

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE - UNICENTRO
DOUTORADO ASSOCIADO EM QUÍMICA UEL/UEPG/UNICENTRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE QUÍMICA - PPGQ

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA
DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS CONTENDO CRISINA**

THIELLEN WROBEL KULTZ DE LIMA

Guarapuava

2021

THIELLEN WROBEL KULTZ DE LIMA

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA
DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS CONTENDO CRISINA**

Tese de Doutorado apresentada à

UNICENTRO, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Doutorado em Química – Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil

Co-orientadora: Prof. Dra. Rubiana Mara Mainardes

Guarapuava

2021

Catálogo na Publicação
Rede de Bibliotecas da Unicentro

L732d Lima, Thiellen Wrobel Kultz de
Desenvolvimento, caracterização e avaliação biológica de nanopartículas lipídicas contendo crisina / Thiellen Wrobel Kultz de Lima. -- Guarapuava, 2021.
xvii, 121 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Química. Área de concentração: Química Aplicada, 2021.

Orientador: Najeh Maissar Khalil
Coorientadora: Rubiana Mara Mainardes

Banca examinadora: Luiz Fernando Cótica, Maria Lurdes Felsner, Giovani Marino Favero, Ricardo Yoshimitsu Miyahara

Bibliografia

1. Nanopartículas sólidas lipídicas. 2. Crisina. 3. Farmacocinética.
I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Química.

CDD 540

THIELLEN WROBEL KULTZ DE LIMA

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO
BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS CONTENDO
CRISINA**

Tese apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, para a obtenção do título de Doutor.

Aprovado em 23 de julho de 2021.

Prof. Dr. Luiz Fernando Cótica – UEM

Prof^ª. Dr^ª. Maria Lurdes Felsner – Unicentro

Prof. Dr. Giovani Marino Favero – UEPG

Prof. Dr. Ricardo Yoshimitsu Miyahara - Unicentro

Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil – Orientador

GUARAPUAVA-PR

2021

Dedico este trabalho à minha família: ao meu pai Valmir, à minha mãe Rosa, à minha irmã Thainá e a seu marido Cristian, ao meu marido Filipe e à minha filha Maitê, que nesta época ainda está em meu ventre!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao meu Deus Todo Poderoso, visto que sem o seu favor sobre a minha vida durante todo o período de desenvolvimento deste projeto à tese, eu possivelmente não concluiria esta etapa em minha vida. Muito obrigada Senhor pelo presente maravilhoso que é minha filha Maitê, que neste momento está sendo formada perfeitamente em meu ventre. Obrigada Deus pelo seu favor imerecido.

Agradeço também aos meus pais, Rosa e Valmir, que, desde o ensino infantil, sempre me incentivaram e apoiaram nos estudos e na carreira acadêmica. Obrigada pelo exemplo de fé, dedicação, amor e apoio que sempre recebi de vocês. Amo vocês com amor imensurável. Agradeço também à minha irmã, Thainá, e ao meu cunhado Cristian pelo apoio e incentivo de sempre, amo muito vocês também.

Ao meu marido, Filipe, eu agradeço imensamente por ser meu ombro, por me incentivar até cansar e por me aguentar em todos esses quatro anos de caminhada, sei que não foi um período fácil para nós, mas agradeço muito tudo o que fez e faz por mim e pela nossa pequena todos os dias. Amo-te infinitamente.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Najeh, por toda a confiança depositada em mim desde a escrita do projeto de doutorado até agora nesse momento de finalização do doutorado. Obrigada por todos os conhecimentos repassados, não somente acadêmicos como pessoais também. O meu muito obrigada!

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Rubiana, os meus sinceros agradecimentos por todas as vezes que a procurei e fui prontamente atendida, bem como pela troca de experiências durante todo esse processo. Obrigada!

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Nanotecnologia, Dani Renzi, Dani Campos, Laís, Vanessa, Erica, Eduardo, Rossana, Chris, Camila D., etc, os meus agradecidos sem tamanho, obrigada sempre pelas trocas de experiências, pelas conversas, distrações e principalmente pelo companheirismo, parceria e colaboração. Com toda a certeza, sem vocês, o meu doutorado não seria possível. Muito obrigada!

Agradeço aos membros da banca examinadora (Prof. Dra. Maria de Lurdes, Prof. Dr. Ricardo, Prof. Dr. Giovani, e Prof. Dr. Luiz Fernando), bem como aos suplentes (Prof.

Dra. Eryza, Prof. Dr. José Carlos e Prof. Dra. Jociane), por todas as contribuições, que com toda a certeza são de grande valia e acrescentaram e muito a este trabalho. A vocês minha admiração e gratidão!

Agradeço a UNICENTRO pela estrutura e por me proporcionar um estudo de qualidade desde a minha graduação e a CAPES pelo fomento durante todo o processo de desenvolvimento dessa tese de doutorado. Agradeço também aos professores que ministraram todos os créditos obtidos durante o período do doutorado.

“Porque Dele, por
Ele, para Ele são todas
as coisas”

Romanos 11:36.

RESUMO

A crisina é um flavonoide amplamente encontrado em plantas e produtos apícolas, como mel e própolis. Este produto natural vem sendo alvo de estudo de muitos pesquisadores devido ao seu amplo espectro de atividades biológicas, tais como atividade anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral, entre outras. Apesar desse amplo espectro de ação, a crisina apresenta baixa solubilidade em água, baixa estabilidade em fluídos biológicos e baixa adesão celular, o que pode afetar sua absorção pelo organismo. A nanotecnologia é uma ferramenta que auxilia na redução desses efeitos, aumentando características de solubilidade e estabilidade de moléculas, promovendo maior entrega da molécula em um local específico de ação. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um sistema nanoestruturado utilizando uma matriz lipídica com palmitato de metila e palmitato de etila para carregamento da crisina através da técnica de homogeneização de alto cisalhamento. Por meio do desenvolvimento do planejamento fatorial uma formulação pode ser otimizada e caracterizada, via da determinação da eficiência de encapsulação, diâmetro de partícula, índice de polidispersão e o potencial zeta, bem como sua morfologia pela técnica de microscopia eletrônica de varredura. A nanopartícula otimizada apresentou tamanho de 332,8 nm, com índice de polidispersão de 0,27 e eficiência de encapsulação de 99,28 %. No estudo de estabilidade, o sistema se manteve estável em suspensão pelo período de 1 mês apenas e os sistemas liofilizados não obtiveram estabilidade comprovada. Foram realizados também, ensaios de toxicidade frente a hemácias e de inibição do radical 2,2'-azínbis-3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico (ABTS•+). Os resultados mostraram a eficácia da nanopartícula com crisina na concentração de 10 µg/mL com uma porcentagem de inibição de aproximadamente 72 % e com relação ao ensaio de hemólise, a nanopartícula não se mostrou tóxica durante todo o período estudado. Os ensaios de liberação em fluído gástrico (pH 1,2) e intestinal (pH 6,8) e tampão fosfato (pH 7,4) resultaram em porcentagens baixas de liberação, podendo ser justificados pela metabolização da crisina ao longo do processo. A validação do método UPLC-MS na determinação de crisina em plasma de ratos foi realizada de acordo com os parâmetros estabelecidos. O ensaio de farmacocinética demonstrou a eficiência do processo de encapsulação de crisina pela nanopartícula sólida lipídica formada, com melhora no perfil farmacocinético em comparação com a crisina administrada de maneira livre. Isso, considerando o aumentando a concentração máxima de 141,56 ng/mL para 313,02 ng/mL, para crisina e nanopartícula de crisina, respectivamente. Este trabalho revela o desenvolvimento e amplo potencial de aplicações de uma nanopartícula lipídica carregadora de crisina, devido à inovação em usar uma matriz lipídica composta por dois lipídeos distintos e um composto bioativo de destaque. Os resultados obtidos podem ser utilizados como base para pesquisas futuras envolvendo a associação entre palmitato de metila, palmitato de etila e crisina.

Palavras-chave: nanopartículas sólidas lipídicas, crisina, farmacocinética.

ABSTRACT

Chrysin is a flavonoid widely found in bee plants and bee products such as honey and propolis. This natural product has been being studied by many researchers due to the broad spectrum of biological activities, such as anti-inflammatory, antioxidant, and antitumor activities, among others. Despite this broad spectrum of action, chrysin has low water solubility, low stability in biological fluids, and low cell adhesion, which can affect its absorption by the body. Nanotechnology is a tool that helps to reduce these effects, increasing solubility and stability characteristics of molecules, promoting enhancing delivery of the molecule to a specific site of action. Thus, this work aimed to develop a nanostructured system using a lipid matrix with methyl palmitate and ethyl palmitate for chrysin carrying through the high-shear homogenization technique. According to the development of factorial design, a formulation was optimized and characterized by evaluating the encapsulation efficiency, particle diameter, polydispersion index, zeta potential, and morphology by scanning electron microscopy technique. The optimized nanoparticle had a size of 332.8 nm, with a polydispersion index of 0.27 and an encapsulation efficiency of 99.28%. In the stability study, the system remained stable in suspension for only a month and a lyophilized system did not obtain proven stability. Toxicity tests against red blood cells and inhibition of the 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS•+) radical were also evaluated. The results showed the effectiveness of the chrysin nanoparticle, with inhibition of approximately 72% to the hemolysis assay in 10 µg/mL. The nanoparticle was not toxic during the entire period of the study. The release assays in gastric (pH 1.2) and intestinal (pH 6.8) fluid and in phosphate buffer (pH 7.4) shows resulted in low percentages of release. It can be related to the metabolization of chrysin throughout the process. The pharmacokinetic assay demonstrated the efficiency of the chrysin encapsulation by the solid lipid nanoparticle formed, with improvement in the pharmacokinetic profile comparing to chrysin administered. Increasing the maximum concentration 141.56 ng/mL and 313.02 ng/mL for chrysin and chrysin nanoparticles, respectively. This work reveals the development and broad application potential of a chrysin-carrying lipid nanoparticle due to the innovation in using a lipid matrix composed of two distinct lipids and a prominent bioactive compound. The results obtained can be used as a basis for future research involving the association between methyl palmitate, ethyl palmitate, and chrysin.

KEYWORDS: solid lipid nanoparticles, chrysin, pharmacokinetics.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fórmula estrutural da 5,7-di-hidroxi-flavona ou crisina.....20
- Figura 2.** Fórmula estrutural dos lipídeos: palmitato de metila (A) e palmitato de etila (B).....23
- Figura 3** – Esquema ilustrativo do método de preparo da nanopartícula lipídica de palmitato de etila/palmitato de metila contendo crisina por meio da técnica de homogeneização por alto cisalhamento. Imagens editadas com conteúdo de imagens disponibilizadas em CLIKER.COM e SMART.SERVIER.COM.....26
- Figura 4.** Cromatograma referente à solução do composto crisina, solubilizado em DMSO e metanol, na concentração de 0,5 mg/mL.....49
- Figura 5.** Cromatograma referente à amostra de sobrenadante de nanopartícula lipídica vazia, a qual não possui crisina, apenas a matriz lipídica.....50
- Figura 6.** Cromatograma referente à amostra de sobrenadante da nanopartícula lipídica carregada contendo crisina juntamente com a matriz lipídica.....51
- Figura 7.** Curva analítica de calibração para a determinação de crisina obtida em amostras de sobrenadante de nanopartículas sólidas lipídicas carregadas, fazendo uso do método de regressão linear, no intervalo de 95% de confiança.....54
- Figura 8.** Gráfico de Pareto dos Efeitos Padronizados avaliando a eficiência de encapsulação do composto crisina em nanopartículas lipídicas carregadas, através da influência dos efeitos (concentração de PVA e as massas de palmitato de metila e palmitato de etila) e suas respectivas interações.....62
- Figura 9.** Gráfico de Pareto dos Efeitos Padronizados avaliando o diâmetro de partícula para as nanopartículas lipídicas carregadas, através da influência dos efeitos (concentração de PVA e as massas de palmitato de metila e palmitato de etila) e suas respectivas interações.64
- Figura 10.** Gráfico representando a influência dos principais efeitos (concentração de PVA e massas de palmitato de metila e palmitato de etila) do planejamento fatorial 2^2 com repetição de ponto central para a resposta tamanho de partícula.....66
- Figura 11.** Gráfico representando a influência das interações dos principais efeitos (concentração de PVA e massas de palmitato de metila e palmitato de etila) do planejamento fatorial 2^2 com repetição de ponto central para a resposta tamanho de partícula.....67
- Figura 12.** Gráfico de Pareto dos Efeitos Padronizados avaliando o índice de polidispersão referente à distribuição do tamanho de partícula para as nanopartículas lipídicas carregadas, através da influência dos efeitos (concentração de PVA e as massas de palmitato de metila e palmitato de etila) e suas respectivas interações.70
- Figura 13.** Gráfico representando a influência dos principais efeitos (concentração de PVA e as massas de palmitato de metila e palmitato de etila) do planejamento fatorial 2^2 com repetição de ponto central para a resposta índice de polidispersão referente à distribuição do tamanho de partícula para as nanopartículas lipídicas carregadas com crisina.....71
- Figura 14.** Gráfico representando a influência das interações dos principais efeitos (concentração de PVA e massas de palmitato de metila e palmitato de etila) do planejamento fatorial 2^2 com repetição de ponto central para a resposta índice de

polidispersão referente à distribuição do tamanho de partícula para as nanopartículas lipídicas carregadas com crisina.	72
Figura 15 – Microscopia Eletrônica de Varredura de nanopartículas lipídicas de palmitato de metila e palmitato de etila contendo crisina. (a) - Suspensão de nanopartículas sólidas lipídicas carregadas com crisina com escala de 500 nm. (b) - Suspensão de nanopartículas sólidas lipídicas carregadas com crisina com escala de 2 µm. (c) - Suspensão de nanopartículas sólidas lipídicas carregadas com crisina com escala de 5 µm.....	76
Figura 16. Estudo da influência do tempo para o parâmetro de tamanho de partícula e IPD na avaliação de estabilidade das nanopartículas sólidas lipídicas carregadas com crisina em suspensão aquosa.....	78
Figura 17. Estudo da influência do tempo para o parâmetro de tamanho de partícula e IPD na avaliação de estabilidade das nanopartículas sólidas lipídicas carregadas com crisina e liofilizadas utilizando água como dispersante.....	80
Figura 18. estudo da influência do tempo para o parâmetro de tamanho de partícula e IPD na avaliação de estabilidade das nanopartículas sólidas lipídicas carregadas com crisina e liofilizadas utilizando a solução de trealose na concentração de 10 % como crioprotetor. *No 49° dia de análise, o equipamento juntamente com o software não forneceram nenhum valor para o tamanho de partícula e para o índice de polidispersão.....	83
Figura 19. Gráfico representativo referente à inibição do radical ABTS ⁺⁺ causada pelas amostras: crisina livre, nanopartículas sólidas lipídicas vazias e nanopartículas sólidas lipídicas carregadas com crisina, contendo crisina nas concentrações de 1, 2,5, 5, 7,5 e 10 µg/mL de crisina para a crisina encapsulada e a livre.	85
Figura 20. Gráfico representativo da atividade citotóxica de 7 amostras distintas (100% hemólise, controle metanol, controle tampão PBS, controle crisina solubilizada em DMSO, controle crisina livre com concentração de 20,0 µg/mL, amostras de nanopartículas sólidas lipídicas vazias e nanopartículas sólidas lipídicas carregadas com crisina na concentração de 20,0 µg/mL) sobre as células hemácias pelo período de 24, 48 e 72 horas de ensaio.	87
Figura 21. Gráfico representativo referente ao perfil de liberação de Crisina carregada pelas nanopartículas sólidas lipídicas frente aos fluídos gástrico simulado (FGS) pelo período de 2 horas e intestinal simulado (FIS) pelo período de 4 horas, totalizando 6 horas de ensaio.....	90
Figura 22. Gráfico representativo referente ao perfil de liberação de crisina carregada pelas nanopartículas sólidas lipídicas frente ao tampão fosfato salino (PBS) pelo período de 120 horas de ensaio.....	93
Figura 23. Cromatogramas MRM representativos de (A) crisina (m/z 254,92→152,94) e de (B) luteolina (m/z 286,95→152,94) em plasma de ratos: amostra de plasma branco, amostra de plasma fortificado com luteolina, amostra plasma fortificado contendo crisina livre e amostra de plasma contendo nanopartículas de crisina.....	96
Figura 24. Curva analítica para a determinação de crisina obtida em plasma de ratos utilizando concentrações de crisina livre, fazendo uso do método de regressão linear, no intervalo de 95% de confiança.....	97
Figura 25. Curvas de concentração plasmática de crisina advinda de dois sistemas: a crisina livre em solução aquosa e a solução de sobrenadante de nanopartículas sólidas lipídicas, ambas obtidas por administração de 10,0 mg/kg de crisina em ratos.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tabela de alterações dos parâmetros cromatográficos fluxo de injeção da fase móvel e porcentagem de proporção da fase móvel para análise do parâmetro de validação denominado robustez.....	30
Tabela 2. Tabela com os efeitos que serão alterados (concentração de PVA e massa de lipídeos: palmitato de metila e palmitato de etila) e os níveis de alterações para o planejamento fatorial 2^3 com repetições do ponto central.....	31
Tabela 3. Matriz contendo os ensaios referentes ao planejamento fatorial 2^3 com repetições do ponto central aplicado para o desenvolvimento do protocolo de btenção de nanopartículas sólidas lipídicas contendo crisina carregada.....	32
Tabela 4. Tabela com as condições cromatográficas para a determinação de crisina pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de díodos.	48
Tabela 5. Avaliação do parâmetro linearidade utilizando os resultados da análise de regressão linear no intervalo de 95 % de confiança e o teste de falta de ajuste aplicado à curva de calibração para a determinação de crisina em nanopartículas sólidas lipídicas.....	52
Tabela 6. Avaliação do parâmetro de validação precisão com resultados de desvio padrão relativo para a repetibilidade e a precisão interediária para três níveis de concentração: 5,0, 25,0 e 50,0 µg/mL para o método CLAE-DAD.....	56
Tabela 7. Estudo da exatidão com valores de recuperação de crisina para três concentrações 5,0, 25,0 e 50,0 µg/mL para a determinação de crisina em amostras de sobrenadante de nanopartículas sólidaslipídicas vazias utilizando o método de CLAE-UV.....	57
Tabela 8. Estudo da robustez do método de determinação de crisina a partir de nanopartículas sólidas lipídicas conforme os valores de recuperação da crisina contando com os parâmetros cromatográficos (fluxo de injeção da fase móvel e proporção da fase móvel) pelo método de CLAE-DAD.....	58
Tabela 9. Estudo do planejamento fatorial 2^2 com repetições do ponto central para as respostas avaliadas de tamanho de partícula (TP), índice de polidispersão (IPD) e eficiência de encapsulação (EE) avaliando os efeitos da concentração de PVA (%) e as massas de palmitato de metila (mg) e palmitato de etila (mg) para o protocolo experimental de desenvolvimento de nanopartículas sólidas lipídicas contendo crisina.....	60
Tabela 10. Estudo da influência dos efeitos (concentração de PVA e massas de palmitato de metila e palmitato de etila) e suas respectivas interações na avaliação do planejamento fatorial 2^3 com repetições do ponto central para a resposta de Eficiência de Encapsulação.....	61
Tabela 11. Estudo da influência dos efeitos (concentração de PVA e massas de palmitato de metila e palmitato de etila) e suas respectivas interações na avaliação do planejamento fatorial 2^3 com repetições do ponto central para a resposta de Tamanho de Partícula.....	63
Tabela 12. Estudo da influência dos efeitos (concentração de PVA e massas de palmitato de metila e palmitato de etila) e suas respectivas interações na avaliação do planejamento fatorial 2^3 com repetições do ponto central para a resposta de índice de polidispersão referente à distribuição de valores de tamanho de partícula.....	69

Tabela 13. Tabela contendo os resultados dos parâmetros avaliados (tamanho de partícula, índice de polidispersão e eficiência de encapsulação para às amostras de sobrenadante de nanopartículas sólidas lipídicas vazia e carregada com crisina.	74
Tabela 14. Estudo da solubilidade da crisina em fluídos gástrico e intestinal fazendo uso de surfactantes com concentrações de 5,0 %.....	89
Tabela 15. Estudo da solubilidade da crisina em meio de tampão fosfato salino (PBS) na concentração de 50,0 mmol/L utilizando concentrações diferentes (2,5 e 5,0 %) do tensoativo Tween.....	92
Tabela 16. Avaliação do parâmetro linearidade utilizando os resultados da análise de regressão linear no intervalo de 95 % de confiança e o teste de falta de ajuste aplicado à curva de calibração para a determinação de crisina em plasma de ratos.....	98
Tabela 17. Estudo dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), da precisão e da exatidão, parâmetros necessários para a validação do método de determinação de crisina em plasma de ratos.....	99
Tabela 18. Estudo da estabilidade do composto crisina em plasma de ratos sob condições de armazenamento (temperatura e tempo) diferentes ($n=3$).....	100
Tabela 19. Parâmetros farmacocinéticos avaliados para duas amostras, a crisina livre e a nanopartícula sólida lipídica contendo crisina, após administração oral de dose única em ratos ($n=6$).....	103

LISTA DE ABREVIACOES, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABTS ^{•+} - radical 2,2'-azinobis-3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico	faj – falta de ajuste
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária	FDA - Federal Drug Administration
AOAC - Association of Official Analytical Chemists	FGS – fluído gástrico simulado
ASC0-∞ - rea sob a curva da concentração plasmática de um fármaco <i>versus</i> tempo extrapolado ao infinito	FIS – fluído intestinal simulado
ASC0-t - área sob a curva da concentração plasmática de um fármaco <i>versus</i> tempo	HEK – linhagem celular
CEUA - Comitê de tica em pesquisa com Uso de Animais	HFF - fibroblastos
Cl - clearance	HPLC - High performance liquid chromatography
CLAE-UV – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Ultra- Violeta	ICH - International Conference on Harmonization
Cmx - concentração máxima	INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
COMCAP - Complexo de Centrais de Apoio  Pesquisa	IPD - ndice de polidispersão
COMEP – Comitê de tica em Pesquisa	Kel - constante de eliminação
DAD – Detector de Arranjo de Diodos	LD – Limite de Detecção
DMSO - dimetilsulfóxido	LQ – Limite de Quantificação
DPPH - 1,1-difenil-2-picrilhidrazil	m/z - razão massa carga
EE – Eficiência de Encapsulação	MEV – Microscopia de Varredura Eletrônica
EPR - erro padrão relativo	MFA- Microscopia de Força Atômica
	MRM - monitoramento de reação múltipla
	NSL – nanopartícula sólida lpida
	PBS - tampão salino fosfato

PE – palmitato de etila	$T_{1/2}$ - tempo de meia-vida
pH - potencial hidrogeniônico	$T_{m\acute{a}x}$ – tempo para atingir a máxima concentração
PI – padrão interno	UEM – Universidade Estadual de Maringá
PLGA - poly (D,L-lactide-co-glycolide)	UPLC-MS/MS - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas
PM – palmitato de metila	UV-Vis - Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta e Visível
PVA – álcool polivinílico	v/v – razão volume/ volume
PZ – Potencial Zeta	V_d - volume de distribuição aparente
r – coeficiente de correlação linear	
R^2 – coeficiente de determinação	
RSD - desvios padrões relativos	

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. OBJETIVOS.....	25
2.1.Objetivos Gerais.....	25
2.2.Objetivos Específicos.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Protocolo de Obtenção de nanopartículas lipídicas sólidas de palmitato de etila e palmitato de metila contendo Crisina	26
3.2 Validação do Método de Determinação de Crisina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	27
3.2.1 Seletividade.....	28
3.2.2 Linearidade.....	28
3.2.3 <i>Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)</i>	28
3.2.4 Precisão.....	29
3.2.5 Exatidão.....	29
3.2.6 Robustez.....	30
3.3 Otimização da Condição Ideal para Protocolo de Obtenção de Nanopartículas Lipídicas através de um Planejamento Fatorial	31
3.4 Técnicas de Caracterização de Nanopartículas.....	33
3.4.1 <i>Determinação de diâmetro médio e índice de polidispersão.....</i>	<i>33</i>
3.4.2 <i>Determinação da Eficiência de Encapsulação da Crisina em nanopartículas lipídicas.....</i>	<i>33</i>
3.4.3 <i>Potencial Zeta.....</i>	<i>34</i>
3.4.4 <i>Microscopia eletrônica de varredura.....</i>	<i>34</i>
3.5 Estudo e avaliação da Estabilidade das nanopartículas lipídicas contendo crisina	35
3.6 Avaliação da Citotoxicidade ex vivo sobre normais.....	36
3.6.1 <i>Preparação de Hemácias</i>	<i>36</i>
3.6.2 <i>Atividade Citotóxica ex vivo sobre as hemácias</i>	<i>37</i>
3.7 Determinação da atividade antioxidante sobre o radical ABTS^{•+}	37
3.8 Liberação da Crisina a partir das Nanopartículas Lipídicas em fluido gástrico simulado (FGS) e no fluido intestinal simulado (FIS).....	38
3.8.1. <i>Preparo dos Fluidos Gástrico e Intestinal.....</i>	<i>38</i>

3.8.2 Ensaio de solubilidade da Crisina nos Fluidos Gástrico e Intestinal Simulados.....	38
3.8.3 Liberação da Crisina associada às Nanopartículas lipídicas nos FGS e FIS.....	39
3.9 Estudo de liberação de Crisina a partir da Nanopartícula Lipídica pelo método in vitro	40
3.9.1 Estudo de solubilidade da Crisina no meio receptor.....	40
3.9.2 Ensaio do perfil de liberação de crisina através das nanopartículas lipídicas pelo método in vitro.....	41
3.10 Ensaio de Farmacocinética Pré-Clínica.....	42
3.10.1 Otimização das Condições cromatográficas para a determinação de Crisina em plasma utilizando a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (UPLC-MS/MS).....	43
3.10.2 Preparação de Padrões e Amostras do Ensaio de Farmacocinética.....	43
3.10.3 Validação do método de determinação de Crisina em plasma utilizando a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (UPLC-MS/MS).....	43
3.10.4 Avaliação dos Parâmetros Farmacocinéticos após Administração Oral de dose única em ratos Wistar	45
3.10.5 Análise dos Dados e Estatística.....	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	48
4.1 Resultados da Validação do Método de Determinação de Crisina pelo Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência por Detector de Arranjo de Diodos.....	48
4.1.1 Seletividade.....	49
4.1.2 Linearidade.....	52
4.1.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	54
4.1.4 Precisão.....	55
4.1.5 Exatidão.....	56
4.1.6 Robustez.....	57

4.2 Resultados do Protocolo de Obtenção de Nanopartícula Lipídica contendo Crisina e Otimização do Planejamento Fatorial 2³ com repetição de pontos centrais.....	59
4.3 Avaliação da Morfologia da Nanopartícula Lipídica contendo Crisina	74
4.4 Estudo e avaliação da Estabilidade das nanopartículas lipídicas contendo crisina	77
4.5 Atividade Antioxidante sobre o radical ABTS⁺*	85
4.6 Ensaio de citotoxicidade sobre as células presentes no sangue, hemácias.....	87
4.7 Resultados do ensaio de Liberação da Crisina a partir das Nanopartículas Lipídicas em fluido gástrico simulado (FGS) e no fluido intestinal simulado (FIS).....	88
4.7.1 <i>Ensaio de solubilidade da Crisina nos Fluidos Gástrico e Intestinal Simulados.....</i>	89
4.7.2 <i>Liberação da Crisina associada às Nanopartículas lipídicas nos FGS e FIS....</i>	90
4.8 Resultados do Estudo de liberação de Crisina a partir da Nanopartícula Lipídica pelo método <i>in vitro</i>	92
4.8.1 <i>Estudo de solubilidade da Crisina no meio receptor.....</i>	92
4.8.2 <i>Ensaio do perfil de liberação de crisina através das nanopartículas lipídicas pelo método in vitro.....</i>	92
4.9 Resultados do ensaio de Farmacocinética.....	94
4.9.1 <i>Validação do método de determinação de Crisina em plasma utilizando a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (UPLC-MS/MS).....</i>	94
4.9.1.1 <i>Seletividade.....</i>	95
4.9.1.2 <i>Linearidade.....</i>	97
4.9.1.3 <i>Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ), Precisão e Exatidão.....</i>	98
4.9.1.4 <i>Estabilidade.....</i>	100
4.9.2 <i>Resultados para o Ensaio de Farmacocinética.....</i>	101
5 CONCLUSÃO.....	107
6 ETAPAS FUTURAS.....	109
7 REFERÊNCIAS.....	110

1 INTRODUÇÃO

A crisina é um composto fenólico que pertence à classe dos flavonoides, cujo nome oficial é 5,7-di-hidroxi-flavona (Figura 1). Naturalmente, é encontrado em produtos apícolas, como mel e própolis, e principalmente em plantas como *Passiflora coreulea*, *Hypericum afrum* e *Scutellaria discolor* (SAMARGHANDIAN, 2011; JAYAKUMAR, 2009; ZHENG, 2003). Em 1990, a crisina foi isolada como composto puro, fazendo uso de várias etapas de extração e fracionamento, analisadas e detectadas pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Desde então, a crisina vem sendo amplamente estudada e suas propriedades terapêuticas e biológicas amplamente investigadas também (BORGES FILHO, 2014).

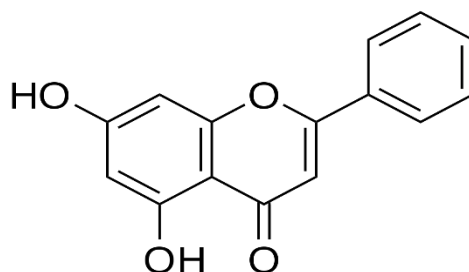


Figura 1. Fórmula estrutural da 5,7-di-hidroxi-flavona ou crisina.

A crisina quando em forma sólida, possui uma coloração amarela e na literatura são relatados inúmeros procedimentos para sua obtenção e purificação, como a extração líquido-sólido (LARIT, 2017; NASEER, 2017), o método de imersão (LAISHRAM, 2015), o método do solvente extrator (HAN, 2018). Ela possui massa molecular igual a 254,22 g/mol, e sua fórmula molecular é $C_{15}H_{10}O_4$. A crisina é pouco insolúvel em água, apresentando baixa solubilidade em metanol e diclorometano. Entretanto, ela é totalmente solúvel em dimetilsulfóxido (DMSO) (NABAVI, 2015; MANI e NATESAN, 2018).

A estrutura da crisina comporta a presença de dois grupos fenóis e um grupo éter que podem ser considerados sítios de reatividade da molécula, tendo o poder de promover alterações significativas, deixando-a mais reativa, propícia à reações como acilações e carboxilações, entre outras. Dessa forma, existe uma facilidade desta molécula na formação de derivados, chamados também de metabólitos intermediários. São encontrados inúmeros mecanismos de reação que mostram reações do tipo nitração, desidratação da molécula, halogenação e até mesmo substituição, fazendo com que a molécula fique mais ativa no combate a linhagens tumorais específicas (ZHENG, 2003).

Devido à sua estrutura fenólica, a crisina apresenta um amplo espectro de propriedades farmacológicas de interesse para a ciência de modo geral. Na literatura são relatadas inúmeros trabalhos que comprovam seu grande potencial como fármaco. A crisina possui registros de atividade antioxidante (VEERAPPAN, 2015; SOUZA, 2015), atividade anti-inflamatória (SHIN, 2009; BAE, 2011, FENG, 2014), atividade neuroprotetora (MEHRI, 2014), no combate à doenças como o mal de Parkinson (RANI, 2016) e diabetes (WOO, 2004) e também atividade antitumoral (LIM, et al., 2017; YU, 2012; ZARIC, 2015; YANG, 2018 B).

Como visto, a crisina é um flavonoide que possui um grande potencial para aplicação dessas atividades farmacológicas. Entretanto, a crisina apresenta algumas ressalvas para seu total aproveitamento no organismo humano ou animal. Essas ressalvas relatadas na literatura são comuns para o grupo de compostos naturais, especialmente os flavonoides, tais problemas são a baixíssima solubilidade em água, a baixa estabilidade da molécula dentro do organismo devido a metabolização precoce, sua baixa biodisponibilidade devido à degradação e metabolização (DONG et al., 2017), seu rápido metabolismo (chamado de metabolismo de primeira passagem), onde pouco do composto ou droga é realmente absorvido pelo organismo, uma alta taxa de eliminação e baixa captação celular (MOHAMMANDIAN, 2017; EATEMADI, 2016).

Essas ressalvas são considerados desfavoráveis para aplicação da crisina livre, ou seja, da molécula diretamente, sem nenhum tipo de transportador. Devido a isso, procurou-se, no presente trabalho, alternativas que possam melhorar ou até mesmo solucionar esses problemas. A área da nanotecnologia é uma área da ciência que se ocupa do estudo, desenvolvimento e aplicação de produtos tecnológicos na escala nanométrica (CROMMELIN, PARK, FLORENCE, 2010; MANGEMATIN, WALSH, 2012; ANARI, 2015). Em nosso trabalho, a área da nanotecnologia foi aplicada para tentar melhorar a disponibilidade das atividades farmacológicas associadas à molécula crisina e para isso foi necessário desenvolver uma nanopartícula, partícula nanométrica (1 a 1000 nm), que seja ideal para carrear a crisina para o interior do organismo humano ou animal para que a mesma tenha um aproveitamento considerável de suas propriedades.

Entre tantas aplicações de sistemas nanoestruturados, como é o caso das nanopartículas, está o desenvolvimento de carreadores de compostos biologicamente ativos. A facilidade, a variabilidade de técnicas utilizadas e a ampla aplicação dessas

partículas na medicina demonstram que as mesmas podem ser distribuídas no organismo humano com a finalidade de superar as dificuldades de aplicação das atividades biológicas aliadas aos produtos naturais (BATRAKOVA; KABANOV, 2008; FENG, 2008, 2006; ZHANG; TAN; FENG, 2012).

As nanopartículas, como mencionado anteriormente, podem ser formadas através de várias técnicas e levando em consideração variadas matrizes, poliméricas, lipídicas, proteicas, etc (FONSECA, KHALIL e MAINARDES, 2017; MATTOS, et al., 2016; JAIN, et al., 2012c). Entretanto, nem todas as matrizes são favoráveis ao carreamento de flavonoides ou até mesmo outros tipos de moléculas. Para carrear a crisina, foi encontrada uma variedade de matrizes utilizadas para o desenvolvimento de nanopartículas, como as nanopartículas formadas por nanoemulsões com carregadores distintos, como Dong, et al. (2017). Também foram encontradas nanopartículas poliméricas formadas a partir de MPEG/PCL com tamanho de 77,0 nm e eficiência de encapsulação de 46,96 %, com efeito anticâncer confirmado (KIM et al., 2017).

Outro trabalho utilizando polímeros foi o de Firouzi-Amandi et al. (2018) que utilizou os polímeros PLGA-PEG como matrizes para sua nanopartícula, matriz essa também usada por Anari (2015) no carreamento de crisina também. Vedagiri, Surekha e Sumathi (2015) utilizaram uma matriz lipídica composta de ácido esteárico, lecitina e ácido taurocólico para carrear crisina. Utilizando proteínas, Ferrado et al. (2018) conduziram um estudo de desenvolvimento de nanopartículas produzidas a base de albumina bovina.

Nota-se que as matrizes menos utilizadas são as matrizes lipídicas e devido a isso o presente trabalho fez uso da mistura de dois lipídeos pouco utilizados para o desenvolvimento de nanopartículas sólidas lipídicas (NSL's). As NSL's são chamadas também de nanopartículas de primeira geração, visto que foram os primeiros sistemas nanoparticulados a serem desenvolvidos em uma sequência linear de sistemas cada vez mais modernos (MULLER et al., 2011; BAGADE, 2014).

As NSL's possuem fácil desenvolvimento, variedade de técnicas a serem aplicadas, as aplicações diversas no organismo humano ou animal, bem como aumento da biodisponibilidade, a liberação sustentada, prolongada e direcionada do composto no organismo. Dentre as vantagens da utilização desse tipo de nanopartículas, destacam-se a geração de sistemas biocompatíveis, biodegradáveis, utilizando a liberação controlada

tem-se ainda a vantagem do direcionamento de compostos e a potencialização dos efeitos biológicos de compostos ativos naturais.

Dessa forma, optou-se por trabalhar com o desenvolvimento desse sistema fazendo uso de palmitato de metila ($C_{17}H_{34}O_2$) e de palmitato de etila ($C_{18}H_{36}O_2$). Ambos os lipídeos são éteres de cadeias longas, com massas moleculares de 270,46 e 284,48 g/mol e pontos de fusão de 30 °C e 24 °C, para palmitato de metila (PM) e para palmitato de etila (PE), respectivamente.

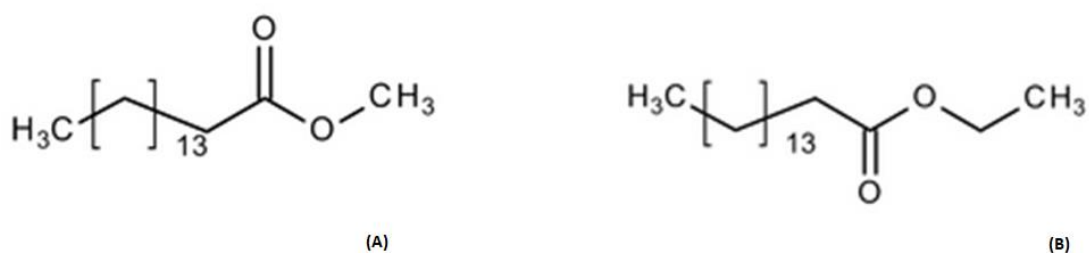


Figura 2. Fórmula estrutural dos lipídeos: palmitato de metila (A) e palmitato de etila (B).

O lipídeo PM apresenta algumas propriedades farmacológicas e físico-químicas de grande interesse, como a atividade anti-inflamatória (SAEED et al, 2012; SHARAWY et al., 2013), atividade acaricida (WANG et al., 2009), atuando também como inibidor da função macrofágica em macrófagos peritoniais (SARKAR et al., 2006), além de apresentar um efeito antifibrótico, que pode ter relação com suas atividades antioxidantes e anti-inflamatórias (MANTAWY et al., 2012; EL-DEMERDASH et al., 2011).

A semelhança estrutural entre as moléculas dos lipídeos PE e PM também acarreta em semelhança entre algumas propriedades, como a atividade anti-inflamatória (SAEED et al, 2012) e a citotoxicidade para macrófagos (CONNING e HEPPLESTON, 1966). Entretanto, outras propriedades distintas são relatadas na literatura, como é o caso do bloqueio do agente reticuloendotelial (ALI et al., 1994a; 1994b) e também na conjugação com ftalimida responsável pela formação de nanopartículas com ação anticâncer, ação essa proveniente da ftalimida (KASOJU et al., 2009). Dumitrascu e colaboradores (2018) realizaram um estudo onde o palmitato de etila autou como único marcador de níveis de ésteres etílicos de ácidos graxos para a avaliação do consumo de álcool detectada no cabelo fazendo uso de cosméticos capilares contendo ou não álcool. Além disso o PE

pode ser encontrado compondo parte do metabolismo humano (BASTIANI, 2020; SINGER, 2021).

Essa mistura lipídica pode contribuir para um efeito sinérgico dentro da nanopartícula lipídica, além de reproduzir as propriedades e características de ambos os lipídeos. A mistura lipídica nunca foi usada anteriormente no desenvolvimento de nanopartículas sólidas lipídicas, visando isso e as vantagens de aplicação desse tipo de sistema nanoestruturado e a variabilidade de aplicações farmacológicas da crisina, este trabalho foi realizado com o principal objetivo de desenvolver uma nanopartícula sólida lipídica contendo crisina, formada a partir de dois lipídeos inovadores para o desenvolvimento de nanopartículas, o palmitato de metila e palmitato de etila.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver, caracterizar e avaliar um sistema nanoestruturado composto de nanopartículas de dois lipídios (palmitato de metila e palmitato de etila), contendo a molécula de crisina, a fim de realizar ensaios avaliando algumas atividades biológicas.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver um protocolo para a obtenção de nanopartículas lipídicas que contenham Crisina.
- Desenvolver uma metodologia analítica por CLAE para a determinação/detecção da molécula Crisina em nanopartículas lipídicas.
- Aplicar e avaliar os resultados de um delineamento experimental com a finalidade de otimizar os resultados de eficiência de encapsulação, de tamanho e de IPD das nanopartículas lipídicas carregadas com Crisina.
- Determinar a eficiência de encapsulação da molécula de Crisina com relação às nanopartículas lipídicas, contando com o método de análise por CLAE já anteriormente validado.
- Caracterizar as nanopartículas lipídicas contendo Crisina quanto aos aspectos físico-químicos, como morfologia, diâmetro médio de partícula, distribuição de tamanho, carga superficial.
- Avaliar a estabilidade físico-química das nanopartículas contendo Crisina sob diferentes condições de armazenamento.
- Avaliar a atividade biológica *in vitro* das nanopartículas lipídicas contendo Crisina, através de ensaios de ação antioxidante e ação anti-hemolítica.
- Desenvolver e validar um método bioanalítico para determinar Crisina em plasma;
- Obter parâmetros farmacocinéticos após a administração de dose única pela via oral em ratos;
- Avaliar nanopartículas de palmitato de metila e palmitato de etila contendo Crisina quanto ao potencial biológico e terapêutico em ratos Wistar adultos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Protocolo de Obtenção de nanopartículas lipídicas sólidas de palmitato de etila e palmitato de metila contendo Crisina

Com a finalidade de obter-se um sistema nanoestruturado, formado por nanopartículas lipídicas sólidas, usando o palmitato de metila e o palmitato de etila como matrizes lipídicas, foi utilizada a técnica de homogeneização/dispersão por alto cisalhamento (NEVES et al., 2013; DARA, 2019; GLAUBITT, 2019; BAZZAZ, 2018; LUAN, 2019).

Inicialmente, foi diluída uma quantidade de 5,0 mg de crisina em 200,0 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) para a total dissolução do sólido. O mesmo foi realizado com 20,0 mg de palmitato de metila, juntamente com 20,0 mg de palmitato de etila, onde foram solubilizados em 800,0 μ L de diclorometano. Ambas as soluções foram misturadas com 10 mL de uma solução de álcool polivinílico na concentração de 0,5 % (m/V) e posteriormente homogeneizadas através de uma homogeneizador de alto cisalhamento, conforme ilustrado na Figura 3.

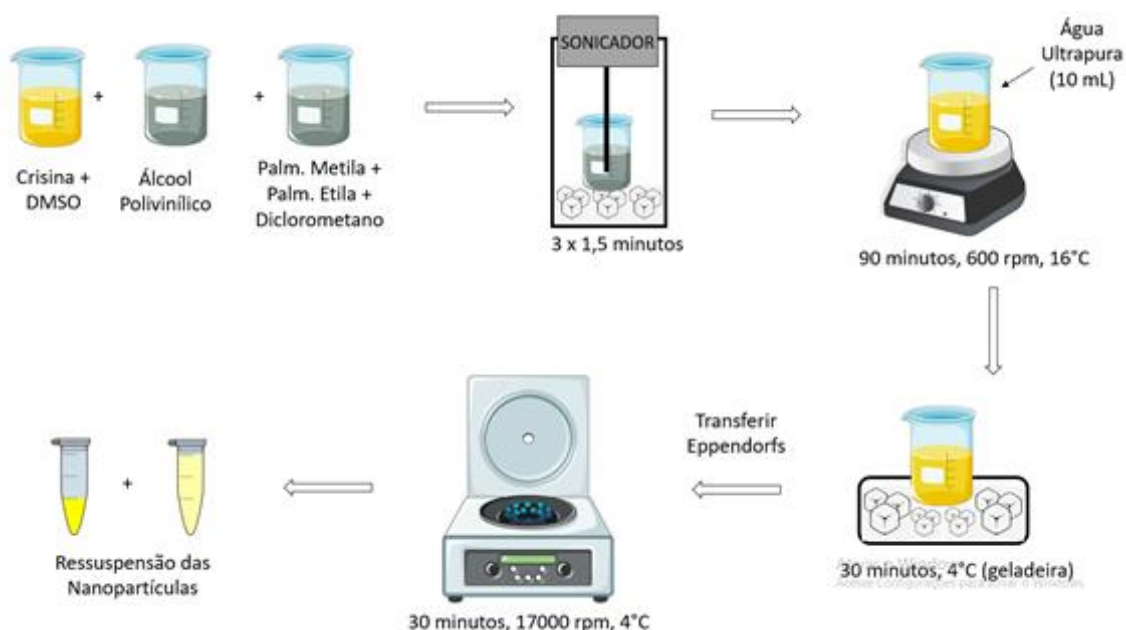


Figura 3 – Esquema ilustrativo do método de preparo da nanopartícula lipídica de palmitato de etila/palmitato de metila contendo crisina por meio da técnica de homogeneização por alto cisalhamento. Imagens editadas com conteúdo de imagens disponibilizadas em CLIKER.COM e SMART.SERVIER.COM.

Após essa etapa, um volume de 10 mL de água ultrapura foi misturada à essa solução e foi realizada uma agitação constante de todo esse conteúdo na rotação de cerca de 600 rpm durante cerca de 90 minutos, mediante uma temperatura de 16 °C. Seguido disso, a suspensão de nanopartículas foi mantida em um banho de gelo durante 30 minutos sob temperatura de 4 °C, para que ocorresse o processo de recristalização das nanopartículas, e logo após, a solução total foi colocada em eppendorf com volume de 2,0 mL e centrifugada nas condições de 4 °C, em um tempo de 30 minutos e rotação de 17000 rpm. O sobrenadante foi reservado para posterior análise e o sólido de cada eppendorf foi ressuspenso em 200,0 µL de água ultrapura (Figura 3).

Para o protocolo de desenvolvimento das nanopartículas lipídicas ‘brancas’ de palmitato de metila e palmitato de etila, ocorrem apenas duas mudanças, a primeira referente a massa de palmitato de etila, e a segunda com a adição de 200,0 µL de DMSO puro sem crisina. Devido a isso, a proporção de 1:1 (palmitato de metila:palmitato de etila), utilizada para o protocolo de nanopartículas carregadas com crisina não resultou em nenhuma formação de sólidos nanoparticulado. Essa mudança de massa de palmitato de etila acarreta na mudança de proporção para 2:1.

A solução de DMSO que continha crisina foi elaborada com a ausência da mesma para que ela respeitasse as proporções, quantidades e volume de fase orgânica. Todo o restante do protocolo, da etapa de homogeneização até a etapa da ressuspensão, foi realizado de maneira similar ao protocolo referente às nanopartículas lipídicas carregadas com crisina (Figura 3).

3.2 Validação do Método de Determinação de Crisina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A Validação do Método de Determinação de Crisina em Nanopartículas Lipídicas consistiu na análise de diversos fatores para a verificação da veracidade e autenticidade da identificação, detecção e quantificação desse composto. Para que a validação seja concluída, alguns parâmetros devem ser analisados, tais como seletividade, linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), bem como precisão, exatidão e robustez do método de determinação (BRITO, 2003; ANVISA, 2017).

3.2.1 Seletividade

A seletividade de um método é o estudo de interferentes que possam ser prejudiciais a determinação do analito de interesse (BRITO, 2003; ANVISA, 2017). A seletividade do método de determinação de crisina carregada em nanopartículas lipídicas foi avaliada realizando o cromatograma de varredura de amostras de solução de sobrenadante de nanopartículas brancas sem crisina (a), o cromatograma de varredura de amostras de sobrenadante de nanopartículas carregadas com crisina (b) e o cromatograma de varredura de uma solução padrão de crisina na concentração de $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ preparada diluindo-se 5,0 mg de crisina em 200 μL de DMSO e solubilizados e completados em 10,0 mL de metanol. Os cromatogramas foram comparados entre si, segundo o tempo de retenção, intensidade do pico de detecção e também quanto ao comprimento de onda referente ao pico cromatográfico da crisina.

3.2.2 Linearidade

A linearidade deste método foi avaliada por meio da realização e avaliação de cromatogramas referentes a uma curva de calibração externa preparada contando com uma solução estoque de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de crisina diluída em metanol, com concentrações de crisina de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cada ponto pertencente a curva de calibração foi injetado em triplicata no equipamento CLAE-UV. Além disso, foram realizados testes de falta de ajuste, no intervalo de 95% de confiança, bem como foi aplicada a técnica de regressão linear (BRITO, 2003; ANVISA, 2017; ARAUJO, 2009;).

3.2.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados através das intensidades de picos cromatográficos referentes às concentrações de crisina de uma curva de calibração externa preparada a partir de uma solução padrão na concentração de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, obtendo-se assim os valores de 1, 2, 4, 6, 8 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de crisina. Os pontos foram injetados em triplicata no equipamento CLAE-UV e os limite de detecção e quantificação foram calculados a partir das equações (1 e 2) abaixo, sendo s , o valor de

desvio padrão do intercepto da curva de calibração e **b**, o valor da inclinação da curva de calibração (BRITO, 2003; ANVISA, 2017; INMETRO, 2018).

$$LD = \frac{3,3s}{b} \quad (1) \quad \text{e} \quad LQ = \frac{10.s}{b} \quad (2) \quad \text{Equações 1 e 2}$$

3.2.4 Precisão

A precisão do método de determinação de crisina em nanopartículas lipídicas foi avaliada utilizando o cálculo das estimativas da repetitividade e da precisão intermediária (BRITO, 2003; INMETRO, 2018). A estimativa da repetitividade foi determinada por meio da injeção e detecção de 3 níveis de concentração de crisina diferentes (5, 25 e 50 µg/mL), avaliados todos em dois períodos (manhã e tarde) de um mesmo dia. A estimativa da precisão intermediária foi determinada através da injeção e detecção de 3 níveis diferentes de concentração (5, 25 e 50 µg/mL) avaliados em três dias diferentes e consecutivos, todos durante o mesmo período (manhã). Todos esses ensaios foram realizados em triplicata. A precisão foi avaliada segundo o valor de desvio padrão relativo (%DPR), sendo o mesmo considerado adequado quando se encontra abaixo de 15 %, validando assim a precisão do método. O desvio padrão relativo foi calculado através das equações (3 e 4) a seguir, sendo **Sp-rep**, o desvio padrão calculado para os valores das triplicatas referentes a cada concentração e injetadas em um único dia em ambos os períodos, e o **Sp-PI**, o desvio padrão calculado para os valores das triplicatas referentes a cada concentração e injetadas em três dias diferentes e consecutivos.

$$DPR_r = \frac{Sp_{rep}}{MÉDIA} \times 100 \quad (3) \quad \text{e} \quad DPR_{PI} = \frac{Sp_{PI}}{MÉDIA} \times 100 \quad (4) \quad \text{Equações 3 e 4}$$

3.2.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada pela recuperação de quantidades de crisina que foram adicionadas a sobrenadantes de nanopartículas brancas, fazendo portanto um enriquecimento de amostra. Foram enriquecidas três amostras de sobrenadantes, em triplicata, com concentrações de 5, 25 e 50 µg/mL de crisina. Após o enriquecimento das amostras, os sobrenadantes foram devidamente filtrados e injetados no equipamento CLAE-UV (BRITO, 2003; ANVISA, 2017). As concentrações de crisina detectadas e

quantificadas foram determinadas com auxílio de uma curva de calibração externa com faixa de concentração de 5 a 50 µg/mL. A recuperação das concentrações enriquecidas ao sobrenadante foi calculada pela equação (5), onde C₁ é a concentração detectada e quantificada pelo equipamento CLAE-UV e C₂ é a concentração enriquecida ao sobrenadante em cada um dos níveis de concentração mencionados acima.

$$\% \text{ Rec} = \frac{C_1}{C_2} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

3.2.6 Robustez

A robustez do método foi avaliada alterando-se algumas das condições cromatográficas otimizadas para a determinação de crisina pelo método CLAE-UV (BRITO, 2003; ANVISA, 2017). As duas condições alteradas foram o fluxo e a proporção da fase móvel utilizada para a determinação de crisina em nanopartículas lipídicas. Para melhor avaliação da robustez, a Tabela 1 foi elaborada, de acordo com as mudanças estiouladas para cada condição.

Tabela 1. Tabela de alterações dos parâmetros cromatográficos fluxo de injeção da fase móvel e percentagem de proporção da fase móvel para análise do parâmetro de validação denominado robustez.

	<i>Nível Máximo</i>	0,9 mL/min
Fluxo da Fase Móvel	<i>Nível Normal</i>	1,0 mL/min
	<i>Nível Mínimo</i>	1,1 mL/min
	<i>Nível Máximo</i>	29% água / 71% acetonitrila
Proporção da Fase Móvel	<i>Nível Normal</i>	30% água / 70% acetonitrila
	<i>Nível Mínimo</i>	31% água / 69% acetonitrila

Para verificar as mudanças causadas pelas alterações dos parâmetros mencionados, foram injetadas e analisadas as soluções padrões com concentrações de 5, 25 e 50 µg/mL de crisina, em triplicata. Foram calculadas as respectivas médias e os respectivos desvios-padrão para os três níveis de concentração abaixo. As concentrações foram calculadas com o auxílio de uma faixa de concentração de 5 a 50 µg/mL de crisina.

3.3 Otimização da Condição Ideal para Protocolo de Obtenção de Nanopartículas Lipídicas através de um Planejamento Fatorial

Para que seja escolhida a condição ótima para o desenvolvimento do Protocolo de Obtenção de Nanopartículas Lipídicas contendo Crisina, a qual resulte também em excelentes resultados para fatores como tamanho de partícula, IPD e eficiência de encapsulação, foi aplicado o Planejamento Fatorial de três fatores em dois níveis distintos (2^3) com repetições do ponto central.

Os três fatores variados foram a massa de palmitato de metila (mg), a massa de palmitato de etila (mg) e a concentração do tensoativo álcool polivinílico (% m/V). As massas de palmitato de metila e de palmitato de etila tiveram sua quantidade variada apresentando valores entre 10,0 a 100,0 mg e a concentração de PVA foi variada entre 0,1 a 1,0 %. Para a avaliação das respostas do planejamento e também de todas as condições, interações e efeitos que interferem no desenvolvimento deste protocolo foi elaborada a Tabela 2, na qual estão descritas as variáveis e os níveis de variação de cada fator do planejamento fatorial.

Tabela 2. Tabela com os efeitos que serão alterados (concentração de PVA e massa de lipídeos: palmitato de metila e palmitato de etila) e os níveis de alterações para o planejamento fatorial 2^3 com repetições do ponto central.

Fator / Níveis	(-1)	0	(+1)
Palmitato de Metila (mg)	10	50	100
Palmitato de Etila (mg)	10	50	100
PVA (% m/V)	0,5	0,675	1,0

O planejamento fatorial contou com a totalidade de 13 ensaios elaborados, devido às repetições de pontos já estarem inclusas na totalidade dos mesmos. As repetições foram realizadas somente no ponto central (ensaios 9-13, Tabela 3) do planejamento. Além disso, a justificativa apresentada para essas repetições é que as mesmas foram utilizadas para avaliar o erro experimental de todo este planejamento.

Tabela 3. Matriz contendo os ensaios referentes ao planejamento fatorial 2^3 com repetições do ponto central aplicado para o desenvolvimento do protocolo de btenção de nanopartículas sólidas lipídicas contendo crisina carregada.

Ensaio	Concentração de PVA (%)	Massa de Palmitato de Metila (mg)	Massa de Palmitato de Etila (mg)
1	- 1	- 1	- 1
2	+ 1	- 1	- 1
3	0	+ 1	- 1
4	+ 1	+ 1	- 1
5	- 1	- 1	+ 1
6	+ 1	- 1	+ 1
7	- 1	+ 1	+ 1
8	+ 1	+ 1	+ 1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0

Toda a análise estatística dos dados foi realizada com o auxílio do software livre, pelo qual foram elaborados os gráficos de efeitos principais, os gráficos de Pareto, os gráficos de efeitos padronizados e também o gráfico das interações entre os efeitos, verificando assim quais dos efeitos ou interações foram significativos para os parâmetros analisados.

Essa significância pode ser medida comparando-se os valores de teste t student, calculados para 4 graus de liberdade, em um nível de confiança de 95%. Os efeitos foram calculados dividindo-se os valores de $t_{calculado}$ pelo valor de $t_{crítico}$ previamente determinados pela tabela de valores de t .

3.4 Técnicas de Caracterização de Nanopartículas

Em várias etapas desta tese, incluindo no planejamento fatorial, será necessária a avaliação desses importantes parâmetros de caracterização, o diâmetro médio de partícula, o índice de polidispersão, a carga superficial, a eficiência de encapsulação e a morfologia. Devido a isso faz-se necessário o detalhamento das análises e técnica realizadas para a investigação de ambos os parâmetros.

3.4.1 Determinação de diâmetro médio e índice de polidispersão

Para as análises de determinação do tamanho médio e do índice de IPD, o preparo das amostras constituiu na dispersão de 10 µL de nanopartículas ressuspensas em 3,0 mL de água ultrapura na proporção de 1:300 (v/v). As análises foram realizadas no equipamento que utiliza a técnica de espalhamento dinâmico de luz Dynamic Light Scattering- Brookhaven® 90 Plus, localizado no Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica, (n = 3).

3.4.2 Determinação da Eficiência de Encapsulação da Crisina em nanopartículas lipídicas

A detecção e quantificação da crisina ocorreram de forma indireta, ou seja, utilizando o sobrenadante proveniente do processo de centrifugação das nanopartículas lipídicas, por isso foram realizadas por meio da técnica CLAE, utilizando o cromatógrafo à líquido Waters® 2695 Alliance, com detector de Arranjos de Diodos 2998. O preparo de todas as soluções injetadas no equipamento foi realizado utilizando-se de solventes orgânicos de grau HPLC LioChrosolv®. A água utilizada para a fase móvel foi purificada com o auxílio do sistema Milli-Q (Milipores Type1 Ultrapure Water, modelo Simplicity UV). Todas as análises feitas pelo equipamento utilizaram o modo de fase reversa de eluição, fazendo uso da coluna Agilent Eclipse XDB-C18 (250mmX4,6mm), volume de injeção de 30 µL, vazão de 1,0 mL/min, temperatura da coluna de 25 °C, com eluição no modo isocrático, sendo a fase móvel constituída por 30 % água Milli-Q (ultrapura) e 70 % de acetonitrila grau HPLC, com duração da corrida cromatográfica de 5 minutos. A

detecção realizada pelo detector DAD realizou a leitura das amostras no comprimento de onda de 280 nm, comprimento este próprio para a análise de flavonoides.

A eficiência de encapsulação foi calculada através da preparação de uma curva de calibração externa, a qual foi preparada com uma solução padrão de crisina em metanol na concentração de 1000 µg/mL, sendo a mesma diluída em proporções diferentes de metanol para se obter concentrações de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 e 50 µg/mL de crisina. Essas soluções, bem como todas as amostras de sobrenadantes de nanopartículas, foram injetadas em triplicata no sistema CLAE-UV. As amostras de sobrenadantes de nanopartículas também foram filtradas em filtros Milipore 0,22 µm e diluídas na proporção e 1:10 (v/v) com a mesma fase móvel utilizada durante as medidas de CLAE-UV.

O cálculo da porcentagem de eficiência de encapsulação (%EE) foi realizado pelo método indireto, no qual a concentração determinada é a concentração encontrada no sobrenadante residual da formulação de nanopartículas. Por meio da diferença da concentração encontrada no sobrenadante e a concentração de composto adicionada à nanopartícula, estima-se o valor da eficiência de encapsulação, ou seja, a concentração de crisina que se encontra dentro da suspensão de nanopartículas.

Para a determinação da eficiência de encapsulação (%EE), bem como da quantidade de massa de crisina que permanece na estrutura das nanopartículas, foi utilizada a equação (6), (n=9).

$$\%EE_{(crisina)} = \frac{\text{massa inicial (mg)} - \text{massa sobrenadante (mg)}}{\text{massa inicial (mg)}} \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

3.4.3 Potencial Zeta

O potencial zeta das amostras analisadas foi determinado com o auxílio do equipamento ZetaSizer ZS, Malven®, localizado no Centro de Ciências Moleculares e Nanotecnologia (UNICENTRO). O equipamento possui temperatura ambiente de 25 °C, com potencial de ± 150 mV e a mobilidade ocorre por eletroforese. O preparo de amostra foi realizado fazendo a dispersão de 10 µL de nanopartículas ressuspendidas em 3,0 mL de KCl na concentração de 1,0 mM, permanecendo na proporção de 1:200 (v/v), (n = 3).

3.4.4 Microscopia eletrônica de varredura

A análise morfológica das nanopartículas foi realizada por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando o microscópio eletrônico de duplo feixe FEI Scios. As suspensões de nanopartículas lipídicas foram diluídas em água ultrapura (1:200) e depositadas em stubs. Após a total secagem da amostra, pelo período de 24 horas, foi realizado o recobrimento metálico utilizando ouro coloidal, sendo então analisado na sequência por MEV. As análises foram realizadas com o apoio do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

A microscopia eletrônica de varredura possibilita a investigação da morfologia das nanopartículas produzidas nesta tese. Para tal, as suspensões das nanopartículas, brancas e contendo crisina, foram diluídas na proporção de 1:200 (v/v). As amostras foram preparadas diluindo-se uma alíquota de 10 µL de suspensão de nanopartículas lipídicas em 2 mL de água ultrapura. As diluições foram gotejadas em suportes metálicos constituídos por aço inoxidável (*stubs*) e secas a temperatura ambiente durante 24 horas. Logo após, as amostras foram metalizadas com ouro coloidal sob vácuo e também submetidas a análises de MEV.

3.5 Estudo e avaliação da Estabilidade das nanopartículas lipídicas contendo crisina

A avaliação da estabilidade das nanopartículas lipídicas contendo crisina foi realizada com mensura de valores de diâmetros médio de partículas, índice de polidispersão (IPD) e Potencial Zeta em função do tempo de armazenamento, ambas descritas nos itens 3.4.1 e 3.4.4. Esses parâmetros foram medidos semanalmente durante o primeiro mês de armazenamento e mensalmente nos meses seguintes, até quando os valores forem estáveis até que não houvesse variação de valores.

A estabilidade das nanopartículas foi avaliada seguindo duas condições de armazenamento, sendo a primeira condição, quando as nanopartículas estão em suspensão e refrigeradas a uma temperatura de 8°C e a segunda condição se apresenta quando as nanopartículas foram submetidas ao processo de liofilização com auxílio ou não de uma solução de uma substância crioprotetora.

O processo de liofilização das nanopartículas lipídicas ocorreu no Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica, utilizando como crioprotetor a solução de trealose 10,0 %. O crioprotetor foi escolhido com base em testes realizados com os crioprotetores sugeridos na literatura (DOKTOROVOVA, et al., 2013; ALI e LAMPRECHT, 2017 e WANG, et al., 2018b). Dessa forma, as amostras foram congeladas no freezer -80°C por 24 horas e logo após as mesmas foram secas pelo processo de liofilização de 24 horas em Liofilizador Série Interprise, Terroni® Equipamentos Científicos (pressão 179 mmHg; -56°C, vácuo 212 Vca).

3.6 Avaliação da Citotoxicidade ex vivo sobre normais

3.6.1 Preparação de Hemácias

As células sanguíneas chamadas de hemácias foram obtidas através da coleta de 5,0 mL de sangue de indivíduos saudáveis voluntários e maiores de 18 anos. A coleta de sangue foi efetuada por punção venosa periférica onde o doador que consentiu em participar foi assegurado da assepsia, segurança e limpeza do local e de todos os equipamentos utilizados para essa coleta. As normas de biossegurança foram todas obedecidas e toda a assepsia do material foi feita com álcool etílico 70,0 % (v/v) e utilizando todos os equipamentos de proteção individual, como luvas e óculos de proteção.

Após a coleta, o sangue foi colocado em um tubo de vidro contendo 10 µL de heparina, homogeneizado e centrifugado, pelo tempo de 5 minutos na temperatura de 4 °C e 1200 rpm. A etapa posterior consistiu na retirada do plasma e da camada de leucócitos por aspiração. Logo após, a suspensão de hemácias foi lavada, por três vezes, com uma solução gelada de tampão salino fosfato (PBS) na concentração de 10,0 mmol/L, de pH 7,4.

Depois de todas as etapas, as hemácias foram ressuspensas em PBS 10,0 mmol/L, contendo glicose, penicilina e estreptomicina, pH 7,4 com a finalidade de acertar o volume globular para 3,0 %. A solução contendo hemácias foi mantida em incubadora (shaker) às condições de 37 °C, 150 rpm pelo tempo de 72 horas, com a finalidade de simular as condições do corpo humano. Todo o procedimento deste ensaio foi realizado conforme protocolos experimentais anteriormente relatados na literatura (CRUZ SILVA

et al., 2000; CRUZ SILVA et al., 2001; BANERJEE et al., 2008). O presente ensaio possui parecer favorável do Comitê de Ética em pesquisa com seres humanos COMEP – UNICENTRO, número 205.075.

3.6.2 Atividade Citotóxica ex vivo sobre as hemácias

Para esse ensaio, 7 amostras diferentes foram avaliadas, sendo 4 tipos de controles e 3 amostras. Os controles foram: controle 100 % de hemólise (A), controle contendo metanol + hemácias (B), controle tampão + hemácias (C) e controle contendo dimetilsulfóxido (DMSO) + hemácias (D). As amostras analisadas foram a solução padrão de crisina na concentração de 50 µg/mL (E), a solução diluída de suspensão de nanopartículas lipídicas vazias (F) e a solução diluída de suspensão de nanopartículas lipídicas carregadas com concentração de crisina de 50 µg/mL (G).

As amostras foram incubadas em shaker com controle de temperatura de 37 °C, sendo após isso, centrifugadas quando retirados as amostras nos tempos de 24, 48 e 72 horas de análise. Após a centrifugação, os sobrenadantes das amostras oriundos da separação realizada pela centrífuga, foram lidos em espectrofotômetro de placas, Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta e Visível (UV-Vis) (Flex Station 3, Molecular Devices).

3.7 Determinação da atividade antioxidante sobre o radical ABTS^{•+}

O ensaio para a determinação da atividade antioxidante das amostras frente ao radical ABTS^{•+} contou com 3 tipos de amostras diferentes: nanopartículas carregadas com crisina, nanopartículas vazias (sem crisina) e solução padrão de crisina. Para tal, as amostras foram testadas nas concentrações de 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL e 20 µg/mL, concentrações quais, para a nanopartícula lipídica carregada, levaram em consideração valores médios de eficiência de encapsulação (EE = 99,0 %).

As diluições da solução padrão de crisina foram realizadas utilizando-se como solvente o tampão salino fosfato no pH 7,4, mas as diluições da suspensão das nanopartículas vazias levaram em consideração os cálculos realizados para a diluição de

nanopartículas lipídicas contendo crisina. Todas as amostras, em todas as concentrações estipuladas foram analisadas em triplicata.

O método utilizado para o estudo da capacidade antioxidante das amostras foi proposto por Re et al. (1999), fazendo-se algumas adaptações. As diluições das amostras foram incubadas em ABTS^{•+} pelo tempo de 30 minutos sob ausência de luz. Após esse período, a análise foi realizada com a leitura da redução do radical ABTS^{•+} em um espectrofotômetro de microplaca no comprimento de onda de 734 nm (AK, GÜLÇİN, 2008).

3.8 Liberação da Crisina a partir das Nanopartículas Lipídicas em fluido gástrico simulado (FGS) e no fluido intestinal simulado (FIS)

3.8.1. Preparo dos Fluidos Gástrico e Intestinal

O preparo do fluido gástrico consistiu na mistura de 0,05 g de NaCl dissolvidos em 5,0 mL de água ultrapura e 0,08 g na enzima pepsina solubilizada em apenas 0,700 mL de HCl na concentração de 0,2 mol/L. Após isso, a mistura foi avolumada para 25,0 mL e o pH foi ajustado para 1,2. Diferentemente do fluido gástrico, o fluido intestinal contou com a mistura de 0,17 g de fosfato monobásico de potássio (K₂HPO₄) solubilizados em 10,0 mL de água ultrapura com 0,25 g da enzima pancreatina solubilizada em 1,92 mL de uma solução de NaOH na concentração de 0,2 mol/L. Depois disso, a solução foi avolumada para 25,0 mL e o pH foi ajustado para 6,8, simulando o pH do trato intestinal. Para ambos os fluidos, os valores de pH foram ajustados utilizando as soluções já preparadas de HCl (na concentração de 0,2 mol/L) e NaOH (na concentração de 0,2 mol/L). Essa metodologia de preparo foi proposta na USP 37 com adição das enzimas (“USP 37-NF 32 EN ESPAÑOL VOLUMEN 2”, 2014).

3.8.2 Ensaio de solubilidade da Crisina nos Fluidos Gástrico e Intestinal Simulados

Os ensaios de solubilidade do composto crisina foram determinados individualmente para os fluidos gástrico simulado e intestinal simulado. O objetivo desse ensaio é averiguar a massa de crisina que foi solubilizada em cada fluido simulado. Isso ocorreu primeiramente de forma visual durante os dias de análise, e após isso de maneira

empírica através da determinação por cromatografia. Esse ensaio faz-se necessário, uma vez que a crisina é praticamente insolúvel em água.

Para isso, cerca de 5,0 mg de crisina foram pesados e colocados em eppendorfs separados e previamente identificados, juntamente com 1,0 mL de cada fluido simulado, em triplicata (n=3). Nos eppendorfs foi adicionado alíquotas de 10 µL de Tween 80 (polisorbato 80) bem como 10 µL de uma solução de dodecil sulfato de sódio na concentração de 5% para otimizar a melhor condição e proporcionar a mistura do composto crisina juntamente com os fluídos gástrico e intestinal.

Durante o período de 48 hrs, as amostras foram submetidas a incubação em uma incubadora shaker (Orbital Q816M22 - Quimis®) com agitação orbital de 150 rpm, em temperatura controlada de 37°C. Nesse período, foi necessário verificar de tempos em tempos se a crisina já solubilizou completamente, se acaso isso ocorresse, deveriam ser adicionados mais 5,0 mg para que os fluídos estejam bem saturados.

Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 17000 rpm, à 15°C, durante o tempo de 15 minutos. Os sobrenadantes obtidos foram retirados e armazenados para posterior análise. Para a análise por cromatografia, os sobrenadantes foram filtrados em filtro Milipore de 0,22 µm e diluídos em metanol na proporção 1:10 (v/v) e tiveram suas concentrações máximas de solubilidade determinadas pelo método analítico CLAE descrito no subitem 3.4.2 (n=3).

3.8.3 Liberação da Crisina associada às Nanopartículas lipídicas nos FGS e FIS

O ensaio de liberação de crisina associada às nanopartículas lipídicas em fluídos gástrico e intestinal simulados contou com o tensoativo Tween 80 (polisorbato 80) para proporcionar melhor mistura entre a crisina e os fluídos simulados simulando assim o trânsito das mesmas pelo trato gastrointestinal. A liberação gastrointestinal foi conduzida sob a condição sink, detalhada no item anterior pelo método de agitação utilizando shaker que proporciona uma agitação orbital e com subsequente ultracentrifugação (CASA et al., 2014).

Uma massa de 156,4 µg de crisina encapsulada foi colocada a um eppendorf e logo após 1,0 mL do fluido gástrico simulado (pH 1,2) contendo 5,0 % de Tween 80 foi

adicionado à massa de crisina. As triplicatas foram incubadas em shaker com agitação constante de 150 rpm, sob temperatura de 37 °C. No tempo de 30 minutos e 1 hora de incubação, os eppendorfs foram ultracentrifugados em condições pré-estabelecidas (15500 rpm, 25 °C e 15 min), os sobrenadantes foram separados e armazenados e foi repostos 1,0 mL de fluido gástrico simulado fresco a fim de manter o volume constante.

Quando se completou 2 horas de incubação, o mesmo foi feito com exceção do líquido repostos sendo o fluido intestinal simulado (pH 6,8) também contendo 5,0 % de Tween 80. Nos intervalos de tempo de 3, 4, 5, 6, 12 horas, as amostras também foram ultracentrifugadas e os sobrenadantes armazenados para posterior análise. No último tempo específico de 24 hrs, nenhum líquido foi repostos.

Para análise cromatográfica, os sobrenadantes recolhidos e armazenados em cada intervalo de tempo foram filtrados em filtro de 0,22 µm e analisados pelo método CLAE desenvolvido para a determinação de crisina em nanopartículas lipídicas. Além deste estudo ser realizado em triplicata, o resultado foi expresso considerando o desvio padrão.

3.9 Estudo de liberação de Crisina a partir da Nanopartícula Lipídica pelo método *in vitro*

3.9.1 Estudo de solubilidade da Crisina no meio receptor

Para o ensaio de liberação de crisina *in vitro* fez-se necessário também um estudo da solubilidade do composto frente a esse meio receptor. O meio receptor utilizado é o tampão PBS na concentração de 50 mM e pH de 7,4. Como foi o caso do ensaio de liberação gastro-intestinal, este ensaio também contou com a otimização do tensoativo mais apropriado para fazer a mistura entre a crisina e o meio receptor. O tensoativo utilizado também foi o Tween 80, investigado nas concentrações de 2,5 a 5,0 %).

O estudo de liberação foi realizado em triplicata (n=3), pesando-se cerca de 5,0 mg de crisina e adicionando o tampão PBS, já misturado com o tensoativo nas concentrações já estipuladas. Essas soluções foram mantidas em shaker pelo período de 48 hrs, na temperatura controlada de 37°C sob agitação de 150 rpm. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas nas condições de agitação de 15500 rpm, com temperatura de 15 °C pelo período de 15 minutos.

Depois dessa etapa, o sobrenadante foi etiquetado e armazenado para posterior análise cromatográfica. Para a análise de CLAE foi preciso filtrar as amostras em filtro com membrana de 0,22 μm e diluí-las em metanol. A análise também contou com as condições já otimizadas e validadas descritas no item 3.2 desta tese. Os resultados são expressos considerando o desvio padrão.

3.9.2 Ensaio do perfil de liberação de crisina através das nanopartículas lipídicas pelo método in vitro

O ensaio de liberação *in vitro* foi realizado em triplicata (n=3) pelo método já mencionado anteriormente de agitação em shaker com subsequente ultracentrifugação da amostra (CASA et al., 2015). Contando com o resultado do ensaio de solubilidade da crisina em tampão PBS, cerca de 250 μg de crisina foram adicionados a eppendorfs e logo após foi adicionado cerca de 1,0 mL de tampão PBS (50 mM, pH 7,4) contendo 5,0 % Tween 80.

As amostras foram incubadas em incubadora com agitação orbital do tipo shaker com rotação de 150 rpm e temperatura controlada de 37 °C. O período de incubação total das amostras foi de 120 hrs, contudo, em tempos previamente estabelecidos, as amostras foram ultracentrifugadas, nas condições de 15500 rpm, com temperatura de 15 °C pelo período de 15 minutos, os sobrenadantes foram retirados e armazenados e líquido fresco foi adicionado ao eppendorf. Os tempos previamente estabelecidos foram de 1,2,4,24,48,72,96 e 120 hrs.

A análise cromatográfica foi realizada contando com os sobrenadantes armazenados anteriormente e filtrados em membrana de 0,22 μm . A análise em CLAE contou com o método descrito no item 4.6, com o método validado e otimizado para a determinação de crisina liberada das nanopartículas lipídicas durante esse estudo de liberação.

3.10 Ensaio de Farmacocinética Pré-Clínica

O ensaio de farmacocinética faz-se necessário para simular o comportamento da crisina bem como da nanopartícula lipídica contendo crisina em um organismo similar ao organismo humano. Dessa maneira, esse estudo torna-se de extrema importância para simular o perfil farmacocinético da crisina e da nanopartícula, verificar sua biodisponibilidade, avaliar seu perfil de liberação entre outros detalhes. O presente ensaio possui parecer favorável do Comitê de Ética em pesquisa com uso de animais CEUA – UNICENTRO, número de protocolo 029/2020.

3.10.1 Otimização das Condições cromatográficas para a determinação de Crisina em plasma utilizando a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (UPLC-MS/MS)

Para a realização do ensaio de farmacocinética pré-clínica, foi necessária a realização do processo de otimização das condições cromatográficas para a determinação do composto crisina em plasma utilizando a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas sequencial (UPLC-MS/MS). As condições cromatográficas para a quantificação de crisina em plasma de ratos foram a utilização de uma coluna C18 de fase reversa, com tamanho de 100 mm x 2,1 mm, fase móvel composta por acetonitrila e acetato de amônio 5 mM, na proporção de 70:30 (v/v), eluída de forma isocrática utilizando o fluxo de 0,2 mL/min com um tempo total de 3,0 minutos, com volume de injeção de 2,0 µL. Para o detector de espectrômetro de massas, o forno de aquecimento da coluna foi mantido a temperatura de 40 °C. Durante a análise, as amostras analisadas foram mantidas no amostrador automático. A detecção espectrométrica para a determinação de crisina foi realizada por meio de ionização por eletropulverização positiva (ESI +) para a luteolina, utilizada como padrão interno (PI) para a análise. As condições do detector MS foram a voltagem capilar de 3,5 kV, a voltagem do cone a 56,41 V, voltagem do extrator 4,64 V, temperatura da fonte 150°C e temperatura de dessolvatação 600 °C e gás de dessolvatação 600 L/h e cone do gás a 30 L/h. A quantificação da crisina foi realizada no modo de monitoramento de reação múltipla (MRM) em m/z 254,92 \rightarrow 102,90 e m/z 254,92 \rightarrow 152,94 para crisina e m/z 286,95 \rightarrow 152,94 para a luteolina.

3.10.2 Preparação de Padrões e Amostras do Ensaio de Farmacocinética

As soluções de crisina e também do padrão interno (PI) foram realizadas utilizando em acetonitrila, o que resultou em soluções estoque de 1000 µL/mL. Essas soluções foram diluídas em acetonitrila para se obter soluções de menores concentrações (1000 e 10000 ng/mL, respectivamente) para utilização como soluções de trabalho. As amostras de controle de qualidade foram obtidas adicionando-se três concentrações de crisina (10, 40 e 80 ng/mL) em plasma, as quais foram usadas para validar e monitorar o desempenho do método bioanalítico. As amostras oriundas de plasma dos ratos foram tratadas por extração líquido-líquido com acetonitrila. Uma alíquota de 500 µL de amostra de plasma foi adicionada com 50 µL da solução de trabalho de luteolina e 1,0 mL de acetonitrila. Após isso, os tubos foram centrifugados sobre rotação de 10000 rpm pelo período de 10 minutos na temperatura de 4 °C. Os sobrenadantes resultantes do processo de centrifugação foram filtrados utilizando filtros de 0,22 µm e transferidos para um frasco de injeção, em seguida, uma alíquota de volume 4 µL foi injetada para análise no UPLC-MS/MS.

3.10.3 Validação do método de determinação de Crisina em plasma utilizando a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (UPLC-MS/MS)

A validação do método de determinação de crisina em plasma utilizando o equipamento UPLC-MS/MS foi realizada de acordo com os métodos recomendados da literatura (AOAC, 2012; ICH, 2005; FDA, 2001), avaliando os parâmetros como seletividade, linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), precisão exatidão e estabilidade, necessário para ensaios que utilizam amostras biológicas.

Para a avaliação da seletividade, extraiu-se o plasma branco de ratos para investigar possíveis interferências de compostos endógenos. O cromatograma da amostra de plasma branco foi comparado com o da amostra de plasma enriquecido com crisina e luteolina (GE, et al., 2015).

A linearidade foi avaliada através da construção de uma curva analítica na faixa de concentração de 5 a 100 ng/mL com sete níveis de concentração de crisina (em plasma de ratos e em acetonitrila), realizando o ensaio em triplicata. Ambas as curvas de calibração foram contruídas com base na razão da área do pico (analito ou PI) *versus* concentração. Ainda com relação à linearidade, foi realizado o estudo da técnica de regressão linear (BARROS NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2001) e aplicado também um teste de falta de ajuste no nível de confiança de 95%. Essas análises foram avaliadas com o auxílio do software Minitab 16. O intervalo de inclinação para cada método de padronização (padrão externo e adição de padrão) foi construído com o objetivo de verificar a presença de um possível efeito matriz.

O LD e o LQ foram calculados a partir das equações 1 e 2 respectivamente, onde SD refere-se ao desvio padrão do intercepto do eixo y e *b* é referindo-se a inclinação da curva de calibração utilizada para a avaliação da linearidade (ARAUJO, 2009; RIBANI, COLLINS e BOTTOLI, 2007).

A precisão do método de determinação foi estimada através de dois parâmetros, da estimativa da repetibilidade e da precisão intermediária (AOAC, 2012). Para ambas as análises foram utilizados padrões de crisina nas concentrações de 10, 40 e 80 ng/mL em 5 replicatas. Para a avaliação da precisão intermediária, os três níveis de concentração foram avaliados em três dias consecutivos e para a avaliação da repetibilidade, os três níveis de concentração foram avaliados no mesmo dia, em períodos diferentes. Para a averiguação da precisão, foram verificados os valores de porcentagem de desvio padrão relativo entre as amostras (DPR %).

A exatidão do método foi avaliada utilizando o estudo de recuperação de crisina por adição padrão de acordo com Nata (2018), para que ocorra perda de crisina durante o processo de extração. As amostras foram enriquecidas com concentrações distintas (10, 40 e 80 ng/mL) de crisina em triplicata, sendo o estudo concluído através da análise do erro padrão relativo (EPR%).

A estabilidade da crisina no plasma de ratos foi estudada sobre três diferentes condições de armazenamento utilizando três padrões nas concentrações baixa, média e alta (1) Estabilidade de congelamento e descongelamento: três ciclos entre intervalo de 24 hrs; (2) Estabilidade de bancada: curto prazo à temperatura ambiente por 6 horas; (3) Estabilidade do amostrador automático: estabilidade pós-preparativa a 10 °C por 24

horas. A recomendação é que o analito seja considerado estável através do erro relativo que precisa possuir o valor dentro de $\pm 15,0\%$ (GE, et al., 2015).

Dessa maneira, realizou-se o estudo da validação do método e de seus parâmetros e regulamentações para que o método seja considerado adequado para a quantificação de crisina em plasma.

3.10.4 Avaliação dos Parâmetros Farmacocinéticos após Administração Oral de dose única em ratos Wistar

O presente estudo farmacocinético foi realizado nas dependências do laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica, em Guarapuava. Os procedimentos seguiram as normas de conduta com pesquisa animal e foram realizados após a autorização do comitê de ética da Universidade Estadual do Centro – Oeste (Protocolo n° 029/2020 – CEUA).

Os animais (n=18) foram divididos inicialmente em grupo tratado com crisina e grupo tratado com nanopartículas de crisina. Os animais serão subdivididos em 3 grupos, contendo 6 animais cada grupo conforme segue:

Grupo 1: Os animais (n=6) foram eutanaziados para que a validação do método de análise por UPLC-MS/MS seja realizada.

Grupo 2: Os animais (n=6) receberam as formulações teste (crisina) por via oral e serão eutanaziados (dose: 20 mg/kg).

Grupo 3: Os animais (n=6) receberam as formulações teste (nanopartículas de crisina) pela via oral e foram eutanaziados (dose: a ser determinada, mas entre 20 mg/kg).

A crisina foi administrada em forma de suspensão aquosa de maneira similar às nanopartículas. As formulações foram administradas por via oral e a administração foi lenta (cerca de 2-3 min) a fim de evitar a deglutição da formulação.

Para o ensaio farmacocinético foram utilizados 18 ratos machos adultos Wistar com peso médio de 200 a 300 g, que foram alojados em gaiolas e mantidos em biotério com alimentação e água ad libitum, exceto durante a realização dos experimentos (estudo de farmacocinética), com ciclos de 12 horas claro-escuro, temperatura (22 ± 2 °C) e umidade (50 a 60%).

Para o experimento, os animais permaneceram em jejum de ração por um período de 12 horas antes e 4 horas após a administração dos fármacos. O jejum de líquidos iniciou após a administração dos fármacos e permanecerá até 4 horas após. As formulações foram ressuspenas em 1,0 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4 e administradas em dose única (concentração será de 20 mg/kg) pela via oral, por meio de gavagem, ou seja, introdução oral.

Amostras de sangue de ratos Wistar foram coletadas (0,3 mL), através de punção da veia caudal, em intervalos de tempo pré-determinados após a administração (0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12 e 24 h), para isso, no momento da coleta os animais foram imobilizados em contensores artificiais, para que o operador permaneça com as mãos livres executando com maior facilidade o procedimento, a contenção foi realizada por um menor tempo possível para evitar estresse.

As alíquotas coletadas (0,3 mL) foram transferidas para microtúbulos heparinizados, os quais foram centrifugados e o plasma separado para posterior tratamento e análise pelo método cromatografia líquida de ultra eficiência UPLC-MS/MS. Após o término do tratamento, os animais foram anestesiados com Cetamina e Xilazina e sacrificados por decapitação com auxílio de guilhotina.

Após a administração e as coletas de sangue, os animais de cada grupo foram sacrificados por decapitação. Amostras de sangue foram imediatamente coletadas em tubos heparinizados e centrifugadas a 4000 rpm durante 10 min a 4°C. O plasma foi separado e armazenado a $-80 \pm 1^\circ\text{C}$ até a análise. Para determinar a concentração de crisina no plasma, as amostras foram descongeladas, pesadas e acondicionadas em tubos de plástico com 2,5 mL de tampão fosfato salino (PBS) pH $7,4 \pm 0,5$ /g de plasma.

A homogeneização subsequente desta mistura foi realizada utilizando um homogeneizador. Os homogeneizados (100 µL) foram transferidos para tubos eppendorf e as amostras de plasma foram analisadas por UPLC/MS-MS (CARREÑO et al., 2016).

3.10.5 Análise dos Dados e Estatística

A análise dos dados obtidos pelo UPLC/MS-MS das amostras de plasma sanguíneo de ratos Wistar foi realizada através do software MassLynx Tm 4.1. a

disposição cinética da crisina foi avaliada seguindo um modelo monocompartimental aberto, com base em pares de dados de concentração *versus* tempo, obtidos através do delineamento da coleta das amostras sanguíneas após administração extravascular em ratos. Através da curva logarítmica da concentração *versus* tempo, foi obtida a curva de declínio caracterizada por fase de decaimento relativa à eliminação de crisina. Os parâmetros farmacocinéticos obtidos e calculados foram o pico de concentração plasmática ($C_{m\acute{a}x}$), o tempo em que ocorreu o pico de concentração plasmática ($T_{m\acute{a}x}$), área sob a curva da concentração plasmática de um fármaco *versus* tempo (ASC_0-t), área sob a curva de concentração plasmática de um fármaco *versus* tempo extrapolado ao infinito ($ASC_0-\infty$), meia vida de eliminação ($T_{1/2}$), constante de eliminação (K_{el}), volume de distribuição aparente (V_d) e clearance (Cl).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Resultados da Validação do Método de Determinação de Crisina pelo Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência por Detector de Arranjo de Diodos.

Visando a confiabilidade dos resultados obtidos pelo Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência na determinação de Crisina pelo Detector de Arranjo de Diodos, deve-se realizar a validação desse método. Para tal, foi necessária a averiguação de alguns parâmetros com a finalidade de verificar a quantificação correta de crisina em uma amostra qualquer. Os parâmetros avaliados foram seletividade, linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), exatidão, precisão e robustez do método.

As condições de análise para o desenvolvimento do método foram otimizadas em análises anteriores, adaptando as condições encontradas na literatura (GARG, 2019; LIU, 2018; WÁS, 2017). Essas condições são elucidadas na Tabela 4. Além da Validação do método, o CLAE foi utilizado para a determinação da Eficiência de Encapsulação para todos os lotes desenvolvidos durante a pesquisa.

Tabela 4. Tabela com as condições cromatográficas para a determinação de crisina pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos.

Coluna Cromatográfica	Agilent Eclipse XDB - C18 – 250 mm X 4,6 mm
Tempo de Corrida	5,0 minutos
Tempo de Retenção	3,4 minutos
Fase Móvel	Água Mili-Q 30,0 % / Acetonitrila 70,0 %
Volume de Injeção	30 µL
Fluxo da Fase Móvel	1,0 mL/minuto
Comprimento de Onda	280,0 nm

O comprimento de onda próximo a 280,0 nm é o comprimento ideal para a detecção de flavonoides em amostras. Isso pode ser observado por alguns trabalhos reportados na literatura (GARG, 2019; FAN, 2019; HUANG, 2018). Os parâmetros avaliados para a validação do método serão descritos item a item, para serem melhor compreendidos e também avaliados conforme o órgão regulamentador, a ANVISA (2017). Dessa forma, pode-se trabalhar cada parâmetro e suas especificações, bem como compará-los com a literatura em questão.

4.1.1 Seletividade

A seletividade do método, como visto anteriormente, foi avaliada através dos cromatogramas de amostras de sobrenadante de nanopartículas brancas, sobrenadante de nanopartículas carregadas e também de uma solução de crisina na concentração de 0,5 mg/mL, utilizando como solvente o DMSO e também metanol. Os cromatogramas obtidos da análise por CLAE-UV foram elucidados abaixo, fazendo-se a comparação entre o tempo de retenção, intensidade do pico cromatográfico referente à crisina e a presença ou não de interferentes.

Na Figura 4 abaixo, referente ao cromatograma da solução de crisina na concentração de 0,5 mg/mL, pode-se verificar no tempo de $\pm 4,0$ minutos a presença de um pico cromatográfico uniforme com intensidade de 0,09 para a absorbância. Esse pico é referente à molécula crisina, notado em todas as diluições e soluções contendo apenas crisina e solvente analisadas em CLAE-UV. Dessa forma, pode-se concluir que o pico observado no tempo de 4,0 min é única e exclusivamente referente à crisina.

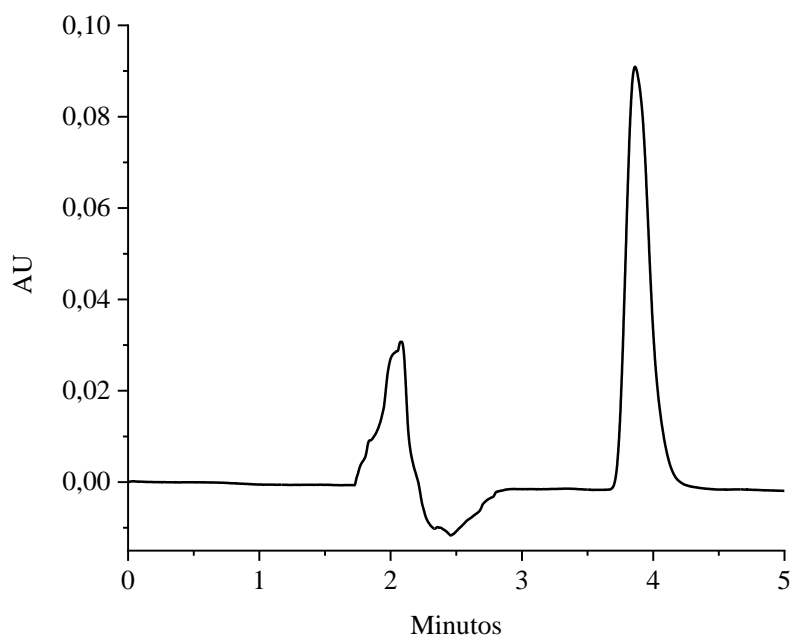


Figura 4. Cromatograma referente à solução do composto crisina, solubilizado em DMSO e metanol, na concentração de 0,5 mg/mL.

Observando o cromatograma da Figura 4 ainda, nota-se também um pico em torno de 2,0 minutos e logo após um pico negativo, ambos são referentes ao que se chama de

“volume morto” que ocorre devido a troca de amostras realizada pelo próprio equipamento. Essa diferença pode ser encontrada na maioria, se não na totalidade dos cromatogramas elucidados nessa tese.

Outro cromatograma o qual a análise também faz parte do estudo da seletividade é o que apresenta-se na Figura 5, cromatograma referente à solução de sobrenadante da nanopartícula lipídica branca. Ao analisarmos esse cromatograma, logo podemos afirmar que, apesar do pico na região de 2,0 minutos, pico esse já mencionado no parágrafo anterior referindo-se a um volume morto, não existe a presença de qualquer pico referente à molécula crisina, o que corrobora com a intenção de que em uma nanopartícula lipídica branca não existe qualquer indício do composto de interesse.

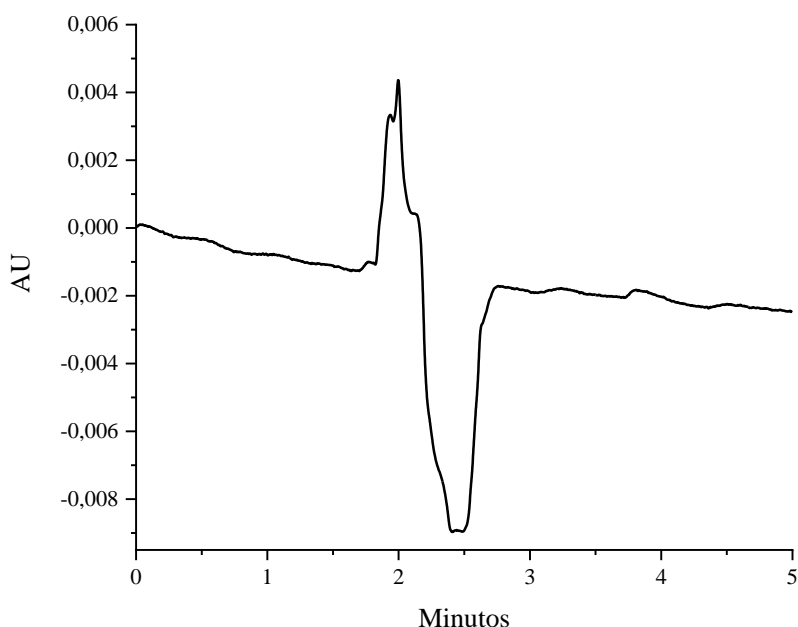


Figura 5. Cromatograma referente à amostra de sobrenadante de nanopartícula lipídica vazia, a qual não possui crisina, apenas a matriz lipídica.

Nota-se ainda na Figura 5 que a intensidade do que chamamos de volume morto também é reduzida, quando comparada a figura anterior da solução de crisina livre. Isso se deve ao fato de não ocorrer a presença de pico cromatográfico nenhum, o que diminui o ruído, tornando o volume morto menos significativo.

Como último mas de grande importância cromatograma avaliado no estudo da seletividade, encontramos o da Figura 6, ou seja, o cromatograma referente à amostra de

sobrenadante da nanopartícula lipídica contendo crisina. Nesta figura, pode-se notar um pico cromatográfico simétrico e de grande intensidade na região de 4,0 minutos. Comparando-se com o cromatograma da Figura 4, pode verificar que os tempos de retenção, ou seja, os tempo de apresentação para o pico são iguais, podendo assim concluir que são ambos picos referentes à crisina, presente tanto na solução como na nanopartícula carregada.

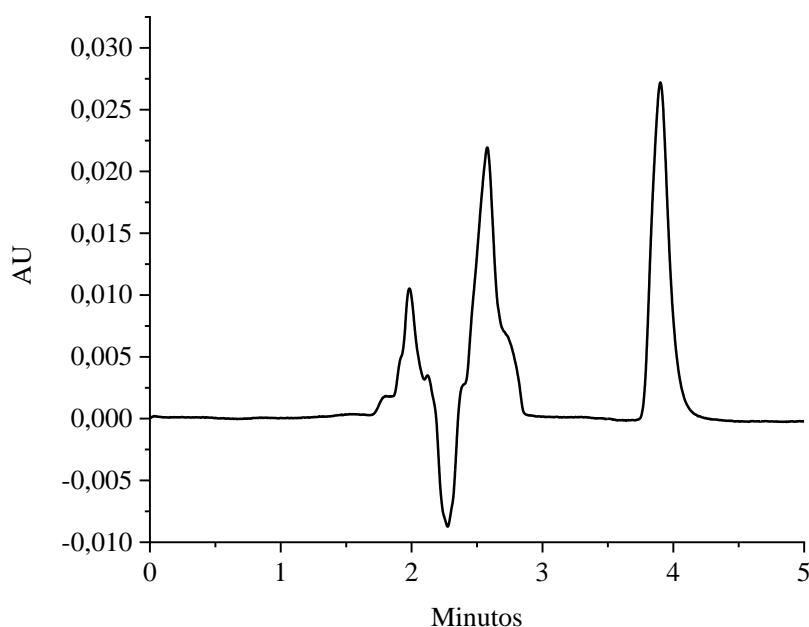


Figura 6. Cromatograma referente à amostra de sobrenadante da nanopartícula lipídica carregada contendo crisina juntamente com a matriz lipídica.

Outro detalhe interessante sobre o cromatograma acima, pode ser percebido pela intensidade do pico cromatográfico referente à crisina. Essa amostra, como dito anteriormente é do sobrenadante da nanopartícula lipídica carregada com crisina, ou seja, refere-se à crisina que não foi encapsulada através do processo de desenvolvimento da nanopartícula. Devido à quantidade mínima de crisina presente no sobrenadante da amostra, não existe grande intensidade do pico cromatográfico mencionado.

Na região de 2,5 minutos, ainda existe um pico de menor intensidade que o referente à crisina e que não foi apresentado nos outros cromatogramas que pode significar uma relação com a interação entre a crisina e o solvente, ou até mesmo da matriz do sobrenadante da amostra.

Com a análise da seletividade, pode-se concluir que o método de determinação de crisina através de CLAE-UV é um método seletivo, ou seja, não apresenta nenhum interferente das matrizes dos sobrenadantes, ou seja, o método pode ser considerado confiável para a determinação de crisina sem que interferentes das amostras de sobrenadante de nanopartículas comprometam a quantificação da crisina. De acordo com o órgão regulamentador (ANVISA, 2017), o método pode ser considerado seletivo quando faz-se a comparação entre os cromatogramas, tempos de retenção.

4.1.2 Linearidade

Para a avaliação da linearidade, uma curva analítica foi feita na faixa de 5,0 a 50,0 mg/mL de crisina. Avalia-se nesse parâmetro a faixa de concentração escolhida para fazer a curva padrão de calibração, ou seja, verificar se as concentrações da curva analítica são adequadas às concentrações resultantes das amostras. Isso nos permitirá dizer se os resultados obtidos são ou não proporcionais às concentrações de crisina nas amostras de sobrenadante de nanopartículas.

Os valores referentes à curva de calibração, foram submetidos à regressão linear no intervalo de 95% de confiança. Sendo assim, os resultados foram introduzidos em um modelo linear, sendo dessa maneira ajustados. Esses resultados estão na Tabela 5.

Tabela 5. Avaliação do parâmetro linearidade utilizando os resultados da análise de regressão linear no intervalo de 95 % de confiança e o teste de falta de ajuste aplicado à curva de calibração para a determinação de crisina em nanopartículas sólidas lipídicas.

Regressão*		Falta de Ajuste **		r	R ²
F _{regressão}	Valor de p	F _{faj}	Valor de p	0,9992	99,92 %
28539,58	0,000	4,99	0,005		
Coeficientes da Reta de Regressão ± Erro Padrão				t _{observado} ***	Valor de p
Intercepto:		-11614		-0,65	0,521
Inclinação:		106670		168,94	0,000

*Para regressão, $F_{critico}(0,05; 1, 23) = 4,28$. **Para falta de ajuste $F_{critico}(0,05; 6, 23) = 2,64$. ***Para os coeficientes da reta, $t_{critico}(0,025; 23) = 2,069$.

A fim de verificar a linearidade do método, foi aplicada uma análise de regressão linear e também um teste de falta de ajuste (F_{faj}) aos dados da curva de calibração (Tabela

5). Os resultados indicam que o modelo adotado é linear, sendo adequado para correlacionar a área do pico de eluição da crisina com a concentração da mesma em cada amostra. Estes resultados são ressaltados pela regressão que foi altamente significativa ($p = 0,000$), apesar do modelo linear apresentar leve falta de ajuste ($p < 0,05$) no nível de confiança de 95%. Além disso, foi obtido um valor para o coeficiente de determinação ($R^2 = 99,9\%$) o que demonstra o bom ajuste do modelo linear aos dados da curva de calibração, pois somente 0,4% da variabilidade é devido aos resíduos e à falta de ajuste.

Da mesma forma, foi aplicado ainda o teste t no intervalo de confiança de 95%, para avaliar a significância da inclinação e do intercepto da curva padrão de calibração, sendo estes dois coeficientes chamados de coeficientes de calibração. Essa análise mostrou que o coeficiente de calibração denominado intercepto da curva padrão pode ser removido da equação. Isso é justificado porque este coeficiente não apresentou significância na equação, ou seja, quando a reta é prolongada, ela passará pela origem da curva de calibração. Para o método de detecção pelo UV-Vis, espera-se, como ocorreu nos resultados, que a curva de calibração, quando prolongada, passe pelo intercepto da curva, obedecendo à lei de Lambert-Beer.

O outro coeficiente, a inclinação da curva padrão de calibração, foi avaliado mostrando ser significativo à equação da reta. Isto é justificado pelo valor de p maior que 0,05 e pelo valor de t maior que o $t_{crítico}$. Desta maneira, pode-se afirmar a linearidade da curva padrão de calibração e verifica-se também que o método apresentado apresenta modelo linear.

Levando em consideração todas estas análises, pode-se provar que o modelo estudado é linear, passa pela origem e é representado pela equação:

$$\text{Área} = - 11614 + 106670 * \text{Concentração de CRISINA em mg/mL.}$$

A linearidade é expressa pelo modelo na faixa de concentração de 5,0 a 50,0 mg/L. A Figura 7 elucida a curva padrão de calibração para a linearidade.

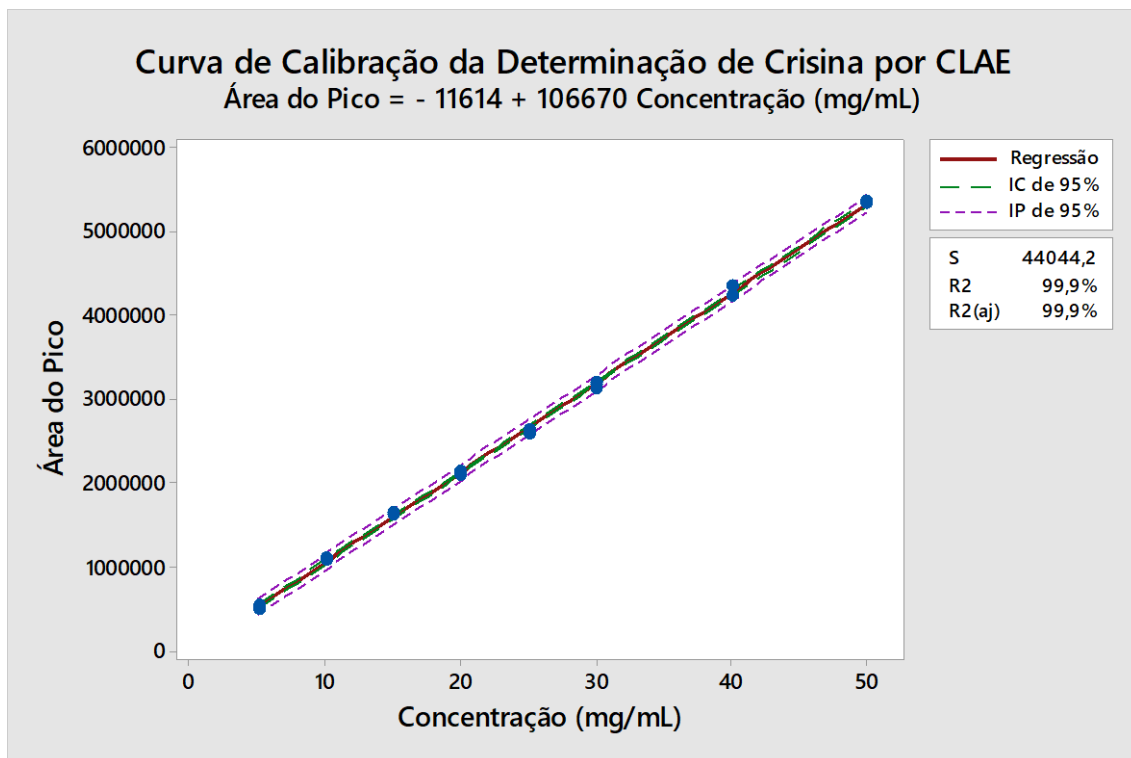


Figura 7. Curva analítica de calibração para a determinação de crisina obtida em amostras de sobrenadante de nanopartículas sólidas lipídicas carregadas, fazendo uso do método de regressão linear, no intervalo de 95% de confiança.

Comparando-se a linearidade estudada neste método cromatográfico, nota-se que o método empregado é linear para essa faixa de concentração (5,0 a 50,0 mg/mL) de crisina, linearidade essa também encontrada por Garg (2019) na determinação de crisina em nanopartículas lipídicas sólidas utilizando a faixa de concentração de 0,2 a 10,0 µg/mL e por Wás (2017) em seu trabalho sobre determinação de flavonoides em pólen de abelha na faixa de concentração de 2,5 a 10,0 µg/mL.

4.1.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O LD e o LQ foram calculados para analisar se o método proposto pode realizar a determinação de crisina presente nas amostras de sobrenadante de nanopartículas lipídicas. Segundo a (ANVISA, 2017), o LD é a menor concentração do analito que o equipamento pode detectar, mas não pode quantificar, e o LQ é a menor concentração deste analito, a qual o equipamento pode quantificar com precisão e exatidão.

Como visto anteriormente, o cálculo do LD e LQ foi feito levando em consideração o desvio padrão do intercepto da curva analítica elaborada para

determinações de crisina com concentração mais baixa que a utilizada na curva de calibração para a linearidade. Os valores de LD e LQ obtidos no método que desenvolvemos para a faixa de concentração de crisina de 1,0 a 8,0 µg/mL foram respectivamente, 0,436 e 1,320 µg/mL.

LD's e LQ's semelhantes foram encontrados no trabalho de Garg (2018) com valores de 0,05 e 0,14 µg/mL de crisina, respectivamente, na faixa de concentração de 0,2 a 10,0 µg/mL. Comparando-se ambos os resultados, pode-se verificar que a curva de calibração utilizada para o cálculo e LD e LQ neste trabalho apresenta faixa de concentração superior à elaborada por Garg, obtendo assim limites de quantificação e detecção maiores que os encontrados neste trabalho. Isso é possivelmente explicado devido a faixa de concentração mais ampla utilizada em seu trabalho e também a inclinação da curva de calibração que é superior à encontrada em nosso trabalho.

4.1.4 Precisão

Fazendo-se a análise da precisão, pode-se verificar a confiabilidade do método estudado. Para essa avaliação, são analisados dois fatores, a precisão intra-corrída, realizada no mesmo dia, e a precisão inter-corrída, realizada no decorrer de 3 dias diferentes e consecutivos. A ANVISA (2017) nos informa que os valores aceitáveis para a precisão são abaixo de 15% de DPR. Os resultados da análise da precisão foram usados para calcular os desvios padrões relativos (DPR %) para as precisões intra e inter-corrídas, das três soluções de crisina com concentração diferente.

Os resultados do estudo de DPR %, demonstrados na Tabela 6, tanto para a precisão intra-corrída, quando para a inter-corrída, mostraram que ambos tiveram seus desvios padrões relativos dentro do valor recomendado, 15 % de RSD. Isto sugere que o método de determinação de crisina por CLAE em amostras de sobrenadante de nanopartículas lipídicas é preciso dentro dos padrões estabelecidos pela ANVISA (2017).

Tabela 6. Avaliação do parâmetro de validação precisão com resultados de desvio padrão relativo para a repetibilidade e a precisão interediária para três níveis de concentração: 5,0, 25,0 e 50,0 µg/mL para o método CLAE-DAD.

Níveis de Concentração	DPR (%)	
	Repetibilidade	Precisão Intermediária
Nível 1 – 5,0 µg/mL	0,987	0,341
Nível 2 – 25,0 µg/mL	0,855	0,263
Nível 3 – 50,0 µg/mL	0,493	0,211

De acordo com a Tabela 6, os valores de repetibilidade e de precisão intermediária foram adequados para a faixa de concentração, que foi a de ppm (µg/mL), sendo o maior valor encontrado foi de 0,987 % para a precisão intra-corrida na concentração de 5,0 µg/mL e o menor valor foi de 0,211 para a precisão inter-corrida na concentração de 50,0 µg/mL. Para o número de injeções realizadas no equipamento CLAE, o procedimento de determinação de crisina em amostras de sobrenadante de nanopartículas lipídicas possui alta precisão, observada pelos baixos valores de repetitividade e precisão intermediária.

Comparando-se a maneira como a precisão foi calculada neste trabalho e comparando-se com a maneira calculada por Garg (2019), ambas foram muito semelhantes, sendo que ambos os autores utilizaram 3 faixas de concentração calculando-se a repetitividade e a precisão intermediária. Os valores de ambos os trabalhos foram muito inferiores ao limite estipulado pelo órgão regulamentador (ANVISA, 2017) para a faixa de concentração de µg/mL, concluindo-se assim a precisão dos métodos em ambos os trabalhos.

4.1.5 Exatidão

Para a análise da exatidão do método de determinação de crisina em amostras de sobrenadante de nanopartículas lipídicas, foram enriquecidas 3 amostras de sobrenadantes de nanopartículas branca com concentrações distintas e as mesmas foram analisadas pelo método CLAE-UV. A exatidão foi analisada por meio de cálculos de recuperação desses três níveis de concentrações, 5,0, 25,0 e 50,0 µg/mL de crisina. O INMETRO (2018) recomenda que ao se tratar da exatidão, a faixa de recuperação do analito quantificado deve estar no intervalo de 80 a 120 %. A Tabela 7 apresenta os

valores de recuperação para as três concentrações, lembrando que cada nível de concentração apresentava triplicatas verdadeiras.

Tabela 7. Estudo da exatidão com valores de recuperação de crisina para três concentrações 5,0, 25,0 e 50,0 µg/mL para a determinação de crisina em amostras de sobrenadante de nanopartículas sólidas lipídicas vazias utilizando o método de CLAE-UV.

Amostras	% de Recuperação			Valor Médio + DP
	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	
5,0 µg/mL	98,6	98,4	99,6	98,86 ± 0,64
25,0 µg/mL	99,8	98,0	99,5	99,09 ± 0,96
50,0 µg/mL	99,9	99,6	98,6	99,36 ± 0,67

Comparando-se o trabalho realizado no presente artigo com o de Garg (2018) que também fez o estudo da recuperação de crisina em três concentrações distintas, nota-se que ambos os trabalhos atingiram valores recomendados pelo INMETRO (2018), onde são encontradas porcentagens de recuperação entre 80 a 100 % para as faixas de concentração utilizadas. Devido a isso, pode-se considerar o método de determinação de crisina em amostras de nanopartículas lipídicas como exato, ou seja, pode-se confiar na determinação realizada pelo equipamento para as concentrações mencionadas na tabela acima.

4.1.6 Robustez

A robustez do método foi avaliada segundo a mudança de dois parâmetros cromatográficos importantes: a proporção e o fluxo da fase móvel. Essas mudanças podem acarretar em variações na quantificação do analito (crisina) em soluções com concentrações específicas e já anteriormente analisadas. Dessa maneira, faz-se o estudo dessas variações e sua influência sobre a quantificação do analito.

Para avaliar a robustez do método, foi necessário realizar o cálculo da porcentagem do DPR. Nata (2018) regulamentou que para um método ser considerado robusto, o mesmo precisa ter valores de % DPR inferior a 15,0%. A Tabela 8 abaixo mostra toda essa influência entre as variações desses parâmetros cromatográficos com a quantificação da crisina nas amostras.

Tabela 8. Estudo da robustez do método de determinação de crisina a partir de nanopartículas sólidas lipídicas conforme os valores de recuperação da crisina contando com os parâmetros cromatográficos (fluxo de injeção da fase móvel e proporção da fase móvel) pelo método de CLAE-DAD.

Parâmetro Variado		% DPR		
		Nível I 5,0 µg/mL	Nível II 25,0 µg/mL	Nível III 50,0 µg/mL
Fluxo	<i>Nível Máximo</i>	0,971	0,621	0,979
	<i>Nível Mínimo</i>	0,449	0,461	0,223
Proporção	<i>Nível Máximo</i>	2,27	0,667	0,295
	<i>Nível Mínimo</i>	2,18	0,456	0,138

Como foi verificado na tabela acima, todos os valores de % DPR foram muito inferiores ao recomendado por Nata (2018), o que sugere que o método cromatográfico de determinação de crisina em nanopartículas lipídicas é robusto, ou seja, com pequenas variações no fluxo e na proporção da fase móvel, a análise não é comprometida, indicando assim uma método eficiente de determinação mesmo sob condições adversas.

Outros métodos foram considerados robustos fazendo também a determinação da crisina em diferentes tipos de amostras, como o caso do trabalho de Garg (2019) onde avaliou a robustez alterando-se o fluxo e a proporção da fase móvel e o comprimento de onda próprio para a determinação de crisina. Tanto os valores de % DPR encontrados neste trabalho como os encontrados por Garg se encontram dentro dos padrões estabelecidos pela Nata (2018), concluindo-se portanto dois métodos robustos de determinação de crisina.

A validação foi realizada de acordo com todas as normas e regulamentações da ANVISA (2017) e também de outros órgãos como o INMETRO (2018), NATA (2018) e AOAC (2012). Devido a isso, conclui-se a validação do método cromatográfico de determinação de crisina em nanopartículas lipídicas contando com método altamente preciso e exato, com excelente seletividade, baixos limites de detecção e de quantificação, considerando a curva utilizada, obtendo-se também excelente robustez e ótima linearidade, o que torna o método validado.

4.2 Resultados do Protocolo de Obtenção de Nanopartícula Lipídica contendo Crisina e Otimização do Planejamento Fatorial 2³ com repetição de pontos centrais.

Contando com um método cromatográfico de determinação de crisina em nanopartículas lipídicas já validado, tendo excelentes parâmetros descritos, estudados e avaliados no item acima, foram desenvolvidas as análises de eficiência de encapsulação para este planejamento fatorial, com a finalidade de obter-se resultados precisos e exatos de quantificação e determinação do analito crisina.

A técnica utilizada para a elaboração das nanopartículas lipídicas contendo crisina foi a de homogeneização/dispersão por alto cisalhamento (NEVES et al., 2013; DARA, 2019; GLAUBITT, 2019; BAZZAZ, 2018; LUAN, 2019). Essa técnica é utilizada para o carregamento de compostos lipossolúveis ou hidrofóbicos, sendo que o alto cisalhamento promove uma mistura (homogeneização) completa entre fase orgânica e fase aquosa, sem que ocorra a formação de grumos ou a separação de ambas as fases.

Como visto no item dos materiais e métodos, as variáveis estudadas para determinar a melhor condição para a obtenção de nanopartículas lipídicas contendo crisina foram a massa de palmitato de metila, a massa de palmitato de etila e a concentração de álcool polivinílico. Para tal, ocorreu, através da aplicação de um planejamento fatorial 2³, com repetições no ponto central, a otimização do protocolo experimental. Com a finalidade de proporcionar uma melhor compreensão dos dados obtidos, foi elaborada a Tabela 9, a qual contém os resultados para as três respostas desejadas do planejamento fatorial adotado.

Tabela 9. Estudo do planejamento fatorial 2^2 com repetições do ponto central para as respostas avaliadas de tamanho de partícula (TP), índice de polidispersão (IPD) e eficiência de encapsulação (EE) avaliando os efeitos da concentração de PVA (%) e as massas de palmitato de metila (mg) e palmitato de etila (mg) para o protocolo experimental de desenvolvimento de nanopartículas sólidas lipídicas contendo crisina.

Ensaio	[PVA] (%)	P. M. (mg)	P. E (mg)	TP (nm)	IPD	EE (%)
1	-1	-1	-1	332,8	0,268	99,259
2	+1	-1	-1	488,4	0,332	98,423
3	0	+1	-1	3376,3	0,514	99,259
4	+1	+1	-1	837,1	0,393	99,371
5	-1	-1	+1	774,0	0,369	99,338
6	+1	-1	+1	326,0	0,295	98,446
7	-1	+1	+1	422,4	0,308	99,282
8	+1	+1	+1	342,9	0,247	99,204
9	0	0	0	558,4	0,274	99,577
10	0	0	0	433,8	0,264	99,098
11	0	0	0	390,6	0,285	99,476
12	0	0	0	360,1	0,249	98,722
13	0	0	0	446,2	0,242	99,048

Com a finalidade de aprofundar a discussão sobre os resultados do planejamento fatorial, foi realizada a análise da significância dos efeitos de cada variável no nível de 95 % de confiança utilizando o erro padrão com o auxílio do software Minitab 18. Fez-se necessária a separação da discussão em três partes, a eficiência de encapsulação será o primeiro item a ser discutido, seguida da resposta tamanho de partícula e por fim, o índice de polidispersão.

Analisando-se a eficiência de encapsulação obtida para os 13 ensaios descritos, foi elaborada a Tabela 10, que elucida os efeitos e seus respectivos erros padrão, para verificar a influência das três variáveis sobre a resposta de eficiência de encapsulação de

crisina no interior da nanopartícula lipídica. De maneira mais visual, foi elaborado também o gráfico de Pareto para essa resposta (Figura 8).

Tabela 10. Estudo da influência dos efeitos (concentração de PVA e massas de palmitato de metila e palmitato de etila) e suas respectivas interações na avaliação do planejamento fatorial 2^3 com repetições do ponto central para a resposta de Eficiência de Encapsulação.

Efeitos	Estimativa ± Erro Padrão
Média Global	99,07 % ± 0,122
Efeitos Principais:	
<i>Concentração de Tensoativo (A)</i>	-0,212 ± 0,244
<i>Massa de Palmitato de Metila (B)</i>	0,206 ± 0,244
<i>Massa de Palmitato de Etila (C)</i>	-0,005 ± 0,244
Efeitos de Interação entre Dois Fatores:	
<i>A x B</i>	0,220 ± 0,244
<i>A x C</i>	-0,031 ± 0,244
<i>B x C</i>	-0,017 ± 0,244
Efeitos de Interação entre Três Fatores:	
<i>A x B x C</i>	0,147 ± 0,244

Através das estimativas e erros padrão podemos observar a influência tanto dos fatores, quanto de suas interações sobre a eficiência de encapsulação. Nota-se que o valor de erro padrão tanto para os fatores quanto para quaisquer das interações entre dois ou três fatores foi superior aos valores das estimativas o que revela que nenhum desses efeitos foi significativo para a resposta analisada (% EE).

Visto que os valores de eficiência de encapsulação tiveram variação menor que 2,0 %, pode-se afirmar que o resultado é condizente com os valores encontrados de estimativa de efeitos. Neste caso, quando o valor do erro é maior que o valor da estimativa, o efeito se torna significativo à resposta esperada, o que demonstra influência sobre a mesma. Dessa maneira, corroborando com os resultados mostrados da Tabela 10, o Gráfico de Pareto (Figura 8) traz uma fácil elucidação fazendo a demonstração desses efeitos através de um gráfico de barras horizontais.

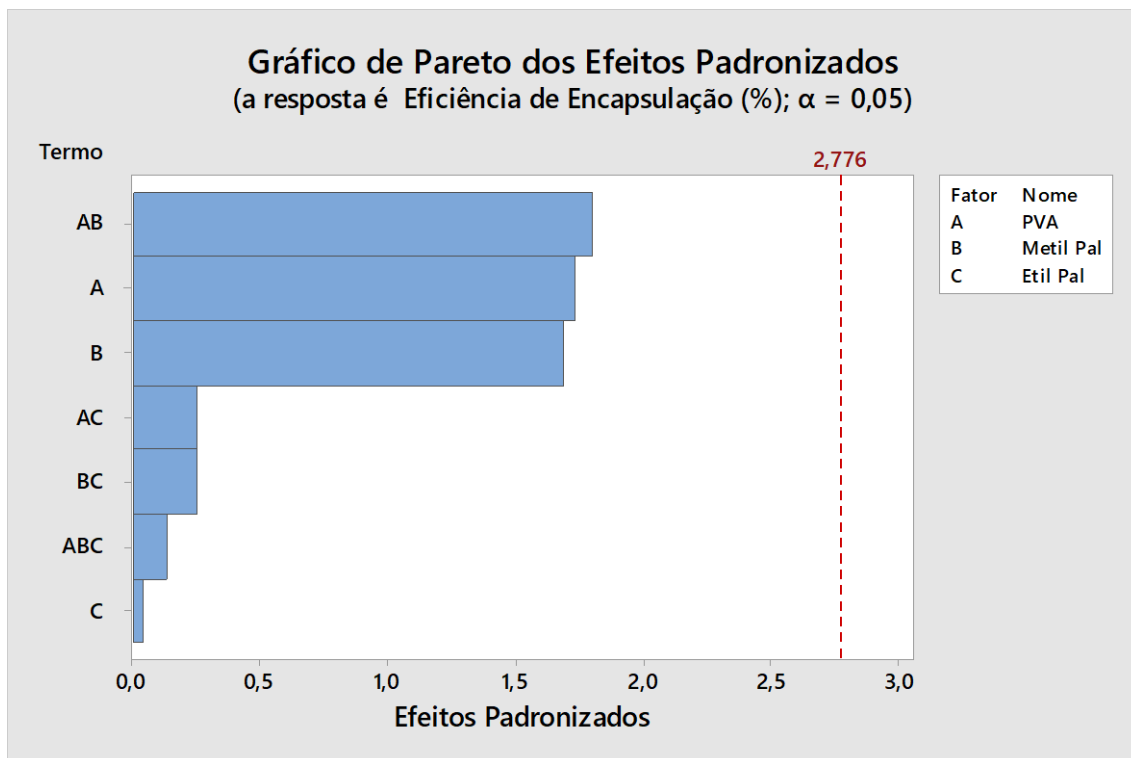


Figura 8. Gráfico de Pareto dos Efeitos Padronizados avaliando a eficiência de encapsulação do composto crisina em nanopartículas lipídicas carregadas, através da influência dos efeitos (concentração de PVA e as massas de palmitato de metila e palmitato de etila) e suas respectivas interações.

Com base no que se pode notar no Gráfico de Pareto, a linha pontilhada se refere ao valor de $t_{crítico}$ para 4 graus de liberdade, no intervalo de 95,0 % de confiança, indicando o limite de significância de cada fator para a resposta Eficiência em Encapsulação (%). Nota-se, portanto, que nenhum dos fatores ou de suas interações, foram significativos para essa resposta, porque nenhum deles ultrapassa essa linha vermelha.

Comparando-se o tamanho das barras horizontais, pode-se notar que os efeitos concentração de tensoativo (A) e massa de palmitato de metila (B), juntamente com a interação entre eles exercem maior influência sobre a Eficiência de Encapsulação, apesar das mesmas não serem significativas. Dessa maneira, pode-se concluir que para a eficiência de encapsulação, nenhum efeito e nenhuma interação teve influência significativa, ou seja, os ensaios todos elucidaram uma boa porcentagem de EE.

O tamanho de partícula, mensurado em nanômetros, foi o segundo fator avaliado nesse planejamento fatorial 2^3 com repetições do ponto central. Para tal, também foi elaborado a Tabela 11, contendo os efeitos e seus respectivos erros padrão para as três variáveis mencionadas e suas interações de dois e três fatores. Através dos valores desses

efeitos, pode ser analisada a influência dos mesmos sobre a resposta Tamanho de Partícula (nm).

Tabela 11. Estudo da influência dos efeitos (concentração de PVA e massas de palmitato de metila e palmitato de etila) e suas respectivas interações na avaliação do planejamento fatorial 2^3 com repetições do ponto central para a resposta de Tamanho de Partícula.

Efeitos	Estimativa \pm Erro Padrão
Média Global	862,5 nm \pm 26,7
Efeitos Principais:	
<i>Concentração de Tensoativo (A)</i>	-363,9 \pm 53,4
<i>Massa de Palmitato de Metila (B)</i>	382,2 \pm 53,4
<i>Massa de Palmitato de Etila (C)</i>	-396,2 \pm 53,4
Efeitos de Interação entre Dois Fatores:	
<i>A x B</i>	-290,8 \pm 53,4
<i>A x C</i>	232,0 \pm 53,4
<i>B x C</i>	-465,9 \pm 53,4
Efeitos de Interação entre Três Fatores:	
<i>A x B x C</i>	382,9 \pm 53,4

Através da Tabela 11, pode-se notar que todos os valores de estimativa dos efeitos calculados, bem como das interações entre esses efeitos, sendo de dois ou de três fatores, foram significativos, ou seja, foram maiores que do que o valor do erro padrão. O fator que exerceu maior influência sobre a resposta tamanho de partícula foi a interação entre o efeito de massa de palmitato de metila (B) e de massa de palmitato de etila (C), demonstrado pelo valor da estimativa (-465,9 \pm 53,4).

Os fatores que exercem menor, mas significativa influência sobre a resposta tamanho de partícula, foram a concentração do tensoativo (%), a massa de palmitato de metila (B), a massa de palmitato de etila (C) como efeitos isolados e a interação entre esses três fatores. Exercendo a menor, mas ainda sim significativa, influência tem-se as interações entre a concentração de tensoativo e a massa de palmitato de metila (AxB) e entre a concentração de tensoativo e a massa de palmitato de etila (AxC).

A melhor visualização de toda essa influência se faz através do gráfico de Pareto (Figura 9). Ele é elaborado através da divisão das estimativas dos efeitos e das interações pelo valor do erro padrão dando origem às barras horizontais de tal gráfico.

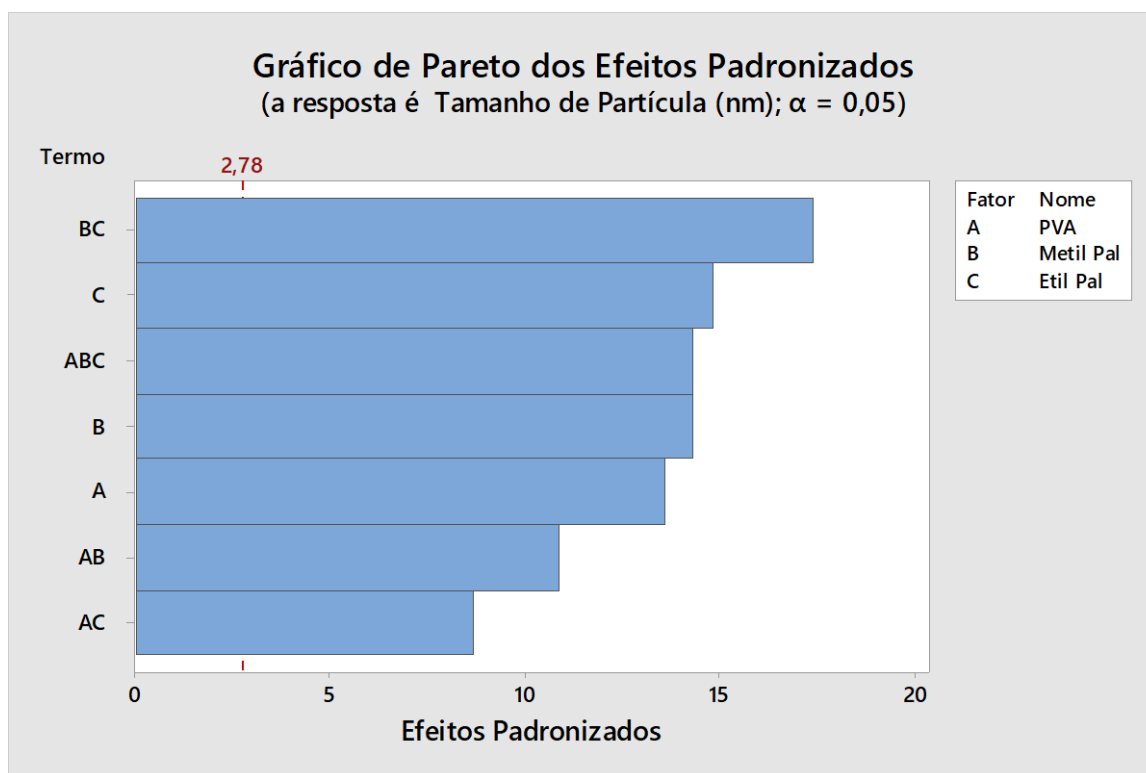


Figura 9. Gráfico de Pareto dos Efeitos Padronizados avaliando o diâmetro de partícula para as nanopartículas lipídicas carregadas, através da influência dos efeitos (concentração de PVA e as massas de palmitato de metila e palmitato de etila) e suas respectivas interações.

Pode-se notar que todos os fatores e interações exerceram influência sobre a resposta tamanho de partícula, sendo que a maior foi a interação entre as massas de palmitato de metila e palmitato de etila (BxC) e entre a menor influência foi a interação entre concentração de tensoativo e a massa de palmitato de etila (AxC). Essas influências podem ser melhor explicadas através dos gráficos de interações e dos principais efeitos.

A influência de todos os fatores e suas respectivas interações são apresentadas através de gráficos de interação e dos principais efeitos. Esses gráficos elucidam o comportamento de cada fator e de cada interação para a resposta de tamanho de partícula. Com base nisso, pode-se estimar, portanto, a condição que fornece o tamanho de partícula adequado, unindo-se as três variáveis, a concentração de tensoativo, a massa de palmitato de metila e a massa de palmitato de etila.

O tamanho de partícula deve ser menor que 400 nm para que não sofra o processo de fagocitose, que entende-se por englobamento de partículas sólidas por células de defesa presentes no organismo, como os fagócitos e os linfócitos. Além disso, as nanopartículas devem ser do tamanho adequado para que consigam carregar o composto crísin, passando por barreiras presentes em todo o organismo humano para liberar o composto desempenhando a função desejada (BANERJEE, 2016; GUPTA, KOMPELLA, 2006; RAO, GECKELER, 2011).

O Gráfico dos Principais Efeitos para o tamanho de partícula (Figura 10) contém os três parâmetros variados e a resposta do tamanho de partícula para os mesmos. Nota-se portanto que, considerando os efeitos isolados, a melhor concentração de tensoativo foi a de 0,675 %, a melhor massa de palmitato de metila foi de 50,0 mg e a melhor massa de palmitato de etila foi de 50,0 mg.

Apesar disso, essas mesmas condições não relatam ainda respostas que se encaixam no esperado ($TP < 400$ nm). Além disso, aparentemente, olhando a Figura 10, nota-se para a concentração de PVA os valores mínimo e máximo não apresentam diferença significativa, estando quase na mesma linha visual, o que ocorre também nas outras variáveis. Deve-se portanto, continuar o estudo investigativo sobre quais valores de parâmetro seriam mais adequados para otimizar a resposta tamanho de partícula.

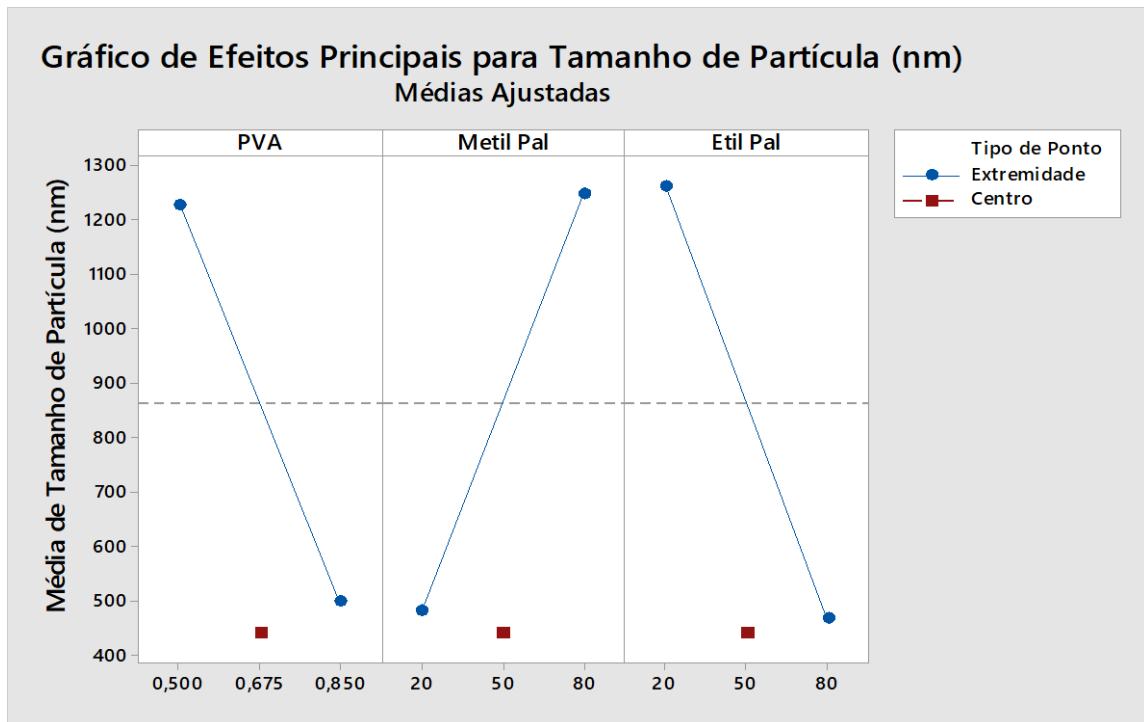


Figura 10. Gráfico representando a influência dos principais efeitos (concentração de PVA e massas de palmitato de metila e palmitato de etila) do planejamento fatorial 2^2 com repetição de ponto central para a resposta tamanho de partícula.

Apesar de podermos visualizar as melhores condições para os parâmetros isolados através dos efeitos, as interações, observadas no gráfico de Pareto, também apresentaram efeitos significativos. Com base nisso, deve ser feito um estudo de todas as variáveis e suas interações para que a melhor condição, escolhida com base no estudo dos efeitos e interações significativas, dos parâmetros, seja alcançada.

Desta maneira, como todos os efeitos e suas interações foram significativos, foi elaborado também o gráfico das Interações frente a resposta de tamanho de partícula (Figura 11). A avaliação de todas as interações fornece as melhores condições dos fatores de concentração de tensoativo, massa de palmitato de metila e massa de palmitato de etila.

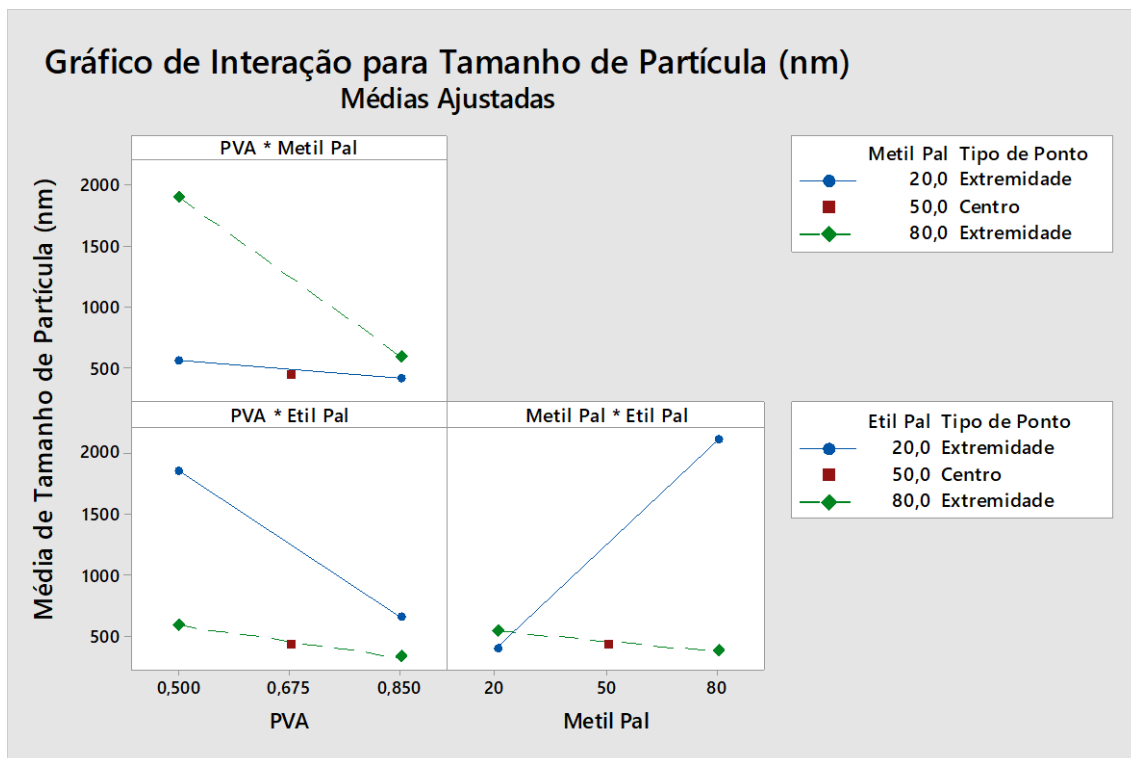


Figura 11. Gráfico representando a influência das interações dos principais efeitos (concentração de PVA e massas de palmitato de metila e palmitato de etila) do planejamento fatorial 2^2 com repetição de ponto central para a resposta tamanho de partícula.

Como pode-se notar, através da Figura 11, a interação entre a concentração de tensoativo e a massa de palmitato de metila fornece menores tamanhos de partícula nos valores de 0,85 % e 20,0 mg, respectivamente. Isso pode ocorrer devido a interação físico química entre a hidroxila do álcool polivinílico e o grupo éster do palmitato de metila. Já na interação entre a concentração de tensoativo e a massa de palmitato de etila, os melhores valores para o tamanho de partícula, considerando o limite superior aceitável de tamanho de 400,0 nm, foram de 0,85 % e 20,0 mg, respectivamente.

Para a última interação pertinente a essa resposta, foi observada que a massa de 80,0 mg de palmitato de metila e a massa de 80,0 mg de palmitato de etila foram as que apresentaram menores valores para a resposta tamanho de partícula. Notou-se entretanto que, experimentalmente, valores de massa superiores a 50,0 mg formavam uma película gordurosa na parte superior do eppendorf, a qual acaba por se misturar com o sobrenadante, possivelmente gerada por um excesso de lipídeos.

Apesar dos resultados mostrarem que a melhor concentração de tensoativo foi a de 0,85 %, pode-se destacar que a concentração de 0,50 % não apresentou diferença

significativa considerando o tamanho de partícula. Na concentração maior de tensoativo (0,85 %), temos valores na faixa de 488,4 nm e para a menor concentração (0,50 %) os valores migram para 332,8 nm.

Devido aos dados apresentados acima, pode-se verificar que o menor tamanho de partícula foi encontrado com a menor concentração de tensoativo, a de 0,50 %, o que, visando otimização de recursos financeiros, o uso de menos reagentes, o que acarreta em menos resíduos e conseqüentemente diminuindo a poluição ambiental, é ecologicamente correto. Além disso, a maior vantagem de todo o processo até aqui é o custo benefício da utilização de uma concentração menor de reagentes.

Com base em todos os gráficos e tabelas já apresentados, os resultados pertinentes à resposta de tamanho de partícula mostraram que as melhores condições para que seja encontrado um menor valor para o tamanho de partícula foram a massa de palmitato de metila de 20,0 mg, a massa de palmitato de etila de 20,0 mg e a concentração de tensoativo de 0,50 %.

Como último fator resposta a ser avaliado tem-se o índice de polidispersão (IPD), que deve possuir valores inferiores a 0,300, para que não haja uma grande dispersão e variabilidade entre os valores de tamanho de partícula, resultando em um sistema homogêneo de distribuição de tamanho, onde dá-se origem a uma 'família' apenas, gerando uma uniformidade na resposta (AVADI, 2010; KHAYATA, 2012).

Visando saber quais os fatores e suas respectivas interações que afetaram significativamente a resposta índice de polidispersão, foi elaborada a Tabela 12 para os efeitos e os respectivos erros padrão considerando as variáveis anteriormente mencionadas, a concentração do tensoativo álcool polivinílico, a massa de palmitato de metila e a massa de palmitato de etila.

Tabela 12. Estudo da influência dos efeitos (concentração de PVA e massas de palmitato de metila e palmitato de etila) e suas respectivas interações na avaliação do planejamento fatorial 2^3 com repetições do ponto central para a resposta de índice de polidispersão referente à distribuição de valores de tamanho de partícula.

Efeitos	Estimativa \pm Erro Padrão
Média Global	0,3408 \pm 0,0062
Efeitos Principais:	
<i>Concentração de Tensoativo (A)</i>	-0,0240 \pm 0,0124
<i>Massa de Palmitato de Metila (B)</i>	0,0247 \pm 0,0124
<i>Massa de Palmitato de Etila (C)</i>	-0,0720 \pm 0,0124
Efeitos de Interação entre Dois Fatores:	
<i>A x B</i>	-0,0430 \pm 0,0124
<i>A x C</i>	-0,0098 \pm 0,0124
<i>B x C</i>	-0,1040 \pm 0,0124
Efeitos de Interação entre Três Fatores:	
<i>A x B x C</i>	0,0495 \pm 0,0124

Como pode-se notar, quase todos os valores referentes a estimativa são maiores que o valor de 0,035. Dessa forma, entende-se por efeitos significativos a concentração de tensoativo (A), a massa de palmitato de metila (B) e a massa de palmitato de etila (C) e por interações significativas as de dois fatores que ocorrem entre A x B e entre B x C e também interação de três fatores A x B x C.

Baseado nesses dados, elaborou-se também o gráfico de Pareto referente aos Efeitos Padronizados (Figura 12), onde na linha vermelha encontra-se o valor de $t_{crítico}$ para 4 graus de liberdade, e assim um ‘limite inferior’ de influência significativa dos efeitos e de suas interações.

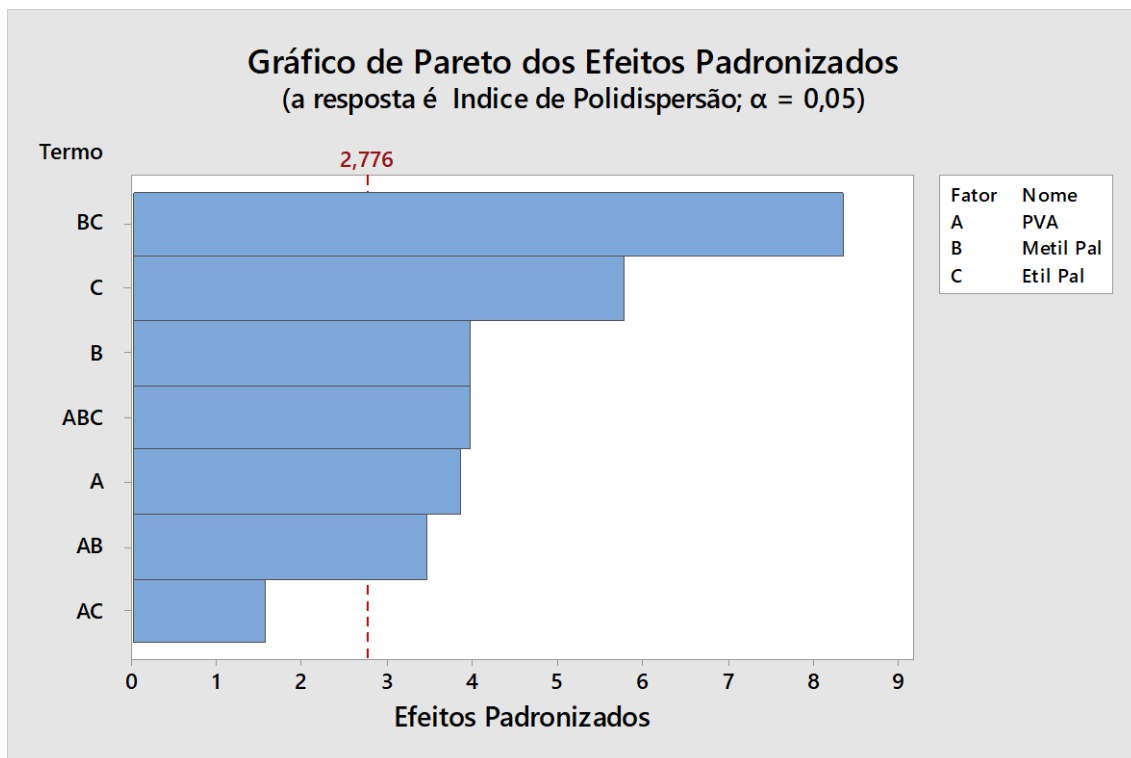


Figura 12. Gráfico de Pareto dos Efeitos Padronizados avaliando o índice de polidispersão referente à distribuição do tamanho de partícula para as nanopartículas lipídicas carregadas, através da influência dos efeitos (concentração de PVA e as massas de palmitato de metila e palmitato de etila) e suas respectivas interações.

Corroborando com a Tabela 12, o gráfico de Pareto (Figura 12) nos fornece uma melhor visualização da influência dos efeitos e suas interações. As barras horizontais indicam os valores de t para cada efeito e sua interação, pode-se notar que a única interação que não ultrapassa a linha vermelha é a interação entre a concentração de tensoativo e a massa de palmitato de etila (A x C), ou seja, a mesma não apresenta qualquer influência sobre a resposta analisada.

Pode-se concluir que todos os demais efeitos e suas interações são significativos para a resposta de índice de polidispersão. Entretanto, a interação de fatores que mais se distancia da linha vermelha, sendo portanto o que exerce maior influência sobre o IPD, é a interação entre a massa de palmitato de metila e a massa de palmitato de etila (BxC), considerando o valor de -0,1040. Os demais efeitos que ultrapassaram a linha também são significativos, mas exercem menor influência.

Para a resposta de IPD, o fator com a segunda maior influência foi a massa de palmitato de etila, visto que o valor encontrado para sua estimativa foi de -0,0720, sendo o valor negativo um indicativo da relação inversamente proporcional, ou seja, quanto

menor o valor da massa de palmitato de etila, maior será o valor do IPD. A interação que apresentou menor influência, mas ainda sim significativa, foi a interação entre a concentração de tensoativo e a massa de palmitato de metila, com valor de estimativa de -0,0430, indicando também uma relação inversamente proporcional.

Como quase todos os fatores e suas respectivas interações exerceram influência sobre a resposta IPD, elaborou-se portanto o gráfico a influência dos Principais Efeitos (Figura 8) juntamente com o gráfico das Interações significativas (Figura 9).

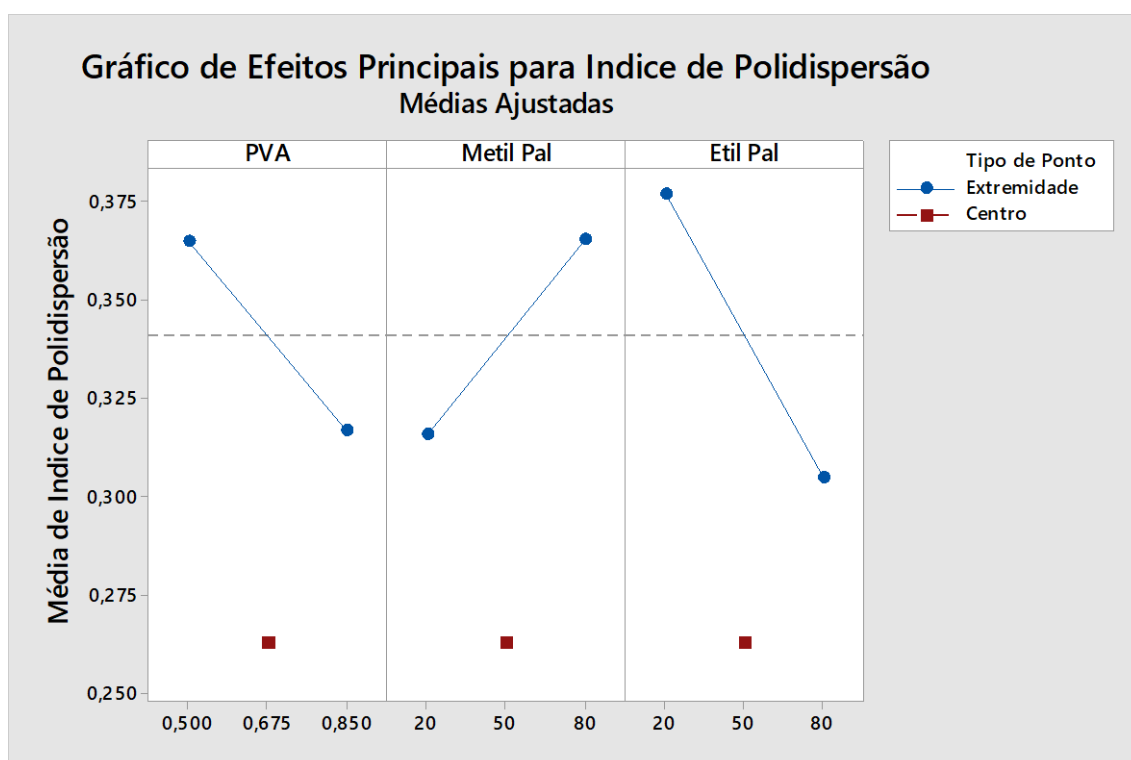


Figura 13. Gráfico representando a influência dos principais efeitos (concentração de PVA e as massas de palmitato de metila e palmitato de etila) do planejamento fatorial 2^2 com repetição de ponto central para a resposta índice de polidispersão referente à distribuição do tamanho de partícula para as nanopartículas lipídicas carregadas com crisina.

A Figura 13 elucidada o comportamento do valor de IPD considerando apenas os efeitos de maneira isolada. Com relação à concentração de PVA, tem-se que o valor mais adequado para o IPD seria o referido ao ponto central, de 0,675 %, apesar da relação inversamente proporcional, o ponto central fornece o menor valor de IPD. A relação entre a massa de palmitato de etila e o valor do IPD resulta em uma relação diretamente proporcional. Entretanto, o ponto referido ao ponto central (50,0 mg) resultou em menor e adequado valor considerando a solicitação exigida ($IPD < 0,300$).

A influência do último fator isolado, a massa de palmitato de etila, sobre o valor de IPD mostrou uma relação inversamente proporcional, em que o aumento do valor de massa resulta em valores baixos de IPD. Apesar disso, o ponto que resultou no melhor valor para o IPD atendendo a especificação determinada foi o ponto central (50,0 mg).

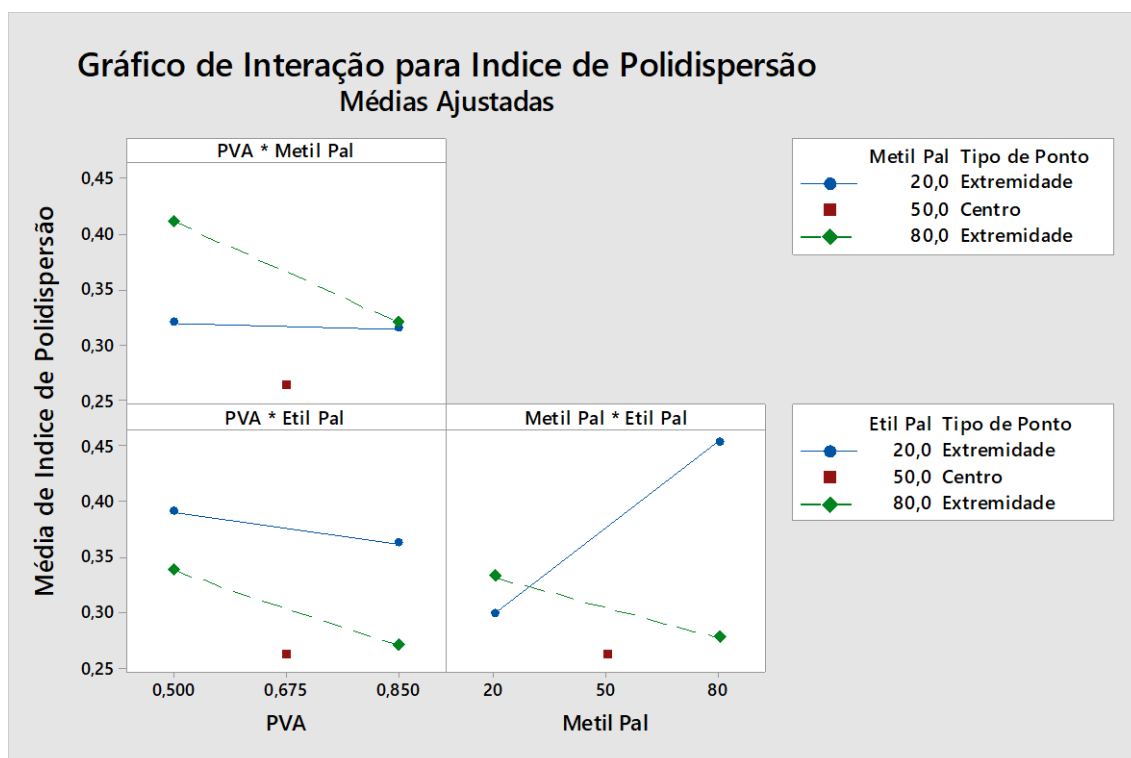


Figura 14. Gráfico representando a influência das interações dos principais efeitos (concentração de PVA e massas de palmitato de metila e palmitato de etila) do planejamento fatorial 2^2 com repetição de ponto central para a resposta [índice de polidispersão referente à distribuição do tamanho de partícula para as nanopartículas lipídicas carregadas com crisina].

A Tabela 12 mostrou que foram significativas apenas duas interações, a interação entre a concentração de tensoativo e a massa de palmitato de metila, com menor influência, e a interação entre a massa de palmitato de etila e a massa de palmitato de metila, exercendo a influência mais significativa.

Visando a melhor discussão da influência dessas interações, a Figura 14 foi elaborada contendo os gráficos do efeito das interações. Nota-se, portanto, que a interação entre A x B resulta em valores muito similares nas concentrações alta e baixa de tensoativo, apesar disso a concentração média (0,675 %) resultou no valor mais baixo de IPD. Para a última interação, entre B x C, notou-se que resultam em baixos níveis de IPD, as massas de 50,0 mg de palmitato de metila e 50,0 mg de palmitato de etila. Apesar

disso, pode-se notar também que tanto o limite superior quanto o limite inferior para as interações entre as massas apresentaram valores recomendados ($IPD < 0,300$), como foi o caso de 20,0 mg de palmitato de metila e 20,0 mg de palmitato de etila e também o de 80,0 mg para ambos.

Observa-se pelos gráficos dos efeitos e de interação que o planejamento fatorial 2^3 tem curvatura significativa. Pode-se concluir portanto, que a melhor condição para o IPD seriam valores baixos de massa dos lipídios (50,0 mg), no entanto, por não apresentar grande diferença significativa optou-se pelo ensaio escolhido para as duas respostas anteriores, cujos valores de massa dos lipídeos são de 20,0 mg juntamente com valor mais baixo da concentração de tensoativo (PVA, 0,5 %), como observado na Tabela 13.

Os tamanhos de partícula e índices de polidispersão estão de acordo com o relatado na literatura para nanopartículas sólidas lipídicas, onde menciona-se que uma das vantagens da utilização das NSL's está em tamanhos de partícula e IPD's com valores baixos ((PROW et al., 2011; COLA, et al., 2016).

Como pode-se notar também, a alta eficiência de encapsulação obtida através desse planejamento é também relatada como uma das vantagens da utilização de NSL's. Esse fato pode ser observado em outros trabalhos como o de Argimón et al. (2017) o qual utilizou as NSL's para o carreamento de vitamina A e alguns de seus ésteres e obteve eficiência de encapsulação maior que 90 %. O trabalho de Cola et al. (2016) também no uso de NSL's e NLC obtiveram eficiência de encapsulação maior que 99,0 % no uso de metopreno e ivermectina para aplicação veterinária.

Como todo o desenvolvimento do planejamento fatorial foi realizado com base em três respostas, eficiência de encapsulação, IPD e tamanho de partícula, e aliando-se todas as condições adequadas para cada resposta, pode-se concluir que a melhor condição do planejamento fatorial foi o ensaio de número 1, onde as condições de massa de lipídios foram de 20,0 mg para palmitato de etila e de 20,0 mg para palmitato de etila, e a concentração do tensoativo de 0,50 %. Isso resultou nos dados de tamanho de partícula (332,8 nm), índice de polidispersão (0,268) e eficiência de encapsulação (99,259 %), dados apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Tabela contendo os resultados dos parâmetros avaliados (tamanho de partícula, índice de polidispersão e eficiência de encapsulação para às amostras de sobrenadante de nanopartículas sólidas lipídicas vazia e carregada com crisina.

	TP (nm)	IPD	EE (%)
Nanopartícula carregada	332,8 ± 8,2	0,27 ± 0,016	99,28 ± 0,04
Nanopartícula vazia	246,8 ± 0,5	0,166 ± 0,011	N/A

*N/A = não se aplica.

4.3 Avaliação da Morfologia da Nanopartícula Lipídica contendo Crisina

A MEV é uma técnica muito eficaz para a verificação da morfologia de nanopartículas, porque com a grande ampliação realizada por essa técnica é possível verificar com detalhes morfológicos específicos como até mesmo tamanho de partícula (FIROUZI-AMANDI, 2018).

A Figura 10 contém três imagens de microscopia em três escalas diferentes (5 µm, 2 µm e 500 nm), mostrando assim o formato das nanopartículas lipídicas contendo de crisina. As amostras foram preparadas fazendo-se diluição de 10 µL da amostra de nanopartícula de crisina para 2,0 mL de água mili-Q (proporção de 1:200).

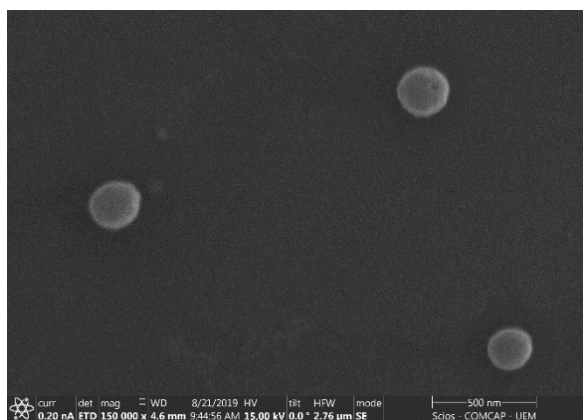
Dessa forma, através da Figura 10 é possível verificar a morfologia esférica das nanopartículas lipídicas de crisina, as quais apresentaram esferas regulares bem como alguns aglomerados de nanopartículas.

O mesmo foi verificado por Garg (2018) no desenvolvimento de nanopartículas sólidas fosfo-lipídicas contendo crisina, segundo uma outra técnica de Microscopia de Força Atômica (MFA). O formato esférico das nanopartículas auxilia na passagem das células do sangue para as células nos tecidos, carregando o composto para atuação biológica em células específicas (CARBONI, 2014).

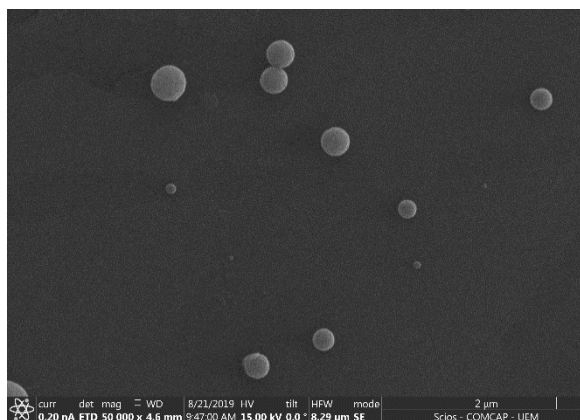
A análise de MEV também corrobora os resultados de tamanho de partícula encontrados pela técnica de espalhamento dinâmico da luz, encontrando valores na região de 300,0 nm. Dessa forma, a avaliação da organização morfológica das nanopartículas

lipídicas carregadoras de crisina permite concluir que o formato é esférico, com superfície lisa acoplando a crisina em seu interior.

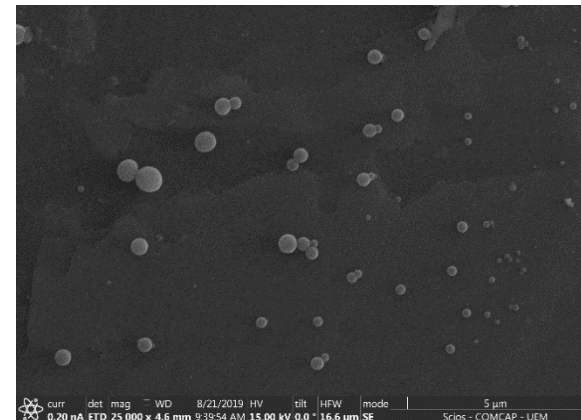
Figura 15 – Microscopia Eletrônica de Varredura de nanopartículas lipídicas de palmitato de metila e palmitato de etila contendo crisina. (a) - Suspensão de nanopartículas sólidas lipídicas carregadas com crisina com escala de 500 nm. (b) - Suspensão de nanopartículas sólidas lipídicas carregadas com crisina com escala de 2 μm . (c) - Suspensão de nanopartículas sólidas lipídicas carregadas com crisina com escala de 5 μm .



(A)



(B)



(C)

4.4 Estudo e avaliação da Estabilidade das nanopartículas lipídicas contendo crisina

O estudo da estabilidade se faz necessário devido a necessidade de obter um sistema nanoparticulado estável por um máximo período de tempo, para que possa fornecer condições adequadas de diâmetro de partículas, IPD e potencial zeta, confirmando sua utilização mesmo após um período de armazenamento do produto. Ainda com relação a sua importância, o estudo da estabilidade visa também, em um futuro distante, a manutenção das condições para um prolongado tempo de prateleira entregando as mesmas vantagens que um sistema obtido recentemente.

O primeiro sistema a ser avaliado será a nanopartícula carregada com crisina em suspensão. Dessa maneira, elaborou-se o Figura 16, o qual retrata a variação do tamanho da partícula e do IPD com relação ao tempo referente a nanopartícula carregada com crisina em suspensão contendo apenas água.

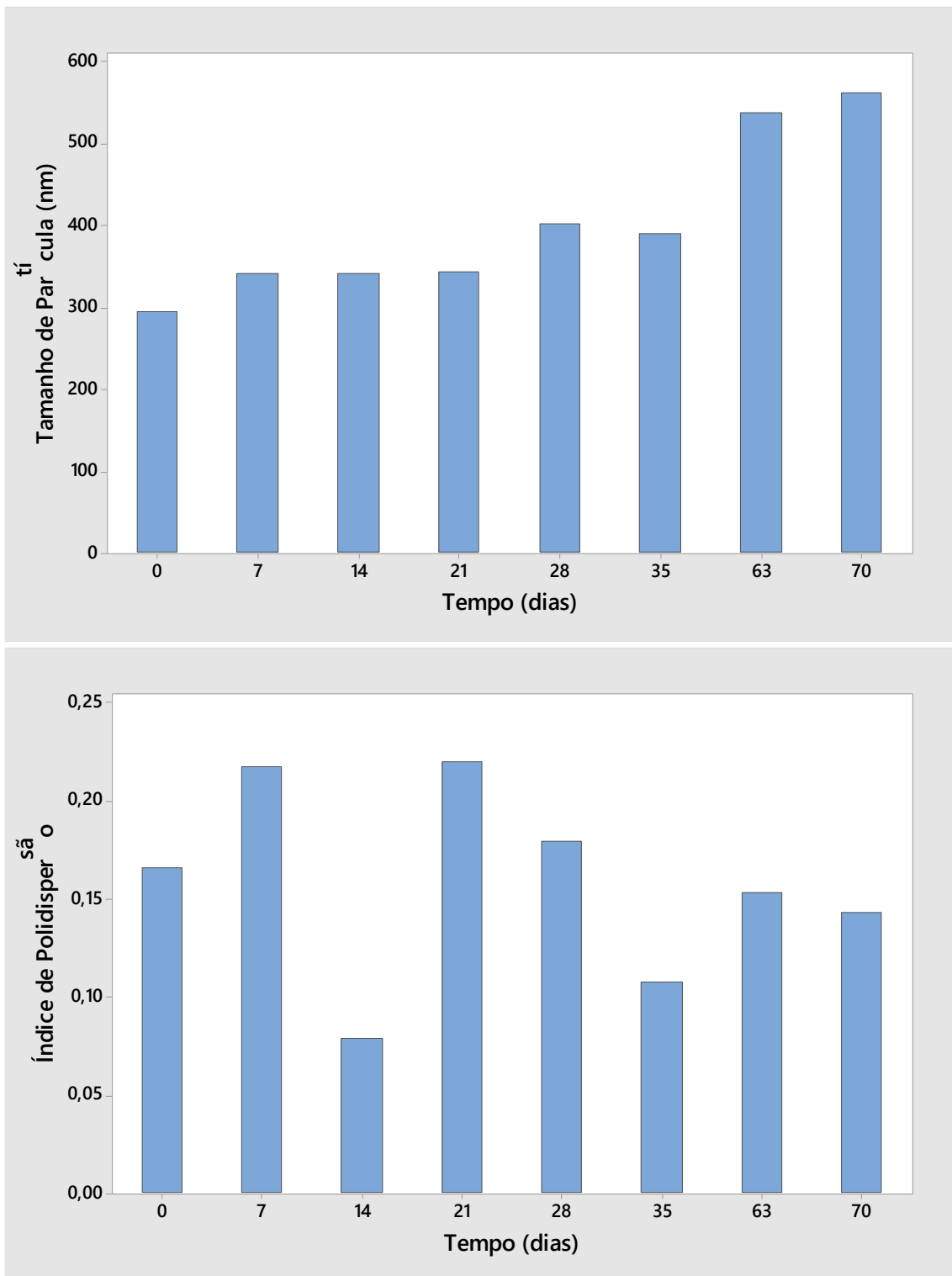


Figura 16. Estudo da influência do tempo para o parâmetro de tamanho de partícula e IPD na avaliação de estabilidade das nanopartículas sólidas lipídicas carregadas com crisina em suspensão aquosa.

Como pode-se observar através da leitura do gráfico, o estudo foi realizado com base nas semanas de análise. No primeiro mês, ainda mais específico nas 3 primeiras semanas de análise, nota-se que o tamanho de partícula possui valores estáveis em torno

de 350 nm, o que demonstra uma a estabilização das nanopartículas nesse período. Quando a análise completa um mês (na quarta semana), pode-se notar que o tamanho de partícula sofre um crescimento pequeno, mas ainda sim significativo, o que pode demonstrar um mudança de estrutura no processo de cristalização da nanopartícula, onde novas formas cristalizadas possam ter se desenvolvido, fenômeno esse conhecido reconhecido em nanopartículas sólidas lipídicas (MISHRA, et al. 2018; LI, et al., 2019).

Após o primeiro mês, o tamanho teve um crescimento considerável, deixando os valores em torno de 575 nm, o que foge consideravelmente dos padrões estabelecidos para a aplicação de sistemas nanoestruturados para a entrega de medicamentos no organismo humano ultrapassando barreiras físicas em seu interior (BANERJEE, 2016; GUPTA, KOMPELLA, 2006; RAO, GECKELER, 2011).

Para o IPD, todos os valores encontrados para o estudo da estabilidade das nanopartículas carregadas em suspensão foram abaixo de 0,300, o que acaba sugerindo uma pouca dispersão de tamanho de partícula encontrado e pouca variação entre o tamanho de “famílias” ou grupos de nanopartículas analisados durante o ensaio. Esses valores estão de acordo com o que a literatura encontrada (AVADI, 2010; KHAYATA, 2012), sugerindo mais uma vez uma certa estabilidade desse sistema nanoestruturado durante o período que foi realizado o ensaio.

Para o potencial zeta, ou seja, o estudo da carga superficial da nanopartícula, não houve nenhuma grande mudança de valores, nem com relação ao encapsulamento de crisina (PZ = - 1,04 mV para PZ = - 0,940 mV) e nem com relação ao tempo de análise (PZ = -1,04 mV para PZ = -5,28 mV). Teoricamente, os valores ideais para proporcionar o afastamento do potencial da neutralidade e garantir melhor estabilidade das nanopartículas são de 30 mV (LEGRAND et al., 1999).

O fato do potencial zeta não variar significativamente pode ser devido a estabilização do sistema cristalino lipídico, isso porque com as transições polimórficas relatadas na literatura que podem ocorrer na estrutura de uma NSL, mantiveram o potencial “estabilizado” mesmo considerando a encapsulação da crisina ou o tempo de armazenamento desse sistema (MISHRA et al., 2018; LI et al., 2019).

Ainda no estudo da estabilidade, considera-se dois sistemas liofilizados, ou seja, que passaram pelo processo de liofilização, onde as suspensões de nanopartículas são

convertidas em pó. O primeiro sistema a ser estudado é a nanopartícula liofilizada e carregada com crisina. Para esse estudo, elaborou-se o gráfico contendo a variação do tamanho de partícula e do IPD para as nanopartículas carregadas e liofilizadas durante o período estudado.

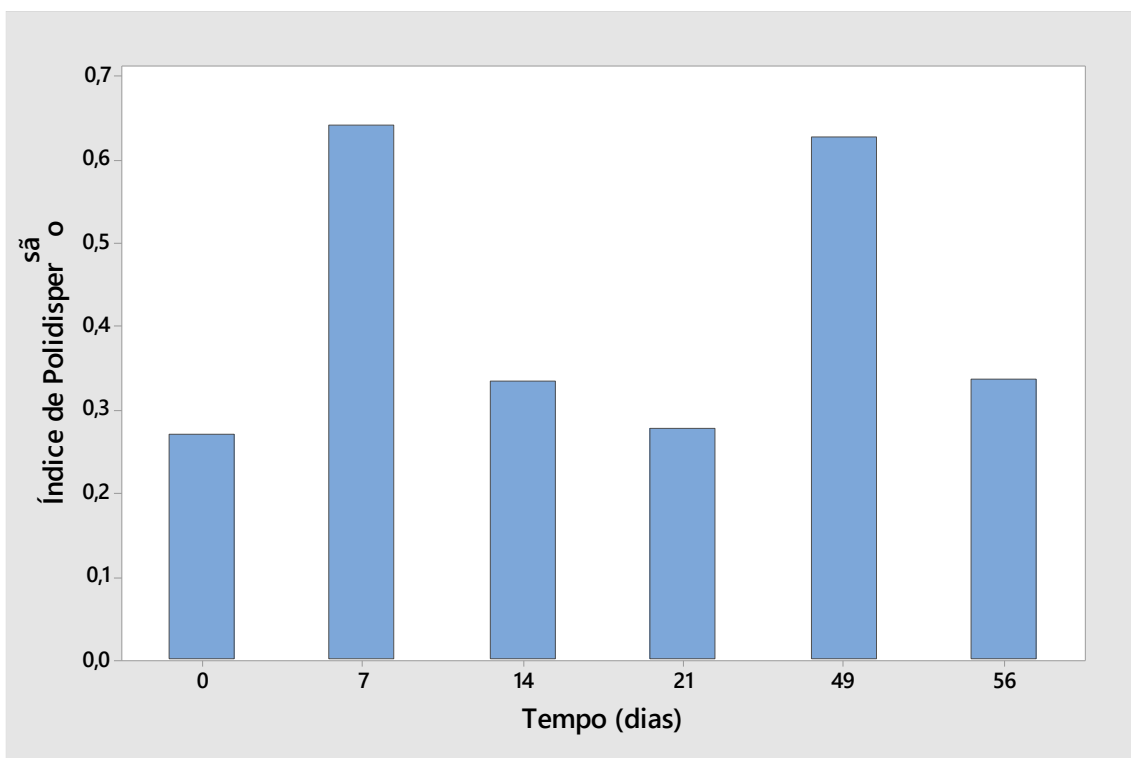
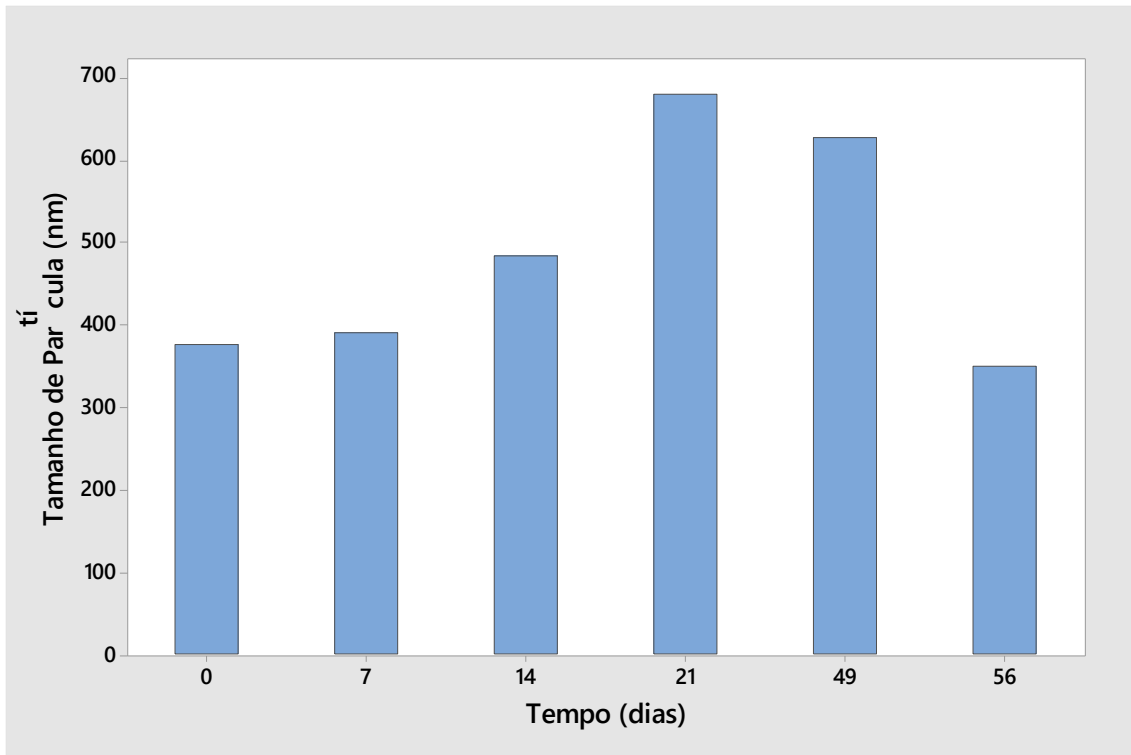


Figura 17. Estudo da influência do tempo para o parâmetro de tamanho de partícula e IPD na avaliação de estabilidade das nanopartículas sólidas lipídicas carregadas com crisina e liofilizadas utilizando água como dispersante.

Através da análise deste gráfico pôde-se notar que o tamanho de partícula encontrado para esse sistema nanoestruturado extrapolou para valores ‘inadequados’ desde o primeiro mês de análise, compreendendo uma variação de 300 nm no período de uma semana de análise, o que demonstra a instabilidade do sistema dentro das condições estipuladas (BANERJEE, 2016; GUPTA, KOMPELLA, 2006; RAO, GECKELER, 2011). Para essa instabilidade, pode-se sugerir que o armazenamento foi fundamental para as variações de tamanho de partícula, visto que as amostras foram armazenadas em geladeira, mesmo após sua liofilização, pensando-se no efeito da temperatura ambiente no derretimento e destruição do sistema. Aliado a isso, tem-se também a presença de polimorfos dentro do sistema, devido a uma possível reestruturação lipídica da matriz, fazendo com que o tamanho seja variado e o composto seja expulso do sistema, deixando-o menos estável (MISHRA et al., 2018; LI et al., 2019).

O mesmo acontece com os valores de IPD, onde não encontramos nenhum valor aceitável para demonstração de estabilização da nanopartícula carregada e liofilizada, o que corrobora com a explicação da possibilidade de reorganização da estrutura lipídica (MISHRA, et al., 2018; LI et al., 2019), apresentando assim uma variabilidade extensa de tamanhos encontrados para o sistema.

O estudo da carga superficial também demonstrou, como no caso do sistema antes estudado, uma constância de valores encontrados. Desde o processo de liofilização (PZ = - 0,940 mV para PZ = - 2,87 mV) até o período de análise realizado (PZ = - 0,940 mV para PZ = - 2,89 mV). Esse fato pode nos sugerir o mesmo mencionado para o sistema carregado em suspensão, que devido aos lipídeos constituintes da matriz, a possível reorganização causada pelos lipídeos através do processo de recristalização mantém a carga superficial negativa e em baixos valores, facilitando também o processo de aumento de tamanho e IPD (MISHRA, et al., 2018; LI et al., 2019).

Como último sistema a ser analisado, estão as nanopartículas carregadas com crisina e liofilizadas com a utilização de um crioprotetor. O crioprotetor escolhido foi a trealose e a concentração de solução utilizada foi de 10 % (m/V). Em ensaios realizados anteriormente, descobriu-se que a melhor condição para a liofilização das nanopartículas sólidas lipídicas carregadoras de crisina foi a trealose 10 %, a qual promoveu melhor

estabilização do tamanho de partícula no processo de liofilização, os demais crioprotetores testados, como o manitol e a sacarose não foram eficientes para esse processo. Dessa maneira, e corroborando com os dados encontrados na literatura (DOKTOROVOVA, et al., 2013; ALI e LAMPRECHT, 2017 e WANG, et al. (2018b), optou-se escolher pela trealose na concentração de 10%.

Para esse estudo, a nanopartícula foi ressuspensa em trealose 10 % após a centrifugação, anteriormente mencionada no protocolo de desenvolvimento da nanopartícula. O estudo de estabilidade desse sistema se faz mais claro observando a Figura 18, onde encontra-se os valores de tamanho de partícula e IPD para o período estudado.

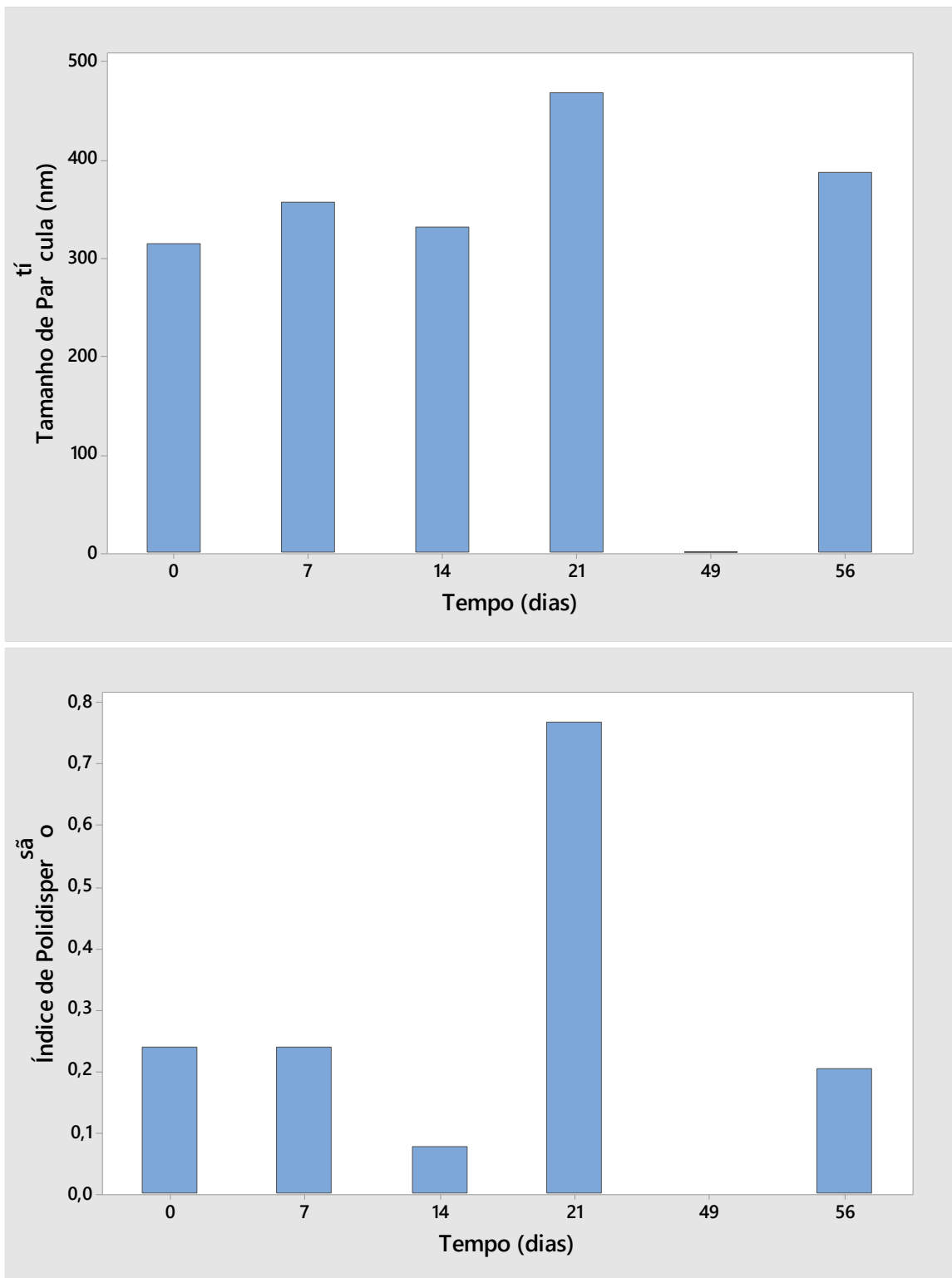


Figura 18. Estudo da influência do tempo para o parâmetro de tamanho de partícula e IPD na avaliação de estabilidade das nanopartículas sólidas lipídicas carregadas com crisina e liofilizadas utilizando a solução de trealose na concentração de 10 % como crioprotetor. *No 49º dia de análise, o equipamento juntamente com o software não forneceram nenhum valor para o tamanho de partícula e para o índice de polidispersão.

Nota-se, através desta figura, que tanto os valores de tamanho de partícula (próximos a 300 nm) quanto os valores de IPD (inferiores a 0,3) permaneceram estáveis durante 2 semanas apenas. Apesar do tamanho e do IPD manterem-se estáveis com o processo de liofilização realizado entre o dia 0 até a primeira semana, o mesmo processo não foi suficiente para manter esses valores dentro os limites estabelecidos (AVADI, 2010; KHAYATA, 2012) durante o período de análise realizado.

Esse fato pode ser explicado pelo armazenamento dessas nanopartículas. As mesmas foram armazenadas refrigeradas pelo fato da matriz ser lipídica e a mesma poder ser destruída à temperatura ambiente. Devido a este armazenamento e também a umidade do ar, os cristais de açúcar podem ter absorvido água, o que desestabilizou e modificou a estrutura do sistema nanoestruturado, tornando-o assim instável para este estudo. Como menciona a literatura (MISHRA et al., 2018; LI et al., 2019), uma desorganização da matriz lipídica provoca uma mudança na estrutura cristalina, o que pode acarretar até mesmo na expulsão do composto encapsulado e na degradação do sistema.

O estudo de carga superficial deste sistema nanoestruturado, assim como os demais sistemas, teve valores estáveis considerando o processo de liofilização ($PZ = -5,98$ mV para $PZ = -4,40$ mV) e para o período de análise realizado ($PZ = -4,40$ mV para $PZ = -4,13$ mV). Isso pode corroborar com a explicação dos demais sistemas, ou seja, devido a matriz lipídica ser reorganizada, mas ainda assim contar com dois lipídeos na estrutura, o valor permanece sem alterações significativas.

Com o estudo desses três sistemas nanoestruturados, pode-se concluir que a nanopartícula sólida lipídica contendo crisina em suspensão desenvolvida nesta tese não demonstra ser estável em tamanho de partícula e IPD por períodos superiores a duas semanas de estudo. Tanto as nanopartículas em suspensão como as liofilizadas com ou sem crioprotetor demonstraram-se estáveis por um tempo ainda menor, o que sugere o desenvolvimento de estudos mais profundos sobre a possibilidade de aumentar o tempo de prateleira e de armazenamento desses sistemas.

Com relação à carga superficial da nanopartícula, deve-se também estudar uma possível relação da não alteração de valores com a mudança dos valores de tamanho de partículas e de IPD. Também pudemos observar que o uso deste crioprotetor não foi eficaz e que, se não forem desenvolvidos outros estudos de estabilidade mais profundos, o mesmo pode ser retirado da formulação devido a sua não eficiência.

4.5 Atividade Antioxidante sobre o radical ABTS^{•+}

A Atividade Antioxidante é uma característica importante a ser avaliada, visto que o acúmulo de substâncias oxidantes no organismo é extremamente prejudicial à saúde, podendo contribuir para o enfraquecimento do organismo, bem como acarretar em distúrbios mais sérios como artrite, catarata e arteriosclerose.

Como é mostrado na Figura 19, a avaliação da atividade antioxidante foi realizada com base em 5 concentrações (1, 2,5, 5, 7,5 e 10 µg/mL) de crisina e da suspensão de nanopartículas lipídicas carregadoras de crisina, bem como, fazendo uso das mesmas diluições, para a suspensão de nanopartículas brancas.

Através da Figura 19, pode-se notar que as concentrações de crisina livre, inibem de maneira crescente, com o aumento da concentração, o radical ABTS^{•+}. Esse fato também foi identificado na amostra de suspensão de nanopartículas contendo crisina, em que o aumento da concentração da amostra, aumenta também a inibição do radical oxidante.

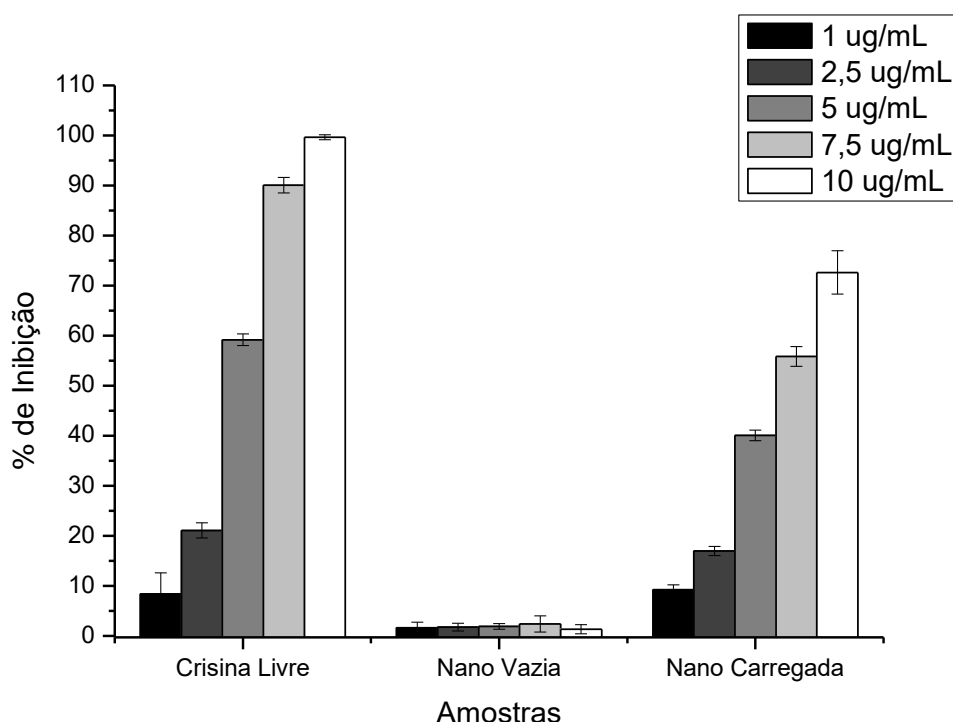


Figura 19. Gráfico representativo referente à inibição do radical ABTS^{•+} causada pelas amostras: crisina livre, nanopartículas sólidas lipídicas vazias e nanopartículas sólidas lipídicas carregadas com crisina, contendo crisina nas concentrações de 1, 2,5, 5, 7,5 e 10 µg/mL de crisina para a crisina encapsulada e a livre.

Aliado aos gráficos de inibição da crisina livre e da suspensão de nanopartículas lipídicas contendo crisina, nas barras centrais estão representadas as concentrações de suspensão de nanopartículas brancas, sem crisina. Nota-se, entretanto que essa amostra não apresentou nenhum potencial de inibição frente ao radical ABTS^{•+}, fato esse que evidencia que os lipídios utilizados para o desenvolvimento do protocolo de obtenção de nanopartículas lipídicas contendo crisina não possuem nenhuma atividade antioxidante, o que significa que na nanopartícula lipídica contendo crisina, a atividade antioxidante é causada pela molécula de crisina.

Sulaiman (2018) em seu trabalho sobre o desenvolvimento de nanopartículas de PLGA-PVA contendo crisina encontrou atividade antioxidante nas duas amostras analisadas, a solução de crisina e a suspensão de nanopartículas de crisina. No artigo foi verificada a dependência entre a ação antioxidante e a concentração de ambas as amostras sobre o radical DPPH. Esse resultado corrobora com o encontrado na Figura 19, visto que a ação antioxidante aumenta quando ocorre o aumento da concentração de crisina, nas duas amostras.

Não existem outras referências de atividades antioxidantes relatadas para nanopartículas lipídicas contendo crisina, entretanto as atividades antioxidantes da crisina são bastante relatadas na literatura, bem como as atividades de plantas que possuem grande quantidade de crisina. Naz et al. (2019) em seu trabalho sobre crisina e seus efeitos terapêuticos revelam que uma das principais atividades biológicas é a atividade antioxidante.

Niu (2019) em seu trabalho sobre a extração de flavonoides de plantas do gênero *Alpinia* verificou que a crisina, bem como seu derivado tectocrisina, exerceram atividade oxidante frente ao radical DPPH, bem como uma forte ação antioxidante férrico redutor. Quiroz (2019) em seu trabalho sobre a extração realizada por ultrassom e identificação de compostos através da técnica de cromatografia líquida com detector espectrômetro de massas identificou 7 compostos fenólicos, incluindo a crisina e concluiu que cada um deles contribuiu sobremaneira sobre a atividade antioxidante, frente ao radical ABTS^{•+} e atividade microbiana dos extratos.

4.6 Ensaio de citotoxicidade sobre as células presentes no sangue, hemácias.

O ensaio de citotoxicidade de compostos frente às células do sangue se torna importante para a investigação do que seria prejudicial e tóxico na formulação de nanopartículas lipídicas contendo de crisina. Para a realização de tal investigação, foi necessário testar 6 tipos de amostra diferentes, verificando assim todos os compostos utilizados para o desenvolvimento da formulação.

Foi realizado também, como primeira amostra, o controle de hemólise (100% hemólise), que corresponde a 100% das hemácias rompidas, ou seja, hemolisadas, e para isso um padrão de hemólise estabelecido para todo o ensaio. As amostras foram incubadas em condições específicas para simular o organismo humano, no período de 24, 48 e 72 horas, sendo retiradas e analisadas em Espectrofotômetro de Absorção Molecular no comprimento de onda de 540 nm. Dessa maneira, a Figura 20 foi elaborada para melhor visualização desses resultados.

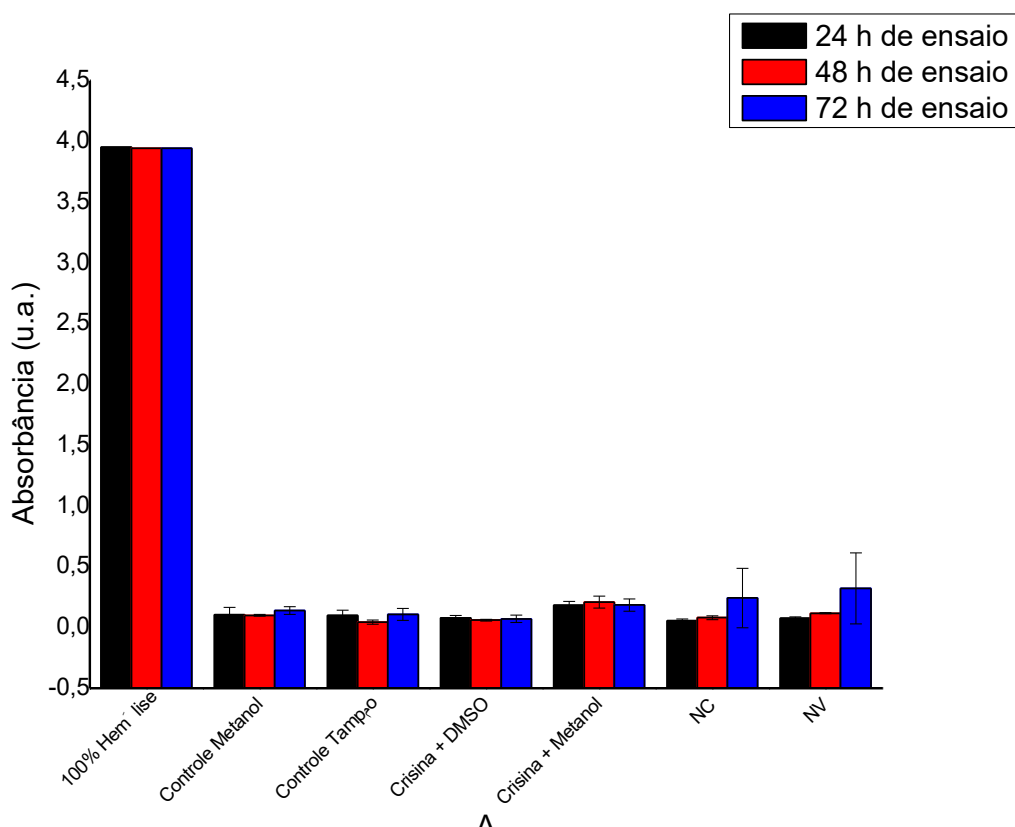


Figura 20. Gráfico representativo da atividade citotóxica de 7 amostras distintas (100% hemólise, controle metanol, controle tampão PBS, controle crisina solubilizada em DMSO, controle crisina livre com concentração de 20,0 $\mu\text{g/mL}$, amostras de nanopartículas sólidas

lipídicas vazias e nanopartículas sólidas lipídicas carregadas com crisina na concentração de 20,0 µg/mL) sobre as células hemácias pelo período de 24, 48 e 72 horas de ensaio.

Através da Figura 20 pode-se perceber que nenhum dos controles ou amostras rompeu as células Hemácias, provocando a hemólise. Os dados apresentados revelaram que o controle metanol, o controle tampão, a crisina solubilizada em DMSO, e a crisina solubilizada em metanol não tiveram dados de absorbância ultrapassando o valor de 0,25, resultado esse que é muito distante da do controle de hemólise total, cuja média de absorbância foi próximo de 4,0.

Além disso, nota-se também que as amostras de suspensão de nanopartículas brancas (NV) e de suspensão de nanopartículas carregadas (NC) não apresentaram médias de absorção superiores a 0,5, valor este muito distante e não relacionado aos valores de hemólise total observados nas colunas de início do gráfico acima. Dessa maneira portanto, pode-se concluir que nenhum dos controles e amostras sofreu o processo de hemólise, durante todo o tempo de 72 horas investigadas, visto que nenhum valor se aproximou do controle de 100%.

Nosrati, et al. (2018) em seu trabalho sobre o desenvolvimento de nanopartículas de crisina modificadas com aminoácidos realizou também o ensaio de citotoxicidade frente às células hemácias e concluiu que as nanopartículas desenvolvidas foram biocompatíveis com as células sanguíneas, resultando em valores inferiores a 4,18 % de atividade hemolítica frente a linhagens celulares normais de HFF (fibroblastos) e HEK (embrionárias). Nosrati et al. (2018a) realizaram o ensaio similar de citotoxicidade com as amostras de nanopartículas de albumina contendo crisina e ácido fólico. O ensaio resultou em valores inferiores a 3,20 % de atividade hemolítica frente a linhagens de células de HFF (fibroblastos).

4.7 Resultados do ensaio de Liberação da Crisina a partir das Nanopartículas Lipídicas em fluido gástrico simulado (FGS) e no fluido intestinal simulado (FIS)

O ensaio de liberação da crisina a partir das NSL's em fluídos simulados visa a compreensão de mecanismos de absorção do composto na matriz lipídica, bem como a avaliação de como ocorre a liberação do composto a interação que ocorre entre o mesmo

e a matriz lipídica. Todas essas informações corroboram para determinar o meio de administração que o sistema nanoparticulado será aplicado.

As NSL's são conhecidas pela grande taxa de liberação do composto encapsulado, devido à organização cristalina de sua matriz. Esse fato pode ser explicado pela reorganização que a matriz sofre, através da formação de polimorfos, bem como a expulsão da droga com facilidade pode interferir no carreamento do composto e em sua eficiência de encapsulação (NASERI et al., 2015; BAHARI et al., 2016).

4.7.1 Ensaio de solubilidade da Crisina nos Fluidos Gástrico e Intestinal Simulados

Como mencionado no item de Materiais e Métodos, o ensaio de solubilidade da crisina nos fluídos simulados foi realizado como condição para o ensaio de liberação. Como já visto anteriormente, a crisina apresenta uma mínima solubilidade em água, entretanto a maior parte dos fluídos simulados é composta por grande quantidade de água e enzimas. Dessa forma, o estudo ocorreu com essa finalidade, a de proporcionar um meio em que a crisina liberada durante o ensaio pudesse ser encontrada e quantificada em uma solução aquosa.

O teste de solubilidade realizado mostrou que o melhor tensoativo que pudesse auxiliar na solubilidade de crisina em um meio aquoso, tanto para o FGS quanto para o FIS, foi o uso de Tween na concentração de 5,0 % (m/V), como pode ser observado na Tabela 14.

Tabela 14. Estudo da solubilidade da crisina em fluídos gástrico e intestinal fazendo uso de surfactantes com concentrações de 5,0 %.

Meios de Liberação	Solubilidade ($\mu\text{g/mL}$)
FGS com Tween 5,0 %	156,0
FIS com Tween 5,0 %	425,45
FGS com Dodecil Sulfato de Sódio 5,0 %	89,17
FIS com Dodecil Sulfato de Sódio 5,0 %	354,55

Dessa forma, para os dois meios, o Tween apresentou a melhor solubilidade com relação ao composto crisina, o que indica que, fazendo uso desse tensoativo, o ensaio de liberação deve possuir a condição SINK mantida com a inserção de 10,0 % da solubilidade máxima no FGS. O uso do Tween com a finalidade de favorecer a solubilidade de um composto nos fluídos simulados pode ser verificado em outros sistemas nanoestruturados, inclusive poliméricos. A condição SINK deve ser mantida durante todo o ensaio, isso porque a mesma garante que a velocidade de dissolução do sistema não seja influenciada pela proximidade da saturação do meio utilizado (ABDOU, 1989; D'SOUZA; DELUCA, 2006; FERRONATO et al., 2010).

4.7.2 Liberação da Crisina associada às Nanopartículas lipídicas nos FGS e FIS

O ensaio de liberação de crisina das nanopartículas lipídicas nos fluídos simulados foi baseado no estudo da solubilidade da crisina nos respectivos meios. Para isso, elaborou-se a Figura 21 com o intuito de elucidar mais claramente esse perfil de liberação do composto. Através dessa figura, pode-se analisar que a percentagem de liberação da crisina em meio gástrico simulado (2,40 %) foi maior que a percentagem em meio intestinal simulado (1,30 %). Entretanto, a soma das percentagens mostra que a crisina foi liberada com eficiência, sendo o valor da soma de 3,70 %. Isso pode ser descrito até mesmo como uma ineficiência do sistema em liberar o composto encapsulado.

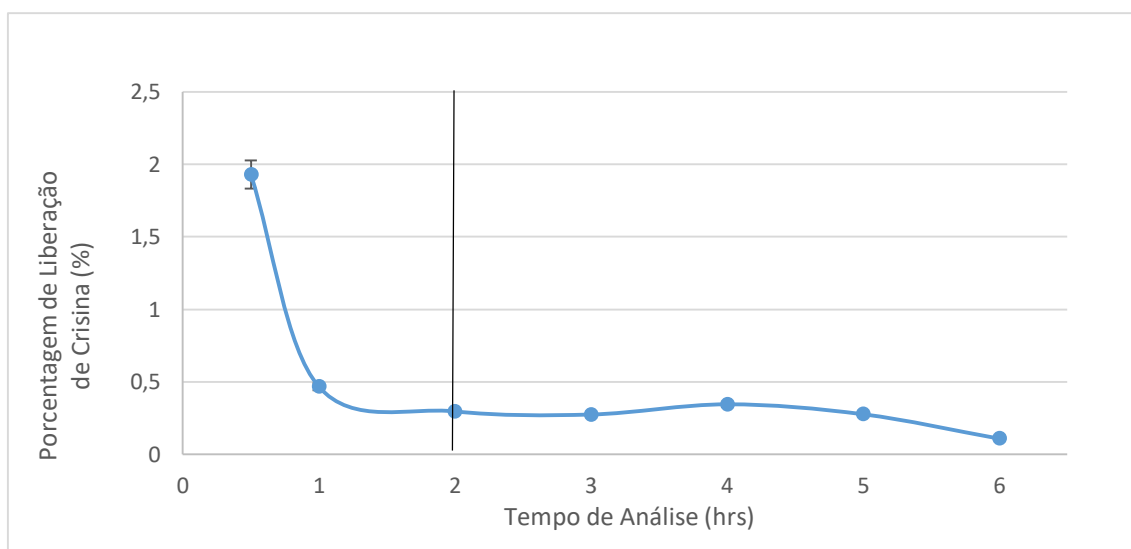


Figura 21. Gráfico representativo referente ao perfil de liberação de Crisina carregada pelas nanopartículas sólidas lipídicas frente aos fluídos gástrico simulado (FGS) pelo período de 2 horas e intestinal simulado (FIS) pelo período de 4 horas, totalizando 6 horas de ensaio.

Nas duas primeiras horas, mostra um decaimento acentuado na liberação de crisina, o que sugere que a crisina adsorvida na parte externa da matriz lipídica. Esse fenômeno é conhecido como efeito 'burst', entretanto, esse efeito tende a realizar uma porcentagem de liberação maior que a adquirida neste ensaio. Existem algumas justificativas cabíveis para a baixa porcentagem de liberação, entre eles está a estrutura lipídica da nanopartícula.

A literatura nos dá um suporte quanto às transições polimórficas que as NSL's sofrem durante o período de armazenamento, isso porque o composto encapsulado pode ser melhor arranjado dentro da matriz, acarretando em um melhor aprisionamento da crisina. Outra explicação que pode justificar a baixa taxa de liberação é referente a temperatura de fusão de ambos os lipídeos (30°C para o palmitato de metila e 24°C para o palmitato de etila) componentes da matriz, causando o "derretimento" da nanopartícula e até mesmo sua degradação.

Outra sugestão para corroborar com os resultados é o fato da detecção realizada em CLAE-UV, onde o comprimento de onda estipulado para a detecção da crisina não é o mesmo para possíveis derivados da molécula. O fato da crisina poder ter sido metabolizada durante a análise de liberação, sofrendo processos como a sulfatação e a glucuronidação (MANI e NATESAN, 2018) nos leva a conclusão que para melhor detecção da porcentagem de crisina liberada do sistema é necessário uma técnica que trabalhe com as quebras das moléculas, podendo assim quantificar a porcentagem da crisina presente nos fluídos.

Referências mostram porcentagens semelhantes de liberação considerando um pH similar ao utilizado nesse ensaio, como é o caso de Lungare, Hallam e Badhan (2016), que em seu trabalho comprovou a liberação de cerca de 3,0 % de crisina em pH de 7,4 no período de 2 horas de análise, utilizando uma matriz polimérica. Há relatos também de diferentes 'receitas' utilizadas no preparo dos fluídos gastro-intestinais que proporcionam porcentagens de liberação em torno de 14,0 % (FERRADO, et al., 2020).

Dessa forma, podemos concluir que a taxa de liberação de crisina revelada através desse ensaio é demasiadamente baixa, podendo-se até mesmo afirmar que o estudo de liberação não foi eficaz. Esses resultados podem sugerir a necessidade de um melhor estudo de solubilidade fazendo uso de outros tensoativos, uma possível mudança de técnica de detecção ou até mesmo a mudança no preparo dos fluídos.

4.8 Resultados do Estudo de liberação de Crisina a partir da Nanopartícula Lipídica pelo método *in vitro*

4.8.1 Estudo de solubilidade da Crisina no meio receptor

Semelhantemente ao que foi realizado na liberação de crisina em fluídos gástrico e intestinal simulados, pelo método *in vitro*, deve-se também realizar o estudo de solubilidade da crisina em meio PBS. Como dito anteriormente, a crisina possui quase nenhuma solubilidade em água, o que torna a análise sem tensoativo impossível.

Dessa forma, primeiramente estudou-se o uso de duas concentrações distintas de Tween 80 (2,5 % e 5,0 %, m/V). O Tween foi escolhido devido a facilidade de manuseio e homogeneização com fluídos aquosos, bem como sua utilização no ensaio anterior. Na Tabela 15 são mostrados os valores de concentração e suas respectivas solubilidades em meio PBS.

Tabela 15. Estudo da solubilidade da crisina em meio de tampão fosfato salino (PBS) na concentração de 50,0 mmol/L utilizando concentrações diferentes (2,5 e 5,0 %) do tensoativo Tween.

Concentração de Tensoativo	Solubilidade (µg/mL)
Tween - concentração 2,5 %	111,48
Tween - concentração 5,0 %	250,0

Como pode-se notar, a melhor condição experimental, ou seja, a concentração de tensoativo que proporcionou a melhor solubilidade de crisina em meio PBS foi a de Tween 80 a 5,0 % (m/V). O uso do Tween também foi verificado em trabalhos semelhantes utilizado como surfactante, o que serve como embasamento teórico para o ensaio de liberação *in vitro*. Vale ressaltar que, para todo o ensaio de solubilidade e de liberação *in vitro*, a condição sink foi obedecida, visando a não influência na velocidade de dissolução do presente sistema.

4.8.2 Ensaio do perfil de liberação de crisina através das nanopartículas lipídicas pelo método *in vitro*

Contando com a solubilidade de crisina em meio PBS (50,0 mmol/L) já otimizada e a condição sink estabelecida, o ensaio de liberação da crisina pode ser realizado. Para

melhor averiguação do perfil de liberação, bem como das taxas ao longo da ocorrência do ensaio, elaborou-se a Figura 22. A mesma faz uma relação de tempo com a quantidade de crisina liberada em meio PBS (50,0 mmol/L) ao longo de 120 horas de análise. Pode-se observar que, nas primeiras dez horas de análise, ocorreu toda a liberação possível do composto, seguido de percentagens nulas após esse período.

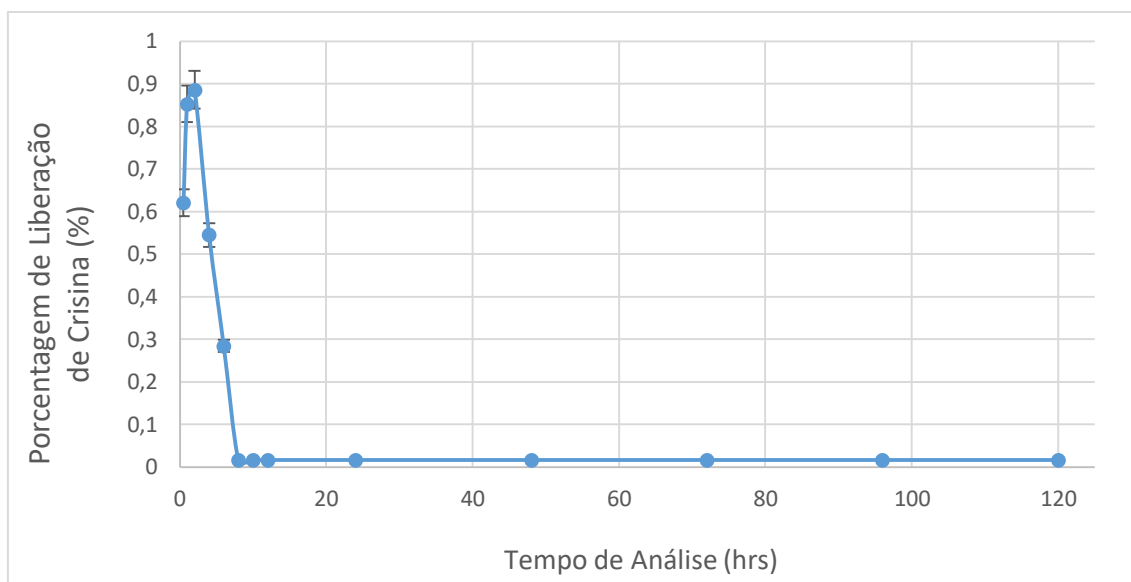


Figura 22. Gráfico representativo referente ao perfil de liberação de crisina carregada pelas nanopartículas sólidas lipídicas frente ao tampão fosfato salino (PBS) pelo período de 120 horas de ensaio.

No total, foram liberados apenas 3,22 % de toda a crisina aprisionada na nanopartícula lipídica, sendo que 96,78 % do composto manteve-se apreendido na matriz lipídica. Nota-se o efeito burst de liberação nas primeiras duas horas de ensaio, o que pode ser explicado também pela dissolução da crisina presente na parte externa da matriz lipídica.

A matriz lipídica do sistema nanoestruturado, como já visto anteriormente, é composta por palmitato de metila e palmitato de etila, cujos pontos de fusão são baixos (de 20 a 35 °C). Considerando a temperatura utilizada durante esse ensaio, a de 35 °C, pode-se sugerir que houve uma degradação ou um ‘derretimento’ do sistema nanoparticulado, podendo assim ter atrapalhado na liberação de crisina. Outro fator importante é que a formação de polimorfos, através das mudanças na estrutura lipídica de toda a matriz, pode ter causado um melhor aprisionamento do composto, ou ainda, pode ter deixado a estrutura lipídica ainda mais estável (HELGASON et al., 2008; MISHRA et al., 2018; LI et al., 2019).

Entretanto, a literatura aborda vários ensaios com o mesmo objetivo, mas com resultados bem distintos (LOTFI-ALTARI, et al., 2017; EL-HUSSEIN, et al., 2020). Os procedimentos realizados por esses autores são baseados em outras técnicas de análise, como o uso de células de difusão, ou até mesmo membranas de diálise. Esses sistemas proporcionaram liberações altas de até 50,0 %, no período de 28 horas, onde a crisina foi liberada do sistema, sem evidências de degradação (GARG e DIN, 2018). A justificativa para esses altos valores de liberação podem ser a presença do efeito burst, erosão em massa e a interferência do meio na hidrólise de lipídeos.

Outros estudos também indicam que a crisina é facilmente metabolizada no organismo, devido aos grupos funcionais presentes a molécula (MANI e NATESAN, 2018). Um fator que pode ser sugerido para a baixíssima porcentagem de liberação do sistema elaborado nesta tese é a metabolização da crisina, transformando-a em derivados que não possuem o mesmo comprimento de onda de detecção, fator esse responsável pela não quantificação de crisina pela técnica utilizada neste ensaio (CLAE-UV).

Como conclusão parcial desse ensaio, verifica-se a baixa taxa de liberação da crisina encapsulada pela NSL formada a partir de palmitato de metila e palmitato de etila durante o tempo de análise realizado. A partir disso, pode-se concluir que a nanopartícula desenvolvida não libera o composto crisina nas condições de ensaio acima retratadas, podendo, no entanto, ser liberada através de outro protocolo experimental.

4.9 Resultados do ensaio de Farmacocinética

Como visto anteriormente, fez-se necessária a validação do método de determinação de crisina em plasma de ratos através da técnica de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas sequencial. Para isso, foi necessária a averiguação de alguns parâmetros importantes para dar sequência ao ensaio farmacocinético. Esses parâmetros foram a seletividade, a linearidade, os limites de detecção e quantificação, a exatidão, a precisão e a estabilidade do método, se tratando de amostras biológicas.

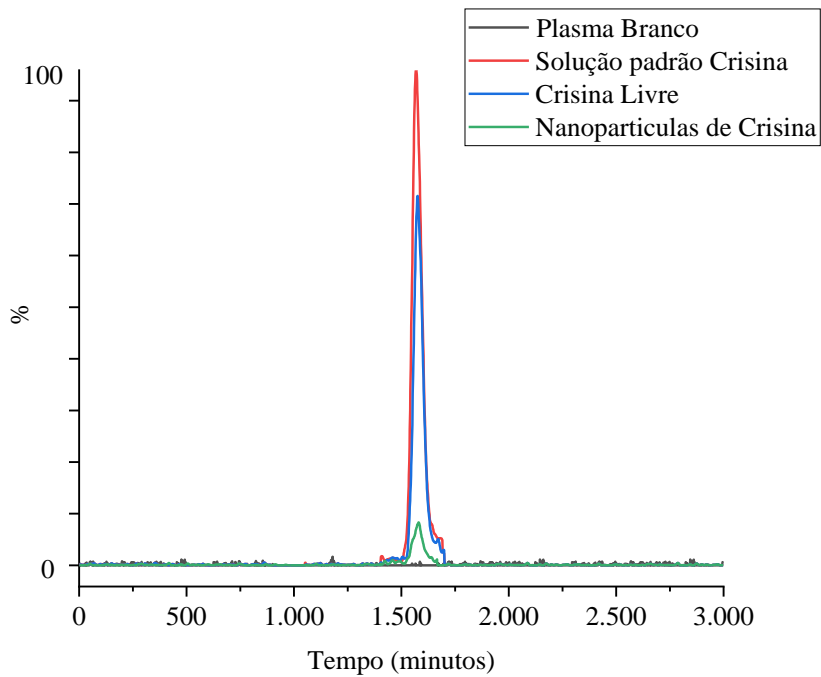
4.9.1 Validação do método de determinação de Crisina em plasma utilizando a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (UPLC-MS/MS)

Para esse estudo, iniciaremos com a discussão da seletividade do método, seguido dos demais parâmetros avaliados nesse item.

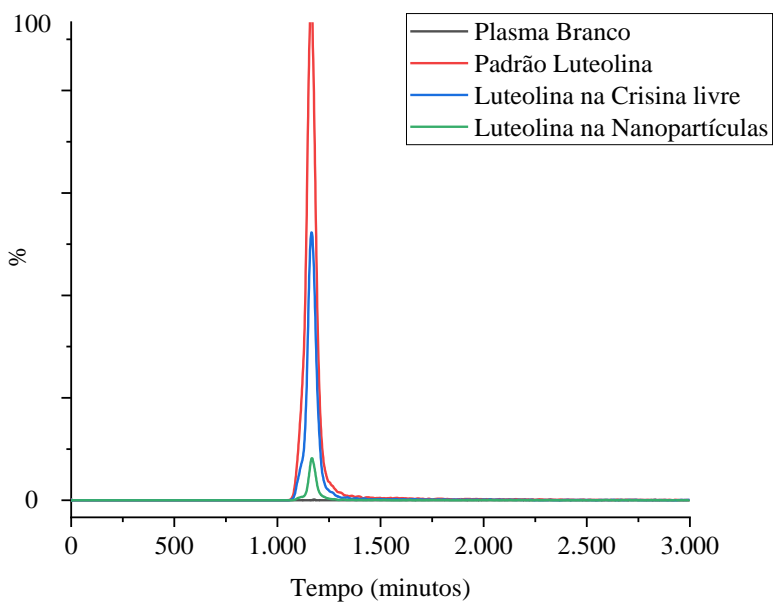
4.9.1.1 Seletividade

Para o estudo do parâmetro de seletividade, deve-se verificar a possível presença de interferentes em uma amostra complexa, como é o caso de amostras biológicas (ARAÚJO, 2009; RIBANI, COLLINS, BOTTOLI, 2007). Dessa forma, para se avaliar a estabilidade da técnica de UPLC-MS/MS, foram comparados os cromatogramas de plasma branco, de plasma de ratos fortificado com crisina livre (concentração 40 ng/mL) e luteolina (concentração 100 ng/mL), e plasma após a administração de nanopartículas de crisina (Figura 23) em dois canais, na razão de massa para a crisina e na razão de massa estipulada para curcumina. O tempo de retenção verificado para a crisina foi de 1,50 minutos, e para a luteolina foi de 1,20 minutos. Nos cromatogramas de plasma branco, não foi detectada a presença de nenhum pico cromatográfico de qualquer componente da matriz que pudesse interferir na quantificação do analito de interesse.

Comparando-se os tempos de retenção dos cromatogramas de plasma fortificado e plasma após a administração de crisina, existe uma semelhança entre os valores, fortalecendo a seletividade do método. Através da análise desse parâmetro farmacocinético, pode-se verificar que o método estabelecido para a determinação de crisina em plasma de ratos é seletivo de acordo com os órgãos regulamentadores (AOAC, 2012; INMETRO, 2018).



(A)



(B)

Figura 23. Cromatogramas MRM representativos de (A) crisina (m/z 254,92 \rightarrow 152,94) e de (B) luteolina (m/z 286,95 \rightarrow 152,94) em plasma de ratos: amostra de plasma branco, amostra de plasma fortificado com luteolina, amostra plasma fortificado contendo crisina livre e amostra de plasma contendo nanopartículas de crisina.

4.9.1.2 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada através da curva analítica construída na faixa de concentração de 5,0 a 100,0 ng/mL de crisina. Os padrões foram preparados utilizando uma solução de acetonitrila através do método de adição de padrão, onde os padrões foram preparados na suspensão de plasma. O método de adição de padrão foi utilizado para comprovar a presença ou não do efeito matriz nas análises.

O estudo da regressão linear e o teste de falta de ajuste foram aplicados a esta curva de calibração, utilizando o nível de 95,0 % de confiança. Os testes são necessários para verificar se o modelo linear é adequado para explicar a variabilidade dos dados. A curva de calibração encontra-se elaborada na Figura 24, bem como todos os dados do estudo de regressão e o teste de falta de ajuste são encontrados na Tabela 16.

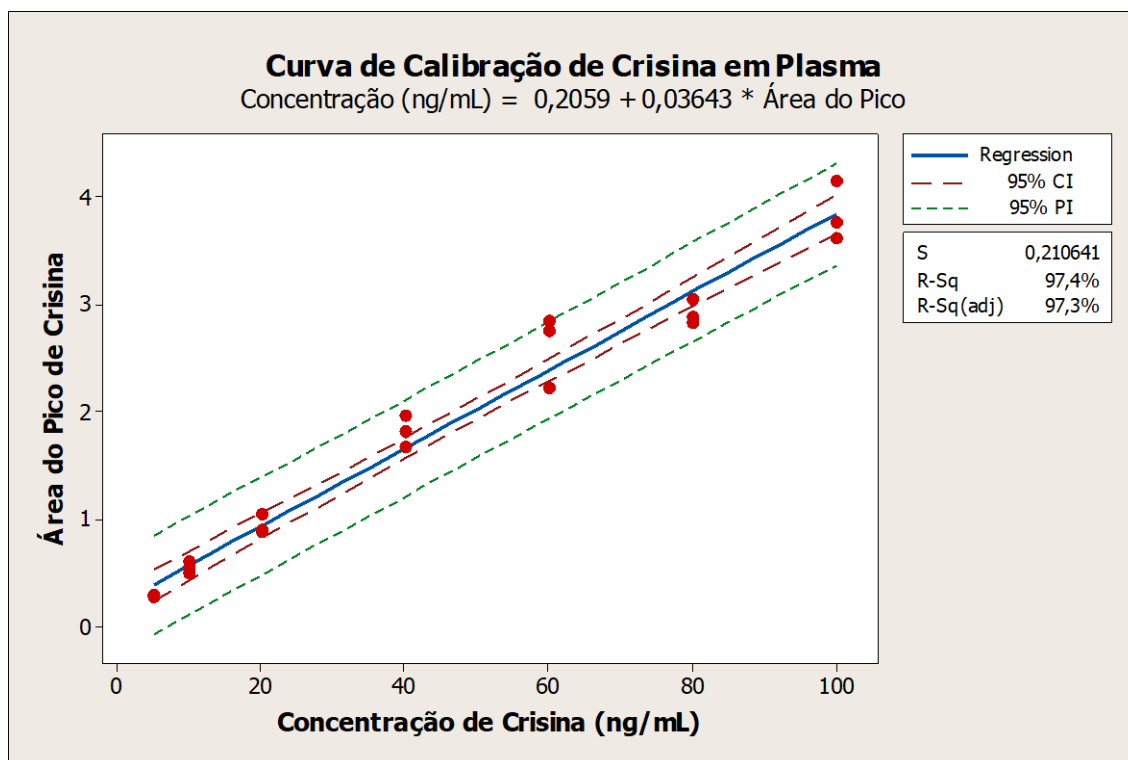


Figura 24. Curva analítica para a determinação de crisina obtida em plasma de ratos utilizando concentrações de crisina livre, fazendo uso do método de regressão linear, no intervalo de 95% de confiança.

Como pode-se observar na Figura 24, os intervalos de predição e de confiança propostos comprovam que existe sensibilidade analítica para a quantificação de crisina em suspensão de plasma, sendo um dos pontos importantes investigados na linearidade. Nota-se, através do coeficiente de determinação (R^2) no valor de 0,95, que a relação entre

a área do pico cromatográfico referente à crisina e a concentração de crisina pode ser explicada através do modelo linear, indicando que apenas 5,6 % dos dados não podem ser ajustados através desse modelo.

Tabela 16. Avaliação do parâmetro linearidade utilizando os resultados da análise de regressão linear no intervalo de 95 % de confiança e o teste de falta de ajuste aplicado à curva de calibração para a determinação de crisina em plasma de ratos.

Regressão*		Falta de Ajuste **		r	R ²
F _{regressão}	Valor de p	F _{faj}	Valor de p	0,973	97,4 %
713,49	0,000	2,19	0,114		
Coeficientes da Reta de Regressão ± Erro Padrão				t _{observado} ***	Valor de p
Intercepto:		-0,206		-2,68	0,015
Inclinação		0,036		26,71	0,000

*Para regressão, $F_{crítico}(0,05; 1, 20) = 2,48$. **Para falta de ajuste $F_{crítico}(0,05; 6, 20) = 2,84$. ***Para os coeficientes da reta, $t_{crítico}(0,025; 20) = 2,086$.

Através da Tabela 16, pôde-se verificar que o valor de $F_{regressão}$ (713,49) foi maior que o valor de $F_{crítico}$, indicando assim que a regressão foi significativa, indicando que a inclinação da curva não obteve valor nulo. Para o teste de falta de ajuste, nota-se que o modelo linear aplicado não considera a falta de ajuste tenha sido significativa ($F_{faj} < F_{crítico}$), sendo o modelo linear considerado adequado para explicar a relação entre a concentração de crisina e área do pico cromatográfico referente à crisina. Portanto, para o estudo de linearidade, o modelo linear é considerado adequado e os resíduos gerados através da análise dos dados em nada influenciam a variação observada nos resultados. O efeito de matriz foi calculado através do estudo da regressão linear e o mesmo não foi significativo ao método.

4.9.1.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ), Precisão e Exatidão

Para o estudo dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), foi necessária a elaboração de uma curva de concentração mais baixa, na faixa de 5,0 a 35,0 ng/mL, em suspensão plasmática. A análise contou com o cálculo dos valores de desvio padrão e inclinação da curva, dessa forma, obteve-se valores de LD e LQ de 0,475 e 1,426 ng/mL,

respectivamente, como pode ser observado através da Tabela 17. Ambos os valores são relativamente baixos, o que seria mais um fator que comprova que o método escolhido para a determinação de crisina em plasma de ratos é sensível. Ge et al. (2015) em seu trabalho encontrou valores de 1,48 e 1,25 nmol/L para LQ e LD, respectivamente. Esses valores são distintos aos encontrados nesse trabalho devido tanto a unidade de medida utilizada para o cálculo quanto a inclinação da curva de calibração realizada, sendo a encontrada por Ge et al. (2015) de maior valor, gerando baixos valores para os limites. Entretanto, pode-se afirmar que com relação a faixa de concentração da curva de calibração utilizada por este trabalho, o método é eficaz para a detecção e quantificação de crisina em plasma de ratos.

Tabela 17. Estudo dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), da precisão e da exatidão, parâmetros necessários para a validação do método de determinação de crisina em plasma de ratos.

LD (ng.mL ⁻¹)	LQ (ng.mL ⁻¹)	Concentração (ng.mL ⁻¹)	Precisão		Exatidão	
			Repetibilidade (DPR%) n=5	Precisão intermediária (DPR%) n=5	Recuperação (%) n =3	(DPR%)
0,475	1,426	10,0	7,09	8,34	97,21	6,12
		40,0	7,21	7,59	107,58	8,36
		80,0	6,40	13,01	112,88	1,63

Como visto anteriormente, a análise da precisão foi dividida em dois aspectos, a repetibilidade a precisão intermediária. Para isso, deve-se observar a Tabela 17, onde encontramos os valores resultantes desses estudos, tabelados em forma de percentagem de desvio padrão relativo (DPR%). Nota-se que todos os valores mostrados acima são condizentes com aquilo que recomendam os órgãos regulamentadores (ANVISA, 2017; AOAC, 2012; INMETRO, 2018). Isso indica excelente precisão do método de determinação de crisina em plasma de ratos. De acordo com Ge et al. (2015) que utilizou o mesmo tipo detector UPLC-MS/MS no estudo da farmacocinética de crisina e seus derivados, a precisão obtida também resultou em valores menores que 15,0 % de DPR, comprovando a eficiência do método.

Com relação a exatidão do método proposto, o estudo foi conduzido de maneira a se avaliar a recuperação de crisina em amostras de plasma enriquecidos através do método de adição padrão. Esse enriquecimento foi realizado em três níveis de concentração distintos, a de 10,0, 40,0 e 80,0 ng/mL de crisina. Como resultados dessa avaliação, nota-se que para os três níveis de concentração (10,0, 40,0 e 80,0 ng/mL), os valores de recuperação ($97,21 \pm 6,21$, $107,58 \pm 8,36$ e $112,88 \pm 1,63$ %, respectivamente) permaneceram na faixa aceitável pelos órgãos regulamentadores (60,0 a 115,0 %), como AOAC (2012) e INMETRO (2018).

Através dessa análise, pode-se notar que o método pode ser considerado exato, evidenciando recuperações notáveis de crisina em plasma de ratos enriquecidos, preciso, comprovado através das porcentagens de desvio padrão relativo e também com baixos limites para realizar a detecção e quantificação de crisina em plasma de ratos.

4.9.1.4 Estabilidade

A estabilidade de um método bioanalítico como este é muito utilizada para verificar condições extremas que as amostras biológicas podem enfrentar. Dessa forma, elaborou-se a Tabela 18, onde os resultados referentes a este parâmetro são resumidos e tabelados.

Tabela 18. Estudo da estabilidade do composto crisina em plasma de ratos sob condições de armazenamento (temperatura e tempo) diferentes ($n=3$).

Condições de armazenamento	Solução Padrão (ng.mL⁻¹)	DPR (%)
Três ciclos de congelamento e descongelamento	10	5,84
	40	4,89
	80	3,03
Estabilidade de temperatura a curto prazo (Temperatura ambiente)	10	11,64
	40	4,77
	80	8,51

Estabilidade pós- preparo (10°C durante 24h)	10	8,44
	40	6,99
	80	11,23
Estabilidade de temperatura a longo prazo (-20°C durante 90 dias)	10	4,69
	40	4,20
	80	3,53

Como pode-se notar, para o armazenamento durante três ciclos de congelamento e descongelamento, nas concentrações de 10, 40 e 80 ng/mL, o desvio padrão calculado foi baixo segundo os padrões estabelecidos pelos órgãos regulamentadores, indicando valores bem menores que o recomendado (< 15,0%), os quais foram de 5,84%, 4,89% e 3,03%. Para a estabilidade à temperatura ambiente a curto prazo, os valores também adequados, abaixo de 15,0 % de desvio padrão relativo (11,64 %, 4,77 % e 8,51 %, para as concentrações de crisina de 10, 40 e 80 ng/mL, respectivamente. Para o terceiro tipo de condição testada, a estabilidade a 10°C durante o tempo de 24 horas, mostrou-se adequada atendendo os valores estabelecidos, sendo encontrados 8,44 %, 6,99 % e 11,23 %, para as concentrações de 10, 40 e 80 ng/mL, respectivamente.

Como última condição avaliada para o parâmetro de estabilidade, está a estabilidade a longo prazo, condição essa que resultou nos menores valores de desvio padrão relativo, sugerindo melhor estabilidade para a determinação de crisina em plasma de ratos. Os valores obtidos para essa condição foram de 4,69 %, 4,20 % e 3,53 %, para as concentrações de 10, 40 e 80 ng/mL, respectivamente. As condições de estabilidade avaliadas sugerem fortemente que a quantificação da crisina em plasma de ratos realizadas após diferentes dias e diferentes temperaturas pode ser realizada, atendendo os objetivos de realizar uma análise estável e com baixo desvio padrão relativo, ou seja, o método é estável mediante condições extremas das amostras biológicas.

4.9.2 Resultados para o Ensaio de Farmacocinética

O estudo farmacocinético foi realizado com o objetivo de investigar e avaliar possíveis mudanças e alterações no perfil farmacocinético do composto crisina, considerando um sistema nanoestruturado lipídico. Dessa forma, foram avaliados o perfil

de absorção, a biodisponibilidade do composto no organismo do animal e a eliminação de crisina carregada por nanopartículas sólidas lipídicas de palmitato de metila e palmitato de etila, utilizando a via oral em uma única dose, comparando-se com o perfil farmacocinético obtido para a crisina livre.

A Figura 25 contém duas curvas de concentração plasmática de crisina *versus* o tempo de análise, as quais foram obtidas após a administração em ratos de uma única dose de crisina livre e também de nanopartículas sólidas lipídicas contendo crisina. Dessa forma nota-se que para a curva da crisina livre, retratando seu perfil plasmático, existe a rápida adsorção do composto, atingindo uma concentração máxima ($C_{máx}$) de 142,55 ng/mL no tempo de 12,0 horas. Logo após isso, a concentração plasmática sofre uma queda significativa para valores de concentração de 20,0 a 25,0 ng/mL, quando é chegado o fim do ensaio.

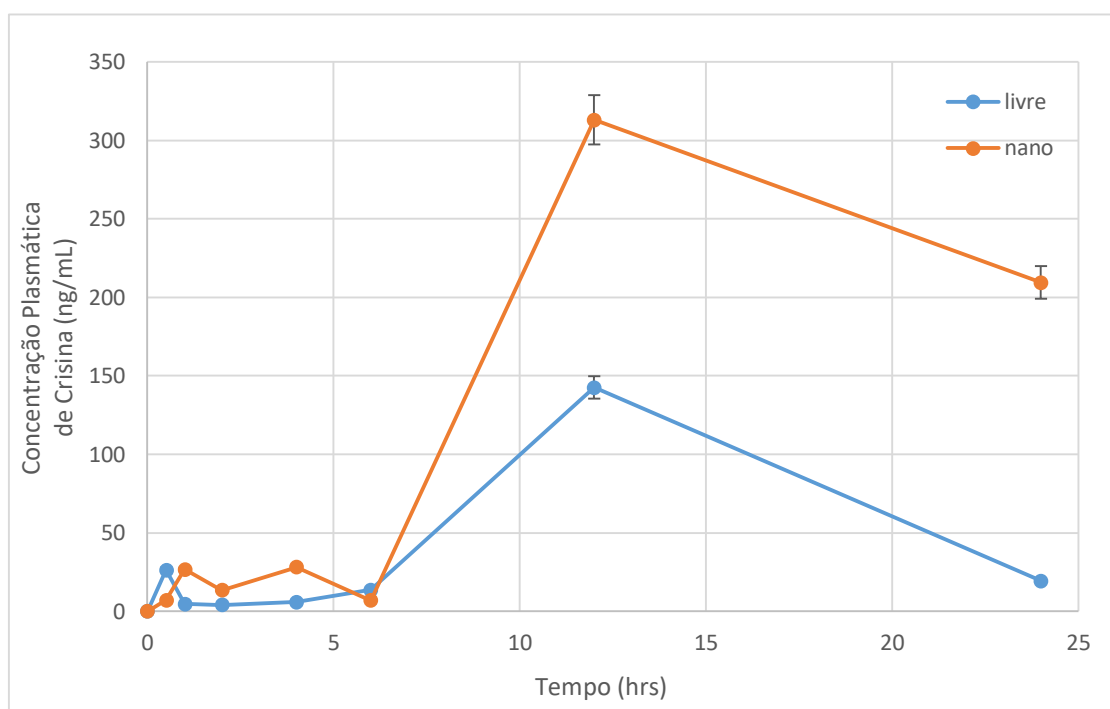


Figura 25. Curvas de concentração plasmática de crisina advinda de dois sistemas: a crisina livre em solução aquosa e a solução de sobrenadante de nanopartículas sólidas lipídicas, ambas obtidas por administração de 10,0 mg/kg de crisina em ratos.

De modo distinto, para a curva plasmática referente às nanopartículas carregadas com crisina, nota-se também uma absorção rápida do composto, entretanto a concentração máxima ($C_{máx}$) alcançada no plasma foi mais que o dobro da obtida pela administração de crisina livre, resultando em um valor de 313,02 ng/mL obtida no mesmo tempo de 12,0 horas, seguida de uma diminuição da concentração para valores alcançados no final do

ensaio de cerca de 230,0 ng/mL. Dessa forma, fazendo-se a comparação entre as curvas e analisando os perfis na Figura 25, pode-se notar que existe uma grande diferença entre as concentrações máximas alcançadas no plasma de ratos para ambas as situações (142,55 ng/mL para crisina livre e 313,02 ng/mL para nanopartícula contendo crisina), considerando um mesmo tempo de análise, bem como a diferença entre as concentrações sustentadas até as horas finais de ensaio (~25,0 ng/mL para crisina livre e ~200,0 ng/mL para nanopartículas contendo crisina) é considerável, dados estes também mostrados na Tabela 19.

Tabela 19. Parâmetros farmacocinéticos avaliados para duas amostras, a crisina livre e a nanopartícula sólida lipídica contendo crisina, após administração oral de dose única em ratos ($n=6$).

Parâmetros Farmacocinéticos	Grupos	
	Crisina livre	Nps-CRIS
C_{max} (ng.mL ⁻¹)	142,555 ± 49,95	313,023 ± 14,54
T_{max} (h)	12	12
ASC_{0-t} (ng.h/mL)	1488,19	4201,11
$ASC_{0-\infty}$ (ng.h/mL)	1605,17	10453,5
$T_{1/2}$ (h)	4,17219	20,6866
Kel (1/h)	0,1661	0,0335
Vd (L)	0,04045	0,07105
Cl (L/h)	0,00672	0,00238

Valores apresentados como média ($n=6$). C_{max} : concentração máxima; T_{max} : tempo para atingir a máxima concentração; ASC_{0-t} : área sob a curva da concentração plasmática de um fármaco *versus* tempo; $ASC_{0-\infty}$: área sob a curva da concentração plasmática de um fármaco *versus* tempo extrapolado ao infinito; $T_{1/2}$: tempo de meia-vida; Kel: constante de eliminação; Vd: volume de distribuição aparente; Cl: clearance.

Ainda com relação à Tabela 19, nota-se que o tempo para que a máxima de concentração plasmática ($T_{máx}$) seja alcançada foi o mesmo para ambas as situações, crisina livre e nanopartícula contendo crisina, o que significa que a nanopartícula possui o mesmo comportamento que a crisina livre, apesar das diferenças entre concentração máxima, biodisponibilidade e liberação sustentada serem bem evidentes. Considerando isso, tem-se que a razão entre as duas concentrações foi de 2,19, o que demonstra a superioridade da nanopartícula com relação a biodisponibilidade do composto crisina.

A fase de distribuição de crisina livre foi muito semelhante à crisina pertencente ao sistema nanoparticulado, uma vez que os valores de volume de distribuição (Vd) ficaram muito similares (0,04045 para crisina livre e 0,07105 para nanopartícula contendo crisina). Com relação aos valores obtidos para a constante de eliminação do composto no organismo do rato, verificou-se que a nanopartícula contendo crisina possui uma taxa de eliminação 4,96 vezes maior do que a obtida para a crisina livre (valores de 0,1661 e 0,0335, para crisina livre e nanopartícula contendo crisina). Isso significa que a crisina é degradada/eliminada pelo organismo mais rapidamente quando ela é aplicada de maneira livre, do que se ela fosse obtida através de um sistema nanoparticulado, fato esse que demonstra a liberação controlada e sustentada da crisina no ambiente plasmático.

O clearance (Cl) para as nanopartículas contendo crisina foi cerca de 2,82 vezes menor que o obtido pela crisina livre (valores de 0,00672 para crisina livre e 0,00238 para nanopartícula contendo crisina), o que indica maior permanência do composto crisina no plasma de ratos, demonstrando aumento da biodisponibilidade do composto. Além disso, o tempo de meia vida ($T_{1/2}$) para as nanopartículas contendo crisina foi 4,96 vezes maior que para o composto livre. Com relação a esse tempo, pode-se sugerir que a nanopartícula lipídica causou também uma maior permanência do composto no organismo do rato, podendo prolongar sua ação terapêutica. As áreas sob as curvas de concentração plasmática de crisina *versus* tempo (ASC_{0-t}) e de crisina *versus* tempo extrapolado ao infinito para a crisina ($ASC_{0-\infty}$) foram 2,82 e 6,51, respectivamente, maiores que a de nanopartícula contendo crisina demonstram que existe uma maior biodisponibilidade de crisina quando a mesma encontra-se encapsulada nesse sistema nanoparticulado lipídico, sendo que para a crisina livre foram obtidos os valores de 1488,19 para o tempo de 24 horas e quando extrapolado o de 1605,17 e para a nanopartícula contendo crisina os valores foram de 4201,11 e 10453,50, respectivamente.

Quando avalia-se os aspectos gerais dos parâmetros farmacocinéticos acima mencionados, nota-se a real diferença entre o perfil farmacocinético da crisina livre e o da nanopartícula sólida lipídica contendo crisina. Isso pode ser explicado pelo efeito protetor fornecido pela matriz lipídica composta por dois lipídeos, bem como pelas mudanças de cristalinidade dos lipídeos “mixados”, fazendo com que o composto encapsulado por eles seja protegido e liberado de maneira sustentável. Também é possível sugerir que a encapsulação de crisina quebrou barreiras antes intransponíveis verificadas pelo uso da crisina livre, barreiras essas tais como a biodisponibilidade, a liberação

ocorrida de forma sustentável e prolongada, o prolongamento de suas ações terapêuticas além das mudanças físico-químicas ocorridas durante o processo.

Mani e Natesan (2018) em seu trabalho de revisão sobre crisina e seus mecanismos de ação e atividades farmacológicas, esclarece que a crisina ingerida em sua forma livre apresenta um metabolismo rápido, bem como uma eliminação sistemática rápida. Segundo os autores, isso se deve ao fato do metabolismo da crisina ser catalisado por vias glucuronidação e sulfatação e não pelas vias hepáticas e intestinais. Ainda conforme os autores mencionam, a interação de algumas enzimas com a crisina é grande, sendo que o uso oral desse composto pode acarretar em uma baixa biodisponibilidade no organismo. Devido a isso, Mani e Natesan ainda destacam a importância de um carregador para a crisina, visando o aumento de sua biodisponibilidade.

Walle et al. (2001) em seu trabalho sobre o metabolismo da crisina e a disposição da mesma no organismo de humanos elucidam que a baixa biodisponibilidade da crisina no intestino deve-se principalmente ao seu metabolismo rápido e também a glucuronidação e sulfatação hepática da mesma. Devido a isso o mesmo sugere a presença de carregadores que possam evitar a rápida metabolização da crisina.

Em um trabalho muito semelhante ao dessa tese, Danhua et al. (2020) realizou a preparação de um carreador lipídico nanoestruturado contendo crisina e realizou também o estudo da farmacocinética. O nanocarreador proposto trouxe resultados interessantes quando comparado apenas à crisina livre, isso porque o $T_{m\acute{a}x}$ foi alterado de 1,86 h para 3,39 hrs, respectivamente, ocorrendo mudanças principalmente no valor da máxima de concentração de crisina no plasma ($C_{m\acute{a}x}$) que foi de 0,44 $\mu\text{g/mL}$ para 1,73 $\mu\text{g/mL}$. Esse fato sugere que utilizando um sistema nanoestruturado, a crisina encontra-se mais biodisponível no organismo, podendo desempenhar as atividades farmacológicas requeridas. Ainda com relação ao trabalho de Danhua, o autor menciona que a biodisponibilidade relativa da crisina em seu trabalho teve um aumento de 3,10 vezes, quando comparados a crisina livre e o nanocarreador lipídico. Em nosso trabalho, esse valor foi muito similar (2,82 vezes), o que comprova a necessidade de um meio de transporte para que a crisina seja realmente 'aproveitada' no organismo, bem como mostra a alteração de seu comportamento farmacocinético no organismo.

Analisando o estudo farmacocinético e fazendo a comparação com a literatura, pode-se concluir que através da utilização da nanopartícula sólida lipídica contendo

crisina e formada através de dois lipídeos, o palmitato de metila e o palmitato de etila, como meio de transporte do composto para o organismo, melhoras significativas são alcançadas, tais como o aumento da biodisponibilidade de crisina no corpo, o aumento da biodisponibilidade em sua absorção oral, o prolongamento do tempo no qual a crisina permanece no plasma de ratos e a redução de sua taxa de eliminação no organismo. Devido a isso, considera-se a eficiência do sistema nanoestruturado desenvolvido nesse trabalho na entrega de crisina ao organismo.

5 CONCLUSÃO

Conclui-se o presente trabalho, indicando, primeiramente, que o protocolo de desenvolvimento elaborado para a criação da nanopartícula sólida lipídica contendo crisina foi eficiente para os parâmetros estabelecidos de tamanho de partícula, índice de polidispersão e morfologia, dando origem a um sistema carregador de crisina com excelente eficiência de encapsulação.

A mistura de lipídeos, palmitato de metila e palmitato de etila, mostrou ser eficiente no desenvolvimento dessa nanopartícula, fato esse evidenciado no planejamento fatorial, onde sua utilização foi crucial para a obtenção de parâmetros físico-químicos aceitáveis. Considerando o planejamento fatorial, pode-se notar que o mesmo teve uma influência grande na decisão dos valores de massa de ambos os lipídeos e também no valor de concentração do tensoativo utilizado.

Com relação ao estudo de estabilidade do composto nanoestruturado, o mesmo mostrou ser estável considerando o tamanho de partícula e o índice de polidispersão avaliados, quando em solução pelo período de 21 dias apenas. A estabilidade do sistema foi totalmente influenciada pelos aspectos físico-químicos dos lipídeos utilizados no processo.

Para os ensaios citotóxicos realizados, o ensaio de hemólise e o ensaio de antioxidante, pode-se considerar o potencial efeito da nanopartícula contendo crisina na comprovação dessas atividades farmacológicas. A superioridade do sistema nanoparticulado frente à crisina livre foi comprovada em ambos os ensaios, entretanto, para a ação antioxidante a crisina livre apresentou melhores efeitos.

Considerando o ensaio de liberação gastro-intestinal, nota-se que a crisina não foi liberada no trato gástro-intestinal simulado nesse ensaio. Para o ensaio de liberação *in vitro* também é possível notar que a percentagem de liberação foi baixa considerando o ensaio realizado.

Os resultados do ensaio de farmacocinética contradizem o que os resultados dos ensaios de liberação mostram, isso porque através desse estudo pôde-se notar a eficiência

do sistema nanoestruturado elaborado por esse trabalho na entrega de crisina ao organismo e melhoria de propriedades farmacológicas, como o aumento da biodisponibilidade da crisina e aumento do período no qual a mesma permanece no organismo.

Dessa forma, conclui-se o presente trabalho elucidando a importância do sistema nanoestruturado desenvolvido nesta tese quanto a superação de fatores que possam atrapalhar a utilização da crisina em sua totalidade e a demonstração de que a nanopartícula sólida lipídica contendo crisina pôde proporcionar muitas vezes a potencialização das atividades farmacológicas relatadas na literatura.

6. ETAPAS FUTURAS

Com a finalização desta tese notou-se ainda a necessidade de alguns estudos mais profundos, com base nos resultados encontrados para alguns ensaios realizados durante o desenvolvimento da nanopartícula sólida lipídica contendo crisina.

O estudo da estabilidade da nanopartícula pode possibilitar uma melhor investigação na utilização de crioprotetores com a finalidade de aumentar a estabilidade do sistema. Também pode-se realizar um estudo mais aprofundado do potencial zeta da nanopartícula, estudando a possibilidade de um revestimento para a nanopartícula visando um afastamento de seu valor da neutralidade, evitando assim a aglomeração das nanopartículas.

Os estudos de liberação, tanto o simulando o trato gástro-intestinal como o realizado com tampão PBS, necessitam de uma mudança de protocolo ou até mesmo uma alteração na técnica de detecção de crisina, podendo ser testada a técnica utilizada no ensaio de farmacocinética, a UPLC-MS/MS.

7 REFERÊNCIAS

ABDOU, H. M. Dissolução, bioavailability and bioequivalence. Easton: Mack Printing, 1989.

AK, T.; GÜLÇİN, İ. **Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin.** *Chemico-biological Interactions*, v. 174, n. 1, p.27-37, 2008.

ALI, A.M., WARKENTIN, T.E., VARDOSY, L., GOLDSMITH, C.H., BLAJCHMAN, M.A. **Platelet concentrates stored for 5 days in a reduced volume of plasma maintain hemostatic function and viability.** *Transfusion*, v. 34, n.1, p. 44-47, 1994.

ALI, H. H.; MICHAUX, F.; NTSAMA, I. S. B.; JANIEWSKI, P. D. J.; LINDER, M. **Shea butter solid nanoparticles for curcumin encapsulation: Influence of nanoparticles size on drug loading.** *European Journal of Lipid Science And Technology*, v. 118, n. 8, p.1168-1178, 2015.

ANARI, E., AKBARZADEH, A., ZARGHAMI, N. **Chrysin-loaded PLGA-PEG nanoparticles designed for enhanced effect on the breast cancer cell line.** *Artificial Cells, Nanomedicine, And Biotechnology*, p.1-7, 2015.

AOAC International. Official methods of analysis. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance. 19th ed, 2012.

ARAUJO, P. **Key aspects of analytical method validation and evaluation.** *Journal of Chromatography B*. v. 877. p. 2224-2234. 2009.

AVADI, M. R.; SADEGHI, A. M. M.; MOHAMMADPOUR, N.; ABEDIN, S.; ATYABI, F.; DINARVAND, R.; RAFIEE-TEHRANI, M. **Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method.** *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 6, n. 1, p. 58–63, 2010.

BAE, Y., LEE, S., & KIM, S.-H. **Chrysin suppresses mast cell-mediated allergic inflammation: Involvement of calcium, caspase-1 and nuclear factor- κ B.** *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 254, n.1, 56–64, 2011.

BAGADE, O.M., PUJARI, R.R., RASKAR, V.S. **solid lipid nanoparticles: a critical appraisal.** *Internacional Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, v. 29, n. 1, p. 110-121, 2014.

BAHARI, L.A.S., HAMISHEHKAR, H. **The impact of variables on particle size of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: a comparative literature review.** *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, v.6, n.2, p. 143-151, 2016.

BANERJEE, A., QI, J., GOGOI, R., WONG, J., MITRAGOTRI, S. **Role of nanoparticle size, shape and surface chemistry in oral drug delivery.** *Journal of Controlled Release*, v. 238, p. 176–185, 2016.

BANERJEE, A.; KUNWAR, A.; MISHRA, B.; PRIYADARSINI, K.I.. **Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin: Studies from AAPH induced hemolysis of RBCs.** *Chemico-Biological Interactions*, v. 174, n. 2, p. 134-139, jul. 2008.

BASTIANI, M. F., LIZOT, L. L. F., DA SILVA, A. C. C., HAHN, R. Z., DRIES, S. S., PERASSOLO, M. S., ANTUNES, M.V., LINDEN, R. **An Optimized Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry Assay for the Determination of Ethyl Palmitate in Hair.** *Journal of Analytical Toxicology*, v.44, n.4, p.402-409, 2020.

BATRAKOVA, E. V.; KABANOV, A. V. **Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers.** *Journal of Controlled Release*, v. 130, n. 2, p. 98-106, 2008.

BAZZAZ, B.S.F., KHAMENEH, B., NAMAZI, N., IRANSHAHI, M., DAVOODI, D., GOLMOHAMMADZADEH, S. **Solid lipid nanoparticles carrying Eugenia caryophyllata essential oil: the novel nanoparticulate systems with broad-spectrum antimicrobial activity.** *Letters in Applied Microbiology*, v. 66, n. 6, p. 506-513, 2018.

BORGES FILHO, C. **Avaliação da bioatividade do flavonoide crisina em camundongos submetidos ao estresse crônico moderado e imprevisível.** 2014. 113f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal do Pampa. Itaqui, RS, 2014.

BRITO, N. M., AMARANTE, O. P. J., POLESE, L., RIBEIRO, M.L., **Validação de métodos analíticos: Estratégia e Discussão.** *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia. e Meio Ambiente*, v. 13. p. 129-146, 2003.

CARBONI, E.; TSCHUDI, K.; NAM, J.; LU, X.; MA, A. W. K. **Particle Margination and Its Implications on Intravenous Anticancer Drug Delivery.** *AAPS Pharmaceutical Science Technology*, v. 15, n. 3, 2014.

CARREÑO, F., PAESE, K., SILVA, C.M., GUTERRES, S.S., COSTA, T.D. **Pre-clinical investigation of the modulation of quetiapine plasma pharmacokinetics and tissues biodistribution by lipid-core nanocapsules.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 119, p. 152–158, 2016.

CASA, D. M., MORAES CARRARO, T.C.M., DE CAMARGO, L.E.A., DALMOLIN, L.F., KHALIL, N.M., MAINARDES, R.M. **Poly (L-lactide) Nanoparticles Reduce Amphotericin B Cytotoxicity and Maintain Its In Vitro Antifungal Activity.** *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 14, n. 1, p. 1–7, 2014.

CERVANTES, B., ARANA, L., MURILLO-CUESTA, S., BRUNO, M., ALKORTA, I., VARELA-NETO, I. **Solid Lipid Nanoparticles loaded with glucocorticoids Protect Auditory Cells from Cisplatin-Induced Ototoxicity.** *Journal of Clinical Medicine*, v. 8, n. 9, p. 1-17, 2019.

COLA, D.F., PASQUOTO, T., GUILGER, M., LIMA, R., SILVA, C.M.G., FRACETO, L.F. **Lipid nanostructured carriers systems for ivermectin and methoprene aiming parasite control.** *Química Nova*, v. 39, n. 09, 2016.

CONNING, D.M., HEPPELSTON, A.G. **Reticuloendothelial activity and local particle disposal. A comparison of the influence of modifying agents.** *British Journal of Experimental Pathology*, v. 47, n. 4, p. 388-400, 1966.

CROMMELIN, D. J. A.; PARK, K.; FLORENCE, A. **Pharmaceutical nanotechnology: Unmet needs in drug delivery.** *Journal of Controlled Release*, v. 141, n. 3, p. 263–264, 2010.

CRUZ SILVA, M. M., MADEIRA, V.M.C., ALMEIDA, L.M., CUSTÓDIO, J.B.A. **Hemolysis of human erythrocytes induced by tamoxifen is related to disruption of**

membrane structure. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1464, n. 1, p. 49–61, 2000.

CRUZ SILVA, M. M., MADEIRA, V.M.C., ALMEIDA, L.M., CUSTÓDIO, J.B.A. **Hydroxytamoxifen interaction with human erythrocyte membrane and induction of permeabilization and subsequent hemolysis.** *Toxicology in Vitro*, v. 15, n. 6, p. 615–622, 2001.

D'SOUZA, S. S.; DELUCA, P. P. **Methods to assess in Vitro drug release from injectable polymeric particulate systems.** *Pharmaceutical Research*, v. 23, n. 3, p. 460–474, 2006.

DANHUA, L., JIPING, M., ZHIQIANG, Z., MINGSONG, F. **Preparação do carreador lipídico nanoestruturado de crisina e sua farmacocinética em ratos.** *Herald of Medicine*, v. 39, n.6, p. 835-839, 2020.

DARA, T., VATANARA, A., MAYBODI, M.N., VAKILINEZHAD, M.A., MALVAJERD, S.S., VAKHSHITEN, F., SHAMSIAN, A., SHARIFZADEH, M., KAGHAZIAN, H., MOSADEGH, M.H. **Erythropoietin-loaded solid lipid nanoparticles: preparation, optimization, and in vivo evaluation.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 178, p. 307-316, 2019.

DONG, D., QUAN, E., YUAN, X., XIE, Q., LI, Z., & WU, B. **Sodium Oleate-Based Nanoemulsion Enhances Oral Absorption of Chrysin through Inhibition of UGT-Mediated Metabolism.** *Molecular Pharmaceutics*, v.14, n.9, p. 2864–2874, 2016.

DOKTOROVOVA, S.; SHEGOKAR, R.; FERNANDES, L.; LOPES, P.M.; MULLER, R.H.; SOUTO, E. B. **Trehalose is not a universal solution for solid lipid nanoparticles freeze-drying.** *Pharmaceutical Development And Technology*, v. 19, n. 8, p.922-929, 2013.

DUMITRASCU, C., PAUL, R., KINGSTON, R., WILLIAMS, R. **Influence of alcohol containing and alcohol free cosmetics on FAEE concentrations in hair. A performance evaluation of ethyl palmitate as sole marker, versus the sun of four FAEEs.** *Forensic Science International*, v. 283, p. 29-34, 2018.

EATEMADI, A., DARAEI, H., AIYLABEGAN, H.T., NEGAHDARI, B., RAJEIAN, B., ZARGHAMI, N. **Carbon nanotubes: properties, synthesis, purification, and**

- medical applications.** *Nanoscale Research Letters*, v. 9, n. 1, p.1-13, 2014.
- EL-DEMERDASH, E. **Anti-inflammatory and antifibrotic effects of methyl palmitate.** *Toxicology And Applied Pharmacology*, v. 254, n. 3, p.238-244, 2011.
- EI-HUSSEIN, D., EI-ZAAFARANY, G.M., NASR, M., SAMMOUR, O. **Chrysin nanocapsules with dual anti-glycemic and anti-hyperlipidemic effects: Chemometric optimization, physicochemical characterization and pharmacodynamic assessment.** *International Journal of Pharmaceutics*, V. 592, p. 1-49, 2020.
- FAN, M., DING, H., ZHANG, G., HU, X., GONG, D. **Relationship of dietary flavonoid structure with its tyrosinase inhibitory activity and affinity.** *LWT – Food Science and Technology*, v. 107, p. 25-34, 2019.
- FENG, S. S. **New-concept chemotherapy by nanoparticles of biodegradable polymers: where are we now?** *Nanomedicine*, v. 1, n. 3, p. 297–309, 2006.
- FENG, S.S. **Nanomedicine: nanoparticles of biodegradable polymers for cancer diagnosis and treatment.** *Cosmos*, v. 4, p. 185–201, 2008.
- FENG, X., QIN, H., SHI, Q., ZHANG, Y., ZHOU, F., WU, H., DING, S., NIU, Z., LU, Y., SHEN, P. **Chrysin attenuates inflammation by regulating M1/M2 status via activating PPAR γ .** *Biochemical Pharmacology*, 89(4), 503–514, 2014.
- FERRADO, J. B., PEREZ, A. A., VISENTINI, F. F., ISLAN, G. A., CASTRO, G. R., & SANTIAGO, L. G. (2019). **Formation and characterization of self-assembled bovine serum albumin nanoparticles as chrysin delivery systems.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 173, 43–51, 2019.
- FERRADO, J.B., PEREZ, A.A., RUIZ, M.C., LEÓN, I.E., SANTIAGO, L.G. **Chrysin-loaded bovine serum albumin particles as bioactive nanosupplements.** *Food & Function*, n. 7, 2020.
- FERRONATO, K., BRUXEL, F., ARAUJO, F.A., TEIXEIRA, H., KOESTER, L.S. **Emprego do método da bolsa de diálise da avaliação da liberação de fármacos a partir de emulsões submicrométricas.** *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 29, n. 2, p. 313–320, 2010.

FIROUZI-AMANDI, A. DADASHPOUR, M., NOURI, M., ZARGHAMI, N., SERATI-NOURI, H., JAFARI-GHARABAGHLOU, D., KARZAR, B.H., MELLATYAR, H., AGHEBATI-MALEKI, L., BABALOO, Z., PILEHVAR-SOLTANAHMADI, Y. **Chrysin-nanoencapsulated PLGA-PEG for macropage repolarization: Possible application in tissue regeneration.** *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 105, p. 773-780, 2018.

FONSECA, D. P.; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R. M. **Bovine serum albumin-based nanoparticles containing resveratrol: Characterization and antioxidant activity.** *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 39, p. 147–155, 2017.

GARG, K.S., DIN, W. **Development and evaluation od Chrysin-phopholipid complex loaded solid lipid nanoparticles – storage stability and *in vitro* anticâncer activity.** *Journal of Microencapsulation*, p. 1-42, 2018.

GE, S., GAO, S., YIN, T., & HU, M. **Determination of Pharmacokinetics of Chrysin and Its Conjugates in Wild-Type FVB and Bcrp1 Knockout Mice Using a Validated LC-MS/MS Method.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 63, n. 11, 2902–2910, 2015.

GLAUBITT, K., RICCI, M., GIOVAGNOLI, S. **Exploring the Nano Spray-Drying Technology as an Innovative Manufacturing Method for Solid Lipid Nanoparticles Dry Powders.** *AAPS PharmSciTech*, v. 20, n. 1, 2019.

GUPTA, R. B.; KOMPELLA, U. B. **Nanoparticles Technology for Drug Delivery.** New York: Taylor & Francis, 2006.

HAN, Q.-T., XIAO, K., XIANG, K.-L., LI, G.-S., & DAI, S.-J. **New Flavonoid Glucuronate Esters with Anti-inflammatory Activities from *Scutellaria regeliana*.** *Chemistry & Biodiversity*, 15(7), 2018.

HELGASON, T., AWAD, T.S., KRISTBERGSSON, K., MCCLEMENTS, D.J., WEISS, J. **Influence of polymorphic transformations on gelations of tripalmitin solid lipid nanoparticle suspensions,** *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 85, p.501-511, 2008.

HUANG, J., LIU, Z., MA, Q., HE, Z., NIU, Z., ZHANG, M., PAN, L., QU, X., YU, J., NIU, B. **Studies on the Interaction between Three Small Flavonoid Molecules and Bovine Lactoferrin.** *Biomed Research International*, p. 1-10, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (INMETRO). Orientação sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-008, revisão 6, 2018.

JAIN, S., VALVI, P.U., SWARNAKAR, N.K., THANKI, K. et al. **Gelatin coated hybrid lipid nanoparticles for oral delivery of Amphotericin B.** *Molecular Pharmaceutics*, v. 9, n. 9, p. 2542–2553, 2012c.

JAYAKUMAR, T., THOMAS, P.A., GERALDINE, P. **In-vitro antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*.** *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 10, n. 2, p.228-234, 2009.

KASOJU, N., BORA, D.K., BHONDE, R.R., BORA, U. **Synthesis, characterization, and application of novel-biodegradable self-assembled 2-(N-phthalimido) ethyl-palmitate nanoparticles for câncer therapy.** *Journal of Nanoparticle Research*, v. 12, p. 801-810, 2010.

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

KIM, K. M., LIM, H. K., SHIM, S. H., & JUNG, J. (2017). **Improved chemotherapeutic efficacy of injectable chrysin encapsulated by copolymer nanoparticles.** *International Journal of Nanomedicine*, v. 12, p.1917–1925, 2017.

LARIT, F., ELOKELY, K.M., CHAURASIVA, N.D., BENYAHIA, S., NAELI, M.A., LEÓN, F., ABU-DARWISH, M.S., EFFERTH, T., WANG, Y., BELOUAHEM-ABED, D., BENAYACHE, S., TEKWANI, B.L., CUTLER, S.J. **Inhibition of human monoamine oxidase A and B by flavonoids isolated from two Algerian medicinal plants.** *Phytomedicine*, v. 40, p. 27-36, 2017.

LEGRAND, P. et al. **Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: A review.** *Pharma Science*, v. 9, p. 411–418, 1999.

- LI, P., BUKHARI, S.N.A, KHAN, T., CHITTI, R., BEVOOR, D.B., HIREMATH, A.R., SREEHARSHA, N., SINGH, Y., GUBBIYAPPA, K.S. **Apigenin-loaded solid lipid nanoparticle attenuates diabetic nephropathy induced by streptozotocin nicotinamide through Nrf2/OH-1/NF-kB signalling pathway.** *Internacional Journal of Medicine*, v. 15, p. 9115-9124, 2020.
- LIM, W., RYU, S., BAZER, F. W., KIM, S.-M., & SONG, G. (2017). **Chrysin attenuates progression of ovarian cancer cells by regulating signaling cascades and mitochondrial dysfunction.** *Journal of Cellular Physiology*, v. 233, n.4, 3129–3140, 2017.
- LIU, Q., WU, H.L., LIU, Z., XIAO, R., WANG, T., HU, Y., DING, Y.J., YU, R.Q. **Chemometrics-assisted HPLC-DAD as a rapid and interference-free strategy for simultaneous determination of 17 polyphenols in raw propolis.** *Analytical Methods*, v. 10, p. 5577-5588, 2018.
- LOTFI-ATTARI, J., PILEHVAR-SOLTANAHMADI, Y., DADASHPOUR, M., ALIPOUR, S., FARAJZADEH, R., JAVIDFAR, S., & ZARGHAMI, N. **Co-Delivery of Curcumin and Chrysin by Polymeric Nanoparticles Inhibit Synergistically Growth and hTERT Gene Expression in Human Colorectal Cancer Cells.** *Nutrition and Cancer*, v. 69, n.8, p. 1290–1299, 2017.
- LUAN, L., CHI, Z., LIU, C. **Chinese White Wax Solid Lipid Nanoparticles as a Novel Nanocarrier of Curcumin for Inhibiting the Formation of *Staphylococcus aureus* Biofilms.** *Nanomaterials*, v. 763, n. 9, 2019.
- LUNGARE, S., HALLAM, K., & BADHAN, R. K. S. **Phytochemical-loaded mesoporous silica nanoparticles for nose-to-brain olfactory drug delivery.** *International Journal of Pharmaceutics*, 513(1-2), 280–293, 2016.
- MANGEMATIN, V.; WALSH, S. **The future of nanotechnologies.** *Technovation*, v. 32, n. 3–4, p. 157–160, 2012.
- MANI, R., & NATESAN, V. (2018). **Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action.** *Phytochemistry*, v.145, p. 187–196, 2018.

MANTAWY, E.M.; TADROS, M.G.; AWAD, A.S.; HASSAN, D.A.A.; DEMERDASH, E.E. **Insights antifibrotic mechanism of methyl palmitate: Impact on nuclear factor kappa B and proinflammatory cytokines.** *Toxicology And Applied Pharmacology*, v. 258, n. 1, p.134-144, 2012.

MEHRI, S., KARAMI, H.V., HASSANI, F.V., HOSSEINZADEH, H. **Chrysin reduced acrylamide-induced neurotoxicity in both in vitro and in vivo assesments.** *Iranian Biomedical Journal*, v. 18, n. 2, p. 101-106, 2014.

MISHRA, V., BANSAL, K.K., VERMA, A., YADAV, N., THAKUR, S., SUDHAKAR, K., ROSENHOLM, J.M. **Solid lipid nanoparticles: Emerging coloidal nano drug delivery systems.** *Pharmaceutics*, v. 10, n. 4, p. 191, 2018.

MOHAMMADIAN, F., PILEHVAR, Y., ZARGHAMI, F., AKBARZADEH, A., ZARGHAMI, N. **Upregulation of miR-9 and Let-7a by nanoencapsulated chrysin in gastric cancer cells.** *Artificial Cells, Nanomedicine, And Biotechnology*, v. 45, n. 6, p.1201-1206, 2016.

MULLER, R.H., SHEGOKAR, R., KECK, C.M. **20 Years of lipid nanoparticles (SLN e NLC): presente state of development e industrial applications.** *Current Drug Discovery Technologies*, v.8, p. 207-277, 2011.

NABAVI, Seyed Fazel. et al. **Neuroprotective effects of chrysin: From chemistry to medicine.** *Neurochemistry International*, v. 90, p. 224-231, 2015.

NASEER, S., LONE, SH., LONE, J.A., KHUROO, M.A., BHAT, K.A. **LAC-MS guided isolation, quantification and antioxidante evaluation of bioactive principles from Epimedium elatum.** *Journal of Chromatography B*, v. 989, p. 62-70, 2015.

NASERI, N.; VALIZADEH, H.; ZAKERI-MILANI, P. **Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: structure, preparati on and application.** *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, v. 5, n. 3, p. 305-313, 2015.

National Association of Testing Authorities (NATA) (2018). – General Accreditation Guidance – Validation and verification of quantitative and qualitative test methods. NATA, Rhodes, Australia, 31 pp.

NAZ, S., IMRAN, M., RAUF, A., ORHAN, I.E., SHARIATI, M.A., IAHTISHAM-UL-HAQ., IQRAYASMIN., SHAHBAZ, M., QAISRANI, T.B., SHAH, Z.A., PLYGUN, S., HEYDARI, M. **Chrysin: Pharmacological and therapeutical properties.** *Life Sciences*, v. 235, n. 116797, 2019.

NEVES, A.R., LÚCIO, M., MARTINS, S., LIMA, J.L.C., REIS, S. **Novel resveratrol nanodelivery systems based on lipid nanoparticles to enhance its oral bioavailability.** *Internacional Journal of Nanomedicine*, v. 8, p. 177-187, 2013.

NIU, Q., GAO, Y., LIU, P., **Otimization of microwave-assisted extraction, antioxidante capacity, and characterization of total flavonoids from the leaves of *Alpinia oxyphylla* Miq.** *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, p. 1-9, 2019.

NOSRATI, H., ABBASI, R., CHARMI, J., RAKHSHBAHAR, A., ALIAKBARZADEH, F., DANAFAR, H., DAVARAN, S. **Folic acid conjugated bovine serum albumin: An eficiente smart and tumor targeted biomacromolecule for inhibition folate receptor positive câncer cells.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 117, p. 1125-1132, 2018.

NOSRATI, H., SALEHIABAR, M., BAGHERI, Z., RASHIDZADEH, H., DAVARAN, S., DANAFAR, H. **Preparation, characterization, and evaluation of amino acid modified magnetic nanoparticles: drug delivery and MRI contrast agente applications.** *Pharmaceutical Development and Technology*, p. 1-29, 2018.

QUIROZ, J.Q., DURAN, A.M.N., GARCIA, M.S., GOMEZ, G.L.C., CAMARGO, J.J.R. **Ultrasound-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Annatto Seeds, Evaluation of Their Antimicrobial and Antioxidant Activity, and Identification of Main Compounds by LC/ESI-MS Analysis.** *International Journal of Food Science*, v. 2019, p. 1-9, 2019.

RANI, N., BHARTI, S., BHATIA, J., NAG, T. C., RAY, R., & ARYA, D. S. **Chrysin, a PPAR- γ agonist improves myocardial injury in diabetic rats through inhibiting AGE-RAGE mediated oxidative stress and inflammation.** *Chemico-Biological Interactions*, v. 250, p. 59–67, 2016.

RAO, P., GECKELER, K.E. **Polymer nanoparticles: Preparation techniques and sizecontrol parameters.** *Progress In Polymer Science*, v. 7, n. 36, p.887-913, 2011.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. **Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.** *Free Radical Biology & Medicine*, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017. Disponível em <
http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401 >

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

ROY, S., SIL, A., & CHARKRABORTY, T. **Potentiating apoptosis and modulation of p53, Bcl2, and Bax by a novel chrysin ruthenium complex for effective chemotherapeutic efficacy against breast cancer.** *Journal of Cellular Physiology*, V. 234, n. 4, p. 4888-4909, 2018.

SAEED, N.M., EL-DEMERDASH, R., ABDEL-RAHMAN, H.M., ALGANDABY, M.M., AL-ABBASI, F.A., ABDEL-NAIM, A.B. **Anti-inflammatory activity of methyl palmitate and ethyl palmitate in different experimental rat models.** *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 264, n.1, p. 84-93, 2012.

SAMARGHANDIAN, S., AFSHARI, J.T., DAVOODI, S. **Chrysin reduces proliferation and induces apoptosis in the human prostate cancer cell line pc-3.** *Clinics*, v. 66, n. 6, p.1073-1079, 2011.

SARKAR, S., KHAN, M.F., KAPHALIA, B.S., ANSARI, G.A.S. **Methyl palmitate inhibits lipopolysaccharide-stimulated phagocytic activity of rat peritoneal macrophages.** *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, v. 20, n.6, p.302-308, 2006.

SHAHADALI, K, GARG, A. & WAHAJUD, D. **Development and evaluation of Chrysin-phospholipid complex loaded solid lipid nanoparticles - storage stability and in vitro anticancer activity,** *Journal of Microencapsulation*, p.1-42, 2018.

SHARAWY, M.H.; EL-AGAMY, D.S.; SHALABY, A.A.; AMMAR, E.S.M. **Protective effects of methyl palmitate against silica-induced pulmonary fibrosis in rats.** *International Immunopharmacology*, v. 16, n. 2, p.191-198, 2013.

SHIN, E. K., KWON, H.-S., KIM, Y. H., SHIN, H.-K., & KIM, J.-K. **Chrysin, a natural flavone, improves murine inflammatory bowel diseases.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 381, n. 4, p. 502–507, 2009.

SINGER, L.T., MIN, M.O., MOMOTAZ, H., POWERS, G., MINNES, S., BEARER, C.F. **Association of fatty acid ethyl esters in meconium with behavior during childhood.** *Drug and Alcohol Dependence*, v. 218, 2021

SOUZA, L. C., ANTUNES, M. S., FILHO, C. B., DEL FABBRO, L., de GOMES, M. G., GOES, A. T. R., DONATO, G., PRIGOL, M., BOEIRA, S.P., JESSE, C. R. (2015). **Flavonoid Chrysin prevents age-related cognitive decline via attenuation of oxidative stress and modulation of BDNF levels in aged mouse brain.** *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 134, p. 22–30, 2015.

SULAIMAN, G.M., JABIR, M.S., HAMEED, A.H. **Nanoscale modification of chrysin for improved of therapeutic efficiency and cytotoxicity.** *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, p. 1-13, 2018.

USP 37-NF 32 EN ESPAÑOL VOLUMEN 2. 2014. (Nota técnica).

VEDAGIRI, A., & THANGARAJAN, S. **Mitigating effect of chrysin loaded solid lipid nanoparticles against Amyloid β 25–35 induced oxidative stress in rat hippocampal region: An efficient formulation approach for Alzheimer’s disease.** *Neuropeptides*, v; 58, p. 111–125, 2016.

VEERAPPAN, R., SENTHILKUMAR, R. **Chrysin enhances antioxidants and oxidative stress in L-NAME-induced hypertensive rats.** *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, v. 5, n. 1, p. 20-27, 2015.

WALLE, T., OTAKE, Y., BRUBAKER, J. A., WALLE, U. K., & HALUSHKA, P. V. **Disposition and metabolism of the flavonoid chrysin in normal volunteers.** *British Journal of Clinical Pharmacology*, 51(2), 143–146, 2001.

WANG, L., MA, Y. GU, Y., LIU, Y., ZHAO, J., YAN, B., WANG, Y. **Cryoprotectant choice and analyses of freeze-drying drug suspension of nanoparticles with functional stabilisers.** *Journal of Microencapsulation*, v. 35, n. 3, p.241-248, 2018b.

WANG, Y.N., WANG, H.X., SHEN, Z.J., ZHAO, L.L., CLARKE, S.R., SUN, J.H., DU, Y.Y., SHI, G.L. **Methyl Palmitate, na acaricidal compound occurring in Green Walnut Husks.** *Journal of Economic Entomology*, v. 102, n. 1, p. 196-202, 2009.

WAS, E., SZCZESNA, T., RYBAK-CHMIELEWSKA, H., TEPER, D., JASKIEWICZ, K. **Application of HPLC-DAD Technique for Determination of Phenolic Compounds in Bee Pollen Loads.** *Journal of Apicultural Science*, v. 61, n. 1, p. 153-162, 2017.

WOO, K., JEONG, Y.J., PARK, J.W., KWON, T.K. **Chrysin-induced apoptosis is mediated through caspase activation and Akt inactivation in U937 leukemia cells.** *Biochemical And Biophysical Research Communications*, v. 325, n. 4, p.1215-1222, 2004.

YANG, Z., GUAN, Y., LI, J., LI, L., & LI, Z. **Chrysin attenuates carrageenan-induced pleurisy and lung injury via activation of SIRT1/NRF2 pathway in rats.** *European Journal of Pharmacology*, v. 836, p. 83-88, 2018.

YU, X.-M., PHAN, T., PATEL, P. N., JASKULA-SZTUL, R., & CHEN, H. **Chrysin activates Notch1 signaling and suppresses tumor growth of anaplastic thyroid carcinoma in vitro and in vivo.** *Cancer*, v. 119, n.4, p. 774–781, 2012.

ZARIC, M., MILTROVIC, M., NIKOLIC, I., BASKIC, D., POPOVIC, S., DJURDJEVIC, O. **Cryshin induces apoptosis in peripheral blood lymphocytes isolated from human chronic lymphocytic leucemia.** *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry*, v. 15, n.2, p. 189-195, 2015.

ZHANG, L., ZHU, K., ZENG, H. ZHANG, J., PU, Y., WANG, Z., ZHANG, T., WANG, B. **Resveratrol solid lipid nanoparticles to trigger credible inhibition of doxorubicin cardiotoxicity.** *International Journal of Nanomedicine*, v. 14, p, 6061-6071, 2019.

ZHANG, Z.; TAN, S.; FENG, S. S. **Vitamin E TPGS as a molecular biomaterial for drug delivery.** *Biomaterials*, v. 33, n. 19, p. 4889–4906, 2012.

ZHENG, X., MENG, W.D., XU, Y.Y., CAO, J.G., QING, F.L. **Synthesis and anticancer effect of chrysin derivatives.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 13, n. 5, p.881-884, 2003.