

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

DESENVOLVIMENTO E CARATERIZAÇÃO FÍSICO,
QUÍMICA E BIOLÓGICA *IN VITRO* DE NANOPARTÍCULAS
POLIMERICAS CONTENDO α - β AMIRINA.

SERAFIM FLORENTINO NETO

MANAUS
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

SERAFIM FLORENTINO NETO

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO,
QUÍMICA E BIOLÓGICA *IN VITRO* DE NANOPARTÍCULAS
POLIMERICAS CONTENDO α - β AMIRINA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Tatiane Pereira de Souza

MANAUS
2018

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

F633d Florentino Neto, Serafim
Desenvolvimento e caracterização físico, química e biológica in vitro de nanopartículas poliméricas contendo alfa e beta amirina. / Serafim Florentino Neto. 2018
90 f.: il.; 31 cm.

Orientadora: Tatiane Pereira de Souza
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Nanotecnologia. 2. Nanoestruturas. 3. Sistemas de Liberação de Medicamentos. 4. Nanopartículas. 5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. I. Souza, Tatiane Pereira de II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

“Desenvolvimento e caracterização físico-química e biológica *in vitro* de nanopartículas poliméricas contendo α - β - amirina”.

DISCENTE: SERAFIM FLORENTINO NETO

PARECER:

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, AM, 13/07/2018.



Prof. Dr. Emerson Silva Lima
Coordenador do PPGCF

A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes professores:



Prof.ª. Dr.ª. Tatiane Pereira de Souza
Orientador e presidente da banca



Prof.ª. Dr.ª. Maria Katherine Santos de Oliveira - Membro externo
Membro externo (CBA)



Prof.ª. Dr.ª. Maria de Meneses Pereira - Membro interno
Membro interno (UFAM)

Dedico as minhas queridas filhas Lavínia Laís Nunes Florentino e Laíse Nunes Florentino e aos meus pais e irmãos, pela compreensão,apoio, incentivo perenemente.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela superação constante aos obstáculos encontrados e a transposição de cada um deles com paz e serenidade.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Tatiane Pereira de Souza, por proporcionar condições favoráveis ao desenvolvimento desta pesquisa;

Ao Prof^o. Dr. Jesus Rafael Rodríguez Amado, pelo apoio contínuo às atividades do laboratório e a contribuição intelectual para o êxito deste trabalho;

A Prof^a Dr^a Fernanda Guilhon Simplicio, pela contribuição em ceder as instalações e equipamentos do FITHOFAR, para extração, purificação e análise do material vegetal;

Ao Prof^o. Dr. Emerson Silva Lima, por permitir o uso das instalações do BIOFHAR, para realização de análises;

Ao Prof^o. Dr. Marco B. Machado - NMRLAB - Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear - RMN, por realizar a análise de RMN do material vegetal;

Ao Prof^o. Dr. Paulo José da Costa Couceiro - LABIV - Laboratório de Espectroscopia no Infravermelho - FT-IR, por realizar a análise de FT-IR do material vegetal;

Ao Prof^o. Dr. Sergio Michielon - Lab Mat - Laboratório de Materiais - por realizar a análise de Difração de RX no material vegetal;

A Dr^a. Klenyce Iamaguchi, pela contribuição para o sucesso desta pesquisa;

Ao Caro colega Leonard Domingo Acho, pelas contribuições para esta pesquisa;

Aos meus familiares (filhas, pais e irmãos), por me compreender nos momentos que estive ausente;

Aos amigos(as) do LIDETEF, Patrícia, Rodrigo, Fabrício, Camila, Deyse, Arine, Newton, Sayuri, pelo apoio diário às atividades de rotina no laboratório;

As colegas do FITHOFAR, Talita, Verônica, Carol, Janaina e Lívia, pelo apoio diário às atividades de rotina no laboratório;

Ao caro amigo Erick, pelo apoio diário às atividades de rotina no laboratório;

Aos amigos da caserna, Quevedo, Jurenil, Denísio e Jules, pelo apoio a mim dispensado.

MUITO OBRIGADO!!!

Maior que a tristeza de não ter vencido é a vergonha de não ter lutado!

Rui Barbosa

RESUMO

Os triterpenos são um grupo de metabólitos que tem relatado ações farmacológicas como o efeito protetor hepático, ansiolíticos e antidepressivos, efeito antinoceptivo, atividade anti-inflamatória, atividade hipoglicemiante e hipolipemiante, dentre outras. Entre os triterpenos, a mistura isomérica de α - β amirina tem demonstrado utilidade farmacológica em diversos estudos *in vitro* e *in vivo*, mas sua baixa solubilidade aquosa têm se apresentado como limitante na administração por via oral. O objetivo deste trabalho foi desenvolver nanopartículas carregadas com a mistura isomérica α - β amirina como uma via provável para sua utilização na terapêutica que poderia evitar o problema farmacocinético citado anteriormente. Primeiro, foi isolada e purificada a mistura isomérica de amirinas usando cromatografia de coluna. Segundo, a mistura foi caracterizada por métodos químicos físicos (RX, FTIR, RMN-¹H e RMN-¹³C, MEV). Terceiro, foram preparadas as nanopartículas usando diversos polímeros (Eudragit E100, Poly- ϵ -caprolactona e Kollicoat Mae100P) e dois tensoativos (Tween 80[®] na fase aquosa e Span 20[®] na fase orgânica) pelo método emulsificação e difusão do solvente. As nanopartículas obtidas foram caracterizadas quanto a seu tamanho e distribuição de tamanho de partículas, potencial zeta, condutividade e foi quantificada a eficiência de encapsulação do processo de preparação. Foi validado o método por HPLC para a quantificação de amirinas no material purificado e nas nanopartículas. Também foi feito um estudo de estabilidade em prateleira, durante 90 dias, das principais propriedades das nanopartículas. Por último foram avaliadas as propriedades antioxidantes (DPPH[•] e ABTS[•]), a capacidade de inibir as enzimas lipase pancreática e alfa glicosidase, assim como a citotoxicidade relativa em fibroblasto não neoplástico de pulmão humano. Foi isolada e purificada uma mistura de α - β amirina com um rendimento de 28% na extração. A mistura é um produto branco, leve e em forma de agulhas finas (observado por MEV). As análises de RX, FTIR, RMN-H e RMN-¹³C confirmaram presença da amirina, que foi avaliada por HPLC confirmando 99% de pureza. As nanopartículas da mistura de α - β amirina, apresentaram um tamanho de partícula de 128,80 nm, uma polidispersão de 0,107, potencial zeta de -35,63 mV e uma condutividade 0,149 $\mu\Omega\text{cm}^{-1}$. As nanopartículas apresentaram uma excelente estabilidade físico-química, em prateleira, até 90 dias após a preparação. Tanto a amirina pura como as nanopartículas de amirina apresentaram pobre atividade antioxidante, frente aos radicais DPPH[•] e ABTS[•]. A amirina pura apresentou uma baixa atividade inibidora das enzimas lipase pancreática e α -glicosidase, diferente das nanopartículas que apresentaram uma excelente atividade inibidora de lipase pancreática (IC₅₀ 15,40 $\mu\text{g/mL}$) e α -glicosidase (IC₅₀ 44,40 $\mu\text{g/mL}$). Ambos os produtos (Amirina e nanopartículas de amirina) não apresentaram atividade inibidora da viabilidade celular de fibroblastos de pulmão humano não neoplástico, mostrando ausência de citotoxicidade nesse linhagem celular. Segundo os resultados obtidos neste estudo pode se sugerir que as nanopartículas carregadas com a mistura isomérica de α - β amirina são uma alternativa viável para seu uso no tratamento coadjuvante da diabetes e de pacientes diabéticos com complicações secundárias como a obesidade. No entanto outros estudos deverão ser conduzidos para comprovar a funcionalidade real das nanopartículas nessas condições de saúde.

Palavras-chave: Nanotecnologia; Nanoestruturas; Sistemas de Liberação de Medicamentos; Nanopartículas; Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; Triterpenos.

ABSTRACT

Triterpenes are a group of metabolites having some important pharmacological effects like liver protective, anxiolytic, antidepressant, anti-inflammatory, hypoglycemic effects, and lipid-lowering, among others. The α and β amyryn are triterpenes showing several pharmacological use in vitro and in vivo, but its low aqueous solubility have been shown to be limiting in oral administration. The objective of this work was to develop α - β -amyryn loaded-nanoparticles as a probable route for its use in therapy, which could avoid or diminish the pharmacokinetic problems mentioned above. First, the isomeric mixture of amyryns was isolated and purified using a chromatographic column. Second, the mixture was characterized by physicochemical methods (RX, FTIR, $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$, MEV). Third, the nanoparticles were prepared by the emulsification-solvent diffusion method, using three different polymers (Eudragit E100, Poly- ϵ -caprolactone, and Kollicoat Mae100P), and two surfactants (Tween 80[®], in the aqueous phase and Span 20[®], in the organic phase). Nanoparticles were characterized by measuring the particle size, particle size distribution, potential zeta, conductivity and the encapsulation efficiency, of the preparation process. An HPLC method was validated for the quantification of amyryns in the purified material and in nanoparticles. A shelf life stability study of nanoparticles main properties was carried out. Finally, the antioxidant properties (DPPH[•] and ABTS[•]), the ability to inhibit pancreatic lipase and alpha-glucosidase enzymes, as well as relative cytotoxicity in human lung non-neoplastic fibroblast were evaluated. A mixture of α - β amyryn was extracted and purified with a yield of 28%. The isomeric mixture is a white, light and fine needle product (as observed by MEV). Analyzes of RX, FTIR, $^1\text{H NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ confirmed the presence of amyryn. A 99% of purity evaluated by an HPLC analytical method was confirmed. Nanoparticles showed a particle size of 128.80 nm, polydispersity 0.107, zeta potential -35.63 mV, and a conductivity of 0.149 $\mu\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$. Nanoparticles presented an excellent physicochemical shelf stability up to 90 days after preparation. Both the pure amyryn and the amyryn nanoparticles showed poor antioxidant activity against DPPH[•] and ABTS[•] radicals. The pure amyryn showed a low inhibitory effect of the pancreatic lipase and α -glucosidase enzymes. On the contrary, amyryn nanoparticles showed an excellent pancreatic lipase inhibitory effect (IC_{50} 15.40 $\mu\text{g} / \text{mL}$) and α -glycosidase (IC_{50} 44.40 $\mu\text{g} / \text{mL}$). Both products (amyryn and amyryn nanoparticles) showed no activity on the cellular viability of non-neoplastic human lung fibroblasts, showing the absence of cytotoxicity in this cell line. The results obtained suggest that amyryn-loaded nanoparticles are a viable alternative for their use as adjuvants on the diabetes treatment, and in diabetic patients with secondary complications such as obesity. However other studies should be conducted to prove the real functionality of nanoparticles in these health conditions.

Keywords Nanotechnology; Nanostructures; Medication Release Systems; Nanoparticles; High Performance Liquid Chromatography; Triterpenes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química dos triterpenos pentacíclicos, a) α amirina, b) β amirina e c) lupeol.....	19
Figura 2 - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.....	25
Figura 3 - Representação esquemática de preparação de nanopartículas obtidas pelo método deposição do polímero pré-formado.	29
Figura 4 - Representação do método de Nanoprecipitação.....	30
Figura 5- Fluxograma da parte experimental	37
Figura 6 - Processo para obtenção e isolamento da mistura isomérica α,β -amirina a partir da resina do <i>Protium sp</i> . A) amostra de <i>Protium sp</i> comercial; B) processo de trituração; C) coluna cromatográfica utilizando a amostra diretamente na coluna e D) processo de rota-evaporação das frações com presença de α , β -amirina	38
Figura 7 - Preparação das nanopartículas - método emulsificação e difusão do solvente, adaptado de fessi 1989.	44
Figura 8 - Obtenção da $\alpha - \beta$ amirina: (A) coluna cromatográfica; (B e C) pó branco; (D) CCD das frações agrupadas e E) $\alpha - \beta$ amirina.	50
Figura 9 - Processo de obtenção: (A) $\alpha - \beta$ amirina purificada e (B) CCD do padrão e da amostra. .	51
Figura 10 – Cromatogramas obtidos por CLAE mostrando o pico cromatográfico e o tempo de retenção do padrão de amirina e da amostra (mistura α e β -amirina isolada e purificada neste trabalho).	52
Figura 11 - Espectroscopia de Infravermelho transformada de Fourier (FT-IR) amostra e padrão da $\alpha - \beta$ amirina.....	53
Figura 12 - Espectro de RMN de ^1H da amirina (CDCl_3 , 500 MHz) padrão e amostra.....	55
Figura 13 – Espectro de RMN ^{13}C da amirina (CDCl_3 , 500 MHz) padrão e amostra.	56
Figura 14 - A, B e C - Correspondem as medidas de difração de raios x (DRX) do Padrão e da amostra: A) medida completas (de $2\theta=2^\circ$ a $2\theta=100^\circ$); B e C ampliação em duas regiões de importância.....	58

Figura 15- Corresponde as medidas de difração de raios-x (DRX) da amirina e do padrão (entre $2\theta=2^\circ$ e $2\theta=30^\circ$) As barras verticais (em azul) correspondem as posições das reflexões de Bragg versus intensidade relativa dos picos proveniente de cristais de α -amirina identificado junto a base de dados ICDD, cartão PDF 00-029-1517. os picos indicados pelos triângulos amarelos correspondem a outros tipos de cristais, provavelmente da β -amirina (estruturas similares)	59
Figura 16 – Microscopia eletrônica de varredura da mistura de α , β - amirina isolada e purificada nopresente trabalho	60
Figura 17 - Gráfico de linearidade (80-800 $\mu\text{g/mL}$) para a quantificação α e β -amirina por CLAE ...	62
Figura 18- Resíduos observados versus resíduos preditos	63
Figura 19 - Efeito do pH no tamanho de partícula e no potencial zeta das nanopartículas.....	69
Figura 20 - Efeito da temperatura na faixa de 10 a 70 ° C no tamanho e índice de polidispersão de partícula das NPs.....	70
Figura 21 - Comportamento da distribuição do tamanho de partícula e potencial zeta de F5 NPs dia 0 e 15.....	72
Figura 22 - Comportamento da distribuição do tamanho de partícula e potencial zeta de F5 NPs dia 30 a 90.....	73
Figura 23- Atividade citotóxica das nanopartículas de amirina e da amirina pura	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diferentes nanotransportadores, aplicações, vantagens e limitações.	24
Tabela 2 – Exemplos de nano medicamentos comercializados nos Estados Unidos da America	27
Tabela 3 – Gradiente de eluição do sistema cromatográfico.....	41
Tabela 4 – Formulação das nanopartículas contendo α – β amirina	43
Tabela 5 - Dados do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C de amirina.....	57
Tabela 6 - curva de regressão linear de α e β - amirina.	63
Tabela 7 - Ensaio de repetibilidade	64
Tabela 8 - Avaliação da exatidão (QE = quantificação experimental; QT = quantificação teórica).....	65
Tabela 9 - Propriedades das cinco formulações das nanopartículas. Todos os ensaios foram realizados com n=3.....	66
Tabela 10 - Tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e condutividade da formulação F5, durante três meses de estudo.	71
Tabela 11 - Atividades antioxidantes pelo sequestro de radical livre	74
Tabela 12 - Atividade inibitória das NPs contendo mistura isomérica α , β - amirina sobre as enzimas α -glicosidase e lipase.....	75

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AcOEt - Acetato de Etila

ALP - Fosfatase alcalina

ALT - Alanina Aminotransferase

AST - Aspartato Aminotransferase

CCl₄ - Tetracloreto de Carbono

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

GABA-A - Ácido Gama-Aminobutírico

Hex - Hexano

IC₅₀ - Concentração de fármaco na qual 50% do seu alvo é inibido

IL 6 - Interleucinas -6

kN - kilonewton

LDH - Lactato Desidrogenase

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MRC-5 - Linhagem Fibroblástica de pulmão de feto humano

NCs – Nanocápsulas

NPs - Nanopartículas

NM – Nanômetro

PCL - Poli-ε-Caprolactona

PLA - Ácido Polilático

PLGA - Poli D, L - Ácido lático-co-Glicólico

PMMA - Poli Metil-Metacrilato

STZ - estreptozotocina

TNF α - Fator de Necrose Tumoral α

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 <i>Protium</i> (Burseraceae).....	18
2.2 Estrutura química dos triterpenos.....	18
2.3 Atividade Farmacológica da $\alpha - \beta$ amirina.....	19
2.4 Toxicidade da $\alpha - \beta$ amirina.....	22
2.5 Sistemas carreadores de fármacos.....	23
2.5.1 <i>Nanotecnologia e nanocarregadores</i>	23
2.5.2 <i>Nanopartículas poliméricas</i>	24
3 OBJETIVOS.....	34
3.1 Objetivo Geral.....	34
3.2 Objetivos Específicos.....	34
4 METODOLOGIA.....	35
4.1 Materiais e Reagentes.....	35
4.2 Equipamentos.....	36
4.3 Procedimento Experimental.....	36
4.3.1 <i>Isolamento e Purificação da mistura isomérica ($\alpha - \beta$ amirina)</i>	37
4.4 Caracterização físico-química da $\alpha - \beta$ amirina obtida.....	39
4.4.1 <i>Espectroscopia de Infravermelho transformada de Fourier (FT-IR)</i>	39
4.4.2 <i>Ressonância Magnética Nuclear (RMN 1H e RMN ^{13}C)</i>	40
4.4.3 <i>Difração de raios-X (DRX)</i>	40
4.4.4 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	40

4.5 Validação do método analítico para quantificação da mistura isomérica de α - β amirina.	40
4.5.1 Condições cromatográficas (GUILHON-SIMPLICIO, 2017, após modificações).....	41
4.5.2 Validação do método analítico.....	41
4.6 Desenvolvimento das nanopartículas (NPs) contendo de α – β amirina	42
4.6.1 Método de preparação.....	42
4.7 Caracterização das NPs	44
4.7.1 Tamanho de partícula e Índice de polidispersão	44
4.7.2 Potencial zeta e condutividade	45
4.7.3 Eficiência de encapsulamento.....	45
4.7.4 Avaliação do efeito do pH.....	45
4.7.5 Efeito térmico	46
4.8 Avaliação da atividade biológica das nanopartículas	46
4.8.1 Atividade antioxidante: inibição do radical DPPH [•]	46
4.8.2 Atividade antioxidante: inibição do radical ABTS [•]	47
4.8.3 Atividade inibitória da lipase pancreática	47
4.8.4 Atividade inibitória da α -glicosidase	48
4.8.5 Ensaio de citotoxicidade.....	49
4.9 Análise Estatística	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 Obtenção da mistura isomérica α – β amirina	50
5.2 Caracterização físico-química da mistura isomérica α – β amirina.....	51
5.3 Validação do método analítico para quantificação da mistura isomérica de α - β amirina.	61
<i>Precisão como repetibilidade</i>	64
5.4 Obtenção das NPs – Seleção da melhor nanoformulação	66

5.5 Caracterização físico química das nanopartículas	68
<i>Avaliação da eficiência da encapsulação</i>	<i>68</i>
<i>Efeito do pH.....</i>	<i>68</i>
<i>Efeito térmico</i>	<i>69</i>
<i>Avaliação da estabilidade das nanopartículas.....</i>	<i>70</i>
5.6 Testes Biológicos.....	73
<i>5.6.1 Atividade antioxidante: inibição dos radicais DPPH e ABTS</i>	<i>73</i>
<i>5.6.2 Atividade inibidora α-glicosidase de murino</i>	<i>74</i>
<i>5.6.3 Atividade inibitória da lipase</i>	<i>75</i>
<i>5.6.4 Citotoxicidade in vitro</i>	<i>76</i>
6 CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

1 INTRODUÇÃO

Um dos gêneros da família *Burseraceae* mais disseminados pela floresta Amazônica é o *Protium*, cujas espécies produzem uma resina, normalmente utilizada pela indústria, principalmente, para a produção de verniz e repelente, podendo também ser usada com finalidade medicinal (ARAGÃO *et al.*, 2007; LANGENHEIM, 2003). Os principais constituintes desta resina pertencem a dois grupos essenciais, α amirina (ursano) e β amirina (oleano). A estes terpenos são atribuídas diversas ações terapêutica (SIANI *et al.*, 2012).

As amirinas são substâncias apolares, insolúveis em água, solúveis em solventes orgânicos como éter etílico, n-hexano, benzeno e clorofórmio (MAHATO; KUNDU, 1994). Alguns triterpenoides têm demonstrado atividades anti-inflamatória, anticancerígena, antileprótica, antiviral, antibacteriana, antifúngica, antidiurética e giardicida. Também foi reportado que são inibidores da enzima acetilcolinesterase (AMARAL *et al.*, 2006; ARAGÃO *et al.*, 2006; AGRA *et al.*; 2007; MAHATO *et al.*, 1992; MAHATO, 1997). As α - β amirinas têm demonstrado atividade farmacológica no combate ao Diabetes Mellitus, à dislipidemia e também atividade hepatoprotetora em ratos.

Estudos das características físico-química das amirinas tem relatado sua alta lipofilicidade (Log P ~8) como um fator limitante para seu uso terapêutico. Apesar dos estudos mostrarem uma boa atividade farmacológica, sua baixa solubilidade aquosa têm se apresentado como inconveniente na administração por via oral (MALLAVADHANI *et al.*, 2004; FROTA, 2011). Assim, o desenvolvimento de um sistema nanoparticulado poderia ser uma alternativa para solucionar suas deficiências biofarmacêuticas e viabilizar seu uso na terapêutica.

Entre os diversos sistemas carreadores de fármacos, os sistemas nanoparticulados têm recebido especial atenção. Nanopartículas são sistemas carreadores que apresentam

dimensões inferiores a 1µm viabilizando atividades farmacológicas com concentrações muito baixas de princípio ativo (RODRIGUEZ *et al.*, 2017). Esses sistemas podem ser obtidos a partir de polímeros biodegradáveis que, devido as suas propriedades físico-químicas, têm despontado como uma opção tecnológica para a vetorização de agentes terapêuticos. O tamanho nanométrico, apresenta inúmeras vantagens para este tipo de sistema, destacando-se melhoria da solubilidade dos fármacos, aumento da estabilidade e, conseqüentemente, aumentando sua biodisponibilidade (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). As nanopartículas têm especial utilidade para administração de fármacos pela via oral, protegendo os princípios ativos da ação degradante dos ácidos estomacais, levando-o intacto até o intestino e permitindo, também, a liberação controlada do fármaco.

Assim, o presente trabalho visa desenvolver um sistema polimérico nanoparticulado (nanopartícula) contendo a mistura α - β amirina, como uma provável alternativa para corrigir problemas relacionados a sua solubilidade e biodisponibilidade, possibilitando assim, sua administração por via oral.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Protium* (Burseraceae)

Este gênero botânico é amplamente distribuído na América do Sul e no Brasil pode ser encontrado desde a região Nordeste até a Amazônica. Popularmente é conhecido como breu branco, almécega do Brasil, goma-limão, almesca, almíscar e manguinha. São árvores que produzem uma resina em seu tronco, bastante utilizada pela população local para o tratamento de diversas enfermidades (LIMA; PIRANI, 2005; MAGALHÃES *et al.*, 2000), sendo indicada como analgésico, cicatrizante, expectorante, dermatites e úlceras gástricas. Estas resinas são também utilizadas em outras aplicações, como na produção de verniz, em embarcações (calafetagem) e em incenso (práticas religiosas) (ARAGÃO *et al.*, 2007; LANGENHEIM, 2003).

Os terpenos são substâncias majoritárias presentes na resina de *Protium sp*, possivelmente, o grupo químico mais abundante neste gênero vegetal, sendo encontrado com frequência em plantas produtoras de óleos. Esta classe de substância tem sua estrutura baseada em diversas unidades de isopreno (metilbuta-1,3-dieno ou hemiterpeno com 5 átomos de carbono). Isto permite uma classificação racional dos terpenos, dependendo do número de isopentano incorporadas no esqueleto molecular básico (ARAGÃO *et al.*, 2007). Dessa forma, e seguindo essa classificação, o gênero *Protium sp* tem como componentes principais os triterpenos pentacíclicos conhecidos por α – β amirina e lupeol (ARAGÃO *et al.*, 2007; MAGALHÃES *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2005).

2.2 Estrutura química dos triterpenos

As α - β amirina são triterpenos pentacíclicos (figura 1) que podem ser divididos em três grupos: ursano, oleano e lupeol, e apresentam diferença básica na estrutura química,

apenas no anel aromático “E”, assim, quando o anel está posicionado no C 20 e contém duas metilas é chamado de β – amirina (oleano) e quando contém uma metila no C 20 e outra no C 19 é chamado de α – amirina (ursano) ambos com estereoquímica na forma cis entre os anéis “D” e “E”. Por outro lado, o lupeol apresenta estereoquímica na forma trans relacionados aos anéis “D” e “E”, e ainda anel “E” composto por cinco carbonos (BARROS *et al.*, 2011; HALDAR *et al.*, 2014; OLIVEIRA, 2005).

Os triterpenos apresentam esqueleto similar aos esteroides, hipótese pela qual se atribui diversas ações farmacológicas (BARROS *et al.*, 2011). Estes isômeros apresentam-se na forma de pó branco, com ligeiro odor, baixa solubilidade em água, e boa solubilidade em solventes orgânicos (ARAGÃO *et al.*, 2015).

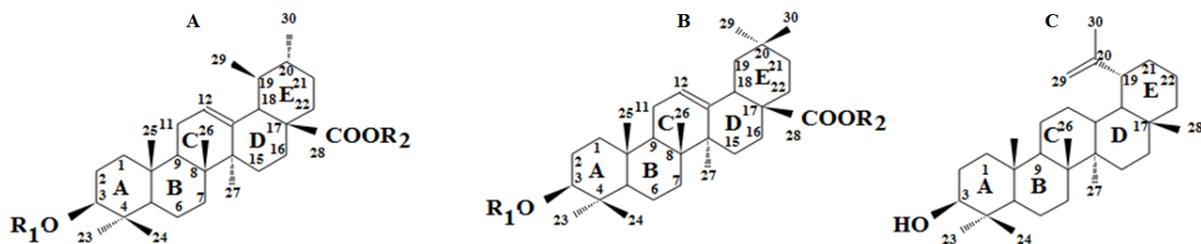


Figura 1 – Estrutura química dos triterpenos pentaciclicos, A) α amirina, B) β amirina e C) lupeol

2.3 Atividade Farmacológica da α – β amirina

Na literatura tem sido reportados estudos relatando os efeitos farmacológicos das amirinas extraídas da resina de *Protiumm sp.* Alguns deles têm relatado um grande potencial dessas substâncias nos tratamentos de diversas patologias (ARAGÃO *et al.*, 2007). Assim, tem sido evidenciado a utilidade das amirinas como protetoras da lesão hepática (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Também foi relatada as atividades ansiolítica e antidepressiva (ARAGÃO *et al.*, 2006), antinoceptiva (PINTO *et al.*, 2008; SOLDI *et al.*, 2008), anti-inflamatória (MELO *et al.*, 2011; THIRUPATHI *et al.* 2016), hipoglicemiante, hipolipemiante (SANTOS *et al.*,

2012), estimulante da proliferação de queratinócitos (BISKUP *et al.*, 2012), e anti convulsivante (ARAGÃO *et al.*, 2015). Outros efeitos citados foram para o combate da insônia (JEON *et al.*, 2015), como modulador do estresse oxidativo (SINGH., *et al.*, 2015), em doenças vasculares isquêmicas (ISHII., *et al.*, 2015), efeitos anti fibróticos, anti-apoptóticos (THIRUPATHI *et al.*, 2016), e para o tratamento da obesidade (CARVALHO *et al.*, 2016).

Oliveira *et al.*, (2005) demonstraram em um modelo de hepatotoxicidade em ratos, induzida por paracetamol, que a mistura dos isômeros $\alpha - \beta$ amirina produz um efeito protetor hepático dose dependente, ainda com diminuição dos marcadores séricos alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). Nesse estudo, as amirinas produziram um elevado efeito anti-inflamatório, evitando a morte dos animais.

As amirinas também apresentaram atividade ansiolítica e antidepressiva em ratos usando o método do campo aberto e labirinto elevado (ARAGÃO *et al.*, 2006). Os resultados obtidos demonstraram interação da amirina com o recetor GABA-A, possivelmente, nos subtipos que provocam os efeitos dos benzo-diazepínicos, com atividade sedativas e hipnóticas. No teste de natação forçada foi possível evidenciar que o efeito antidepressivo decorre do aumento da atividade adrenérgica.

No modelo de dor visceral induzida com ácido acético por via intraperitoneal, o octonoato de $\alpha - \beta$ amirina mostrou uma ação cerca de 2.300 vezes maior que quando foi administrada por via oral. Esse resultado indica que provavelmente a lipofilia favorece a absorção da molécula o que poderia ser um fator determinante na potência destes triterpenos (SOLDI *et al.*, 2008). Um experimento de dor orofacial induzido por formalina e capsaïcina demonstrou que as amirinas não têm ação na dor neurogênica mediada por receptores opioides, mas sim na dor inflamatória mediada por ciclooxigenases. Assim, as amirinas se apresentam como um fármaco promissor no tratamento da dor da cavidade oral e facial (PINTO *et al.*, 2008).

Santos *et al.*, (2012) investigaram o efeito hipoglicemiante causado pela mistura de α , β -amirina, em modelos de ratos com indução diabética pela Estreptozotocina (STZ). Neste estudo, os autores sustentam que a diminuição dos níveis glicêmicos pode ter sido causada pela redução da absorção de glicose entérica, inibição da glicogenólise e aumento de sua absorção pela musculatura e tecido adiposo. A ação anti-dislipidêmica poderia estar associada à melhora da sensibilidade da insulina, pois esta não regula só o metabolismo dos carboidratos, mas interfere também no metabolismo dos lipídeos e lipoproteínas, bem como triglicerídeos.

Em outro estudo conduzido por Aragão (2015), utilizando um modelo de convulsões induzidas por pentilenotetrazol, foi verificado que a amirina produziu efeitos anticonvulsivantes significantes e que a indução convulsiva foi mediada por GABA, sustentando a hipótese que a amirina pode está associada com os receptores gabaérgicos. As amirinas, possivelmente, produzem um efeito neuroprotetor ao estimular a produção de taurina (um aminoácido com diversas funções fisiológicas ao nível cerebral). Outro estudo utilizando um modelo de sono induzido por pentobarbital foi sugerido que a β amirina age ativando o neurotransmissor gabaérgico resultando em melhora no estado geral do sono (JEON *et al.*, 2015).

O tetracloreto de carbono (CCl_4) é um potente agente hepatotóxico, reage com o Citocromo P-450, causando desalogenação, formando triclorometila que é altamente reativo e este pode se ligar as proteínas e os lipídeos, levando a peroxidação e a patogênese da doença. O uso de amirina diminuiu a elevação das lipoxigenases demonstrando efeito antioxidante e de eliminação de radicais livres, com isso reestabelece as biomembranas do parênquima hepático, neste sentido, as amirinas agem de forma curativa como modulador hepático (SINGH *et al.*, 2015).

A β amirina mostrou boa atividade anti-angiogênica, em doenças vasculares isquêmicas sugerindo que poderia ter utilidade nesses tipos de doenças (Ishii *et al.*, 2015).

Em um estudo realizado para verificar os efeitos anti-fibróticos, anti-apoptóticos em modelos de ratos intoxicados com dimetilnitrosamina, a utilização de β amirina mostrou diminuição das enzimas plasmáticas AST, ALT, ALP e LDH em relação ao valor normal, indicando estabilidade da membrana do hepatócito e, conseqüentemente, reparo da lesão hepática causada pela dimetilnitrosamina. A β amirina também mostrou atividade na regulação dos marcadores apoptóticos diminuindo significativamente as caspases 3 que é um marcador de fibrose hepática (THIRUPATHI *et al.*, 2016).

A obesidade tem sido um problema de dimensões mundiais e vários estudos têm sido realizados buscando soluções terapêuticas para esse problema. Nesse contexto destaca-se o trabalho executado por Carvalho *et al.*,(2016) que utilizando dieta rica em gorduras para camundongos avaliou o efeito anti-obesidade das amirinas. Os resultados mostraram que estes triterpenos reduzem os acúmulos de gordura induzida pela dieta no ganho de peso, adiposidade visceral e a esteatose hepática. O mecanismo de ação proposto pelos autores inclui inibição das amilases e lípases no sistema digestivo, melhora significativa na resistência à leptina (liberada da célula gordurosa em resposta ao aumento da massa gordurosa) e insulina, mantendo-a bem próximo dos parâmetros orgânicos.

2.4 Toxicidade da α – β amirina

Segundo Oliveira *et al.*,(2005), a resina de *Protium* e a mistura isomérica não demonstraram potencialidade tóxica quando administradas em camundongos por via intraperitoneal. Em um teste de toxicidade aguda realizado pelos autores foi administrado em ratos a mistura isomérica de α - β amirina por via oral, em dose de 5g/kg e por via intraperitoneal até 2g/kg sendo observado nenhuma intoxicação dos animais e nem óbito.

Ishii *et al.* (2015) incubou células endoteliais de veia umbilical humana cultivadas em

diferentes concentrações de β amirina em um intervalo de 24 a 72h. Não foi observado efeito citotóxico na viabilidade celular.

Uma outra pesquisa realizada por Thirupathi *et al.*,(2016), onde os ratos foram tratados com β amirina em doses 10 e 50 mg/kg durante 4 semanas não foi observado sinais de toxicidade, mas quando administrado doses superiores a 30mg/kg os animais apresentaram tremor, ataxia, aumento da respiração e letargia.

2.5 Sistemas carreadores de fármacos

2.5.1 Nanotecnologia e nanocarregadores

A nanotecnologia estuda as aplicações da tecnologia dos objetos e dispositivos que possuam pelos menos uma de suas dimensões físicas na escala nanométrica, ou seja, uma parte em 1 milhão, um nanômetro (1 nm) que corresponde a bilionésima parte do metro (PIMENTA; MELO, 2004). Pesquisas recentes tem-se desenvolvido com o objetivo de obter novos produtos capazes de oferecer vantagens, como: melhor solubilidade, biodisponibilidade e estabilidade. Essas vantagens são atribuídas ao tamanho nanométrico, que pode produzir efeitos superiores as formulações, quando comparado ao fármaco usado na forma tradicional (DIMER, *et al.*, 2013).

Os materiais utilizados na produção dos sistemas nanométricos, principalmente quando carreadores de fármacos, obedece um critério rigoroso de qualidade e devem ser suscetível a biocompatibilidade, capacidade para funcionalização de superfície, conjugação, complexação e encapsulamento. Nesse contexto, os agentes terapêuticos podem ser encapsulados, ligados covalentemente, adsorvidos, solubilizados, retidos ou ainda conjugados as nanopartículas (MOGHIMI *et al.*, 2005).

Os nanocarreadores são estruturas capazes de transportar o fármaco partindo do local da administração até o ponto da efetiva ação terapêutica ou diagnóstica e, para alcançar este objetivo, as principais nanoestruturas usadas são: as nanopartículas lipídicas, as micelas, os lipossomas e as nanopartículas poliméricas. A tabela 1 mostra os diferentes nanotransportadores, aplicações, vantagens e limitações (ETHERIDGE *et al.*, 2013).

NT	Vantagens	Desvantagens	SA	Aplicação	Referência
NP	Capacidade de encapsular diferentes tipos de substâncias / Proteção da substância ativa	Citotoxicidade de alguns polímeros	Griseofulvina Tretinoína β-caroteno Docetaxel	Antifúngica Tratamento Dérmico Antioxidante Anti-tumoral	ZILI <i>et al.</i> , 2005 OURIQUE <i>et al.</i> , 2008 RIBEIRO <i>et al.</i> , 2008 TORRECILLA <i>et al.</i> , 2013
	Baixa citotoxicidade / Biocompatibilidade / Encapsulação de SA hidrofílicas e hidrofóbicas/ Não imunogênicos	Estabilidade	2- Metoxiestradiol 5- Fluoruracilo/ Metotrexano Diclofenaco de sódio	Anti-tumoral Anti-tumoral Anti inflamatório	DU <i>et al.</i> , 2010 CONCEIÇÃO <i>et al.</i> , 2009 LIMA & OLIVEIRA, 2002
NLC	Melhor capacidade de encapsulamento / Eficácia na incorporação da SA	Não referidas	Luteína ATRA Vimopcetina	Dérmica Anti-tumoral Tratamento neurológico	MITRI <i>et al.</i> , 2011 CHINSRIWONGKUL <i>et al.</i> , 2011 ZHUANG <i>et al.</i> , 2010

Tabela 1 – Diferentes nanotransportadores, aplicações, vantagens e limitações.

Legenda: NT- Nanotransportadores; NP- Nanopartículas Poliméricas (Nanocápsulas/Nanoesferas); Lip- Lipossomas; NLC - Carregadores lipídicos nanoestruturados. ATRA - Ácido trans retinóico

Fonte: Retirado de DELGADO (2013)

2.5.2 Nanopartículas poliméricas

Nanopartículas poliméricas são estruturas coloidais que têm em sua composição polímeros de origens naturais, sintéticos ou semissintéticos e são biodegradáveis, estas estruturas poliméricas têm ampla utilização para liberação de fármacos podendo direcionar o agente terapêutico para locais específicos ou mesmo controlar sua cedência (RAWAT *et al.*, 2006). As nanopartículas podem ser divididas em duas categorias: nanoesferas e nanocápsulas e esta divisão depende da composição e organização estrutural (figura 2).

As nanocápsulas possuem um sistema tipo reservatório com núcleo líquido, que pode ser óleo ou água envolvido pelo material sólido (invólucro polimérico). Nesta situação, o fármaco pode estar dissolvido no núcleo e/ou incluído ou adsorvido na parede polimérica. Já as nanoesferas são estruturas formadas por matrizes poliméricas que, diferentemente das nanocápsulas o núcleo não se apresenta diferenciado (isento de óleo). Os fármacos neste tipo de estrutura estão distribuídos ou encapsulados de forma homogênea na matriz polimérica, e ainda, podem estar adsorvidos na superfície da nanoesferas. O processo de liberação do fármaco a partir deste tipo de nanoestrutura geralmente ocorre por difusão (SOPPIMATH *et al.*, 2001; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; GUTERRES *et al.*, 2007; LETCHFORD; BURT, 2007; PARVEEN; *et al.*, 2012; MELO *et al.*, 2012; STEICHEN *et al.*, 2013).

A liberação dos fármacos presentes nas estruturas poliméricas para os líquidos biológicos é dependente: da dissolução e desintegração do polímero, da nanoestrutura e, também, da ocorrência da difusão destes mesmos líquidos na membrana polimérica. As características do fármaco, bem como as do polímero (biodegradação, distribuição de massa molecular e hidrofobicidade) exercem forte influência na liberação do princípio ativo e, conseqüentemente, uma elevada importância na obtenção de estruturas nanoparticuladas com finalidade de liberação controlada do fármaco (RIEUX *et al.*, 2006; TORCHILIN, 2006).

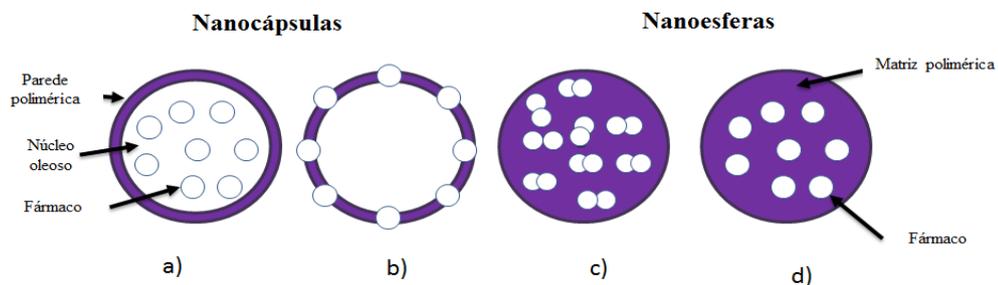


Figura 2 - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas
 Legenda: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas.

Fonte: (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003)

Estas estruturas têm sido desenvolvidas com finalidade de aplicações na terapêutica para administração de fármacos por diversas vias como oral, parenteral e oftalmológica (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

As pesquisas focam seus esforços, principalmente, na via de administração oral com objetivo de corrigir ou atenuar os efeitos indesejáveis como: 1) diminuição dos efeitos colaterais de alguns fármacos, exemplo, dos anti-inflamatórios não esteroidais (irritação na mucosa gástrica); 2) proteção de fármacos sensíveis aos líquidos entéricos (peptídeos, proteínas e hormônios) preservando sua biodisponibilidade. A oftalmologia, também, desperta grande interesse por estas formulações visando uma liberação controlada, redução de efeitos colaterais e melhora da absorção sistêmica quando da administração destas formulações pela via oftálmica (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Segundo Guterres *et al.*, (2007), as nanocápsulas modificam a atividade terapêutica do fármaco através da alteração nas características físico-químicas das preparações, pela capacidade de manter o fármaco por mais tempo no local da aplicação, produzindo assim uma ação mais prolongada, além de se comportar como reservatório para fármacos lipófilo o que é útil no tratamento de enfermidades da pele, por exemplo, através da administração pela via cutânea.

Os sistemas nanoparticulados apresentam-se como uma estratégia consistente e promissora para indústria quando comparados aos sistemas convencionais são capazes de melhorar a biodisponibilidade, solubilidade e permeabilidade de vários fármacos facilitando assim, administração por via oral de algumas moléculas antes impossíveis de serem usadas por esta via, outro ganho com as nanopartículas é a redução da frequência de doses diárias e como consequência uma melhor adesão ao tratamento por parte do cliente. As nanopartículas minimizam problemas relacionados aos fármacos como: baixa solubilidade em água,

permeabilidade e menor biodisponibilidade e com isso conserva a estabilidade e mantém a estrutura da forma farmacêutica (KUMARI *et al*, 2010).

No mercado é possível encontrar uma diversidade de polímeros com diferentes características e funcionalidades, mas aqueles biodegradáveis são os de primeira escolha quando se quer desenvolver nanopartículas, devido sua fácil eliminação pelas vias de excreção do organismo e, também, por apresentar um maior controle e estabilidade da liberação dos fármacos, pois dependendo da escolha da formulação a degradação pode ser precoce ou perdurar por alguns dias. Os polímeros biodegradáveis podem ser de origem natural (albumina, celulose, alginato, colageno e quitosano), ou ainda, sintética (ácido polilático (PLA), poli ϵ -caprolactona (PCL) e poli metil-metacrilato (PMMA), são alguns exemplos) (RIEUX *et al.*, 2006).

A tabela 2 ilustra alguns medicamentos obtidos através da nanotecnologia e conhecidos como “nanomedicamento”, disponíveis no mercado dos Estados Unidos, com aprovação da *Food and Drug Administration* (FDA), de acordo com um levantamento realizado pela Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial em 2013.

Nano medicamento	Fármaco/carreador	Via de administração	Empresa	Indicação	Ano
Abelcet	Anfotericina B/ complexo lipídico	Intravenosa	Enzon	Infecções fúngicas	2004
Abraxane	Paclitaxel/nanopartículas de albumina (~130 nm)	Intravenosa	Abraxis Bio Science AstraZeneca	Câncer de mama metastático	2005
Ambisome	Anfotericina B/lipossomas	Intravenosa	Gilead (Foster City, CA, USA), Fujisawa Japan)	Infecções fúngicas	1995
Rapamune	Sirolimus/nanocristais	Comprimidos	Elan Drug Delivery, Wyeth Pharmaceutical	Imunossupressor	1999
Triglide	Fenofibrato/nanocristais	Comprimidos	SkyePharma, First Horizon Pharmaceutical	Lipidemias	2005

Tabela 2 – Exemplos de nano medicamentos comercializados nos Estados Unidos da America
Fonte: (BRASIL, 2013).

Considerando a nanotecnologia como recurso farmacotécnico para obtenção de medicamentos, as propriedades dos princípios ativos bem como dos polímeros e demais excipientes que compõem a formulação exercem influência fundamental nos processos de liberação do(s) princípio(s) ativo(s), bem como para atingir o sítio alvo de atividade farmacológica. Geralmente, os polímeros de origem natural apresentam características de liberação mais intensa por serem biodegradáveis por natureza; em contrapartida os sintéticos possuem a capacidade de prolongar um pouco mais a liberação dos agentes terapêuticos, podendo se alongar a dias e até mesmo semanas, o que é ideal quando se pretende desenvolver um medicamento de liberação sustentada (RIEUX *et al.*, 2006; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; TORCHILIN, 2006).

2.5.2.1 Métodos de obtenção

Há relatos na literatura de diversos métodos de preparação de nanopartículas poliméricas, os quais em linhas gerais são divididos em dois grupos: os baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos (cianoacrilatos de alquila) e os fundamentados na precipitação de polímeros pré-formados, cujos principais são os, poli ácido lático (PLA), poli ácido-co-ácido glicólico (PLGA), poli ϵ caprolactona (PCL), kollicoat, eudragit e, também, os copolímeros do ácido metacrílico e de um éster acrílico ou metacrílico (GUTERRES *et al.*; 2007; DASHEVSKY *et al.*, 2004; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Dentre todas as técnicas descritas na literatura para obtenção de nanopartículas, destaca-se o método proposto por Fessi *et al.* (1989) baseado na deposição de um polímero pré-formado e biodegradável, também conhecido como nanoprecipitação, é um método que elimina a presença indesejável de monômeros e oligômeros residuais, que são produzidos pelo processo de polimerização *in situ* e, também, evita a possibilidade de reação cruzada entre o monômero e o agente terapêutico. Esta técnica consiste na dissolução do polímero em um

solvente orgânico (acetona ou etanol, por exemplo) associado com o óleo (quando presente, e necessário), o tensoativo lipofílico e o agente terapêutico. Esta fase, chamada de fase oleosa, é adicionada lentamente sobre a fase aquosa, composta de água e tensoativo hidrofílico. O resultado desta mistura é a formação espontaneamente, de nanocápsulas (quando há presença de óleo) e ou de nanoesfera (quando há ausência de óleo), apresentando tamanhos que variam, geralmente, de 200 a 500 nm (figura 3).

Características importantes das nanoestruturas obtidas através desta técnica é a estabilidade, a elevada taxa de encapsulação em especial para agentes terapêuticos lipofílicos (SCHAFFAZICK, *et al.*, 2003; GUTERRES, *et al.*, 2007;).

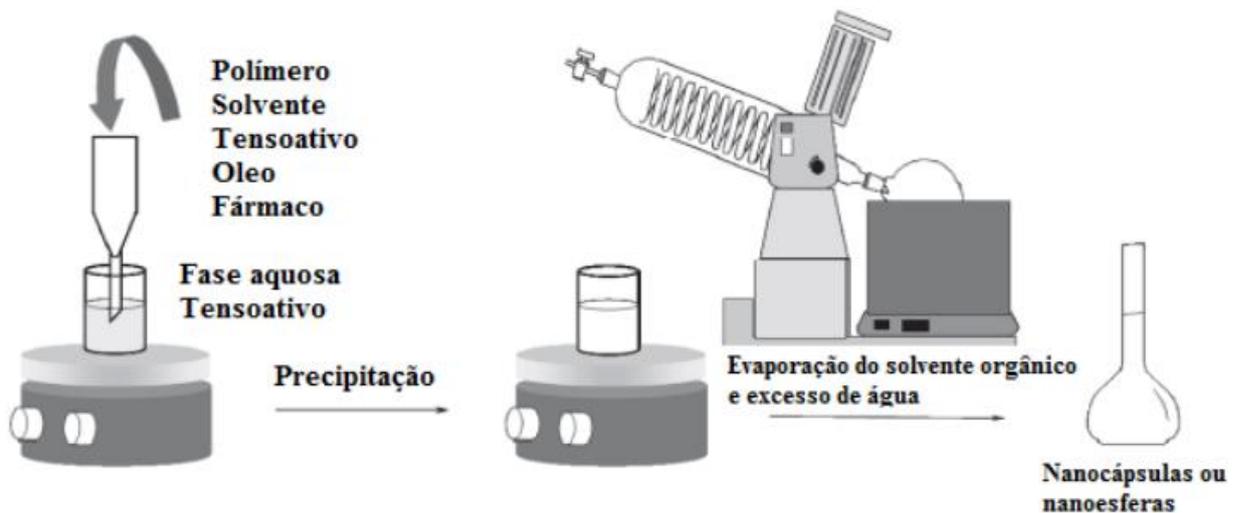


Figura 3 - Representação esquemática de preparação de nanopartículas obtidas pelo método deposição do polímero pré-formado.

Fonte: retirado de GUTERRES *et al.*, 2007.

O método de nanoprecipitação seguido de evaporação do solvente é um processo relativamente simples. A fase orgânica é constituída de um polímero dissolvido num solvente orgânico, como exemplo acetona ou álcool etílico, onde estará dissolvido o fármaco. O uso de um tensoativo inserido na fase orgânica como por exemplo, fosfolipídio é adequado para prevenir a coalescência das nano gotículas. A fase aquosa é composta por água e um tensoativo do tipo o/a, por exemplo, tween 80[®]. A fase orgânica é vertida sobre a fase aquosa,

sobre agitação constante. Assim ocorre uma emulsificação espontânea formando um sistema opalescente, devido a miscibilidade das fases. O solvente orgânico é retirado sob pressão reduzida para a formação das nanopartículas (QUINTANAR-GUERRERO, *et al.*, 1998; LEGRAND, *et al.*, 2007; MOHAMMADI, *et al.*, 2010).

Para o desenvolvimento de nanocápsulas, a escolha do óleo usado na fase orgânica deve obedecer os seguintes critérios: ausência de toxicidade, compatibilidade com o agente terapêutico, miscibilidade no solvente orgânico e ausência de risco de degradação do polímero (BLOUZA *et al.*, 2006). Dessa forma, o método de nanoprecipitação atende de preferência ao encapsulamento de substância lipofílicas por conta da miscibilidade do solvente com a fase aquosa, sendo pouco eficiente para fármacos hidrossolúveis. Esquemáticamente, a figura 4 mostra o processo de preparação de nanopartículas poliméricas com base no método de deposição interfacial do polímero pré-formado (REIS *et al.*, 2006).

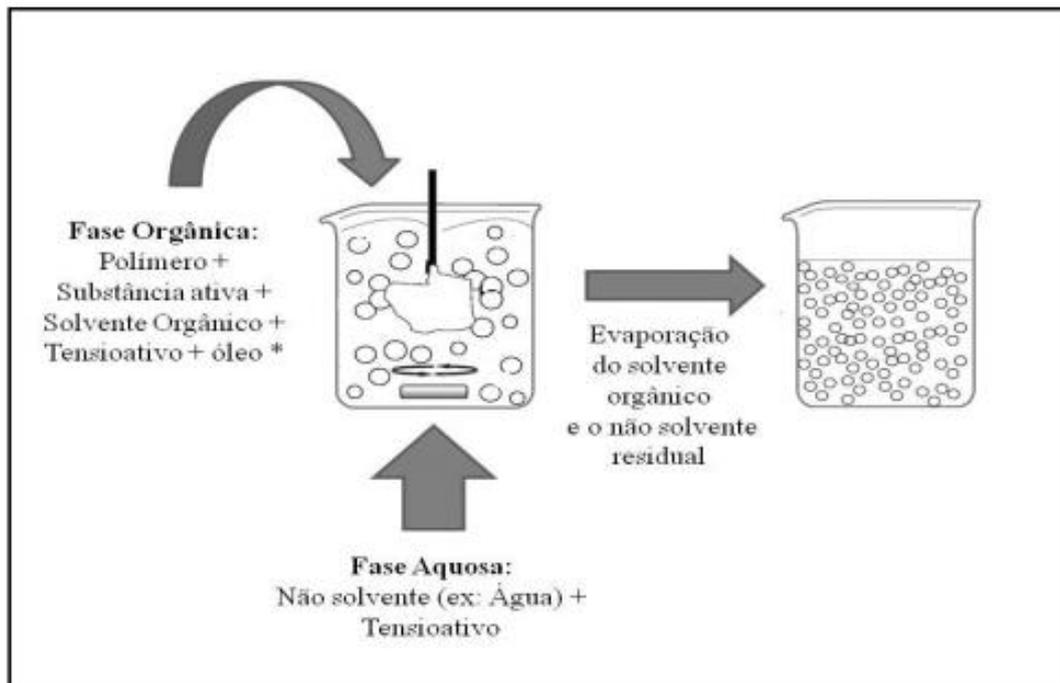


Figura 4 - Representação do método de Nanoprecipitação

Legenda: * O óleo é usado apenas quando da formação de nanocápsulas, na formação de nanoesferas este componente está ausente

Fonte: retirado de REIS *et al.*, 2006

Para obtenção de nanocápsulas pelo método da deposição interfacial de polímeros pré-formados, os componentes indispensáveis são: o polímero, o óleo e os tensoativos (ANGELI, 2007; FESSI *et al.*, 1989), sendo o componente oleoso imprescindível pois, é nele que se dá a solubilização da substância que se deseja encapsular, e a lipossolubilidade do agente terapêutico é um fator preponderante para encapsulação. Os compostos oleosos mais usados são os ésteres etílicos de ácidos graxos saturados, misturas de triglicerídeos de ácidos graxos saturados de cadeia longa e Miglyol 80[®] e 812[®] (FESSI *et al.*, 1989). Os tensoativos, também, são componentes importantes para estas preparações, sendo necessário, geralmente, um de elevado Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo (exemplo Symperonic PEF 80[®] ou Tween 80[®]) e outro de baixo valor de Equilíbrio Hidrofilo Lipofilo, exemplo monoestearato de sorbitan (Epikuron 170[®]). Quando o solvente é evaporado, os tensoativos agem aumentando a viscosidade do sistema, e conseqüentemente aumenta a estabilidade e evita a coalescência e a agregação entre as partículas. (FESSI *et al.*, 1989; PUISIEUX., *et al* 1994).

A encapsulação de fármacos ou de agentes cosméticos utilizando polímeros representa uma opção de interesse para mascarar as propriedades físico-químicas intrínsecas de várias substâncias, melhorar a interação com membranas biológicas e melhorar sua absorção, penetração cutânea ou fixar o produto mais tempo no local da aplicação (GUTERRES *et al*, 2007).

As formas farmacêuticas de liberação prolongada devem possuir características de cedência específicas para as condições do sistema digestório. Os polímeros como Eudragit®, acetato de polivinilo, Kollicoat MAE etc, produzem liberação do fármaco que depende do pH. Muitos fármacos são ionizáveis e por isso, a liberação do fármaco ocorre dependendo do pH do meio. Os fármacos com características básicas que tendem a solubilizar em pH baixo, podem ser liberados ao nível estomacal (DASHEVSKY *et al*, 2004). Estudos toxicológicos

asseguram que estes polímeros quando degradados produzem monômeros biocompatíveis e não oferecem risco para a saúde, pois a via de metabolização está bem estabelecida (MELO *et al.*, 2012).

2.5.2.2 Caracterização das suspensões de NPs

A caracterização das nanopartículas podem ser realizada pela união de várias técnicas tais como: a análise morfológica, distribuição de tamanho, determinação do potencial zeta e do pH, bem como a determinação da concentração de agente terapêutico ligado às nanoestruturas (taxa de encapsulamento) (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) é bastante utilizada na busca de informações relativas à forma e ao tamanho das nanopartículas. A MET possibilita também diferenciar estas nanopartículas poliméricas (nanocápsulas e nanoesferas), podendo, inclusive, determinar a espessura da parede das nanocápsulas. Outra técnica é a criofratura que também têm sido usada no auxílio da análise morfológica destas nanoestruturas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; DEDAVID, 2007; PORTO, 2015).

A avaliação quanto ao tamanho e distribuição do tamanho da partícula da formulação é de fundamental importância, pois um dos principais problemas na armazenagem é a sedimentação das nanopartículas que leva agregação e perda da estabilidade (ANGELI, 2007). Outro ensaio relevante é a medição do potencial zeta que fornece informações importantíssima para caracterizar a superfície das nanopartículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

O potencial elétrico no plano de corte, pode ser definido como a distância da superfície da partícula a um ponto no fluido da suspensão, os íons de carga elétrica diferente permanece fortemente unidos a partícula quando esta se move no campo elétrico. É possível calcular esta mobilidade através da corrida eletroforética das partículas num campo elétrico

(MALVERN, 2014). O potencial zeta reflete uma medição indireta da estabilidade física das partículas, quanto maior o valor modular do potencia zeta, maior a estabilidade dos sistemas nanoparticulados. As partículas que apresentarem um potencial zeta elevado (positivo ou negativo), repelem-se com muita força, evitando a agregação e coalescência (TAMJIDI, *et al.* 2013).

O monitoramento do pH de uma suspensão em função do tempo, oferece informações relevantes pois, uma variação neste parâmetro pode indicar degradação do polímero e alteração da estabilidade da suspensão, por tanto quando o pH diminui num período de tempo bem estreito, pode ser devido a ionização de grupos carboxílicos contidos no polímero como também à hidrólise, dependendo da hidrofobicidade do poliéster (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; GUTERRES *et al.*, 1995).

Mensurar o fármaco presente em uma nanopartícula é essencial. Não é uma tarefa fácil pois tem dificuldade em separar principio ativo livre da aquele carregado no interior da nanopartícula. A técnica amplamente utilizada é a ultracentrifugação. O fármaco livre é medido no sobrenadante e o fármaco total é determinado após completa dissolução das nanopartículas em solvente adequado. A quantidade do fármaco encapsulado é mensurado em função da diferença entre o total do fármaco presente na suspensão e a quantidade de fármaco livre na suspensão, sendo determinada após a separação das fases por ultrafiltração/centrifugação (ANGELI, 2007; FESSI *et al.*, 1989).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver e avaliar a atividade biológica *in vitro* de nanopartículas poliméricas carregadas com a mistura isomérica α - β amirina.

3.2 Objetivos Específicos

1. Obter e caracterizar físico-quimicamente uma mistura isomérica de α - β amirina;
2. Validar método analítico por CLAE para quantificação da mistura isomérica de α - β amirina.
3. Desenvolver uma suspensão de nanopartículas polimérica contendo a mistura isomérica de α - β amirina;
4. Avaliar a eficiência de encapsulação de mistura isomérica de α - β amirina na suspensão de nanopartículas;
5. Avaliar a estabilidade, em prateleira, durante 90 dias da suspensão de nanopartículas obtidas;
6. Avaliar a atividade antioxidante da suspensão de nanopartículas;
7. Avaliar a atividade inibitória de alfa-glicosidase e lipase da suspensão de nanopartículas;
8. Avaliar a citotoxicidade relativa da suspensão de nanopartículas em fibroblasto não neoplásico de pulmão humano.

4 METODOLOGIA

4.1 Materiais e Reagentes

- ❖ Acetato de Etila Grau CLAE (Tédia[®], USA);
- ❖ Acetona P.A (Dinâmica Química Contemporânea Ltda);
- ❖ Acetonitrila Grau CLAE (Merck[®]);
- ❖ Água bi destilada para injeção, marca B. Braun;
- ❖ Água mili-Q[®] (FITOPHAR-FCF-UFAM);
- ❖ Dispositivo de ultracentrifugação Amicon Ultra 0,5, membrana de celulose regenerada 100000 Daltons (Millipore[®], Bedford, USA);
- ❖ Eudragit[®] E100 [poli (ácido metacrílico, metacrilato de metilo) BASF (Alemanha)].
- ❖ Kollicoat[®] MAE[®] 100P [poli (ácido metacrílico, metacrilato de etilo)] BASF (Alemanha);
- ❖ Lipase pancreática de porcino tipo II (Sigma, código L3126-25G);
- ❖ Membrana 0,45 µm (Millipore[®], Bedford, USA);
- ❖ Monoestearato de Sorbitano - Span 20[®] (Sigma Aldrich Chem. Co.);
- ❖ Monolaurato de polioxietileno sorbitano – Tween 80[®] (Sigma Aldrich Chem);
- ❖ 4-Nitrophenyl palmitate (PNP, Sigma, código N2752-50G);
- ❖ Padrão secundário α - β Amirina (FITOPHAR-FCF-UFAM);
- ❖ Poli- ϵ -caprolactona (PCL) – MM 70.000-90.000 (Sigma Aldrich Chem. Co.)
- ❖ Tampão pH 4,00 e 7,00 (Sigma);
- ❖ Tampão TRISMA-HCL 75mM pH 8,5 (Sigma)
- ❖ Vanilina sulfúrica(preparada no FITOPHAR-FCF-UFAM).

4.2 Equipamentos

- Agitador magnético e aquecedor (Nova Ética, Modelo: 114);
- Balança analítica (marca Shimadzu, Modelo AY 220);
- Bomba a vácuo (marca primatec);
- Centrífuga (marca HT, Modelo MCD-2000) até 10.000 RPM;
- Coluna Cromatográfica Luna C18 Phenomenex (250 mm x 4,6 mm d.i., 5 μ m com pré-coluna de mesmo material);
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) (marca Shimadzu, modelo Ultimate 3000 com detector de UV-vis);
- Equipamento de DRX (marca Panylitical, modelo Empyrian,);
- Funil de Büchner;
- Microscopia eletrônica de varredura (marca Carl Zeiss, modelo LEO 435 VP, Sputter Bal Tec, modelo CPD 050);
- Multivapor rotatório (marca Buchi, Modelo: P-6);
- Ressonância Magnética Nuclear (marca Bruker, modelo ASCEND™ 500);
- Titulador automático MPT-2 (Malvern, UK) acoplado ao Zetasizer;
- Ultrassom (Cleaner, Modelo: USC 1400);
- Zetasizer® (marca Malvern, Modelo: Nano SZ).

4.3 Procedimento Experimental

Os trabalhos foram realizados em duas etapas: a primeira foi o processo isolamento/purificação da amirina a fim de obter uma mistura dos isômeros (α - β amirina) com elevada pureza. Essa etapa foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF/UFAM). A segunda etapa consistiu no desenvolvimento da suspensão de nanopartícula polimérica realizada no Laboratório de

Inovação e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas (FCF/UFAM). A figura 5 representa o fluxograma experimental geral deste estudo.

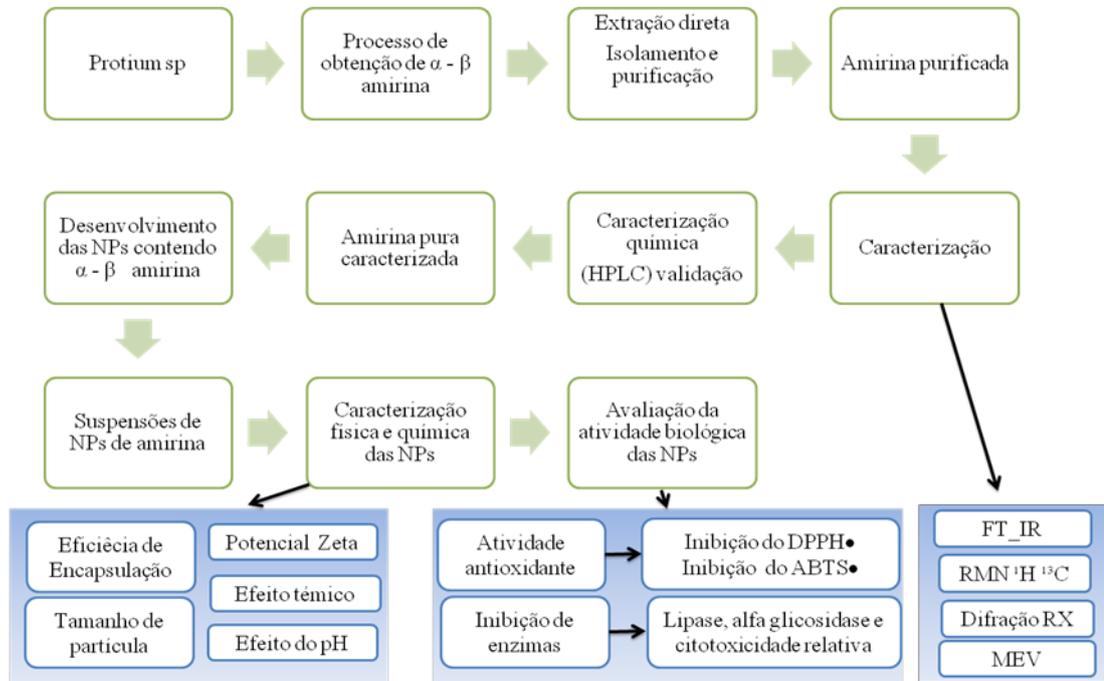


Figura 5- Fluxograma da parte experimental

4.3.1 Isolamento e Purificação da mistura isomérica ($\alpha - \beta$ amirina)

4.3.1.1 Material vegetal

Foi usado 500g de resina de uma planta do gênero *Protium*, comprada no mercado municipal de Coari, município do estado do Amazonas, e gentilmente cedido pela Profa. Dra. Fernanda Simplicio Guillon para realização desta pesquisa. O material vegetal foi armazenado em local limpo e seco a temperatura ambiente, até o procedimento de extração.

4.3.1.2 Processo de extração/isolamento/purificação

Foi realizada uma extração direta colocando 30g de amostra triturada numa coluna cromatográfica de 5,5 cm de diâmetro interno e 38 cm de altura, aberta em fase normal. O material foi submetido a uma filtração cromatográfica sobre sílica-gel 60 (0,063-0,200 mm;

70-230 Mesh). Os eluentes utilizados foram n-hexano, acetato de etila e metanol em ordem crescente de polaridade obtendo-se seis frações de 300 mL cada.



Figura 6 - Processo para obtenção e isolamento da mistura isomérica α,β -amirina a partir da resina do *Protium sp.* A) amostra de *Protium sp.* comercial; B) processo de trituração; C) coluna cromatográfica utilizando a amostra diretamente na coluna e D) processo de rota-evaporação das frações com presença de α, β -amirina

As proporções foram: fração 1 (F1) – hex/AcOEt 99:1 v/v; frações 2 (F2) – hex/AcOEt 98:2 v/v, fração 3 (F3) – hex/ AcOEt 97:3 v/v; fração 4 (F4) – hex/AcOEt 96:4 v/v; fração 5 (F5) –

hex/AcOEt 95:5 v/v; e fração 6 (F6) 100% de metanol. Todas as frações foram evaporadas a vácuo para eliminar o excesso de solventes (figura 6).

Para purificação das frações, foram realizadas duas lavagens sucessivas em banho de ultrassom usando acetona como solvente e cinco lavagens usando metanol. Cada lavagem durou 10 min. e em seguida, as amostras foram filtradas utilizando funil de Buchner e bomba de vácuo. As amostras foram secas em capela de extração e pesadas para verificar o rendimento. Posteriormente, foram feitas CCD em placas de sílica gel F₂₅₆ de 5 cm de altura. A amostra, exatamente 1 mg, foi dissolvida em 10 mL acetato de etila. A fase móvel consistiu em uma mistura de n-hexano e acetato de etila na proporção 8:2 (v/v). A amostra foi aplicada a 5 mm da base, o percurso cromatográfico foi de 4 cm. Para a visualização das amirinas as cromatoplas foram reveladas com vanilina sulfúrica. As manchas observadas foram comparadas com as manchas do padrão dos isômeros α e β -amirina (Fitophar), eluído simultaneamente com as amostras.

4.4 Caracterização físico-química da α – β amirina obtida

O mistura isomérica obtida foi caracterizada quanto as suas propriedades físico-químicas, através da determinação dos ensaios descritos abaixo:

4.4.1 Espectroscopia de Infravermelho transformada de Fourier (FT-IR)

O espectro de FT-IR da amostra foi obtido em um espectrômetro Thermo Electron (modelo Nicoleti S10), com 32 varreduras na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} . Cada amostra foi misturada com KBr na proporção 1:100 e prensada em disco na pressão 80 kN por 1 min.

4.4.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^1H e RMN ^{13}C)

Para este teste foi utilizado o equipamento: Ressonância Magnética Nuclear de 500MHz δ (*m, J* (Hz); Modelo ASCENDTM 500; marca Bruker; solvente clorofórmio deuterado foram utilizados 200 μg de amostra em 400 μL de CDCl_3 solvente; tubo de RMN: 5mm.

4.4.3 Difração de raios-X (DRX)

Os perfis de DRX das amostras foram obtidas em um equipamento modelo Empyrian, marca Panylitical, usando radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$) com um filtro de Ni. A análise foi feita com passo de $0,02^\circ$, corrente de 40 mA, voltagem de 40 kV e usando o detector PIXcel3D.

4.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microfotografia da α - β amirina foi registrada usando o método de dispersão de elétrons (SE) usando magnificação de 500x e um voltagem de 20kV. Esta análise foi realizada no Laboratório Temático de Microscopia Eletrônica (LTMOE) – INPA, usando um aparelho Carl Zeis (LEO 435 VP, Sputter (Bal Tec, modelo CPD 050)).

4.5 Validação do método analítico para quantificação da mistura isomérica de α - β amirina

O método de determinação de amirinas por CLAE foi utilizado para a quantificação da amirina princípio ativo, e para a avaliação da eficiência de encapsulação no processo de preparação das nanopartículas.

4.5.1 Condições cromatográficas (GUILHON-SIMPLICIO, 2017, após modificações)

As condições cromatográficas utilizadas foram baseadas na metodologia descrita por Guilhon-Simplicio (2017): fase estacionária: coluna Luna C18 Phenomenex (250 mm × 4,6 mm d.i., 5 µm) e fase móvel: como sistema de eluição foi utilizado gradiente linear conforme tabela 3, constituído das seguintes fases móveis:

A) Acetonitrila - B) Água tipo mili-Q®

As análises foram realizadas empregando fluxo de 0,8 mL/min, e volume de injeção de 20 µL. A detecção foi feita a um comprimento de onda de 200 nm.

Tempo (min.)	A (%)	B (%)
0 - 10	60	40
10- 20	80	20
20- 30	100	0
30- 35	60	40

Tabela 3 – Gradiente de eluição do sistema cromatográfico

4.5.2 Validação do método analítico

O estudo de validação foi realizado utilizando como substância de referência o padrão de amirinas fornecido pela Prof^a. Dr^a. Fernanda Simplício Guilhon (FITOPHAR-FCF-UFAM)

Avaliação da linearidade

Para realização deste ensaio, foi preparada uma solução mãe (1mg/mL) do analito. Para isso, foram dissolvidos 5mg da mistura padrão de amirinas em 600µl de AcOEt. Posteriormente, essa solução foi diluída até 5 mL usando acetonitrila.

Para avaliação da linearidade, foi construída curva padrão com 5 pontos, utilizando soluções nas concentrações 80; 200; 400; 600 e 800 µg/mL preparadas partindo da solução mãe (1mg/mL). Antes da injeção no aparelho de CLAE as soluções foram filtradas através de

uma membrana Millipore[®] de 0,45 μm . As determinações foram realizadas em triplicata. Para a avaliação da linearidade foram considerados os seguintes critérios: Regressão linear da curva ($R > 0,990$); homocedasticidade entre os pontos da curva (*Test* de Cochran não significativo para $\alpha=0,05$), coeficiente de variação global $< 5\%$; interseção estatisticamente igual a 0; distribuição aleatória dos resíduos).

Avaliação da Precisão - Teste de repetibilidade

Para essa avaliação foram feitas nove injeções do analito, com concentração correspondente ao ponto médio da curva padrão (400 $\mu\text{g/mL}$). Foram estimados o valor médio, desvio padrão e o coeficiente de variação, considerando como critério de aceitação CV $< 5\%$ para um mínimo de 9 determinações (ANVISA, 2003).

Avaliação da Exatidão

O ensaio de exatidão foi realizado através do método de contaminação da amostra com a substância de referência (padrão com pureza conhecida). Este ensaio, também, é conhecido como teste de recuperação. Para este teste de acordo com ANVISA (2003) é possível uma variabilidade de até $100 \pm 10\%$, para matérias-primas e princípios ativos. O cálculo de recuperação foi feito pela seguinte equação:

$$\text{Exatidão} = (\text{Quantidade recuperada}/\text{Quantidade real}) \times 100$$

4.6 Desenvolvimento das nanopartículas (NPs) contendo de $\alpha - \beta$ amirina

4.6.1 Método de preparação

As NPs contendo $\alpha - \beta$ amirina foram preparadas usando o método de emulsificação-difusão do solvente (FESSI *et al.*, 1989). Inicialmente, foram preparadas cinco formulações diferentes com o intuito de avaliar o efeito do polímero e dos tensioativos nas propriedades das nanopartículas obtidas. A composição das formulações estão descritas na tabela 4.

Fase orgânica	F1	F2	F3	F4	F5
Palmitato de isopropila	500mg	500mg	500mg	500mg	500mg
$\alpha - \beta$ amirina	50mg	50mg	50mg	50mg	50mg
Span 20 [®]	-	-	500mg	-	500mg
PCL	350mg	-	350mg	-	-
Eudragit [®]	-	350mg	350mg	-	-
Kollicoat [®]	-	-	-	350mg	350mg
Álcool 92,6°C	-	-	-	5mL	5ml
Acetona	15 mL				
Fase aquosa					
Tween 80 [®]	500mg	500mg	500mg	500mg	500mg
Água Mili-Q [®]	50 mL				

Tabela 4 – Formulação das nanopartículas contendo $\alpha - \beta$ amirina

A fase orgânica foi preparada dissolvendo o polímero no solvente sob agitação magnética a 400 rpm. Depois disso, o Span 20[®] (éster de monolaurato de sorbitano), a amirina (previamente dissolvida em acetona) e o palmitato de isopropila foram adicionados. A mistura foi agitada durante 10 min usando agitador magnético (Fisatom, SP, Brasil). A fase aquosa foi composta por água (Mili-Q[®] e polissorbatato 80 (Tween 80[®])), também com agitação por 10min a 400 rpm. Posteriormente, a fase orgânica foi adicionada sobre a fase aquosa (1mL/min) mantendo a agitação por cinco minutos. Em seguida, a mistura foi homogeneizada em aparelho Ultraturrax (marca IKA, Alemanha) a 10.000 rpm, por 5 min. Em seguida, a suspensão de nanopartículas foi concentrada em um evaporador rotativo a vácuo (marca Bouchi, Suíça), para eliminação total de acetona e obtenção de uma concentração final de (1mg/mL) . A figura 7 apresenta o fluxograma de preparação das nanopartículas.

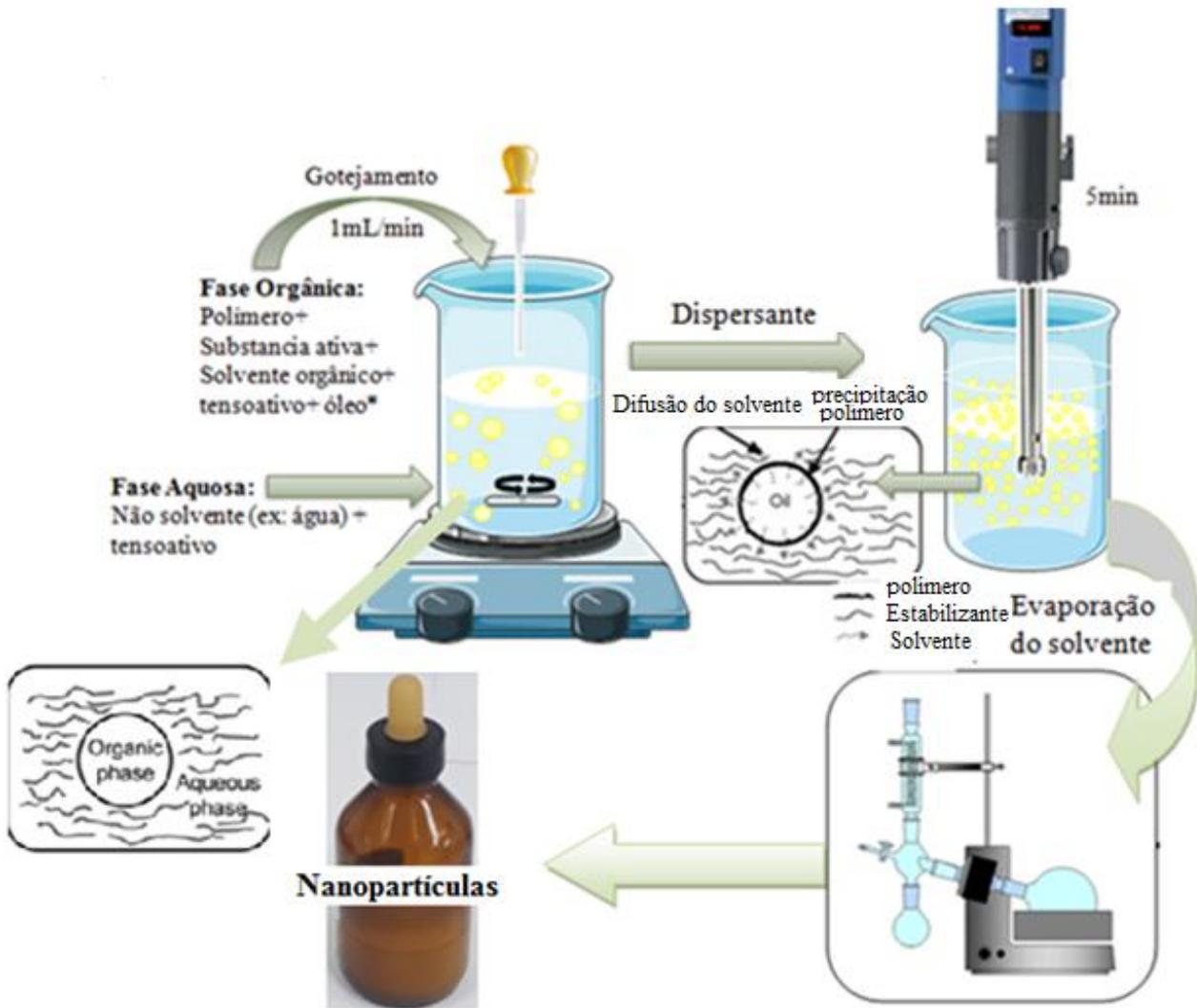


Figura 7 - Preparação das nanopartículas - método emulsificação e difusão do solvente, adaptado de FESSI (1989)

4.7 Caracterização das NPs

4.7.1 Tamanho de partícula e Índice de polidispersão

O tamanho de partícula e o índice de polidispersão foram medidos por Espectroscopia de Correlação de Fótons, usando um Zetasizer (MALVERN, UK). As nanopartículas foram diluídas 1:9 (v/v) em água para injeção e filtradas em membrana Millipore® (0,45 µm). Foi utilizado um comprimento de onda do laser de 633 nm, 173° de ângulo de espalhamento, a 25°C (RODRIGUEZ *et al.*, 2017). As medidas foram feitas em triplicata, nos dias 0, 7, 15, 30, 60 e 90 após a preparação.

4.7.2 Potencial zeta e condutividade

O potencial zeta e a condutividade foram medidos em um Zetasizer (Malvern, UK). As amostras foram dissolvidas em água destilada (1:9) e as medidas foram feitas a 25°C, usando uma voltagem de 150V (RODRIGUEZ *et al.*, 2017). As medidas foram feitas em triplicata, nos dias 0, 7, 15, 30, 60 e 90 após a preparação.

4.7.3 Eficiência de encapsulamento

A eficiência de encapsulação da α,β amirina nas nanopartículas foi avaliada em cromatografia líquida de alta eficiência utilizando método previamente validado, conforme item 4.5. A separação das nanopartículas do meio líquido foi realizada por ultrafiltração/centrifugação (ANGELI, 2007; FESSI *et al.*, 1989), utilizando dispositivo com membrana de celulose regenerada de tamanho de poro 10 kDa (Millipore[®]), no qual a suspensão passa pela membrana ficando retidas só as nanopartículas. Um volume exato da suspensão de nanopartículas (0,4mL) foi colocada no dispositivo e centrifugado a 13.000 rpm, por 15 min, a temperatura de 24°C. O líquido filtrado (200 μ L) foi diluído com 12 μ L de acetato de etila e 96 μ L de acetonitrila, filtrado por uma membrana Millipore[®] de 0,45 μ m e injetado um volume de 20 μ L no equipamento. O conteúdo de amirina encapsulado (EE) foi determinado por diferença entre a quantidade utilizada para preparação das nanopartículas (QT) e a quantidade determinada no líquido filtrado (QLF), conforme equação abaixo:

$$EE (\%) = [(QT-QLF) / QT] * 100.$$

4.7.4 Avaliação do efeito do pH

O efeito do pH no tamanho de partícula, no Índice de polidispersão e no potencial zeta das nanopartículas foi avaliado usando um titulador automático MPT-2 (Malvern, UK) acoplado ao Zetasizer. Hidróxido de sódio (0,1 mol/l) e ácido clorídrico (0,1 mol/l)

foram utilizados como soluções titulantes. O instrumento foi calibrado com soluções tampão (pH 4, pH 7, pH 10; Alphatec, Brasil). As medições foram realizadas em triplicata a 25°C.

4.7.5 Efeito térmico

Para avaliar o efeito da temperatura no tamanho das partículas e no índice de polidispersão a temperatura da suspensão de nanopartículas em água (1:10) foi aumentada de 20 até 70°C, em intervalos de 5°C. A suspensão de NPs foi mantida por cinco minutos a cada temperatura antes de fazer a medição. O tamanho de partícula e o índice de polidispersão foram medidos em triplicata e os resultados foram expressados como a média \pm desvio padrão.

4.8 Avaliação da atividade biológica das nanopartículas

4.8.1 Atividade antioxidante: inibição do radical DPPH[•]

A atividade sequestrante do radical DPPH[•] das nanocápsulas de amirina foi realizada segundo metodologia utilizada por Burits e Bucar (2000) com algumas modificações. O teste foi realizado em microplacas de 96 poços. Foi preparada uma solução de 0,05 $\mu\text{g/mL}$ de DPPH[•] em etanol. Em seguida foi adicionado nos poços da microplaca 30 μL do MA3, padrão e/ou controle (DMSO) na concentração de 1mg/mL. A placa foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro e a leitura foi realizada em 492 nm no leitor de microplaca (Multimode Detector DTX 800 da Beckman). Em seguida, foram realizados os cálculos de percentual de inibição, baseado na absorbância do controle e utilizando o programa Excel. Como o percentual de inibição foi maior que 50%, foram realizadas oito diluições seriadas para obter os valores de CI_{50} que foram calculados pelo programa de

estatística GraphPad Prism, versão 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). O padrão utilizado foi o ácido gálico, e os calculos realizados segundo a equação abaixo:

$$\% \text{ inibição} = 100 - [\text{Abs}_{a/p} / \text{Abs}_C] \times 100.$$

Onde: $\text{Abs}_{a/p}$ = (Absorbância do branco – Absorbância da Amostra), Abs_C = (Absorbância do branco – Absorbância do Controle).

4.8.2 Atividade antioxidante: inibição do radical ABTS[•]

Para avaliar a atividade antiradicalar ABTS[•] das nanocápsulas de amirina foi realizado o ensaio descrito por Shanty; Mohanan (2017) com leves modificações. Inicialmente, foi preparada a solução de ABTS[•] 0,7 mM em 5mL de água deionizada e 5mL de persulfato de potássio 2,4 mM, em seguida incubou-se a mistura reacional em temperatura ambiente na ausência de luz por 12 horas para obter uma solução oxidada de tonalidade azul esverdeada. Antes de plaquear o ABTS[•] oxidado foi diluído (1:5) com água deionizada, após o plaqueamento (igual que com o DPPH[•]) incubou-se por 15 minutos na ausência de luz à temperatura ambiente, a leitura foi realizada no leitor de microplaca em 620nm. Os resultados foram expressos em porcentual de inibição e a CI_{50} foi calculado através do programa estatístico GraphPad Prism 6.0. O padrão utilizado foi o ácido gálico.

4.8.3 Atividade inibitória da lipase pancreática

A avaliação foi feita de acordo com a metodologia de Slanc *et al.*, (2009) com pequenas modificações. A lipase pancreática de porcino tipo II, foi diluída em tampão TRISMA-HCL 75mM pH 8,5. O substrato 4-Nitrophenyl palmitate (PNP) foi preparado sendo diluído primeiro em acetonitrila depois em etanol na proporção de 1:4. O padrão usado foi o Orlistat e as leituras foram feitas em um leitor de microplacas (Multimode Detetor DTX

800, Beckman, UK) à 450 nm. Foi colocado 30µL das amostras, padrão e/ou controle (DMSO) nos diferentes poços da microplaca em triplicata e 250µL da enzima (0,8 mg/mL), após incubação de 5 minutos a 37°C no escuro foi adicionado 20µL de PNP (4mg/mL), incubou novamente por 10 minutos até que a leitura do controle de $1,000 \pm 0,1$. Realizou-se o cálculos do porcentual de inibição usando a equação abaixo:

$$\% \text{ inibição} = 100 - [\text{Abs}_{a/p} / \text{Abs}_C] \times 100.$$

Onde: Abs a/p = (Absorbância de branco - absorbância da amostra) a 450 nm, Abs C = (Absorbância do Branco - Absorbância do Controle),

A IC₅₀ foi determinada pela análise de Probabilidade utilizando o *software* GraphPad (CA, EUA), com nível de significância de 0,05. As concentrações que apresentaram uma inibição maior de 50% foram separadas para fazer a determinação da IC₅₀.

4.8.4 Atividade inibitória da α -glicosidase

A atividade inibitória de α -glucosidase foi baseada na metodologia de ANDRADE-CETTO *et al.*, (2008) com pequenas modificações. Inicialmente, foi preparada a enzima numa concentração de 3mg/mL, partindo do pó de intestino de mamífero (rato), a mistura foi agitada por 5 minutos, centrifugada a 3600 rpm por 10 minutos e separado o sobrenadante que continha a enzima α -glicosidase já extraída, ambos, o substrato 4- nitrofenil-D-glucopiranosido (4-NPGP) e a enzima foram diluídos em tampão fosfato 10mM pH 6,9. Em seguida foram colocados 30µL da amostra, 30µL do padrão e/ou controle (DMSO) nos diferentes poços da microplaca em triplicata, e ainda, 170µL da enzima extraída foi incubada durante 5 minutos a 37°C no escuro, à enzima foi adicionado 100µL do 4-NPGP (5mg/mL), e incubada novamente por 20 minutos ou até que a leitura do controle à 405nm de $1,000 \pm 0,1$. Realizou-se o cálculos do porcentual de inibição usando a equação:

$$\% \text{ inibição} = 100 - [\text{Abs}_{a/p} / \text{Abs}_C] \times 100.$$

Onde: Abs a/p = (Absorbância de branco - absorbância da amostra) a 450 nm, Abs C = (Absorbância do Branco - Absorbância do Controle).

A IC₅₀ foi determinado pela análise de Probabilidade utilizando o *software* GraphPad (CA, EUA), com nível de significância de 0,05. As concentrações que apresentaram uma inibição maior de 50% foram condicionadas para fazer a determinação da IC₅₀.

4.8.5 Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade relativa das nanocápsulas de amirina foi avaliada pelo ensaio Alamar Blue[®] (AHMED *et al.*, 1994). Fibroblastos de pulmão humano não neoplásico (MRC-5, ATCC-USA) foram cultivados durante 24 h em microplacas de 96 poços de fundo plano (0,5 x 10⁴ células / poço). As amostras foram dissolvidas em DMSO e diluídas em meio de cultura com alto teor de glicose nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,56 µg/mL. A concentração final de DMSO foi inferior a 0,2%. As células cultivadas foram incubadas com a suspensão de nanopartículas por 24h a 37°C em atmosfera de CO₂ (5%). A fluorescência foi medida num leitor de microplacas (Beckman e Coulter, UK). O crescimento celular foi utilizado como controle positivo. DMSO 0,1% foi usado como controle negativo. O medicamento de referência (Doxorrubicina 5µg/mL, Sigma-Aldrich, Brasil) foi utilizado como controle de morte celular. Todo o ensaio foi realizado em duplicata com três repetições em cada análise.

4.9 Análise Estatística

Todas as análises estatísticas realizadas neste trabalho que foram relatadas em cada ensaio em particular, foram feitas usando o pacote estatístico, *Stat Graphic Centurion XV.1* (StatEase Co, MA, USA). Foi utilizado um nível de significância de 0,05 em todos os testes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção da mistura isomérica $\alpha - \beta$ amirina

Das seis frações coletadas durante o processo de isolamento/purificação (figura 8A), as frações 1 e 2 produziram 4,76% e 4,85 % de amirina respectivamente. As frações 3 e 4 (figura 8B e 8C) apresentaram maior quantidade do pó branco (83,34%) e as frações 5 e 6 juntas obtiveram 11,9%. O rendimento total da coluna foi de 28% (8,4g), a quantidade obtida do material vegetal, corrobora com resultado obtido por Ferreira, R.; (2017).

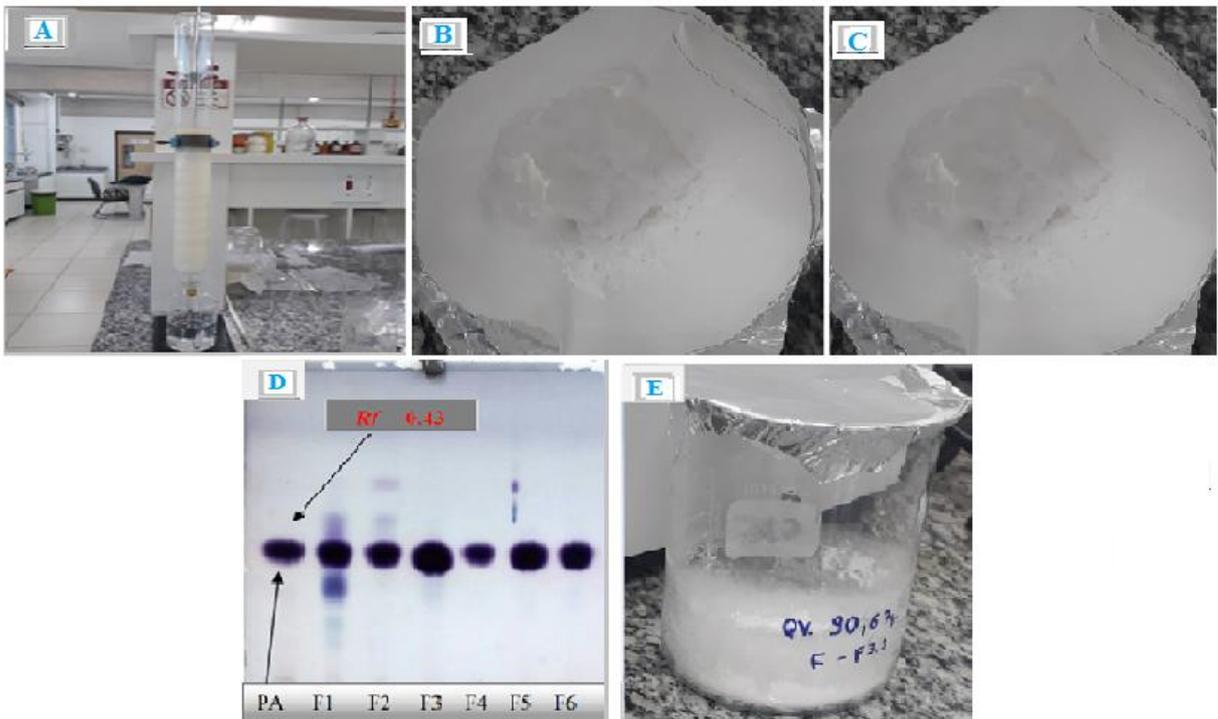


Figura 8 - Obtenção da $\alpha - \beta$ amirina: (A) coluna cromatográfica; (B e C) pó branco; (D) CCD das frações agrupadas e E) $\alpha - \beta$ amirina.

Todas as frações foram analisadas através de cromatografia de camada delgada. As que apresentaram manchas com o mesmo R_f do padrão (0,43), sem outras manchas nos cromatogramas, foram aceita como purificadas (F4 e F6, figura 8D). As frações com manchas na parte superior e/ou inferior do R_f do padrão foram lavadas de novo, usando acetona para aquelas frações que tinham manchas acima e abaixo da mancha do padrão e metanol para

aquelas que tinha mancha só abaixo do *Rf do padrão*. Ao final, todas as frações foram reunidas e feita a cromatografia de camada delgada novamente, cujo resultado está apresentado na figura 9B. O aspecto macroscópico da mistura isomérica de α - β amirina, isolada e purificada, pode ser visualizado na figura 9A.

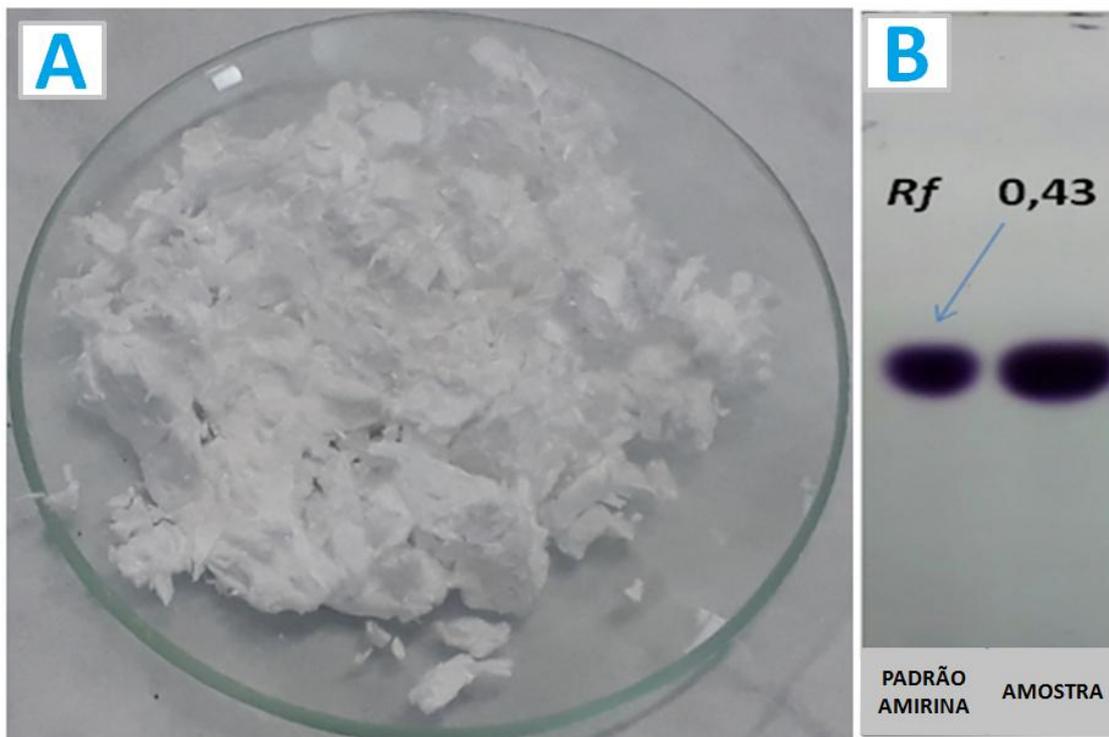


Figura 9 - Processo de obtenção: (A) α - β amirina purificada e (B) CCD do padrão e da amostra

5. 2 Caracterização físico-química da mistura isomérica α - β amirina

A caracterização da mistura isomérica de amirina isolada foi realizada com o intuito de avaliar o grau de pureza da mesma, bem como eficiência do processo de isolamento/purificação utilizado. Dessa forma, o material isolado/purificado (α,β -amirina) neste trabalho foi submetido aos ensaios descritos abaixo:

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A figura 10 mostra os cromatogramas do padrão de amirina utilizado como substância de referência e da amostra obtida no nosso processo isolamento/purificação. Analisando-se os

cromatogramas é possível verificar que o pico cromatográfico da mistura α , β -amirina obtida tem o mesmo tempo de retenção (5,186 min) do padrão (5,189 min), sendo o índice de pureza do pico superior a 0,9987.

O produto isolado e purificado apresentou um percentual de 99% da mistura de α , β -amirina, o que representa um excelente resultado, principalmente quando comparado com produto similar de amirinas desenvolvido por Guilhon-Simplicio (2017), onde foram obtidas α , β -amirina com teores de pureza superiores a 98%. O elevado grau de pureza da mistura isolada torna viável investigar suas possíveis atividades farmacológicas visando a preparação de formas farmacêuticas com atividade terapêutica definida.

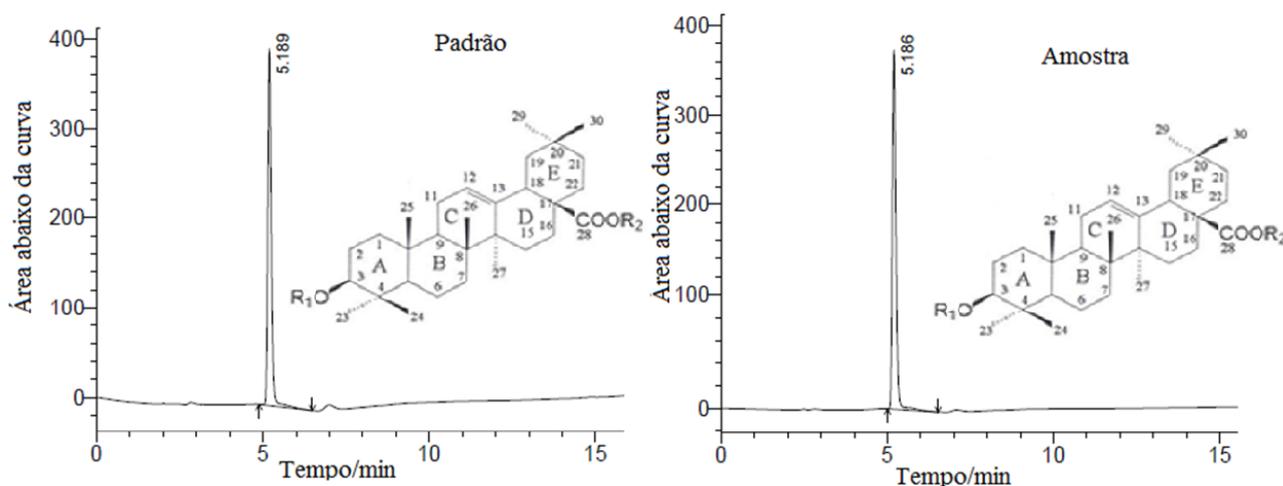


Figura 10 – Cromatogramas obtidos por CLAE mostrando o pico cromatográfico e o tempo de retenção do padrão de amirina e da amostra (mistura α e β -amirina isolada e purificada neste trabalho).

Espectroscopia de Infravermelho transformada de Fourier (FT-IR)

O espectro FT-IR da mistura isolada e purificada neste trabalho e do padrão de amirina são apresentados na figura 11. Em ambos os espectros apresenta-se uma banda de alta intensidade encontrada em aproximadamente 2854 cm^{-1} , essa banda está associada à deformação axial das ligações C-H das cadeias cíclicas. Grande parte da estrutura da α – β amirina é composta por cadeias de ciclo alcanos, que justifica essa banda de alta intensidade.

A banda observada na região de 3297-3413 cm^{-1} é atribuída a grupos hidroxilas (OH) ligados a uma cadeia de ciclo alceno e a banda na região de 1036-1189 cm^{-1} é característica da vibração da ligação C-O. Outra banda característica das amirinas foi encontrada em ambos os espectros na região de 1464-1359 cm^{-1} devido a deformação angular dos grupos dimetila e metila germinativos de duplete no anel "E" (SILVA-JUNIOR *et al.*, 2017). Pode ser observado que ambos os espectros (padrão e amostra) têm correlação total nas estruturas químicas que representam, reiterando a alta pureza da mistura de amirinas isolada e purificada neste trabalho.

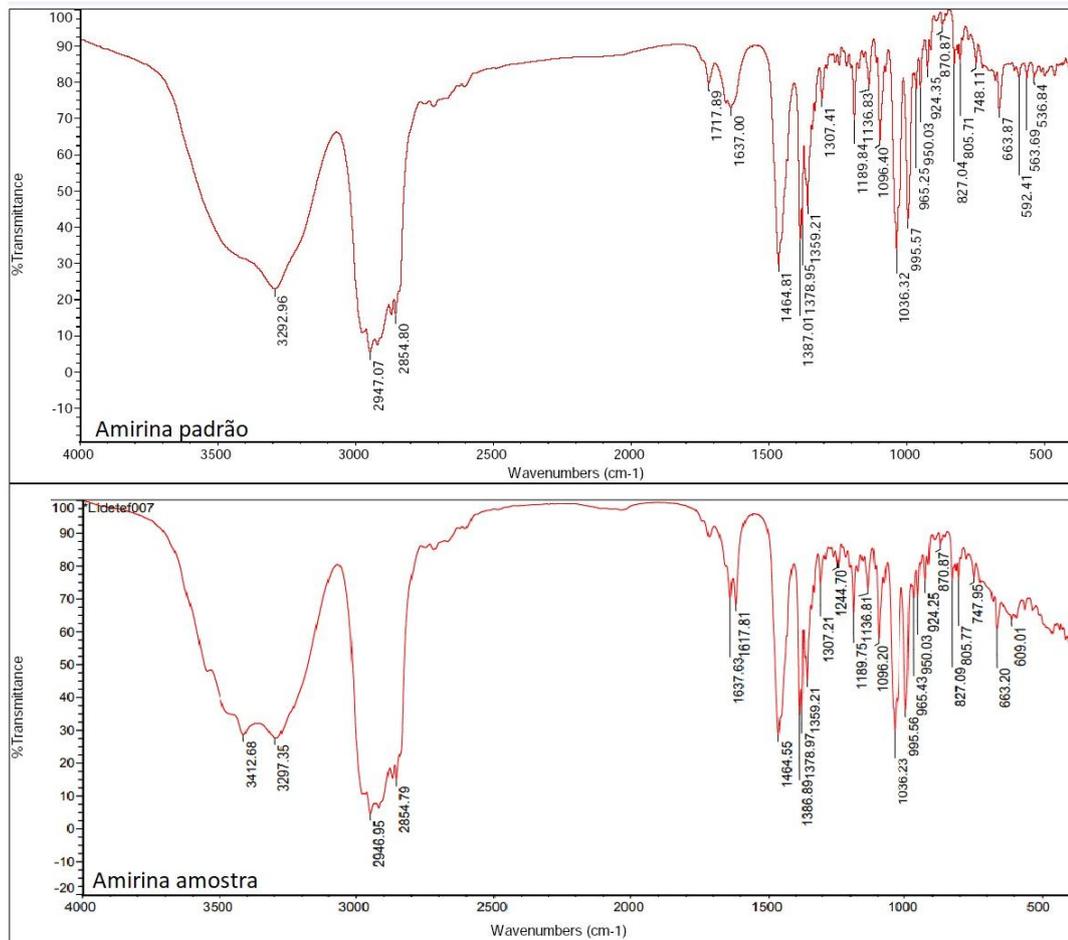


Figura 11 - Espectroscopia de Infravermelho transformada de Fourier (FT-IR) amostra e padrão da α - β amirina.

Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^1H e RMN ^{13}C)

É uma técnica instrumental de larga utilização para determinação estrutural de substâncias, confirmando a identificação do esqueleto carbono-hidrogênio. Ela permite identificação da funcionalidade do carbono específico, bem como inferir com quem os carbonos vizinhos se parecem, e em alguns casos é possível determinar a molécula integralmente.

A identificação do triterpeno amirina é bastante conhecida com diversas descrições na literatura devido às sínteses para obtenção de seus derivados. É possível obter a confirmação de sua estrutura analisando os deslocamentos químicos dos sinais presentes na região de carbonos olefínicos e de hidrogênios característicos (CARVALHO, *et al.*, 1998; DIAS; HAMERSKI; PINTO, 2011).

A análise nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C apresentou sinais característicos de triterpenos do esqueleto oleano. Na região entre 4 e 2 ppm dos espectros RMN de ^1H (figura 12) podem ser observados os deslocamentos de amirina. Verificou-se em δ 3,22 dois dupletos correspondentes aos carbonos carbinólicos característicos de triterpenos do tipo 3 β -OH, e dois tripletos em δ 5,12 correspondentes à ligação CH de olefinas.

A análise seguiu-se com a obtenção de espectros de RMN ^{13}C . Foram encontrados 30 sinais característicos de triterpenos: sinais do carbono sp² não hidrogenado (C-13) em δ 139,5 e 145,2 e do carbono C-12 em δ 124,4 e 121,7 ppm, o que correspondia à ligação dupla entre os carbonos da β amirina, além dos deslocamentos em 124,43 e 139,5, referentes à ligação dupla dos carbonos C-12 e C-13 da α amirina, característicos da mistura triterpênica de α - β amirina (figura 13).

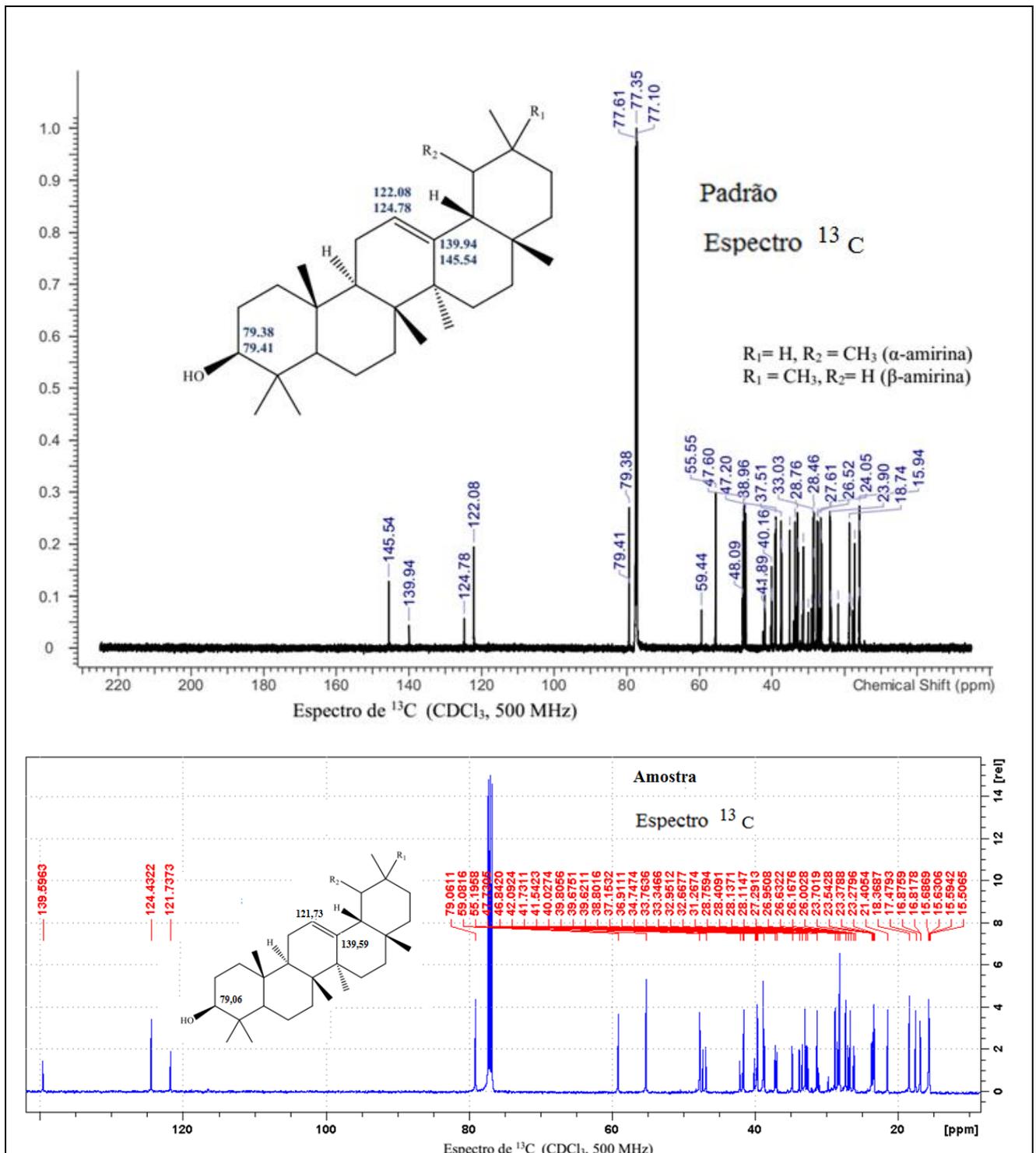


Figura 13 – Espectro de RMN ^{13}C da amirina (CDCl_3 , 500 MHz) padrão e amostra.

Os deslocamentos de RMN ^1H e RMN ^{13}C (ppm) (tabela 5) comparados com os relatados da literatura permitiram a confirmação da mistura triterpênica de α , β -amirina no produto isolado (CARVALHO, *et al.*, 1998; DIAS; HAMERSKI; PINTO, 2011).

Carbono	δ (ppm) RMN ^1H	Literatura	δ (ppm) RMN ^{13}C	Literatura
1	-	1,59	38,8	38,7
2	-	1,98	27,2	27,2
3	3,22 (dd, 11,1; 5,3) 3,22 (dd, 11,1; 4,4)	3,16 (dd, 11,2; 5,1) 3,15 (dd, 10,8; 4,4)	79,0	79,6
4	-	-	38,8	38,7
5	0,73 (d; 12,0)	0,73 (d; 11,3)	55,1	55,1
6	-	-	18,3	18,3
7	-	-	32,9	32,8
8	-	-	40,0	39,9
9	-	-	47,7	47,7
10	-	-	36,9	36,9
11	-	-	23,7 - 23,5	23,6
12	5,12(t; 3,6)	5,18 (t; 3,6)	124,4 - 121,7	124,4 - 121,6
13	-	-	139,5 - 145,2	139,6 - 145,2
14	-	-	42,0	41,7
15	1,99 m	1,99 m	28,7 - 26,1	28,7 - 26,2
16	1,99 m	1,99 m	26,6 - 26,9	26,6 - 26,1
17	-	-	33,7 - 32,6	33,7
18	-	-	47,2	47,4
19	-	1,93(m)	59,0 - 47,6	59,0 - 47,6
20	-	-	39,6 - 31,2	39,6 - 31,1
21	-	-	31,2 - 34,7	31,2 - 34,7
22	1,91 (dt; 7,2; 3,0)	1,86 (m)	41,5 - 37,1	41,5 - 37,2
23	0,99 (s)	0,83 (s)	28,1 - 28,4	28,0 - 28,4
24	0,80 (s)	0,96 (s)	15,5 - 15,6	15,7 - 15,7
25	0,79 (s)	0,79 (s)	15,5 - 15,7	15,7 - 15,7
26	0,95 (s)	0,99 (s)	16,8 - 16,8	16,9 - 16,9
27	1,07 (s)	1,25 (s)	23,3 - 26,0	23,3 - 26,1
28	0,99 (s)	1,13 (s)	28,1 - 28,7	28,1 - 28,8
29	0,91 (d, 5,7)	0,93 (s)	23,3 - 33,3	23,3 - 33,4
30	0,79 m	0,87 (s)	21,4 - 23,7	21,4 - 23,6

Tabela 5 - Dados do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C de amirina
 Fonte: (CARVALHO, 1998, DIAS; HAMERSKI; PINTO, 2011)

Difração de raios-X (DRX)

Os padrões de DRX do padrão e da amostra (figura 14), obtidos nas mesmas condições experimentais, mostraram picos intensos e estreitos indicando alto grau de cristalinidade. Na figura 14B, de $2\theta \sim 2^\circ$ a $2\theta \sim 30^\circ$, podem-se observar os picos da amirina isolada (preto), com uma cor mais intensa que a do padrão (vermelho). Isto mostra que os planos cristalinos de maiores distâncias interplanares da amostra são mais bem formados que o do padrão, provavelmente relacionado aos tempos de crescimento (as amostras foram feitas exatamente nas mesmas condições). O pico indicado pelo símbolo # existe nas duas amostras,

porém na amirina (isolada no presente trabalho) é mais evidente. Por outro lado, após o pico mais intenso de ambas as amostras, em $2\theta \sim 13.7^\circ$, as relações se invertem para alguns picos, indicados pelas setas da figura 14B e facilmente observado na figura 14C. Decorre desta observação que as amostras tendem a se orientar de maneira diferente durante o preparo para a tomada de medida de difratometria de raios-x pelo método do pó. Esta orientação, oriunda da forma das partículas revela microestruturas distintas. Os asteriscos na figura 14C salienta a existência de 2 picos de Bragg no padrão que foi sutilmente observado na amirina.

A figura 15 ilustra a identificação das fases .

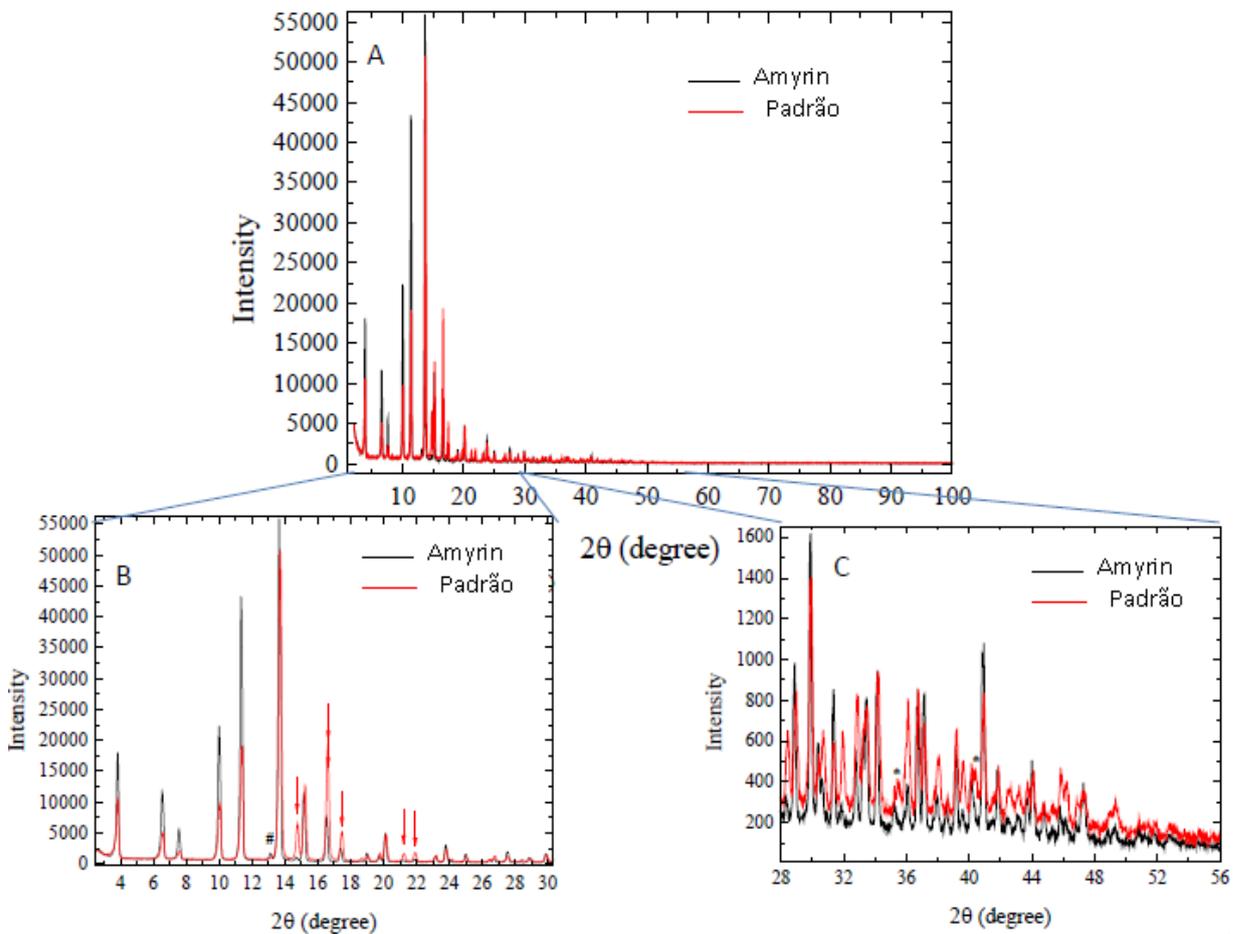


Figura 14 - A, B e C - Correspondem as medidas de difração de raios x (DRX) do Padrão e da amostra: A) medida completas (de $2\theta=2^\circ$ a $2\theta=100^\circ$); B e C ampliação em duas regiões de importância.

As barras em azul correspondem a posição e intensidades relativas dos picos de α -amirina reportada por Frondel (1967). É notável a semelhança entre as posições dos picos assim como a relação de intensidades entre os padrões experimentais e o tabelado [International Center for Diffraction Data (ICDD)]. Podemos ver então que a fase majoritária corresponde a cristais α -amirina, semelhante as encontradas em resinas fósseis do tipo Elemi (FRONDEL, 1967). Os picos indicados pelos triângulos corresponde a outra fase (supostamente cristais de β amirina). Vemos que esta fase possui sua estrutura melhor cristalizada na amirina.

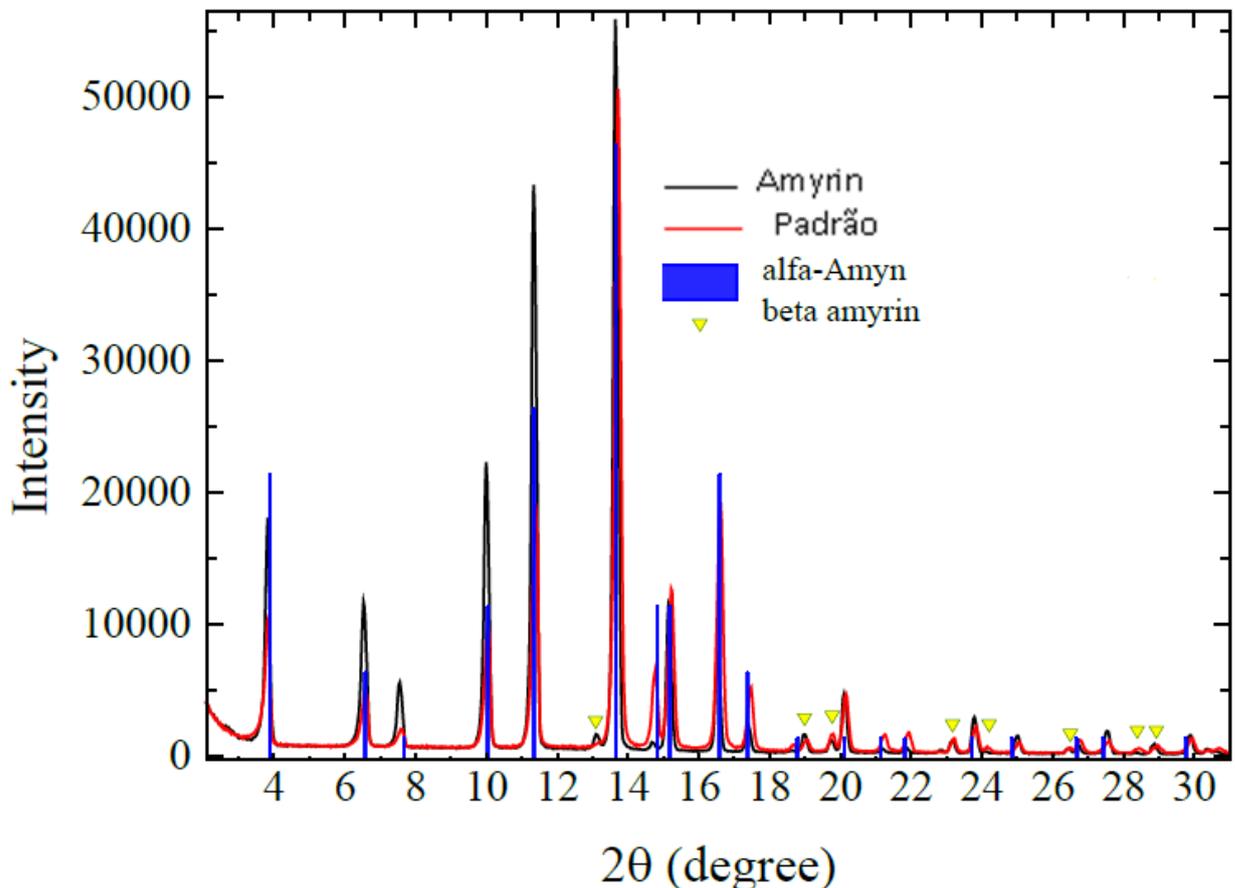


Figura 15- Corresponde as medidas de difração de raios-x (DRX) da amirina e do padrão (entre $2\theta=2^\circ$ e $2\theta=30^\circ$) As barras verticais (em azul) correspondem as posições das reflexões de Bragg versus intensidade relativa dos picos proveniente de cristais de α -amirina identificado junto a base de dados ICDD, cartão PDF 00-029-1517. Os picos indicados pelos triângulos amarelos correspondem a outros tipos de cristais, provavelmente da β -amirina (estruturas similares)

Como única diferença entre as amostras é o tempo de cristalização, pode-se inferir que menos tempo de cristalização, menos fase secundária e cristais menores de α amirina.

A partir do que se consegue reunir na literatura sobre cristais α - β amirina foi confeccionado os CIFs (https://en.wikipedia.org/wiki/Crystallographic_Information_File), para assim obter o difratogramas teóricos e sobrepor aos experimentais. Essa informação é vital para simular cristalograficamente as amostras. Entretanto, nenhuma das estruturas descritas na literatura com detalhes suficientes, descrevem essas medidas de DRX. Apenas o artigo da Frondel (1968) concorda perfeitamente, porém sem descrição.

Todos esses cristais são da classe triterpenos pentacíclicos como as amirinas. A literatura é discrepante entre si quanto a parâmetros de rede e mesmo entre as estruturas α - β amirina. Dessa forma, maiores estudos precisam ser realizados para elucidar todos parâmetros cristalográficos dessa molécula e derivados.

Análises da morfologia da mistura de amirinas

Através da microscopia eletrônica de varredura é possível visualizar a imagem com aparência tridimensional, resultado direto da profundidade de campo, que permite avaliar a morfologia, o tamanho e a textura de amostras sólidas. Na figura 16 observa-se um produto com características fibrosas e cristais alongados na forma de agulhas com tamanhos variados. Essa forma concorda com a descrição de outros produtos de extração de amirina relatados por outros autores (DEDAVID, 2007, SILVA-JUNIOR 2017).

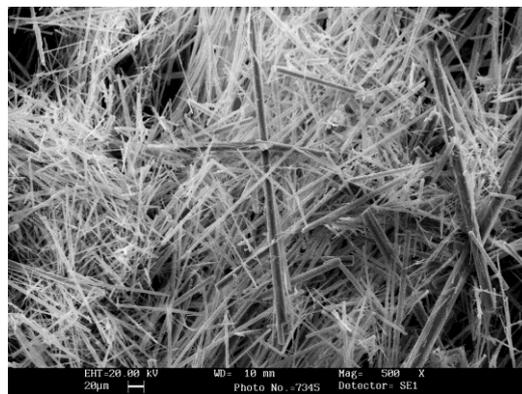


Figura 16 – Microscopia eletrônica de varredura da mistura de α - β amirina isolada e purificada nopresente trabalho

5.3 Validação do método analítico para quantificação da mistura isomérica de α - β amirina.

A figura 10 mostra o cromatograma do padrão e da mistura isomérica de α - β amirina isolada e purificada a partir de *Protium sp.* Como pode ser observado, o método cromatográfico utilizado apesar de não ter sido capaz de separar os dois isômeros, uma vez que a mistura de α - β amirina apresenta-se como um único pico com tempo de retenção de 5,18 min, pode ser considerado apropriado para a finalidade do presente estudo. Analisando os parâmetros cromatográficos do método foi constatado que o pico apresentou alto grau de pureza e fator de simetria aceitável (aqui você pode colocar o valor se quiser), quando praticamente nenhuma calda (*tailling*). E, apesar do tempo de corrida cromatográfica ser de 30 min. (tempo necessário para estabilização do sistema), o método também se mostrou específico, uma vez que no cromatograma do branco (injetando-se apenas a fase móvel) não se detectou absorção no tempo de retenção correspondente ao pico cromatográfico do triterpeno.

Sendo assim, o método foi validado de acordo com os critérios exigidos para validação de métodos analíticos, cujos resultados estão descritos abaixo:

Linearidade

Segundo a norma (BRASIL, 2003) a linearidade é a capacidade de um método analítico de mostrar respostas analíticas diretamente proporcionais as concentrações do analito na amostra, num intervalo específico. A relação linear é descrita pela equação $y = ax + b$, e deve obedecer um determinado intervalo de concentração da espécie medida. O intervalo de concentrações, no qual se pode construir uma curva analítica linear, é conhecida como faixa linear dinâmica (AUGUSTO; ANDRADE; CUSTODIO, 2000).

Seguindo as indicações da norma foram analisadas cinco concentrações do analito (padrão e amostra), nos intervalos de 80 a 800 $\mu\text{g/mL}$. Para avaliar a correlação entre concentração – resposta (área do pico) foi aplicado o método de regressão linear (figura 17). O coeficiente de correlação é um parâmetro que permite estimar a relação entre as variáveis na curva obtida, e quanto mais se aproxima de 1,0, menor a dispersão dos pontos experimentais (RIBANI *et al* 2004). A norma recomenda um coeficiente regressão (R) maior de 0,99 e de correlação (R^2) maior ou igual a 0,98. A tabela 6 apresenta os resultados obtidos para cada um dos níveis de concentração utilizados e após análise matemática resultaram na equação da reta (área do pico = 53001 * Concentração - 655991). A análise estatística mostrou um valor de R = 0,9987 e um valor de $R^2 = 0,9974$, evidenciando a alta relação entre a concentração dos analitos e a resposta obtida (área do pico cromatográfico)(BRASIL, 2003).

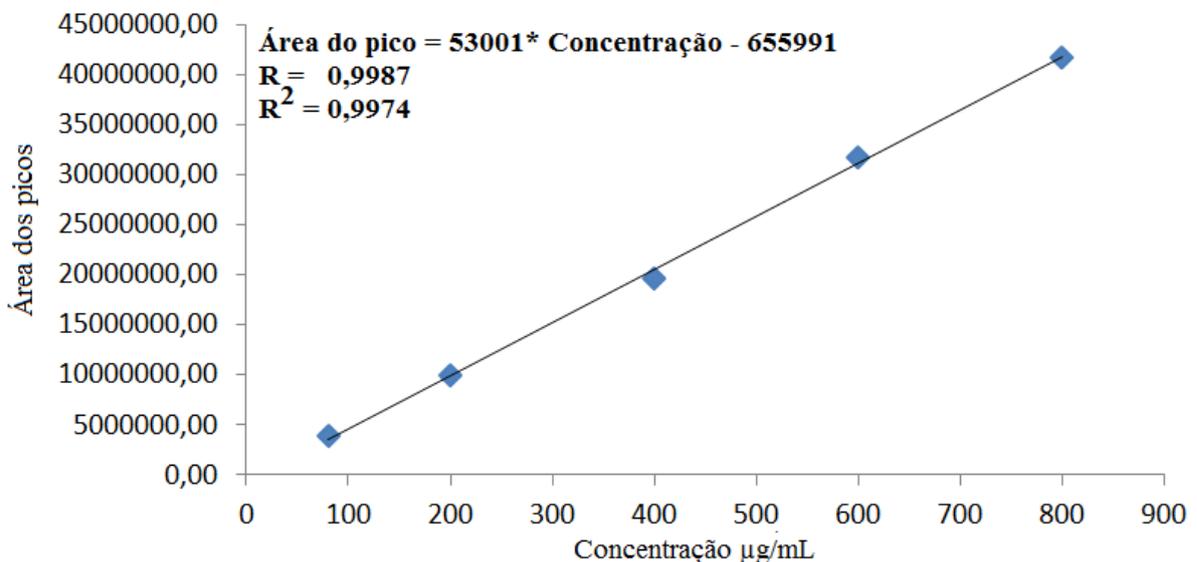


Figura 17 - Gráfico de linearidade (80-800 $\mu\text{g/mL}$) para a quantificação α e β -amirina por CLAE

Na tabela 6 pode-se observar que os coeficientes de variação (CV), em todos os níveis de concentração (como medida padronizada da dispersão em cada nível), foi menor de 3,5%, valor menor que o preconizado pela norma (BRASIL, 2003) que é $\leq 5\%$. Em resumo, foi

obtida uma baixa dispersão da resposta com coeficiente de variação global de 1,90 (ANVISA 2003).

C (µg/mL)	Área dos picos	DP	CV %
80	4597711,00	94243,37	2,05
200	11458691,33	139536,49	1,22
400	23198039,00	583319,47	2,51
600	33585293,67	1057486,15	3,15
800	41608680,67	234918,82	0,56

Tabela 6 - curva de regressão linear de α - β amirina

A análise de variância (*Test de Cochran*, para $p < 0,05$), comparando as respostas em cada nível de concentração mostrou um valor de $p = 0,8818$ ($p > 0,05$) indicando que não há diferença estatística significativa na variabilidade dos desvio padrão em cada um dos níveis de concentração, ou seja, que a linha é homocedástica (igual variabilidade).

Foi realizada uma prova *t-Student* para comprovar que o intercepto da curva de linearidade é estatisticamente igual a 0. O teste mostrou um valor da prova *t* de 0,3983 com $p = 0,7170$. Dado que o p valor é maior de 0,05, o intercepto é estatisticamente igual a 0. Esse resultado concorda com o valor sugerido pela norma (BRASIL, 2003) que exige que o intercepto tenha que ser igual a 0, para validar o teste de linearidade.

O gráfico dos resíduos observados versus os resíduos preditos é apresentado na figura

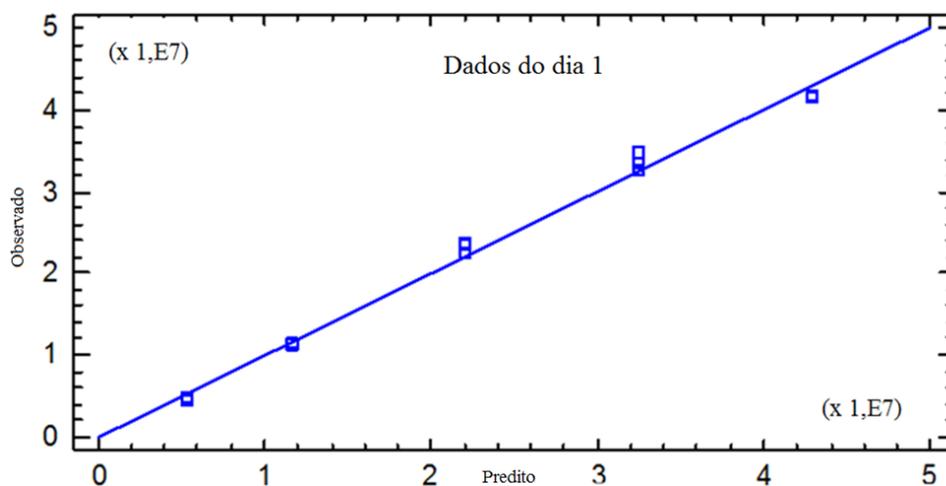


Figura 18- Resíduos observados versus resíduos preditos

18. Nessa figura pode-se observar que os resíduos se distribuem aleatoriamente em cada nível de concentração.

O gráfico dos resíduos versus valores preditos é uma técnica utilizada para inferir as suposições dos resíduos e verifica também a detecção de heteroscedasticidade (Conover *et al.*, 1981). Não foi evidenciado nenhum comportamento ou tendência atípica, confirmando a análise de homoscedasticidade (figura 18).

Depois de comprovar que todos os parâmetros avaliados cumprem com a regulamentação estabelecida pelas autoridades sanitarias (BRASIL, 2003), com relação a validação dos métodos analíticos, pode-se concluir que o método é linear no intervalo de 80 até 800 µg/mL.

Precisão como repetibilidade

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis entre eles a repetibilidade ou precisão intermediária, é a concordância entre os resultados avaliados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação.

Análise	Área	Recuperação
1	24075250	439,016
2	25377537	464,035
3	25813732	472,415
4	26015665	476,294
5	25546065	467,273
6	26930225	493,864
7	24907136	454,998
8	25720417	470,622
9	25849839	473,108
Média	25581762,89	467,96
Desvio padrão	784156,04	15,06
CV (%)	3,07	3,22

Tabela 7 - Ensaio de repetibilidade

Para essa avaliação foram feitas nove injeções do analito no ponto médio de concentração da curva (400 µg/mL, tabela 7). Os resultados obtidos são apresentados na tabela 8. O valor do coeficientes de variação (% CV) das nove determinações (3,22) foi menor que o valor limite admitido pela norma (BRASIL, 2003) (5%), indicando que o método pode ser considerado reprodutível.

Ensaio de exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor de referência aceito como verdadeiro (BRASIL, 2003). O ensaio foi realizado com a concentração equivalente ao ponto central da curva de calibração e os resultados estão descritos na tabela 8. A Agência normaliza percentuais de recuperação do analito e do padrão interno próximos a 100%, porém, admite uma faixa de variabilidade de $100 \pm 20\%$, para matérias primas e princípios ativos (BRASIL, 2003).

Amostra + padrão		Recuperação usando o padrão	
Área	Recuperação(µg/mL)	Área	Recuperação(µg/mL)
23561123	428,87	-	-
23772703	432,93	-	-
22769901	413,68	23670515,00	430,97
23488783	427,48	22546065,00	409,38
24595479	448,73	23377537,00	425,34
Média	430,34	-	421,90
Exatidão = [QE/QT]*100 %	108,14 ± 2,81	-	105,47 ± 2,28
Prova t (t, p)		0,9524;	0,3736

Tabela 8 - Avaliação da exatidão (QE = quantificação experimental; QT = quantificação teórica)

A análise estatística dos resultados do ensaio de recuperação confirmou que não há diferença estatisticamente significativa entre os valores de recuperação da amostra contaminada com padrão, comparada com a recuperação de padrão nas mesmas condições. Considerando que o valor de recuperação ficou abaixo que 110%, pode-se concluir que o método é exato na faixa de concentrações avaliadas.

De acordo com os resultados obtidos, pode ser concluído que o método analítico por CLAE utilizado neste trabalho cumpre com os requisitos de validação: precisão, exatidão e linealidade, podendo o método ser considerado validado, o que significa que oferece resultados em concordância com a finalidade para a qual é utilizado nessa pesquisa.

5.4 Obtenção das NPs – Seleção da melhor nanoformulação

Durante o processo de formulação das nanopartículas de amirina, foram avaliadas 5 formulações com diferentes tipos de polímeros (PCL, Kollicoat[®] e Eudragit[®]), mantendo-se sempre a mesma concentração nas formulação a fim de avaliar qual polímero mais adequado para obtenção de NPs da mistura isomérica de α,β -amirina. As propriedades avaliadas durante esse processo (tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e condutividade) são apresentados na tabela 9.

Formulação	Tamanho partícula(nm)		Índice polidispersão		Potencial zeta(V)		Condutividade (m/s cm ⁻¹)	
	\bar{X}	Dp	\bar{X}	Dp	\bar{X}	Dp	\bar{X}	Dp
F1	143,49	46,81	0,371	0,041	-16,27	9,33	0,2965	0,095
F2	364,35	55,52	0,327	0,080	-5,17	1,67	0,2087	0,015
F3	321,30	15,54	0,308	0,056	-16,97	4,18	0,2615	0,007
F4	405,20	36,11	0,426	0,057	-33,56	20,70	0,0906	0,139
F5	128,80	1,89	0,107	0,011	-35,63	0,55	0,149	0,0005

Tabela 9 - Propriedades das cinco formulações das nanopartículas. Todos os ensaios foram realizados com n=3

Nos processos de formulação de nanopartículas, costuma-se a fazer a primeira avaliação das propriedades dos sistemas em 24h e 48h após a preparação. Assim, pode ser avaliada a estabilidade desses sistemas nas primeiras 24h - 48h, e caso tenha ocorrido algum processo de instabilidade, é simples de detectar. As primeiras 4 formulações (F1, F2, F3 e F4) após 24h de preparação apresentaram sinais de instabilidade. As formulações F1 e F3 (Tabela 9) apresentaram uma coloração esbranquiçada, com precipitados muito leves, e com tamanho de partículas de 143 e 322 nm, respectivamente. Ambas as formulações

apresentaram um gráfico com distribuição bimodal, com altos valores de índice de polidispersão. As duas formulações apresentaram potencial zeta modularmente baixo. Do mesmo modo, as formulações F2 e F4 apresentaram uma cor branca, com tamanho de partículas de 364 e 405nm. A formulação F2 apresentou precipitado no fundo e um potencial zeta com valor modular especialmente baixo, no entanto a formulação F4 apresentou uma grande variabilidade no tamanho expressada num alto índice de polidispersão (0,426). Após 48h, em todas as formulações, foi observada uma separação em duas fases, uma visivelmente clara no fundo, correspondente a fase aquosa e outra mais espumosa e leve na parte superior, correspondente a fase oleosa. As quatro formulações (F1, F2, F3 e F4) apresentaram altos valores de condutividade, significando uma alta mobilidade de íons livres na solução, o que comumente provoca instabilidade devido a interação das cargas dos íons com a dupla camada elétrica das nanopartículas poliméricas (RODRIGUEZ *et al.*, 2017).

Com base nos resultados, verificou-se que a utilização dos polímeros PCL na formulação F1 e Eudragit[®] (F2 e F3) resultou inadequada para a obtenção de nanopartículas estáveis. A formulação F4, pela sua parte, foi preparada usando Kollicoat MAE 100P, porém os resultados indicam que a ausência de tensoativo (Span 20[®]) na fase orgânica influencia de forma negativa, pois apresentou visíveis sinais de instabilidade.

A formulação F5, diferente das outras, foi preparada usando Kollicoat MAE 100P, mais um tensoativo não iônico (Span 20[®]) na fase orgânica. Essa formulação apresentou um tamanho de partículas baixo 129 nm (tabela 9), com uma faixa muito estreita de variabilidade, expressada num índice de polidispersão de 0,107, com um valor modular de potencial zeta acima de 30 (-35,63 mV) e uma baixa condutividade de 0,149 $\mu\Omega\text{cm}^{-1}$. Na literatura sugere que sistemas nanoparticulados com valor modular de potencial zeta acima de -30 mV,

costumam sere muito estáveis (RODRIGUEZ *et al.*, 2017), pois a repulsão entre as partículas carregadas é grande evitando a coalescência e a ocorrência do fenômeno de *Ripening* que reduz a energia superficial causando separação e precipitação em sistemas de nanopartículas (FERREIRA *et al.*, 2017). Conforme esses resultados, a formulação F5 foi selecionada como deal para continuar com os processos de caraterização, estabilidade e avaliação da atividade biológica. Portanto, a F5 obtida com o polímero Kollicoat[®] foi preparada em maior quantidade para ser caracterizada conforme os ensaios descritos a seguir.

5.5 Caracterização físico química das nanopartículas

Avaliação da eficiência da encapsulação

O conteúdo de princípio ativo contido nas NPs tem grande influência sobre a atividade farmacológica do fármaco, sobre as propriedades de liberação e sobre a própria estabilidade do fármaco. Segundo Stella *et al.*, (2007), as substâncias lipofílicas podem chegar a ser encapsuladas até 70%. A eficiência de encapsulação na formulação F5 foi de 65,47%, o que pode ser considerado uma eficiência satisfatória do processo de formulação das nanopartículas (RODRIGUEZ *et al.*, 2017).

Efeito do pH

O comportamento do tamanho de partícula e do potencial zeta das NPs frente as variações de pH na faixa de 1 a 9 foi avaliado e o resultado é mostrado na figura 19. O potencial zeta se manteve praticamente inalterado entre pH 1 e 4, a partir de então ocorreu um aumento modular do potencial até pH 9, onde atingiu um valor de -22mV. Por outro lado, na faixa pH 1 até pH 5, o tamanho de partícula aumentou até um valor de 320 nm, após o valor de pH 5, houve um declínio no tamanho de partícula até atingir um valor de 250 nm, mantendo esse valor até o final do ensaio (pH entre 6-9). Esses resultados estão em

concordância com os resultados obtidos por outra equipe de pesquisadores, que prepararam nanocápsulas de Loratadine, onde foi observado o mesmo comportamento. Tais autores, atribuíram esse comportamento às características químicas do polímero Kollicoat MAE 100P, que mantém alta estabilidade a pH menor que 5, mas começa incrementar volume até quebrar a cobertura das nanocápsulas após uma hora em pH 5,5 (RODRIGUEZ *et al.*, 2017).

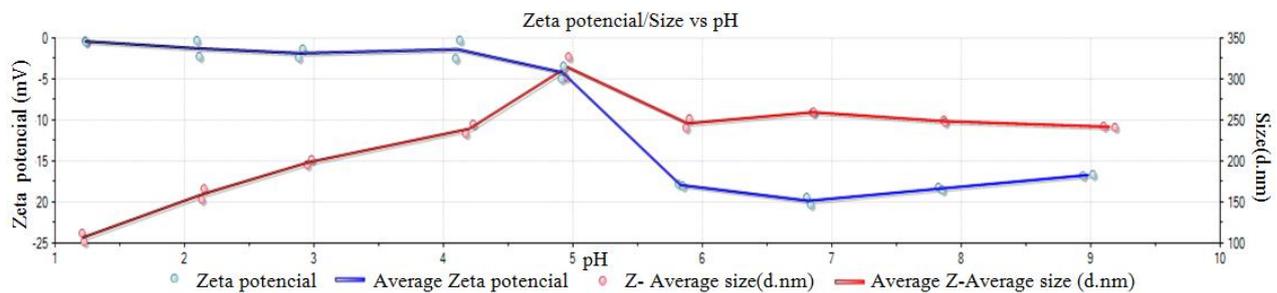


Figura 19 - Efeito do pH no tamanho de partícula e no potencial zeta das nanopartículas

Efeito térmico

Para o desenvolvimento de formulações de nanopartículas pela técnica de emulsificação-difusão é necessário a utilização de certos equipamentos muitas vezes por um período prolongado de tempo. Esse uso provoca efeitos térmicos que podem afetar a formulação e em especial o princípio ativo (MORA-HUERTAS *et al.*, 2012). Diante disso faz-se necessário o conhecimento da influência da temperatura nas propriedades físico-químicas do sistema nanoparticulado desenvolvido.

A figura 20 apresenta o efeito da temperatura entre 10 e 70°C sobre o tamanho de partícula e índice de polidispersão das nanopartículas. Na faixa de temperatura avaliada, o tamanho da partícula se manteve entre 100 e 103 nm, praticamente constante, mostrando valores de índice de polidispersão que diminuem com o aumento da temperatura desde 0,120 a 10 °C até 0,070 a 70°C. Esse comportamento indica uma grande estabilidade da formulação de NPs. Segundo a literatura, o Kollicoat MAE é um polímero derivado do

ácido metacrílico misturado em iguais proporções com acrilato de etila (BÜHLER, 2007). O ácido metacrílico e os polímeros de metacrilatos, quando formulados com tweem 80[®] como agente plastificante e coadjuvante, permitem que o envolcero das NPs dilatem com grande plasticidade, sempre que o pH esteja menor que 5, atingindo até 8 vezes seu tamanho sem quebrar, o que justifica a alta estabilidade térmica das nanopartículas obtidas com esse polímero (BAJDIK ; PINTYE, 2006., RODRIGUEZ *et al.*, 2017). O uso de tweem 80[®], produz também um efeito estérico impedindo a agregação (SAUER ; MEIER, 2001), pois mantém o grupo alquilo hidrofóbico na superfície da partícula mantendo a cadeia de óxido de polietileno hidratada e em movimento, resultando em uma barreira de repulsão capaz de inibir a agregação das partículas (TADROS, 2013), efeito que é constatado pela diminuição da polidispersão com o aumento da temperatura, mantendo o tamanho de partículas em uma faixa muito estreita e homogênea.

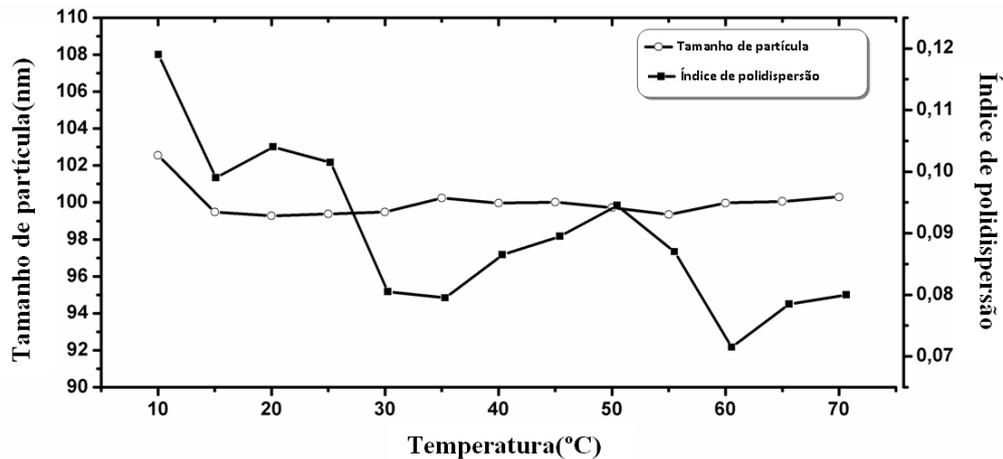


Figura 20 - Efeito da temperatura na faixa de 10 a 70 ° C no tamanho e índice de polidispersão de partícula das NPs

Avaliação da estabilidade das nanopartículas

Os estudos de estabilidade das propriedades das formulações são realizadas ao longo do tempo, em prateleira ou submetidas a determinadas condições de estresse. Esses estudos permitem avaliar os efeitos de fatores de formação e fatores externos sobre as propriedades de

excipientes e essencialmente do princípio ativo. Ainda, estes estudos permitem definir a melhor forma de acondicionamento e armazenamento da forma farmacêutica final (BAJDIK; PINTYE, 2006).

Neste trabalho foi realizado o estudo de estabilidade na formulação F5 ao longo de 90 dias, em condições de prateleira no laboratório, envasadas em frasco âmbar, a temperatura entre $25 \pm 2^\circ\text{C}$, e condições normais de umidade e iluminação. A figuras 21 e 22 apresenta os gráficos de distribuição do tamanho de partícula e o potencial zeta ao longo dos três meses de estudo.

Como pode ser observado na figura 21, o tamanho de partícula manteve uma distribuição monomodal, muito fechada com um baixo índice de polidispersão (tabela 10) muito baixo durante três meses após preparação. Segundo SCHAFFAZICK *et al.*, (2003) nanopartículas tendem a apresentar diâmetros médios entre 100 e 300 nm. As NPs desenvolvidas neste trabalho apresentaram tamanho médio a baixo de 130 nm, com baixa variabilidade durante o tempo de armazenamento, mas com tendência á diminuição de tamanho, acontecendo o mesmo com o índice de polidispersão, que permaneceu praticamente constante.

Tempo (Dia)	Tamanho partícula(nm)		Índice polidispersão		Potencial zeta(mV)		Condutividade (m/s cm^{-1})	
	\bar{X}	Dp	\bar{X}	Dp	\bar{X}	Dp	\bar{X}	Dp
0	128,80	1,89	0,107	0,011	-35,63	0,55	0,149	0,0005
7	129,14	0,38	0,108	0,014	-34,56	0,55	0,150	0,0023
15	127,38	1,62	0,081	0,017	-32,96	1,059	0,154	0,0030
30	128,60	1,68	0,128	0,013	-35,93	1,900	0,156	0,0000
60	129,38	1,22	0,128	0,013	-38,60	1,014	0,149	0,0015
90	123,26	0,32	0,111	0,015	-36,70	1,571	0,156	0,0017

Tabela 10 - Tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e condutividade da formulação F5, durante três meses de estudo.

A utilização de tensoativos não iônicos em dupla, faz com que o tamanho das partículas permaneça praticamente constante durante longos períodos, aumentando a

estabilidade do meio e consequentemente prevenindo a formação de agregação ao longo do tempo (GUTERRES, 1995; PUISIEUX *et al.*, 1994). Essas características são próprias de sistemas nanoparticulados de grande estabilidade cinética e termodinâmica (RODRIGUEZ *et al.*, 2017).

O potencial zeta (figuras 21 e 22) e a condutividade (tabela 10) praticamente não sofreram variação ao longo do tempo, mantendo valores muito próximos ao longo dos três meses de estudo. Os valores de potencial zeta mantiveram-se acima de -35 mV ao longo do tempo, indicando uma grande estabilidade das NPs (MAGENHEIM; BENITA, 1991).

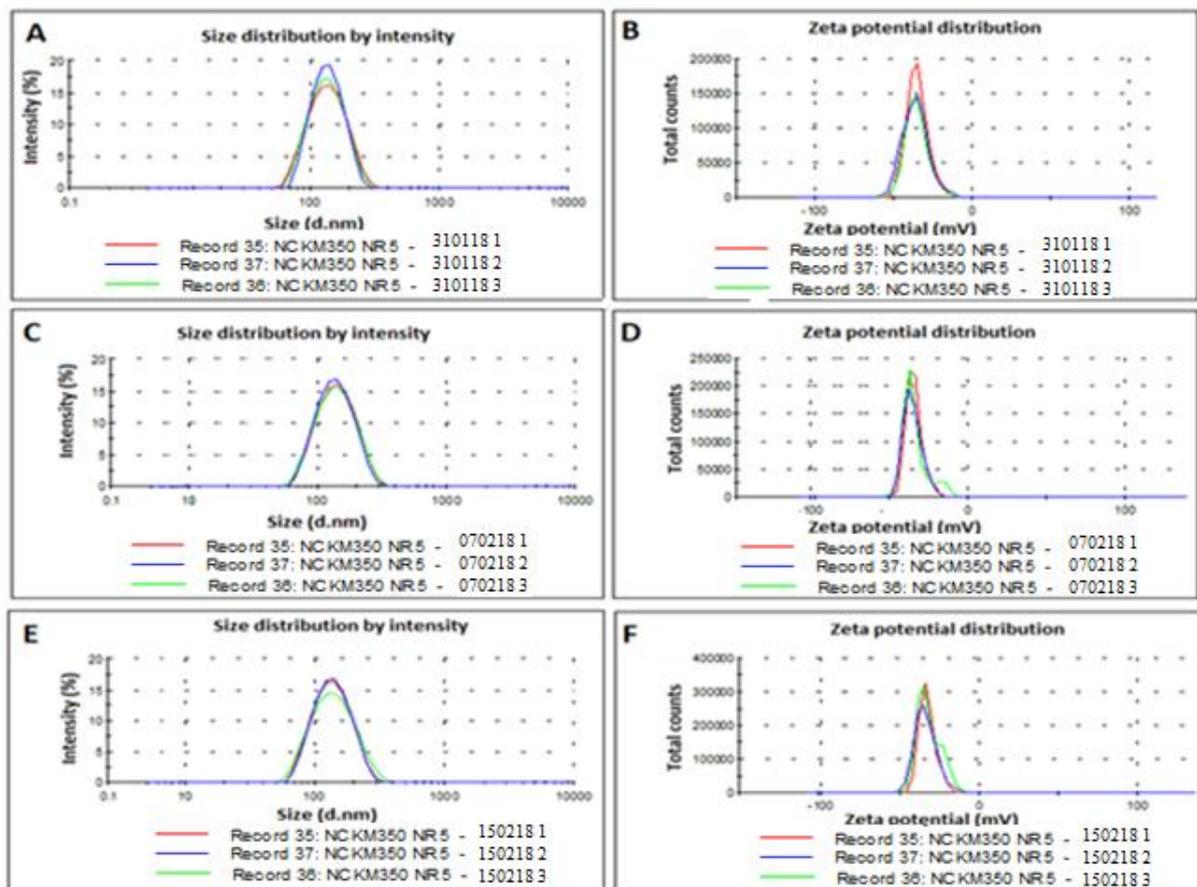


Figura 21 - Comportamento da distribuição do tamanho de partícula e potencial zeta de F5 NPs dia 0 e 15

A condutividade ao longo dos três meses teve ligeiras variações, primeiro com uma leve tendência a aumentar e depois a diminuir. Essa variação da condutividade é

característica dos sistemas nanoparticulados em equilíbrio, devido a interações leves entre a dupla camada elétrica e os íons presentes na solução (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

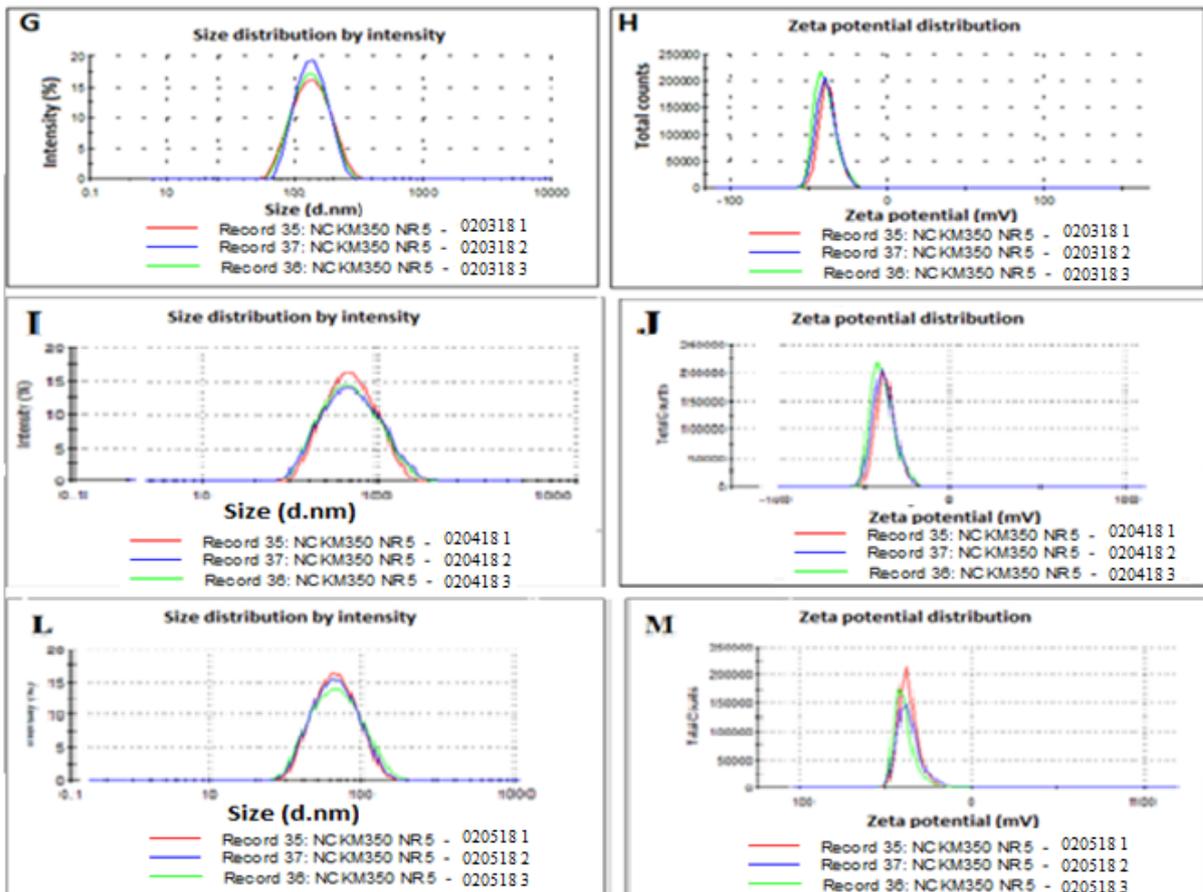


Figura 22 - Comportamento da distribuição do tamanho de partícula e potencial zeta de F5 NPs dia 30 a 90

5.6 Testes Biológicos

5.6.1 Atividade antioxidante: inibição dos radicais DPPH e ABTS

O teste de DPPH[•] é um dos métodos indiretos mais úteis para estabelecer a atividade antioxidante de substâncias químicas em geral. Foi utilizado, originalmente, em 1950 em pesquisas sobre doadores de hidrogênio em produtos naturais. Anos depois foi empregado para determinar o potencial antioxidante de moléculas fenólicas isoladas de alimentos, bem como amostras biologicamente importantes (ROGINSKY; LISSI, 2005). Uma característica

relevante dessa metodologia é que ela não está associada a situações extremas de temperatura e oxigenação (SILVA *et al.*, 1999).

O DPPH• é um radical estável e com baixa taxa de reatividade com a maioria das moléculas. Deste modo, apenas reagentes redutores fortes têm a capacidade de reagir com estes radicais de modo estequiométrico. O sequestro destes radicais é um dos mecanismos reconhecidos pelo qual ocorre a ação dos antioxidantes dos fármacos (SANTOS *et al.*, 2007).

O IC₅₀ representa a concentração mínima necessária de uma substância ou composto bioativo para reduzir em 50% a concentração do radical DPPH• (PRADO, 2009). Então quanto maior o consumo de DPPH• por uma amostra, menor será a sua IC₅₀, porém maior sua atividade antioxidante (SOUSA *et al.*, 2007).

A tabela 11 apresenta os resultados da avaliação da atividade antioxidante da amirina isolada/purificada e das nanopartículas contendo a mistura isomérica dessa molécula. Tanto a amirina pura como as NPs apresentaram um baixo potencial de inibição de ambos os radicais, indicando uma baixa atividade antioxidante (tabela 11).

Substância	DPPH•		ABTS•	
	Inibição (%)	IC ₅₀ (µg/mL)	Inibição (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
Amirina isolada	1,54 ± 0,52	-	-	-
Nanopartículas	3,10 ± 2,00	-	3,70 ± 0,30	-
Ácido Gálico	86,20 ± 2,10	2,00 ± 0,06	93,70 ± 1,50	2,13 ± 0,06

Tabela 11 - Atividades antioxidantes pelo sequestro de radical livre

5.6.2 Atividade inibidora α -glicosidase de murino

A enzima α -glicosidase tem a função de converter os hidratos de carbono complexos nos seus monossacarídeos para facilitar o seu metabolismo. Os inibidores de α -glicosidase (por exemplo, Acarbose, Voglibose e Miglitol) ajudam a manter a glicose no sangue dentro dos valores normais, reduzindo a taxa de conversão, assim a acumulação desses

monosacáridos se faz demoradamente sendo fácil o seu controle pelo fármaco hipoglicemiante (LI *et al.*, 2005). Por essa razão, as substâncias inibidoras de α -glicosidase são excelentes candidatos para o tratamento complementar da diabetes.

A formulação de NPs contendo amirina, desenvolvidas neste trabalho, apresentaram um potente efeito inibidor α -glicosidase com IC_{50} de $44,40 \pm 1,90 \mu\text{g/mL}$ (tabela 12). O efeito foi superior ao padrão de referência utilizado (Acarbose, IC_{50} $62,30 \pm 1,30\mu\text{g/mL}$). Uma explicação para este fato é que a mistura isomérica presente nas nanopartículas deve competir com os hidratos de carbono na corrente sanguínea, retardando a ligação destes a α -glicosidase, produzindo uma inibição da enzima. Esse efeito sugere o resultado de uma lenta liberação de amirina das nanopartículas, mas esse efeito terá de ser comprovado posteriormente. É importante destacar que, a molécula de amirina pura em concentração de $100 \mu\text{g/mL}$ apresentou uma baixa atividade inibitória desta enzima ($1,59 \pm 0,57 \mu\text{g/mL}$), indicando que o uso da nanoformulação se apresenta como uma opção viável para a utilização da amirina no controle do diabetes.

Substâncias	Lipase		α - Glicosidase	
	Inibição (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Inibição (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Amirina	$16,41 \pm 2,42$	-	$1,59 \pm 0,57$	-
Nanopartícula	$95,30 \pm 2,00$	$15,40 \pm 0,70$	$72,70 \pm 1,40$	$44,40 \pm 1,90$
Acarbose	-	-	$65,30 \pm 0,60$	$62,30 \pm 1,30$
Orlistat	$93,20 \pm 1,10$	$0,29 \pm 0,01$	-	-

Tabela 12 - Atividade inibitória das NPs contendo mistura isomérica α , β - amirina sobre as enzimas α -glicosidase e lipase.

5.6.3 Atividade inibitória da lipase

Os fármacos inibidores da lipase pancreática tem potencial aplicação no tratamento de pacientes obesos, especialmente naqueles pacientes com diabetes tipo II que desenvolveram obesidade (KIM *et al.*, 2007; MEENATCHI *et al.*, 2017). Os fármacos inibidores de lipase são escassos na terapêutica e apresentam pouco uso clínico,

além disso, atualmente, não há nenhum medicamento obtido a partir de extratos vegetais. Também é importante salientar o fato que, além do Orlistat, não é observado na literatura ou novos estudos, e nem novas moléculas inibidoras de lipase têm sido relatados desde 2014 (LUNAGARIYA *et al.*, 2014). O Orlistat[®] e outros inibidores de lipase produzem efeitos gastrointestinais adversos como a incontinência fecal, flatulência, e esteatorreia (BIRARI; BHUTANI, 2007).

O estudo de inibição da lipase pancreática produzido pelas NPs de amirina e pela amirina pura mostrou uma forte atividade inibidora das NPs (IC_{50} $15,40 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$, Tabela 12), porém foi menor que a atividade produzida pela substância de referência (Orlistat, $0,29 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$), no entanto, bem maior que a produzida pela molécula de amirina pura que apresentou na concentração de $100\mu\text{g/mL}$, um percentual de inibição muito baixo ($16,41 \pm 2,42\%$), e não foi possível determinar sua IC_{50} . Os resultados obtidos sugerem que as NPs se apresentam como um produto promissor para auxiliar o tratamento da obesidade em pacientes diabéticos. Contudo, mais estudos terão que ser feitos para confirmar a utilidade deste produto para este tipo de tratamento.

5.6.4 Citotoxicidade *in vitro*

A viabilidade celular (números de células viáveis e integridade da membrana citoplasmática) é um ensaio de toxicidade relativa que permite avaliar se uma substância produz morte ou dano celular sobre determinado tipo de célula. Neste estudo, uma cultura de células não neoplásicas de pulmão humano foi colocada em contato com uma série de concentrações das nanopartículas de amirina e da amirina pura, com o intuito de avaliar se alguma delas produz morte ou dano celular nesse tipo de células (BISKUP, 2012).

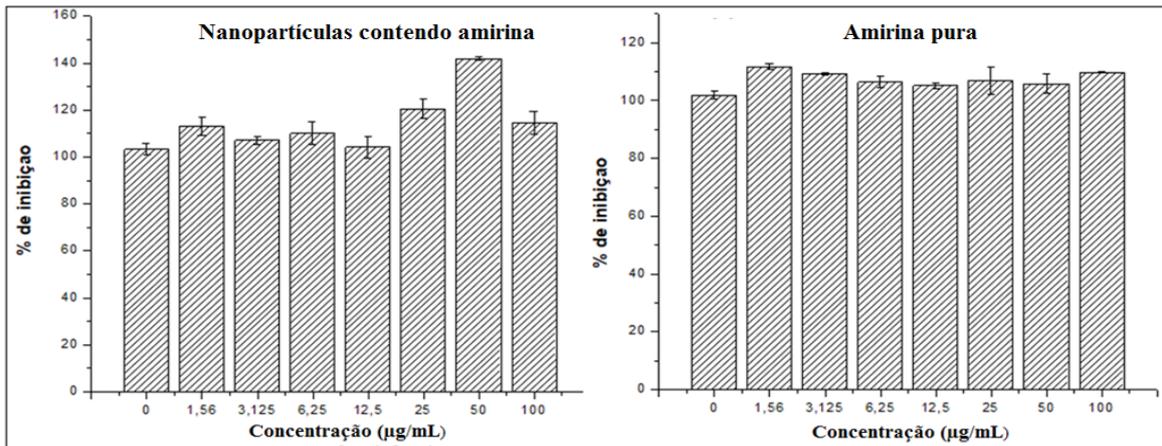


Figura 23- Atividade citotóxica das nanopartículas de amirina e da amirina pura

Os resultados obtidos (figura 23) mostraram que tanto as NPs de amirina como a amirina pura, em nenhuma das concentrações testadas produziram morte sobre as células utilizadas, indicando que ambas as amostras (molécula isolada e em formulação de NPs) nas concentrações testadas (1,56 µg/mL e 100µg/mL) não tem efeito citotóxico. Esse resultado indica que o uso dessa substância poderia ser seguro em pacientes, no entanto, outros estudos com outras linhagens celulares, além de outros estudos *in vivo* precisam ser feitos para ter certeza da inocuidade de ambas às amostras.

6 CONCLUSÕES

1. Neste estudo foi isolado e purificado uma mistura isomérica de α - β amirina com um rendimento de 28% e com 99% de pureza, avaliada por um método cromatográfico, por CLAE validado para essa finalidade.
2. O método cromatográfico por CLAE utilizado para a caracterização química da amirina e para a avaliação do conteúdo de amirinas “encapsulado” foi validado, mostrando ser linear, exato e preciso no intervalo de concentrações entre 80-800 $\mu\text{g/mL}$.
3. Foram preparadas nanopartículas carregadas com a mistura de α - β amirina, isolada e purificada neste trabalho, usando como polímero de revestimento o Kollicoat Mae 100P.
4. As nanopartículas obtidas apresentaram um tamanho de partícula de 128,80 nm, uma polidispersão de 0,107, potencial zeta de -35,63 mV e uma condutividade 0,149 $\mu\Omega\text{cm}^{-1}$.
5. As nanopartículas mostraram estabilidade físico-química em prateleira até 90 dias após a preparação.
6. A avaliação da atividade antioxidante das nanopartículas de amirina e da amirina pura demonstrou uma pobre atividade antioxidante de ambas às substâncias.
7. As nanopartículas de amirina mostraram uma forte atividade inibidora das enzimas lipase pancreática (IC_{50} 15,40 $\mu\text{g/mL}$) e α -glicosidase (IC_{50} 44,40 $\mu\text{g/mL}$), diferente da amirina pura que apresentou uma atividade muito baixa de inibição de ambas enzimas.
8. O ensaio de citotoxicidade relativa das nanopartículas de amirina e da amirina pura em fibroblasto não neoplásico de pulmão humano mostrou inocuidade de ambas as duas, frente esta linhagem celular.
9. Segundo os resultados obtidos neste estudo pode-se indicar que as nanopartículas carregadas com a mistura de α - β amirina poderiam ser uma alternativa viável para seu uso no tratamento coadjuvante da diabetes e para pacientes diabéticos com complicações

secundárias como a obesidade. No entanto, outros estudos deverão ser conduzidos para comprovar a funcionalidade real e a inocuidade das nanopartículas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRA, M. F.; *et al.* Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 17, n. 1, p. 114–140, 2007.

AHMED, S.A., *et al.* A new rapid and non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [³H] thymidine incorporation assay. *J Immunol Meth*, v. 170, n.2, p.211-224, 1994.

AMARAL, F. M. M. *et al.* Plants and chemical constituents with giardicidal activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, p. 696–720, 2006.

ANDRADE-CETTO, A.; BECERRA-JIMÉNEZ, J.; CÁRDENAS-VÁZQUEZ, R. Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. *J Ethnopharmacol*, v. 116, n. 1, p. 27-32, 2008.

ANGELI, V. W. Desenvolvimento e Caracterização de formulações fotoprotetoras contendo nanocápsulas. 2007. 198f. Tese (Doutorado em Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

ANTON, N.; *et al.* Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates A review, *Journal of Controlled Release*, v.128, n. 3, p.185-199, 2008.

ARAGÃO, G. F. *et al.* A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 85, n. 4, p. 827–834, 2006.

ARAGÃO, G. F. *et al.* Antiplatelet Activity of α - and β .-Amyrin, Isomeric Mixture from *Protium heptaphyllum*. *Pharmaceutical Biology*, v. 45, n. 5, p. 343–349, 2007.

ARAGÃO, G. F. *et al.* Alterations in brain amino acid metabolism and inhibitory effects on PKC are possibly correlated with anticonvulsant effects of the isomeric mixture of α - and β -amyrin from *Protium heptaphyllum*. *Pharmaceutical biology*, v. 53, n. 3, p. 407–413, 2015.

BAJDIK, K.J., PINTYE, H.,. Study of deformation process of stored polymethacrylate free films. *Pharmazie*. v. 61, p. 887–888, 2006.

BARRIOS, J. G. *et al.* Validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para doseamento do adapaleno em suspensões de nanocápsulas. *Química Nova*, v. 34, n. 8, p. 1464–1467, 2011.

BARROS, F. W. A. *et al.* Amyrin esters induce cell death by apoptosis in HL-60 leukemia cells. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 19, n. 3, p. 1268–1276, 2011.

BISKUP, E. *et al.* Triterpenoid alfa-amyrin stimulates proliferation of human keratinocytes but does not protect them against UVB damage. *Acta Biochimica Polonica*, v. 59, n. 2, p. 255–260, 2012.

BIRARI, R; BHUTANI K. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug Discov Today*; v.12, p. 879–889, 2007.

BLOUZA, I. L. *et al.* Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 325, n. 1–2, p. 124–131, 2006.

BRASIL – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Determinar a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução-RE Nº 899 de 29 maio 2003. Brasília: ANVISA, p. 1-19, 2003.

BRASIL – AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL. Relatório de acompanhamento setorial. Nanotecnologia na área da saúde: mercado, segurança e regulação. Porto Alegre , ABDI, 2013.

BÜHLER, V., Kollicoat grades. Functional polymers for the pharmaceutical industry. BASF Aktiengesellschaft, Pharma Solutions 67056 Ludwigshafen, Germany. p. 229, 2007.

BURITS, M. E.; BUCAR, F., Atividade antioxidante do óleo essencial de *Nigella sativa* . *Phytother.* v.14, p. 323-328, 2000.

CARVALHO, K. M. M. B. *et al.* Amyrins from *Protium heptaphyllum* Reduce High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice via Modulation of Enzymatic, Hormonal And Inflammatory Responses. *Planta Medica*, v.83, n 3-04, p. 285-291, 2016.

CARVALHO, M. G. de.; *et al.* Triterpenos isolados de *Eschweilera longipes* miers (Lecythidaceae). *Química Nova* , v. 21, n. 6, p. 740-743, 1998.

CHINSRIWONGKUL, A., *et al.*; Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for Parenteral Delivery of an Anticancer Drug. An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists, v.13, p.150-158, 2011.

CONCEIÇÃO, A., MATOS C., MOUTINHO C. Encapsulação de dois fármacos anticancerígenos (5-fluorouracil e metotrexato) em lipossomas unilamelares. Revista da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, v.6, p. 50-59, 2009.

CONOVER, A. W. J., JOHNSON, M. E., JOHNSON, M. M. A. Comparative Study of Tests for Homogeneity of Variances , with Applications to the Outer Continental Shelf Bidding Data. Technometrics, v.23, n.4, p. 351–361, 1981.

Crystallographic Information File <disponível em (https://en.wikipedia.org/wiki/Crystallographic_Information_File)>, acesso em 04 mai 2018.

DASHEVSKY A.; *et al.* pH-independent release of a basic drug from pellets coated with the extended release polymer dispersion Kollicoat[®] SR 30 D and the enteric polymer dispersion Kollicoat[®] MAE 30 DP, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 58, p. 45-49, 2004.

DEDAVID, B. A. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

DELGADO, J. M. F. Preparação e Caracterização de Nanotransportadores (nanocápsulas, nanoesferas, lipossomas e transportadores lipídicos nanoestruturados) sem substância ativa. 2013. 117f. Dissertação.(Mestrado em Tecnologia Biomédica). Escola Superior de Tecnologia e Gestão. Instituto Politécnico de Bragança. Portugal. Bragança.

DIAS, D. O. *et al.* Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of β -caryophyllene in a nanoemulsion dosage form prepared with copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil. Analytica Chimica Acta, v. 721, p. 79–84, 2012.

DIAS, M. O., HAMERSKI, L., PINTO, A. C. Separação semipreparativa de α e β -amirina por cromatografia líquida de alta eficiência. Química Nova, v.34 n. 4, p. 704–706, 2011.

DIMER, F. A. *et al.* Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. *Química Nova*, v. 36, n.10, p. 1520–1526, 2013.

ETHERIDGE, M. L. *et al.* The big picture on nanomedicine: The state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2013.

FERREIRA, M; *et al.* Nanostructures: Micro & Nano technologies series. Elsevier, v.1, p. 320, 2017.

FERREIRA, R. G. S., Obtenção da Mistura Triterpênica de α , β - Amirenona e Avaliação de seus efeitos Hipolipemiante, Hipoglicemiante e Antiobesidade. 2017. 111f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

FESSI, H. *et al.* Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 55, n. 1, p. 1- 4, 1989.

FRONDEL, J. W. X-Ray Diffraction Study of Fossil Elemis. *Nature*, v. 215, p.1360, 1967.

FROTA, J. T. Avaliação das atividades hipoglicemiante e hiperlipidêmica da mistura de α , β -amirina, triterpenos pentacíclicos isolados do *Protium heptaphyllum*, em camundongos. f 41-92. 2011. Dissertação (mestrado em farmacologia). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza.

GUILHON-SIMPLICIO, F. Estudo químico e farmacológico *Byrsonima* (Malpighiaceae) para o desenvolvimento de novos anti-inflamatórios e antimicrobianos. 2017. Tese (Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

GUTERRES, S. S. *et al.* Poly(D,L-Lactide) nanocapsules containing non-steroidal anti-inflammatory drugs: Gastrointestinal tolerance following intravenous and oral administration. *Pharmaceutical Research*, v. 12, n.10, p. 1545–1547, 1995.

GUTERRES, S. S.; *et al.* Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. *Drug target insights*, v. 2, n. 2, p. 147–157, 2007.

HALDAR, S. *et al.* Lipase mediated separation of triterpene structural isomers, α - and β -amyrin. *Tetrahedron Letters*, v. 55, n.19, p. 3122–3125, 2014.

ISHII, M. *et al.* β - Amyrin induces angiogenesis in vascular endothelial cells through the Akt/endothelial nitric oxide synthase signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 467, n. 4, p. 676–682, 2015.

JEON, S. J. *et al.* Positive effects of β - amyrin on pentobarbital-induced sleep in mice via GABA ergic neurotransmitter system. *Behavioural Brain Research*, v. 291, p. 232–236, 2015.

KIM J. H.; *et al.* Development of inhibitors against lipase and alpha-glucosidase from derivatives of monascus pigment. *FEMS Microbiol Lett*, v. 276, p. 93–98, 2007.

KUMARI, A. *et al.* Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systêms. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 75, n. 1, p. 1–18, 2010.

LANGENHEIM, J. H. *Resinas de plantas: química, evolução, ecologia e etnobotânica.* Timber Imp ed. Portland, OR - Estados Unidos. 2003. 586 p.

Legrand, P., *et al.* Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 344, n. 1–2, p. 33-43, 2007.

LETCHFORD, K.; BURT, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 65, n. 3, p. 259–269, 2007.

LI, H.; *et al.* Dissolution evaluation in vitro and bioavailability in vivo of self-microemulsifying drug delivery systems for pH-sensitive drug loratadine. *J. Microencapsul.* v.32, n. 2, p. 175–180, 2014.

LIMA E. M., OLIVEIRA A. G. Tissue Tolerance of Diclofenac Sodium Encapsulated in Liposomes After Intramuscular Administration. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v.28, p. 673-680, 2002.

LIMA, L. R.; PIRANI, J. R. Burseraceae. Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo, vol. 4. IN: WANDERLEY, M.G.L., *et al.* (cords.). Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. Instituto de Botânica, São Paulo, v. 4, p. 163-168, 2005.

LUNAGARIYA, N. A., *et al.* Inibidores da lipase pancreática: estado da arte e perspectivas clínicas. *jornal EXCLI*, v.13, p. 897-921, 2014.

MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. *STP Pharma Sciences*, v. 1, n. 4, p. 221-241, 1991.

MAHATO, A. P. ; KUNDU, S. B. ^{13}C NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids-a and Some Salient Features. *Phytochemistry*, v. 37, n. 6, p. 1517 - 1575,1994.

MAHATO, S. B.; *et al.* Triterpenoids. *Phytochemistry*, v. 31, n. 7, p. 2199–2249, 1992.

MAHATO, S. B. S. SEN. Advances in Triterpenoid Research, 1990-1994 L. *Phytochemistry*, v. 44, n. 2, p. 1185–1236, 1997.

MAGALHÃES, R. M. *et al.* Triterpenos da resina de *Protium heptaphyllum* March (Bourseraceae). Caracterização em misturas binárias. *Química Nova*, v. 23, n. 5, p. 623–626, 2000.

MALLAVADHANI, U. V., *et al.* Antimicrobial Activity of Some Pentacyclic Triterpenes and Their Synthesized 3-O-Lipophilic.Chains. *Biol. Pharm. Bull.* v. 27, n.10, p. 1576—1579 2004.

MALVERN Instruments Ltd. Manual Zetasizer Nano Series Performance, Simplicity, Versatility, 2014. p. 20. Disponível em: <http://www.malvern.com/en/products/product-range/zetasizer-range/default.aspx> - acesso em 13 mar 17.

MEENATCHI, B., *et al.*, Protic ionic liquid assisted synthesis and characterization of ferromagnetic cobalt oxide nanocatalyst. *Jornal de Polímeros e Materiais Inorgânicos e Organometálicos*, v.2 p 27, 2017.

MELO, C. M. *et al.* Anti-inflammatory effect of α,β -amyrin, a triterpene from *Protium heptaphyllum*, on cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Inflammation Research*, v. 60, n. 7, p. 673–681, 2011.

MELO, N. F. S., *et al.* Benzocaine-Loaded Polymeric Nanocapsules: Study of the Anesthetic Activities. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 101, n. 3, p. 1157–1165, 2012.

MOGHIMI, S. M., *et al.* Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB journal* : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, v. 19, n. 3, p. 311–30, 2005.

MOHAMMADI, G., *et al.* Development of azithromycin–PLGA nanoparticles: Physicochemical characterization and antibacterial effect against *Salmonella typhi*, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 80, n. 1, P. 34-39, 2010.

MORAES, C. M. *et al.* Benzocaine loaded biodegradable poly-(d,l-lactide-co-glycolide) nanocapsules: factorial design and characterization. *Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology*, v. 165, n. 3, p. 243–246, 2009.

MORA-HUERTAS, C. E., *et al.* Nanocapsules prepared via nanoprecipitation and emulsification–diffusion methods: Comparative study, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 80, n. 1, p. 235-239, 2012.

OLIVEIRA, F. A., *et al.* Protective effect of α - And β -amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 98, n. 1–2, p. 103–108, 2005.

OLIVEIRA, F. A., Estudo das propriedades farmacológicas da resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl) March e de seus principais constituintes, mistura de alpha e beta amirina. 2005. 61-80f. Tese (programa de pós graduação em Farmacologia). Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza.

OURIQUE A F., *et al.* Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 352, n. 1-2, p.1- 4, 2008.

PANDYA, V. M., PATEL, J. K., PATEL, D. J., Formulation, optimization and characterization of simvastatin nanosuspension prepared by nanoprecipitation technique. *Pharm. Lett.* v.3, n. 2, p.129–140, 2011.

PARVEEN, S., *et al.* Nanoparticles: A boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 8, n. 2, p.147–166, 2012.

PIMENTA, M.; MELO, C. D. P. Nanociências e nanotecnologia. *Parcerias estratégicas*, v. 18, p. 9–21, 2004.

PINTO, S. A. H. *et al.* Antinoceptive effect of triterpenoid α,β -amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. *Phytomedicine*, v. 15, n. 8, p. 630–634, 2008.

PORTO, A. S. Desenvolvimento de Nanoemulsão O/A a base de óleo de copaíba, incorporadas com nanopartículas magnéticas de zinco. 2015. 101f, Dissertação de mestrado, Instituto de Ciências Biológicas. Universidade de Brasília. Brasília.

PRADO, A. Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais. 2009. 107f. Dissertação (Ciência e Tecnologia de Alimentos) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

PUISIEUX, F., *et al.* Polymeric micro-and nanoparticles as drug carriers. *Polymeric ed.* Canadá. Marcel Dekker, p.749-94, 1994.

QUINTANAR-GUERRERO, D., *et al.* Preparation Techniques and Mechanisms of Formation of Biodegradable Nanoparticles from Preformed Polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v.24, p.1113 - 1128, 1998.

RAWAT M., *et al.* Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs. *Pharmaceutical Society of Japan*, v. 29, p. 790-798, 2006.

REIS, C. P; *et al.* Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 2, n. 1, p. 8–21, 2006.

RIBANI, M., *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO H. S., *et al.* Preparation of nanodispersions containing β -carotene by solvent displacement method. *Food Hydrocolloid*, 22: 12-17, 2008.

RIEUX, A. D., *et al.* Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *Journal of Controlled Release*, v. 116, n. 1, p. 1–27, 2006.

RODRIGUEZ A, J. R. *et al.* Development, stability and in vitro delivery profile of new loratadine-loaded nanoparticles. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v.25, n.8, p. 1158–1168, 2017.

ROGINSKY, V, LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*. v.92, p. 235-254, 2005.

SANTOS, M. H., *et al.* Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica*). *Química Nova*, v.30, n.3, p. 604-610, 2007.

SANTOS, F. A. *et al.* Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of α , β -amyirin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. *Lipids in health and disease*, v. 11, n. 98, p. 1–8, 2012.

SAUER, M., MEIER, W., Responsive nanocapsules. *Chem Commun*. v.1, p. 555–562, 2001.

SCHAFFAZICK, S. R., *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulado para administração de fármacos. *Química Nova*, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

SIANI, A. C., *et al.* Chemical composition of South American Burseraceae non-volatile oleoresins and preliminary solubility assessment of their commercial blend. *Phytochemical Analysis*, v. 23, n. 5, p. 529–539, 2012.

SILVA-JÚNIOR, W. F., *et al.* Thermal behavior and thermal degradation kinetic parameters of triterpene α , β amyirin. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 127, p.1757-1766, 2017.

SILVA, F. A. M., *et al.* Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova*. v. 22, n. 1, p 94-103, 1999.

SINGH, D. *et al.* Modulatory potential of α -amyirin against hepatic oxidative stress through antioxidant status in wistar albino rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 161, p. 186–193, 2015.

SLANC, P., *et al.* Triagem de alimentos selecionados e extratos de plantas medicinais para a inibição da lipase pancreática. *Phytother.* v. 23, p.874 - 877, 2009.

SHANTY, A.; MOHANAN, P. Heterocyclic Schiff bases as nontoxic antioxidants: Solvent effect, structure activity relationship and mechanism of action. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 192, p.181-187, 2017.

SOLDI, C., *et al.* Synthetic derivatives of the α - and β -amyrin triterpenes and their antinociceptive properties. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 16, n. 6, p. 3377–3386, 2008.

SOPPIMATH, K. S., *et al.* Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Rel.*, v. 70, p. 1–20, 2001.

SOUSA, *et al.*, Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*. v.30, p. 351-355. 2007.

STELLA, B., *et al.* Encapsulation of gemcitabine lipophilic derivatives into polycyanoacrylate nanospheres and nanocapsules, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 344, n. 1–2, p. 71-77, 2007.

STEICHEN, S. D. *et al.* A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 48, n. 3, p. 416–427, 2013.

TADROS, T., *Encyclopedia of Colloid and Interface Sci.* Springer, New York, p. 748, 2013.

TAMJIDI, F. *et al.* Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 19, p. 29–43, 2013.

THIRUPATHI, A. *et al.* Beta-Amyrin, a pentacyclic triterpene, exhibits anti-fibrotic, anti-inflammatory, and anti-apoptotic effects on dimethyl nitrosamine-induced hepatic fibrosis in male rats. *Human & Experimental Toxicology*, v.36, n. 12, p. 1295–1392, 2016.

TORCHILIN, V. Multifunctional nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 58, n. 14, p.1532–1555, 2006.

TORRECILLA, D., *et al.* Anti-tumor efficacy of chitosan-g-poly(ethylene glycol) nanocapsules containing docetaxel: Anti-TMEFF-2 functionalized nanocapsules vs. non-functionalized nanocapsules. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 83, p.330-337, 2013.

ZHUANG, C., *et al.* Preparation and characterization of vinpocetine loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for improved oral bioavailability. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 394, p.179-185, 2010.

ZILI, Z., SFAR S., FESSI H. Preparation and characterization of poly-e-caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 294, p. 261-267, 2005.