

Mariana Alves Battisti

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCARREADOR LIPÍDICO
CONTENDO EXTRATO PADRONIZADO DE FOLHAS DE
Cecropia pachystachya Trécul VISANDO À OBTENÇÃO DE
MEDICAMENTO DE USO TÓPICO**

Dissertação submetida ao
Programa de Pós Graduação em
Farmácia da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do
Grau de Mestre em Farmácia.

Orientador: Profa. Dra. Angela
Machado de Campos

Coorientador: Prof. Dr. Flávio
Henrique Reginatto

Florianópolis

2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Battisti, Mariana Alves
DESENVOLVIMENTO DE NANOCARREADOR LIPÍDICO CONTENDO
EXTRATO PADRONIZADO DE FOLHAS DE Cecropia pachystachya
Trécul VISANDO À OBTENÇÃO DE MEDICAMENTO DE USO TÓPICO /
Mariana Alves Battisti ; orientadora, Angela Machado De
Campos ; coorientador, Flávio Henrique Reginatto. -
Florianópolis, SC, 2015.
119 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Farmácia. 3. Sistema Nanoparticulados .
4. Cecropia pachystachya Trécul. I. De Campos, Angela
Machado. II. Reginatto, Flávio Henrique. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Farmácia. IV. Título.

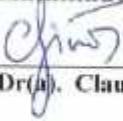
“Desenvolvimento de nanocarreador lipídico contendo extrato padronizado de *Cecropia pachystachya* Trécul visando à obtenção de medicamento de uso tópico”

POR

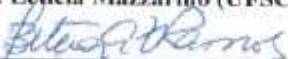
Mariana Alves Battisti

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

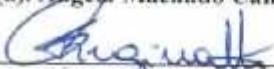
Banca Examinadora:


Prof(a). Dr(a). Claudia Maria Oliveira Simões (UFSC – Membro Titular)


Prof(a). Dr(a). Leticia Mazzarino (UFSC – Membro Titular)


Prof(a). Dr(a). Betina Zanetti Ramos (NANOVETORES – Membro Titular)


Prof(a). Dr(a). Angela Machado Campos (UFSC – Orientador(a))


Prof(a). Dr(a). Flavio Henrique Reginatto (UFSC – Coorientador(a))


Prof(a). Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 13 de março de 2015.

A minha mãe meu grande exemplo de vida, dedico, mais esta conquista como forma de gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo a Deus, pela vida e por estar sempre comigo em todos os momentos.

À minha família, especialmente minha mãe, pelo apoio e incentivo durante toda minha vida. Aos meus irmãos Jordana e William, que mesmo distantes sempre torceram por mim.

À minha orientadora Prof^ª. Dra. Angela Machado de Campos, pela orientação, dedicação, atenção e paciência que teve comigo no mestrado, além de diversos votos de confiança que depositou em mim ao longo de toda a minha vida acadêmica.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto, por ter aceitado me orientar neste trabalho e pelo apoio em tudo que precisei.

Agradeço a Prof^ª. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões por disponibilizar seu laboratório para os estudos de permeação.

Aos amigos e colegas do laboratório, Thaisa, Jana, Mari, Geci Bárbara, Georgia, Pri, Sandra, Simone, Aline, Jonas e Nilson por todos os momentos de descontração dentro e fora do laboratório e pelas grandes trocas de conhecimento durante nossas conversas.

Aos meus companheiros de mestrado e amigos André, Lari e Vivi, por todas as risadas.

À Talitha, por todo apoio e ensinamentos desde a minha iniciação científica. Muito Obrigada!!

As minhas amigas, Amina, Carol, Denise e Jana que me acompanham desde o começo da faculdade.

À Priscila e Mauricio meus grandes amigos, por toda amizade e cumplicidade.

À Carol do laboratório de Farmacognosia pelo incentivo e apoio durante o trabalho.

Ao Thiaguinho, pela colaboração e pelo otimismo durante os experimentos de permeação.

As demais pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho!

Muito Obrigada!!

Deus nunca disse que a jornada seria fácil, mas
Ele disse que a chegada valeria a pena.

(Max Lucado)

RESUMO

Cecropia pachystachya Trécul, espécie nativa e abundante no sul e sudeste do Brasil, é amplamente utilizada na medicina popular. Recentemente, *C. pachystachya* teve sua atividade anti-inflamatória demonstrada e atribuída à composição rica em polifenóis, especialmente flavonoides. Nanocarreadores lipídicos (NCL) são sistemas promissores para via dérmica devido ao tamanho nanométrico e o caráter lipofílico que confere propriedades oclusivas, favorecendo a penetração cutânea da substância encapsulada. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver NCL contendo extrato padronizado de *C. pachystachya* visando obter um produto de uso tópico. Para tanto, um estudo de extração foi realizado, sendo estabelecidas como condições ótimas uma concentração de 5% de droga vegetal e etanol (20%, V/V) como líquido extrator, utilizando a ultraturbulização com método extrativo. As soluções extrativas foram submetidas à extração com resina de troca iônica (Amberlite XAD-16) para obtenção de fração enriquecida em compostos C-glicosídeos (FECp). A técnica de microemulsão foi utilizada para encapsulação da FECp. Com base em estudo preliminar de formulação foram definidos como componentes da formulação. Um segundo planejamento experimental foi realizado para avaliar os efeitos da quantidade de fração enriquecida adicionada na formulação, tempo de agitação da pré-emulsão, tempo e velocidade de agitação da emulsão final e sobre o tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI), eficiência de encapsulação (EE%) e teor de marcador químico. O tamanho médio de partícula variou entre 93 e 188 nm, com índice de polidispersão para todas as formulações na faixa de 0,3-0,4. Elevados valores de EE% foram obtidos para todas as formulações testadas (valores superiores a 70%). O teor de marcador variou significativamente em função da quantidade de fração enriquecida de *C. pachystachya* adicionada inicialmente. As formulações contendo 50 mg de fração apresentaram o maior teor (1,30 %). Um estudo de permeação cutânea utilizando células de difusão tipo Franz foi realizado para avaliar as formulações. A quantidade de fração enriquecida permeada através da pele aumentou após a aplicação dos nanocarreadores lipídicos em comparação com a fração enriquecida livre.

Palavras-chave: *Cecropia pachystachya* Trécul; flavonoides C-glicosídeos, nanotecnologia; nanopartículas; nanocarreadores lipídicos; administração tópica

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF THE NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS (NLC) CONTAINING STANDARDIZED EXTRACT OF *Cecropia pachystachya* Trécul FOR TOPICAL ADMINISTRATION

Cecropia pachystachya is popularly known as embaúba, is widely used in traditional medicine to treat cough, asthma, bronchitis, high blood pressure, inflammation, heart diseases and as diuretic. The NLC lipid matrix is composed of a blend of a solid lipid and oil. NLC composed of physiological and biocompatible lipids, are considered as a versatile delivery system for different routes of administration. The aim of the present study was prepare and characterize NLC formulations containing a C-glycosyl flavonoid-rich *Cecropia pachystachya* Trécul leaf extract Therefore a study of the optimum conditions for extraction was performed and where 5% of drug and 20% ethanol were selected. From the optimization of the crude extract, a fraction enriched in C-glycosyl compounds was obtained. The lipidic dispersions containing standardized extract were prepared by microemulsion technique. An initial study was performed to select solid lipid, surfactant and co-solvent would be used in the formulation. Compritol® 888 ATO as lipid defined, with Tween® 80 and lecithin as surfactant, and propylene glycol as a co-solvent. A second experimental design was conducted to evaluate the effects of added amount of fraction enriched in the formulation, the time the pre-emulsion and final emulsion stirring, and stirring speed on particle size, polydispersity index (PDI), entrapment efficiency (EE%) and chemical-markers concentration of nanoparticles was evaluated. The average particle size ranged between 93 and 188 nm, with a polydispersity index for all formulations in the range of 0.3-0.4. High EE% values were obtained for all tested formulations. Loading was from 1.30%, influenced by the amount of enriched fraction of *C. pachystachya* added initially. *In vitro* skin permeation of enriched C-glycosyl flavonoids fraction was assessed using Franz diffusion cell and pig ear as membrane model. The quantity fraction enriched permeated through the skin after application of increased lipid nanocarriers in comparison with the free enriched fraction.

Keywords: *Cecropia pachystachya* Trécul; C-glycosyl flavonoids; nanotechnology; nanoparticles; nanostructured lipid carriers; topical administration

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	48
Equação 2	56
Equação 3	63
Equação 4	64
Equação 5	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul, conhecida popularmente como embaúba prateada.	36
Figura 2 Estruturas químicas dos flavonóides isoorientina (A) e isovitexina (B) presentes em <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul.	37
Figura 3 Estrutura cristalina da nanopartículas lipídicas sólidas e estrutura amorfa do nanocarreador lipídico.....	39
Figura 4 Estruturas descritas na literatura dos nanocarreadores lipídicos sólidos.	40
Figura 5. Diagrama esquemático da preparação de NLC utilizando o método de microemulsão.	44
Figura 6. Representação de uma secção transversal da pele humana que mostra as diferentes camadas e apêndices.	46
Figura 7. Diagrama das três vias de permeação através da pele: intracelular, intercelular e folicular. A região amplificada mostra o caminho percorrido pelo fármaco na via intracelular e intercelular.	47
Figura 8 Esquema da câmara de difusão tipo Franz.....	51
Figura 9 Gráfico dos resultados obtidos a partir de planejamento experimental para a resposta tamanho de partícula.	80
Figura 10 Cromatogramas da especificidade do método por CLAE. (A) nanocarreadores lipídicos brancos e (B) FECp	85
Figura 11 Gráfico referente à resposta teor do marcador químico ISOO nos sistemas nanoestruturados	89
Figura 12 Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) para os nanocarreadores lipídicos.....	91
Figura 13 Perfil de liberação do nanocarreador lipídico contendo FECp.	93

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Resumo dos componentes testados para a formação do nanocarreador lipídico contendo FECp.....	60
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros avaliados por meio de planejamento experimental para a obtenção das soluções extrativas de <i>C. pachystachya</i> pelo método de turbo-extração.....	58
Tabela 2. Programação da fase móvel para quantificação dos marcadores químicos isoorientina e isovitexina presentes no extrato bruto e fração enriquecida de <i>C. pachystachya</i> (FECp) por CLAE	60
Tabela 3 Composição dos nanocarreadores lipídicos contendo FECp preparadas com os lipídios sólidos monoestearato de glicerila (MEG) ou Compritol® ATO 888	62
Tabela 4. Planejamento experimental para preparação dos nanocarreadores lipídicos.....	63
Tabela 5 Resultados da padronização dos extratos obtidos por turbo-extração de <i>C. pachystachya</i>	73
Tabela 6 Teores dos marcadores químicos presentes no extrato bruto e FECp nas concentrações de 1,0 mg/mL e 0,5 mg/mL respectivamente	74
Tabela 7 Valores obtidos para o tamanho de partícula e índice de polidispersão a partir do estudo de seleção dos componentes para a produção dos nanocarreadores lipídicos (NCL)	77
Tabela 8 Termos do modelo significante, valores dos coeficientes de regressão e ANOVA (valores de p) para as respostas teor de marcador, EE%, tamanho de partícula, PDI obtidas a partir do desenvolvimento de nanocarreadores lipídicos sólidos contendo FECp usando o delineamento fatorial 2 ⁴	79
Tabela 9 Valores obtidos para o tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta dos nanocarreadores lipídicos (NCL). Fatores: (A) quantidade de fração enriquecida adicionada na formulação; (B) tempo de agitação da pré-emulsão; (C) tempo de agitação da emulsão final; (D) velocidade de agitação.	81
Tabela 10 Resultados obtidos na análise da linearidade para o marcador ISOO pelo método de CLAE	83
Tabela 11 Limites de quantificação e detecção obtidos para a validação do método por CLAE para o marcador ISOO	84

Tabela 12 Resultados obtidos na análise de precisão intermediária referente às concentrações teóricas (a) 2 µg/mL, (b) 5 µg/mL e (c) 10 µg/mL	86
Tabela 13 Dados de repetibilidade na concentração teórica de 10 µg/mL	86
Tabela 14 Valores obtidos para a eficiência de encapsulação e teor de marcador dos nanocarreadores lipídicos (NCL) após planejamento experimental.....	88
Tabela 15 Comparação das respostas das formulações teóricas e experimental otimizadas	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
EE%	Eficiência de encapsulação
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FECp	Fração enriquecida de <i>C. pachystachya</i>
ICH	<i>International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>
ISOO	Isoorientina
ISOV	Isovitexina
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MEG	Monoestearato de glicerila
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MPV	Matéria-prima vegetal
NCL	Nanocarreador lipídicos
NLS	Nanopartículas lipídicas sólidas
PDI	Índice de polidispersão
Q24	Quantidade de isoorientina permeada
RhEGF	Fator de crescimento transdérmico recombinante
RS	Resíduo seco

SUMÁRIO

SUMÁRIO25

1	INTRODUÇÃO.....	30
2	OBJETIVOS.....	34
2.1	OBJETIVO GERAL	34
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
3	REVISÃO DA LITERATURA	35
3.1	<i>CECROPIA PACHYSTACHYA</i> TRÉCUL.	35
3.1.1	Composição química.....	36
3.1.2	Aspectos biológicos.....	37
3.2	SISTEMAS NANOPARTICULADOS	38
3.2.1	Nanocarreadores lipídicos.....	38
3.2.1.1	Nanocarreadores lipídicos para administração tópica.....	41
3.2.2	Métodos de preparação dos nanocarreadores lipídicos sólidos.....	42
3.2.2.1	Homogeneização à alta pressão	42
3.2.2.2	Difusão e evaporação de solvente	42
3.2.2.3	Dispersão por ultrassom.....	43
3.2.2.4	Dupla emulsão	43
3.2.2.5	Técnica de microemulsão a quente	43
3.3	PELE.....	44
3.4	TRANSPORTE DE FÁRMACOS ATRAVÉS DA PELE	46
3.4.1	Fatores que influenciam a permeação.....	48
3.5	MODELOS PARA AVALIAÇÃO DA PERMEACÃO CUTÂNEA DE FÁRMACOS	49
3.5.1	Metodologia de estudo <i>ex vivo</i> para permeação cutânea	50

4	MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1	MATERIAIS	55
4.1.1	Matérias-primas.....	55
4.1.2	Solventes	55
4.1.3	Equipamentos.....	55
4.2	MÉTODOS.....	56
4.2.1	Aquisição e beneficiamento da matéria-prima vegetal (MPV)	56
4.2.1.1	Aquisição do material vegetal	56
4.2.1.2	Moagem e acondicionamento do material vegetal.....	56
4.2.1.3	Caracterização da MPV	57
	<i>Perda por dessecação</i>	<i>57</i>
	<i>Determinação do teor de extrativos.....</i>	<i>57</i>
4.2.2	Obtenção e caracterização das soluções extrativas.....	58
4.2.2.1	Preparo das soluções extrativas	58
4.2.2.2	Determinação do resíduo seco (RS).....	58
4.2.3	Preparação e caracterização do extrato seco e fração enriquecida em flavonóides de <i>C. pachystachya</i>	59
4.2.3.1	Secagem das soluções extrativas	59
4.2.3.2	Obtenção de fração enriquecida de <i>C. pachystachya</i>	59
4.2.3.3	Quantificação dos marcadores químicos	60
4.2.4	Estudos preliminares da formulação	60
4.2.4.1	Seleção dos componentes da formulação	61
4.2.4.2	Técnica de microemulsão utilizada no estudo preliminar de formulação	62
4.2.5	Desenvolvimento e caracterização de sistema nanoestruturado lipídico	63
4.2.5.1	Preparação dos nanocarreadores lipídicos (NCL).....	63
4.2.5.2	Tamanho de partícula e índice de polidispersão (PDI).....	63

4.2.5.3	Potencial zeta	63
4.2.5.4	Determinação da eficiência de encapsulação (EE%) e teor de ISOO nos nanocarreadores.....	64
4.2.5.5	Validação da técnica de quantificação dos marcadores químicos nos nanocarreadores por cromatografia líquida de alta eficiência	64
4.2.5.6	Avaliação da morfologia.....	66
4.2.6	Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> dos nanocarreadores lipídicos em tampão fosfato salino pH 7,4	66
4.2.6.1	Avaliação da solubilidade de FECp em tampão fosfato salino pH 7,4.....	66
4.2.6.2	Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> da FECp a partir do nanocarreador lipídico	66
4.2.7	Avaliação da penetração cutânea <i>ex vivo</i> em célula de Franz	67
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL	71
5.1.1	Perda por dessecação.....	71
5.1.2	Teor de extrativos	71
5.2	OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO EXTRATIVO.....	72
5.2.1	Obtenção e análise das soluções extrativas	72
5.2.2	Obtenção e análise quantitativa do extrato seco e da fração enriquecida em flavonoides de <i>C. pachystachya</i> (FECp).....	73
5.3	SELEÇÃO DOS COMPONENTES PARA PREPARAÇÃO DOS NANOCARREADORES LIPIDICOS SÓLIDOS....	74
5.4	ESTUDO DE FORMULAÇÃO DOS NANOCARREADORES POR DELINEAMENTO ESTATÍSTICO FATORIAL	77

5.4.1	Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta dos nanocarreadores.....	80
5.4.2	Validação de metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação dos marcadores químicos ISOO e ISOV incorporados aos sistemas nanoestruturados.....	82
5.4.3	Determinação da eficiência de encapsulação e teor do marcador químico ISOO nos nanocarreadores por CLAE.....	87
5.4.4	Otimização dos nanocarreadores lipídicos a partir do estudo de formulação.....	90
5.4.5	Avaliação da morfologia.....	91
5.5	AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO DO NANOCARREADOR LIPÍDICO.....	91
5.5.1	Solubilidade da FECp em tampão fosfato salino pH 7,4	91
5.5.2	Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do sistema nanoestruturado.....	92
5.5.3	Avaliação do estudo de permeação.....	93
6	CONCLUSÕES.....	99
	REFERÊNCIAS.....	103

INTRODUÇÃO

Introdução geral – Revisão da literatura - Objetivos

1 INTRODUÇÃO

As plantas possuem uma longa história de uso pelo homem. A busca por cura de doenças a partir de ervas é considerada uma das primeiras formas da utilização de produtos naturais. Os primeiros registros da utilização destas plantas com alguma finalidade terapêutica, datam de cerca de 2600 a.C. na Mesopotâmia (CRAGG; NEWMAN, 2013; MODOLO et al., 2015).

O número de espécies de plantas encontradas na natureza com alguma atividade farmacológica é vasto, portanto estas se tornaram uma grande fonte de interesse para a indústria farmacêutica (VIEGAS et al., 2006).

Cecropia pachystachya Trécul é uma espécie pertencente ao gênero *Cecropia* sp, e destaca-se pelo seu extensivo uso popular., sendo amplamente distribuída na América Latina e no Brasil, onde ocorre principalmente no sul e sudeste do país (COSTA et al., 2011).

Como principais constituintes químicos esta espécie apresenta diversos compostos oriundos do metabolismo secundário, entre eles terpenóides, esteroides, compostos fenólicos, catequinas e procianidinas. Especificamente em relação à classe dos compostos fenólicos destacam-se os flavonóides tipo C-glicosídeos, principalmente isoorientina e isovitexina (LIMA-LANDMAN et al., 2007).

Na medicina popular *C. pachystachya* é utilizada na forma de infusão para o tratamento de problemas respiratórios como tosse, asma e bronquite, além de serem empregados como anti-inflamatório e diurético (PIO, 1978; ARAGÃO et al., 2010). Estudos comprovaram que essa espécie possui ainda atividade hipotensora (ALMEIDA et al., 2006), hipoglicemiante e antioxidante (ARAGÃO et al., 2010) diurética (CONSOLINI; MIGLIORI, 2005), sedativa e cardiotônica (CONSOLINI et al., 2006), ansiolítica e antidepressiva (COSTA et al., 2011) antinociceptiva e antitumoral (SCHINELLA et al., 2008; DE OLIVEIRA ARAGÃO et al., 2013).

Os efeitos anti-inflamatórios de extratos metanólicos das folhas de *C. pachystachya* demonstrados no modelo de redução do edema de pata de rato podem ser comparados aos efeitos de corticóides, como dexametasona (SCHINELLA et al., 2008; DE OLIVEIRA ARAGÃO et al., 2013).

Estes resultados indicam que o desenvolvimento de formulações de uso tópico contendo *C. pachystachya*, capazes de penetrar o extrato córneo, podem constituir uma interessante alternativa no tratamento de processos inflamatórios da pele.

A administração de fármacos apresenta como vantagens evitar grandes flutuações nos níveis plasmáticos, impedir a metabolização de primeira passagem através do fígado e o desconforto do paciente com administrações invasivas como injeções, de forma que este tipo de administração vem ganhando cada vez mais atenção. Apesar das grandes vantagens que o tratamento pela via tópica apresenta, a adequada penetração cutânea das substâncias ativas a partir da camada córnea ainda é um grande desafio. O estrato córneo representa a principal barreira protetora do organismo, tanto para a perda de água, quanto contra danos. Com isso, formas farmacêuticas convencionais, tem mais dificuldade em alcançar as camadas mais profundas da pele, e apenas concentrações subterapêuticas são permeadas, tornando as terapias ineficientes (SCHÄFER-KORTING et al., 2007).

A pesquisa e o desenvolvimento de novos sistemas para contornar esses problemas é uma necessidade que se impõe àqueles envolvidos com a pesquisa e desenvolvimento de medicamentos. Desta forma, estratégias para aumentar a permeação cutânea vêm sendo propostas, tanto no sentido de atingir camadas mais profundas da pele como visando uma absorção percutânea.

Entre os sistemas capazes de melhorar as características de sistemas farmacêuticos para administração tópica, destacam-se os sistemas nanoestruturados, que são caracterizados por apresentar tamanhos na faixa de 10 e 1000 nanômetros.

O tamanho nanométrico desses sistemas os torna adequados para importantes aplicações farmacêuticas, devido à sua grande área superficial. Entre as vantagens destes sistemas destacam-se o direcionamento do fármaco ao local de ação, aumento da concentração de fármaco nos tecidos, e obtenção de perfis de liberação sustentada (SCHÄFER-KORTING et al., 2007)

Entre os sistemas nanoestruturados com potencial para aplicação tópica destacam-se os nanocarreadores lipídicos (NLC), que são constituídos por uma mistura de um óleo e um lipídio sólido, ambos fisiológicos e biodegradáveis, por consequência estes sistemas exibem baixa toxicidade. Os lipídios utilizados como base para preparação dos NLC incluem triglicerídeos, glicerídeos parciais, ácidos graxos, esteroides e ceras. Quando comparados a outros tipos de sistemas nanoestruturados lipídicos, os NLC destacam-se pela alta capacidade de carga da substância ativa, característica que tem sido atribuída à sua estrutura desorganizada pela presença do lipídio líquido (TIWARI; PATHAK, 2011).

A utilização dos sistemas lipídicos nanoestruturados, com seu reconhecido potencial de melhoria do perfil biofarmacêutico, parece ser uma estratégia bastante promissora no transporte de substância através da pele. No caso de drogas vegetais, devido à sua inerente complexidade, esta associação pode ser particularmente benéfica. Neste sentido, este trabalho tem como objetivo desenvolver e caracterizar nanocarreadores lipídicos contendo extrato padronizado de *C. pachystachya* e com isso obter um produto fitoterápico de aplicação tópica com atividade anti-inflamatória.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar um sistema nanoparticulado lipídico contendo extrato padronizado de *Cecropia pachystachya* Trécul com vistas a obter um produto fitoterápico de uso tópico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar e caracterizar extratos padronizados de *C. pachystachya* visando obter máxima concentração de compostos fenólicos, especialmente flavonoides C-glicosídicos (isoorietina e isovitexina);

- Realizar estudo de pré-formulação para estabelecer a composição mais adequada das nanopartículas lipídicas contendo os extratos padronizados desenvolvidos;

- Desenvolver nanopartículas lipídicas contendo os extratos padronizados de *C. pachystachya*;

- Caracterizar os sistemas lipídicos nanoestruturados quanto à morfologia, tamanho de partícula, polidispersão e eficiência de encapsulação;

- Avaliar a cinética de liberação *in vitro* dos marcadores químicos a partir das nanopartículas;

- Avaliar o perfil de permeação cutânea *ex vivo* do sistema nanoestruturado utilizando células de difusão tipo Franz.

3 REVISÃO DA LITERATURA

O uso de produtos naturais para produção de medicamentos é reconhecidamente uma fonte inesgotável. Mesmo após o uso de tecnologias para descobertas de moléculas sintéticas, associado ao baixo investimento na área de fitoterápicos, estes continuam a ter uma porcentagem importante em relação a todos os medicamentos prescritos (UCHÔA et al., 2010).

A flora brasileira possui uma grande diversidade de plantas que apresentam alguma atividade farmacológica (DI STASI et al., 2002), muitas destas com um potencial considerável baseado na ampla utilização popular, o que justifica o crescente número de estudos envolvendo plantas nos últimos anos (BIGLIANI et al., 2010). Devido a essa grande diversidade o Brasil é um grande fornecedor mundial de matéria-prima vegetal para o mercado farmacêutico (BRANDÃO et al., 2008)

O gênero *Cecropia* sp., pertencente à família Urticaceae é composto por aproximadamente 75 espécies, com ampla distribuição na América Latina, especialmente na Argentina, Brasil, México e Paraguai (DE OLIVEIRA ARAGÃO et al., 2013). Para aplicação na medicina popular do gênero *Cecropia* destacam-se o uso de suas folhas, cascas e brotos.

No Brasil, este gênero é popularmente conhecido como embaúba, imbaúba, umbaúba e embaúva, derivados da palavra “ambaíva”, que em Tupi significa tronco oco (CONSOLINI et al., 2006). No nosso país, as espécies mais abundantes são *C.glaziovii*, *C. hololeuca*, *C. leucócoma*, *C. lyratiloba*, *C. obtusa*, *C. pachystachya* e *C. scabra* (TANAE et al., 2007).

3.1 *Cecropia pachystachya* Trécul.

A *Cecropia pachystachya* Trécul. ocorre em diferentes ecossistemas do Brasil, como a Mata Atlântica e Pantanal, sendo mais comumente encontrada no sul e sudeste do país (COSTA et al., 2011). Conhecida também como embaúba-prateada devido à coloração prata da parte inferior das folhas (Figura 1), suas árvores apresentam aproximadamente 7 metros de altura, bem menores que outras espécies desse gênero, que podem chegar a 20 metros de altura. Devido à rapidez do seu crescimento é útil nos reflorestamentos além de suas folhas

serem muito apreciadas pelo bicho-preguiça e os frutos pelos pássaros (JORGE et al., 1998)

Figura 1. *Cecropia pachystachya* Trécul, conhecida popularmente como embaúba prateada.

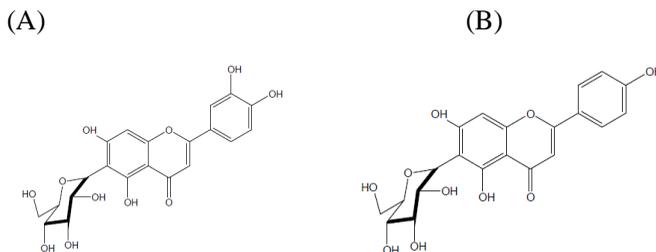


Fonte: COSTA (2009)

3.1.1 Composição química

Em relação à constituição química de *C. pachystachya* são descritos uma grande diversidade de compostos oriundos do metabolismo secundário da planta, entre eles terpenoides, esteroides, compostos fenólicos, catequinas e procianidinas, presentes em diferentes extratos de suas folhas. Especificamente em relação aos flavonoides, destacam-se os flavonoides tipo C-glicosídeos isoorientina (ISOO) e isovitexina (ISOV), apresentados na Figura 2, sendo estes os constituintes majoritários (LACAILLE-DUBOIS et al., 2001; ARAGÃO et al., 2010; COSTA et al., 2011)

Figura 2 Estruturas químicas dos flavonóides isoorientina (A) e isovitexina (B) presentes em *Cecropia pachystachya* Trécul.



Fonte: Ortmann (2013)

3.1.2 Aspectos biológicos

Os estudos farmacológicos descritos para *C. pachystachya* em geral são de investigação pré-clínica e mostram que a espécie possui atividade hipotensora (ALMEIDA et al., 2006), hipoglicemiante e antioxidante (ARAGÃO, D. M. O. et al., 2010), diurética (CONSOLINI; MIGLIORI, 2005), sedativa e cardiotônica (CONSOLINI et al., 2006).

Estudos realizados por Schinella e colaboradores (2008) demonstraram que o extrato diclorometano das folhas de *C. pachystachya*, reduziu significativamente o edema induzido por carragenina na pata de ratos.

Recentemente, Aragão e colaboradores (2012) investigaram a atividade anti-inflamatória de extratos metanólicos da espécie e demonstraram que a redução do edema pela via tópica foi semelhante ao da dexametasona.

Extratos metanólicos de *C. pachystachya* apresentaram atividade inibitória sobre a peroxidação lipídica microsossomal de ratos em uma concentração mais baixa do que a necessária para inibir as atividades enzimáticas da peroxidação não lipídica. Esta atividade foi atribuída a um efeito inibitório de algumas isoenzimas do citocromo P450, e a uma ação sequestradora de radicais livres (VELÁZQUEZ et al., 2002; ARAGÃO, D. M. O. et al., 2010).

3.2 SISTEMAS NANOPARTICULADOS

A efetividade das terapias utilizando substâncias ativas não depende somente de se comprovar que determinada substância possui atividade. Alguns aspectos biofarmacêuticos, como concentração insuficiente devido à má absorção, metabolismo e eliminação rápidos, distribuição para outros tecidos, combinados com elevada toxicidade e baixa solubilidade condicionam a obtenção de um tratamento eficiente. Com isso novos sistemas carreadores de fármacos vêm sendo desenvolvidos para contornar esses problemas. Para tanto, são requeridas algumas características a esses sistemas, como adequada encapsulação da substância ativa, inexistência de toxicidade, controle de liberação a alvos específicos, estabilidade durante o tempo de armazenagem e possibilidade de escalonamento (MEHNERT; MÄDER, 2001)

Os sistemas carreadores coloidais têm atraído à atenção nos últimos anos, pois constituem uma estratégia interessante para a melhoria do perfil biofarmacêutico de substâncias terapêuticamente ativas. Apresentam a vantagem de reduzir o número de doses diárias do medicamento, diminuir a toxicidade, solubilizar ativos lipofílicos e hidrofílicos, promover a manutenção da concentração plasmática em níveis terapêuticos e liberar o fármaco no alvo de ação, além de favorecer a adesão do paciente ao tratamento entre outras vantagens (MEHNERT; MÄDER, 2001)

Na área farmacêutica, o termo “nanopartícula” refere-se a sistemas coloidais com tamanho entre 10-1000 nanômetros (HAMIDI et al., 2008). Existe uma variedade de materiais utilizados para preparação de nanopartículas na área farmacêutica como proteínas, polissacarídeos, polímeros sintéticos, lipídios sólidos e líquidos. A escolha desses componentes vai depender de que tipo de características o sistema deve possuir, como tamanho de partícula requerido, estabilidade, biocompatibilidade etc (MOHANRAJ; CHEN, 2006).

3.2.1 Nanocarreadores lipídicos

Os nanocarreadores lipídicos (NCL), conhecidos como a segunda geração das nanopartículas lipídicas, têm despertado grande interesse nos últimos anos como carreadores coloidais. NCL surgiram a partir das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e são compostos por uma mistura de um lipídio no estado sólido com um lipídio líquido. Esta mistura de moléculas de lipídios diferentes proporciona uma partícula com uma

estrutura com mais imperfeições, se comparada com as NLS (OBEIDAT et al., 2010; ADITYA et al., 2014). Justamente neste ponto reside o interesse da obtenção desta segunda geração de nanopartículas lipídicas, pois a introdução de um lipídio líquido na estrutura da partícula resulta na produção de partículas sólidas, mas não cristalinas, como pode ser observado na Figura 3 (MÜLLER et al., 2002). A partir desta estrutura mais amorfa, os NCL têm a capacidade de ultrapassar as desvantagens conhecidas das NLS, como baixa eficiência de encapsulação devido à formação altamente ordenada do lipídio sólido, o que, após a recristalização, limita os espaços para o fármaco acomodarse, além da expulsão deste durante a estocagem causada pelo polimorfismo do lipídio (MÜLLER et al., 2007; TIWARI; PATHAK, 2011).

Figura 3 Estrutura cristalina da nanopartículas lipídicas sólidas e estrutura amorfa do nanocarreador lipídico.



Fonte: Adaptado de Müller, R. H. et al., (2007)

A partir da adição adequada do lipídio líquido na formulação há a formação de compartimentos de óleo no sistema. Em geral, a solubilidade dos fármacos é maior em óleos, se comparado aos lipídios sólidos, portanto a quantidade de fármaco que se pode acrescentar no sistema é maior, aumentando assim a eficiência de encapsulação dos nanocarreadores. (MÜLLER et al., 2002)

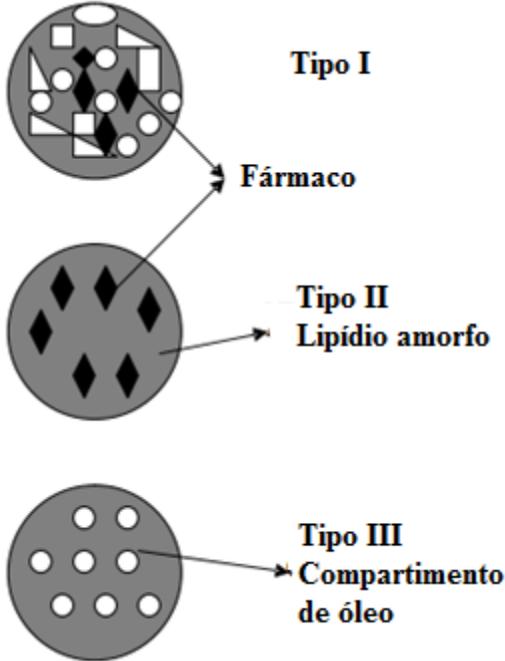
Diferentes tipos de estruturas podem ser obtidas variando-se a composição lipídica e o processo de preparação dos nanocarreadores. Para os NCL três estruturas foram propostas na literatura (Figura 4) (TAMJIDI et al., 2013):

Tipo I: é constituído por uma estrutura cristalina apresentando imperfeições; este formato é obtido quando uma pequena quantidade de óleo é acrescentada à matriz sólida;

Tipo II: é constituído por uma matriz amorfa; este modelo é possível através da utilização de lipídios que não recristalizam, como por exemplo, o isopropilmiristato.

Tipo III: conhecido como modelo múltiplo, onde pequenos compartimentos de lipídio líquido se formam dentro da matriz sólida; este modelo pode ser obtido quando a proporção de lipídio líquido excede a sua solubilidade no lipídio sólido

Figura 4 Estruturas descritas na literatura dos nanocarreadores lipídicos sólidos.



Fonte: Adaptado de Tamjidi et al., (2013)

Em geral os lipídios utilizados para a preparação dos nanocarreadores são fisiológicos, e com isso há uma diminuição no perigo da toxicidade aguda e crônica. Entre as classes de lipídios mais descritos na literatura destacam-se triglicerídeos (por exemplo, triestearina), glicerídeos parciais (por exemplo, monoestearato de glicerila), ácidos graxos (por exemplo, ácido esteárico), esteróides (por exemplo, colesterol) e ceras (por exemplo, palmitato de cetila). Com isso, estes sistemas têm demonstrado grande potencial terapêutico para vários fármacos e vias de administração, como as vias dérmica, oral e parenteral (DATE et al., 2011).

3.2.1.1 Nanocarreadores lipídicos para administração tópica

Devido a seus vários efeitos desejáveis sobre a pele os NCL tem se tornado muito atraentes para aplicações sobre a pele, inclusive pelas danificadas ou inflamadas, principalmente por sua composição baseada em lipídios biocompatíveis (WISSING; MÜLLER, 2003). Entre as características que garantem a eficiência dos nanocarreadores para a via tópica destaca-se o tamanho de partícula, pois seu tamanho reduzido assegura elevada aderência ao estrato córneo, aumentando assim a quantidade de fármaco encapsulado que penetra na pele. Devido às propriedades oclusivas apresentadas por estas nanopartículas, uma maior hidratação da pele é observada, favorecendo a penetração cutânea. Além disso, as nanopartículas obtidas a partir de lipídios são capazes de melhorar a estabilidade química de compostos sensíveis à luz, oxidação e hidrólise (PUGLIA et al., 2008)

Inúmeros trabalhos descrevem o interesse dos NCL no aumento da penetração de fármacos através da pele. Junyaprasert e colaboradores (2009) prepararam NCL da coenzima Q10 pela técnica de homogeneização a alta pressão, usando Precifac[®] (palmitato de cetila) como lipídio, Miglyol[®] 812 (triglicerídeos de ácido caprico/ caprilico) como óleo e Tego[®] Care 450 (poligliceril 3-metilglucose diestearato) como estabilizante. Os ensaios de permeação foram conduzidos em célula de difusão do tipo Franz, usando pele humana como modelo de membrana. Os autores evidenciaram um aumento significativo do efeito oclusivo e da permeação da quantidade de fármaco com o uso do NCL, em comparação com a nanoemulsão.

Gainza e colaboradores (2015) desenvolveram NCL contendo fator de crescimento epidérmico recombinante (rhEGF) a partir Precirol[®] ATO 5 e Miglyol[®] 812, utilizando como estabilizantes uma combinação de Poloxamer e Tween[®] 80. A redução do tempo de cicatrização de feridas crônicas foi avaliada e, demonstraram um aumento da porcentagem de feridas fechadas em comparação com o de rhEGF livre e a formulação branca de NCL.

Pathak e colaboradores (2009) observaram o efeito de liberação sustentada a partir de NCL. Os autores prepararam e caracterizaram NLC contendo lidocaína, utilizando como método de preparação a dispersão a quente. Para os estudos de permeação foi utilizada como membrana modelo pele de porco, em células de difusão tipo Franz. Os resultados mostraram que o efeito anestésico do fármaco foi aproximadamente 5 vezes maior que aquele produzido após aplicação do gel comercial de Xylocaína[®].

3.2.2 Métodos de preparação dos nanocarreadores lipídicos sólidos

O método de preparação dos sistemas nanoestruturado é um fator determinante para as suas características físico-químicas, tais como tamanho polidispersão e morfologia, o que, em contrapartida influencia diretamente a encapsulação e liberação do fármaco (ROSCA et al., 2004).

De maneira geral, as técnicas descritas na literatura para preparação dos nanocarreadores lipídicos são semelhantes às utilizadas para preparação de nanopartículas lipídicas, diferindo apenas na adição do lipídio líquido na formulação.

Entre os métodos descritos para produção de NCL destacam-se a homogeneização à alta pressão, a difusão e evaporação de solvente, a dispersão por ultrassom, a dupla emulsão e a microemulsão a quente (PARDEIKE et al., 2009).

3.2.2.1 Homogeneização à alta pressão

A técnica de homogeneização à alta pressão é uma das mais utilizadas na literatura para obtenção de NCL. Na homogeneização à alta pressão uma dispersão de partículas é submetida a uma pressão elevada (100-2000 bar) através de uma abertura estreita, em uma curta distância e com alta velocidade, ao encontro de uma barreira para formação dos sistemas. Esta técnica pode ser realizada a altas temperaturas (homogeneização a quente) ou a temperatura ambiente (homogeneização a frio). Com esta técnica é possível trabalhar com altas concentrações de lipídio e, geralmente, a distribuição de tamanho de partículas em uma faixa muito estreita é obtida (índice de polidispersão inferior a 0,2). Equipamentos específicos para a execução da mesma estão disponíveis comercialmente (MEHNERT; MÄDER, 2001)

3.2.2.2 Difusão e evaporação de solvente

O método de difusão e evaporação de solvente foi primeiramente desenvolvido para a preparação de nanopartículas com polímeros sintéticos. Este método é simples e não requer nenhum equipamento especial. Nesta técnica os lipídios são dissolvidos em um solvente orgânico imiscível com água (por exemplo, ciclo-hexano), que está

emulsionado na fase aquosa. Após a evaporação do solvente, geralmente sob pressão reduzida, a dispersão de nanopartículas é formada por precipitação do lipídio no meio aquoso. A utilização de solvente orgânico e a dificuldade de produzir partículas em larga escala são citadas como desvantagens desse método (MEHNERT; MÄDER, 2001; HU et al., 2006).

3.2.2.3 Dispersão por ultrassom

Esta técnica foi inicialmente utilizada para a produção de nanopartículas lipídicas sólidas. Esta técnica é baseada na quebra da fase interna de uma emulsão pré-formada pela produção de ondas sonoras alternadas de pressões altas e baixas geradas pelo ultrassom (irradiação ultrassônica). Apesar de ser um método simples, tem como desvantagem a obtenção de formulações com distribuição de tamanho bimodal na faixa de micrometros. A utilização de sonda de ultrassom pode ocasionar a contaminação por metal, o que constitui uma das principais limitações desta técnica (MÄDER; MEHNERT, 2005).

3.2.2.4 Dupla emulsão

O método de dupla emulsão é a técnica mais utilizada para fármacos hidrofílicos. Este método consiste basicamente na preparação de uma emulsão em três fases água/óleo/água (A/O/A). A dupla emulsão é um sistema complexo constituído de gotículas da fase aquosa interna dispersas dentro de gotículas maiores de fase orgânica, as quais são dispersas em uma fase aquosa externa (MARTINS et al., 2007).

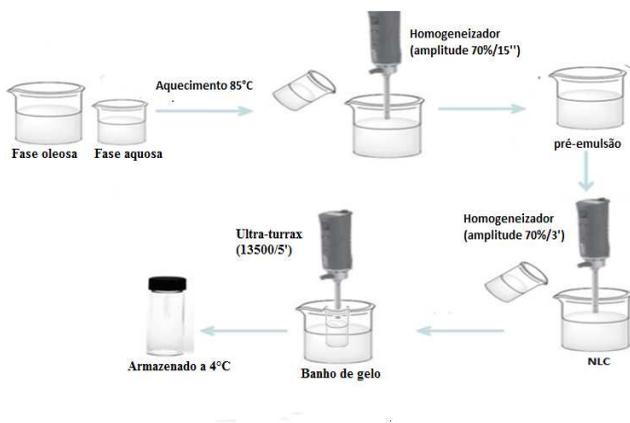
3.2.2.5 Técnica de microemulsão a quente

O método de microemulsão foi desenvolvido inicialmente por Gasco e colaboradores (1993). Para a formação dos sistemas a partir dessa técnica, além dos lipídios que compõem a fase lipídica, é necessária a utilização de tensoativo e, na maioria dos casos, um co-tensoativo, além da água como fase dispersante. Nesta técnica, uma mistura de lipídios fundida a uma temperatura acima da de fusão do lipídio sólido é vertida sobre uma fase aquosa aquecida a mesma temperatura. Esta pré-emulsão óleo-em-água ainda quente é vertida em um volume de água gelada (2-5 °C), seguida de forte agitação e

posterior redução do volume (MÜLLER et al., 2000; MEHNERT; MÄDER, 2001).

Os lipídios que compõem a formulação devem apresentar baixo ponto de fusão, para que quando a fase interna do sistema entrar em contato com a água gelada, as nanogotas lipídicas cristalizem imediatamente, formando os nanocarreadores (WISSING et al., 2004). O processo de formação das microemulsões está esquematizado na Figura 5.

Figura 5. Diagrama esquemático da preparação de NLC utilizando o método de microemulsão.



Fonte: O autor

3.3 PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano, com uma área aproximada de 2 m^2 , com a função principal de estabelecer o contato entre nosso corpo e o ambiente externo. Além de impedir a perda de água e a entrada de matérias estranhas no organismo, também exerce proteção física, química e imunológica, defesa contra patógenos, radiação UV e radicais livres, e ainda é responsável pela termorregulação (HARDING, 2004). Por apresentar uma grande área superficial, a administração tópica exibe um grande potencial para aplicação de fármacos, com a vantagem de conseguir contornar problemas encontrados na administração oral como metabolismo de

primeira passagem e a ação de enzimas e pH extremos característicos do trato gastrointestinal, desta forma contribuindo para a melhora da biodisponibilidade (ZHAI; ZHAI, 2014). Além disso, permite a entrega controlada de fármacos com conforto para o paciente, quando comparada com outras vias de administração (BOLZINGER et al., 2012).

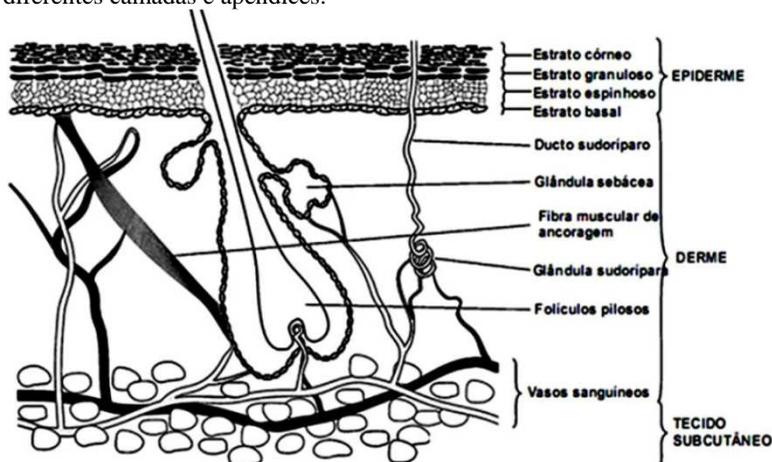
A pele apresenta-se subdividida basicamente em 3 camadas distintas: a epiderme, a derme e a hipoderme, contendo ainda como anexos os folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas. Nos estudos de permeação, a derme e a epiderme merecem mais atenção, uma vez que a hipoderme é constituída basicamente de células adiposas e não tem um papel relevante neste sentido (BAROLI, 2010)

A derme, a camada mais profunda da pele com espessura em torno de 3-5 mm, fornece suporte mecânico para a pele. É irrigada pela circulação sanguínea, portanto substâncias que atingem esta camada podem atingir a circulação sistêmica. É composta por proteínas fibrosas (colágeno e elastina) e um gel interfibrilar de glicosaminoglicanas, sais e água, apresentando, dessa forma, um caráter essencialmente hidrofílico. Os anexos da pele como, folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas encontram-se na derme (EL MAGHRABY et al., 2008).

A epiderme possui em torno de 50-100 μm de espessura e é a camada mais superficial da pele. Seu epitélio é do tipo escamoso estratificado, sendo os queratinócitos as células em maior número nessa região. É dividida em 5 camadas, sendo estas definidas pela posição morfológica e estado de diferenciação dos queratinócitos. A primeira, conhecida como camada basal, é a mais profunda e encontra-se em contato com a derme por meio dos hemidesmossomos e seguida da camada espinhosa, a qual é composta por células cúbicas ou achatadas que formam junções celulares umas com as outras e possuem grande quantidade de desmossomos, conferindo aspecto espinhoso a essa região. A camada granulosa é composta por células achatadas contendo grânulos de queratohialina, adquirindo maior concentração de queratina na porção superior. A camada lúcida composta por células achatadas, hialinas e eosinófilas, está presente apenas em regiões específicas do organismo mais suscetíveis a atrito, como planta dos pés e palmas das mãos. Por último, a camada córnea, também denominada de estrato córneo, que fica em contato com o ambiente externo. Devido ao processo de descamação, a epiderme encontra-se em constante autorrenovação, onde a perda das células da superfície do estrato córneo é compensada pelo crescimento de células na camada basal (BARRY, 1983; MENON, 2002; BAROLI, 2010; ZHAI; ZHAI, 2014).

A camada mais externa da epiderme, o estrato córneo, constitui uma das principais barreiras à penetração de fármacos, justamente por ter como função regular o fluxo de compostos químicos e água entre o ambiente e o organismo. Com 15 a 20 camadas de células, o estrato córneo é composto basicamente por corneócitos (queratinócitos terminalmente diferenciados) e células mortas (anucleadas), alongadas e planas. Os corneócitos estão localizados em uma matriz intercelular constituída por bicamadas lipídicas contendo ácidos graxos, ceramidas, fosfolipídeos, triglicerídeos e colesterol. A estrutura do estrato córneo é muitas vezes exemplificada como um arranjo de tijolos e argamassa, onde os corneócitos (tijolos) são incorporados na matriz rica em lipídios intercelulares (argamassa) (EL MAGHRABY et al., 2008). Na figura 6 é possível observar as várias camadas da pele.

Figura 6. Representação de uma secção transversal da pele humana que mostra as diferentes camadas e apêndices.



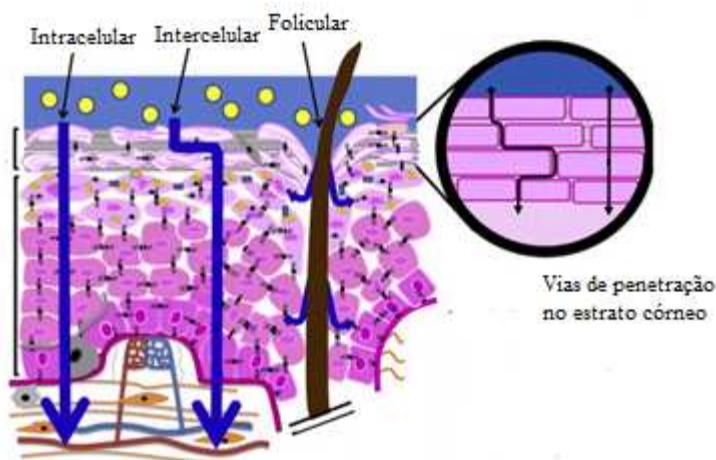
Fonte: Adaptado de El. Maghraby et al. (2008)

3.4 TRANSPORTE DE FÁRMACOS ATRAVÉS DA PELE

Com relação ao transporte de fármacos e outras moléculas a partir da superfície da pele até as camadas mais profundas, três vias principais são conhecidas: transporte folicular, no qual o fármaco permeia pelos apêndices; transporte intracelular, em que o fármaco passa através das células; e transporte intercelular, que acontece por entre as células. (Figura 7).

A via folicular é considerada menos importante, pois a fração do corpo coberta por pelos é pequena, estando em torno de 0,1%. Esta rota é mais interessante para transporte de íons e moléculas polares, já que essas têm maior dificuldade em cruzar o estrato córneo intacto, que tem um caráter bastante lipofílico (SCHÄFER-KORTING et al., 2007; BOLZINGER et al., 2012).

Figura 7. Diagrama das três vias de permeação através da pele: intracelular, intercelular e folicular. A região amplificada mostra o caminho percorrido pelo fármaco na via intracelular e intercelular.



Fonte: Adaptado de Bolzinger et al. (2012)

Sabe-se que a via intercelular se sobrepõe à via intracelular, ou seja, a molécula preferencialmente difunde por entre as células da camada lipídica lamelar (HARDING, 2004). Devido às suas características físico-químicas diferenciadas, o estrato córneo possui afinidade, tanto por moléculas hidrofílicas (em menor grau) devido à matriz de queratina, quanto lipofílicas devido às demais estruturas. Portanto, fármacos hidrofóbicos penetram pela via intercelular, enquanto que as moléculas hidrofílicas pela via intracelular através dos corneócitos (BOLZINGER et al., 2012).

3.4.1 Fatores que influenciam a permeação

Além da polaridade das substâncias, outras características podem influenciar a difusão passiva do fármaco através das camadas do estrato córneo. Três parâmetros físico-químicos foram identificados relativos ao fármaco:

Massa molar: a massa molar é o fator que determina o coeficiente de difusão da molécula, e deve estar abaixo de 500 Da para que a substância seja bem absorvida;

Ligações de hidrogênio: estudos sugerem que o número de doadores e de receptores de hidrogênio é determinante para a difusividade da molécula no estrato córneo, pois tem como função controlar as interações com a superfície dos corneócitos;

Coefficiente de partição: o coeficiente de partição ($\log P$) refere-se à partição estrato córneo-água e também tem influência no estudo de permeação. Quanto mais baixo o valor de $\log P$, mais hidrofílica é a molécula contribuindo assim para uma baixa absorção transdérmica, já que moléculas lipofílicas apresentam maior afinidade pelos componentes da pele (LIU et al., 2011; BOLZINGER et al., 2012).

Com relação ao estrato córneo algumas características devem ser levadas e conta para se obter uma boa permeação (AULTON, 2005).

Hidratação da pele: a hidratação é um dos fatores mais importantes para o aumento da permeabilidade da pele, pois quando a água satura a pele, ocorre à diminuição da resistência do estrato córneo, provavelmente provocada pelo intumescimento das estruturas dos corneócitos além da criação de canais aquosos;

Temperatura: o efeito da temperatura é pequeno se comparado ao da hidratação, sabe-se que o coeficiente de difusão decresce com a diminuição da temperatura;

pH: o pH afeta o grau de ionização das moléculas e, embora moléculas não ionizadas passem mais facilmente através das membranas lipídicas, moléculas ionizadas também podem penetrar o estrato córneo. Moléculas ionizadas apresentam maior concentração do que as neutras quando em solução saturada ou próxima da saturação, portanto acabam exercendo uma contribuição significativa para o fluxo total;

O fluxo de permeação de fármaco através do estrato córneo pode ser expresso pelo modelo matemático da lei de Fick, demonstrada na equação 1.

$$J = \frac{dm}{dt} = \frac{D \times K \times \Delta C}{h} \quad (1)$$

onde J é o fluxo por unidade de área no estado estacionário, m é a massa, t o tempo, D é o coeficiente de difusão na pele, K é o coeficiente de partição do fármaco entre a pele e veículo, ΔC é o gradiente de concentração do fármaco entre o veículo e a pele e h é o comprimento da rota difusional através da pele.

3.5 MODELOS PARA AVALIAÇÃO DA PERMEACÃO CUTÂNEA DE FÁRMACOS

Estudos sobre a penetração cutânea de fármacos são extremamente importantes na otimização da elaboração de formas farmacêuticas de liberação dérmica e transdérmica.

Inúmeros métodos *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo* têm sido investigados para avaliar a absorção percutânea dos fármacos. Porém, devido à dificuldade de realizar experimentos *in vivo* (utilização de grande número de animais, diferença de permeabilidade entre as espécies, questões éticas), preferem-se experimentos *ex vivo*, que empregam fragmentos de pele animal ou humana, devido também a vantagem de maior controle e reprodução dos parâmetros de avaliação e possibilidade de correlação *in vitro/in vivo* (TANOJO et al., 1997).

Os estudos *ex vivo* para avaliação da permeação cutânea geralmente ocorrem pela difusão do fármaco através de membrana para uma solução receptora onde será realizada a determinação analítica. Nestes estudos, a membrana mais indicada é a pele humana, e várias fontes, como cirurgias plásticas, têm sido utilizadas para a obtenção das mesmas. Porém, sua disponibilidade é bastante limitada, e uma forma de contornar este problema é a utilização de pele animal.

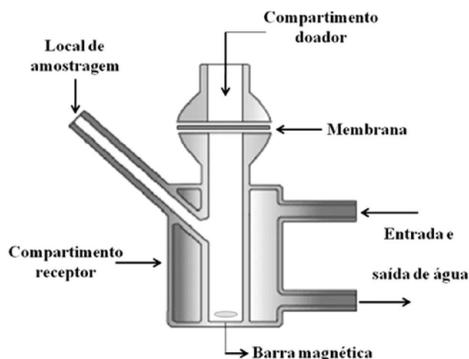
Dentre os modelos animais mais utilizados na literatura como substitutos da pele humana nos estudos *ex vivo* de permeação cutânea, o mais relevante é a pele de porco, devido a sua similaridade estrutural e funcional com a pele humana, aliada à praticidade da obtenção deste material em abatedouros. Estudos realizados demonstraram que a estrutura do estrato córneo e da epiderme viável de suínos se assemelha ao da pele humana (JACOBI et al., 2007). A pele da orelha de porco é especialmente adequada para estudos de permeação e gera resultados comparáveis aos obtidos com pele humana (GODIN; TOUITOU, 2007).

3.5.1 Metodologia de estudo *ex vivo* para permeação cutânea

Apesar de não simular a membrana biológica, os testes *ex vivo* são considerados métodos rápidos e com a capacidade de avaliar alguns fenômenos que ocorrem entre a aplicação do produto e o efeito medido farmacologicamente (SATO et al., 2007). O modelo de difusão da câmara de Franz, também chamado modelo estático, é usualmente empregado em estudos de permeação cutânea *ex vivo* de produtos tópicos. Esta metodologia foi aprovada pelo FDA para testes de permeação e dissolução de preparações tópicas (CAL; CENTKOWSKA, 2008).

O sistema vertical tipo Franz é composto por um compartimento doador (superior) e outro receptor (inferior) Figura 8. O compartimento receptor é preenchido com uma solução, geralmente tampão, de modo a manter a não saturação do sistema, ou seja, condição *sink*. No compartimento doador é colocado o material que se deseja testar. Entre os compartimentos citados anteriormente é colocada uma membrana, podendo esta ser artificial (acetato de celulose) ou biológica (pele suína etc.). Os ensaios são realizados em banho termostatzado $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (temperatura corporal) sob agitação magnética constante. Alíquotas são retiradas em tempos específicos e quantificadas por metodologia adequada.

Figura 8 Esquema da câmara de difusão tipo Franz.



Fonte: Nemen (2010)

Inúmeros trabalhos na literatura utilizam esta metodologia para avaliação da permeação cutânea de fármacos a partir de NCL. Joshi e colaboradores (2008) observaram a absorção transdérmica de Celecoxibe, um inibidor seletivo da COX-2, a partir de NCL. Para os estudos de permeação, utilizaram como membrana modelo pele de rato em células de difusão tipo Franz. No estudo *ex vivo* realizado por Han e colaboradores (2012) a avaliação da permeação transdérmica do flurbiprofeno foi investigada também utilizando como metodologia de estudo câmara de difusão tipo Franz. Em ambos os trabalhos os autores conseguiram determinar o perfil de permeação dos fármacos a partir dos nanocarreadores lipídicos.

MATERIAS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Matérias-primas

Compritol[®] 888 ATO (Behenato de glicerila, Gatefossé, França)

Cloreto de sódio (Isofar Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda, Brasil)

Fosfato de sódio monobásico (Vetec Química Fina Ltda, Brasil)

Fosfato de potássio dibásico (Vetec Química Fina Ltda, Brasil)

Isoorientina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA).

Isovitexina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA).

Lecitina de Soja, 75% de fosfatidilcolina (Lipoid GMBH, Alemanha).

Pluronic[®] F68 (Poloxamer 188)

Tween[®] 80 (Polissorbato 80, Isofar Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda, Brasil)

4.1.2 Solventes

Acetonitrila grau CLAE (Vetec Química Fina Ltda, Brasil).

Ácido acético grau CLAE (Vetec Química Fina Ltda, Brasil).

Metanol grau CLAE (Vetec Química Fina Ltda, Brasil).

Propilenoglicol P.A. (Vetec Química Fina Ltda, Brasil).

4.1.3 Equipamentos

Agitador magnético com aquecimento Schott SLR (Schott Instruments, Alemanha).

Agitador tipo vortex KMC-1300V (Vision Scientific CO Ltda, EUA).

Balança analítica AS2000 (Ohaus Corporation, EUA).

Banho de agitação multiponto (Dist Produtos para Laboratório, Brasil).

Banho de ultrassom USC 700 (Unique Indústria e Comércio de Produto Eletrônico Ltda, Brasil).

Centrífuga 4K15 Sigma (Sigma, EUA).

Cromatógrafo líquido de alta eficiência Perkin Elmer Series 200, equipado com bomba binária Séries 200 e detector UV/Vis Serie 200.

Homogeneizador a alta velocidade Ultra-Turrax T25 Basic (Ika Werke, Alemanha)

Homogeneizador ultrassônico UP 200S (Hielscher Ultrasonics GmbH, Alemanha)

Microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM-1011 (Jeol Ltda., EUA).

Mini spray-dryer B-290 (Buchi, EUA)

Moinho de facas MacmontS

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Aquisição e beneficiamento da matéria-prima vegetal (MPV)

4.2.1.1 Aquisição do material vegetal

Folhas de *Cecropia pachystachya* Trécul. foram coletadas no município de Torres, Rio Grande do Sul. O material testemunho está depositado no Herbário da Universidade Federal de Santa Catarina (FLOR 37143).

4.2.1.2 Moagem e acondicionamento do material vegetal.

As folhas foram secas em estufa de ar circulante (35-40 °C) e submetidas à moagem em moinho de facas em malha de 3,0 mm. O material resultante foi acondicionado ao abrigo de luz e umidade para posterior realização dos ensaios de caracterização e processo extrativo.

4.2.1.3 Caracterização da MPV

Perda por dessecação

Exatamente cerca de 2 gramas de folhas secas moídas foram transferidos para pesa filtros previamente dessecados e tarados. Em seguida o pesa filtro contendo a amostra foi submetido a aquecimento em estufa a 105 °C durante 5 horas, seguida de resfriamento em dessecador e pesagem. O procedimento foi repetido por períodos de 30 minutos de secagem até obtenção de peso constante. Os resultados de três determinações foram expressos em termos de porcentagem ponderal sobre a quantidade da amostra (BRASIL, 2010).

Determinação do teor de extrativos

Cerca de 1 grama de material vegetal, exatamente pesado, foi levado à fervura com 100 gramas de água por 10 minutos. Após o resfriamento, a massa total foi reconstituída para 100 gramas de água purificada, filtrada em papel filtro, sendo os 20 mL iniciais desprezados. Este procedimento foi repetido duas vezes. Em seguida, uma alíquota de 20 g da solução resultante foi colocada em pesa filtro previamente tarado e levado a secar em banho-maria. Posteriormente o pesa filtro foi colocado em estufa a 105 °C durante 2 horas, resfriado em dessecador por 20 minutos e então pesado. Para cada solução foram feitas três determinações ($n=3$). O teor de extrativos (TE) foi calculado utilizando-se a média dos 6 valores obtidos, segundo a equação 2 (BUNDESVERREINIGUNG, 1986)

$$TE = (RS \times fd \times 100) / m - (m \times PD/100) \quad (2)$$

onde:

TE = teor percentual de extrativos (% , m/m).

PD = perda por dessecação (%)

RS = massa do resíduo seco (g)

m = massa do material vegetal (g)

fd = Fator de diluição (5)

4.2.2 Obtenção e caracterização das soluções extrativas

4.2.2.1 Preparo das soluções extrativas

As soluções extrativas foram obtidas por turbo-extração. O material vegetal foi submetido à extração durante 5 minutos em Ultraturrax, sob agitação de 9500 rpm. Os demais parâmetros de extração foram estabelecidos através de um planejamento experimental a fim de investigar as variáveis tecnológicas, concentração de planta e concentração etanólica do líquido extrator. Os níveis dos fatores avaliados encontram-se descritos na Tabela 1. As soluções extrativas foram caracterizadas através dos teores de resíduo seco (RS).

Tabela 1. Parâmetros avaliados por meio de planejamento experimental para a obtenção das soluções extrativas de *C. pachystachya* pelo método de turbo-extração

Fatores avaliados	Mínimo	Máximo
Concentração de planta (% p/V).	5	10
Concentração etanólica (% V/V)	0	20

4.2.2.2 Determinação do resíduo seco (RS)

Cerca de 20,0 g de cada solução extrativa, exatamente pesados, foram colocados em pesa filtros previamente tarados. A seguir o conteúdo de cada pesa filtro foi levado à secura em banho-maria, sob agitação ocasional. Posteriormente os pesa filtros foram colocados em estufa a 105 °C por duas horas, resfriados em dessecador até chegar à temperatura ambiente e então pesados. O experimento foi realizado em triplicata e o resultado foi calculado em relação a 100,0 g de solução extrativa (% m/m) pela média de três determinações (HARTKE; MUTSCHLER, 1987)

4.2.3 Preparação e caracterização do extrato seco e fração enriquecida em flavonóides de *C. pachystachya*

4.2.3.1 Secagem das soluções extrativas

As soluções extrativas foram desalcoolizadas em evaporador rotatório a 40 °C. Em seguida, a solução resultante foi seca em spray dryer sob as seguintes condições de secagem: temperatura de entrada: 160 °C; temperatura de saída: 111 °C; fluxo de alimentação: 5%; fluxo de ar: 100%; diâmetro do atomizador 0,7 mm. Posteriormente o extrato bruto seco resultante foi armazenado em freezer a -20 °C.

4.2.3.2 Obtenção de fração enriquecida de *C. pachystachya*.

Uma fração enriquecida em flavonoides C-glicosídeos (FECp) foi obtida a partir do extrato bruto seco por procedimento adaptado de Ortmann (2013). Cerca de 2 gramas de extrato seco foram retomados em 400 mL de água. O extrato ressuspendido foi particionado com *n*-butanol por 5 vezes e, em seguida, as soluções butanólicas, depois de reunidas, foram secas em evaporador rotatório a 40 °C. A fração butanólica seca resultante foi solubilizada em água e mantida em contato com a resina de troca iônica Amberlite® XAD-16 na proporção de 1:20:200 (fração butanólica:resina:água, m/m/V), e mantidos durante 1 hora sob agitação. Este sistema ficou em repouso para a resina decantar e, a seguir, o resíduo aquoso foi eliminado. Os compostos aderidos à resina foram extraídos com metanol por 5 vezes consecutivas de 5 minutos. As soluções metanólicas resultantes desta extração foram reunidas e, em seguida o metanol foi eliminado em evaporador rotatório. O resíduo seco obtido foi ressuspendido em água, a solução aquosa resultante congelada a -20 °C e liofilizada por 48 horas. Finalizada a operação de secagem, a FECp enriquecida em compostos C-glicosídeo obtida foi armazenada em dessecador até a sua utilização.

4.2.3.3 Quantificação dos marcadores químicos

A análise dos marcadores químicos isoorientina (ISOO) e isovitexina (ISOV) presentes no extrato e na FECp foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) por metodologia desenvolvida e validada por Costa e colaboradores (2011). Como fase estacionária foi utilizada uma coluna Brownlee® Choice C-18 (150 × 4,6 mm i.d.; 5µm) com pré-coluna ODS (4,0 x 3,0 mm) e como fase móvel um gradiente combinando acetonitrila (solvente A) e solução aquosa de ácido acético 1% (pH= 3) (solvente B). A fase móvel foi preparada diariamente e desgaseificada em banho de ultrassom, antes do uso. O comprimento de onda de detecção foi 340 nm. A tabela 2 apresenta a programação da fase móvel utilizada.

Tabela 2. Programação da fase móvel para quantificação dos marcadores químicos isoorientina e isovitexina presentes no extrato bruto e fração enriquecida de *C. pachystachya* (FECp) por CLAE

Programação (min)	Modo	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0-5	Gradiente	5	95
5-30	Gradiente	20	80
30-40	Isocrático	20	80

O extrato bruto e a FECp foram diluídas nas concentrações de 1,0 e 0,5 mg/mL respectivamente, e as soluções resultantes, em triplicata, foram filtradas com membrana de 0,45 µm de diâmetro de poro. Para quantificação dos marcadores foi construída uma curva analítica na faixa de 0,8-50 µg/mL. Os teores foram expressos em miligramas do composto por grama de extrato (mg/g).

4.2.4 Estudos preliminares da formulação

A partir da caracterização da matéria-prima vegetal observou-se que o material vegetal apresentou o mesmo perfil fitoquímico relatado anteriormente na literatura (COSTA et al., 2011). O flavonoide C-glicosídeo isoorientina foi identificado e quantificado como composto majoritário nos extratos de *C. pachystachya* produzidos nesse trabalho. Portanto para as metodologias subsequentes este foi utilizado como marcador.

4.2.4.1 Seleção dos componentes da formulação

A solubilidade de FECp foi determinada em três diferentes lipídios líquidos: triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico, óleo de rícino e palmitato de isopropila. Cerca de 10 mg de fração foram adicionados em um tubo de ensaio contendo 1 grama, exatamente pesados, de óleo e mantido sob agitação por 2 horas em banho-maria a 85 °C. O lipídeo capaz de solubilizar maior quantidade de extrato foi utilizado para a continuação deste estudo.

Os demais componentes foram selecionados com base em um estudo preliminar de formulação utilizando a técnica de microemulsão, descrita a seguir. Neste estudo, lipídios sólidos, tensoativos hidrofílicos e co-solventes (Quadro 1) foram utilizados em diferentes combinações gerando 6 formulações (F1 a F6), descritas na Tabela 3. Lecitina de soja foi utilizada como tensoativo lipofílico em todas as formulações. Como respostas foram avaliadas a formação dos sistemas nanoestruturados, o tamanho de partícula e o índice de polidispersão.

Quadro 1 Resumo dos excipientes testados para a formação dos nanocarreadores lipídicos contendo FECp

Lípidios líquidos	Óleo de rícino Triglicerídeo de ácido cáprico/caprílico Palmitato de isopropila
Lípidios sólidos	Monoestearato de glicerila Compritol ATO 888
Tensoativos	Lecitina Tween® 80 Pluronic® F68
Co-solventes	Etanol Butanol Propilenoglicol

Tabela 3 Composição dos nanocarreadores lipídicos contendo FECp preparadas com os lipídios sólidos monoestearato de glicerila (MEG) ou Compritol® ATO 888

Constituintes	Unidade	F1	F2	F3	F4	F5	F6
MEG (g)	g	0,2	0,2	0,2	-	-	-
Compritol® ATO 888	g	-	-	-	0,2	0,2	0,2
Solução de Pluronic® F68 1,5% (m/V)	mL	-	10	10	10	-	-
Solução de Tween® 80 1,5% (m/V)	mL	10	-	-	-	10	10
Palmitato de isopropila	g	0,022	0,022	0,02	0,022	0,022	0,022
Lecitina de soja	g	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Etanol	mL	1	1	-	-	-	-
Butanol	mL	-	-	1	1	1	-
Propilenoglicol	mL	-	-	-	-	-	1
Água	mL	100	100	100	100	100	100
FECp	mg	25	25	25	25	25	25

4.2.4.2 Técnica de microemulsão utilizada no estudo preliminar de formulação

Os nanocarreadores foram obtidos pela técnica de microemulsão (ZHANG et al., 2014). Esta técnica baseia-se na formação das partículas a partir de uma microemulsão quente vertida em água gelada. Para preparação dos nanocarreadores, a fase lipídica composta pelos lipídios líquido e sólido, emulsionante lipofílico, co-solvente e a FECp foi aquecida a 85 °C. Em seguida, a fase aquosa composta de solução de emulsionante hidrofílico, previamente aquecida na mesma temperatura, foi vertida na fase oleosa e submetida à irradiação ultrassônica por 3 minutos e 15 segundos. Esta emulsão pré-formada foi vertida em béquer contendo 100 mL de água destilada mantida a 2 °C e submetida à agitação no dispersor Ultra-turrax, formando as nanoestruturas. Posteriormente, o volume da fase dispersante foi reduzido a 20 mL em rotavapor e as formulações prontas foram armazenadas a 4 °C sob proteção da luz.

4.2.5 Desenvolvimento e caracterização de sistema nanoestruturado lipídico

4.2.5.1 Preparação dos nanocarreadores lipídicos (NCL)

A partir da seleção dos componentes da formulação estabelecidos no estudo preliminar descrito anteriormente, os demais parâmetros, como quantidade de FECp (A), tempo de agitação da pré-emulsão (B) tempo de agitação da emulsão final (C) e velocidade de agitação (D) foram definidos com base em um planejamento experimental. A influência destes parâmetros sobre o tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI), eficiência de encapsulação (EE%) e teor de marcadores associados ao sistema foi avaliada com base no planejamento experimental descrito na tabela 4.

Tabela 4. Planejamento experimental para preparação dos nanocarreadores lipídicos.

Fator	Tipo	Subtipo	Mínimo	Máximo
A (mg)	Numérico	Ordinal	10	50
B (s)	Numérico	Ordinal	15	180
C (min)	Numérico	Ordinal	3	5
D (rpm)	Catagórico	Nominal	9500	13500

Os resultados foram avaliados através do software *Design-Expert*[®] versão 7.0.0. Foram geradas 12 formulações a partir do delineamento fatorial.

4.2.5.2 Tamanho de partícula e índice de polidispersão (PDI)

O tamanho de partícula e o PDI das formulações foram determinados por espalhamento de luz dinâmico utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS. As medidas foram realizadas a 25 °C após diluição apropriada das amostras.

4.2.5.3 Potencial zeta

O potencial zeta das formulações foi determinado por anemometria laser Doppler utilizando o equipamento Zetasizer Nano

ZS. As amostras foram colocadas em célula eletroforética, onde um potencial de ± 150 mV foi estabelecido.

4.2.5.4 Determinação da eficiência de encapsulação (EE%) e teor de ISOO nos nanocarreadores

A EE% foi estimada como sendo a diferença percentual da quantidade total de teor de ISOO presente na FECp adicionada à formulação e aquela encontrada no ultrafiltrado, obtido após ultrafiltração/centrifugação das dispersões coloidais utilizando unidades de filtração Ultrafree - MC (100.000 MWCO, Millipore, EUA). As análises para quantificação do marcador foram realizadas por CLAE. O teor foi calculado segundo a equação 3 e os valores foram expressos em porcentagem.

$$\text{Teor} = \frac{\text{quantidade total de ISOO} - \text{ISOO não encapsulada}}{\text{quantidade total de lípido}} \times 100 \quad (3)$$

A metodologia analítica desenvolvida por Costa e colaboradores (2011) foi revalidada neste trabalho para determinação da EE% a partir da quantificação do teor do marcador químico ISOO.

4.2.5.5 Validação da técnica de quantificação dos marcadores químicos nos nanocarreadores por cromatografia líquida de alta eficiência

Os parâmetros avaliados para a revalidação neste estudo foram especificidade, linearidade, precisão (intra-dia e inter-dia), limite de quantificação e limite de detecção. As condições instrumentais e analíticas utilizadas estão descritas no item 4.2.3.3.

Curva analítica, linearidade e intervalo de detecção

Para obtenção das curvas analíticas foram preparadas soluções de ISOO utilizando como solvente metanol: água (1:1, V/V) nas concentrações 0,8; 1,0; 2,0; 5,0; 10 e 50 $\mu\text{g/mL}$ para ambos os

marcadores. As medidas das áreas referentes a cada concentração dos marcadores foram utilizadas para construção da curva analítica. A equação da reta e o coeficiente de correlação (r) foram determinados pela análise da regressão linear utilizando o método dos mínimos quadrados. As análises foram realizadas em triplicata

Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação foi determinado conforme a equação 4.

$$LQ = \frac{dp \times 10}{S} \quad (4)$$

onde dp é o desvio padrão do intercepto com o eixo y da equação da reta, S é a inclinação da reta e 10 é utilizado com base na relação de dez vezes o ruído da linha de base.

Limite de detecção (LD)

O limite de detecção foi determinado conforme a equação 5.

$$LD = \frac{dp \times 3,3}{S} \quad (5)$$

onde dp é o desvio padrão do intercepto com o eixo y da equação da reta, S é a inclinação da reta e 3,3 é utilizado com base na relação de 10 vezes o ruído da linha de base.

Especificidade do método

A especificidade do método foi avaliada através da comparação dos cromatogramas obtidos com a solução em metanol:água de fração e dos nanocarreadores brancos.

Precisão intra e interdia

A precisão do método foi determinada por medidas da repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (precisão interdia). A repetibilidade foi avaliada pela determinação de seis diferentes amostras na concentração de 10 µg/mL, no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais. A precisão intermediária foi avaliada através da realização da análise das concentrações 2,0; 5,0 e 10,0 µg/mL em três dias diferentes.

4.2.5.6 Avaliação da morfologia

A morfologia das partículas foi investigada por microscopia eletrônica de transmissão (MET). A amostra foi corada com 1% do corante tetróxido de ósmio e as imagens foram capturadas em diferentes ampliações.

4.2.6 Avaliação do perfil de liberação *in vitro* dos nanocarreadores lipídicos em tampão fosfato salino pH 7,4

4.2.6.1 Avaliação da solubilidade de FECp em tampão fosfato salino pH 7,4

Visando estabelecer as condições para o estudo de liberação, a solubilidade da fração em tampão fosfato salino pH 7,4 foi determinada. Para isto, 2 mL de tampão foram adicionados a tubos de ensaios contendo um excesso FECp. As misturas foram mantidas a $37 \pm 0,5$ °C sob agitação magnética e, após 24 horas, foram centrifugadas por 10 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante coletado foi filtrado e analisado por CLAE, conforme metodologia previamente descrita no item 4.2.5. Os resultados foram calculados em termos de ISOO. A solubilidade foi expressa em micrograma de ISOO por mL de tampão.

4.2.6.2 Avaliação do perfil de liberação *in vitro* da FECp a partir do nanocarreador lipídico

Para avaliar o perfil de liberação da FECp encapsulada no nanocarreador, uma alíquota de 10 mL do nanocarreador foi transferido para um béquer contendo 90 mL de tampão fosfato salino pH 7,4, sendo

mantido a $37 \pm 0,5$ °C com agitação constante. Em intervalos de tempo pré-determinados alíquotas do meio de liberação foram retiradas, filtradas em dispositivos de ultrafiltração/centrifugação para posterior análise por CLAE, conforme metodologia analítica previamente validada. A partir dos resultados, gráficos da porcentagem de fração enriquecida liberada em função do tempo foram construídos.

4.2.7 Avaliação da penetração cutânea *ex vivo* em célula de Franz

Com o objetivo de avaliar a capacidade de permeação dos nanocarreadores na pele, um estudo de permeação *ex vivo* utilizando células de difusão tipo Franz foi conduzido, utilizando pele de orelha de porco. Para obtenção do perfil cinético de permeação o compartimento receptor foi preenchido com 10 mL de tampão fosfato salino pH 7,4. O sistema, composto de oito células individuais conectado a um banho termostatizado à $37 \pm 0,5$ °C, foi mantido sob agitação constante por um período de 24 horas. Os fragmentos de pele foram colocados na interface entre as células doadora e receptora. De modo a atender a condição *sink* exigida 2 mL da formulação foram aplicados diretamente sobre a pele no compartimento doador e, imediatamente, cada célula foi fechada para evitar a evaporação da amostra. Amostras da solução receptora foram coletadas nos seguintes tempos para a avaliação do perfil cinético de permeação: 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0; 24 h e armazenadas até o momento da quantificação. A cada coleta, o volume de meio retirado do compartimento receptor foi repostado com meio fresco. Após as coletas, as alíquotas retiradas do compartimento receptor foram analisadas por CLAE para quantificação da ISOO.

A avaliação da retenção cutânea de ISOO foi realizada após o término do estudo. As amostras de pele foram retiradas da câmara de Franz e lavadas com tampão para remover o excesso de amostra da superfície. Posteriormente separou-se a epiderme da derme, com o auxílio de bisturi e pinça. As camadas foram recortadas, picoteadas e os fragmentos foram colocados em tubos tipo falcon, onde foram adicionados 5 mL de metanol (líquido extrator). Em seguida os tubos contendo as amostras foram submetidos à agitação (Vortex[®]) por 5 minutos e sonicação durante 30 minutos para o rompimento das células e aumento da eficiência de extração. Para eliminação de interferentes como restos celulares e proteínas, as amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes foram coletados para posterior análise. A quantificação

de ISOO presente no meio receptor e nas camadas da pele foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência conforme descrito no item 4.2.5.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

O desenvolvimento de um medicamento fitoterápico agrega um valor tecnológico à preparação de formulação contendo extratos vegetais, o que o diferencia de preparações utilizadas na medicina tradicional. Neste sentido, é de fundamental importância a padronização de cada uma das etapas visando a garantia da qualidade, eficácia e segurança, bem como a reprodutibilidade, requisitos indispensáveis para um medicamento. Considerando a variabilidade inerente e a complexidade de uma planta medicinal, é imprescindível a avaliação de suas características para conferir a este material a qualidade de matéria-prima vegetal, de grau farmacêutico, que é o ponto de partida para todo este processo e, portanto, de sua qualidade depende a qualidade de todos os produtos intermediários e finais do mesmo.

5.1.1 Perda por dessecação

A presença de umidade no material vegetal pode induzir processos de degradação enzimática e química, e contribuir para proliferação de microorganismos durante o armazenamento da planta por um longo período de tempo (FARIAS, 2010). Estes fatores demonstram a importância do conhecimento do teor de umidade no desenvolvimento de um medicamento fitoterápico. O teor de umidade preconizado pela Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010) pode variar de 8-14%.

O resultado encontrado para a perda por dessecação da matéria-prima vegetal seca e moída foi de 10,65 % ($\pm 0,12$) com desvio padrão relativo de 0,04 % ($n = 3$), encontrando-se dentro do preconizado.

5.1.2 Teor de extrativos

O teor de extrativos é um parâmetro importante no controle de qualidade da matéria-prima vegetal. A partir dessa técnica é possível quantificar as substâncias extraídas com uma metodologia padrão de extração definida por Bundesvereinigung (1986), que estabelece um parâmetro de qualidade que permite a comparação de diferentes lotes.

O teor de extrativos em água obtido para a matéria-prima vegetal seca e moída foi de 17,45 % \pm 0,38, com desvio padrão relativo igual a 2,26 %.

5.2 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO EXTRATIVO

No desenvolvimento de um fitoterápico, a etapa de padronização do processo extrativo é de fundamental importância e constitui um desafio ao formulador. A partir de uma matriz complexa, a extração visa tornar possível a obtenção de um medicamento, com todos os requisitos de qualidade, segurança e constância de composição que isto supõe, por meio da retirada seletiva de compostos, que é condicionada pelo método de extração.

A turbo-extração foi a técnica escolhida para a preparação dos extratos de *C. pachystachya*. Esta técnica baseia-se na redução do tamanho de partícula concomitantemente com a extração. Com a aplicação de elevadas forças de cisalhamento ocorre o rompimento das células da matéria-prima vegetal favorecendo assim a rápida dissolução das substâncias. Entre as vantagens dessa técnica destacam-se o quase esgotamento da matéria-prima vegetal e a rapidez da extração, na ordem de minutos (SONAGLIO et al., 2010)

5.2.1 Obtenção e análise das soluções extrativas

O ponto ótimo de extração por turbo-extração foi estabelecido a partir de um planejamento experimental em que os fatores e as respostas indicaram a condição experimental mais adequada para obter extratos com a máxima concentração simultânea dos dois marcadores ISOO e ISOV.

Os fatores escolhidos para avaliação neste estudo foram concentração de droga (5 e 10 %) e concentração etanólica (água, etanol 10 %, etanol 20 %). A definição dos solventes para a operação de extração baseou-se na solubilidade dos compostos tipo C-glicosídeos presentes na matéria-prima vegetal. Devido à sua polaridade elevada apresentam boa solubilidade em etanol e água (RAWAT et al., 2011).

A Tabela 6 apresenta os valores de resíduo seco e teores de ISOO e ISOV encontrados utilizando-se as diferentes condições previamente estabelecidas.

Tabela 5 Resultados da padronização dos extratos obtidos por turbo-extração de *C. pachystachya*

Concentração de planta (% m/V)	Concentração etanólica (% V/V)	RS (%g/g)	ISOO (mg/g)	ISOV (mg/g)
5	0	0,68 (±1,88)	12,84 (±3,85)	6,25 (±3,95)
5	10	0,55 (±2,90)	13,39 (±3,21)	5,89 (±1,18)
5	20	0,85 (±3,62)	16,58 (±1,94)	6,50 (±2,53)
10	10	1,08 (±1,30)	15,56 (±1,04)	6,73 (±2,44)

O resíduo seco é um parâmetro de suma importância na otimização das soluções extrativas. Tem a capacidade de informar sobre a influência de diferentes fatores sobre a qualidade do processo extrativo e com isso estimar a quantidade total de substâncias extraídas (NUNES et al., 2000).

Entre os líquidos extratores estudados, o etanol 20 % gerou o maior teor de sólidos e a máxima extração de marcadores. Com o aumento da relação droga/solvente não ocorreu um aumento proporcional do resíduo seco, assim a concentração de droga de 5 % foi definida para o trabalho.

5.2.2 Obtenção e análise quantitativa do extrato seco e da fração enriquecida em flavonoides de *C. pachystachya* (FECp)

Neste trabalho, a secagem das soluções extrativas foi realizada visando o grande número de vantagens que extratos secos apresentam, sobretudo considerando os diversos aspectos práticos quando utilizados como forma farmacêutica intermediária: manipulação mais simples com melhor estabilidade quando comparados com extratos líquidos, melhoria da homogeneidade de distribuição dos constituintes da preparação e pesagem facilitada e mais precisa, conferindo à forma final maior garantia da dose empregada. Assim, a secagem dos extratos foi executada em spray dryer conforme descrito no item 4.2.3.1. Por se tratar de um produto intermediário para a produção imediata dos nanocarreadores, não houve a necessidade da realização de um estudo de secagem. Os parâmetros de secagem foram pré-estabelecidos pelo nosso grupo para outra espécie do gênero *Cecropia* sp. (dados não publicados) e utilizados para a secagem do extrato neste trabalho. Para a execução desta etapa, foram preparados 2 L de solução extrativa que

geraram 12,28 g de extrato seco, com um rendimento em relação ao valor teórico de resíduo seco de 80%.

Inúmeros trabalhos da literatura utilizam o fracionamento de extratos padronizados para maximizar a concentração e, conseqüentemente, potencializar a atividade de determinado grupo de ativos (PANDEY et al., 2010; MAITY et al., 2012; BALZAN et al., 2013). Os flavonoides C-glicosídeos ISOO e ISOV são apontados como possíveis compostos ativos nos extratos de *C. pachystachya* (COSTA, 2009; GAZAL et al., 2014), portanto, o fracionamento do extrato foi direcionado para estes compostos.

A resina Amberlite® XAD-16, um adsorvente polimérico sintético com grande área superficial (SOUSA; BRITO, 2013), foi anteriormente utilizada com sucesso por Costa e colaboradores (2011b) para a extração seletiva de flavonoides a partir de extratos brutos de *C. glaziovii*. O procedimento foi adaptado para utilização do extrato seco e realizado para a obtenção do FECp.

As amostras de extrato seco e fração enriquecida foram submetidas à análise por CLAE. Os resultados encontrados após a quantificação das amostras apresentaram a concentração dos teores dos flavonoides C-glicosídeos cinco vezes superior na fração, quando comparado com o extrato bruto.

Os teores dos marcadores para o extrato bruto e a FECp estão descritos na Tabela 6

Tabela 6 Teores dos marcadores químicos presentes no extrato bruto e FECp nas concentrações de 1,0 mg/mL e 0,5 mg/mL respectivamente

Composto	Extrato bruto (mg/g)	Fração enriquecida (mg/g)
Isoorientina	9,76	50,66
Isovitexina	3,25	37,94

5.3 SELEÇÃO DOS COMPONENTES PARA PREPARAÇÃO DOS NANOCARREADORES LIPIDICOS SÓLIDOS

No desenvolvimento tecnológico de uma formulação faz-se necessário um estudo preliminar, com o objetivo tanto de selecionar o método de preparação como os excipientes para obter um sistema com características adequadas à finalidade pretendida.

Diversas técnicas têm sido empregadas para a obtenção de sistemas nanoestruturados lipídicos visando à administração tópica. Como exemplos, podemos citar homogeneização à alta pressão (LIEDTKE et al., 2000; PARDEIKE et al., 2009; SCHWARZ et al., 2013) dispersão por ultrassom (CASTRO et al., 2009; MUSSI et al., 2013) e microemulsão a quente (MARQUELE-OLIVEIRA et al., 2010; SOUZA et al., 2011; KHURANA et al., 2013).

Neste trabalho, a técnica de microemulsão foi empregada para a obtenção de nanocarreadores lipídicos capazes de encapsular a FECp, pois apresenta vantagens em relação às demais técnicas, como facilidade de manuseio e processo de produção rápido, bem como dispensa a utilização de equipamentos especiais (ZHANG et al., 2013). Esta técnica baseia-se na transferência de uma emulsão O/A quente para água fria, sob agitação vigorosa, resultando na solidificação do lipídio da fase oleosa formando partículas em escala nanométrica (SOUZA et al., 2011). Os nanocarreadores lipídicos obtidos a partir da técnica de microemulsão são compostos por uma mistura de um lipídio sólido com baixo ponto de fusão e um lipídio líquido, adicionados de agentes emulsionantes e co-solventes (MEHNERT; MÄDER, 2001). O Quadro 1 apresenta os excipientes testados no estudo preliminar de formulação neste trabalho.

Considerando a importância dos lipídios na estrutura dos nanocarreadores, esses foram os primeiros componentes a serem avaliados. A investigação do óleo mais adequado para a formulação foi realizada a partir de um estudo de solubilidade da fração no mesmo, uma vez que uma boa afinidade do lipídio líquido pela substância ativa exerce influência significativa sobre a eficiência de encapsulação (NEGI et al., 2014). Entre os lipídios líquidos testados, o palmitato de isopropila, um éster de ácido graxo amplamente utilizado em formas farmacêuticas tópicos convencionais como cremes e loções, foi selecionado. Além da maior solubilidade da fração, este lipídio é aceito pelo FDA como componente para formulações tópicas (ROWE et al., 2009)

Diferentes classes de lipídios têm sido amplamente utilizadas como excipientes farmacêuticos devido a seu baixo custo e baixa toxicidade e entre essas os glicerídeos representam uma família de lipídios muito utilizados na indústria farmacêutica. Entre os lipídios sólidos estudados, o Compritol[®] se revelou mais adequado para a produção dos nanocarreadores lipídicos, pois apresentou os melhores resultados para as respostas estudadas se comparado com o MEG, principalmente com respeito à reprodutibilidade.

O Compritol® um glicerídeo de cadeia longa constituído de uma mistura de mono, di e triglicerídeos de ácido behênico (JENNING et al., 2000) é frequentemente usado como lipídio sólido para a produção de nanocarreadores lipídicos devido à sua baixa citotoxicidade (SHAMMA; ABURAHMA, 2014). Por ser rico em triglicerídeos e ácidos graxos, é conhecido por formar cristais imperfeitos com espaço suficiente para acomodar fármacos hidrofílicos (ROHIT; PAL, 2013).

A seleção dos emulsificantes adequados é um dos fatores mais importantes relacionados à estabilidade do sistema, pois tem como função evitar agregação das partículas. A combinação de tensoativos de origem natural com agentes emulsionantes auxiliares é muito mais efetiva para estabilizar os sistemas do que quando se utiliza somente um emulsionante (BRUXEL et al., 2012) Tensoativos não iônicos, como o Tween® 80 combinado com fosfolipídios, geram filmes mais compactos, e com isso conferem mais estabilidade à formulação. O Tween® 80 é aceito por vários órgãos regulatórios, além de ser utilizado frequentemente em formulações de nanocarreadores lipídicos (AGRAWAL et al., 2010).

A lecitina de soja também é comumente utilizada no preparo de sistemas nanoparticulados, e apresenta como vantagens ser biocompatível e biodegradável. Apesar de não apresentarem carga em pH fisiológico, grupamentos polares carregados negativamente em sua estrutura conferem um potencial zeta final negativo na interface, contribuindo para impedir a aglomeração das partículas (BRUXEL et al., 2012).

A escolha do co-solvente é outro ponto crítico na formação dos nanocarreadores pela técnica escolhida, visto que estes excipientes têm como função auxiliar na diminuição da tensão interfacial, e com isso, produzir pequenas partículas (CAVALLI et al., 1996). De acordo com a literatura, compostos alcoólicos e glicólicos com baixo peso molecular são mais eficazes para esta finalidade (MOJAHEDIAN et al., 2013). O propilenoglicol é utilizado na indústria farmacêutica como umectante, conservante e co-solvente, sendo descrito pelos órgãos regulatórios como componente seguro para formulações de administração tópica (ROWE et al., 2009). Por estes motivos foi escolhido como co-solvente neste trabalho.

A Tabela 7 apresenta os valores de tamanho e PDI das formulações obtidas a partir deste estudo. Todas as formulações aqui testadas apresentaram-se macroscopicamente como sistemas coloidais, sem a formação de aglomerações ou resíduos visíveis de lipídios. Os sistemas formados a partir do MEG (F1/ F2/ F3) não foram selecionados

para o estudo, pois não houve uma boa reprodutibilidade entre as formulações. Entre os nanocarreadores produzidos com Compritol® (F4/ F5/ F6) todas as formulações apresentaram tamanho e índice de polidispersão adequados para este trabalho

Tabela 7 Valores obtidos para o tamanho de partícula e índice de polidispersão a partir do estudo de seleção dos componentes para a produção dos nanocarreadores lipídicos (NCL)

Respostas	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Tamanho (nm)	106	324	120	240	288	172
PDI	0,402	0,441	0,248	0,303	0,304	0,248

A partir destes resultados, a formulação F6, composta de 0,200 g de lipídio sólido Compritol®, 0,022 g de palmitato de isopropila, 0,050 mg de lecitina de soja, 10 mL de solução de Tween® 80 1,5 %, 1 mL de propilenoglicol e 100 mL de água, foi selecionada para a continuação dos estudos. Além de apresentar uma menor dispersão de tamanhos, nesta formulação o co-solvente utilizado foi propilenoglicol, que é aceito por órgãos regulatórios para preparações tópicas, o que constitui uma vantagem em relação às formulações preparadas com butanol.

5.4 ESTUDO DE FORMULAÇÃO DOS NANOCARREADORES POR DELINEAMENTO ESTATÍSTICO FATORIAL

Após a definição dos componentes na formulação, um segundo estudo foi realizado para avaliar outras variáveis relacionadas com a técnica de preparação, que podem afetar as características dos NCL, tais como tempo e velocidade de agitação, temperatura, condições de adição da pré-emulsão na água gelada, volume das fases, entre outros. Devido à contribuição simultânea de diversos fatores, fez-se necessário um estudo detalhado de formulação, no qual a combinação de diferentes variáveis permitiu estabelecer as condições de obtenção de sistemas adequados para a encapsulação da FECp. Neste caso, um planejamento fatorial foi a ferramenta utilizada para avaliar o efeito de diferentes quantidades da FECp, tempo de agitação da pré-emulsão, tempo de agitação da emulsão final e velocidade de agitação, após a adição da fase orgânica sobre a fase aquosa gelada sobre características fundamentais dos nanocarreadores, como tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta, bem como a eficiência de encapsulação e o teor do

marcador ISOO associado ao sistema. Assim um planejamento fatorial tipo 2^4 foi construído, resultando em 12 formulações preparadas em duplicata.

Para a estimativa de significância do modelo, uma análise de variância (ANOVA) foi aplicada (Tabela 8). O modelo é considerado significativo quando o valor de probabilidade de significância (p) for inferior a 0,05. A partir dos valores de p , representados na Tabela 8 pode-se concluir que o modelo foi significativo para todas as respostas, e com este resultado pode-se assegurar que o planejamento é eficaz para definir as melhores condições experimentais no desenvolvimento dos nanocarreadores lipídicos neste estudo.

Tabela Termos do modelo significante, valores dos coeficientes de regressão e ANOVA (valores de p) para as respostas teor de marcador, EE%, tamanho de partícula, PDI obtidas a partir do desenvolvimento de nanocarreadores lipídicos sólidos contendo FECp usando o delineamento fatorial 2⁴

Termo	Tamanho		PDI		Teor de marcador		EE%	
	Coeficiente	<i>p value</i>	Coeficiente	<i>p value</i>	Coeficiente	<i>p value</i>	Coeficiente	<i>p value</i>
Intercepto	132,92	<0,0001	395,83	0,0442	0,82	<0,0001	81,60	<0,0001
A	28,01	<0,0001	18,92	0,0067	0,47	<0,0001	-10,93	<0,0001
B	0,51	0,8418	-6,64	0,2130	5,417E003	0,3217	-0,11	0,8924
C	-0,58	0,8191	-2,00	0,7009	7,917E003	0,1531	0,51	0,5264
AB	7,14	0,0603	5,29	0,4058	-	-	-1,30	0,1886
R ²	0,8255		0,3879		0,9962		0,8753	
R ² -ajustado	0,7888		0,2590		0,9957		0,8491	
Adequação da precisão	12,703		4,806		90,496		14,470	

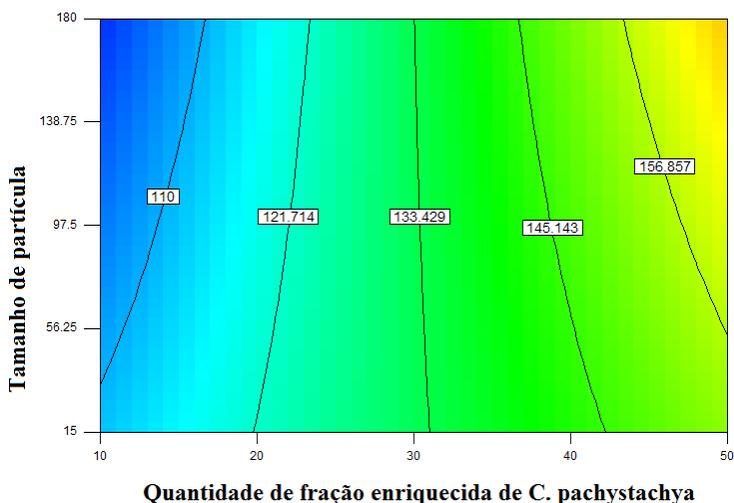
*(A) Quantidade de FECp adicionada (mg); (B) Tempo de agitação da pré-emulsão (s); (C) Tempo de agitação da emulsão final (min); AB representa interação entre os fatores.

5.4.1 Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta dos nanocarreadores

O diâmetro médio das partículas foi determinado por espalhamento de luz dinâmico. Esta técnica permite a medição do tamanho das partículas com tamanho menor que 1 μm e é baseada no movimento Browniano das partículas. Quando iluminadas por um feixe de luz laser, o movimento das partículas no meio faz com que a intensidade da luz dispersa varie, sendo detectado em um ângulo determinado que fornece informações diretas sobre o movimento das mesmas, permitindo o cálculo do tamanho destas (MENDONÇA et al., 2003).

As partículas exibiram tamanhos entre 97 e 179 nm. Pela análise de variância apresentada na Tabela 8 foi possível observar que o tamanho foi influenciado principalmente pela quantidade da FECp adicionada (fator A). A Figura 9 mostra esta tendência, na qual é possível visualizar que o aumento da concentração do extrato acarreta um aumento proporcional do diâmetro médio das partículas. Esse resultado está de acordo com outros trabalhos da literatura, onde a quantidade de fármaco adicionado no sistema impacta significativamente no tamanho de partícula (LIU; WU, 2010; SOUZA et al., 2011).

Figura 9 Gráfico dos resultados obtidos a partir de planejamento experimental para a resposta tamanho de partícula.



O índice de polidispersão (PDI) é um parâmetro que indica a homogeneidade da distribuição dos tamanhos das partículas. Valores de PDI acima de 0,5 são descritos na literatura como indicativo de uma ampla distribuição de tamanhos e valores abaixo disso representam populações de partículas com baixa dispersão de tamanhos especialmente em relação a partículas lipídicas sólidas (LIU; WU, 2010). Os fatores avaliados não exerceram influência sobre a polidispersão que apresentou valores entre 0,3 e 0,4, indicando uma baixa dispersão de tamanhos.

A Tabela 9 demonstra as características de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta dos nanocarreadores lipídicos obtidos a partir do planejamento experimental.

Tabela 8 Valores obtidos para o tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta dos nanocarreadores lipídicos (NCL). Fatores: (A) quantidade de fração enriquecida adicionada na formulação; (B) tempo de agitação da pré-emulsão; (C) tempo de agitação da emulsão final; (D) velocidade de agitação.

Formulação	Fatores				Tamanho	PDI	Potencial Zeta
	A	B	C	D			
NCL 1	10	15	5	9500	97	0,392	-17,4
NCL 2	10	15	3	13500	121	0,390	-16,8
NCL 3	10	180	5	9500	112	0,382	-17,1
NCL 4	10	180	3	13500	103	0,383	-17,2
NCL 5	25	15	5	9500	132	0,386	-17,0
NCL 6	25	15	3	13500	127	0,379	-17,2
NCL 7	25	180	5	9500	113	0,345	-17,5
NCL 8	25	180	3	13500	106	0,331	-17,9
NCL 9	50	15	5	9500	147	0,417	-16,9
NCL 10	50	15	3	13500	156	0,418	-17,0
NCL 11	50	180	5	9500	179	0,427	-17,0
NCL 12	50	180	3	13500	169	0,428	-17,1

O potencial zeta das partículas foi determinado por anemometria laser Doppler. Este método é capaz de avaliar a velocidade que uma partícula se move em um líquido quando um campo elétrico é aplicado e, a partir de cálculos matemáticos, indicar a carga superficial das partículas (MIRHOSSEINI et al., 2008). A medida do potencial zeta é um dado importante, pois é um indicativo sobre a estabilidade da formulação, principalmente, durante o seu período de estocagem.

Segundo a literatura, para garantir a estabilidade das formulações o potencial zeta deve ser superior em módulo a 30 mV (FREITAS; MÜLLER, 1998). Esta regra, no entanto, não é geral, pois algumas formulações produzidas com tensoativos não iônicos podem apresentar valores de potencial zeta inferiores a este limite sendo, porém, estabilizadas por impedimento estérico (MÜLLER et al., 2000). O valor médio de potencial zeta obtido para as formulações foi de -17,0 mV e, como pode ser observado na Tabela 9, não apresentou variações significativas em função das diferentes condições em que foram preparadas as formulações.

É importante salientar que a utilização de misturas de surfactantes em uma formulação tem a capacidade de incrementar a redução da tensão interfacial, se comparado com a utilização de um único agente tensoativo (OLBRICH; MÜLLER, 1999). Neste trabalho, utilizou-se a combinação de um tensoativo não iônico (Tween[®] 80) com um surfactante zwitteriônico (lecitina). Com isso, os sistemas obtiveram, além da estabilização eletrostática fornecida pela lecitina, a estabilização estérica relacionada ao Tween[®] 80 (KHERADMANDNIA et al., 2010).

5.4.2 Validação de metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação dos marcadores químicos ISOO e ISOV incorporados aos sistemas nanoestruturados

No desenvolvimento de um carreador nanométrico, um dos parâmetros mais importantes é a sua capacidade de associação com a molécula ativa (ou moléculas ativas), que se traduz na avaliação da eficiência de encapsulação e do teor destas substâncias no sistema. Para isto, é necessário dispor de metodologia analítica validada capaz de avaliar a quantidade de substância ativa em presença dos outros constituintes do sistema. Neste sentido, a metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência desenvolvida e validada por Costa e colaboradores (2011) foi co-validada a fim de demonstrar que o método é adequado para este propósito.

Linearidade e intervalo de detecção

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em exame, enquadrados em uma determinada faixa de concentração. O intervalo de detecção corresponde ao intervalo entre o valor superior e

inferior da analito baseado na linearidade do método (BRITO et al., 2003).

A linearidade do método foi avaliada no intervalo de 0,8-50 µg/mL para a ISOO. Foram elaboradas três curvas analíticas para cada marcador. A tabela 11 apresenta as equações de reta e os coeficientes de correlação para a ISOO. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) indica como linear uma reta em que o coeficiente de correlação seja igual ou superior a 0,99 (BRASIL, 2003). Os resultados obtidos indicaram linearidade no intervalo investigado.

Tabela 9 Resultados obtidos na análise da linearidade para o marcador ISOO pelo método de CLAE

Composto	Intervalo de linearidade (µg/mL)	Equação da reta	Coefficiente de correlação (r)
Isoorientina	0,8-50	$y = 24565x + 32415$	0,999

Limite de quantificação e limite de detecção

A sensibilidade do método para a quantificação de ISOO foi avaliada pela determinação dos limites de detecção e quantificação. A menor concentração do analito em questão que pode ser detectada utilizando uma metodologia analítica é denominada limite de detecção (ICH, 2005). O limite de quantificação é representado pela menor concentração do analito que pode ser medida sob as condições experimentais estabelecidas (ICH, 2005).

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados com base no desvio padrão do intercepto, com o eixo y e a inclinação da reta da curva padrão (tabela 11). Estes resultados obtidos mostram que o método avaliado é sensível para determinação da eficiência de encapsulação e teor de ISOO nos nanocarreadores lipídicos.

Tabela 10 Limites de quantificação e detecção obtidos para a validação do método por CLAE para o marcador ISOO

Marcador	Limite de quantificação	Limite de detecção
Isoorientina	0,012 $\mu\text{g/mL}$	0,0041 $\mu\text{g/MI}$

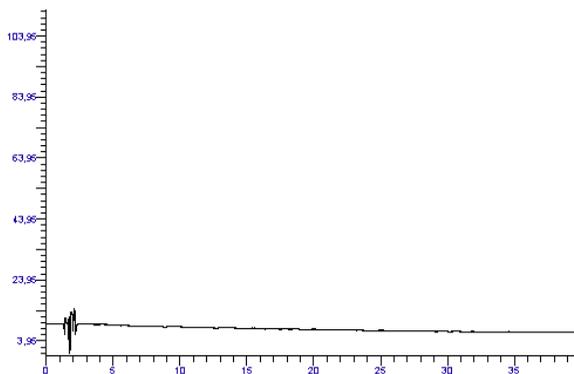
Especificidade

O termo especificidade define a capacidade do método em detectar o analito em presença de outros componentes presentes na matriz (ICH, 2005).

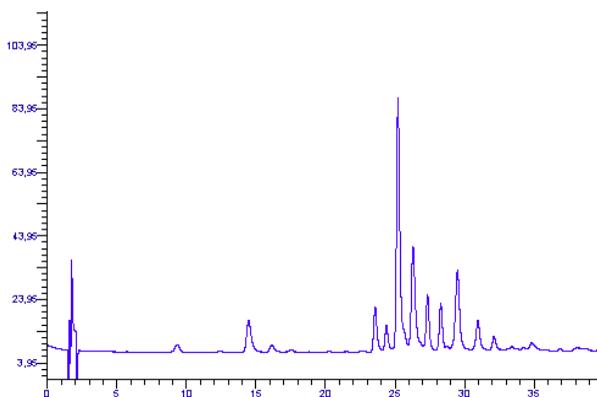
A figura 10 apresenta o cromatograma obtido no estudo de especificidade, na qual é possível observar que os componentes presentes no ultrafiltrado da formulação branca não interferiram na detecção do marcador químico de *C. pachystachya*, sendo o método considerado específico.

Figura 10 Cromatogramas da especificidade do método por CLAE. (A) nanocarreadores lipídicos brancos e (B) FECp

A)



B)



Precisão

Precisão é o termo utilizado para representar a habilidade do método em reproduzir resultados obtidos em uma série de medidas sob condições definidas ((INMETRO, 2003; ICH, 2005). A precisão foi avaliada em dois níveis diferentes: precisão intermediária e repetibilidade.

A precisão intermediária (precisão inter-dias) expressa os efeitos das variações metodológicas dentro do laboratório em diferentes dias

(BRASIL, 2003). A amostra foi analisada nas concentrações teóricas de 2, 5 e 10 µg/mL e foram injetadas no cromatógrafo três vezes em três dias diferentes. Os resultados da precisão intermediária referente à metodologia desenvolvida para os nanocarreadores lipídicos estão dispostos na tabela 12.

Tabela 11 Resultados obtidos na análise de precisão intermediária referente às concentrações teóricas (a) 2 µg/mL, (b) 5 µg/mL e (c) 10 µg/mL

Dias	Concentração (µg/mL)	Média (µg/mL)	DPR (%)
1 ^a	1,67		
2 ^a	1,62	1,66	1,74
3 ^a	1,68		
1b	5,41		
2b	5,44	5,44	0,57
3b	5,48		
1c	10,91		
2c	10,91	10,92	0,09
3c	10,93		

A repetibilidade refere-se à concordância dos resultados avaliados em medições sucessivas de um mesmo método dentro de um curto período de tempo (INMETRO, 2003; ICH, 2005). Para avaliar a repetibilidade do método, a concentração teste de 10 µg/mL foi injetada seis vezes no mesmo dia. Os resultados da repetibilidade referente à metodologia desenvolvida estão dispostos na tabela 13.

Os resultados de desvio padrão relativo (DPR) para o marcador foi inferior a 2,0 %, estando de acordo com o preconizado para este parâmetro, que admite uma variação máxima de 5,0 %.

Tabela 12 Dados de repetibilidade na concentração teórica de 10 µg/mL

Repetições	Concentração (µg/mL)	Média (µg/mL)	DPR (%)
1	10,91		
2	10,91		
3	10,93		
4	10,90	10,84	1,60
5	10,49		
6	10,92		

5.4.3 Determinação da eficiência de encapsulação e teor do marcador químico ISOO nos nanocarreadores por CLAE

A avaliação da eficiência de encapsulação e o teor de substância ativa na formulação são essenciais para o desenvolvimento tecnológico de um sistema nanoestruturado. Compreende-se por eficiência de encapsulação a porcentagem de fármaco incorporado no sistema carreador relativo ao fármaco total inicialmente adicionado, ou seja, essa determinação específica quanto da substância ativa está efetivamente associada às partículas e quanto permanece livre na fase dispersante. Por outro lado, o teor de fármaco refere-se à porcentagem de fármaco incorporado no sistema em relação ao peso total da fase lipídica (GASPAR et al., 1997; MUCHOW et al., 2008; VILLIERS et al., 2009)

Devido ao tamanho nanométrico, a determinação da eficiência de encapsulação de suspensões coloidais é considerada complexa. Para contornar essa dificuldade, a técnica de ultrafiltração-centrifugação é utilizada e consiste na utilização de uma membrana para separar a fase contínua (aquosa) das nanoestruturas sólidas por centrifugação (SCHAFFAZICK et al., 2003). A concentração livre da substância ativa é determinada no ultrafiltrado e a fração associada às nanoestruturas é calculada pela diferença entre a quantidade inicial e a quantidade livre detectada.

A Tabela 14 apresenta os valores de eficiência de encapsulação verificadas a partir da quantificação de ISOO e de teor de ISOO nos nanocarreadores preparados pela técnica de microemulsão. De acordo com a avaliação estatística, a eficiência de encapsulação e o teor de ISOO foram influenciados significativamente somente pela concentração de FECp ($p < 0,0001$) como demonstrado na tabela 8.

Tabela 13 Valores obtidos para a eficiência de encapsulação e teor de marcador dos nanocarreadores lipídicos (NCL) após planejamento experimental

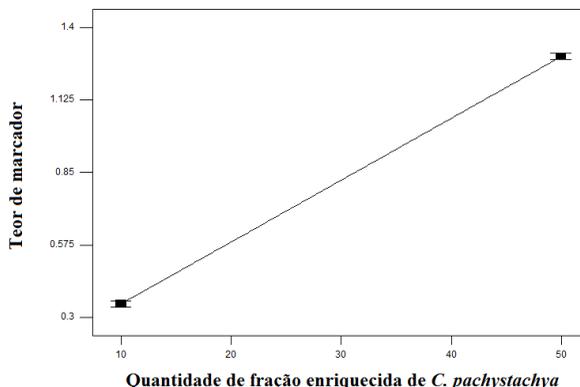
Formulação	Fatores				EE%	Teor (% _v , m/V)
	A	B	C	D		
NCL 1	10	15	5	9500	90,00	0,33
NCL 2	10	15	3	13500	95,05	0,34
NCL 3	10	180	5	9500	97,60	0,36
NCL 4	10	180	3	13500	96,50	0,36
NCL 5	25	15	5	9500	84,75	0,76
NCL 6	25	15	3	13500	79,65	0,71
NCL 7	25	180	5	9500	80,20	0,72
NCL 8	25	180	3	13500	78,30	0,70
NCL 9	50	15	5	9500	72,70	1,31
NCL 10	50	15	3	13500	72,90	1,28
NCL 11	50	180	5	9500	72,85	1,30
NCL 12	50	180	3	13500	69,65	1,25

A: Quantidade de FECp adicionada (mg); B: tempo de agitação da pré-emulsão (s); C: tempo de agitação da emulsão final (min); D: velocidade de agitação (rpm).

Os sistemas preparados neste trabalho mostraram valores elevados de eficiência de encapsulação e teor de ISOO. A eficiência de encapsulação indicou compatibilidade entre a fração enriquecida e a matriz lipídica dos NCL. Além das vantagens relacionadas à técnica de microemulsão, como facilidade de manuseio, processo de produção rápido e a ausência de necessidade de equipamentos especiais, esta também pode ser considerada eficiente em encapsular compostos hidrofílicos nos sistemas lipídicos. A encapsulação de substâncias hidrofílicas em matrizes lipídicas é um desafio, pois o fármaco tende a particionar para a fase aquosa durante o processo de produção (ZHANG et al., 2013), resultando normalmente em encapsulação ineficiente. Ghadiri e colaboradores (2012) desenvolveram um estudo para aumentar a eficiência de encapsulação da paromicina, uma molécula orgânica, altamente polar, utilizada para o tratamento da leishmaniose cutânea. Os autores compararam duas técnicas de preparação de nanopartículas lipídicas, microemulsão e difusão do solvente, e concluíram que os sistemas produzidos por microemulsão tiveram um valor significativamente mais elevado de eficiência de encapsulação. A capacidade de encapsulação de compostos hidrofílicos por sistemas lipídicos tem sido relacionada à incorporação da droga na camada de surfactante na superfície do carreador lipídico (TIYABOONCHAI et al.,

2007). Durante o processo de formação da partícula, o fármaco tende a migrar para a fase aquosa; entretanto, durante o resfriamento da emulsão O/A, a solubilidade em água do mesmo tende a diminuir, ocasionando o re-particionamento para a fase oleosa. Na etapa seguinte ocorre a recristalização do lipídio sólido de dentro para fora formando um núcleo sólido, não estando mais acessível para o fármaco que estava disponível na fase orgânica. Conseqüentemente, o mesmo fica mais concentrado na camada externa da partícula ou na camada superficial das partículas (MARQUELE-OLIVEIRA et al., 2010). Além disso, o lipídio sólido Compritol® tem sido relatado por conferir uma estrutura amorfa aos sistemas devido a sua composição rica em triglicerídeos e ácidos graxos (ROHIT; PAL, 2013), facilitando a acomodação do fármaco em um sistema nanoestruturado que não é cristalino.

Figura 11 Gráfico referente à resposta teor do marcador químico ISOO nos sistemas nanoestruturados



A figura 11 demonstra a influencia da quantidade de FECp adicionada para a resposta teor de ISOO. Como é possível observar, à medida que aumenta a concentração de FECp maiores teores são obtidos. Desta forma, quanto maior for o teor final, menor será o volume dos nanocarreadores necessário para veicular quantidade específica da FECp.

Finalmente, observando os resultados demonstrados na Tabela 9, é possível verificar um efeito contrário do aumento da quantidade da FECp adicionada à formulação sobre EE% e teor de ISOO: à medida que a quantidade inicial de FECp aumenta, há uma diminuição de EE% e um aumento do teor de marcador. Estes resultados são bastante

interessantes, principalmente considerando que uma pequena redução de EE% (de cerca de 80% a 72% para 25 e 50 mg de FECp, respectivamente) resultou em um aumento de cerca de 75% no teor de ISOO nos nanocarreadores (de 0,72 para 1,28).

Este aumento significativo no teor poderia indicar que a quantidade máxima a ser encapsulada ainda não teria sido atingida. Com isto em mente, novos experimentos foram conduzidos no sentido de avaliar um possível aumento na quantidade inicial de FECp. No entanto, quantidades mais elevadas de FECp tornaram a fase oleosa excessivamente viscosa, inviabilizando a preparação dos nanocarreadores nas condições experimentais propostas.

5.4.4 Otimização dos nanocarreadores lipídicos a partir do estudo de formulação

A otimização da formulação incluindo todas as respostas avaliadas no estudo anterior foi baseada na função de desejabilidade, que combina os níveis de respostas dos fatores avaliando um equilíbrio favorável entre as mesmas. A desejabilidade pode variar de 0 a 1, sendo que o limite superior corresponde a valores ótimos relacionados a todas as respostas (DERRINGER, 1980). A meta definida para esse estudo foi buscar o máximo valor de teor de ISOO, e os valores mínimos para tamanho e índice de polidispersão. A EE % não foi considerada neste estudo de otimização, pois todas as formulações apresentaram valores considerados elevados. O ponto ótimo encontrado pela avaliação dos resultados experimentais foi caracterizado por um valor de 0,704 mostrando que a formulação ótima, dentro do campo experimental estudado, pode ser obtida com 50 mg de FECp, tempo de agitação da pré-emulsão 15 segundos, tempo de agitação da emulsão final 5 minutos e velocidade de agitação 9500 rpm.

A formulação predita através do modelo matemático foi preparada em triplicata. Os valores teóricos preditos foram próximos às respostas dos experimentos executados. O tamanho teórico foi de 152 nm e o experimental 162 nm. A polidispersão sugerida pelo modelo matemático foi de 0,419, a experimental 0,382. O valor teórico para teor de ISOO foi de 1,30 %, enquanto o valor experimental foi de 1,31%. Os valores teóricos e aqueles obtidos experimentalmente para estes parâmetros estão demonstrados na Tabela 15.

Tabela 14 Comparação das respostas das formulações teóricas e experimental otimizadas

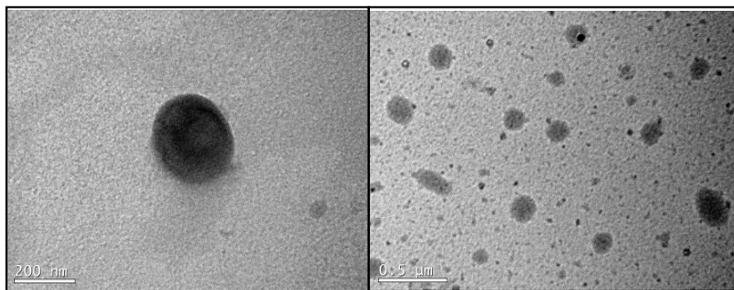
	Teor de ISOO (%, mg/mL)	Tamanho (nm)	PDI
Teórico	1,30	152	0,419
Experimental	1,31 ± 1,82	162 ± 0,06	0,382 ± 1,49

5.4.5 Avaliação da morfologia

A morfologia da formulação otimizada foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e pode ser visualizada na Figura 12. A MET é uma técnica amplamente utilizada para obter informações relativas à forma e ao tamanho de sistemas nanoparticulados.

As imagens obtidas revelaram partículas esféricas e o tamanho observado pela técnica de espalhamento de luz dinâmico também foi confirmado.

Figura 12 Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) para os nanocarreadores lipídicos



5.5 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO DO NANOCARREADOR LIPÍDICO

5.5.1 Solubilidade da FECp em tampão fosfato salino pH 7,4

A escolha do meio de liberação para os experimentos *in vitro* depende da solubilidade do fármaco, pois é necessária para manutenção das condições *sink*. Para a obtenção das condições *sink*, a quantidade do

meio de liberação deve corresponder a dez vezes o volume de meio necessário para obter uma solução saturada do analito testado (AULTON, 2005). Desta forma, é excluída a possibilidade de a solubilidade vir a ser um fator limitante para a liberação e, assim, comprometer a validade do estudo.

A solubilidade da fração enriquecida de *C.pachystachya*, verificada a partir da quantificação de ISOO, em tampão fosfato salino pH 7,4, encontrada experimentalmente, foi de 536 µg/mL. Assim, de modo a atender as condições *sink* exigidas para o ensaio de liberação *in vitro*, uma alíquota de 10 mL do nanocarreador lipídico (que contém 2500 µg de ISOO) foi adicionado a 90 mL de tampão fosfato pH 7,4.

5.5.2 Avaliação do perfil de liberação *in vitro* do sistema nanoestruturado

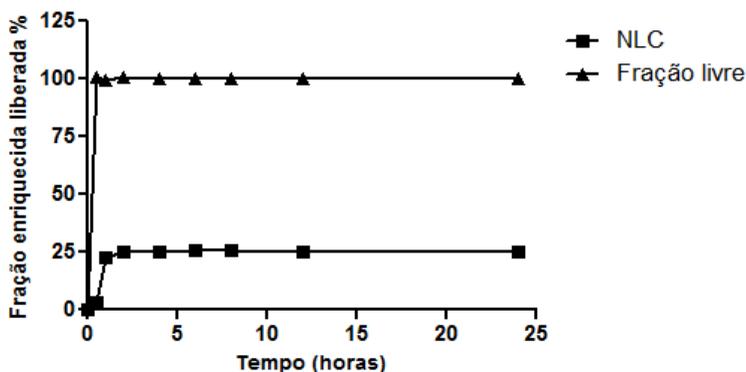
Para o desenvolvimento de carreadores coloidais, o conhecimento da velocidade e da proporção de liberação do fármaco a partir do sistema é de grande interesse. Com estes dados é possível inferir o comportamento do sistema *in vivo*, e também o mecanismo de liberação do fármaco a partir da partícula (WASHINGTON, 1989). Entre os fatores que influenciam a cinética de liberação das partículas destacam-se a concentração do fármaco e a mistura dos lipídios utilizados (SOUTO et al., 2004)

Através do resultado obtido para o perfil de liberação foi possível observar que houve uma rápida liberação na primeira hora de análise, o que pode ser atribuído à fração não encapsulada e a fração adsorvida na superfície das partículas (BHANDARI; KAUR, 2013; MUSSI et al., 2013). Rohit e colaboradores (2013) atribuíram à liberação inicial da isoniazida, um fármaco altamente hidrofílico, a sua incorporação em partes na camada superficial das partículas. Após a liberação inicial, não houve liberação até o final do experimento, 24 horas no total. Sugere-se que esse perfil de liberação ocorra devido à localização da FECp no núcleo lipídico dos nanocarreadores, que é formado basicamente por Compritol®888 ATO. Este lipídio é um excipiente altamente lipofílico tradicionalmente utilizado em formas farmacêuticas como lubrificante (OPOTA et al., 2013) e descrito na literatura para a liberação controlada a partir de sistemas lipofílicos (ZHANG et al., 2014). Esse efeito sobre a liberação é atribuído ao comprimento da sua cadeia carbonada, constituída de 69 unidades de carbono (ROHIT; PAL, 2013).

A Figura 13 apresenta os perfis de liberação dos nanocarreadores obtidos e de uma quantidade semelhante da FECp em 24 horas. A

liberação total do FECp no primeiro tempo avaliado demonstra que não houve impedimento para a difusão dos marcadores nas condições de ensaio.

Figura 13 Perfil de liberação dos nanocarreadores lipídicos contendo FECp



5.5.3 Avaliação do estudo de permeação

A administração cutânea de fármacos é reconhecidamente uma via não-invasiva e com inúmeras vantagens. Entretanto a administração cutânea apresenta uma grande limitação, que está relacionada com a excelente resistência à penetração de moléculas no estrato córneo. Conseguir ultrapassar a barreira do estrato córneo é um grande desafio no desenvolvimento de formulações transdérmicas (WOHLRAB et al., 2011; ELSHAFEEY et al., 2012). Inúmeras estratégias têm sido investigadas para melhorar a entrega de fármacos na pele, entre estas a utilização de promotores químicos ou o uso de sistemas nanoestruturados. Alternativamente aos promotores de permeação sugeriram os sistemas nanoestruturados que possuem como característica aumentar a absorção de fármacos e a possibilidade da liberação prolongada, além da proteção contra degradação química.

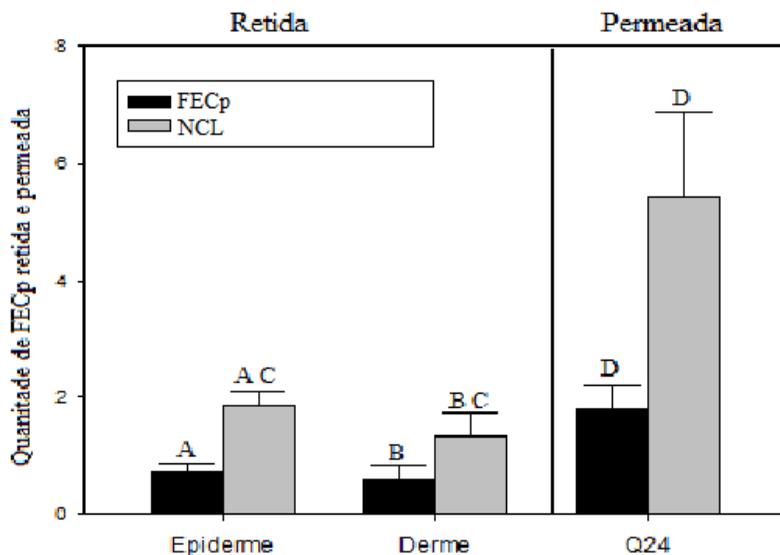
As propriedades físico-químicas dos nanocarreadores tais como tamanho, área superficial e características dos materiais utilizados na formulação parecem exercer influência na permeação da pele pelos sistemas (DESAI et al., 2010).

Com o objetivo de verificar a habilidade dos nanocarreadores lipídicos sólidos em liberar a FECp na pele, estudos de permeação *ex vivo* foram realizados utilizando células de difusão tipo Franz. Neste experimento, uma alíquota (2,0 mL) da formulação, contendo 50 mg de fração (equivalente a 500 µg de ISOO) foi aplicada no compartimento doador da célula de difusão, garantindo condições *sink*. A quantidade da fração permeada através da pele de orelha suína após 24 horas (Q24) está representada na figura 14.

A permeação cutânea da fração enriquecida a partir do nanocarreador lipídico foi cerca de três vezes superior à observada para a fração livre de *C. pachystachya*. Essa maior permeação das partículas com relação à fração livre esta em consonância com dados da literatura que demonstram a capacidade dos NCL em melhorar a permeação cutânea dos fármacos. No estudo realizado por Bose e colaboradores (2013), os autores evidenciaram o aumento da permeação cutânea da quercetina, um flavonoide com estrutura semelhante à ISOO, quando encapsulada em nanopartículas lipídicas, em comparação com a molécula livre.

Outro fato a ser destacado é que, este marcador químico apresenta um baixo valor de log P (-0,33), o que confere características hidrofílicas à molécula, o que pode contribuir para uma baixa absorção transdérmica, já que moléculas lipofílicas apresentam maior afinidade pelos componentes da pele. Como esperado, uma maior retenção nas camadas da pele foi observada em relação à fração livre. Provavelmente este efeito está relacionado com a natureza lipídica do sistema nanoestruturado.

Figura 14 Quantidade de ISOQ permeada (Q24) e retida na derme e epiderme após administração tópica de fração livre e sistema nanoparticulado de *Cecropia pachystachya*



a) $p < 0,0001$; b) $p < 0,0026$; c) $p < 0,0196$; d) $p < 0,0001$

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Extratos obtidos por turboextração apresentaram maiores teores de isoorientina (ISOO) e isovitexina (ISOV) utilizando 5 % (p/V) de MPV e etanol 20 % (V/V) como líquido extrator.

Uma fração enriquecida em flavonoides (FECp) foi obtida e apresentou teores de ISOO e ISOV mais elevados comparados ao extrato bruto.

No estudo de formulação realizado a partir de planejamento fatorial, somente a quantidade de FECp adicionada teve influencia sobre o tamanho de partícula, eficiência de encapsulação e teor de ISOO dos sistemas desenvolvidos.

O tamanho das partículas variou entre 97-179 nm com um índice de polidispersão na faixa de 0,3-0,4, indicando uma baixa dispersão de tamanhos. O potencial zeta para todas as formulações apresentou valores negativos com um valor médio de -17 Mv.

Os valores de EE% para as formulações variaram entre 69,6 a 97,6%. Apesar da aparente disparidade, estes altos valores são considerados elevados, revelando uma capacidade satisfatória dos nanocarreadores em incorporar a FECp.

O teor de ISOO nas formulações variou de 0,33 a 1,31 mg/100 mL de nanocarreadores, sendo que, a medida que a quantidade de FECp aumentou, maiores teores de ISOO foram obtidos.

Os resultados experimentais obtidos na caracterização da formulação otimizada foram semelhantes àqueles estimados pelo *software*, comprovando a robustez e a capacidade preditiva do delineamento experimental para otimização dos nanocarreadores.

As micrografias de microscopia eletrônica de transmissão evidenciaram a formação de partículas esféricas.

Para o sistema nanoestruturado desenvolvido neste estudo não foi evidenciado liberação da FECp em 24 horas, o que pode estar relacionado à alta lipofilicidade do lipídio sólido, Compritol[®]. A liberação inicial (25% no tempo de 1 hora) pode ser atribuída à FECp livre.

O estudo de permeação evidenciou um efeito benéfico da nanoencapsulação sobre a penetração cutânea FECp. Sendo assim, estes nanocarreadores despontam como sistemas promissores para a administração tópica de FECp.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ADITYA, N. P.; MACEDO, A. S.; DOKTOROVOVA, S.; SOUTO, E. B.; KIM, S.; CHANG, P.-S.; KO, S. Development and evaluation of lipid nanocarriers for quercetin delivery: A comparative study of solid lipid nanoparticles (SLN), nanostructured lipid carriers (NLC), and lipid nanoemulsions (LNE). **Food Science and Technology**, v. 59, n. 1, p. 115-121, 2014.

AGRAWAL, Y.; PETKAR, K. C.; SAWANT, K. K. Development, evaluation and clinical studies of Acitretin loaded nanostructured lipid carriers for topical treatment of psoriasis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 401, n. 1-2, p. 93-102, 2010.

ALMEIDA, R. R.; RAIMUNDO, J. M.; OLIVEIRA, R. R.; KAPLAN, M. A. C.; GATTAS, C. R.; SUDO, R. T.; SUDO, G. Z. Activity of *Cecropia Lyratiloba* extract on contractility of cardiac and smooth muscles in wistar rats **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, p. 109-113, 2006.

ARAGÃO; GUARIZE, L.; LANINI, J.; DA COSTA, J.; GARCIA, R.; SCIO, E. Hypoglycemic effects of *Cecropia pachystachya* in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 3, p. 629-633, 2010.

ARAGÃO, D. M. O.; GUARIZE, L.; LANINI, J.; COSTA, J. C.; GARCIA, R. M. G.; SCIO, E. Hypoglycemic effects of *Cecropia pachystachya* in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 629-633, 2010.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. (Pharmaceutics: The science of dosage forms design). Porto Alegre, 2005. (Tradução: ORTEGA, G.G. et al.).

BALZAN, S.; HERNANDES, A.; REICHERT, C. L.; DONADUZZI, C.; PIRES, V. A.; GASPAROTTO JUNIOR, A.; CARDOZO JUNIOR, E. L. Lipid-lowering effects of standardized extracts of *Ilex paraguariensis* in high-fat-diet rats. **Fitoterapia**, v. 86, n. 0, p. 115-122, 2013.

BAROLI, B. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: Fiction or reality? **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 1, p. 21-50, 2010.

BARRY, B. W. Dermatological Formulation. Percutaneous absorption. **Drug and Pharmaceutical Science** v. 50, p. 480, 1983.

BHANDARI, R.; KAUR, I. P. Pharmacokinetics, tissue distribution and relative bioavailability of isoniazid-solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 441, n. 1-2, p. 202-212, 2013.

BIGLIANI, M. C.; GRONDONA, E.; ZUNINO, P. M.; PONCE, A. A. Effects of *Cecropia pachystachya* and *Larrea divaricata* aqueous extracts in mice. **Human and Experimental Toxicology**, v. 29, p. 601-606, 2010.

BOLZINGER, M. A.; BRIANÇON, S.; PELLETIER, J.; CHEVALIER, Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, n. 3, p. 156-165, 2012.

BOSE, S.; DU, Y.; TAKHISTOV, P.; MICHNIAK-KOHN, B. Formulation optimization and topical delivery of quercetin from solid lipid based nanosystems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 441, n. 1-2, p. 56-66, 2013.

BRANDÃO, M. G. L.; ZANETTI, N. N. S.; OLIVEIRA, P.; GRAEL, C. F. F.; SANTOS, A. C. P.; MONTE-MÓR, R. L. M. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 141-148, 2008.

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

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 5ª edição. São Paulo: 2010.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. D. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos estratégia e discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

BRUXEL; MANOELA LAUX, L. B. W.; MICHELLE FRAGA; KOESTER, L. S.; TEIXEIRA, H. F. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827-1840, 2012.

BUNDESVEREINIGUNG Deutscher Apothekerverbaende (Hrgs.) **Deutsche Arzneimittel - Codex. Frankfurt: Govi, Stuttgart: Deutscher Apotheker**, 1986. v.1: Codex-Probe 4, p. 9.

CAL, K.; CENTKOWSKA, K. Use of cyclodextrins in topical formulations: Practical aspects. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 3, p. 467-478, 2008.

CASTRO, G. A.; COELHO, A. L. L. R.; OLIVEIRA, C. A.; MAHECHA, G. A. B.; ORÉFICE, R. L.; FERREIRA, L. A. M. Formation of ion pairing as an alternative to improve encapsulation and stability and to reduce skin irritation of retinoic acid loaded in solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 381, n. 1, p. 77-83, 2009.

CAVALLI, R.; MARENGO, E.; CAPUTO, O.; UGAZIO, E.; GASCO, M. R. The effect of alcohols with different structures on the formation of warm o/w microemulsions. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 17, n. 7, p. 717-734, 1996/01/01 1996.

CONSOLINI; MIGLIORI. Cardiovascular effects of the South American medicinal plant *Cecropia pachystachya* (ambay) on rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 3, p. 417-422, 2005.

CONSOLINI; RAGONE, M. I.; MIGLIORI, G. N.; CONFORTI, P.; VOLONTÉ, M. G. Cardiotonic and sedative effects of *Cecropia pachystachya* Mart. (ambay) on isolated rat hearts and conscious mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 1, p. 90-96, 2006.

COSTA; ORTMANN, C. F.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H. An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* Species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 1096-1102, 2011.

COSTA, G. M. **Estudo fitoquímico comparativo entre *Cecropia glaziovii* Sneth. e *Cecropia pachystachya* Trécul.** 2009. (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Farmácia, UFSC, Florianópolis.

COSTA, G. M.; ORTMANN, C. F.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H. An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society** v. 22, n. 6, p. 1096-1102, 2011.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta -General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

DATE, A. A.; VADOR, N.; JAGTAP, A.; NAGARSENKER, M. S. Lipid nanocarriers (GeluPearl) containing amphiphilic lipid Gelucire 50/13 as a novel stabilizer: fabrication, characterization and evaluation for oral drug delivery*. **Nanotechnology**, v. 22, n. 27, 2011.

DE OLIVEIRA ARAGÃO, D. M.; DE ASSIS LIMA, I. V.; DA SILVA, J. M.; BELLOZI, P. M. Q.; DE CARVALHO DA COSTA, J.; CARDOSO, G. M. M.; DE SOUZA-FAGUNDES, E. M.; SCIO, E. Anti-Inflammatory, antinociceptive and cytotoxic effects of the methanol extract of *Cecropia pachystachya* Trécul. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 6, p. 926-930, 2013.

DERRINGER, G. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Tecnology**, v. 12, p. 214-220, 1980.

DESAI, P.; PATLOLLA, R. R.; SINGH, M. Interaction of nanoparticles and cell-penetrating peptides with skin for transdermal drug delivery. **Molecular Membrane Biology**, v. 27, n. 7, p. 247-259, 2010.

DI STASI, L. C.; OLIVEIRA, G. P.; CARVALHAES, M. A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O. S.; KAKINAMI, S. H.; REIS, M. S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v. 73, n. 1, p. 69-91, 2002.

EL MAGHRABY, G. M.; BARRY, B. W.; WILLIAMS, A. C. Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, n. 4-5, p. 203-222, 2008.

ELSHAFEEY, A. H.; HAMZA, Y. E.; AMIN, S. Y.; ZIA, H. In vitro transdermal permeation of fenoterol hydrobromide. **Journal of Advanced Research**, v. 3, n. 2, p. 125-132, 2012.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: UFSC, E. U. E. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 6º ed. Porto Alegre/ Florianópolis 2010. cap. 12,

FREITAS, C.; MÜLLER, R. H. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLNTM) dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 168, n. 2, p. 221-229, 1998.

GAINZA, G.; BONAFONTE, D. C.; MORENO, B.; AGUIRRE, J. J.; GUTIERREZ, F. B.; VILLULLAS, S.; PEDRAZ, J. L.; IGARTUA, M.; HERNANDEZ, R. M. The topical administration of rhEGF-loaded nanostructured lipid carriers (rhEGF-NLC) improves healing in a porcine full-thickness excisional wound model. **Journal of Controlled Release**, v. 197, n. 0, p. 41-47, 2015.

GASPAR, M. M.; BLANCO, D.; CRUZ, M. E. M.; ALONSO, M. J. Formulation of L-asparaginase-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of polymer properties on enzyme loading, activity and in vitro release. **Journal of Controlled Release**, v. 52, p. 53-62, 1997.

GAZAL, M.; ORTMANN, C. F.; MARTINS, F. A.; STRECK, E. L.; QUEVEDO, J.; DE CAMPOS, A. M.; STEFANELLO, F. M.; KASTER, M. P.; GHISLENI, G.; REGINATTO, F. H.; LENCINA, C. L. Antidepressant-like effects of aqueous extract from *Cecropia pachystachya* leaves in a mouse model of chronic unpredictable stress. **Brain Research Bulletin**, v. 108, n. 0, p. 10-17, 2014.

GHADIRI, M.; FATEMI, S.; VATANARA, A.; DOROUD, D.; NAJAFABADI, A. R.; DARABI, M.; RAHIMI, A. A. Loading hydrophilic drug in solid lipid media as nanoparticles: Statistical modeling of entrapment efficiency and particle size. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 424, n. 1-2, p. 128-137, 2012.

GODIN, B.; TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 11, p. 1152-1161, 2007.

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 15, p. 1638-1649, 2008.

HAN, F.; YIN, R.; CHE, X.; YUAN, J.; CUI, Y.; YIN, H.; LI, S. Nanostructured lipid carriers (NLC) based topical gel of flurbiprofen: Design, characterization and in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 439, n. 1–2, p. 349-357, 2012.

HARDING, C. R. The stratum corneum: structure and function in health and disease. **Dermatologic Therapy**, v. 17, p. 6-15, 2004.

HU, F.-Q.; JIANG, S.-P.; DU, Y.-Z.; YUAN, H.; YE, Y.-Q.; ZENG, S. Preparation and characteristics of monostearin nanostructured lipid carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 314, n. 1, p. 83-89, 2006.

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

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008** 2003.

JACOBI, U.; KAISER, M.; TOLL, R.; MANGELSDORF, S.; AUDRING, H.; OTBERG, N.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Porcine ear skin: an in vitro model for human skin. **Skin Research and Technology**, v. 13, n. 1, p. 19-24, 2007.

JENNING, V.; MÄDER, K.; GOHLA, S. H. Solid lipid nanoparticles (SLN™) based on binary mixtures of liquid and solid lipids: a 1H-NMR study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 205, n. 1–2, p. 15-21, 2000.

JORGE, L. I. F.; MARKMAN, B. E. O.; FERRO, V. D. O. Elementos histológicos característicos de *Cecropia pachystachya* Trécul (embaúba). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 7-8, p. 35-40, 1998.

JOSHI, M.; PATRAVALE, V. Nanostructured lipid carrier (NLC) based gel of celecoxib. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 346, n. 1–2, p. 124-132, 2008.

JUNYAPRASERT, V. B.; TEERANACHAIDEEKUL, V.; SOUTO, E. B.; BOONME, P.; MÜLLER, R. H. Q10-loaded NLC versus nanoemulsions: Stability, rheology and in vitro skin permeation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 377, n. 1–2, p. 207-214, 2009.

KHERADMANDNIA, S.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; NOSRATI, M.; ATYABI, F. Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, n. 6, p. 753-759, 2010.

KHURANA, S.; JAIN, N. K.; BEDI, P. M. S. Development and characterization of a novel controlled release drug delivery system based on nanostructured lipid carriers gel for meloxicam. **Life Sciences**, v. 93, n. 21, p. 763-772, 2013.

LACAILLE-DUBOIS, M. A.; FRANCK, U.; WAGNER, H. Search for potential Angiotensin Converting Enzyme (ACE)-inhibitors from plants. **Phytomedicine**, v. 8, n. 1, p. 47-52, 2001.

LIEDTKE, S.; WISSING, S.; MÜLLER, R. H.; MÄDER, K. Influence of high pressure homogenisation equipment on nanodispersions characteristics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 196, n. 2, p. 183-185, 2000.

LIMA-LANDMAN, M. T. R.; BORGES, A. C. R.; CYSNEIROS, R. M.; DE LIMA, T. C. M.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J. Antihypertensive effect of a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth in rats: An in vivo approach to the hypotensive mechanism. **Phytomedicine**, v. 14, n. 5, p. 314-320, 2007.

LIU, C. H.; WU, C.-T. Optimization of nanostructured lipid carriers for lutein delivery. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 353, n. 2–3, p. 149-156, 2010.

LIU, X.; TESTA, B.; FAHR, A. Lipophilicity and its relationship with passive drug permeation. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 5, p. 962-977, 2011/05/01 2011.

MÄDER, K.; MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles concepts, procedures and physicochemical aspects. **Lipospheres in Drug Targets and Delivery: Approaches, Methods and Applications**, 2005. p.1-22.

MAITY, N.; NEMA, N. K.; SARKAR, B. K.; MUKHERJEE, P. K. Standardized clitoria ternatea leaf extract as hyaluronidase, elastase and matrix-metalloproteinase-1 inhibitor. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 44, n. 5, p. 584-587, Sep-Oct 2012.

MARQUELE-OLIVEIRA, F.; DE ALMEIDA SANTANA, D. C.; TAVEIRA, S. F.; VERMEULEN, D. M.; MORAES DE OLIVEIRA, A. R.; DA SILVA, R. S.; LOPEZ, R. F. V. Development of nitrosyl ruthenium complex-loaded lipid carriers for topical administration: improvement in skin stability and in nitric oxide release by visible light irradiation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, n. 4, p. 843-851, 2010.

MARTINS, S.; SARMENTO, B.; FERREIRA, D. C.; SOUTO, E. B. Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery – liposomes versus lipid nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 2, n. 4, p. 595-607, 2007.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n. 2–3, p. 165-196, 2001.

MENDONÇA, C. R. B.; BICA, C. I. D.; PIATNICKI, C. M. S. Water in soybean oil microemulsions as medium for electrochemical measurements. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 628-636, 2003.

MENON, G. K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, Supplement, n. 0, p. S3-S17, 2002.

MIRHOSSEINI, H.; TAN, C. P.; HAMID, N. S. A.; YUSOF, S. Effect of Arabic gum, xanthan gum and orange oil contents on ζ -potential, conductivity, stability, size index and pH of orange beverage emulsion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 315, n. 1-3, p. 47-56, 2008.

MODOLO, L. V.; DE SOUZA, A. X.; HORTA, L. P.; ARAUJO, D. P.; DE FÁTIMA, Â. An overview on the potential of natural products as ureases inhibitors: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 1, p. 35-44, 2015.

MOHANRAJ, V.; CHEN, Y. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, p. 561-573, 2006.

MOJAHEDIAN, M. M.; DANESHAMOZ, S.; SAMANI, S. M.; ZARGARAN, A. A novel method to produce solid lipid nanoparticles using n-butanol as an additional co-surfactant according to the o/w microemulsion quenching technique. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 174, n. 0, p. 32-38, 2013.

MUCHOW, M.; MAINCENT, P.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles with a solid matrix (SLN®, NLC®, LDC®) for oral drug delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 34, p. 1394-1405, 2008.

MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 161-177, 2000.

MÜLLER, R. H.; PETERSEN, R. D.; HOMMOSS, A.; PARDEIKE, J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 522-530, 2007.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, n. 1-2, p. 121-128, 2002.

MUSSI, S. V.; SILVA, R. C.; OLIVEIRA, M. C. D.; LUCCI, C. M.; AZEVEDO, R. B. D.; FERREIRA, L. A. M. New approach to improve encapsulation and antitumor activity of doxorubicin loaded in solid lipid nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 1-2, p. 282-290, 2013.

NEGI, L. M.; JAGGI, M.; TALEGAONKAR, S. Development of protocol for screening the formulation components and the assessment of common quality problems of nano-structured lipid carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 461, n. 1-2, p. 403-410, 2014.

NEMEN, D. **Sistemas nanoestruturados lipídicos contendo resveratrol [dissertação]: preparação, caracterização e avaliação da penetração cutânea**. 2010. (Dissertação). Programa de Pós Graduação em Farmácia, UFSC, Florianópolis.

NUNES, R. D. S.; SANTANA, D. P. D.; PAULINO, U.; XAVIER, H. S. Padronização Botânica de *Lippia sidoides Cham* (Verbenaceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 19, p. 115-118, 2000.

OBEIDAT, W. M.; SCHWABE, K.; MÜLLER, R. H.; KECK, C. M. Preservation of nanostructured lipid carriers (NLC). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, n. 1, p. 56-67, 2010.

OLBRICH, C.; MÜLLER, R. H. Enzymatic degradation of SLN—effect of surfactant and surfactant mixtures. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 180, n. 1, p. 31-39, 1999.

OPOTA, D. O.; KALOUSTIAN, J.; SENGA, P. K.; VEMBA, A. T.; CIMANGA, R. K. The efficiency of glyceryl behenate as sustained-release agent compared with hydroxypropylcellulose in tablets. **International Journal of PharmTech Research**, v. 5, p. 622-628, 2013.

ORTMANN, C. F. **Avaliação da estabilidade de extrato, fração e flavonóides C-glicosídeos presentes em *Cecropia glaziovii***. 2013. 122 Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PANDEY, R.; GAUTAM, A. K.; BHARGAVAN, B.; TRIVEDI, R. Total extract and standardized fraction from the stem bark of *Butea monosperma* have osteoprotective action: evidence for the nonestrogenic osteogenic effect of the standardized fraction. **Menopause**, v. 17, p. 602-610, 2010.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366, n. 1–2, p. 170-184, 2009.

PATHAK, P.; NAGARSENKER, M. Formulation and Evaluation of Lidocaine Lipid Nanosystems for Dermal Delivery. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 10, n. 3, p. 985-992, 2009.

PIO, M. C. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Rio de Janeiro: 1978.

PUGLIA, C.; BLASI, P.; RIZZA, L.; SCHOUBBEN, A.; BONINA, F.; ROSSI, C.; RICCI, M. Lipid nanoparticles for prolonged topical delivery: An in vitro and in vivo investigation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 357, n. 1–2, p. 295-304, 2008.

RAWAT, P.; KUMAR, M.; RAHUJA, N.; SRIVASTAVA, D. S. L.; SRIVASTAVA, A. K.; MAURYA, R. Synthesis and antihyperglycemic activity of phenolic C-glycosides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 1, p. 228-233, 2011.

ROHIT, B.; PAL, K. I. A method to prepare solid lipid nanoparticles with improved entrapment efficiency of hydrophilic drugs. **Current Nanoscience** v. 9, 2013.

ROSCA, I. D.; WATARI, F.; UO, M. Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation. **Journal of Controlled Release**, v. 99, n. 2, p. 271-280, 2004.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients** Washington: 2009.

SATO, M. E. O.; GOMARA, F.; PONTAROLO, R.; ANDREAZZA, I. F.; ZARONI, M. Permeação cutânea in vitro do ácido kójico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 195-203, 2007.

SCHÄFER-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H. C. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 427-443, 2007.

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

SCHINELLA; AQUILA, S.; DADE, M.; GINER, R.; DEL CARMEN RECIO, M.; SPEGAZZINI, E.; DE BUSCHIAZZO, P.; TOURNIER, H.; RÍOS, J. L. Anti-inflammatory and apoptotic activities of pomolic acid isolated from *Cecropia pachystachya*. **Planta Medica**, v. 74, n. 03, p. 215-220, 17.03.2008 2008.

SCHWARZ, J. C.; BAISAENG, N.; HOPPEL, M.; LÖW, M.; KECK, C. M.; VALENTA, C. Ultra-small NLC for improved dermal delivery of coenzyme Q10. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 447, n. 1-2, p. 213-217, 2013.

SHAMMA, R. N.; ABURAHMA, M. H. Follicular delivery of spironolactone via nanostructured lipid carriers for management of alopecia. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 5449-5460, 2014.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: ED. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento** Porto Alegre, 2010.

SOUSA, A. D.; BRITO, E. S. D. Effect of treatment with adsorbent resin on the volatile profile and physicochemical characteristics of clarified cashew apple juice. **Food Science and Technology**, v. 33, p. 619-623, 2013.

SOUTO, E. B.; WISSING, S. A.; BARBOSA, C. M.; MÜLLER, R. H. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, n. 1, p. 71-77, 2004.

SOUZA, L. G.; SILVA, E. J.; MARTINS, A. L. L.; MOTA, M. F.; BRAGA, R. C.; LIMA, E. M.; VALADARES, M. C.; TAVEIRA, S. F.; MARRETO, R. N. Development of topotecan loaded lipid nanoparticles for chemical stabilization and prolonged release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 1, p. 189-196, 2011.

TAMJIDI, F.; SHAHEDI, M.; VARSHOSAZ, J.; NASIRPOUR, A. Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 19, n. 0, p. 29-43, 2013.

TANAE, M. M.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; DE LIMA, T. C. M.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J. Chemical standardization of the aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth endowed with antihypertensive, bronchodilator, antiacid secretion and antidepressant-like activities. **Phytomedicine**, v. 14, n. 5, p. 309-313, 2007.

TANOJO, H.; ROEMELÉ, P. E. H.; VAN VEEN, G. H.; STIELTJES, H.; JUNGINGER, H. E.; BODDÉ, H. E. New design of a flow-through permeation cell for studying in vitro permeation studies across biological membranes. **Journal of Controlled Release**, v. 45, n. 1, p. 41-47, 1997.

TIWARI, R.; PATHAK, K. Nanostructured lipid carrier versus solid lipid nanoparticles of simvastatin: Comparative analysis of characteristics, pharmacokinetics and tissue uptake. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 415, n. 1-2, p. 232-243, 2011.

TIYABOONCHAI, W.; TUNGPRADIT, W.; PLIANBANGCHANG, P. Formulation and characterization of curcuminoids loaded solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 337, n. 1-2, p. 299-306, 2007.

UCHÔA, V. T.; DE PAULA, R. C.; KRETTLI, L. G.; SANTANA, A. E. G.; KRETTLI, A. U. Antimalarial activity of compounds and mixed fractions of *Cecropia pachystachya*. **Drug Development Research**, v. 71, n. 1, p. 82-91, 2010.

VELÁZQUEZ, E.; TOURNIER, H. A.; BUSCHIAZZO, P. M.; SAAVEDRA, G.; SCHINELLA, G. R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**, v. 74, p. 91-97, 2002.

VIEGAS, C.; BOLZANI, V. D. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.

VILLIERS, M. M. D.; ARAMWIT, P.; KWON, G. S. **Nanotechnology in Drug Delivery**. Madison, WI, USA: 2009.

WASHINGTON, C. Evaluation of non-sink dialysis methods for the measurement of drug release from colloids: effects of drug partition. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 56, n. 1, p. 71-74, 1989.

WISSING, S. A.; KAYSER, O.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 9, p. 1257-1272, 2004.

WISSING, S. A.; MÜLLER, R. H. The influence of solid lipid nanoparticles on skin hydration and viscoelasticity – in vivo study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, n. 1, p. 67-72, 2003.

WOHLRAB, J.; KREFT, B.; TAMKE, B. Skin tolerability of transdermal patches. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 8, n. 7, p. 939-948, 2011.

ZHAI, Y.; ZHAI, G. Advances in lipid-based colloid systems as drug carrier for topic delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 193, n. 0, p. 90-99, 2014.

ZHANG, C.; GU, C.; PENG, F.; LIU, W.; WAN, J.; XU, H.; LAM, C. W.; YANG, X. Preparation and optimization of triptolide-loaded solid lipid nanoparticles for oral delivery with reduced gastric irritation. **Molecules**, v. 18, n. 1420-3049 p. 1340-1356, 2013.

ZHANG, C.; PENG, F.; LIU, W.; WAN, J.; WAN, C.; XU, H.; LAM, C. W.; YANG, X. Nanostructured lipid carriers as a novel oral delivery system for triptolide: induced changes in pharmacokinetics profile associated with reduced toxicity in male rats. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1049-1063, 2014.