 1,0 mL/min.....	51

Figura 24 – Cromatograma da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm de 5 µm), fase móvel ACN:MeOH:H <sub>2</sub> O na razão de 30:40:30 (v/v), volume de injeção de 20 µL, com fluxo de 1,5 mL/min.....	52
Figura 25 – Cromatograma da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm de 5 µm), fase móvel ACN:MeOH:H <sub>2</sub> O na razão de 30:50:20 (v/v), volume de injeção de 50 µL, com fluxo de 1,5 mL/min.....	52
Figura 26 – Cromatograma da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm de 5 µm), fase móvel ACN:MeOH:H <sub>2</sub> O na razão de 30:50:20 (v/v), volume de injeção de 50 µL, com fluxo de 1,8 mL/min.....	52
Figura 27 – Cromatograma da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm de 5 µm), fase móvel ACN:MeOH:H <sub>2</sub> O na razão de 30:50:20 (v/v), volume de injeção de 50 µL, com fluxo de 1,8 mL/min.....	53
Figura 28 – Curva de calibração da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm de 5 µm), fase móvel H <sub>2</sub> O:ACN:MeOH na razão de 20:30:50 (v/v), com fluxo de 1,8 mL/min. ....	54
Figura 29 – Cromatogramas de teste de interferência do meio propilenoglicol:etanol (9:1), obtidos por CLAE-UV utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm de 5 µm), fase móvel H <sub>2</sub> O:ACN:MeOH na razão de 40:30:30 (v/v), com fluxo de 1 mL/min.....	55
Figura 30 – Separação gradual dos epímeros grandisina e epigrandisina com o aumento gradual do tensoativo LSS. ....	55
Figura 31 – Cromatogramas do tampão + 25% de LSS (a) e epímeros (b) obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm de 5 µm), fase móvel H <sub>2</sub> O:ACN:MeOH na razão de 30:30:40 (v/v), com fluxo de 0,5 mL/min. ....	56
Figura 32 – Transferência direta de solutos altamente hidrofóbicos entre micelas e fase estacionária modificada pelo tensoativo.....	58
Figura 33 – Concentração de grandisina remanescente nas nanocápsulas durante a realização do estudo de estabilidade, obtido por análise em CLAE.....	61
Figura 34 – Distribuição de tamanho das nanocápsulas durante o período do estudo de estabilidade. ....	62
Figura 35 – Perfil de liberação da grandisina livre e encapsulada (n = 4) pelo período de 48h. ....	63
Figura 36 – Perfil de liberação da grandisina encapsulada (n = 4) ao longo de 21 dias.....	64

Figura 37 – Grandisina cristalizada no óleo após a retirada do solvente orgânico....65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição sugerida para a preparação de nanocápsulas pelo método de nanoprecipitação .....	21
Tabela 2 – Meios utilizados nos estudos de solubilidade da grandisina. ....	29
Tabela 3 – Condições cromatográficas utilizadas no desenvolvimento de metodologia analítica. ....	31
Tabela 4 – Condições cromatográficas utilizadas no desenvolvimento de metodologia analítica. ....	33
Tabela 5 – Formulações de nanocápsulas com PLGA 85:15 testadas para otimização da obtenção das nanocápsulas.....	36
Tabela 6 – Quantidade de grandisina dissolvida em mg/mL de meio. ....	40
Tabela 7 – Resultado analítico da repetibilidade (precisão intra-corrída) do método validado.....	49
Tabela 8 – Resultado de tratamento estatístico por teste t de <i>Student</i> para verificação da precisão do método validado entre analistas e dias diferentes. ....	49
Tabela 9 – Análise estatística das variações testadas para verificação da robustez do método analítico validado.....	51
Tabela 10 – Diâmetro médio e índice de polidispersão obtidos das várias formulações com PLGA 85:15 testadas para otimização da obtenção de nanocápsulas. ....	58
Tabela 11 – EE% do fármaco encontrado para as formulações 4A (5 mg de grandisina), 4B (8 mg de grandisina), 4C (10 mg de grandisina) e 4D (12 mg de grandisina).....	59
Tabela 12 – Diâmetro médio e índice de polidispersão obtidos durante o período de 30 dias de estudo. ....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PLGA	Copolímero de ácido láctico e glicólico ou poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)
NPs	Nanopartículas
MDR	Resistência a Múltiplas Drogas
gp-P	glicoproteína-P
PdI	Índice de Polidispersibilidade
PCL	Poli( $\epsilon$ -caprolactona)
PACA	Poli(alquilocianoacrilato)
PEG	Poli(etilenoglicol)
PVAL	Álcool polivinílico
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
TG	Termogravimetria
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
ACN	Acetonitrila
MeOH	Metanol
EE%	Eficiência de encapsulação

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
2.1	NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	17
2.1.1	Nanocápsulas poliméricas.....	18
2.1.2	Métodos de preparação.....	19
2.1.2.1	Método de nanoprecipitação.....	20
2.2	GRANDISINA.....	25
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
4.1	MATERIAIS.....	28
4.1.1	Substâncias e Reagentes.....	28
4.1.2	Equipamentos e Utensílios Diversos.....	28
4.1.3	Membrana de diálise FisherBrand (peso molecular 12.000-14.000 Da) de celulose regenerada – Fisher Scientific, Reino Unido.....	29
4.2	MÉTODOS.....	29
4.2.1	Estudo da solubilidade da grandisina.....	29
4.2.2	Análise térmica.....	30
4.2.2.1	Termogravimetria (TG).....	30
4.2.2.2	Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	30
4.2.3	Determinação dos parâmetros analíticos para a grandisina.....	30
4.2.3.1	Determinação do comprimento de onda de absorção máxima da grandisina em espectrofotômetro.....	30
4.2.3.2	Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Método 01).....	31
4.2.3.2.1	Curva de calibração para grandisina.....	31
4.2.3.2.2	Precisão intra-corrída e inter-corrídas.....	32
4.2.3.2.3	Limites de quantificação e detecção.....	32
4.2.3.2.4	Robustez.....	32
4.2.3.2.5	Seletividade.....	33
4.2.3.3	Desenvolvimento de metodologia analítica por CLAE para experimentos de perfil de liberação (Método 02).....	33
4.2.3.3.1	Curva de calibração para grandisina.....	33
4.2.3.3.2	Avaliação de interferentes na metodologia analítica.....	34
4.2.3.3.3	Separação dos epímeros da grandisina.....	34
4.2.4	Preparo das nanocápsulas.....	34
4.2.4.1	Estudo de desenvolvimento da formulação.....	35
4.2.4.2	Avaliação da estabilidade físico-química das nanocápsulas.....	36
4.2.4.3	Diâmetro médio da partícula e índice de polidispersibilidade (Pdl).....	37
4.2.4.4	Avaliação do potencial zeta.....	37
4.2.5	Determinação da eficiência de encapsulação do fármaco.....	37
4.2.5.1	Separação do fármaco livre.....	37

4.2.5.2 Cálculo da eficiência de encapsulação .....	38
4.2.6 Perfil de liberação.....	38
4.2.6.1 Perfil de liberação da grandisina livre .....	38
4.2.6.2 Perfil de liberação da grandisina a partir das nanocápsulas .....	39
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>40</b>
5.1 TESTE DE SOLUBILIDADE .....	40
5.2 ANÁLISE TÉRMICA.....	40
5.3 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS PARA A GRANDISINA.....	42
5.3.1 Determinação do comprimento de onda de absorção máxima.....	42
5.3.2 Desenvolvimento de metodologia analítica por CLAE para determinação da grandisina (método 01).....	42
5.3.2.1 Curva de calibração para grandisina por CLAE-UV .....	48
5.3.2.2 Precisão .....	49
5.3.2.3 Limites de quantificação e detecção .....	50
5.3.2.4 Seletividade .....	50
5.3.2.5 Robustez.....	50
5.3.3 Desenvolvimento de metodologia analítica por CLAE para determinação da grandisina em experimentos de perfil de liberação (método 02).....	51
5.3.3.1 Curva de calibração para experimentos de perfil de liberação por CLAE-UV.....	54
5.3.3.2 Avaliação de interferentes na metodologia analítica.....	54
5.3.3.3 Separação dos epímeros da grandisina .....	55
5.4 PREPARO DAS NANOCÁPSULAS.....	58
5.4.1 Estudo de desenvolvimento da formulação.....	58
5.5 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE%) .....	59
5.5.1 Avaliação da estabilidade físico-química das nanocápsulas com grandisina.....	60
5.5.2 Avaliação do potencial zeta.....	61
5.5.3 Tamanho médio das partículas e índice de polidispersibilidade (Pdl).....	62
5.6 RESULTADOS DO PERFIL DE LIBERAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS DE GRANDISINA 1000 µg/mL .....	63
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>66</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a nanotecnologia, aplicada à medicina, trouxe significativos avanços no diagnóstico e tratamento de doenças (MONDAL *et al.*, 2010). Assim, numerosos estudos estão se concentrando no desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas com base em nanocarreadores, que têm demonstrado várias vantagens sobre as formulações convencionais, tornando esta linha de pesquisa uma área promissora e inovadora para o setor farmacêutico (MORAES *et al.*, 2010).

Mais especificamente, tomando o exemplo do tratamento do câncer, a quimioterapia convencional muitas vezes tem efeitos colaterais graves para os pacientes devido à sua ação não específica, uma vez que os medicamentos atuam tanto em células normais quanto nas cancerosas (ZHANG *et al.*, 2010). Portanto, os nanossistemas têm sido amplamente relatados na literatura científica como a nova geração de produtos farmacêuticos, devido às suas vantagens em comparação com a terapia convencional. Dentre essas vantagens podem ser citadas a melhoria da disponibilidade de compostos hidrofóbicos, a proteção dos compostos ativos contra a degradação enzimática ou ocasionada por pH extremo, e a possível liberação sustentada de compostos (MARTINS *et al.*, 2010). Estes sistemas de liberação de fármacos são, de fato, capazes de encapsular a substância ativa e conduzi-la a alvos específicos, sem alterar a estrutura química da molécula transportada (MORAES *et al.*, 2010). Os sistemas nanométricos carreadores de fármacos normalmente são produzidos empregando materiais poliméricos e/ou lipídicos, resultando em sistemas particulados ou vesiculares com capacidade para o transporte e liberação de fármacos (NEUMANN *et al.*, 2010), devendo estes ser biodegradáveis e biocompatíveis (CHOMOUCKA *et al.*, 2010). Existem diversos tipos diferentes de nanopartículas, tais como transportadores lipídicos, dendrímeros, nanopartículas metálicas e micro e nanopartículas poliméricas (MARTINS *et al.*, 2010).

Neste trabalho foi estudada a encapsulação da grandisina em nanopartículas poliméricas (nanocápsulas), uma formulação cujo potencial para administração por via injetável poderá viabilizar estudos adicionais pré-clínicos e clínicos da aplicação deste fármaco na terapêutica. A grandisina foi escolhida para aplicação desta tecnologia devido a suas propriedades físico-químicas e atividades antiparasitária,

citotóxica, antiangiogênica, antinociceptiva, anti-inflamatória e quimioprotetora (CARVALHO *et al.*, 2010; OLIVEIRA JÚNIOR *et al.*, 2007; VALADARES *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.*, 2011).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Durante as últimas décadas, tem havido um crescimento constante no número de sistemas nanoestruturados disponíveis para a terapia (WANG *et al.*, 2010), havendo um grande enfoque nas nanopartículas empregadas para o tratamento do câncer. Comumente, nanopartículas são definidas como partículas sólidas, usualmente em uma dispersão coloidal, que incluem nanosferas e nanocápsulas. As nanopartículas poliméricas podem ser preparadas tanto por métodos de polimerização *in situ* como a partir de polímeros pré-formados. Uma de suas características fundamentais é seu tamanho, geralmente a partir de 5-10 nm, com um limite superior de aproximadamente 1000 nm, embora a faixa geralmente obtida seja de 100-500 nm (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

As nanopartículas (NPs) são consideradas sistemas de liberação de fármacos muito versáteis, têm um considerável potencial para a vetorização de substâncias ativas e exibem várias vantagens sobre os sistemas de liberação convencionais. Algumas dessas vantagens são: alta estabilidade, o que confere longa vida útil no organismo; alta capacidade de transporte; viabilidade de incorporação de substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas; possibilidade de administração por meio de diversas vias. As nanopartículas também podem ser projetadas para permitir liberação controlada de fármacos a partir de uma matriz. Todas estas propriedades permitem melhoria da biodisponibilidade do fármaco, produzindo elevado nível de ação farmacológica e redução da frequência de dosagem. Mais importante, as nanopartículas podem reduzir o efeito MDR (Resistência a Múltiplas Drogas), que pode ocorrer na terapia com muitos fármacos anticâncer, através de um mecanismo de efluxo do fármaco das células mediado pela glicoproteína-P (gp-P) (YAN *et al.*, 2010).

Nanopartículas poliméricas estão sendo usadas para administrar produtos naturais, tais como a coenzima Q10, ácido elágico, estradiol, curcumina e quimioterápicos, como paclitaxel e doxorrubicina (RAVINDRAN *et al.*, 2010).

### 2.1.1 Nanocápsulas poliméricas

Nanosistemas poliméricos podem ser classificados em nanocápsulas e nanoesferas (MORAES *et al.*, 2009; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2010) de acordo com sua organização físico-química (MORAES *et al.*, 2009), sendo a obtenção de cada um desses sistemas dependente do método de preparação e dos materiais empregados (MORAES *et al.*, 2010; ARAÚJO *et al.*, 2009).

Nanocápsulas estão recebendo crescente atenção como transportadores de fármacos para diferentes áreas, tais como cosmética e farmacêutica (SANTANDER-ORTEGA *et al.*, 2010). Além disso, uma das principais vantagens das nanocápsulas, em comparação com as nanoesferas é a capacidade de obter uma maior carga do fármaco (TEIXEIRA *et al.*, 2010).

Nanocápsulas são sistemas vesiculares reservatório, formados por um núcleo oleoso ou aquoso rodeado por uma fina membrana polimérica (SANTANDER-ORTEGA *et al.*, 2010), que geralmente consiste de um polímero biocompatível e biodegradável (TEIXEIRA *et al.*, 2010). Neste caso, a substância ativa não fica somente dissolvida no núcleo, mas também pode estar adsorvida na membrana polimérica (ARAÚJO *et al.*, 2009; MORAES *et al.*, 2010). Além disso, conforme descrito na revisão de MORA-HUERTAS e colaboradores (2010), o núcleo da nanocápsula pode conter a substância ativa na forma líquida, sólida ou como uma dispersão molecular. Da mesma forma, este reservatório pode ser lipofílico ou hidrofílico de acordo com o método de preparação e as matérias-primas utilizadas. (Figura 1).

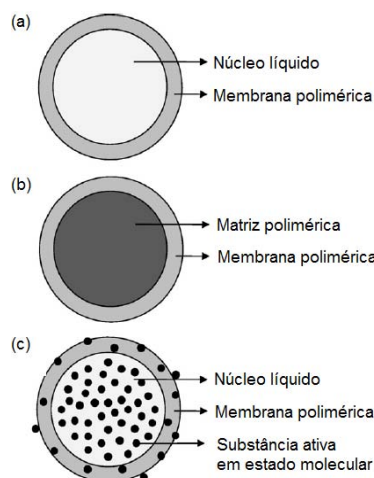
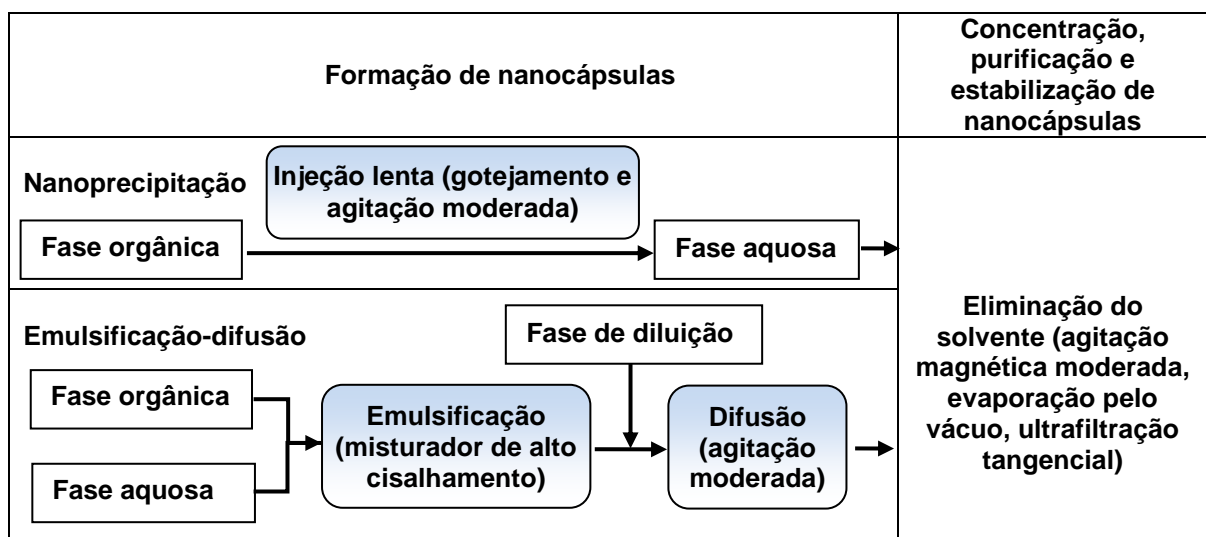


Figura 1 – Diferentes tipos de nanopartículas, (a) núcleo líquido; (b) matriz polimérica; (c) substância ativa em dispersão molecular (Adaptado de MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

A versatilidade destes sistemas para a encapsulação de uma grande variedade de fármacos, tais como peptídeos de baixo peso molecular ou material genético, amplia as possibilidades de emprego dos mesmos na terapêutica. Segundo diferentes autores, nanocápsulas utilizadas como transportadores de fármacos podem mascarar sabores desagradáveis, fornecer propriedades de liberação controlada de moléculas vulneráveis e proteger da degradação por fatores externos, como a luz, ou do ataque enzimático no seu trânsito através do trato digestivo. Além disso, os sistemas nanoencapsulados resultam em internalização celular de fármacos relativamente maiores quando em comparação com micropartículas. Este comportamento pode ser modificado dependendo de cargas superficiais das nanocápsulas e da natureza hidrofílica ou hidrofóbica do polímero utilizado na formação da membrana polimérica, e estas características do reservatório polimérico são posteriormente cruciais para a estabilidade das partículas a longo prazo (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010; SANTANDER-ORTEGA *et al.*, 2010).

### 2.1.2 Métodos de preparação

Existem seis métodos clássicos para a preparação de nanocápsulas: nanoprecipitação, emulsão-difusão, dupla emulsificação, emulsão-coacervação, revestimento polimérico (*polymer-coating*) e camada-por-camada (*layer-by-layer*) (KULTERER *et al.*, 2011; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010) (Figura 2).



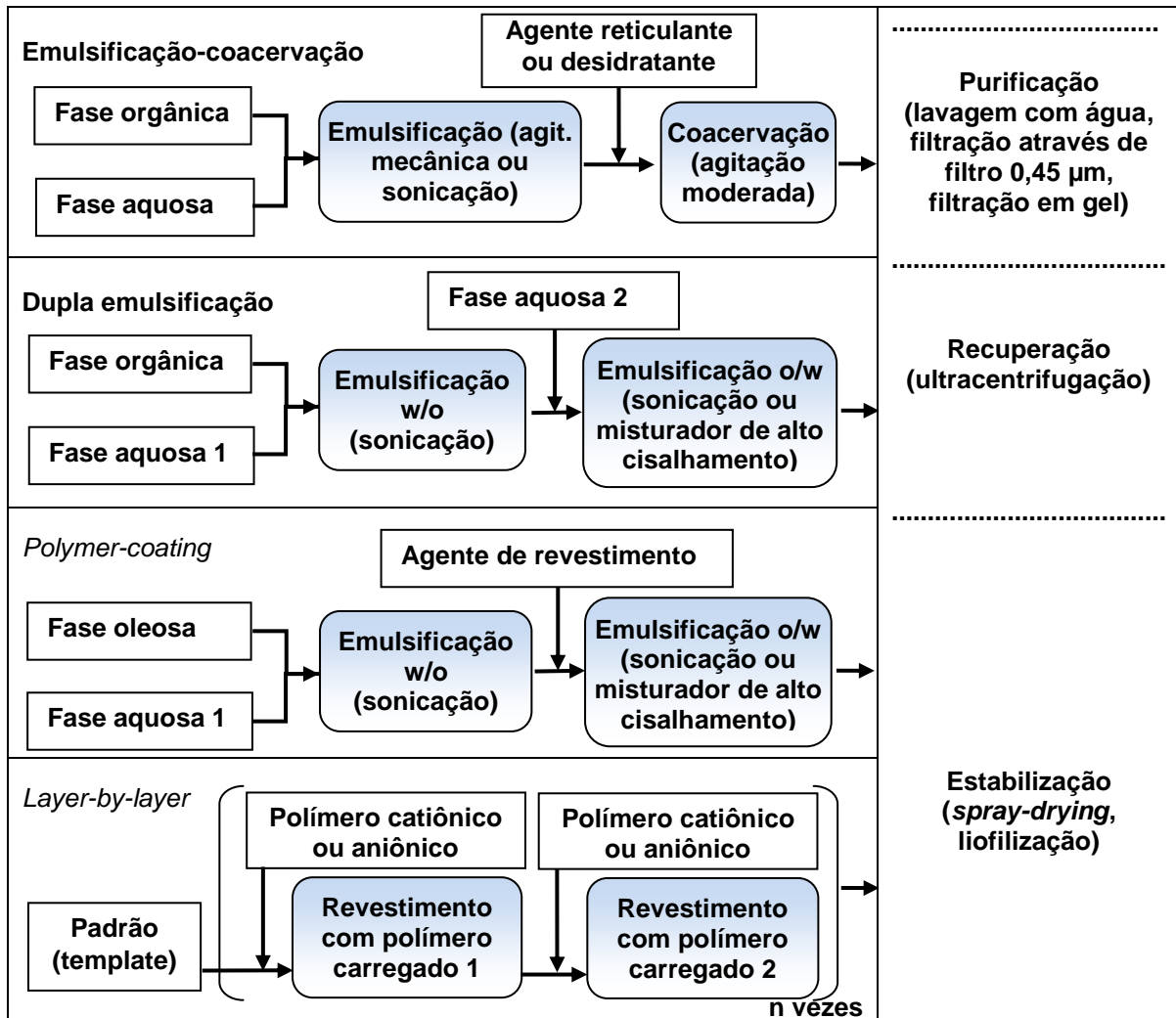


Figura 2 – Diferentes métodos para a preparação de nanocápsulas (Adaptado de MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

### 2.1.2.1 Método de nanoprecipitação

Devido ao grande interesse no estudo de nanopartículas biodegradáveis como sistemas de liberação de fármacos e aos progressos no campo da nanotecnologia farmacêutica nas últimas décadas, diferentes estratégias têm sido propostas para a produção de nanopartículas poliméricas, permitindo ampla modulação de suas características (BECK-BROICHSITTER *et al.*, 2010). Entre as inúmeras estratégias de fabricação, o método de nanoprecipitação, também chamado de deslocamento de solventes ou deposição interfacial, desenvolvido e patenteado por FESSI e colaboradores (1989), é conhecido por ser uma técnica conveniente para a produção de nanopartículas biodegradáveis (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998; BECK-BROICHSITTER *et al.*, 2010; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010; KULTERER *et al.*, 2010). O método é simples, rápido, econômico, e requer

baixas quantidades de solvente orgânico, produzindo partículas de pequeno tamanho em combinação com um estreito índice de polidispersibilidade (PDI) (KULTERER *et al.*, 2011).

Para a produção de nanocápsulas pelo método de nanoprecipitação são necessários uma substância formadora de filme, tal como um polímero (sintético, semi-sintético ou polímero natural) em solução; um solvente orgânico, ou uma mistura de solventes orgânicos (p.ex. etanol, acetona, hexano, cloreto de metileno ou dioxano); substância ativa; óleo; um tensoativo lipofílico; um solvente orgânico para a substância ativa ou para o óleo (se estes forem necessários); e finalmente a fase aquosa. A fase aquosa consiste de um solvente aquoso ou mistura de solventes aquosos, além de um ou mais tensoativos naturais ou sintéticos. No entanto, é possível usar duas fases orgânicas ou duas fases aquosas, desde que as condições de solubilidade, insolubilidade e miscibilidade sejam satisfeitas (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010; KULTERER *et al.*, 2011).

A composição sugerida para a preparação de nanocápsulas de 150-200 nm em escala laboratorial, usando o método de nanoprecipitação, é mostrada na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição sugerida para a preparação de nanocápsulas pelo método de nanoprecipitação

Material	Composição sugerida
Substância ativa	10-25 mg
Polímero	0.2-0.5% do solvente
Óleo	1.0-5.0% do solvente
Tensoativo a/o	0.2-0.5% do solvente
Solvente (fase orgânica)	25 ml
Agente estabilizante	0.2-0.5% do não-solvente
Não-solvente (fase aquosa)	50 ml

Fonte: MORA-HUERTAS *et al.*, 2010

Os polímeros comumente usados são poliésteres biodegradáveis, especialmente poli(e-caprolactona) (PCL), poli(ácido lático) e poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA). Eudragit<sup>®</sup> também pode ser usado, além de muitos outros polímeros, tal como o poli(alquiliacrilato) (PACA) (Khoee e Yaghoobian, 2008).

Além de substâncias ativas lipofílicas, o núcleo das nanocápsulas é composto por um tensoativo O/A e um óleo em que a solubilidade do fármaco seja a mais alta possível. Além disso, o óleo não deve ser tóxico, deve ser pouco solúvel no polímero e vice-versa, e não deve haver risco de degradação do polímero (Limayem *et al.*, 2006). Ressalta-se que os diferentes tipos de triglicerídeos cáprico/caprílico são usados frequentemente por existir ampla gama de substâncias ativas solúveis nos mesmos. Apesar de outros óleos e ésteres, como benzoato de benzila, ácido oléico, oleato de etila, óleo de argan, óleo de girassol e óleo de soja, não serem utilizados com frequência, podem originar bons resultados. No que diz respeito aos tensoativos O/A, ésteres e fosfolipídeos são os preferidos. Em relação aos solventes para polímeros, acetona é a escolha na maioria dos casos. Outros solventes, tais como etanol, são usados a fim de dissolver a substância ativa ou o óleo. Água ou soluções tampão podem ser usadas como não-solventes, enquanto o agente estabilizante na fase aquosa é geralmente o poloxamer 188 ou o polissorbato 80 (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

No método de nanoprecipitação, o polímero, o fármaco e opcionalmente um estabilizante lipofílico (ex., fosfolipídeos) são dissolvidos em um solvente miscível em água, tal como acetona ou etanol. Esta solução é vertida ou injetada em uma solução aquosa contendo um estabilizante (ex., álcool polivinílico ou poloxamer 188) sob agitação magnética. Assim, as nanocápsulas são formadas instantaneamente pela rápida difusão do solvente, o qual é então eliminado da suspensão sob pressão reduzida, obtendo-se uma dispersão coloidal (Figura 3) (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010). As variáveis chave do procedimento estão associadas com as condições da adição da fase orgânica na fase aquosa, tais como taxa de injeção da fase orgânica, velocidade de agitação da fase aquosa, método de adição da fase orgânica e razão fase orgânica/fase aquosa. Da mesma forma, as características das nanocápsulas são influenciadas pela natureza e concentração de seus componentes (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

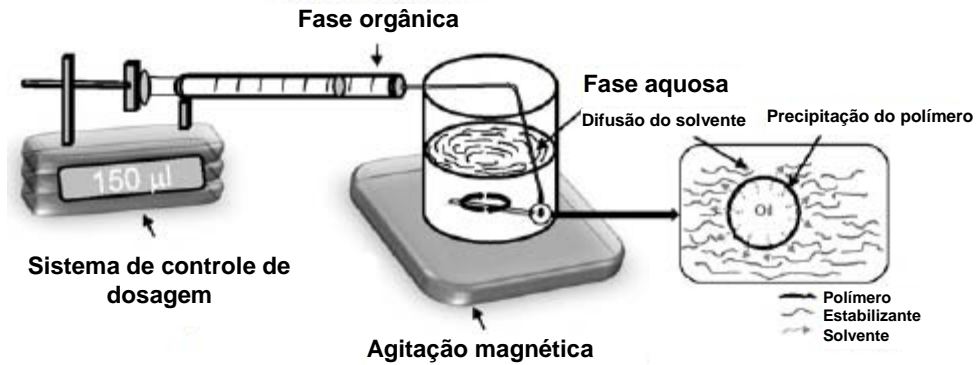


Figura 3 – Processo usado para a preparação de nanocápsulas pelo método de nanoprecipitação (Adaptado de MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

Embora existam controvérsias sobre o mecanismo de formação de nanocápsulas através desta técnica, a investigação sobre a precipitação do polímero e a difusão do solvente provou que ambas são úteis nesse processo (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

Com base na teoria da precipitação de polímeros, de Sugimoto (Sugimoto, 1987), Lince e colaboradores (2008) indicam que o processo de formação das partículas no método de nanoprecipitação compreende três fases: nucleação, crescimento e agregação. O andamento de cada etapa determina o tamanho da partícula, o qual é definido como a razão entre a concentração do polímero e a solubilidade do mesmo na mistura de solventes. A separação entre as etapas de nucleação e crescimento é o fator chave para a formação de partículas uniformes. Idealmente, as condições de operação devem permitir alta taxa de nucleação, fortemente dependente da supersaturação, e baixa taxa de crescimento.

Por outro lado, a partir das pesquisas realizadas por Davies em relação à transferência de massa entre dois líquidos e o efeito Gibbs–Marangoni (McManamey *et al.*, 1973; Davies, 1975), Quintanar e colaboradores (1998) explicaram a rápida formação das nanopartículas como um processo que ocorre devido às diferenças na tensão superficial geradas durante o deslocamento do solvente. A turbulência interfacial é causada pela redução localizada da tensão interfacial onde a fase oleosa sofre pulsações rápidas e irregulares ou “kicks”, cada um dos quais é rapidamente amortecido por arraste viscoso. A energia necessária para estes movimentos “jerky” (bruscos), originados da energia livre liberada através do solvente, retorna para o seu estado de equilíbrio. O mecanismo molecular da turbulência interfacial pode ser explicado pela formação contínua de turbilhões de solvente (ex., acetona) na interface. Esses turbilhões podem originar-se tanto na

formação da gota ou nas desigualdades térmicas no sistema. Assim, uma vez que o processo já foi iniciado, movimentos associados com “kicks” anteriores mudam a pressão no interior do solvente, pelo aumento da pressão na superfície ou diminuição da tensão interfacial. Assim, se as gotas de solvente formado contêm polímeros, estes tendem a se agregar e formar nanopartículas por causa da difusão contínua de solvente e por causa da presença de um meio não-solvente (Figura 4) (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998).

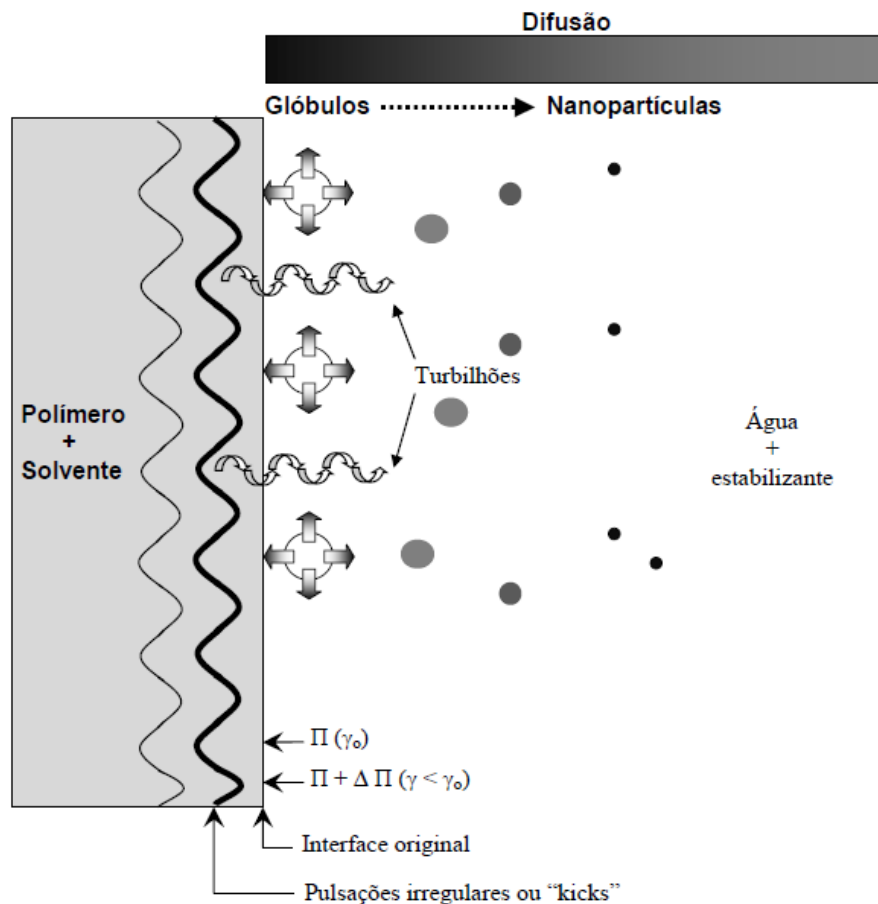


Figura 4 – Representação esquemática da formação de nanopartículas pelo deslocamento de solvente, baseado no mecanismo de turbulência interfacial, onde  $\pi$  e  $\gamma$  representam a pressão da superfície e a tensão interfacial, respectivamente (Adaptado de QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998).

O termo nanoprecipitação é frequentemente usado para definir este processo, entretanto, é importante ressaltar que, de acordo com o mecanismo descrito, a formação de nanocápsulas é devida à agregação do polímero em gotas da emulsão estabilizada, e as etapas de nucleação e crescimento não estão aparentemente envolvidas. A utilidade desta técnica está limitada a solventes miscíveis em água,

em que a taxa de difusão é suficiente para produzir emulsificação espontânea (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998).

## 2.2 GRANDISINA

A *Virola surinamensis*, conhecida popularmente como ucuúba branca, é uma planta típica da floresta amazônica e mata atlântica e é comumente utilizada no tratamento de erisipelas, cólicas e dispepsias, sendo que, estudos experimentais demonstraram que vários componentes desta planta possuem atividades anti-parasitárias contra *Schistosoma mansoni*, *Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani* e *Trypanosoma cruzi* (OLIVEIRA JÚNIOR *et al.*, 2007). As sementes e folhas desta planta mostraram ser ricas fontes de pesquisa de lignanas e neolignanas tetraidrofurânicas, como a grandisina (Figura 5). Tais substâncias apresentam potente atividade *in vitro* contra o parasita tripomastigota (CHICARO *et al.*, 1996).

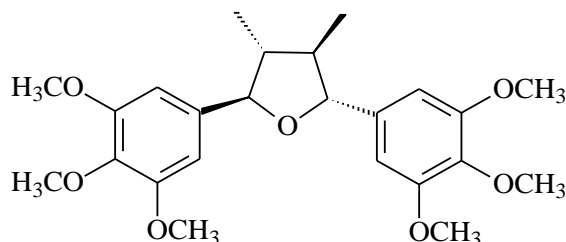


Figura 5 – Estrutura química da grandisina

Em estudos recentes, a grandisina demonstrou atividade antinociceptiva, anti-inflamatória (CARVALHO *et al.*, 2010) e potencial ação quimioprotetora dose dependente, prevenindo a fragmentação cromossômica induzida pela ciclofosfamida, apresentando-se assim como possível candidato a agente anti-câncer (OLIVEIRA JÚNIOR *et al.*, 2007; VALADARES *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.*, 2011).

Por outro lado, a obtenção de formulações aquosas para a grandisina mostrou-se um grande desafio por ser praticamente insolúvel em água. Assim, levando em consideração o grande potencial terapêutico desta substância, surgiu a proposta de incorporar a mesma em nanocápsulas poliméricas, com o objetivo de obter uma formulação farmacêutica em veículo aquoso, que futuramente possa ser

utilizada em ensaios in vivo na investigação das atividades terapêuticas da grandisina.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Obter e caracterizar nanocápsulas de PLGA contendo grandisina.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Efetuar a caracterização físico-química da grandisina (solubilidade e ponto de fusão através de análise térmica);
- Desenvolver metodologia analítica para determinação quantitativa da grandisina;
- Padronizar o método de obtenção e formação de nanocápsulas de PLGA com diâmetro de aproximadamente 200 nm e índice de polidispersão  $< 2,0$ ;
- Caracterizar as nanocápsulas obtidas quanto ao diâmetro médio e polidispersibilidade;
- Avaliar a estabilidade físico-química das nanocápsulas de PLGA contendo grandisina;
- Determinar a eficiência de encapsulação e carga de fármaco;
- Realizar estudo de perfil de liberação *in vitro*, da grandisina livre e encapsulada.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

#### 4.1.1 Substâncias e Reagentes

- Grandisina (fornecida pelo Prof. Dr. Massuo Jorge Kato, do Instituto de Química, Universidade de São Paulo)
- Acetona - Merck®
- Metanol - Merck®
- Álcool etílico - Merck®
- Fosfatidilcolina - Lipoid GmbH
- Pluronic F68® – Sigma Aldrich®
- Pluronic F127® – Sigma Aldrich®
- Trealose – Sigma Aldrich®
- Óleo de soja
- Fosfato de potássio monobásico anidro PA - Merck®
- Hidróxido de sódio PA - Merck®
- Poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) (85:15) - SIGMA (EUA)
- Água ultra-pura Milli-Q®
- Tampão Fosfato pH 7,4
- Acetonitrila HPLC – JT Baker, EUA.
- Fosfato de Sódio monobásico anidro PA – Merck, Alemanha.
- Metanol HPLC – JT Baker, EUA.

#### 4.1.2 Equipamentos e Utensílios Diversos

- Agitador de tubos Vortex VG3 – IKA, Alemanha
- Banho de Ultrassom USC-2899A – Unique, Brasil
- Coluna ChromSep SS OmniSpher 3 C18 (100x4,6 mm) 5 µm – Varian, EUA.
- Cromatógrafo – Bomba quaternária (ProStar 240), com amostrador automático (ProStar 410) e detector na região do ultravioleta (ProStar 310) – Varian, EUA.

- Espectrofotômetro CARY UV-Visível – Varian, EUA.

**4.1.3. Membrana de diálise FisherBrand (peso molecular 12.000-14.000 Da) de celulose regenerada – Fisher Scientific, Reino Unido.**

- Mini-Incubadora Ma 410 – Marconi, Brasil.
- ZetaSizer Nano-S – Malvern Instruments, Reino Unido.
- Zetaplus - Brookhaven Instruments Corporation.

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Estudo da solubilidade da grandisina

A solubilidade da grandisina foi avaliada em diferentes meios, conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2 – Meios utilizados nos estudos de solubilidade da grandisina.

Meio	Condições do teste
Metanol	25°C, agitação manual
Tampão KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.4	37°C ± 0,5°C, agitação mecânica a 150 rpm
Tampão KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.4 + 5% álcool etílico	
Tampão KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.4 + 5% tween 80	
Tampão NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.4 + 5% lauril sulfato de sódio	

Os testes foram realizados em duplicata. Um excesso de grandisina foi adicionado a cada recipiente contendo meio, posteriormente submetido a agitação (manual por 5 min, para o metanol, ou mecânica, em mini-incubadora com agitação orbital, por 24 horas, para os outros meios).

Após a agitação, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos, uma alíquota do sobrenadante foi coletada e filtrada (filtro PVDF). A quantificação do fármaco presente na amostra foi feita por CLAE (itens 4.2.3.2 e 4.2.3.3).

## 4.2.2 Análise térmica

### 4.2.2.1 Termogravimetria (TG)

Para esse teste, aproximadamente 5 mg de grandisina foram individualmente pesados e colocados em cadinho de platina. Antes do ensaio termogravimétrico foi realizada a calibração da termobalança, usando amostra de oxalato de cálcio monoidratado. Foi realizada, ainda, corrida em branco. As condições do teste foram as seguintes:

- Razão de aquecimento:  $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ;
- Faixa de aquecimento: entre  $25^{\circ}\text{C}$  (temperatura ambiente) e  $650^{\circ}\text{C}$ ;
- Composição e fluxo do gás de purga:  $\text{N}_2$  sob vazão de  $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

### 4.2.2.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Aproximadamente 2 mg de grandisina foram pesados em cadinho de alumínio, posteriormente tampado e selado. Antes dos ensaios em DSC, o eixo de temperatura da célula foi calibrado utilizando padrões de índio e zinco. Dois cadinhos vazios foram tampados e selados para serem utilizados como referência e branco.

Os parâmetros utilizados para os experimentos foram:

- Razão de aquecimento:  $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ;
- Faixa de aquecimento: entre  $25^{\circ}\text{C}$  (temperatura ambiente) e  $400^{\circ}\text{C}$ ;
- Composição e fluxo do gás de purga:  $\text{N}_2$  sob vazão de  $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

## 4.2.3 Determinação dos parâmetros analíticos para a grandisina

### 4.2.3.1 Determinação do comprimento de onda de absorção máxima da grandisina em espectrofotômetro

Foi realizada varredura do espectro de absorbância no intervalo de comprimento de onda de 200 nm a 400 nm de uma solução de grandisina em metanol na concentração de  $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ .

A análise espectrofotométrica no ultravioleta foi realizada obedecendo às condições limite de absorvância de 0,2 a 1,5, utilizando cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm.

#### 4.2.3.2 Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Método 01)

Amostra de grandisina foi dissolvida em metanol em quantidade suficiente para obter uma solução de concentração 1,5 mg/mL. Foram avaliadas as condições cromatográficas variando fases móveis e fluxos, conforme demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3 – Condições cromatográficas utilizadas no desenvolvimento de metodologia analítica.

Fase Móvel	Proporção (v/v)	Fluxo (mL/min)	Modo	Coluna	Detector	Temperatura	Volume de injeção
ACN:MeOH	50:50	1,0	Isocrático	C <sub>18</sub> , 250x4,6 mm, 5 µm	UV-Vis (269 nm)	Ambiente (25°C)	20 µL
	70:30						
	80:20						
	90:10	0,5					
ACN:MeOH:H <sub>2</sub> O	50:30:20	1,0					
	40:40:20						
	30:50:20						
	20:60:20						
	10:70:20			C <sub>18</sub> , 100x4,6 mm, 5 µm			

O método cromatográfico selecionado foi então validado segundo Resolução – RE nº 899, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Análise estatística dos dados foi efetuada utilizando o programa GraphPad Prism 5.

##### 4.2.3.2.1 Curva de calibração para grandisina

Para construção da curva de calibração foram preparadas sete soluções de grandisina em metanol. Inicialmente foi preparada uma solução-mãe de 1mg/mL de grandisina. Esta solução foi sequencialmente diluída, obtendo-se as seguintes concentrações: 150 µg/mL; 100 µg/mL; 75 µg/mL; 50 µg/mL; 25 µg/mL; 10 µg/mL e 5 µg/mL, que foram preparadas em triplicata.

As leituras das áreas obtidas após injeção das soluções foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), usando equipamento com detector UV-Vis (Varian), coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (100 mm x 4,6 mm x 5 µm). As

condições cromatográficas foram: acetonitrila, metanol e água na proporção de 10:70:20 como fase móvel, em modo isocrático, fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 µL, temperatura ambiente e tempo de corrida de 4 minutos.

#### 4.2.3.2.2 *Precisão intra-corrída e inter-corrídas*

A repetibilidade ou precisão foram avaliadas a partir do cálculo de desvio padrão relativo (DPR) (Equação 1).

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (1)$$

Onde DP é o desvio padrão e CMD a concentração média determinada.

Para determinação da precisão foram realizadas seis determinações a 100% da concentração teste, em dias diferentes por analistas diferentes.

#### 4.2.3.2.3 *Limites de quantificação e detecção*

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram obtidos a partir dos coeficientes angular e linear das curvas analíticas aplicados às Equações 2 e 3.

$$LD = \frac{DP \times 3}{IC} \quad (2)$$

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC} \quad (3)$$

Onde DP é o desvio padrão do intercepto com o eixo y e IC a inclinação da curva analítica média.

#### 4.2.3.2.4 *Robustez*

Para avaliar a robustez do método cromatográfico, pequenas variações nos parâmetros analíticos do mesmo foram realizadas para avaliar a sua susceptibilidade às variações nas condições analíticas. Os parâmetros analíticos avaliados foram comprimento de onda, alterado de 269 nm para 268 e 270 nm; o

fluxo inicial de 1 mL/min foi alterado para 0,95 e 1,05 mL/min; e a proporção da fase móvel foi modificada de 70:30 (MeOH/(H<sub>2</sub>O/ACN)) (v/v) para 72:28 (MeOH/(H<sub>2</sub>O/ACN)) (v/v) e 68:32 (MeOH/(H<sub>2</sub>O/ACN)) (v/v).

#### 4.2.3.2.5 Seletividade

Com o intuito de verificar a existência de possíveis interferentes dos excipientes da formulação no método desenvolvido (item 4.2.3.2), nanocápsulas sem fármaco (brancas) foram produzidas e rompidas, conforme descrito no item 4.2.5. e injetadas no CLAE.

#### 4.2.3.3 Desenvolvimento de metodologia analítica por CLAE para experimentos de perfil de liberação (Método 02)

Amostra de grandisina foi dissolvida em metanol em quantidade suficiente para obter solução com concentração 1,5 mg/mL. Diluições desta solução em metanol foram posteriormente misturadas na proporção 1:1 com solução tampão fosfato pH 7,4, acrescida de 5% de lauril sulfato de sódio. Foram avaliadas diferentes condições cromatográficas: proporções da fase móvel, fluxo e coluna, conforme demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4 – Condições cromatográficas utilizadas no desenvolvimento de metodologia analítica.

Fase Móvel	Proporção (v/v)	Fluxo (mL/min)	Modo	Coluna	Detector	Temperatura	Volume de injeção
ACN:MeOH:H <sub>2</sub> O	30:40:30	1,0	Isocrático	C <sub>18</sub> , 100x4,6 mm, 5 µm	UV-Vis (269 nm)	Ambiente (25°C)	20 µL
		1,5					50 µL
	30:50:20	1,5		C <sub>18</sub> , 250x4,6 mm, 5 µm			50 µL
		1,8					50 µL

#### 4.2.3.3.1 Curva de calibração para grandisina

Para construção da curva de calibração foram preparadas oito soluções de grandisina em metanol. Inicialmente foi preparada uma solução-mãe de 0,1 mg/mL de grandisina. Esta solução foi sequencialmente diluída, obtendo-se as seguintes concentrações: 50 µg/mL; 40 µg/mL; 30 µg/mL; 20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 1 µg/mL, e 0,8 µg/mL. As diluições foram preparadas em triplicata.

As leituras das áreas obtidas após injeção das soluções foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), usando equipamento com detector UV-Vis (Varian), coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (250 mm x 4,6 mm x 5 µm) e as condições cromatográficas foram: acetonitrila, metanol e água na proporção de 30:50:20 como fase móvel, em modo isocrático, fluxo de 1,8 mL/min, volume de injeção de 50 µL, coluna em temperatura ambiente e tempo de corrida de 5 minutos. As curvas de calibração (n=3) foram construídas a partir das médias das áreas dos picos versus as concentrações de grandisina.

#### 4.2.3.3.2 *Avaliação de interferentes na metodologia analítica*

Para viabilizar os ensaios de dissolução e devido à não solubilidade aquosa da grandisina, foi necessária a realização de testes de solubilidade do fármaco em meios aquosos adicionados de tensoativos. Assim, através dos testes realizados, obteve-se a solubilização da grandisina em tampão fosfato de sódio pH 7.4, contendo 5% de lauril sulfato de sódio. Também, por motivo do estudo de perfil de liberação, foi necessário preparar uma solução mais concentrada da grandisina livre (não nanoestruturada), a fim de se obter perfis comparativos. Para tanto, foi utilizado o meio propilenoglicol/etanol (9:1) como solvente da grandisina. Contudo, foi necessário confirmar qualquer possível interferência desta solução no método de quantificação descrito no item 4.2.3.3.

#### 4.2.3.3.3 *Separação dos epímeros da grandisina*

No seguinte experimento observou-se a separação do pico cromatográfico original do fármaco em dois picos. À medida em que a concentração do lauril sulfato de sódio (LSS) era aumentada na solução, era possível visualizar uma melhor resolução entre estes dois picos através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

### 4.2.4 **Preparo das nanocápsulas**

Nanocápsulas contendo grandisina foram obtidas partindo-se do método de deposição interfacial de polímero pré-formado (nanoprecipitação) (FESSI *et al.*,

1989), com algumas modificações nas concentrações dos componentes da formulação e utilização de metanol e acetona na proporção de 1:1 para dissolver a fosfatidilcolina. A fase interna (orgânica), constituída de PLGA (85:15), fosfolípido de soja, óleo de soja e grandisina foi inicialmente preparada em temperatura ambiente ( $\approx 25^{\circ}\text{C}$ ). Soluções foram preparadas dissolvendo o polímero em 7mL de acetona, o óleo de soja e a grandisina em 10mL de acetona, a fosfatidilcolina em uma mistura de 5mL de metanol e 5mL de acetona. A fase externa (aquosa) foi preparada com adição dos tensoativos hidrofílicos Pluronic F68<sup>®</sup> e F127<sup>®</sup> na proporção de 1:1 em tampão fosfato pH 7,4. Após essas preparações terem sido concluídas, as soluções orgânicas foram misturadas e introduzidas lentamente na solução aquosa (fase aquosa), que foi previamente preparada e mantida sob agitação moderada. A adição da fase orgânica à fase aquosa foi realizada pela infusão com fluxo uniforme e contínuo, utilizando seringa com agulha G23 (Gauge 23), que corresponde à medida do diâmetro interno de 0,3175mm, anteriormente padronizado para nanocápsulas de PLA (TEIXEIRA *et al.*, 2007), através da imersão do bisel na fase aquosa. O produto dessa mistura foi uma nanoemulsão, que foi colocada sob agitação controlada, sem que houvesse formação de espuma, por 30 minutos, a fim de que as nanocápsulas ficassem homogêneas após a evaporação do solvente (através do processo de rotaevaporação), ocorrendo precipitação do polímero em volta da gotícula da emulsão. A acetona e o metanol, os quais rapidamente se difundem através da fase aquosa, foram então removidos sob pressão reduzida, de aproximadamente 600 ATM a  $40^{\circ}\text{C}$  (através do processo de rotaevaporação), originando uma dispersão coloidal. Esta dispersão coloidal foi concentrada para um volume final de 10mL pela remoção da água sob as mesmas condições (SANTOS *et al.*, 2005). As nanocápsulas formadas foram avaliadas quanto ao Pdl e diâmetro médio pela técnica de espalhamento dinâmico de luz, e quanto ao conteúdo de fármaco encapsulado.

#### 4.2.4.1 Estudo de desenvolvimento da formulação

Durante o estudo de pré-formulação foram testadas diferentes condições, conforme demonstrado na tabela 5.

Inicialmente foram variadas as quantidades do polímero, e posteriormente de tensoativo hidrofílico, utilizados para a produção das nanocápsulas, segundo a técnica descrita no item 4.2.4.

Tabela 5 – Formulações de nanocápsulas com PLGA 85:15 testadas para otimização da obtenção das nanocápsulas.

Componentes das formulações	Formulações			
	1	2	3	4
PLGA 85:15 (0,57 dl/g) (mg)	150	165	200	150
PC L100 99% (mg)	150	150	150	150
Óleo de soja (mg)	100	100	100	100
Metanol (mL)	5	5	5	5
Acetona (mL)	22	22	22	22
Tampão fosfato pH 7.4 (mL)	50	50	50	50
Poloxamer (Pluronic F68®) (mg)	150	150	150	75
Poloxamer (Pluronic F127®) (mg)	-	-	-	75

Após a definição da formulação com as características mais próximas das ideais ( $PdI < 0,2$  e diâmetro médio  $< 200nm$ ), concentrações de 0,5; 0,8; 1,0 e 1,2 mg/mL de grandisina foram incorporadas na intenção de avaliar a eficiência máxima de encapsulação e a obtenção da formulação com a maior carga de fármaco possível.

#### 4.2.4.2 Avaliação da estabilidade físico-química das nanocápsulas

Dispersões de nanocápsulas ( $n=3$  para cada formulação) foram analisadas logo após a sua obtenção e nos intervalos de 1, 5, 10 e 30 dias, sendo as mesmas armazenadas durante este período em geladeira ( $4^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ ).

Na avaliação da estabilidade físico-química destas dispersões as análises realizadas seguiram as metodologias descritas abaixo, adaptadas de Santos e colaboradores (2005) e Teixeira e colaboradores (2007).

##### a) Aspectos macroscópicos

As seguintes características físicas da formulação foram analisadas: coloração, translucência azulada, deposição de resíduos e/ou cristais, formação de grumos, cremagem ou nata sobrenadante, gotículas de óleo aderidas ao vidro, floculação ou separação de fases. Essa análise foi feita por observação visual.

#### b) Estudo da variação do pH

A variação do pH foi analisada utilizando-se um potenciômetro digital equipado com eletrodo de vidro e sensor de temperatura. A dispersão de nanocápsulas (com e sem fármaco) foi colocada em béquer, para que o eletrodo introduzido permitisse a leitura imediata do pH das formulações.

#### 4.2.4.3 Diâmetro médio da partícula e índice de polidispersibilidade (Pdl)

Amostra de nanocápsulas foi diluída em cerca de 1 mL (1:200) de água Milli-Q, e avaliada quanto ao diâmetro médio das partículas e seu respectivo índice de polidispersão (Pdl) por técnica de espalhamento dinâmico de luz a 25°C em equipamento Zetasizer (Malvern).

#### 4.2.4.4 Avaliação do potencial zeta

Cerca de 1 mL de uma diluição (1:150), em água Milli-Q, da dispersão de nanocápsulas (com e sem fármaco) foi avaliado quanto ao potencial zeta em equipamento Zetaplus (Brookhaven Instruments Corporation) pela técnica de mobilidade eletroforética.

### **4.2.5 Determinação da eficiência de encapsulação do fármaco**

#### 4.2.5.1 Separação do fármaco livre

Para a separação do fármaco livre, uma alíquota de 1 mL da dispersão de nanocápsulas foi centrifugada por 15 minutos a 3000 rpm, formando precipitado no fundo do eppendorf que consistiu de fármaco precipitado, não encapsulado. A quantificação do fármaco livre foi efetuada por diferença, determinando-se a quantidade de fármaco mantida na dispersão coloidal, contido nas nanocápsulas. Para a quantificação do fármaco, 50 µL do sobrenadante foram adicionados a 950 µL de metanol grau CLAE. Essa mistura foi agitada em vortex por 1 minuto e centrifugada novamente por 15 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi filtrado em

filtro PVDF de porosidade 0,45 µm e analisado através do método cromatográfico descrito no item 4.2.3.2.

#### 4.2.5.2 Cálculo da eficiência de encapsulação

Para calcular a eficiência de encapsulação, 50 µL da dispersão de nanocápsulas filtrada, obtidos pela técnica descrita no item 4.2.5.1, foram rompidos com 950 µL de metanol (diluição 1:20 (v/v)), sendo o material obtido centrifugado por 15 minutos a 3000 rpm, filtrado em filtro PVDF de porosidade 0,45 µm e analisado através do método cromatográfico descrito no item 4.2.3.2.

O cálculo foi realizado através da equação 4.

$$x = \left( \frac{y+3,6838}{4,0991} \right) \times 20 \quad (4)$$

Onde:  $y$  é a área encontrada através da análise cromatográfica e  $x$  a concentração de grandisina obtida.

### 4.2.6 Perfil de liberação

#### 4.2.6.1 Perfil de liberação da grandisina livre

O perfil de liberação da grandisina livre foi determinado como a concentração de grandisina permeada de uma solução para o meio receptor (tampão fosfato pH 7,4, com 5% de lauril sulfato de sódio a 37°C) em função do tempo. Por causa da baixa solubilidade da grandisina em meio aquoso, uma mistura de propilenoglicol/etanol (9:1) (CHEN et al., 2010) foi utilizada para obter uma solução com a concentração desejada de grandisina.

A liberação de grandisina foi realizada através de um sistema de diálise adaptado em mini-incubadora com agitação orbital, nas seguintes condições: volume de 10mL do meio receptor, temperatura de 37°C e agitação constante ( $\approx 77$  rpm). Foram utilizadas membranas de diálise de acetato de celulose, tubulares, de 6,37 mm de diâmetro e poro de 12.000 a 15.000 Daltons. Sacos para diálise foram montados a partir dessas membranas, onde foi inserido 1mL da solução de

grandisina com concentração de 1 mg/mL. O tubo de diálise foi mergulhado no meio receptor e a liberação de grandisina foi avaliada em intervalos pré-determinados de tempo. Nos pontos 3, 6, 9, 12, 24, 36 e 48h foram retiradas alíquotas de 0,5 mL do meio receptor, sendo feita a reposição desse volume nas mesmas condições de temperatura.

As alíquotas retiradas foram analisadas por CLAE, para determinar o conteúdo de grandisina liberada, como descrito no item 4.2.3.3.

#### 4.2.6.2 Perfil de liberação da grandisina a partir das nanocápsulas

O perfil de liberação da grandisina encapsulada foi determinado como a concentração de grandisina permeada de uma dispersão de nanocápsulas para o meio receptor (tampão fosfato pH 7,4, com 5% de lauril sulfato de sódio a 37°C) em função do tempo.

A liberação de grandisina foi realizada através de um sistema de diálise adaptado em mini-incubadora com agitação orbital, nas seguintes condições: volume de 10mL do meio receptor, temperatura de 37°C e agitação constante ( $\approx 77$  rpm). Foram utilizadas membranas de diálise de acetato de celulose, tubulares, de 6,37 mm de diâmetro e poro de 12.000 a 15.000 Daltons, onde foi inserido 1mL da dispersão de nanocápsulas com concentração de 1 mg/mL de grandisina. O tubo de diálise foi mergulhado no meio receptor e a liberação de grandisina foi avaliada em intervalos de tempo. Nos pontos 0,125, 0,25, 0,375, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21 dias foram retiradas alíquotas de 0,5 mL do meio receptor, sendo feita a reposição desse volume nas mesmas condições de temperatura.

As alíquotas retiradas foram analisadas por CLAE, para determinar o conteúdo de grandisina liberada, como descrito no item 4.2.3.3.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 TESTE DE SOLUBILIDADE

Na maior parte dos meios aquosos não foi possível quantificar a grandisina, o que comprovou sua insolubilidade nestes meios. Já no tampão fosfato de sódio pH 7,4, com 5% de lauril sulfato de sódio, e no metanol, foi possível quantificar o fármaco e determinar sua solubilidade (Tabela 6).

Tabela 6 – Quantidade de grandisina dissolvida em mg/mL de meio.

Solvente utilizado	Quantidade de fármaco dissolvido (mg/mL)	Resultado de acordo com farmacopéia brasileira 4ª Ed. e USP 30
Metanol	25,5	1 parte da grandisina em 40 de solvente (parcialmente solúvel)
Tampão KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4	n/q	n/q
Tampão KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4 + 5% álcool etílico	n/q	n/q
Tampão KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4 + 5% tween 80	n/q	n/q
Tampão NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4 + 5% lauril sulfato de sódio	0,34352	1 parte da grandisina em 2911 de solvente (muito pouco solúvel)

n/q: valor abaixo do limite de quantificação.

A utilização do tensoativo lauril sulfato de sódio somente em associação com o tampão fosfato de sódio pH 7,4 se deve à incompatibilidade do mesmo em presença de sais de potássio, o que leva à formação de precipitados (ROWE *et al.*, 2009).

Foi observada solubilidade parcial em metanol. Já em relação ao lauril sulfato de sódio, este foi responsável por promover a solubilização micelar da grandisina visto que os tensoativos são reconhecidamente utilizados na solubilização de substâncias lipofílicas, como o fármaco em questão (BERNARDES *et al.*, 2006).

### 5.2 ANÁLISE TÉRMICA

O objetivo da análise térmica neste trabalho foi verificar o comportamento da grandisina com a elevação gradativa da temperatura, por motivo da realização de experimentos com temperatura acima da ambiente, obtendo também dados referentes ao comportamento termo-analítico desta molécula, que ainda não possui estas características descritas em literatura. Os resultados obtidos a partir das

técnicas de análise térmica termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial (Figura 6) mostraram dois pontos de fusão (103,05°C e 118,88°C) do fármaco, e através da derivada DTG pode-se observar uma perda de massa de aproximadamente 88%, resultante de um processo de degradação iniciado a partir da temperatura de 286,47°C. Por estes resultados, foi possível garantir a estabilidade térmica da grandisina nas temperaturas necessárias para a preparação das nanocápsulas (por volta de 40°C).

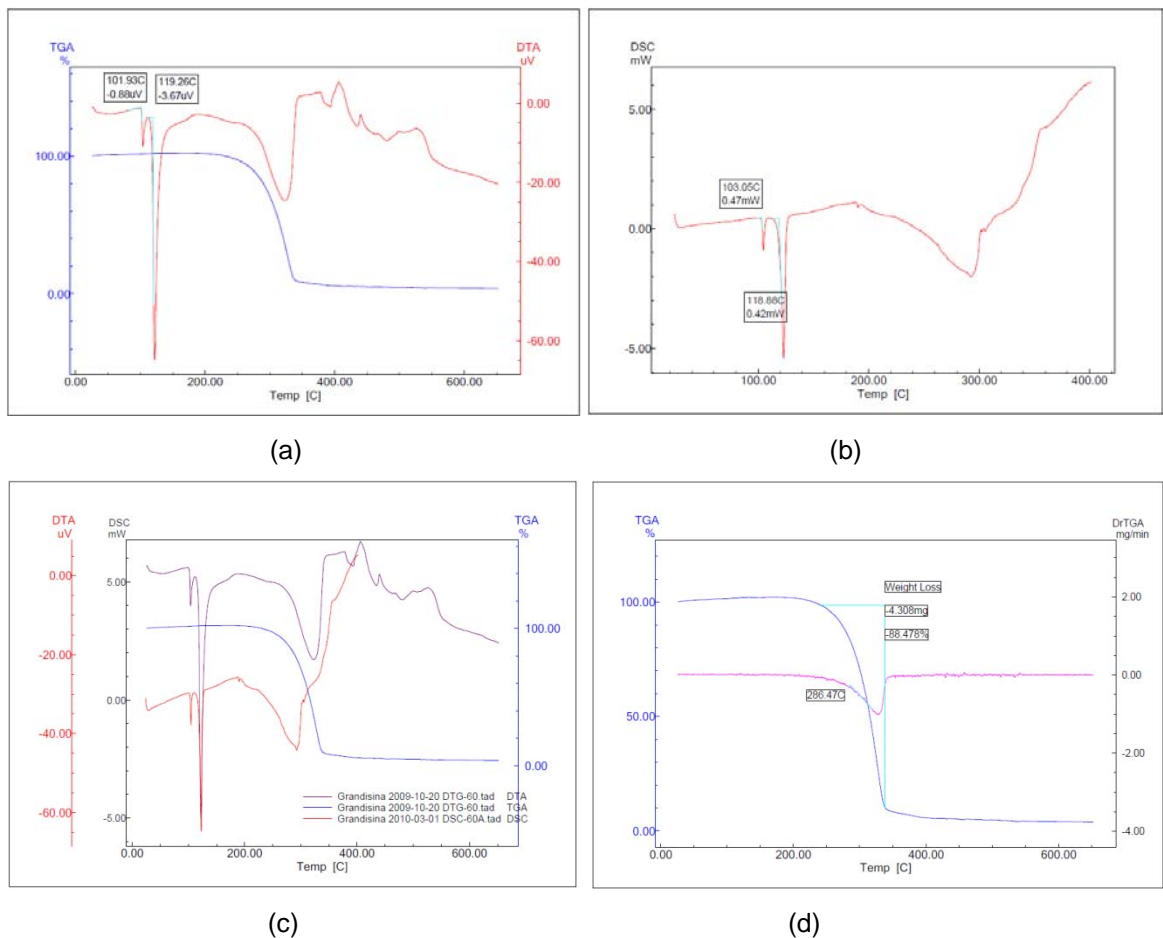


Figura 6 – Resultados: (a) curva TG; (b) curva DSC; (c) Sobreposição curvas TG e DSC; (d) derivada TGA

A observação de dois pontos de fusão foi devida ao fato de que a grandisina é uma mistura epimérica (Figura 7), em que a (+)-grandisina é o composto majoritário, e a epigrandisina o composto secundário (33% da mistura) (GREGER *et al.*, 2000). Portanto, como a grandisina apresenta mais de um centro quiral, tem-se neste caso dois diastereoisômeros facilmente identificáveis através do ponto de fusão. Neste tipo de isomeria, as moléculas apresentam características físicas diferentes, o que não

ocorre com os enantiômeros, que apresentam solubilidade e ponto de fusão iguais (LIMA, 1997).

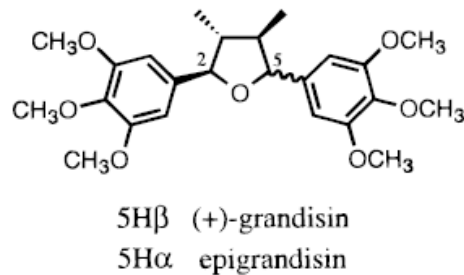


Figura 7 – Estrutura química da grandisina, com demonstração da posição espacial de seus epímeros

### 5.3 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS PARA A GRANDISINA

#### 5.3.1 Determinação do comprimento de onda de absorção máxima

Conforme pode ser verificado na Figura 8, o comprimento de onda de absorção máxima da grandisina encontrado foi de 269 nm.

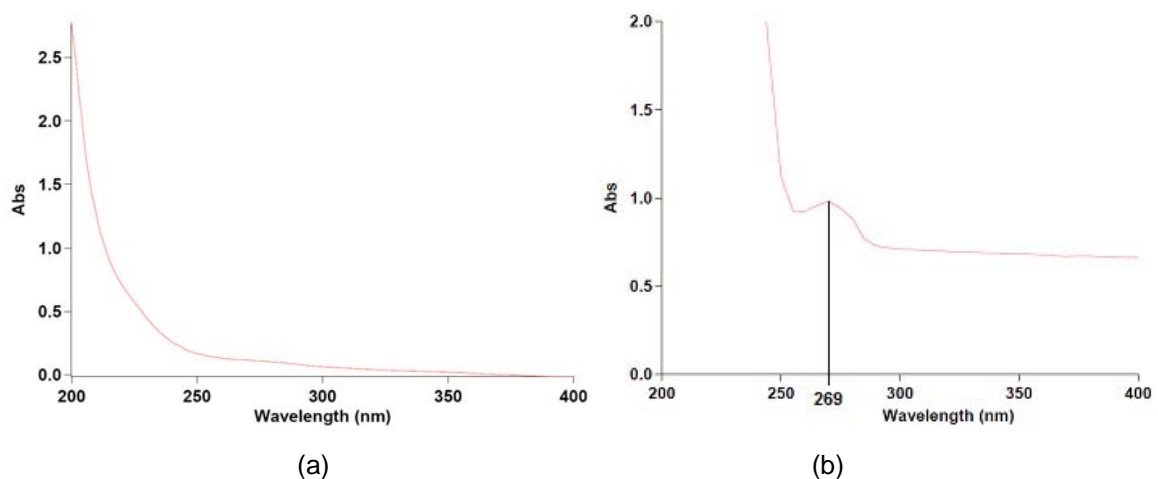


Figura 8 – Varredura do espectro de absorção: (a) metanol e (b) solução metanólica de grandisina 50 $\mu$ g/mL.

#### 5.3.2 Desenvolvimento de metodologia analítica por CLAE para determinação da grandisina (método 01)

Não existem relatos na literatura acerca de métodos analíticos para a quantificação da grandisina, sendo necessário desenvolver um método por CLAE.

Para o desenvolvimento do método cromatográfico, diferentes condições analíticas foram testadas, conforme demonstrado nas figuras 9 a 13. Foi constatado que as variações da proporção da fase móvel e do fluxo deslocaram o pico da grandisina. À medida em que a proporção de acetonitrila era aumentada na mistura da fase móvel (ACN:metanol), a redução na polaridade da fase móvel prolongou o tempo de eluição do fármaco. Da mesma forma, a redução da vazão também provocou o aumento do tempo de eluição, provocando também um ligeiro alargamento do pico.

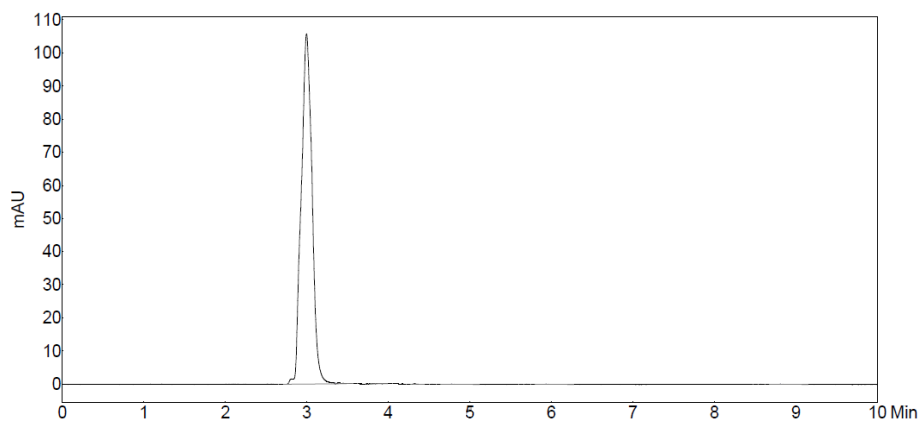


Figura 9 – Cromatograma da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm de 5  $\mu$ m), fase móvel ACN:MeOH na razão de 50:50 (v/v), com fluxo de 1 mL/min.

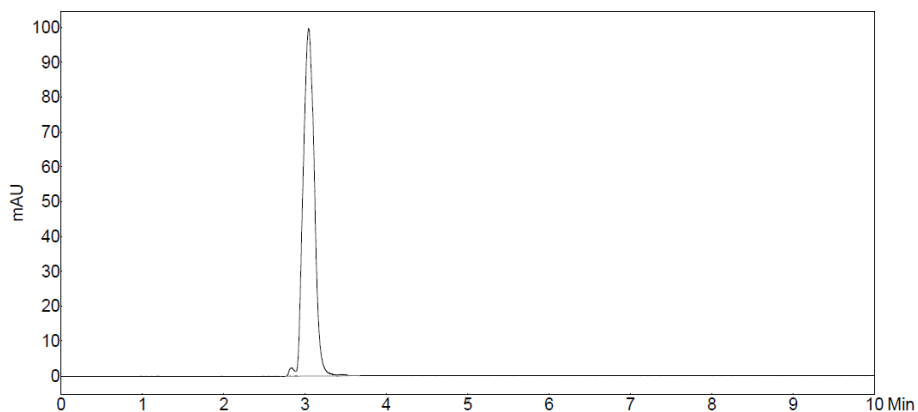


Figura 10 – Cromatograma da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm de 5  $\mu$ m), fase móvel ACN:MeOH na razão de 70:30 (v/v), com fluxo de 1 mL/min.

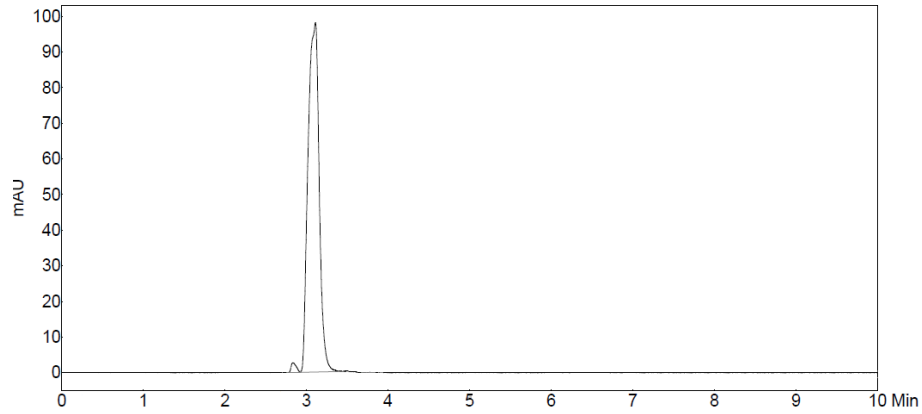


Figura 11 – Cromatograma da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm de 5  $\mu$ m), fase móvel ACN:MeOH na razão de 80:20 (v/v), com fluxo de 1 mL/min.

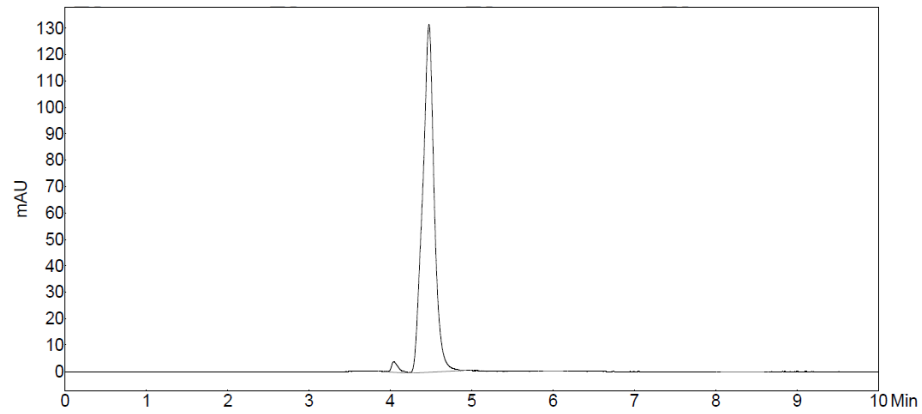


Figura 12 – Cromatograma da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm de 5  $\mu$ m), fase móvel ACN:MeOH na razão de 90:10 (v/v), com fluxo de 1 mL/min.

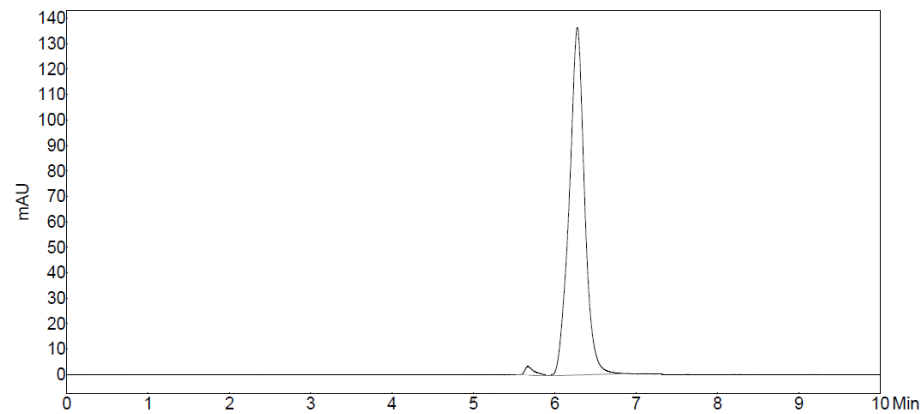


Figura 13 – Cromatograma da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm de 5  $\mu$ m), fase móvel ACN:MeOH na razão de 90:10 (v/v), com fluxo de 0,5 mL/min.

Nas figuras 14 a 19, as variações na fase móvel (composição e proporção), com a adição de água para elevar sua polaridade, levaram à melhor separação do pico da grandisina em relação ao pico de interferentes e da injeção, e redução do tempo da corrida. Houve redução do tempo de corrida após substituição da coluna de 250mm por outra de 100mm com as mesmas características de empacotamento.

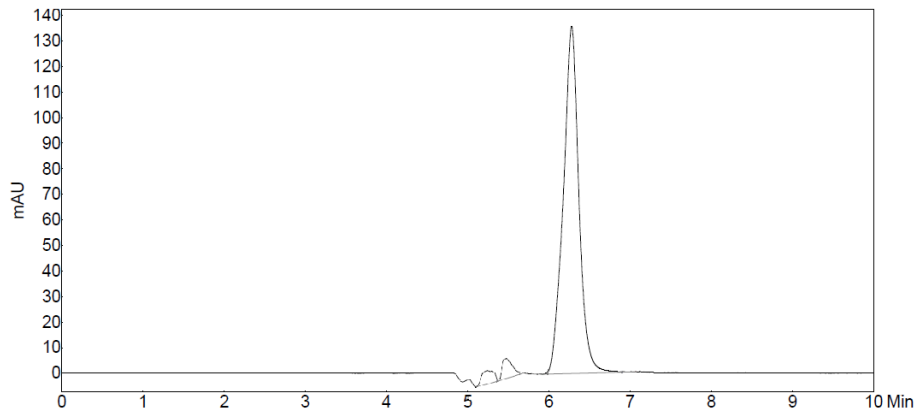


Figura 14 – Cromatograma da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm de 5  $\mu$ m), fase móvel ACN:MeOH:H<sub>2</sub>O na razão de 50:30:20 (v/v), com fluxo de 1,0 mL/min.

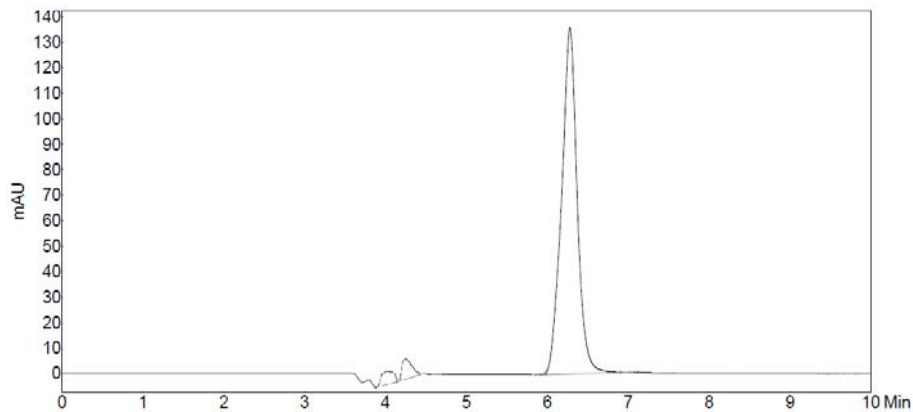


Figura 15 – Cromatograma da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm de 5  $\mu$ m), fase móvel ACN:MeOH:H<sub>2</sub>O na razão de 40:40:20 (v/v), com fluxo de 1,0 mL/min.

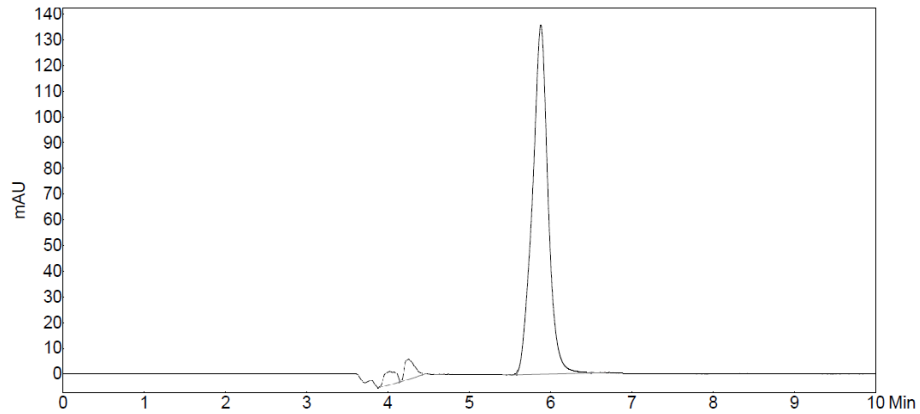


Figura 16 – Cromatograma da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm de 5  $\mu$ m), fase móvel ACN:MeOH:H<sub>2</sub>O na razão de 30:50:20 (v/v), com fluxo de 1,0 mL/min.

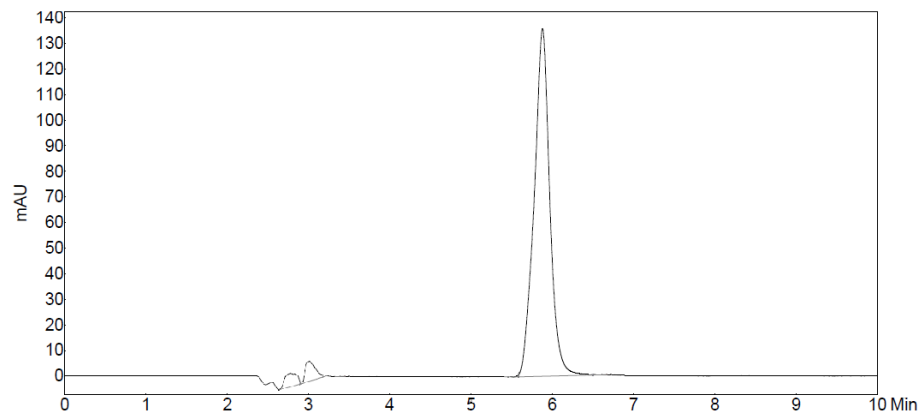


Figura 17 – Cromatograma da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm de 5  $\mu$ m), fase móvel ACN:MeOH:H<sub>2</sub>O na razão de 20:60:20 (v/v), com fluxo de 1,0 mL/min.

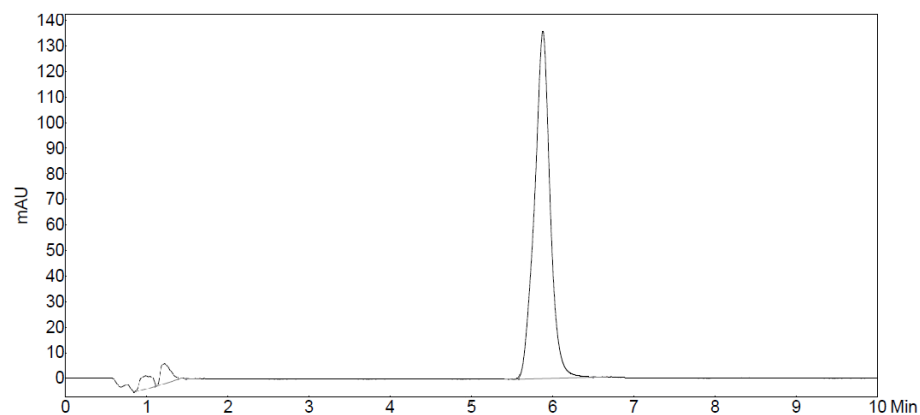


Figura 18 – Cromatograma da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm de 5  $\mu$ m), fase móvel ACN:MeOH:H<sub>2</sub>O na razão de 10:70:20 (v/v), com fluxo de 1,0 mL/min.

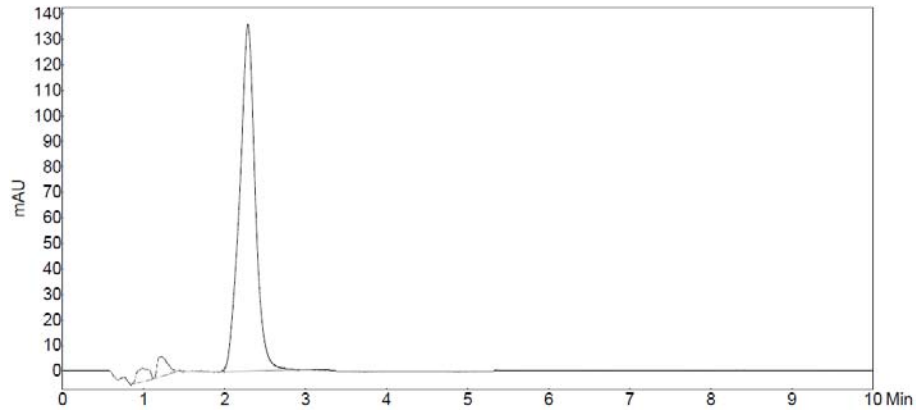


Figura 19 – Cromatograma da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (100 x 4,6 mm de 5  $\mu$ m), fase móvel ACN:MeOH:H<sub>2</sub>O na razão de 10:70:20 (v/v), com fluxo de 1,0 mL/min.

A partir das etapas do desenvolvimento analítico descritas, foram selecionadas as seguintes condições cromatográficas:

- Coluna C18, 100 x 4,6 mm de 5  $\mu$ m
- Comprimento de onda de 269 nm
- Fase móvel 20(água):10(acetonitrila):70(metanol)
- Fluxo de 1,0 mL/min
- Tempo de retenção: 2,24 min
- Simetria:  $\approx$  1,0
- Pratos teóricos:  $\approx$  1500

Através da metodologia analítica desenvolvida foi possível obter resultados confiáveis para a grandisina, com fácil separação de possíveis interferentes que pudessem vir a ser detectados, resultando em cromatogramas como o exemplificado na Figura 20.

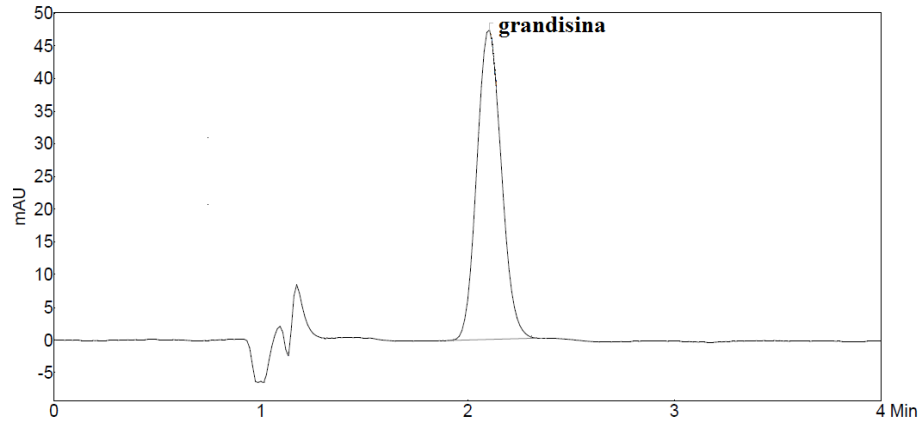


Figura 20 – Cromatograma da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (100 x 4,6 mm de 5  $\mu$ m), fase móvel ACN:MeOH:H<sub>2</sub>O na razão de 10:70:20 (v/v), com fluxo de 1 mL/min.

### 5.3.2.1 Curva de calibração para grandisina por CLAE-UV

A linearidade foi determinada pelo coeficiente de correlação ( $R^2$ ), obtido através das curvas de calibração feitas em triplicata (Figura 21). A linearidade do método demonstrou proporcionalidade entre as diferentes concentrações, absorbâncias e áreas dos picos. Isto foi verificado na faixa de concentração de 5 a 150  $\mu$ g/mL, tendo sido utilizados sete valores para a construção da curva, conforme descrito no item 4.2.3.2.1.

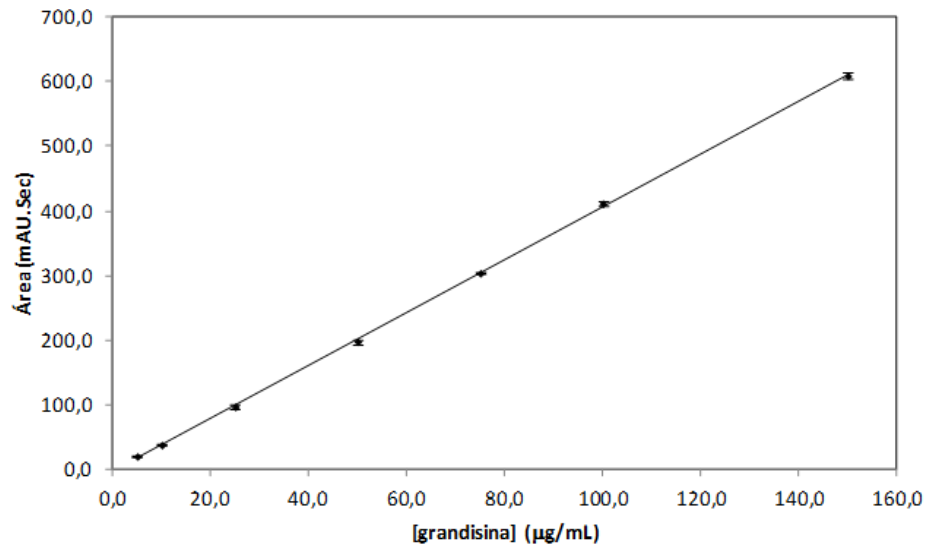


Figura 21 – Curva de calibração da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (100 x 4,6 mm de 5  $\mu$ m), fase móvel H<sub>2</sub>O:ACN:MeOH na razão de 20:10:70 (v/v), com fluxo de 1 mL/min.

De acordo com a RE nº 899/03 da ANVISA, coeficientes de correlação da curva de calibração próximos a 1 confirmam que o método apresenta linearidade.

Desta forma, a metodologia analítica desenvolvida demonstrou linearidade uma vez que apresentou resultados diretamente proporcionais às concentrações de grandisina presente nas soluções, com coeficiente de correlação da curva média (n=3) de 0,9998. A equação da reta obtida foi  $y=4,0991x-3,6838$ .

### 5.3.2.2 Precisão

O método mostrou-se preciso para repetibilidade (precisão intra-corrída) e precisão intermediária (precisão inter-corrídas). Na repetibilidade, as seis amostras com concentração de 100% (Tabela 7), apresentaram desvio padrão relativo (DPR) inferior a 1%.

Tabela 7 – Resultado analítico da repetibilidade (precisão intra-corrída) do método validado.

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )						Média	DPR (%)
1	2	3	4	5	6		
48,8	48,5	48,2	48,5	48,1	48,5	48,4	0,6

Para a precisão intermediária (Tabela 8), os resultados referentes a dias e analistas diferentes não mostraram diferença estatisticamente significativa, segundo o teste t de *Student*. Nesta análise foi usado o programa GraphPad Prism 5. Todos os resultados apresentaram-se inferiores ao t tabelado de 2,571; confirmando com 95% de confiança que o método é preciso, por não haver diferenças estatisticamente significativas entre dias e entre analistas.

Tabela 8 – Resultado de tratamento estatístico por teste t de *Student* para verificação da precisão do método validado entre analistas e dias diferentes.

	Dia I (Analista 1)	Dia II (Analista 1)	Dia I (Analista 2)
Média ( $\mu\text{g/mL}$ )	48,4	46,9	46,2
DPR (%)	0,6	0,7	1,3
t calculado		1,310	1,698
t tabelado		2,571	

### 5.3.2.3 Limites de quantificação e detecção

A partir dos dados obtidos através da linearidade do método (coeficientes angular e linear), utilizando as equações descritas no item 4.2.3.2.3, foram calculados os limites de detecção e quantificação, respectivamente, tendo sido obtidos os valores 1,23  $\mu\text{g/mL}$  para o limite de detecção e de 4,09  $\mu\text{g/mL}$  para o limite de quantificação.

### 5.3.2.4 Seletividade

Observou-se (Figura 22) que não houve detecção dos constituintes da formulação, concluindo-se assim que não há qualquer interferência dos componentes do nanossistema no método de análise utilizado na quantificação da grandisina.

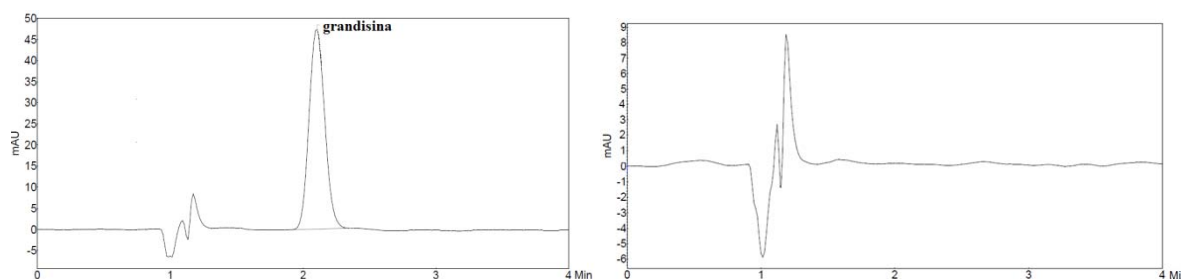


Figura 22 – Cromatogramas da grandisina (a) e nanocápsulas brancas (b) obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (100 x 4,6 mm de 5  $\mu\text{m}$ ), fase móvel  $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}:\text{MeOH}$  na razão de 20:10:70 (v/v), com fluxo de 1 mL/min.

### 5.3.2.5 Robustez

Pequenas mudanças nos parâmetros analíticos, como fluxo, proporção dos constituintes da fase móvel e comprimento de onda, descritas no item 4.2.3.2.4, realizadas para avaliar a sensibilidade do método a mudanças, não demonstraram variações significantivas, apresentando desvio padrão relativo (DPR) inferior a 2%. Por meio da análise estatística dos resultados, usando o parâmetro estatístico teste F, verificou-se que os valores obtidos para os F calculados foram menores que o F tabelado, determinando com 95% de confiança que o método é robusto para as variáveis testadas (Tabela 9).

Tabela 9 – Análise estatística das variações testadas para verificação da robustez do método analítico validado.

Análise estatística	Fluxo de fase móvel (mL/min)			Proporção de fase móvel (%)			Comprimento de onda (nm)		
	0,95	1,00	1,05	68:32	70:30	72:28	268	269	270
Média	50,9	50,9	50,7	49,2	49,2	49,1	49,1	48,3	48,6
DPR (%)	0,23	0,82	0,31	1,29	1,17	0,39	1,78	0,19	0,36
F calculado	4,875			0,1042			2,201		
F tabelado				5,14					

### 5.3.3 Desenvolvimento de metodologia analítica por CLAE para determinação da grandisina em experimentos de perfil de liberação (método 02)

Devido à interferência do lauril sulfato de sódio, presente no meio receptor usado no experimento de perfil de liberação (item 4.2.6), no método inicialmente desenvolvido para a quantificação da grandisina, foi necessário o desenvolvimento de outro método que permitisse a quantificação da grandisina liberada.

Para o desenvolvimento do método cromatográfico, diferentes condições analíticas foram testadas, conforme demonstrado nas figuras de 23 a 26, sendo constatado que as variações na proporção da fase móvel, fluxo, coluna e volume de injeção levaram ao resultado esperado, a separação da grandisina do volume morto e dos interferentes do LSS, permitindo assim sua detecção e quantificação.

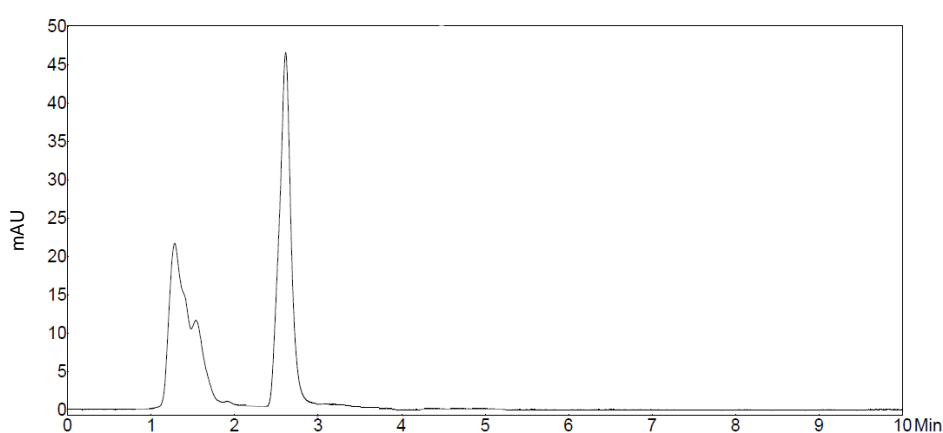


Figura 23 – Cromatograma da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (100 x 4,6 mm de 5 µm), fase móvel ACN:MeOH:H<sub>2</sub>O na razão de 30:40:30 (v/v), volume de injeção de 20 µL, com fluxo de 1,0 mL/min.

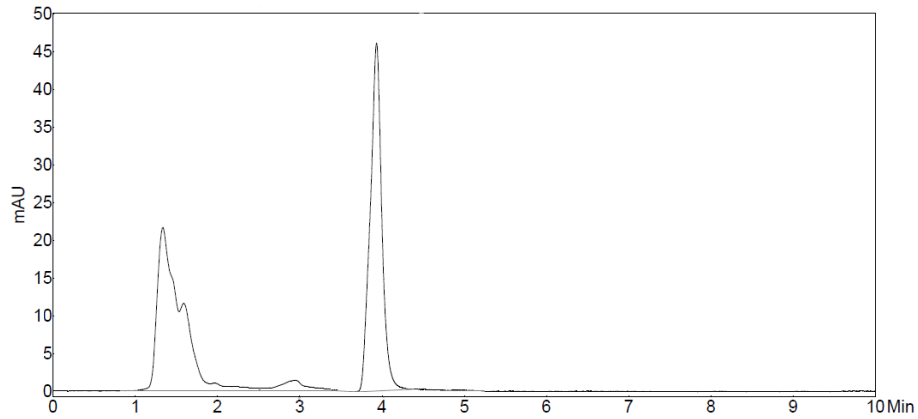


Figura 24 – Cromatograma da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm de 5  $\mu$ m), fase móvel ACN:MeOH:H<sub>2</sub>O na razão de 30:40:30 (v/v), volume de injeção de 20  $\mu$ L, com fluxo de 1,5 mL/min.

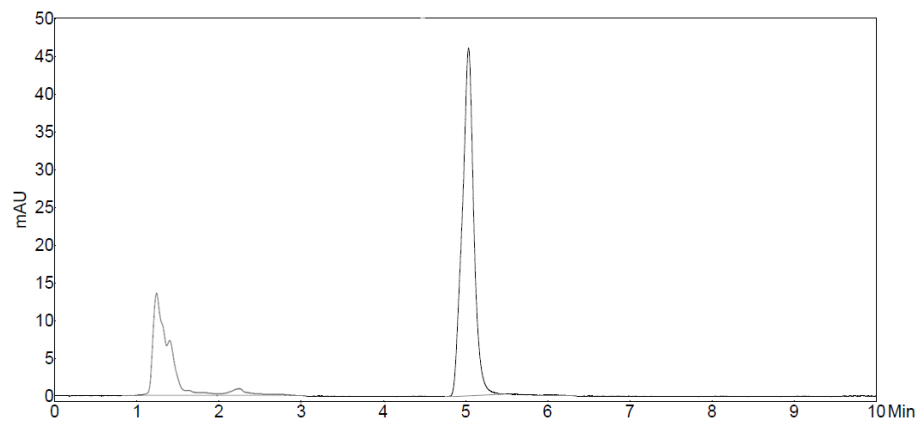


Figura 25 – Cromatograma da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm de 5  $\mu$ m), fase móvel ACN:MeOH:H<sub>2</sub>O na razão de 30:50:20 (v/v), volume de injeção de 50  $\mu$ L, com fluxo de 1,5 mL/min.

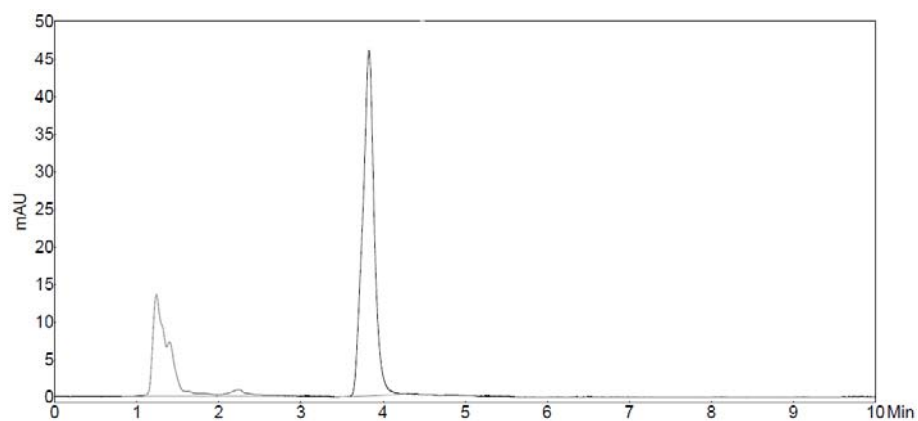


Figura 26 – Cromatograma da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm de 5  $\mu$ m), fase móvel ACN:MeOH:H<sub>2</sub>O na razão de 30:50:20 (v/v), volume de injeção de 50  $\mu$ L, com fluxo de 1,8 mL/min.

A partir das etapas do desenvolvimento analítico descritas, foram obtidas as seguintes condições cromatográficas:

- Coluna C18, 250 x 4,6 de 5  $\mu\text{m}$
- Comprimento de onda de 269 nm
- Fase móvel 20(água):30(acetonitrila):50(metanol)
- Fluxo de 1,8 mL/min
- Tempo de retenção: 3,8 min
- Simetria:  $\approx 1,0$
- Pratos teóricos:  $\approx 1600$
- Limite de quantificação de 0,8  $\mu\text{g/mL}$

Portanto, através da metodologia analítica desenvolvida, pôde-se obter resultados confiáveis para a quantificação da grandisina nos ensaios de liberação, com a fácil separação de possíveis interferentes do meio. A Figura 27 ilustra um típico cromatograma obtido pelo método selecionado.

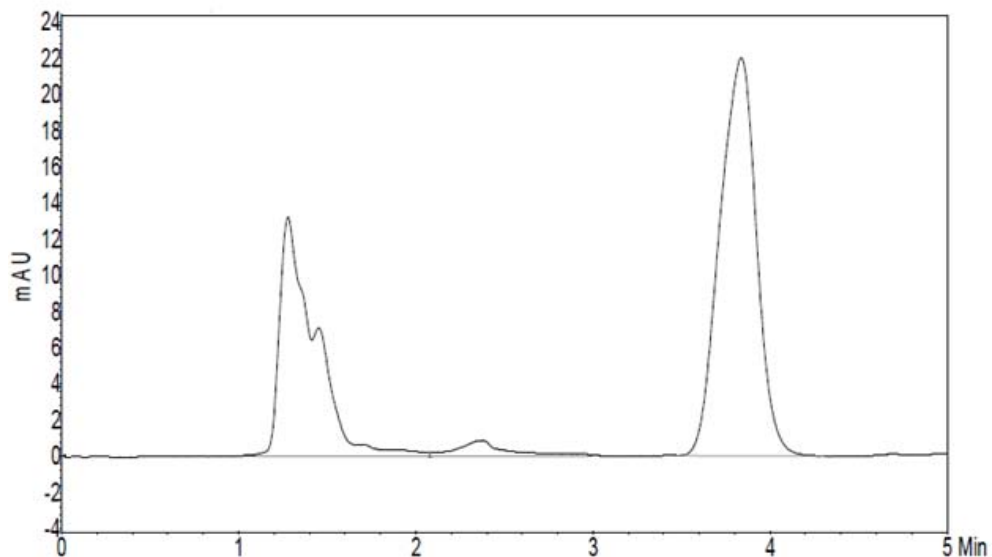


Figura 27 – Cromatograma da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm de 5  $\mu\text{m}$ ), fase móvel ACN:MeOH:H<sub>2</sub>O na razão de 30:50:20 (v/v), volume de injeção de 50  $\mu\text{L}$ , com fluxo de 1,8 mL/min.

### 5.3.3.1 Curva de calibração para experimentos de perfil de liberação por CLAE-UV

A linearidade foi determinada pelo coeficiente de correlação ( $R^2$ ), obtido através das curvas de calibração (Figura 28). A linearidade do método demonstrou proporcionalidade entre as diferentes concentrações, as absorvâncias e as áreas dos picos. Isto foi verificado na faixa de concentração de 0,8 a 50  $\mu\text{g/mL}$ , tendo sido utilizados oito valores para a construção da curva, conforme descrito no item 4.2.3.3.1.

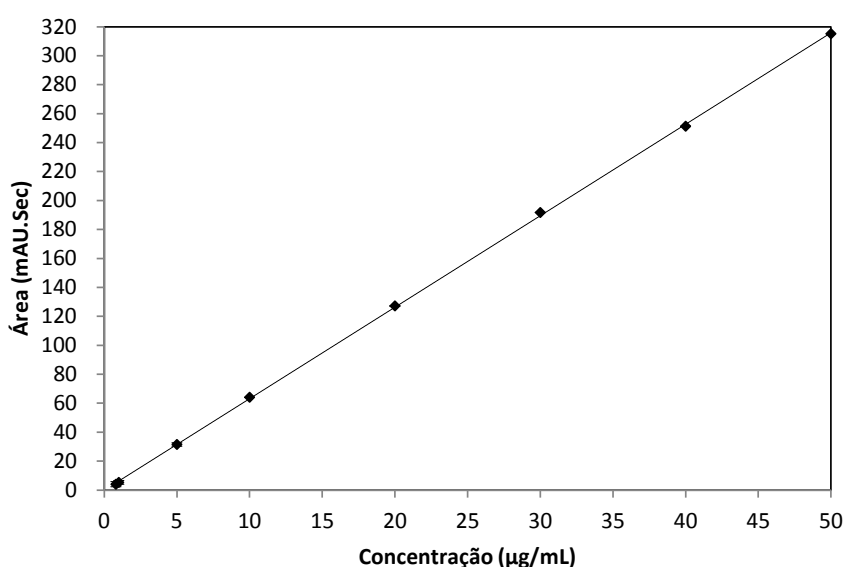
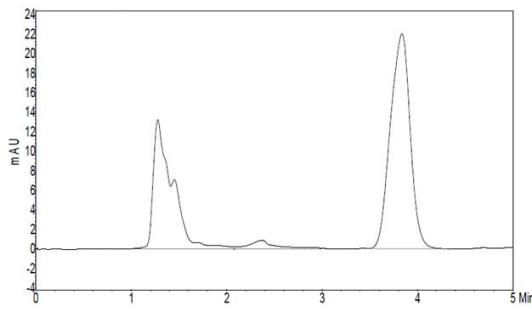


Figura 28 – Curva de calibração da grandisina obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm de 5  $\mu\text{m}$ ), fase móvel  $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}:\text{MeOH}$  na razão de 20:30:50 (v/v), com fluxo de 1,8 mL/min.

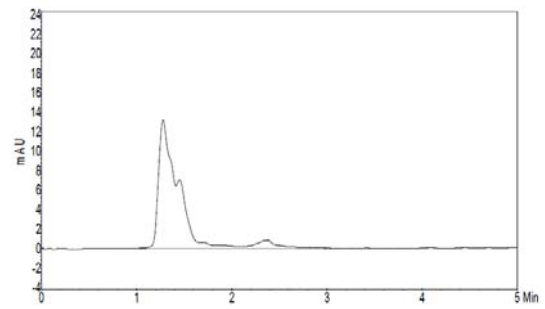
Para este segundo método, foi encontrado coeficiente de correlação de 0,9999. A equação da reta obtida foi  $y=6,3195x-0,0756$ .

### 5.3.3.2 Avaliação de interferentes na metodologia analítica

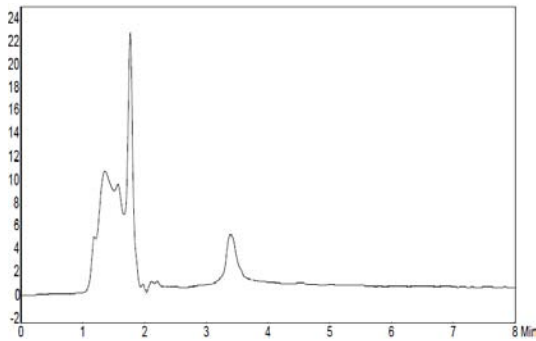
Como verificado na Figura 29, não houve interferência no método em questão, não existindo assim qualquer impedimento para a quantificação da grandisina dissolvida no meio receptor (tampão fosfato de sódio pH 7.4, contendo 5% de lauril sulfato de sódio a partir da solução em propilenoglicol:etanol (9:1)).



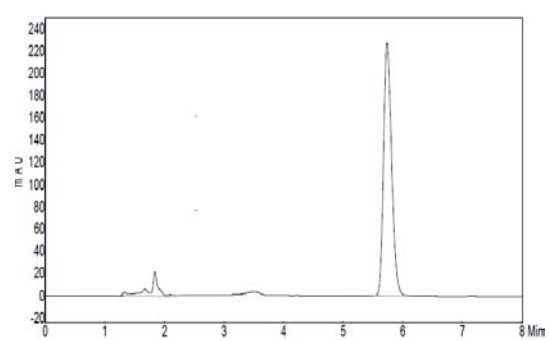
(a) grandisina + tampão fosfato de sódio pH7.4 com 5% de lauril + MeOH



(b) tampão fosfato de sódio pH7.4 com 5% de lauril sulfato de sódio + MeOH



(a) tampão fosfato de sódio pH7.4 com 5% de lauril sulfato de sódio+ propilenoglicol:etanol (9:1) + MeOH



(b) grandisina + tampão fosfato de sódio pH7.4 com 5% de lauril sulfato de sódio+ propilenoglicol:etanol (9:1) + MeOH

Figura 29 – Cromatogramas de teste de interferência do meio propilenoglicol:etanol (9:1), obtidos por CLAE-UV utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm de 5  $\mu$ m), fase móvel H<sub>2</sub>O:ACN:MeOH na razão de 40:30:30 (v/v), com fluxo de 1 mL/min.

### 5.3.3.3 Separação dos epímeros da grandisina

Como demonstrado na figura 30, ocorreu uma progressiva separação do pico cromatográfico.

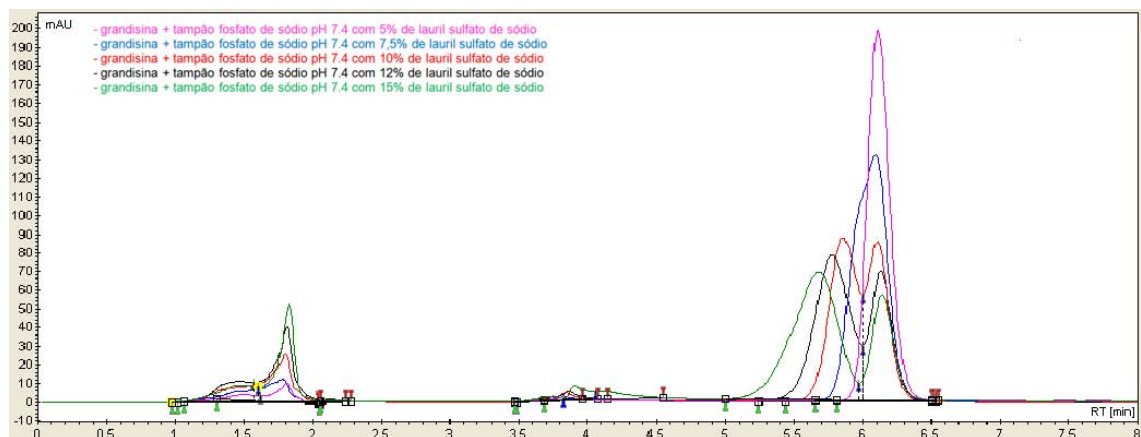
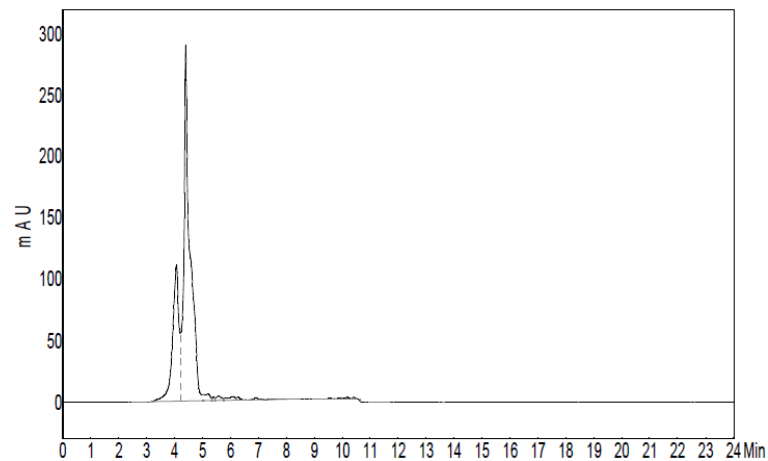


Figura 30 – Separação gradual dos epímeros grandisina e epigrandisina com o aumento gradual do tensoativo LSS.

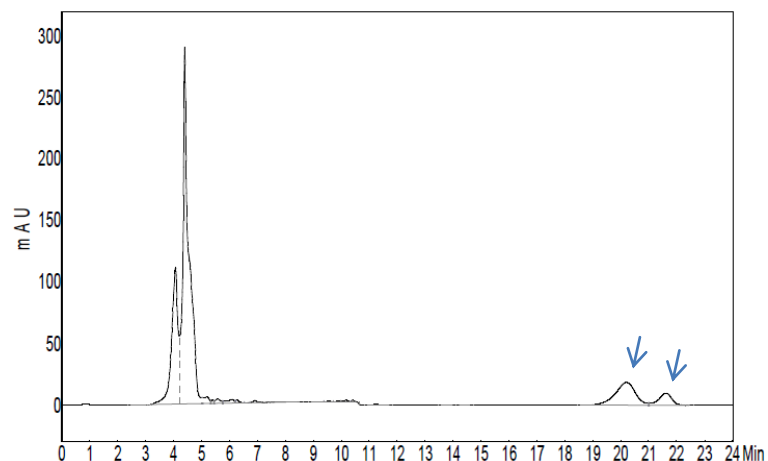
A partir de variações na proporção da fase móvel, fluxo e concentração de LSS no tampão, chegando nas condições de:

- Coluna C18, 250 x 4,6 mm de 5  $\mu\text{m}$
- Comprimento de onda de 269 nm
- Fase móvel: 30(água):30(acetonitrila):70(metanol)
- Fluxo de 0,5 mL/min
- 25% de lauril sulfato de sódio

Portanto, a partir das condições citadas acima, obteve-se a separação do pico dos epímeros com boa resolução, como pode ser observado na figura 31.



(a)



(b)

Figura 31 – Cromatogramas do tampão + 25% de LSS (a) e epímeros (b) obtido por CLAE-UV utilizando coluna C18 (250 x 4,6 mm de 5  $\mu\text{m}$ ), fase móvel  $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}:\text{MeOH}$  na razão de 30:30:40 (v/v), com fluxo de 0,5 mL/min.

Como já discutido no item 5.2, Greger e colaboradores (2000) verificaram que a grandisina é na realidade uma mistura epimérica, onde a (+)- grandisina é o composto majoritário, e a epigrandisina como composto secundário (33% da mistura).

A separação pode ser explicada porque tensoativos ou aditivos quirais são geralmente utilizados na separação de enantiômeros (Nishi, 1996), sendo que a adição de LSS, em concentrações acima de sua concentração micelar crítica (CMC), resulta na formação de pares de íons, reduzindo a polaridade do fármaco e prolongando sua retenção (Jancic *et al.*, 2005). O LSS não tem habilidade para distinguir estereoisômeros, portanto, a fim de separar estereoisômeros (ou epímeros), LSS deve ser adicionado a eletrólitos para aumentar a seletividade para o estereoisômero. Acima da CMC, uma mudança na concentração do tensoativo é traduzida em aumento na concentração das micelas em solução, enquanto o número de monômeros do tensoativo na fase móvel permanece constante. Assim, a adsorção de uma quantidade aproximadamente fixa de monômeros do tensoativo na fase estacionária também é produzida, dando origem a uma coluna modificada estável e a um comportamento regular de retenção. As capacidades únicas das fases móveis micelares são atribuídas à habilidade das micelas em compartimentalizar seletivamente e organizar solutos no nível molecular. Entretanto, a associação dos monômeros do tensoativo à fase estacionária tem implicações profundas no que diz respeito à retenção e à seletividade. O comportamento cromatográfico em um sistema de cromatografia líquida de fase reversa (CLFR), de um soluto eluído com uma fase móvel que contém um tensoativo acima do CMC, pode ser explicada considerando três fases: fase estacionária, solvente de maior volume e pseudofase micelar. Os solutos são separados com base em sua partição diferencial, entre o solvente de maior volume e as micelas na fase móvel, ou a fase estacionária revestida pelo tensoativo. Para espécies insolúveis em água, o particionamento pode ocorrer via transferência direta do soluto entre a pseudofase micelar e a fase estacionária modificada (Figura 32) (Cheanyeh *et al.*, 2011).

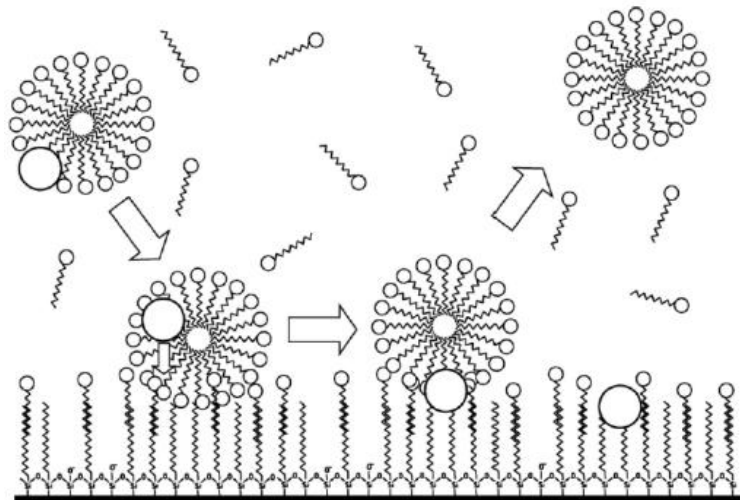


Figura 32 – Transferência direta de solutos altamente hidrofóbicos entre micelas e fase estacionária modificada pelo tensoativo.

Por se tratar de um produto de origem natural e para o qual não há padrões analíticos disponíveis, não foi possível identificar os picos cromatográficos encontrados.

## 5.4 PREPARO DAS NANOCÁPSULAS

### 5.4.1 Estudo de desenvolvimento da formulação

Os resultados referentes ao Pdl e diâmetro médio das nanocápsulas obtidas neste estudo estão listados na Tabela 10.

Tabela 10 – Diâmetro médio e índice de polidispersão obtidos das várias formulações com PLGA 85:15 testadas para otimização da obtenção de nanocápsulas.

Formulações	Diâmetro médio $\pm$ D.P. (nm)	Pdl $\pm$ D.P.
01	218,0 $\pm$ 18,4	0,547 $\pm$ 0,002
02	206,0 $\pm$ 12,7	0,454 $\pm$ 0,011
03	212,0 $\pm$ 11,3	0,379 $\pm$ 0,009
04	188,4 $\pm$ 3,5	0,139 $\pm$ 0,023

Como observado na Tabela 10, as formulações 01, 02 e 03 apresentaram elevados valores de Pdl (índice de polidispersibilidade), o que mostra que não há uniformidade no tamanho das populações de nanocápsulas. Para a formulação 01,

na qual foi utilizado somente o tensoativo Pluronic F68<sup>®</sup>, este resultado pode ser devido ao menor peso molecular menor deste tensoativo em relação ao Pluronic F127<sup>®</sup> (8.400 g/mol vs 12.600 g/mol), exercendo menor restrição cinética no processo de adsorção e difusão rápida (Liu *et al.*, 2011).

Com relação às formulações 02 e 03, estas podem ter sido afetadas pelo excesso de polímero, o que pode gerar agregados de polímeros livres. Já a formulação 04, na qual foram utilizados 150 mg do polímero e houve associação dos tensoativos Pluronic F68<sup>®</sup> e F127<sup>®</sup>, verificou-se diâmetro médio abaixo de 200 nm e  $Pdl \leq 0,2$ . Este resultado pode ser devido à associação dos *poloxamers* (Pluronic F68<sup>®</sup> e F127<sup>®</sup>), que, pelo seu mecanismo estabilizador estérico (Santander-Ortega *et al.*, 2006), podem ter levado à redução da velocidade de agregação das nanocápsulas.

#### 5.5 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE%)

A eficiência de encapsulação da grandisina foi determinada através do teste de quatro variações da formulação 4, considerada de melhores características, resultando em formulações 4A, 4B, 4C e 4D (preparadas com 5, 8, 10 e 12 mg de grandisina, respectivamente), sendo preparados 10mL da dispersão de nanocápsulas para cada formulação.

Para a determinação da eficiência de encapsulação foi utilizado o método descrito no item 4.2.3.2, e para o cálculo foi utilizada a equação descrita nos item 4.2.5.2, obtendo-se os resultados apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – EE% do fármaco encontrado para as formulações 4A (5 mg de grandisina), 4B (8 mg de grandisina), 4C (10 mg de grandisina) e 4D (12 mg de grandisina).

Formulações	Eficiência de encapsulação (%)	Teor de grandisina na formulação (mg/mL)
4A	100	0,5
4B	100	0,8
4C	98	0,98
4D	90	1,08

Por estes resultados, observa-se que a formulação 4C resultou no melhor rendimento da preparação, tendo alcançado EE% de 98% de grandisina encapsulada e um teor de fármaco encapsulado de aproximadamente 1mg/mL.

Embora as formulações 4A e 4B tenham resultado em 100% de encapsulação, foi observado que a quantidade de fármaco empregado nestas formulações era menor que a capacidade de carga máxima do nanossistema. Por sua vez, a formulação 4D excedeu a capacidade máxima, mostrando que quantidades superiores a 10mg não são incorporadas às partículas, levando à presença de fármaco livre no meio aquoso, o que foi demonstrado pela queda na eficiência para 90%. De acordo com Müller e colaboradores (2004), o decaimento da eficiência da associação do fármaco com a nanocápsula pode ser devido à precipitação de nanocristais do fármaco durante a formação das nanocápsulas, o que foi comprovado pela centrifugação realizada após o preparo das mesmas.

#### **5.5.1 Avaliação da estabilidade físico-química das nanocápsulas com grandisina**

As características físicas da dispersão de nanocápsulas obtida inicialmente foram conservadas (coloração, translucência azulada, etc), não sendo visualmente observadas, ao final de até 30 dias, alterações como: deposição de resíduos e/ou cristais, formação de grumos, cremagem ou nata sobrenadante, gotículas de óleo aderidas ao vidro, floculação ou separação de fases.

Durante o período de armazenamento em geladeira foi observada uma pequena redução na quantidade de grandisina encapsulada (6,4%), o que provavelmente se deveu à liberação da pequena quantidade de fármaco adsorvida na superfície do nanossistema polimérico (Figura 33).

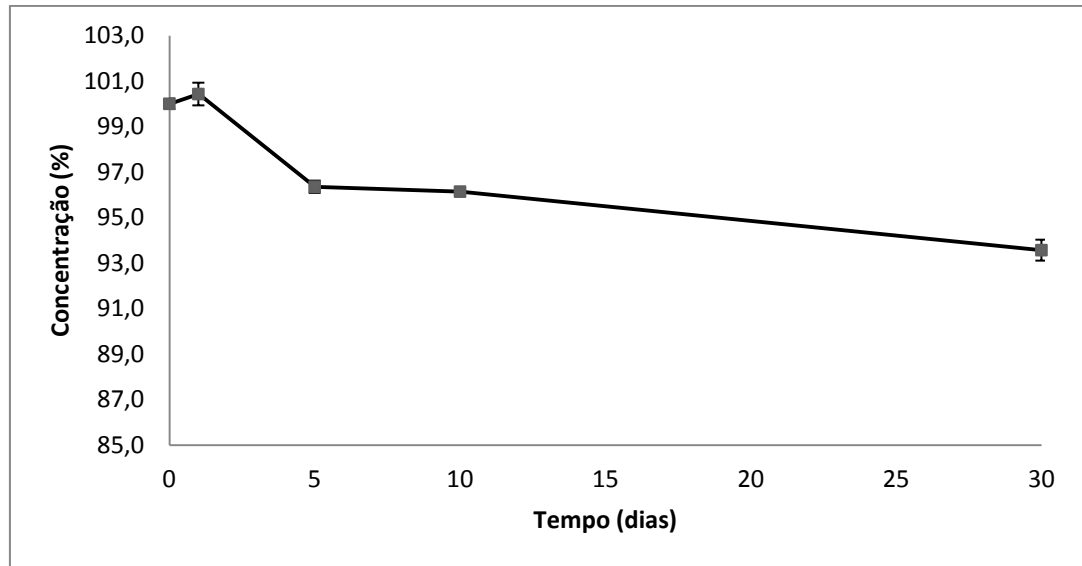


Figura 33 – Concentração de grandisina remanescente nas nanocápsulas durante a realização do estudo de estabilidade, obtido por análise em CLAE.

### 5.5.2 Avaliação do potencial zeta

O potencial zeta reflete a carga de superfície da partícula, portanto, na ausência de mecanismos de estabilização estérica, a estabilidade de nanopartículas é determinada pelo equilíbrio de forças de repulsão e atração das partículas presentes. Assim, se as forças de repulsão forem grandes, há a tendência de evitar a agregação, sendo esse o caso de nanopartículas com potencial zeta de cerca de  $(\pm) 30$ , que são mais estáveis em suspensão (Moraes *et al.*, 2010).

Neste trabalho, foi encontrado o valor de  $-15,73\text{mV}$  para as nanocápsulas contendo grandisina. Embora o valor do potencial zeta encontrado seja inferior ao apontado pela literatura como requisito para a estabilidade, as nanocápsulas de grandisina se mostraram estáveis quanto à agregação e mudança de suas características coloidais por um período de até 10 dias. É provável que a mistura de poloxamers utilizada na formulação tenha contribuído para garantir que a dispersão mantenha suas características de diâmetro e Pdl devido ao mecanismo de estabilização estérica.

### 5.5.3 Tamanho médio das partículas e índice de polidispersibilidade (Pdl)

Na Tabela 12 é possível verificar que a dispersão de nanocápsulas manteve o Pdl e o diâmetro médio dentro dos valores ideais ( $Pdl < 0,2$  e diâmetro médio  $< 200$  nm), até o décimo dia de estudo, sendo observada posteriormente uma elevação do índice de polidispersibilidade e tamanho das nanocápsulas, o que levou a supor que ocorreu uma instabilidade do sistema, com possível agregação das nanocápsulas, o que pode ser confirmado pela Figura 34.

Tabela 12 – Diâmetro médio e índice de polidispersão obtidos durante o período de 30 dias de estudo.

Tempo (dias)	Diâmetro médio ± D.P. (nm)	Pdl ± D.P.
0	161,5 ± 0,35	0,123 ± 0,01
1	159,4 ± 0,78	0,115 ± 0,01
5	161,1 ± 0,42	0,150 ± 0,02
10	160,5 ± 0,85	0,120 ± 0,04
30	257,5 ± 1,20	0,270 ± 0,01

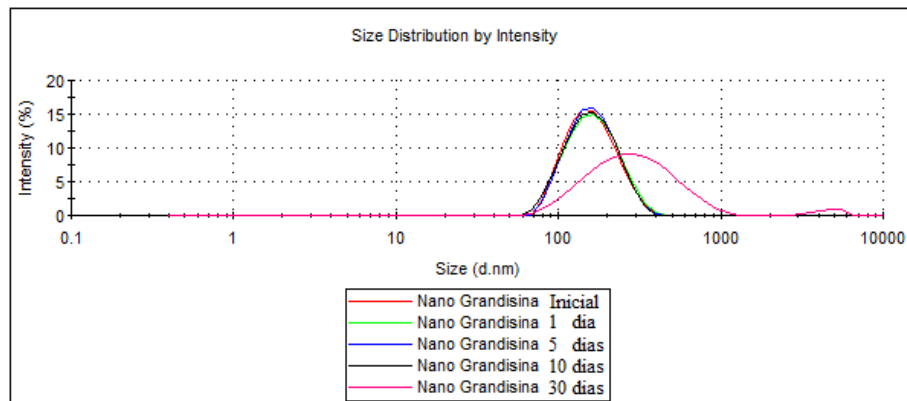


Figura 34 – Distribuição de tamanho das nanocápsulas durante o período do estudo de estabilidade.

A origem da instabilidade coloidal de nanocápsulas durante o período do estudo é em grande parte devido à floculação das nanocápsulas por causa das forças de repulsão ineficazes entre as mesmas (Gaudin *et al.*, 2008), o que é confirmado pelo valor zeta potencial de  $-15,73$  mV, encontrado para as nanocápsulas contendo grandisina. A estabilidade foi mantida até o décimo dia de estudo, o que é justificado pelo uso dos poloxamers, uma vez que as cadeias hidrofóbicas de polioxipropileno direcionam o polímero para adsorver sobre a

superfície das partículas, enquanto as cadeias hidrofílicas de polioxietileno cercam as partículas, causando impedimento estérico contra agregação (Liu *et al.*, 2011). Portanto, este período de estabilidade coloidal é resultante do total revestimento das nanopartículas de PLGA pelos poloxamers (Santander-Ortega *et al.*, 2006), mas provavelmente não suficiente para garantir estabilidade a longo prazo.

## 5.6 RESULTADOS DO PERFIL DE LIBERAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS DE GRANDISINA 1000 µg/mL

De acordo com os resultados apresentados na Figura 35, pode-se observar significativa diferença (aproximadamente duas vezes maior) entre a liberação da grandisina livre em comparação com a encapsulada.

Segundo Chen e colaboradores (2010), o meio propilenoglicol/etanol (9:1) utilizado para solubilização do fármaco livre (lovastatina) apresentou rápida liberação, sendo de 43% em 24h. Portanto, conclui-se que a liberação de 56,74% em 24h observada no presente experimento também o classifica da mesma forma.

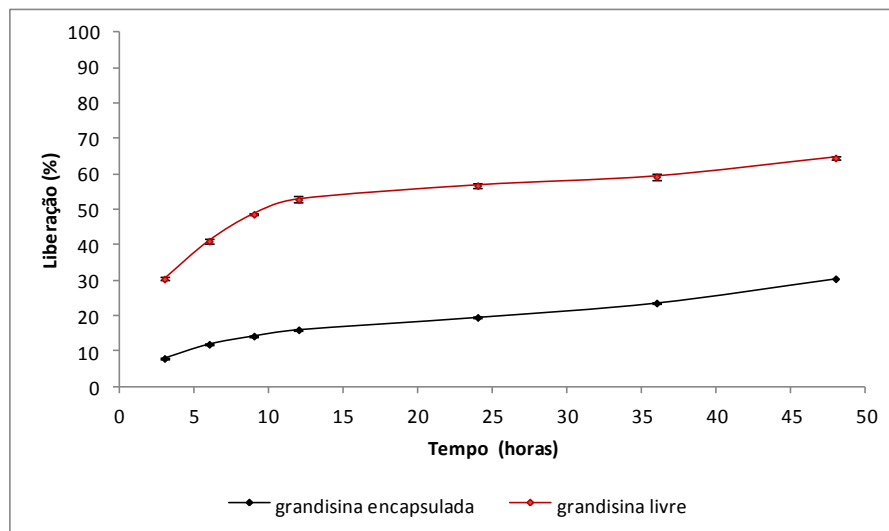


Figura 35 – Perfil de liberação da grandisina livre e encapsulada (n = 4) pelo período de 48h.

No experimento de liberação para as nanocápsulas com grandisina (Figura 36), os resultados obtidos mostram uma lenta liberação (aproximadamente 52% em 21 dias). Segundo Li e colaboradores (2001), ocorre primeiramente uma liberação inicial rápida (30,45% em 48h), e em um segundo momento liberação sustentada. O fármaco supostamente dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas seria liberado

por meio de sua difusão através da membrana polimérica, podendo apresentar cinética de ordem zero (Soppimath *et al.*, 2001). Assim, o mecanismo de liberação corresponderia, principalmente, à difusão do mesmo a partir do núcleo oleoso em direção à membrana polimérica. Além disto, a rápida liberação do fármaco poderia ser atribuída a uma pequena quantidade adsorvida a superfície das partículas (Fresta *et al.*, 1996).

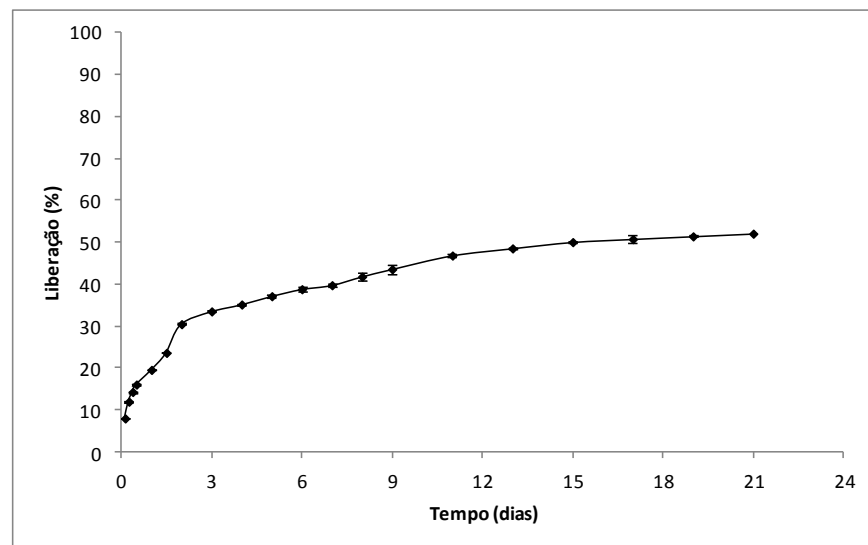


Figura 36 – Perfil de liberação da grandisina encapsulada (n = 4) ao longo de 21 dias.

Um achado adicional, que pode corroborar para a explicação da liberação sustentada após as 48h iniciais de ensaio, é a evidência encontrada após a tentativa de solubilização da grandisina em óleo de soja fora do nanossistema. Posteriormente à remoção do solvente orgânico, foi observada turvação do óleo, em que, após observação em microscópio óptico, verificou-se a cristalização da grandisina (Figura 37). Na obtenção de diferentes sistemas emulsionados O/A com distintos tamanhos de glóbulos de fase interna, observou-se que o crescimento dos cristais de grandisina era limitado pelo diâmetro das gotículas da fase interna. Assim, pode-se sugerir que no núcleo oleoso das nanocápsulas ocorra o mesmo processo, havendo a formação de nanocristais, produzindo assim depósito de grandisina dentro das nanocápsulas, o que levaria à lenta liberação observada.

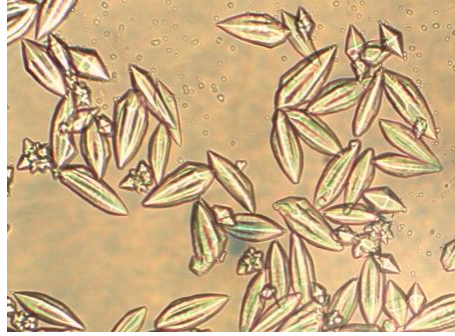


Figura 37 – Grandisina cristalizada no óleo após a retirada do solvente orgânico.

## 6 CONCLUSÕES

- A metodologia analítica para quantificação da grandisina nas nanocápsulas poliméricas foi desenvolvida e validada, e se demonstrou eficiente para as aplicações propostas.
- A grandisina foi caracterizada como insolúvel em água, parcialmente solúvel em metanol e em solução tampão contendo 5% do tensoativo lauril sulfato de sódio.
- A coexistência de dois epímeros da grandisina foi demonstrada pelos ensaios de análise térmica (dois pontos de fusão distintos) e por CLAE utilizando altas concentrações de tensoativos na fase móvel.
- Utilizando-se o método de nanoprecipitação do polímero pré-formado as nanocápsulas de PLGA foram obtidas e caracterizadas, obtendo-se valores de  $Pdl < 0,2$  e diâmetro médio  $< 200\text{nm}$ ;
- Através do trabalho realizado na formulação, pela associação dos tensoativos Pluronic F68<sup>®</sup> e F127<sup>®</sup>, chegou-se a uma formulação estável e com 98% de eficiência de encapsulação;
- As nanocápsulas obtidas foram estáveis por até 10 dias quanto aos aspectos de diâmetro médio e índice de polidispersão, apresentando variações destes parâmetros após este período, provavelmente devido ao baixo valor de potencial zeta apresentado pelas partículas.
- O perfil de liberação da grandisina realizado mostrou rápida liberação nas primeiras 48h (30 %) e posteriormente liberando 52% durante 21 dias, provavelmente devido à formação de nanocristais no compartimento interno das nanocápsulas.
- Foi possível obter formulações de nanocápsulas poliméricas contendo grandisina com elevada eficiência de encapsulação e possibilitando chegar à concentração de, pelo menos, 1mg/mL na dispersão de nanocápsulas em

meio aquoso, o que pode representar uma alternativa viável de sistema de liberação para esta substância em futuros ensaios de bioatividade.

## REFERÊNCIAS

- Araújo J.; Gonzalez E.; Egea M.A.; Garcia M.L.; Souto E.B. Nanomedicines for ocular NSAIDs: safety on drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine** v. 5, p. 394–401, 2009.
- Bernardes L.S.C.; Kato M.J.; Albuquerque S.; Carvalho I. Synthesis and trypanocidal activity of 1,4-bis-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-1,4-butanediol and 1,4-bis-(3,4-dimethoxyphenyl)-1,4-butanediol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** v. 14, p. 7075–7082, 2006.
- Beck-Broichsitter M.; Rytting E.; Lehardt T.; Wang X.; Kissel T. Preparation of nanoparticles by solvent displacement for drug delivery: A shift in the “ouzo region” upon drug loading. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 41, p. 244–253, 2010.
- Carvalho A.A.V.; Galdino P.M.; Nascimento M.V.M.; Kato M.J.; Valadares M.C.; Cunha L.C.; Costa E.A. Antinociceptive and Antiinflammatory Activities of Grandisin extracted from *Virola surinamensis*. **Phytother. Res.** V. 24, n. 1, p. 113-118, 2010.
- Cheanyeh Chenga; Hsiang-Rong Tsai. Application of simple on-line sweeping sample concentration technique coupled micellar electrokinetic chromatography for simultaneous analysis of estrogen and androgen epimer. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. V. 56, p. 728– 735, 2011.
- Chen C-C.; Tsai T-H.; Huang Z-R.; Fang J-Y. Effects of lipophilic emulsifiers on the oral administration of lovastatin from nanostructured lipid carriers: Physicochemical characterization and pharmacokinetics. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. V. 74, p. 474–482, 2010.
- Chicaro, P.; Kato, M. J.; Albuquerque, S.; Yoshida, M. *Planta Med.* 1998, 68, 667–669. LIGNANS,  $\gamma$ -LACTONES AND PROPIOPHENONES OF *VIROLA SURINAMENSIS* - Lopes N.P.; Blumenthal E.E.A.; Cavalheiro A.J.; Kato, M. J; Yoshida, M. **Phytochemistry**, Vol. 43, No. 5, p. 1089-1092, 1996.
- Chomoucka J.; Drbohlavova J.; Huska D.; Adam V.; Kizek R.; Hubalek J. Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. **Pharmacological Research** v. 62, p. 144–149, 2010.
- Fessi H.; Puisieux F.; Devissaguet J.Ph.; Ammoury N.; Benita S. - Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement - **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p.R1-R4, 1989.
- Fresta M.; Cavallaro G.; Giammona G.; Wehrli E.; Puglisi G. Preparation and characterization of polyurethane-Z-cyanoacrylate nanocapsules containing antiepileptic drugs. **Biomaterials**. V. 17, n. 6, p. 751 – 758, 1996.

Gaudin F.; Sintes-Zydowicz N. Core–shell biocompatible polyurethane nanocapsules obtained by interfacial step polymerisation in miniemulsion. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**. V. 331, p. 133–142, 2008.

Greger H.; Pacher T.; Vajrodaya S.; Bacher M.; Hofer O.. Intraspecific Variation of Sulfur-Containing Bisamides from *Aglaia leptantha*. **J. Nat. Prod.**, Vol. 63, N. 5, p. 616–620, 2000.

Jancic B.; Medenica M.; Ivanovic D.; Malenovic A. Evaluation of a Liquid Chromatographic Method for Analysis of Indinavir and Degradation Products Arising from Hydrolysis of its Amide Bond. **Chromatographia**. V. 62, p. 233–238, 2005.

Khoee, S.; Yaghoobian, M. An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. **European Journal of Medicinal Chemistry**. V. 44, p. 2392–2399, 2009.

Kulterer M.R.; Reischl M.; Reichel V.E.; Hribernik S.; Wu M.; Köstler S.; Kargl R.; Ribitsch V. Nanoprecipitation of cellulose acetate using solvent/nonsolvent mixtures as dispersive media. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**. V. 375, n. 1-3, p. 23-29, 2011.

Li Y-P.; Pei Y-Y.; Zhang X-Y.; Gu Z-H.; Zhou Z-H.; Yuan W-F.; Zhou J-J.; Zhu J-H.; Gao X-J. PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats. **Journal of Controlled Release**. V. 71, p. 203–211, 2001.

Limayem Blouza I.; Charcosset C.; Sfar S.; Fessi H.. Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 325, p. 124–131, 2006.

Lince, F.; Marchisio, D.L.; Barresi, A.A.. Strategies to control the particle size distribution of poly-ε-caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications. **Journal of Colloid and Interface Science**. V. 322, p. 505–515, 2008.

Lima V.L.E.. Os Fármacos e a Quiralidade: Uma Breve Abordagem. **Química Nova**, v. 20, n.6, p. 657-663, 1997.

Liu P.; Rong X.; Laru J.; Veen B.v.; Kiesvaara J.; Hirvonen J; Laaksonen T.; Peltonen L. Nanosuspensions of poorly soluble drugs: Preparation and development by wet milling. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 411, p. 215–222, 2011.

Martins D.; Costa F.T.M.; Brocchi M.; Durán N.. Evaluation of the antibacterial activity of poly-(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles containing violacein. **Journal of Nanoparticle Research**. V. 13, n. 1, p. 355-363, 2011.

Mondal N.; Halder K.K.; Kamila M.M.; Debnath M.C.; Pal T.K.; Ghosal S.K.; Sarkar B.R.; Ganguly S. Preparation, characterization, and biodistribution of letrozole loaded PLGA nanoparticles in Ehrlich Ascites tumor bearing mice **International Journal of Pharmaceutics** v. 397, p. 194–200, 2010.

Moraes C.M.; Matos A.P.; Paula E.; Rosa A.H.; Fraceto L.F. Benzocaine loaded biodegradable poly-(d,l-lactide-co-glycolide) nanocapsules: factorial design and characterization **Materials Science and Engineering B**. v. 165, p. 243–246, 2009.

Moraes C.M.; Paula E.; Rosa A.H.; Fraceto LF. Physicochemical Stability of Poly(lactide-co-glycolide) Nanocapsules Containing the Local Anesthetic Bupivacaine. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 21, n. 6, p. 995-1000, 2010.

Mora-Huertas C.E.; Fessi H.; Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery **International Journal of Pharmaceutics** v. 385, p. 113–142, 2010.

Müller, C. R.; Haas, S. E.; Bassani, V. L.; Gutterres, S. S.; Fessi, H.; Peralba, M. C. R.; Pohlmann, A. R. Degradação e estabilização do diclofenaco em nanocápsulas poliméricas. **Química Nova**. v. 27, p. 555-560, 2004.

Neumann D.; Merkwirth C.; Lamprecht A. Nanoparticle Design Characterized by In Silico Preparation Parameter Prediction Using Ensemble Models **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p. 1982–1996, 2010.

Nishi H. Enantiomer separation of drugs by electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**. V. 735, p. 57-76, 1996.

Oliveira Júnior, L. M.; Guerra, M. T.; Vieira, M. S.; Valadares, M. C. Investigação do potencial mutagênico da grandisina. **Anais eletrônicos da XV Semana Científica Farmacêutica**, Goiânia: UFG, 2007, n.p.

Quintanar-Guerrero D.; Allémann E.; Fessi H.; Doelker E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug development and industrial pharmacy**. v. 24(12), p. 1113-1128, 1998.

Ravindran J.; Nair H.B.; Sung B.; Prasad S.; Tekmal R.R.; Aggarwal B.B. Thymoquinone poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles exhibit enhanced anti-proliferative, anti-inflammatory, and chemosensitization potential. **Biochemical Pharmacology**. v. 79, p. 1640–1647, 2010.

Rowe R.C.; Sheskey P.J.; Quinn M.E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6.ed. Londres: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2009. 652 p.

Santander-Ortega M.J., Jódar-Reyes A.B., Csaba N., Bastos-González D., Ortega-Vinuesa J.L. - Colloidal stability of Pluronic F68-coated PLGA nanoparticles: A variety of stabilisation mechanisms - **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 302, p. 522–529, 2006.

Santander-Ortega M.J.; Lozano-López M.V.; Bastos-González D.; Peula-García J.M.; Ortega-Vinuesa J.L. Novel core-shell lipid-chitosan and lipid-poloxamer nanocapsules: stability by hydration forces. **Colloid Polym Sci**. v. 288, p.159–172, 2010.

Santos, N.P.; Nascimento, S.C.; Silva, J.F.; Pereira, E.C.G.; Silva, N.H.; Honda, N.K.; Santos-Magalhães, N.S. Usnic acid nanocapsules: an evaluation of cytotoxicity. **J. Drug. Sci. Tech.**, v. 15, n. 5, p. 355-361, 2005.

Schaffazick S.R.; Guterres S.S.; Freitas L.L.; Pohlmann A.R. Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. **Química Nova**. v. 26, n. 5, p. 726 - 737, 2003.

Soppimath K.S.; Aminabhavi T.M.; Kulkarni A.R.; Rudzinski W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**. V. 70, p. 1–20, 2001.

Sugimoto T. Preparation of monodispersed colloidal particles. **Advances in Colloid and Interface Science**. V. 28, p. 65-108, 1987.

Teixeira P.R. Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas poliméricas contendo isotretinoína. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

Teixeira Z.; Zanchetta B.; Melo B.A.G.; Oliveira L.L.; Santana M.H.A.; Paredes-Gamero E.J.; Justo G.Z.; Nader H.B.; Guterres S.S.; Durán N. Retinyl palmitate flexible polymeric nanocapsules: Characterization and permeation studies **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 81, p. 374–380, 2010.

Vieira, M.S.; Oliveira, V.; Lima, E.M.; Kato, M.J.; Valadares, M.C. In vitro basal cytotoxicity assay applied to estimating acute oral systemic toxicity of grandisin and its major metabolite. **Experimental and Toxicologic Pathology**. v. 63, n. 5, p. 505-510, 2011.

Valadares M.C.; Carvalho I.C.T.; Oliveira Junior L.; Vieira M.S.; Benfica P.L.; Carvalho F.S.; Andrade L.V.S.; Lima E.M.; Kato M.J. Cytotoxicity and antiangiogenic activity of grandisin. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 61: p. 1709–1714, 2009.

Valadares M.C.; de Oliveira L.M. Jr.; de Carvalho F.S.; Andrade L.V.; dos Santos A.P.; de Oliveira V.; Gil Ede S.; Kato M.J. Chemoprotective effect of the tetrahydrofuran lignan grandisin in the in-vivo rodent micronucleus assay. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 63(3), p. 447-451, 2011.

Yan F.; Zhang C.; Zheng Y.; Mei L.; Tang L.; Song C.; Sun H.; Huang L. The effect of poloxamer 188 on nanoparticle morphology, size, cancer cell uptake, and cytotoxicity. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine** v. 6, p. 170–178, 2010.

Wang H.; Zhang S.; Liao Z.; Wang C.; Liu Y.; Feng S.; Jiang X.; Chang J. PEGlated magnetic polymeric liposome anchored with TAT for delivery of drugs across the blood-spinal cord barrier. **Biomaterials** v. 31, p. 6589 – 6596, 2010.

Zhang C.; Zhao L.-Q.; Dong Y.-F.; Zhang X.-Y.; Lin J.; Chen Z. Folate-mediated poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyoctanoate) nanoparticles for targeting drug delivery **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** v. 76, p. 10–16, 2010.