LUCIANA FACCO DALMOLIN

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE NANOPARTÍCULAS DE POLI(ÁCIDO-LÁTICO) CONTENDO VANILINA

GUARAPUAVA

2015

LUCIANA FACCO DALMOLIN

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE NANOPARTÍCULAS DE POLI(ÁCIDO-LÁTICO) CONTENDO VANILINA

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, UNICENTRO-PR.
Orientadora: Profª. Drª. Rubiana Mara Mainardes.
Co-orientador: Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil.

GUARAPUAVA

2015

Catalogação na Publicação
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

D148d

Dalmolin, Luciana Facco
Desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade antioxidante de nanopartículas de poli(ácido lático) contendo vanilina / Luciana Facco Dalmolin. – – Guarapuava, 2015
x, 71 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, 2015

Orientadora: Rubiana Mara Mainardes
Co-orientador: Najeh Maissar Khalil
Banca examinadora: Rubiana Mara Mainardes, Paulo Renato de Oliveira, Paulo César Ghedini

Bibliografia

1. Ciências farmacêuticas. 2. Nanopartículas. 3. PLA. 4. Vanilina. 5Câncer. 6. Atividade antioxidante. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

CDD 615

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, guia da minha vida e fortaleza em todos os momentos difíceis.

Aos meus pais Vitélio e Neli que sempre me apoiaram em todos os momentos e decisões e foram peças chaves para que eu chegasse até aqui. Por serem meu porto seguro e terem as melhores palavras de conforto e carinho quando eu preciso e por sempre acreditarem no meu potencial, me dando forças pra seguir em frente.

Aos meus irmãos Nelice e Fabio que sempre me incentivaram e motivaram. Por me proporcionarem muitos momentos de alegria quando conseguíamos estar juntos e que quando longe sempre deram um jeitinho de encurtar a distância e fazer com que eu me sentisse próxima a eles.

Ao meu namorado Rogério que soube entender meus momentos de desespero e ocupação e sempre me ajudou no que precisei além de todo o amor e carinho dedicado a mim que com certeza foram fundamentais.

À minha orientadora Rubiana, por ter depositado um voto de confiança em mim desde o segundo ano de faculdade, mesmo sem nem saber quem eu era direito. Por acreditar que eu seria capaz de chegar até aqui e por todos os ensinamentos transmitidos ao longo de todos estes anos, não só científicos, mas também de vida.

Ao meu co-orientador Najeh por toda contribuição para realização deste projeto, pela paciência e pelas inúmeras dicas no mundo científico.

Ao meu grupo de amigas da faculdade: Aline, Diani, Dani, Fer, Cami, Day, Leizi, Thaysa, Lori e Iara com as quais dividi as alegrias e frustrações, vocês foram presentes que Deus colocou em meu caminho, desejo que a nossa amizade dure para sempre.

Às amigas de fora Cami, Jana, Ale e minha prima Fabi com as quais convivi boa parte deste tempo do mestrado e que sempre foram apoio e companhia pra mim.

Aos colegas de laboratório, desde os que já passaram por ele - Talita, Ana, Thuane, Clescila, Débora, Ju - até os que estão até hoje - Lu C., Lígia, Jo, Thaysa, Lori, Di, Aline, Leizi, Daniel, Emilli, Junior, Dieny, Neto, Lari, Guilherme, Su. Com certeza cada um de vocês contribuiu de alguma forma, com alguma informação, conhecimento ou ajuda no laboratório, para a minha carreira científica e sempre serei muito grata por isso. Obrigada também por todos os bons momentos que passamos juntos no laboratório os quais ficarão gravados pra sempre na memória.

À CAPES pela bolsa concedida.

Aos professores do programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas da UNICENTRO por todo conhecimento transmitido e especialmente ao professor Romano por ter nos emprestado inúmeras vezes seu laboratório para utilizarmos o sonicador.

Ao pessoal da química, especialmente a professora Eriza que ajudou nas análises do DR-X, ao Mateus e a Joslaine que colaboraram na análise do potencial zeta e a Jo que me ajudou na análise do infravermelho.

Ao professor Ricardo da física que colaborou nas análises do DSC e TG.

Ao professor Paulo e a professora Tânia pelas ótimas considerações e contribuições na banca de qualificação.

Enfim, a todos aqueles que eu não listei mas que com certeza estavam comigo em pensamento torcendo para que tudo desse certo, meu sincero muito obrigada!

RESUMO

O carreamento de agentes antitumorais por meio de nanopartículas poliméricas é uma estratégia promissora para o tratamento do câncer. Dentre os compostos em destaque, a vanilina tem sido bastante estudada principalmente por sua atividade antioxidante e também pelo caráter antimutagênico e quimiopreventivo que tem demonstrado. Porém, problemas de baixa solubilidade e biodisponibilidade inerentes a características da própria molécula fazem com que seja necessária uma alternativa de carregamento desta molécula a fim de vencer estas limitações e atingir o local de ação em concentrações efetivas. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas de poli(ácido-lático) (PLA) contendo vanilina, caracterização físico-química, bem como a avaliação da estabilidade física e do potencial antioxidante *in vitro*. As nanopartículas foram preparadas pelo método de emulsificação evaporação do solvente e caracterizadas quanto ao tamanho, índice de polidispersão, morfologia, potencial zeta, perfil de liberação *in vitro*, eficiência de encapsulação, DSC, esprectroscopia de infravermelho e difração de raio-X. Um método analítico por CLAE foi desenvolvido e validado para a quantificação da vanilina. A eficiência de encapsulação média da vanilina nas nanopartículas de PLA foi de aproximadamente 41% e o método utilizado mostrou-se capaz de produzir partículas esféricas com tamanho nanométrico em torno de 239 nm, com alta homogeneidade na distribuição do tamanho, potencial zeta de -22 mV e estrutura de caráter amorfo. No ensaio de liberação *in vitro* as nanopartículas de vanilina apresentaram um efeito “burst” inicial seguido de uma liberação sustentada e lenta, sendo que ao final de 120 h aproximadamente 22% do fármaco foi liberado. No estudo da estabilidade física as nanopartículas desenvolvidas permanecem estáveis quanto ao tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e teor de vanilina durante o período de tempo avaliado (3 meses). A avaliação da atividade antioxidante *in vitro* demonstrou um perfil de inibição tempo-dependente e concentração-dependente das nanopartículas de vanilina, uma vez que a porcentagem de inibição da maior concentração foi equivalente à do fármaco livre após 96 h de incubação. Assim, o conjunto de resultados demonstra que o sistema nanoestruturado produzido de PLA para a veiculação da vanilina possui adequadas características físico-químicas e é capaz de manter a atividade antioxidante *in vitro* com o decorrer da liberação do fármaco.

Palavras-chave: Nanopartículas, PLA, vanilina, câncer, atividade antioxidante.

ABSTRACT

The loading of antitumor agents through polymer nanoparticles is a promising strategy for cancer treatment. Among the compounds that have been highlighted, vanillin is a molecule that has been studied mainly for its antioxidant capacity and also the antimutagenic and chemopreventive character that has demonstrated. However, problems of low solubility and bioavailability inherent characteristics of the molecule itself cause an alternative drug loading it is necessary to overcome this limitation and reach the site of action in effective concentrations. Therefore, this study aimed to the development of PLA polymeric nanoparticles containing vanillin, the physicochemical characterization of these as well as the evaluation of their antioxidant potential in vitro. The nanoparticles were prepared by emulsion solvent evaporation method and characterized as to size, polydispersity index, zeta potential, in vitro release profile, encapsulation efficiency, DSC, IR spectroscopy and x-ray diffraction. An analytical HPLC method was developed and validated for the quantification of vanillin. The average efficiency of vanillin encapsulation in PLA nanoparticles was approximately 41% and the method used was capable of producing particles with nanometric size of 239, with high homogeneity in size distribution, zeta potencial of -22 mV and structure amorphous character. In vitro release assay vanillin nanoparticles showed a initial "burst" effect followed by a sustained and slow release, with the end 120 hours only 22% of the drug was released. In the study of the physical stability of the developed nanoparticles were stable in size, polydispersity index, zeta potential and drug contents during the study period (3 months). Evaluation of antioxidant activity in vitro demonstrated a concentration-dependent and time-dependent inhibition profile of vanillin nanoparticles, since the percentage of inhibition greater concentration was equivalent to that of free drug after 96 hours of incubation. Thus, the set of results shows that the nanostructured system produced PLA for loading vanillin possesses suitable physicochemical characteristics and is able to maintain the antioxidant activity in vitro in the course of drug release.

Keywords: nanoparticles, poly (lactic acid), vanillin, cancer, antioxidant activity**.**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da vanilina. 13
Figura 2 - Esquema representativo dos diferentes tipos de nanocarreadores. 17
Figura 3 - Esquema representativo dos tipos de nanopartículas poliméricas. 18
Figura 4 - Esquema representativo da formação de nanopartículas pelo método de emulsificação evaporação do solvente. 20
Figura 5 - Cromatograma representativo da absorvância (AU) em função do tempo (min) de uma solução padrão de vanilina (40 µg/ mL) em metanol: água. 33
Figura 6 - Curva analítica da vanilina em metanol:água (80:20, v/v).. 34
Figura 7 - Comparação dos cromatogramas de amostras de vanilina frente a potenciais interferentes, componentes da formulação das nanopartículas.. 35
Figura 8 - Curva analítica para cálculo dos limites de detecção e quantificação da vanilina.. 38
Figura 9 - Perfil de distribuição do tamanho das nanopartículas PLA contendo vanilina. 43
Figura 10 - Espectro de FT-IR das amostras de vanilina pura (Vanilina), da mistura física de PLA e vanilina (PLA-Vanilina), nanopartículas de PLA vazias (Nano PLA) e nanopartículas de PLA contendo a vanilina encapsulada (Nano PLA-Vanilina). 45
Figura 11 - Difratogramas de raio-X da vanilina, nanopartículas vazias de PLA (Nano PLA) e nanopartículas de PLA contendo vanilina (Nano PLA-Vanilina). 47
Figura 12 - Curva de DSC (fluxo de calor x temperatura) e TG (massa x temperatura) 49
Figura 13 - Micrografias das nanopartículas de PLA contendo vanilina obtidas através de MEV-FEG: a) aumento de 14,6k x; b) aumento de 27,1k x. 51
Figura 14 - Perfil de liberação da vanilina a partir das nanopartículas de PLA em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4 contendo PVA 1% (p/v) a 37ºC. 52
Figura 15 - Estabilidade das nanopartículas de PLA contendo vanilina em função do tempo quanto ao: a) diâmetro médio; b) índice de polidispersão e c) potencial zeta. 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições cromatográficas do método de quantificação da vanilina por CLAE. . 33
Tabela 2 - Resultados da exatidão para os padrões de vanilina (n=4). 36
Tabela 3 - Resultados dos testes de precisão intra-corrida e inter-corrida para amostras de vanilina (n=4). 37
Tabela 4 - Resultados de robustez de diferentes concentrações de vanilina frente a variações do método (n=3). 39
Tabela 5 - Eficiência de encapsulação das nanopartículas de PLA contendo vanilina 41
Tabela 6 - Diâmetro médio e do índice de polidispersão das nanopartículas de PLA contendo vanilina, dispersas em água (n=10)..... 42
Tabela 7 - Potencial zeta das nanopartículas preparadas na ausência ou na presença de vanilina, dispersas em água (n=3)..... 44
Tabela 8 - Análise cinética da liberação de vanilina a partir de nanopartículas de PLA em tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 7,4) contendo PVA 1%..... 53
Tabela 9 - Teor de vanilina contida nas nanopartículas de PLA após três meses de armazenamento (n=3). 57
Tabela 10 - Porcentagem de inibição do radical $ABTS^{\bullet+}$ obtida pelas diferentes concentrações do fármaco livre e das nanopartículas de vanilina, em 0, 24, 48, 72 e 96 horas. 58
Tabela 11 - IC50 da vanilina livre e da vanilina encapsulada nas nanopartículas de PLA demonstrado sobre a captura do radical $ABTS^{\bullet+}$ em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4, λ = 734nm..... 60

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 11
2 REVISÃO DA LITERATURA 13
2.1 Vanilina 13
2.2 Nanotecnologia 16
2.3 Nanopartículas poliméricas 17
3 OBJETIVOS 21
3.1 Objetivo geral 21
3.2 Objetivos específicos 21
4 MATERIAIS E MÉTODOS 22
4.1 Substâncias e reagentes 22
4.2 Equipamentos e acessórios 22
4.3 Metodologia analítica 23
4.3.1 Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE para análise quantitativa da vanilina nas nanopartículas 23
4.3.2 Condições cromatográficas 23
4.3.3 Preparação das soluções-padrão e amostras 23
4.3.4 Validação do método cromatográfico 24
4.4 Obtenção das nanopartículas de PLA contendo vanilina 25
4.5 Caracterização físico química das nanopartículas 26
4.5.1 Eficiência de encapsulação 26
4.5.2 Análise do diâmetro médio e índice de polidispersidade 27
4.5.3 Potencial zeta 27
4.5.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourrier (FTIR) 27
4.5.5 Difração de Raio-X 27
4.5.6 Calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria 28
4.5.7 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo 28
4.5.8 Ensaio de liberação *in vitro* 28
4.6 Estudo de estabilidade 30
4.7 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* 30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 32
5.1 Desenvolvimento e validação da metodologia analítica 32
5.1.1 Condições cromatográficas 32

5.1.2 Linearidade 34
5.1.3 Especificidade 34
5.1.4 Exatidão 36
5.1.5 Precisão 36
5.1.6 Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) 37
5.1.7 Robustez 38
5.2 Obtenção das nanopartículas de PLA contendo vanilina 39
5.3 Caracterização das nanopartículas obtidas 40
5.3.1 Eficiência de encapsulação 41
5.3.2 Diâmetro médio e índice de polidispersão 42
5.3.3 Potencial zeta 43
5.3.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourrier 44
5.3.5 Difração de raio-X 46
5.3.6 DSC e TG 48
5.3.7 Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo 51
5.3.8 Liberação *in vitro* 51
5.4 Estudo de estabilidade 54
5.5 Atividade antioxidante *in vitro* 57
6 CONCLUSÕES 61
7 REFERÊNCIAS 62

1 INTRODUÇÃO

Dentre as doenças emergentes, o câncer tem se destacado como um evidente e grave problema de saúde pública tanto em países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento, sendo responsável por altas taxas de mortalidade e morbidade.

O estresse oxidativo ocasionado pelo excesso de espécies radicalares é responsável pela promoção de efeitos como a peroxidação dos lípidos, a agressão às proteínas de tecidos e membranas, danos ao DNA e enzimas. Portanto, estas espécies reativas podem estar relacionadas com diversas patologias, como a artrite, choque hemorrágico, doenças coronárias, catarata, doenças degenerativas do cérebro relacionadas com a idade, bem como com o surgimento do câncer (APAK et al., 2007). Neste sentido, os efeitos benéficos de compostos com capacidade antioxidante têm importante papel na prevenção e tratamento de doenças nas quais o estresse oxidativo esteja envolvido, atuando sobre a diminuição da expressão de radicais livres.

Dentre estes compostos, a vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído), principal constituinte dos grãos de baunilha, dos quais foi isolada em 1816 das favas da orquídea *Vanilla planifolia*, sendo sua estrutura determinada em 1874 (WALTON, MAYER e NARBAD, 2003; LI e ROSAZZA, 2000), tem ganho destaque para aplicação na área médica pelo fato de apresentar diversas propriedades farmacológicas relatadas, dentre estas, o potencial quimiopreventivo, atividade antimutagênica, inibição de metástase, propriedade antibacteriana, antiinflamatória, antioxidante e vem sendo estudada também para o tratamento da anemia falciforme (ALI et al., 2012; AKAGI et al., 1995; FITZGERALD et al., 2004; TAI et al., 2011; WU et al., 2009; ABRAHAM et al., 1991).

Embora a vanilina possua um grande potencial terapêutico, tendo em vista as inúmeras propriedades farmacológicas que possui, sua efetividade é limitada devido a sua baixa biodisponibilidade oral, em média 7,6 %. Isso está associado a sua extensa metabolização e degradação no trato gastrointestinal, onde a vanilina sofre oxidação e é transformada em ácido vanilínico. Além disso, possui um curto tempo de meia-vida e é uma molécula com baixa solubilidade aquosa (SAMMONS e WILLIAMS, 1941; BEAUDRY et al., 2010; TRAPERO et al., 2007).

A utilização de carreadores nanoestruturados para veiculação de moléculas constitui uma estratégia promissora para contornar problemas relacionados a baixa biodisponibilidade e solubilidade de fármacos (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Neste contexto, a aplicação da nanotecnologia farmacêutica refere-se ao uso de estruturas e sistemas na escala nanométrica para o carregamento de fármacos visando a otimização da ação farmacológica. A administração de partículas de fármacos em tamanho nanométrico possui uma gama de características únicas que podem levar a um desempenho melhorado. As nanopartículas poliméricas são um dos tipos de carreadores nanoestruturados que possuem como características: melhorar as propriedades biofarmacêuticas e farmacocinéticas de fármacos, diminuir efeitos colaterais, prolongar o tempo de liberação destes no organismo, aumentar a estabilidade e eficácia terapêutica e possibilitar o direcionamento de fármacos a um sítio específico (DEVALAPALLY, CHAKILAM e AMIJI, 2007; FARAJI e WIPF, 2009).

A técnica de emulsificação evaporação do solvente foi a primeira metodologia desenvolvida para a formação de nanopartículas poliméricas e ainda hoje é amplamente aplicada (RAO e GECKELER, 2011). Vários são os polímeros que podem ser utilizados para o preparo das nanopartículas poliméricas, o poli (ácido-lático) (PLA) é um dos polímeros sintéticos mais empregado devido à características de biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de ser aprovado para o uso humano pelo órgão governamental regulatório *Food and Drug Administration* (FDA) (KUMARI, YADAV e YADAV, 2010).

Assim, este trabalho tem como objetivo desenvolver nanopartículas poliméricas de PLA contendo vanilina, visando à melhoria das suas propriedades biofarmacêuticas e farmacocinéticas, na busca do aproveitamento de seu potencial terapêutico no tratamento de doenças nas quais o estresse oxidativo esteja envolvido.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Vanilina

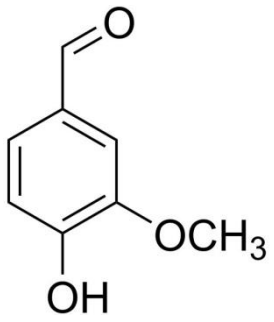
A vanilina, quimicamente conhecida como 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído, é o principal constituinte dos grãos de baunilha, dos quais foi isolada em 1816 das favas da orquídea *Vanilla planifolia*, sendo sua estrutura determinada em 1874 (WALTON, MAYER e NARBAD, 2003; LI e ROSAZZA, 2000). A vanilina é encontrada na concentração de 1 a 2% (p/p) nos grãos de baunilha e contribui para 1/3 do sabor de baunilha, enquanto que outros compostos voláteis e não-voláteis contribuem com os 2/3 restantes (SINHA, SHARMA e SHARMA, 2008).

A vanilina é um dos principais aromatizantes, sendo largamente utilizado em alimentos, perfumes, bebidas e fármacos (CLARK, 1990).

Apresenta-se como um pó cristalino branco-transparente, cuja fórmula molecular é $C_8H_8O_3$ e a massa molecular 152,15 g/mol. Seu ponto de fusão é de 80 a 82 ºC e o ponto de ebulição 285 ºC. A solubilidade em água da vanilina é de 1 grama em 100 mL e sua densidade é 1,056 g/mL (SINHA, SHARMA e SHARMA, 2008).

Segundo Lomascolo et al . (1999), aproximadamente 1% da vanilina produzida por ano é extraída da planta sendo o restante sintetizada, já que o custo para isso é bem menor do que o da extração natural. Sinteticamente a vanilina era produzida inicialmente a partir do eugenol com altas taxas de rendimento, porém o alto consumo de reagentes levou à síntese a partir da lignina (HOCKING, 1997). Nos últimos anos, a maior parte da vanilina produzida sinteticamente se dá pelo uso do guaiacol e p-cresol, precursores derivados do petróleo e oriundos da indústria petroquímica (MUKHOPADHYAY, 2005).

Figura 1 - Estrutura química da vanilina.



Vários estudos indicam que a vanilina exibe inúmeras propriedades farmacológicas interessantes para a aplicação na área médica, dentre estas, o potencial quimiopreventivo, atividade antimutagênica, inibição de metástase, propriedades antibacteriana, antiinflamatória, antioxidante e vem sendo estudada também para o tratamento da anemia falciforme (ALI et al., 2012; AKAGI et al., 1995; FITZGERALD et al., 2004; TAI et al., 2011; WU et al., 2009; ABRAHAM et al., 1991). Por apresentar várias atividades farmacológicas relatadas, é considerada uma molécula nutracêutica. As atividades farmacológicas e biológicas que a vanilina possui são verificadas em vários estudos.

Sua atividade antifúngica contra fungos e leveduras que causam a deterioração dos alimentos foi reportada em purê de frutas, sistemas de ágar a base de frutas e refrigerantes (FITZGERALD et al., 2005; LÓPEZ-MALO e ALZAMORA, 1995). Provavelmente esta atividade esteja relacionada com a fração fenólica da molécula, cuja ação antimicrobiana é conhecida desde 1800, quando o cirurgião Joseph Lister utilizou fenol para reduzir infecção em incisões cirúrgicas. O fenol e seus derivados lesam as células microbianas pela alteração da permeabilidade seletiva da membrana citoplasmática causando uma perda das substâncias intracelulares vitais (FITZGERALD et al., 2005). Sua ação contra *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, causadores de doenças graves, também tem sido descrita (BOONCHIRD e FLEGEL, 1982).

A atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* e *Listeria innocua* bem como contra *Pseudomonas Pseudomonas*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Subfava Staphylococcus* e *Bacillus megaterium* foi testada por meio de bases de Schiff obtidas de derivados da vanilina (FITZGERALD et al., 2004; VAGHASIYA et al., 2004), porém muitos desses resultados são inconclusivos e não foi possível a determinação de uma concentração mínima inibitória de vanilina que atua como agente antimicrobiano.

Destaque especial pode ser dado a sua atividade antioxidante devido a capacidade de interagir e captar radicais livres, responsáveis pelos processos oxidativos, gerados pelo nosso corpo. Neste contexto, Kumar et al. (2004) demonstraram que a vanilina pode inibir as reações mediadas por peroxinitrito, que *in vivo* leva à oxidação e nitração de lipídios, DNA e proteínas. Kamat et al. (2000) verificaram a capacidade de proteção da vanilina contra danos oxidativos induzidos pela fotossensibilização provocados nas membranas de células, utilizando mitocôndrias de fígado de rato como sistemas modelo. A vanilina mostrou-se capaz de proteger o DNA contra quebras de fitas induzidas por espécies reativas de oxigênio, como oxigênio singlete e contra danos ao DNA de linfócitos periféricos induzidos pelo peróxido de

hidrogênio (KUMAR, PRIYADARSINI e SAINIS, 2002; LIU e ZHENG, 2002). Nos alimentos, sua atividade é relatada por inibir a auto-oxidação da gordura do leite, e proteger outros alimentos contra a oxidação (MYKOLAIIVNA e PETRIVNA, 2005).

Quanto a sua atividade antimutagênica e anticarcinogênica, Akagi et al. (1995) verificaram que a vanilina foi capaz de inibir a carcinogênese de intestino delgado e pulmão, em ratos, além de inibir a mutagênese induzida, tanto em bactérias quanto células de mamíferos (KING et al., 2007). Em cultura de células, a vanilina suprimiu aberrações cromossômicas induzidas pela luz UV ou raio-X (SASAKI et al., 1990) e sugeriu-se que ela pode inibir aberrações cromossômicas induzidas por peróxido de hidrogênio, N-metil-N-nitrosoguanidina e mitomicina C (GUSTAFSON et al., 2000). Lirdprapamongkol et al. (2005) mostraram que a vanilina possui atividade anti-metastática, *in vitro* e *in vivo*, contra células de câncer de mama, pela inibição da migração celular e digestão da matriz extracelular, processos responsáveis pela invasão do câncer. Em outro estudo realizado por Liang et al. (2009) foi demonstrada a capacidade da vanilina em suprimir a atividade enzimática da matriz metaloproteinase-9 através da inibição do fator nuclear kappa B (NF-κB), relacionado com a progressão da invasão de células Hep-G2 (células de hepatocarcinoma celular). Portanto, todos estes estudos evidenciam um amplo espectro do potencial anti-cancerígeno da vanilina sugerindo sua exploração como um candidato terapêutico para esta doença.

Além destas atividades farmacológicas, outras também tem sido relatadas, porém são menos exploradas. ABRAHAM et al. (1991) demonstraram que para o tratamento da anemia falciforme a vanilina apresentou atividade *in vitro* através da ligação covalente do grupo aldeído com a hemoglobina presente nas células vermelhas do sangue. Quando utilizada como um aditivo alimentar, tem sido reconhecida pela capacidade de impedir condições como as hiperlipidemias, auxiliar no tratamento de diabetes, distúrbios cardiovasculares e obesidade (MOKSHAGUNDAM e MOKSHAGUNDAM, 2003).

Toxicologicamente a vanilina dissolvida em etanol 5% (v/v) foi testada em ratos quando administrada via intraperitoneal e oral nas doses de 150 e 300 mg/Kg e os resultados demonstraram que ela não apresentou qualquer efeito tóxico sanguíneo, renal, hepático ou cerebral nos ratos e ainda foi capaz de reduzir de maneira eficaz o efeito tóxico do etanol (HO et al., 2011). Devido essa baixa toxicidade, a vanilina é reconhecida como segura para o uso humano pelo FDA (WALTON, MAYER e NARBAD, 2003).

Quanto ao perfil farmacocinético, a vanilina apresenta uma baixa solubilidade aquosa o que colabora para sua baixa biodisponibilidade oral que é em média 7,6%, possui também um curto tempo de meia-vida. Sua molécula sofre extensa metabolização e degradação no

trato gastrointestinal, sendo transformada em ácido vanilínico por meio de um processo de oxidação. Todas estas características limitam a efetividade e o grande potencial terapêutico da vanilina (SAMMONS e WILLIAMS, 1941; BEAUDRY et al., 2010; TRAPERO et al., 2007).

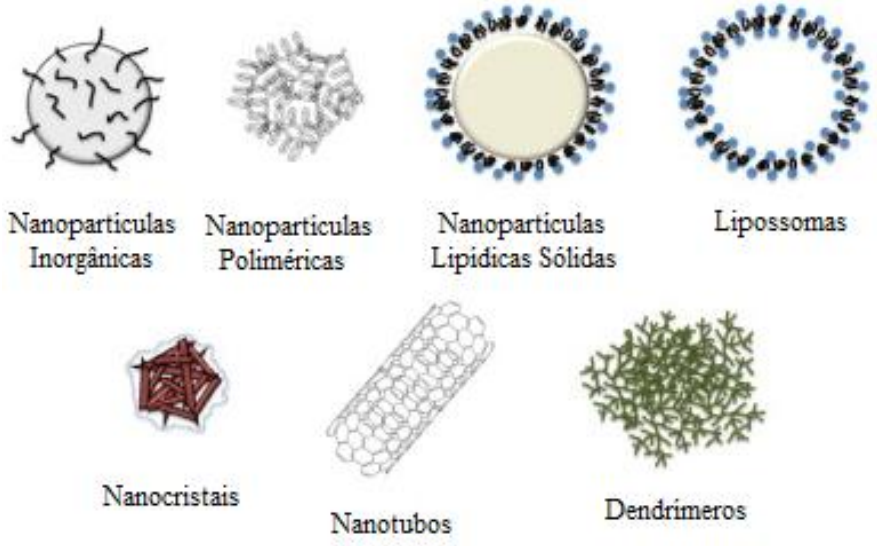
2.2 Nanotecnologia

A nanotecnologia envolve o estudo, desenvolvimento e aplicação de estruturas e sistemas na escala nanométrica (um bilionésimo do metro). Nesta escala, as propriedades físicas dos elementos podem ser modificadas uma vez que ocorre um aumento significativo em sua relação área-superfície, logo a nanotecnologia explora os fenômenos e as propriedades únicas e específicas que a matéria passa a apresentar na nanoescala (POOLE e OWENS, 2003; ROSSI–BERGMANN, 2008). Está presente em diversas áreas do conhecimento, desde a química, farmácia, biologia, medicina até as engenharias e agricultura, por isso é caracterizada como uma ciência multidisciplinar (FERNANDES e FILGUEIRAS, 2008).

O marco inicial da nanotecnologia é apontado como um discurso proferido pelo físico Richard Feynman em 1959, durante o encontro anual da Sociedade Americana de Física. Os primeiros nanocarreadores para fins farmacêuticos propostos foram os lipossomas em 1974 por Gregoriadis et al. (1974), desde então, houve um crescente avanço no número de nanodispositivos para a liberação de fármacos, produzidos principalmente a partir de lipídios ou polímeros e sua aplicação nas diversas áreas biomédicas como biossensores, biomarcadores e imagens moleculares (SAHOO e LABHASETWAR, 2003; COUVRER e VAUTHIER, 2006; EMERICH e THANOS, 2006).

A nanotecnologia farmacêutica, especificamente, refere-se a aplicação de nanoestruturas para o carregamento de fármacos visando a otimização da ação farmacológica, princípio básico das novas terapias medicamentosas. A administração de partículas de fármacos em tamanho nanométrico possui uma gama de características únicas que pode levar a um desempenho melhorado em uma variedade de formas de dosagem. Tem como objetivos principais proporcionar melhora nas propriedades biofarmacêuticas e farmacocinéticas de moléculas ativas, diminuir efeitos colaterais, prolongar o tempo de liberação de fármacos no organismo, aumentar a estabilidade e eficácia terapêutica e direcionar fármacos a um sítio específico (DEVALAPALLY, CHAKILAM e AMIJI, 2007; FARAJI e WIPF, 2009).

Figura 2 - Esquema representativo dos diferentes tipos de nanocarreadores (Adaptado de FARAJI e WIPF, 2009).

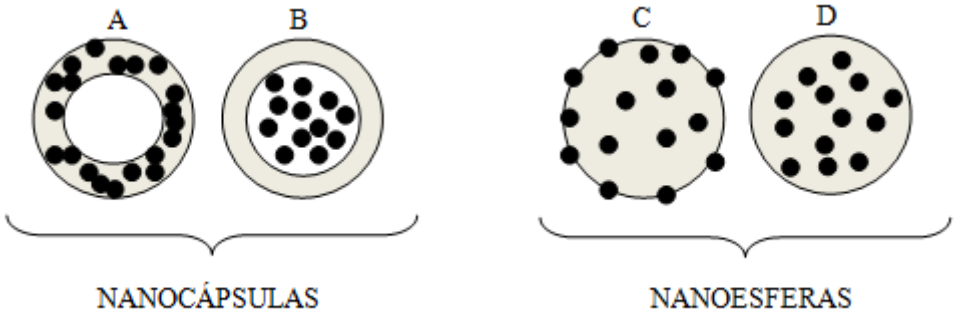


Os nanocarreadores de fármacos podem apresentar diferentes tipos de arranjos estruturais, bem como serem obtidos a partir de diferentes matérias-primas. Sendo assim se destacam na nanotecnologia farmacêutica as nanopartículas poliméricas, nanopartículas inorgânicas, nanopartículas lipídicas sólidas, lipossomas, nanocristais, microemulsões, nanotubos, dendrímeros, nanoparticulas magnéticas, nanopartículas conjugadas (figura 3), entre outras (SINGH e LILLARD, 2009). Várias formulações empregando nanotecnologia no desenvolvimento já estão sendo comercializadas com sucesso no mercado e outras passam por ensaios clínicos.

2.3 Nanopartículas poliméricas

Nanopartículas poliméricas são uma ampla classe de nanocarreadores, definidas como sistemas transportadores coloidais sólidos, com diâmetro que varia de 10 a 1000 nm, compostas por polímeros sintéticos ou naturais. Representam uma excelente alternativa tecnológica como sistema de liberação de fármacos devido a alta biocompatibilidade e biodegradabilidade, possibilidade de vetorização do fármaco ao sítio de ação pela adição de ligantes específicos à superfície das partículas, administração por diferentes vias, facilidade de controle do tamanho da partícula e das características da superfície e modulação da degradação do carreador e liberação do fármaco, através da escolha das técnicas e materiais de preparo adequados (MOHANRAJ e CHEN, 2006).

Figura 3 - Esquema representativo dos tipos de nanopartículas poliméricas. A) Nanocápsula com moléculas do fármaco adsorvido na matriz polimérica; B) Nanocápsula com moléculas do fármaco dissolvido no núcleo; C) Nanoesfera com moléculas do fármaco adsorvidas na superfície da matriz polimérica; D) Nanoesfera com moléculas do fármaco dispersas na matriz polimérica (Adaptado de SCHAFFAZICK et al., 2003).



São classificadas em dois grandes grupos de acordo com o arranjo estrutural: sistemas vesiculares ou sistemas matriciais, sendo denominadas nanocápsulas ou nanoesferas, respectivamente. O fármaco pode estar retido ou adsorvido na matriz polimérica ou dissolvido no núcleo, no caso das nanocápsulas (figura 3) (RAO e GECKELER, 2011).

Os polímeros sintéticos são preferidos para o desenvolvimento de nanopartículas devido a maior reprodutibilidade que apresentam, além de possuírem elevado grau de pureza em comparação com os polímeros naturais. Os polímeros sintéticos são poliésteres alifáticos, derivados dos ácidos acrílico e metacrílico ou derivados de cianoacrilato de alquila. Como principais exemplos de polímeros pré-formados utilizados pode-se citar a poli(ε-caprolactona), o poli(ácido-lático) (PLA), poli(ácido-glicólico) (PGA) e os copolímeros por eles formados poli(d,l-ácido-lático-co-glicólico) (PLGA). Por outro lado, como exemplos de monômeros para polimerização *in situ*, destacam-se os derivados de cianoacrilato de alquila (ANDERSON e SHIVE, 1997; JAIN, 2000).

O poliéster PLA é um polímero sintético obtido a partir do ácido lático que apresenta alto grau de transparência, alta temperatura de fusão (175ºC) e é de fácil fabricação. Possui isômeros opticamente ativos, o dextrógiro (D) e levógiro (L), ou a mistura racêmica dos dois. Uma vez que o ácido lático natural está na forma L, o isômero levógiro possui maior biocompatibilidade. A presença da cristalinidade e alto ponto de fusão dessa forma tornam-a menos susceptível a degradação do que a mistura racêmica (KULKARNI et al., 1971).

Destaca-se devido a características de biodegradabilidade e biocompatibilidade, sendo, portanto considerado atóxico para o organismo. Tem sido empregado na elaboração e nos

estudos de desenvolvimento de vários nanodispositivos, demonstrando grande relevância nesta área. Quando degradado pelo organismo gera como subproduto o ácido lático que é metabolizado em piruvato através da ação enzimática da lactato desidrogenase presente no coração, fígado e músculos. O piruvato, via ciclo de Krebs, é eliminado na forma de dióxido de carbono e água, principalmente pelos pulmões e rins (BRANNON-PEPPAS, 1995; JAIN, 2000; TOKIWA e KALABIA, 2006).

Por suas características biocompatíveis e pela longa história de segurança, o PLA é aprovado para o uso em humanos pelo FDA (KUMARI, YADAV e YADAV, 2010).

A obtenção das nanopartículas poliméricas é possível através de técnicas de preparação que podem envolver a polimerização de monômeros ou basear-se na dispersão de polímeros pré-formados (RAO e GECKELER, 2011).

A polimerização de monômeros apresenta como desvantagem o fato de poder conter moléculas residuais na formulação, produzidas a partir do processo, causando toxicidade, além da possibilidade de inativação do fármaco através de reações cruzadas que possam ocorrer e a dificuldade de controle do peso molecular do polímero formado, fatores que limitam sua utilização (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998).

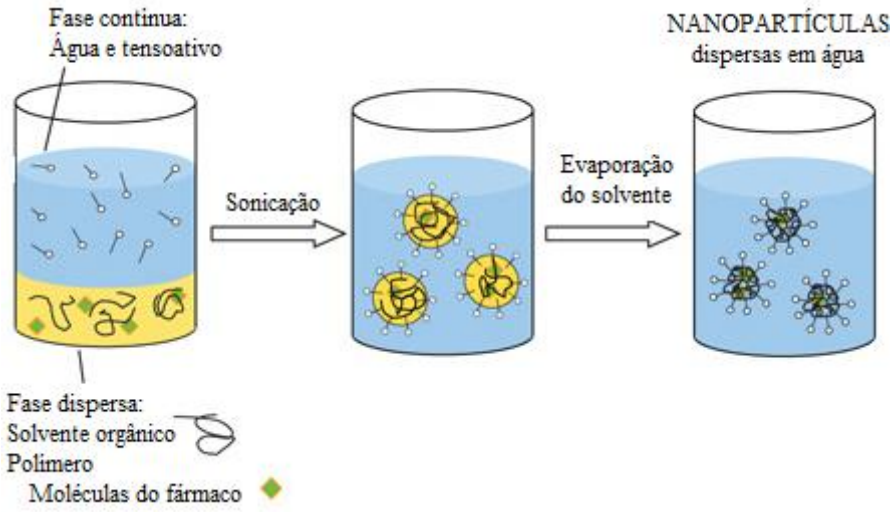
Dentro da categoria de dispersão de polímeros pré-formados, as principais técnicas são: *salting out*, emulsificação difusão do solvente, emulsificação evaporação do solvente e nanoprecipitação. De acordo com cada técnica e polímero a ser utilizado é possível a modulação das características físico-químicas das nanopartículas, morfologia, estrutura interna, eficiência de encapsulação, carga da superfície e cinética de liberação (RAO e GECKELER, 2011).

A técnica de emulsificação evaporação do solvente foi a primeira metodologia desenvolvida para a formação de nanopartículas poliméricas e ainda hoje é amplamente utilizada. É uma técnica simples onde duas principais estratégias podem ser utilizadas para o preparo, a formação de uma emulsão simples, eficiente para a encapsulação de fármacos lipofílicos e que requer uma alta energia durante o processo de homogeneização, ou de uma emulsão múltipla, utilizada para encapsular fármacos hidrofílicos (KUMARI, YADAV e YADAV, 2010; RAO e GECKELER, 2011).

De maneira geral, a técnica consiste na solubilização do polímero e do fármaco em solvente orgânico apropriado, geralmente diclorometano, clorofórmio e/ou acetato de etila que são então misturados e emulsionados em uma solução aquosa de um agente tensoativo/emulsificante por agitação de ambas as fases, a uma fonte de energia elevada, como, por exemplo, os ultrassons ou a homogeneização a alta pressão (figura 5). A emulsão é

transformada em uma suspensão de nanopartículas através da evaporação do solvente que ocorre com aumento da temperatura, sob pressão e agitação constante, induzindo a precipitação do polímero e formação das nanoesferas, nas quais o fármaco encontra-se adsorvido e/ou finamente disperso na rede da matriz polimérica. As nanopartículas são coletadas por ultracentrifugação e liofilizadas para armazenagem. Neste método, o tamanho pode ser controlado através de ajustes na taxa e tempo de agitação, tipo e quantidade do agente de dispersão, viscosidade das fases e temperatura (SOUTO, SEVERINO e SANTANA, 2012).

Figura 4 - Esquema representativo da formação de nanopartículas pelo método de emulsificação evaporação do solvente (Adaptado de SIGMA ALDRICH, 2014).



Em suma, o diâmetro reduzido das nanopartículas poliméricas e sua maior estabilidade estrutural lhes conferem inúmeras vantagens em comparação a outros sistemas que apresentam dimensões maiores ou menor estabilidade. São capazes de transpor barreiras biológicas e alcançar melhor os sítios ativos proporcionando uma maior interação com os componentes biológicos, resultado da ampliação da área superficial, destacando-se assim como eficientes nanocarreadores para a veiculação de fármacos (ALEXIS et al., 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho consiste no desenvolvimento tecnológico (obtenção e caracterização físico-química) de nanopartículas poliméricas para veiculação de vanilina e avaliação da sua atividade antioxidante *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver metodologia analítica por CLAE para a quantificação e análise da vanilina;
- Desenvolver nanopartículas de PLA contendo vanilina pela técnica de emulsificação evaporação do solvente;
- Caracterizar as nanopartículas obtidas quanto a eficiência de encapsulação, diâmetro médio, distribuição do tamanho, potencial zeta, difração de raio-X, infravermelho, DSC e perfil de liberação *in vitro*;
- Avaliar a estabilidade física das nanopartículas de PLA contendo vanilina;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* das nanopartículas contendo vanilina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Substâncias e reagentes

Vanilina (Sigma-Aldrich);
Água ultrapura (sistema Milli-Q Gradiente Millipore®, resistividade de 18,2 MΩ/cm);
Metanol (grau HPLC) (J.T. Baker);
Poli(álcool vinílico), 31000 MW, grau hidrólise 98-99% (Sigma-Aldrich);
Diclorometano (Fmaia);
Acetato de etila (P.A, Biotec®);
Dimetil sulfóxido (P.A, Biotec®);
Poli(DL-ácido láctico), 85,000 – 160,000 MW (Sigma Chemical *Co*);
Sacarose (P.A., Vetec Química Fina);
Brometo de potássio, grau espectroscópico (KBr) (Aldrich Co.);
ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolinona-6-ácido sulfônico)) (Sigma-Aldrich);
Fosfato de sódio monobásico anidro (P.A., Vetec®);
Fosfato de potássio dibásico (P.A., Biotec®).

4.2 Equipamentos e acessórios

Aparelho para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) – Waters® Alliance acoplado à um detector de Arranjo de Fotodiodo (PDA) e coluna fase reversa C18 (125mm X 4mm) de tamanho de partícula 5 μm – LiChrospher® 100 ;
Equipamento para análise do potencial zeta – Malvern nano ZS90;
Osmose reversa laboratorial – Vexer Indústria e Comércio de Equipamentos LTDA;
Balança analítica (Bel Engineering – Mod. M214A);
Pipetas monocanal (Labmate);
Leitor de microplacas (Spectra Max 190 – Molecular Devices);
Evaporador rotatório (Marconi - Ma 120);
Bomba a vácuo (Tecnal – Mod. TE 058);
Capela para exaustão de gases (Lucadema);
Ultracentrífuga refrigerada (Hermle Z36HK);
Sistema de ultrapurificação de água (MilliQ Gradiente Millipore);
Membranas filtrantes - acetato de celulose 0,22 μm e PTFE 0,45 μm – (Millipore);

Liofilizador (Terroni – Mod. LD1500);
Espectrômetro de Infravermelho (Thermo Scientific Nicolet IR200 FT-IR);
Equipamento de espalhamento dinâmico da luz (Light Scattering - Brookhaven 90 Plus);
Desruptor de células ultrasônico (Unique);
Difratômetro de Raios X (Bruker – Mod. D2 PHASER);
Espectrofotômetro UV-Vis (Jasco);
Sistema de calorimetria exploratória diferencial – T.A. Instruments, modelo SDT Q600;
Incubadora com agitação orbital (Quimis);
Microscópio eletrônico de Varredura por efeito de campo – TESCAN, MODELO Lyra3

4.3 Metodologia analítica

4.3.1 Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE para análise quantitativa da vanilina nas nanopartículas

Um método analítico apropriado e reprodutível foi desenvolvido para quantificação da vanilina através da CLAE com detecção por arranjo de fotodiodo (PDA), de acordo com as normas preconizadas na resolução vigente (ANVISA, 2003; ICH, 2005). Este método foi posteriormente utilizado para a análise da eficiência de encapsulação da vanilina nas nanopartículas poliméricas.

4.3.2 Condições cromatográficas

As análises foram realizadas utilizando o modo de eluição isocrático. O fluxo da fase móvel estabelecido foi de 1 mL/min sendo constituída por metanol e água (80:20, v/v). O volume de injeção foi de 50 µL e a leitura foi realizada em 230 nm. O tempo de corrida foi de 4 min, a temperatura da coluna de 30 ºC e da amostra 25 ºC.

4.3.3 Preparação das soluções-padrão e amostras

Uma solução padrão estoque de vanilina (1 mg/mL) foi preparada em uma mistura de metanol/água (80:20, v/v) e as diluições posteriores foram realizadas para se obter oito diferentes concentrações de soluções-padrão que foram utilizadas para a construção da curva analítica (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 µg/mL), todas em triplicata. Similarmente, cinco

soluções padrão (0,4; 0,6; 0,8; 1; 2 μg/mL) foram obtidas para determinar o limite de quantificação (LQ) e o limite de detecção (LD). Todas as amostras também foram diluídas em metanol/água (80:20, v/v) para a leitura. Antes da injeção, os padrões e as amostras foram filtradas através de um filtro com uma membrana de acetato de celulose de tamanho de poro de 0,22 μm.

4.3.4 Validação do método cromatográfico

O método cromatográfico foi validado de acordo com os parâmetros de especificidade, linearidade, exatidão, precisão, robustez, limite de quantificação e limite de detecção estabelecidos na Resolução nº 899 de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, e recomendações do *ICH topic Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, ICH (2005).

A especificidade foi avaliada por comparação dos cromatogramas representativos de soluções padrão de vanilina com os cromatogramas do sobrenadante resultante da produção de nanopartículas vazias (sem vanilina), com o objetivo de averiguar se haveria interferência de algum dos excipientes utilizados na formulação das nanopartículas no mesmo tempo de retenção da vanilina.

A linearidade foi determinada através da construção de uma curva analítica com cinco soluções padrão (n=3) de concentrações diferentes de vanilina (10, 20, 40, 60 e 80 μg/mL). Os valores obtidos correspondentes a área do pico de cada concentração serviram para o cálculo de regressão linear da equação da reta e para o cálculo do coeficiente de correlação (R).

A exatidão foi verificada a partir de 12 determinações contemplando o intervalo linear da curva analítica, ou seja, 3 diferentes concentrações de vanilina, baixa (10 μg/mL), média (40 μg/mL) e alta (80 μg/mL), com 4 réplicas cada, por meio do cálculo da porcentagem de recuperação expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (Equação 1).

Recuperação (%) = (concentração média experimental / concentração teórica) x 100 ***(Equação 1)***

A precisão foi comprovada através de análises intra-corrida (repetibilidade) e inter-corridas (precisão intermediária). Para ambas, foram utilizados padrões de vanilina nas concentrações de 10, 40 e 80 μg/mL. A precisão intra-corrida ou repetibilidade foi realizada

em um mesmo dia e em um curto espaço de tempo entre as leituras (4 réplicas cada concentração), enquanto a precisão inter-corridas ou intermediária, foi desempenhada em três dias diferentes. A precisão do método foi verificada através do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%) (Equação 2).

CV% = Desvio Padrão/Concentração média determinada x 100 ***(Equação 2)***

Para a determinação dos limites de quantificação e detecção foi necessário construir uma curva analítica com concentrações baixas de vanilina (0,4; 0,6; 0,8; 1; 2 μg/mL). A partir dos valores da inclinação da curva (*slope*) e o desvio-padrão do intercepto com eixo y obtidos, foram calculados os limites de acordo com as seguintes equações (Equações 3 e 4):

$LD = 3{,}3 \times \sigma/S$ ***(Equação 3)***

$LQ = 10 \times \sigma/S$ ***(Equação 4)***

A robustez do método foi testada de acordo com alterações na proporção da fase móvel (metanol:água 83:14 e 77:23), mudança da temperatura da coluna (25 °C) e do fluxo da fase móvel (0,95 e 1,05 mL/min). Os resultados foram expressos em porcentagem de recuperação e DPR. Para estas análises foram utilizados padrões de vanilina nas concentrações de 10, 40 e 80 μg/mL, em triplicata.

4.4 Obtenção das nanopartículas de PLA contendo vanilina

As nanopartículas poliméricas foram preparadas pela técnica de emulsificação/ evaporação do solvente (VANDERHOFF, 1979; REIS et al., 2006, RAO e GECKELER, 2011), a partir de uma emulsão simples óleo em água (O/A).

A escolha dos solventes para preparação das nanopartículas foi efetuada com base no polímero utilizado, características do fármaco e nos testes de otimização da formulação previamente realizados. Desta forma, inicialmente dissolveu-se 50 mg do polímero PLA em 1,5 mL de diclorometano e 5 mg de vanilina em 0,2 mL de dimetilsulfóxido e 0,3 mL de acetato de etila, sendo que esta solução constituiu a fase oleosa da emulsão. Esta fase oleosa foi então vertida na fase aquosa que foi constituída de 6 mL de uma solução de álcool polivinílico a 1% (p/v) e emulsionada por meio de um desruptor ultrassônico durante 6

minutos (potência 60), resultando na emulsão óleo em água (O/A) a qual foi submetida a evaporação do solvente através de rotaevaporação sob vácuo a 37ºC durante 30 min.

A dispersão de nanopartículas de vanilina resultante foi separada da vanilina não encapsulada por processo de ultracentrifugação, a 14000 rpm, 4° C, durante 30 minutos. O precipitado foi lavado uma vez com água ultrapura e o sobrenadante foi coletado para posterior análise.

Por fim, as nanopartículas foram dispersas em sacarose 5% (p/v), utilizada como crioprotetor, congeladas e posteriormente liofilizadas.

Para a análise de alguns testes de caracterização e como controle nos teste *in vitro* e *in vivo*, foram preparadas nanopartículas vazias, sem o fármaco encapsulado. O protocolo experimental foi o mesmo, sendo que a única diferença foi a não adição da vanilina na formulação.

4.5 Caracterização físico química das nanopartículas

4.5.1 Eficiência de encapsulação

A quantificação da vanilina encapsulada nas nanopartículas foi determinada pelo método indireto, através da análise do sobrenadante resultante do processo de obtenção das nanopartículas, por CLAE. Este método determina a quantidade de fármaco não encapsulado nas nanopartículas que é então subtraído da quantidade inicial.

Para isso uma alíquota do sobrenadante foi diluída (1:10) em metanol e água (80:20, v/v), filtrada em membrana de poro 0,22 μm e analisada pelo método previamente desenvolvido e validado por CLAE.

A equação 5 foi utilizada para determinar a eficiência de encapsulação (EE%):

$$EE\% = (VAN_{inicial} - VAN_{livre}) / VAN_{inicial} \times 100 \qquad \textbf{(Equação 5)}$$

Onde, $VAN_{inicial}$ corresponde a quantidade de vanilina adicionada inicialmente à formulação e, VAN_{livre} é a quantidade do fármaco resultante no sobrenadante, não incorporado à nanopartícula, quantificado por CLAE. Os valores de EE% foram expressos por média e DP.

4.5.2 Análise do diâmetro médio e índice de polidispersidade

Para determinação do diâmetro médio e índice de polidispersidade (IP) das nanopartículas foi empregada a técnica de espectroscopia de correlação de fótons também conhecida com *quase-elastic light scattering*.

Para as análises, as dispersões de nanopartículas foram diluídas em água ultrapura em cubeta apropriada e colocadas na câmara de análise, de modo que o feixe atravessasse a dispersão em toda a sua extensão. Foram realizadas 10 determinações do diâmetro médio e do índice de polidispersão, calculando-se a média e o desvio padrão. As condições de leitura no equipamento foram: ângulo de espalhamento de 90º, temperatura de 25º C e comprimento de onda do laser de 660 nm.

4.5.3 Potencial zeta

A análise do potencial zeta foi realizada por determinação da mobilidade eletroforética das nanopartículas utilizando o Zetasizer Nano ZS90 (Malvern). Previamente as amostras foram diluídas em água e colocadas na célula eletroforética onde um potencial de ±150 mV foi estabelecido.

Foram realizadas, para cada formulação, 3 determinações do potencial zeta, calculando-se a média e o desvio padrão.

4.5.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourrier (FTIR)

Os espectros de absorção no infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro de FTIR. A vanilina pura, a mistura física de vanilina/PLA e nanopartículas contendo ou não a vanilina foram analisados com o intuito de verificar a presença de interações entre os componentes da formulação. As amostras foram preparadas em pastilhas de brometo de potássio (KBr) e as leituras foram efetuadas entre 4000 e 600 cm^{-1}.

4.5.5 Difração de Raio-X

A análise da cristalografia da vanilina e das nanopartículas foi obtida por difração de raio-X (DRX). Os dados foram adquiridos por meio de um difratômetro que utilizou radiação de Cu Kα numa voltagem de 30 kV e corrente de 10 mA, λ = 1,5418 Å. A varredura de raios

X foi executada em ângulo aberto de 2θ na faixa de 10 a 70. Foram analisadas as nanopartículas contendo vanilina encapsulada e nanopartículas vazias, além do fármaco livre.

4.5.6 Calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria

Para esta análise o equipamento utilizado executou medidas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG) simultâneos. Aproximadamente 10 mg das amostras foram adicionadas em cápsulas de alumínio, aquecidas sob atmosfera de nitrogênio, de 30 a 450º C em uma velocidade de 10 º C/minuto e com vazão de 100 mL/min. Para avaliar as alterações da estrutura interna após a incorporação da vanilina nas nanopartículas, a análise foi efetuada também com a vanilina pura para comparação, e com as nanopartículas de PLA vazias.

4.5.7 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo

As amostras foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG) utilizando uma tensão de aceleração de 5,0 kV. Uma alíquota da suspensão de nanopartículas de PLA contendo vanilina foi depositada sobre o porta amostra (*stub*) e deixada secar completamente, até a formação de um filme. Os filmes obtidos foram recobertos com uma fina camada de ouro por meio de um metalizador. Micrografias foram então obtidas e analisadas com aumentos de 14 mil vezes e 27 mil vezes.

4.5.8 Ensaio de liberação *in vitro*

Para o ensaio de liberação *in vitro*, foi realizado previamente um estudo de solubilidade da vanilina no meio de liberação a ser utilizado para verificar as condições *sink* e através disso determinar a quantidade de fármaco a ser utilizada. Para isso utilizou-se o método de *shake flask* em plataforma de agitação orbital com incubadora e temperatura controlada de 37°C (MARIN, MARGARIT e SALCEDO, 2002; PARAISO, 2012). Considerando a solubilidade da vanilina em água de 10 mg/mL descrita na literatura, pesou-se 170 mg de vanilina que foram colocadas em erlemmeyer de 250 mL e dissolvidas em 20 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4 contendo PVA 1% (p/v) e mantidas sob agitação por um período de 72 h. A cada 24 horas as amostras eram verificadas e estando o fármaco aparentemente totalmente dissolvido, eram adicionadas mais 10 mg de vanilina à solução.

Após o período de 72 h as amostras foram submetidas à filtração através de membrana com poro 0,45 µm, adequadamente diluídas e analisadas pelo método analítico previamente desenvolvido e validado.

O perfil de liberação *in vitro* das nanopartículas de PLA contendo vanilina foi determinado por meio do método de dissolução e ultracentrifugação (SEIJO et al ., 1990; FONTANA et al ., 1998). Por este método, determinada quantidade de suspensão de nanopartículas contendo 1 mg de vanilina (quantidade estabelecida pelo estudo da solubilidade) foi dispersa em 5 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4 contendo PVA 1% (p/v) e separados em tubos que foram colocados em uma incubadora de agitação orbital, a temperatura de 37 ºC. Em tempos pré determinados (1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 h) os tubos foram centrifugados a 14000 rpm por 15 minutos, a 4 ºC e o sobrenadante foi coletado para posterior análise. O precipitado foi então novamente suspenso em 5 mL de tampão e incubado até o próximo tempo de análise.

A partir dos resultados calculados, obteve-se a curva do percentual cumulativo de fármaco liberado em função do tempo.

A avaliação matemática do perfil de liberação obtido foi realizada pelo ajuste dos dados experimentais ao modelo de ordem zero (Equação 6), de primeira ordem (Equação 7), segunda ordem (Equação 8), Higuchi (Equação 9) além do modelo semi-empírico de Korsmeyer-Peppas (Equação 10), através do software *MicroMath Scientist*®.

$C = kt$ ***(Equação 6)***

$C = 100\,(1 - e^{-kt})$ ***(Equação 7)***

$C = 100\,[1 - (Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t})]$ ***(Equação 8)***

$C = k\sqrt{t}$ ***(Equação 9)***

$Ft = at^{n}$ ***(Equação 10)***

Na qual:

C - percentual do fármaco dissolvido no tempo t;

k, α e β - constantes cinéticas de dissolução;

A e *B* - concentrações iniciais do fármaco que contribuem para os dois momentos de dissolução do fármaco;

Ft - fração do fármaco dissolvido no tempo t;

a - constante que mostra as características estruturais e geométricas da forma farmacêutica;

n - expoente de liberação que indica o mecanismo que essa ocorre.

4.6 Estudo de estabilidade

Para verificar a estabilidade das nanopartículas de PLA contendo vanilina, suspensões em crioprotetor (sacarose 5% - p/v) das mesmas foram armazenadas durante três meses sob duas diferentes condições de temperatura: em temperatura ambiente e à -20°C. Após cada mês, as nanopartículas foram avaliadas quanto ao diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta. O teor também foi avaliado após os três meses de armazenamento, através do método desenvolvido e validado por CLAE para quantificação da vanilina (item 4.3). Todas as análises foram realizadas em triplicata. Para análise estatística dos resultados foi utilizada ANOVA seguida do pós teste de Tukey.

4.7 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante foi analisada pelo método de descoloração do radical de 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) - ABTS descrito por Re et al . (1999). Este método baseia-se na formação de um radical ($ABTS^{\bullet+}$) gerado por oxidação do ABTS na presença de persulfato de potássio, sendo a atividade antioxidante determinada pelo grau de descoloração analisada pela absorção do cátion radical em 734 nm (RE et al ., 1999).

A solução do radical ABTS formado pela incubação de ABTS (7 mM) com persulfato de potássio (140 mM) foi estocado a temperatura ambiente na ausência de luz por 12h. Após este período, diluiu-se o radical ABTS com tampão fosfato de sódio (PBS) 10 mM, pH 7,4, até obter absorbância próxima à 0,70 em 734 nm.

Diferentes concentrações de vanilina (livre ou encapsulada) (1,95 - 31,25 µg/mL) e também amostras de nanopartículas vazias como controle negativo foram utilizadas, todas foram incubadas em tampão a 37º C. O $ABTS^{\bullet+}$ foi incubado durante 30 minutos com as amostras nos tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 h e, logo após, a complexação foi medida pelo decréscimo da absorbância em um leitor de microplacas. Todas as leituras foram realizadas em triplicata e a atividade antioxidante foi calculada como porcentagem de inibição do $ABTS^{\bullet+}$, de acordo com a equação 11.

$$\% \text{ Inibição} = \frac{(Ac - Aa)}{Ac} \times 100 \qquad \textbf{(Equação 11)}$$

Onde: *Ac* é a absorbância do controle e *Aa* é a absorbância da amostra.

Para o estudo relacionado ao IC_{50} (concentração que apresenta 50% da capacidade sequestrante total do $ABTS^{\bullet+}$), as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software OriginPro 8. A avaliação por ANOVA de via única foi realizada, seguido da análise de regressão e do teste de Tukey.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento e validação da metodologia analítica

5.1.1 Condições cromatográficas

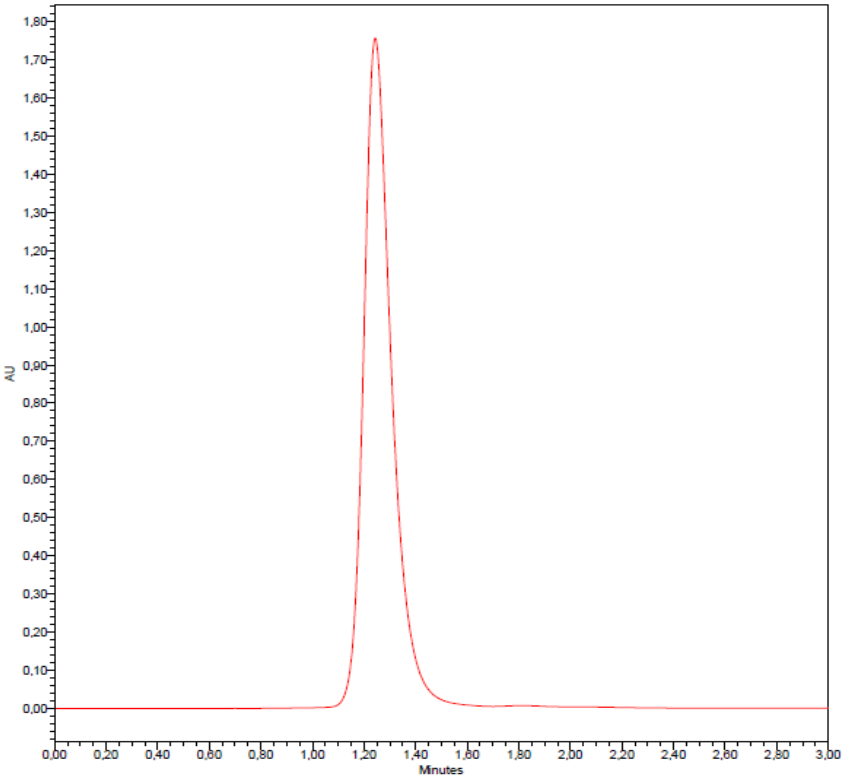
Os testes inicias para determinação das condições cromatográficas foram baseados em métodos já disponíveis para a quantificação da vanilina, sendo assim, foram testadas diferentes proporções de metanol e água como fase móvel. Testes acidificando a água também foram realizados para verificar se ocorria alguma melhora na simetria do pico, já que muitos autores empregam água acidificada com ácido acético ou ácido clorídrico misturada com metanol para esta finalidade, porém o resultado não representou melhora significativa (HERRMANN e STOCKLI, 1982; GUARINO e BROWN, 1985; VOISINE et al., 1995; LAMPRECHT, PICHLMAYER e SCHMID, 1994). Portanto, os melhores resultados foram obtidos quando utilizada a proporção metanol:água 80:20 (v/v) como fase móvel.

Outro fator que pode influenciar na simetria do pico cromatográfico é o diluente da amostra, por isso, também foram testadas diferentes formas de preparo das soluções padrão, diluindo-as somente em metanol, somente em água, ou na mesma proporção da fase móvel. Os melhores resultados foram gerados quando a amostra estava diluída na mesma proporção da fase móvel.

Desta forma, estabeleceu-se a composição e proporção da fase móvel metanol:água 80:20 (v/v) como a que gerou o pico mais estreito e simétrico (figura 5), sendo que para isso as amostras foram diluídas também na fase móvel para leitura.

Quanto ao tempo de retenção, nos métodos desenvolvidos para a quantificação da vanilina em outros trabalhos, os tempos variam de 2,20 (WALISZEWSKI, PARDIO e OVANDO, 2006) a 36 minutos (VOISINE et al., 1995), já no método desenvolvido em questão, o tempo de retenção da vanilina foi de aproximadamente 1,25 minutos para um fluxo de fase móvel estabelecido de 1 mL/min, tempo bastante curto e suficientemente maior que o volume morto da coluna que é de 0,7 minutos para este mesmo fluxo. O tempo total da corrida foi então definido como 3 minutos, levando-se em consideração o tempo de retenção de 1,25 minutos da vanilina. O comprimento de onda de 230 nm foi determinado como o mais adequado para quantificação da vanilina por ter gerado os picos de absorção máxima, garantindo maior sensibilidade ao método.

Figura 5 - Cromatograma representativo da absorvância (AU) em função do tempo (min) de uma solução padrão de vanilina (40 µg/ mL) em metanol: água. Fase móvel metanol: água (80:20), fluxo de 1 mL/min; detecção no comprimento de onda de 230 nm, temperatura da coluna de 30°C, volume de injeção de 50 µL.



A tabela 1 resume os parâmetros cromatográficos do método desenvolvido para quantificação da vanilina encapsulada nas nanopartículas.

Tabela 1 - Condições cromatográficas do método de quantificação da vanilina por CLAE.

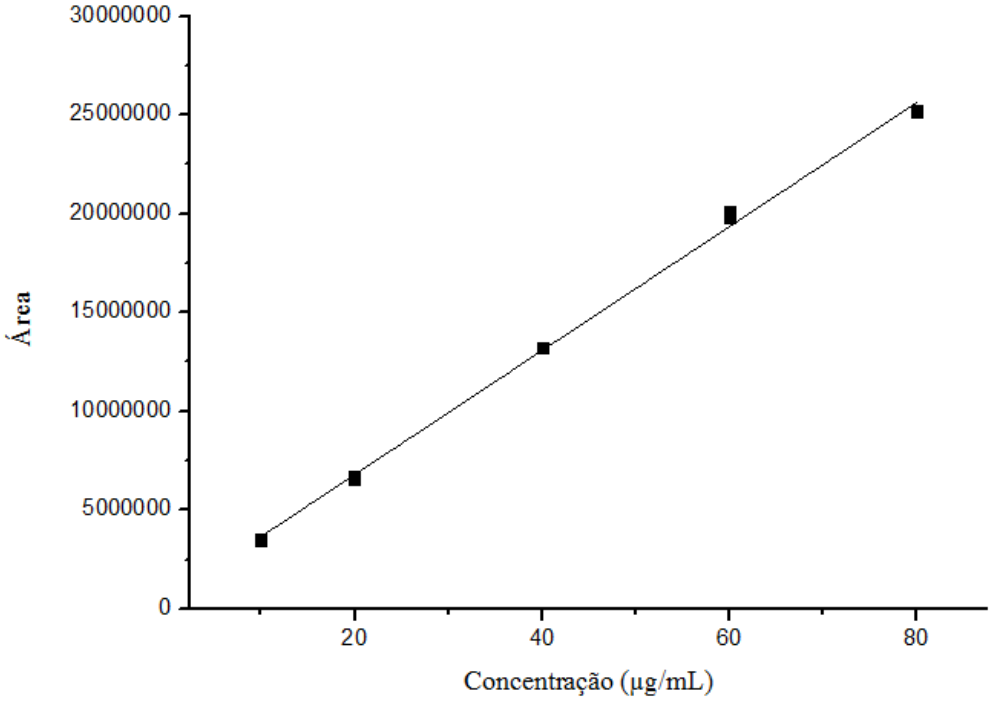
Característica	**Condições cromatográficas**
Detecção	PDA λ=230 nm
Modo de eluição	Isocrático
Fluxo da fase móvel	1 mL/min
Composição da fase móvel	Metanol:Água
Proporção da fase móvel	80:20
Volume de injeção	50 µL
Temperatura da coluna	30ºC
Coluna	Fase reversa C18 (125mmx4mm) tamanho de partícula 5µm

5.1.2 Linearidade

A linearidade do método foi determinada por meio da análise da área sob a curva de cinco soluções padrão de vanilina em função das respectivas concentrações (10, 20, 40, 60 e 80 µg/mL), a partir disto foi realizada a construção da curva analítica e obtidos os valores do cálculo da equação de regressão linear e do coeficiente de correlação (R).

A curva analítica construída (figura 6) gerou um valor do coeficiente de correlação de 0,999 bem próximo de 1, portanto, o método demonstrou-se linear no intervalo de concentração utilizado, sendo a equação da reta definida como $y = 3{,}15.10^5\ x + 4{,}49.10^5$ onde Y é a área do pico e X é a concentração da solução padrão em µg/mL. A verificação da linearidade do método garantiu a confiabilidade no uso da equação da reta para a quantificação da vanilina.

Figura 6 - Curva analítica da vanilina em metanol:água (80:20, v/v). Fase móvel metanol:água (80:20) em 230 nm (n=3). Equação da reta: $y = 3{,}15.10^5\ x + 4{,}49.10^5$.

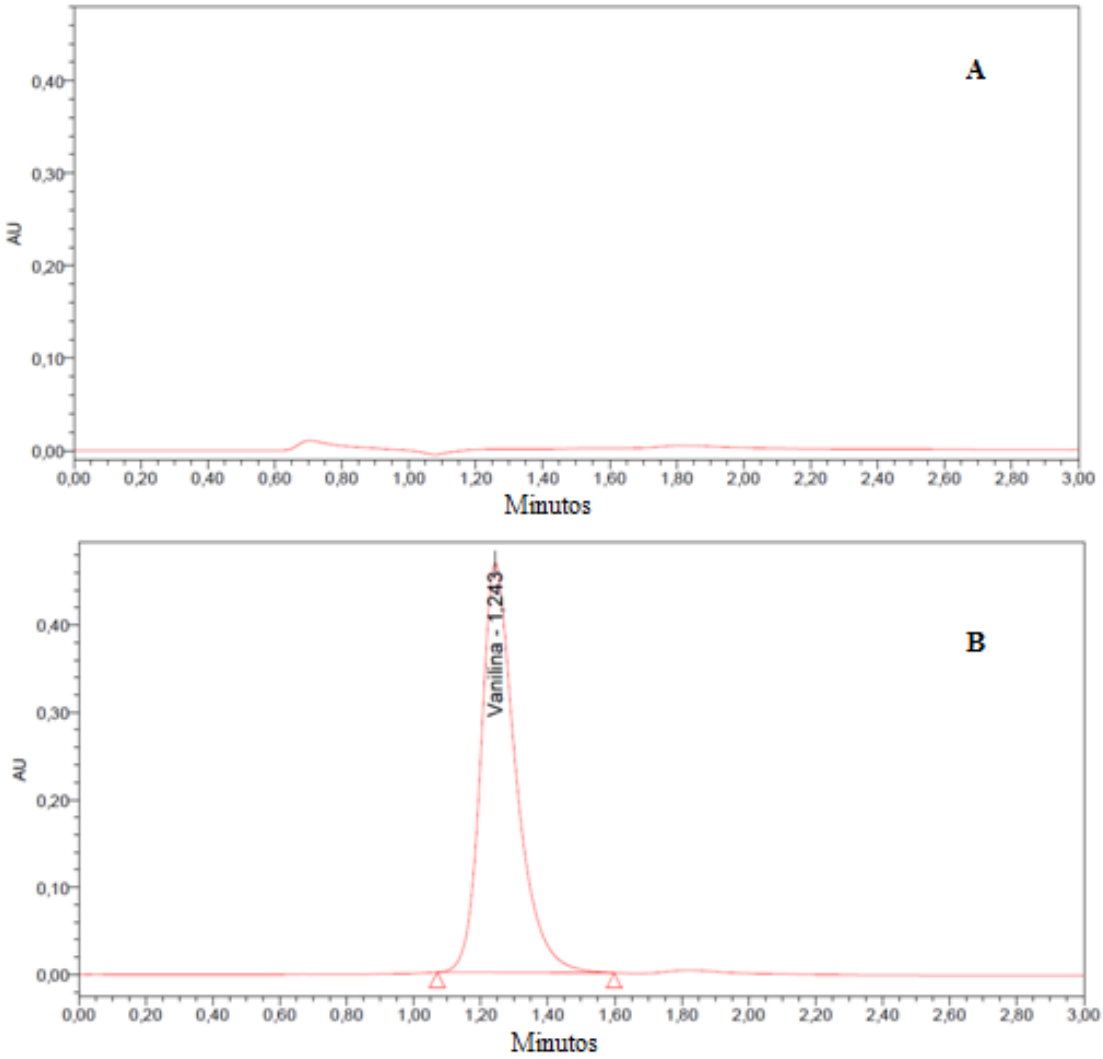


5.1.3 Especificidade

Para análise da capacidade do método de medir exatamente a vanilina em presença de outros componentes inerentes da formulação foram comparados cromatogramas de soluções

padrão de vanilina com cromatogramas obtidos a partir da leitura de sobrenadantes de nanopartículas vazias (preparadas igualmente, porém sem a adição da vanilina na formulação). O sobrenadante obtido após a centrifugação foi diluído em metanol:água (80:20, v/v) para análise. O cromatograma da solução padrão de vanilina mostrou a presença do pico representativo do fármaco no tempo de retenção de aproximadamente 1,25 minutos, já no cromatograma da leitura do sobrenadante de nanopartículas vazias não foi observado nenhum pico neste mesmo tempo de retenção (figura 7), indicando a especificidade e seletividade do método para o intuito pretendido, uma vez que não há interferência de componentes da formulação na determinação quantitativa da vanilina.

Figura 7 - Comparação dos cromatogramas de amostras de vanilina frente a potenciais interferentes, componentes da formulação das nanopartículas. Em A está representado o cromatograma do sobrenadante obtido a partir de nanopartículas vazias. Em B, cromatograma de um padrão de vanilina na concentração de 10 µg/mL.



5.1.4 Exatidão

A exatidão do método foi confirmada por meio da proximidade dos valores de concentrações obtidos nas leituras de amostras de vanilina em comparação com os valores de concentração teóricos.

Para isso, foram analisadas pelo método proposto três soluções padrão de vanilina com diferentes concentrações, com 4 réplicas cada. As concentrações utilizadas foram 10, 40 e 80 µg/mL e os resultados foram expressos como porcentagem de recuperação e desvio padrão relativo. Todas as concentrações analisadas apresentaram porcentagem de recuperação acima de 95% e abaixo de 105%, valores que demonstram a concordância entre os resultados obtidos experimentalmente e os valores teóricos. Os dados detalhados estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Resultados da exatidão para os padrões de vanilina (n=4).

Exatidão		
Concentração (µg/mL)	**Média da concentração medida (µg/mL) ± desvio padrão (DP)**	**Porcentagem de recuperação (%)**
10	9,53 ± 0,05	95,30
40	40,51 ± 0,07	101,28
80	80,04 ± 0,15	100,05

5.1.5 Precisão

A precisão é uma medida que representa os erros relativos do método e é expressa como DPR. A precisão do método foi avaliada intra-corrida (repetibilidade) e inter-corridas (precisão intermediária) em 3 dias diferentes. Três diferentes concentrações de vanilina (10, 40 e 80 µg/mL) foram preparadas em quadruplicata, analisadas e o DPR da resposta foi calculado em cada caso. Os resultados estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Resultados dos testes de precisão intra-corrida e inter-corrida para amostras de vanilina (n=4).

PRECISÃO INTRA-CORRIDA		
Concentração teórica (µg/mL)	**Média da concentração medida (µg/mL) ± DP**	**DPR (%)**
10	9,54 ± 0,07	0,72
40	40,73 ± 0,17	0,42
80	82,54 ± 0,08	0,10

PRECISÃO INTER-CORRIDA				
Concentração teórica (µg/mL)	**Média da concentração medida 1º dia (µg/mL) ± DP**	**Média da concentração medida 2º dia (µg/mL) ± DP**	**Média da concentração medida 3º dia (µg/mL) ± DP**	**DPR (%)**
10	9,54 ± 0,07	9,62 ± 0,08	9,62 ± 0,06	0,47
40	40,73 ± 0,17	41,35 ± 0,07	41,64 ± 0,06	2,58
80	82,54 ± 0,08	82,47 ± 0,23	82,60 ± 0,50	0,19

DPR: desvio padrão relativo

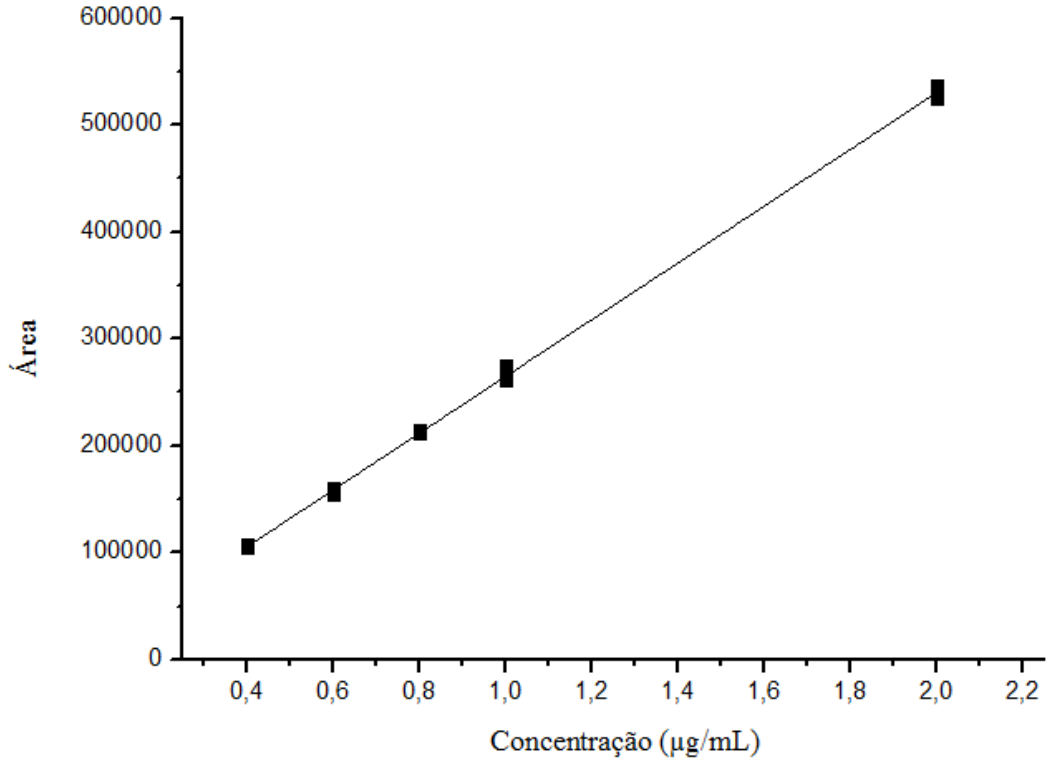
A resolução da ANVISA assim como o ICH preconiza que o DPR pode ser de no máximo 5%; valores maiores não são aceitáveis. Sendo assim, os resultados obtidos confirmam a precisão, uma vez que mesmo o maior valor de DPR obtido que foi de 2,58 % correspondente a análise inter-corrida da amostra de vanilina de concentração 40 µg/mL encontra-se dentro da faixa aceitável.

5.1.6 Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Os valores de LD e LQ foram calculados a partir do desvio padrão de resposta e do *slope* obtido a partir da regressão linear de uma curva de calibração específica (figura 8), a qual foi construída por meio da análise de soluções padrão de baixas concentrações de vanilina (0,4; 0,6; 0,8; 1; 2 µg/mL) em triplicata. O método foi linear no intervalo proposto, sendo o valor de R de 0,999. Desta forma, o LD obtido para o método desenvolvido foi de 0,0256 µg/mL e o LQ de 0,085 µg/mL, valores que denotam sensibilidade do método e confiabilidade dos resultados para análises de concentrações baixas do analito, como é o caso da quantificação de vanilina em ensaios do perfil de liberação *in vitro*. Para se confirmar o

valor do limite de quantificação obtido através da equação, uma amostra de vanilina na concentração de 0,085 µg/mL foi preparada e analisada. O resultado confirmou que foi possível tanto a detecção quanto a quantificação dessa baixa concentração.

Figura 8 - Curva analítica para cálculo dos limites de detecção e quantificação da vanilina. Fase móvel metanol:água (80:20) em 230 nm (n=3). Equação da reta $y = 2{,}65.10^5x - 2{,}15.10^2$, R = 0,999614.



5.1.7 Robustez

Foram aplicadas pequenas alterações em alguns parâmetros do método cromatográfico desenvolvido para se avaliar a capacidade do mesmo em resistir a pequenas variações que possam ocorrer durante as corridas analíticas. Alterou-se a proporção da fase móvel, o fluxo e a temperatura da coluna. Os resultados estão dispostos na tabela 4, expressos como porcentagem de recuperação.

Tabela 4 - Resultados de robustez de diferentes concentrações de vanilina frente a variações do método (n=3).

Robustez			
Modificações do método original	**Recuperação (%) ± DPR**		
	10 µg/mL	**40 µg/mL**	**80 µg/Ml**
Fluxo 1,05 mL/min	89,77 ± 2,46	93,83 ± 1,28	93,14 ± 0,32
Fluxo 0,95 mL/min	102,10 ± 0,83	104,02 ± 1,20	103,05 ± 0,40
Fase móvel Metanol: Água 77:23 (v/v)	95,51 ± 2,38	99,45 ± 1,59	98,50 ± 0,40
Fase móvel Metanol: Água 83:17 (v/v)	97,15 ± 2,43	99,56 ± 1,24	97,60 ± 0,33
Temperatura da coluna 25ºC	95,41 ± 2,29	99,63 ± 1,53	98,33 ± 0,88

DPR: desvio padrão relativo

Nota-se que a alteração da temperatura da coluna de 30 para 25 ºC, assim como a mudança da proporção da fase móvel de 80:20 (metanol:água) para 77:23 ou 83:17 e do fluxo da fase móvel de 1 para 0,95 mL/min proporcionaram valores de porcentagem de recuperação entre 95,41 e 104,02 que encontram-se dentro da faixa de aceitação, sendo o método desenvolvido considerado robusto para estas pequenas e deliberadas alterações. A única alteração para a qual o método não resistiu e apresentou valores de recuperação abaixo de 95% foi a mudança do fluxo para 1,05 mL/min.

5.2 Obtenção das nanopartículas de PLA contendo vanilina

As nanopartículas foram eficientemente obtidas a partir de polímeros pré-formados, uma vez que este é o método mais facilmente controlável e de maior rendimento (WANG, 2011). O polímero utilizado foi o PLA devido suas características de biocompatibilidade e biodegradabilidade. A técnica escolhida para a obtenção das nanopartículas foi a emulsificação evaporação do solvente, que é uma técnica amplamente utilizada pela

possibilidade de otimização das características físico-químicas das nanopartículas e pela simplicidade dos procedimentos envolvidos (WATTS, 1990).

Por meio desta técnica, foi preparada uma emulsão O/A, onde o fármaco foi adicionado juntamente com o polímero na fase oleosa da emulsão. Durante a preparação do sistema, a escolha do tensoativo é responsável pela redução da tensão interfacial, auxiliando no processo de dispersão e garantindo a cobertura adequada entre a interface aquosa e orgânica (SHAFIQ-UN-NABI et al., 2007). O tensoativo utilizado bem como sua concentração e volume adicionados, foram definidos de acordo com testes de otimização da formulação, sendo o álcool polivinílico a 1% o que apresentou os melhores resultados, tanto na capacidade de formação da emulsão, quanto nas melhores eficiências de encapsulação e menores diâmetros médios das nanopartículas.

Além do tensoativo, também foram realizados testes prévios para escolha dos solventes orgânicos utilizados para a dissolução do polímero e do fármaco. Foram testadas diferentes proporções de diclorometano com acetato de etila, diclorometano com dimetilsulfóxido e diclorometano, acetato de etila e dimetilsulfóxido.

De acordo com os resultados obtidos nestes pré testes, foi possível notar que o acetato de etila é de fundamental importância para a obtenção de partículas de tamanhos menores e com uma distribuição de tamanho mais homogênea, dados que são observados também em outros estudos como o de Mainardes e Evangelista (2005) e Freytag et al. (2000). Freytag et al. (2000) atribuem este dado ao fato da maior solubilidade aquosa do acetato de etila que acarreta uma rápida partição na fase contínua (aquosa) da emulsão e favorece a precipitação do polímero e a obtenção de partículas menores.

Desta forma, a formulação otimizada que foi utilizada para todos os demais testes teve como composição da fase oleosa 200 µL de dimetilsulfóxido, 300 µL de acetato de etila e 1,5 mL de diclorometano onde foram solubilizados 50 mg do polímero PLA e 5 mg da vanilina. A fase aquosa foi constituída de 6 mL de uma solução aquosa de PVA a 1% (p/v). De acordo com os constituintes e com o método de preparo utilizado para a obtenção das nanopartículas de PLA contendo vanilina, é possível afirmar que as nanopartículas obtidas são classificadas como nanoesferas.

Quando liofilizadas apresentaram-se macroscopicamente como um pó fino de coloração branca.

5.3 Caracterização das nanopartículas obtidas

5.3.1 Eficiência de encapsulação

As nanopartículas de PLA contendo vanilina foram caracterizadas quanto a eficiência de encapsulação por meio do método indireto de quantificação por CLAE. O resultado obtido está relacionado na tabela 5.

Tabela 5 - Eficiência de encapsulação das nanopartículas de PLA contendo vanilina (n=10).

Porcentagem da Eficiência de Encapsulação		
	Média da eficiência de encapsulação (%)	**Desvio padrão**
Nanopartículas de PLA contendo vanilina	41,11	4,19

A eficiência de encapsulação média das nanopartículas de vanilina obtidas que foi de aproximadamente 41% pode ser considerada satisfatória, uma vez que a vanilina é um fármaco que, em função das características estruturais de sua molécula, apresenta tanto regiões hidrofílicas quanto hidrofóbicas o que acaba dificultando a sua ótima encapsulação devido a possibilidade do fármaco escapar para a fase aquosa pela melhor solubilidade nesta fase (DUPEYRÓN et al., 2013).

Outros estudos também relatam eficiências de encapsulação da vanilina próximas as obtidas, quando carreada por diferentes estruturas e preparadas por diferentes métodos. Sun-Waterhouse et al. (2013) microencapsularam a vanilina utilizando a técnica de spray-drying e quatro tipos de polímeros (alginato de sódio, metil β-ciclodextrina, hidroxipropilmetilcelulose e inulina), obtendo valores de eficiência de encapsulação que variaram de 37 a 53%. Kayaci e Uyar (2011) sintetizaram inclusões sólidas de complexos de vanilina com três tipos de ciclodextrinas (α-CD, CD-β e γ-CD) que foram preparadas utilizando o método de liofilização e verificaram que a taxa de encapsulação não foi eficiente. Em outro estudo, foram preparados lipossomas contendo vanilina que apresentaram porcentagem de encapsulação de 47,5 a 50,3% (CASTAN et al., 2013).

Com isso, pode-se afirmar que o método utilizado bem como o polímero e solventes escolhidos foram eficazes em encapsular a vanilina em nanopartículas.

5.3.2 Diâmetro médio e índice de polidispersão

O tamanho e a polidispersão das nanopartículas são parâmetros fundamentais na caracterização destes sistemas coloidais, pois influenciam diretamente na dissolução, absorção e distribuição do fármaco por eles veiculados no organismo.

Para aplicação farmacêutica, tem-se interesse em nanopartículas de tamanhos menores que 300 nm e com elevada homogeneidade, para que proporcionem maior interação com os componentes biológicos e melhor estabilidade (GUPTA e KOMPELLA, 2006).

Todos os lotes preparados das nanopartículas de PLA contendo vanilina apresentaram tamanho inferior a 300 nm. Os resultados estão demonstrados na tabela 6.

Tabela 6 - Diâmetro médio e do índice de polidispersão das nanopartículas de PLA contendo vanilina, dispersas em água (n=10).

Média do tamanho (nm) ± desvio padrão	**Média do índice de polidispersão ± desvio padrão**
239,78 ± 21,14	0,073 ± 0,015

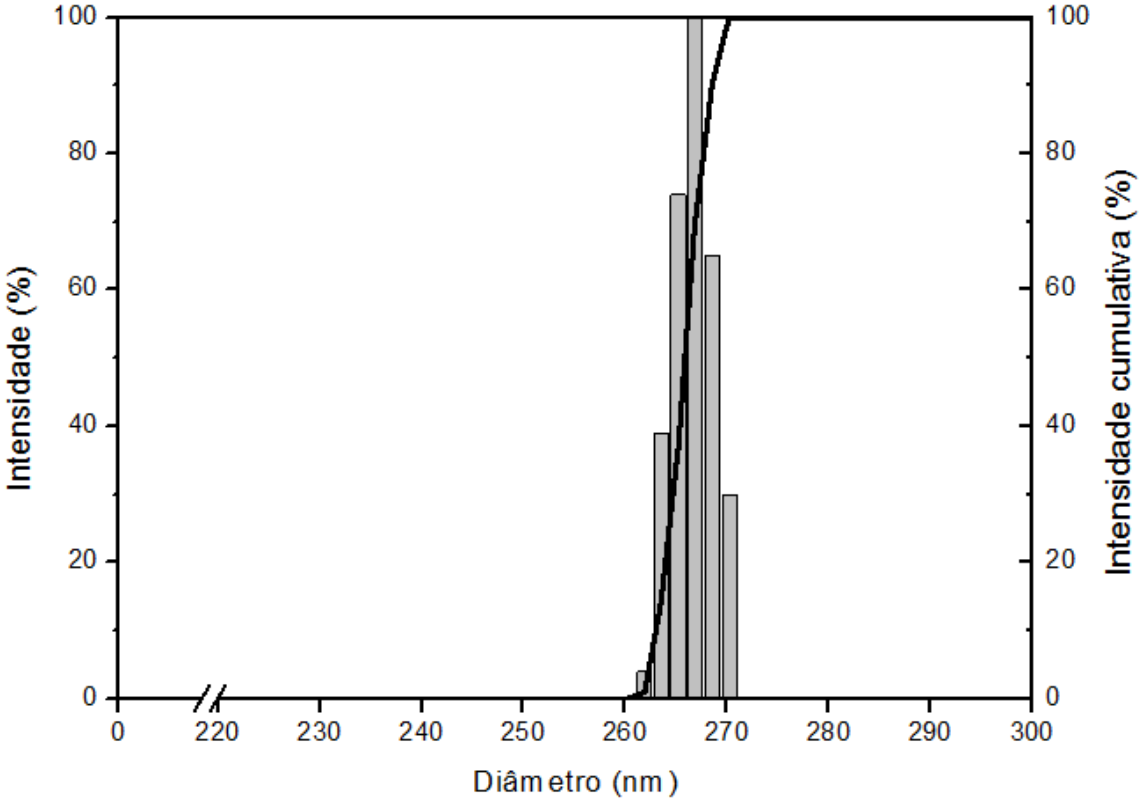
Quanto ao índice de polidispersão, importante parâmetro que avalia a homogeneidade do tamanho das partículas e que pode variar de 0 a 1, quanto mais próximo de 0 for seu valor significa que mais homogênea em relação ao tamanho estará a formulação. Isto é de extrema importância para que as nanopartículas poliméricas desenvolvidas apresentem, quando administradas no meio biológico, iguais características entre si em interagir com as membranas e células (KIM et al., 2012).

Considera-se que valores de polidispersividade entre 0,1 e 0,25 indicam uma distribuição de tamanho relativamente estreita, ao passo que valores acima de 0,5 indicam uma distribuição muito ampla de tamanho (PATRAVALE; DATE; KULKARNI, 2004). Desta forma, o baixo valor médio do índice de polidispersão obtido (0,0734 - tabela 6), indica que há homogeneidade nas nanopartículas de PLA contendo vanilina desenvolvidas. O perfil de distribuição de um dos lotes produzidos que pode ser visualizado na figura 9, demonstra a característica monomodal da distribuição do tamanho, uma vez que 100% das nanopartículas encontram-se numa mesma faixa de tamanho que variou de 261,9 a 270,2 nm. Para este mesmo lote a média do tamanho foi 259,4 nm e o índice de polidispersão 0,057.

Kwon et al. (2013) também produziram nanopartículas de um pró-fármaco da vanilina e obtiveram tamanho médio de aproximadamente 260 nm, porém com um elevado índice de

polidispersão (1,5). Já Wang et al. (2011) alcançaram um tamanho de 100 a 150 nm utilizando a quitosana como polímero para a encapsulação da vanilina em nanopartículas, contudo, como se trata de um polímero natural, não garante a biodegradabilidade e biocompatibilidade que são asseguradas pelo uso do PLA.

Figura 9 - Perfil de distribuição do tamanho das nanopartículas PLA contendo vanilina.



Desta forma, analisando os dados obtidos, foi possível verificar que as nanopartículas desenvolvidas de PLA contendo vanilina apresentaram tamanho satisfatório de acordo com o objetivo pretendido, uma vez que este tamanho foi da ordem de nanômetros e a maioria dos processos biológicos ocorrem nesta escala (SCHAFFAZICK et al., 2003). Além disso, a formulação demonstrou característica homogênea de distribuição do tamanho, indicando a efetividade e reprodutibilidade do processo de obtenção das nanopartículas.

5.3.3 Potencial zeta

O potencial zeta das nanopartículas está diretamente associado à estabilidade das mesmas quando em suspensão. Representa a carga superficial e indica a força de repulsão entre elas. O aumento do potencial zeta provoca um aumento também na força de repulsão

entre as partículas levando a formação de nanopartículas mais estáveis com uma distribuição de tamanho mais uniforme. Pode sofrer influência das mudanças na interface com o meio dispersante em função da dissociação de grupos funcionais na superfície das partículas ou da adsorção de íons presentes no meio de dispersão (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Preconiza-se que quanto mais próximo ou maior que ±30 mV for o valor do potencial zeta, mais estáveis podem ser consideradas as partículas, sendo que partículas com potencial próximo a 0 mV tendem a sofrer o fenômeno de floculação mais facilmente (MULLER, JACOBS e KAYSER, 2001).

Na tabela 7 é possível observar os resultados do potencial zeta obtidos para as nanopartículas de PLA contendo vanilina. Nota-se que a formulação desenvolvida gerou nanoesferas com uma média de potencial zeta negativo, decorrentes provavelmente da presença de grupamentos carboxílicos terminais da cadeia de PLA na parede polimérica das nanopartículas, uma vez que o PLA é caracterizado como um polímero aniônico (LEGRAND et al., 1999; NEVES et al., 2013). A diferença em módulo de 2,86 mV no potencial zeta das nanopartículas contendo o fármaco em comparação com as nanopartículas vazias, provavelmente se deve a vanilina que encontra-se adsorvida na superfície das nanoesferas, visto que a vanilina dispersa em água também apresenta um potencial negativo de -9,57 mV (n=3).

Tabela 7 - Potencial zeta das nanopartículas preparadas na ausência ou na presença de vanilina, dispersas em água (n=3).

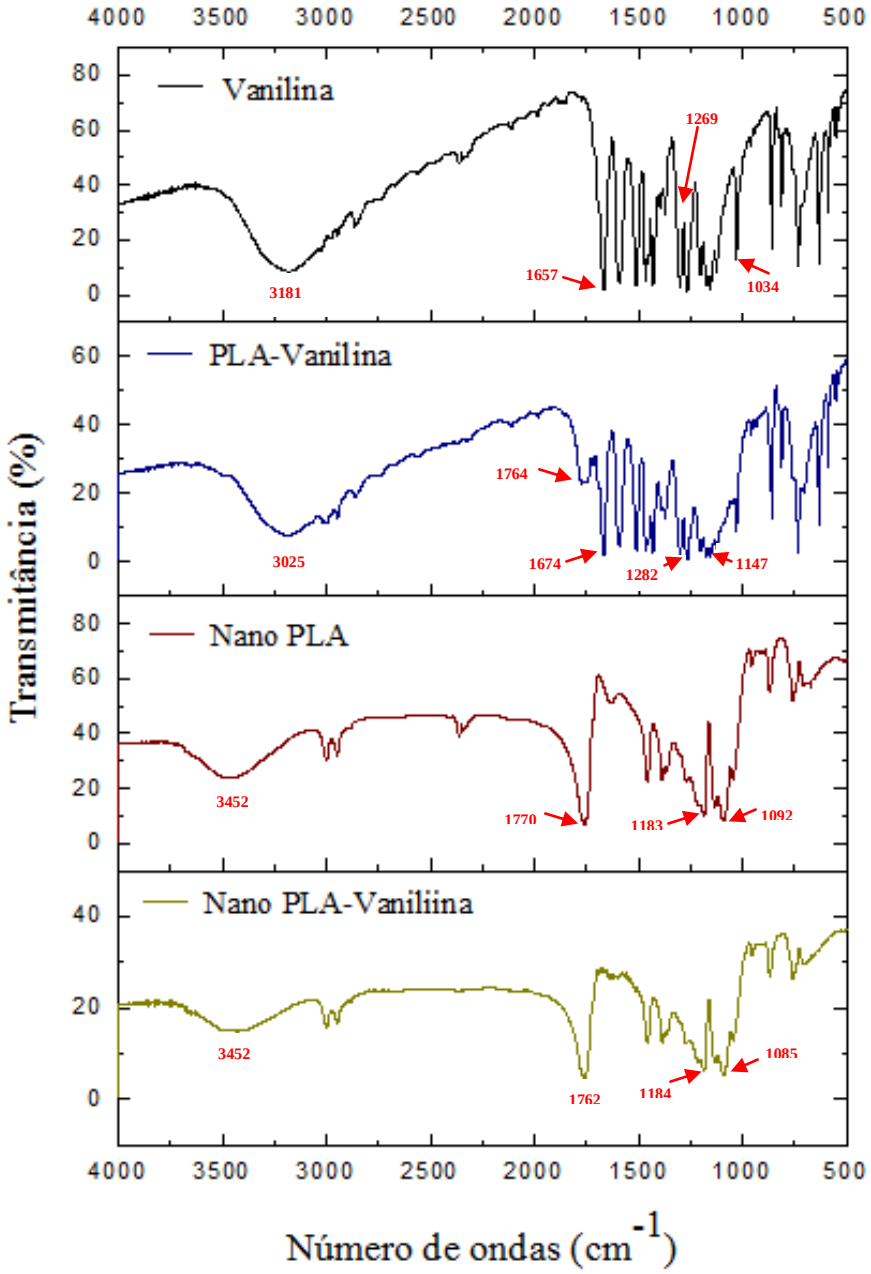
Formulação	Potencial zeta (mV) ± desvio padrão
Nanopartículas de PLA contendo vanilina	-22,66 ± 0,72
Nanopartículas de PLA vazias	-19,80 ± 0,44

Sendo assim, os valores de potencial zeta obtidos foram considerados satisfatórios por estarem mais próximos de ± 30 mV, o que dá a garantia de que as nanopartículas desenvolvidas no presente trabalho não possuem tendência a agregação e desta forma sua estabilidade física em suspensão será mantida.

5.3.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourrier

A figura 10 mostra os espectros de FTIR da vanilina, da mistura física do PLA com a vanilina, de uma formulação de nanopartículas vazias de PLA, e da formulação de nanopartículas de PLA contendo vanilina encapsulada.

Figura 10 - Espectro de FT-IR das amostras de vanilina pura (Vanilina), da mistura física de PLA e vanilina (PLA-Vanilina), nanopartículas de PLA vazias (Nano PLA) e nanopartículas de PLA contendo a vanilina encapsulada (Nano PLA-Vanilina).



A análise da vanilina pura (figura 10 - Vanilina) permitiu a verificação de quatro picos característicos, especialmente. Em 3182 cm^{-1} o pico correspondente a deformação axial da hidroxila (-OH) fenólica, em ligação de hidrogênio intermolecular; em 1657 cm^{-1} o pico característico da deformação axial da carbonila (C=O) do aldeído conjugado com o anel benzênico; e, em 1269 cm^{-1} e 1034 cm^{-1} os picos relacionados a deformação axial assimétrica e simétrica de C-O-C, respectivamente. Estes resultados obtidos corroboram com aqueles evidenciados em outros trabalhos (WANG et al., 2011; KAYACI e UYAR, 2011).

O poliéster PLA (figura 10 – Nano PLA) apresentou bandas características em 3452 cm^{-1} referente à deformação axial da hidroxila do ácido carboxílico em ligação de hidrogênio intermolecular e em 1770 cm^{-1} referente a deformação axial da carboxila (COOR) do éster e/ou do ácido carboxílico. Outros dois picos observados em 1183 cm^{-1} e em 1092 correspondem a deformação axial assimétrica e simétrica da ligação C-O-C, respectivamente.

A mistura física de PLA e vanilina (figura 10 – PLA-Vanilina) exibiu um pico em 3025 cm^{-1} que corresponde a deformação axial do OH referente tanto ao grupo fenólico da vanilina, quanto ao ácido carboxílico do PLA. Outro pico pode ser visualizado em 1764 cm^{-1} e está relacionado a deformação axial da carboxila do PLA. Em 1674 cm^{-1} a presença do pico corresponde a deformação axial da ligação C=O do aldeído conjugado com o anel benzênico da vanilina e em 1282 cm^{-1} refere-se a deformação axial assimétrica da ligação C-O-C da vanilina. O pico em 1147 cm^{-1} corresponde a deformação axial simétrica/assimétrica da ligação C-O-C referente ao PLA.

Avaliando o espectro de infravermelho das nanopartículas de PLA desenvolvidas contendo vanilina (figura 10 – Nano PLA-Vanilina), pode-se inferir que devido a baixa quantidade de vanilina em relação ao PLA é possível observar uma maior transmitância dos picos referentes aos grupamentos do PLA e por isso os picos de absorção da vanilina não ficaram evidentes.

De uma maneira geral, a análise espectral de infravermelho das amostras permitiu verificar que os picos referentes aos grupos funcionais específicos de cada componente da formulação mantiveram-se inalterados, demonstrando que não ocorreram interações moleculares durante o processo de obtenção das nanopartículas.

5.3.5 Difração de raio-X

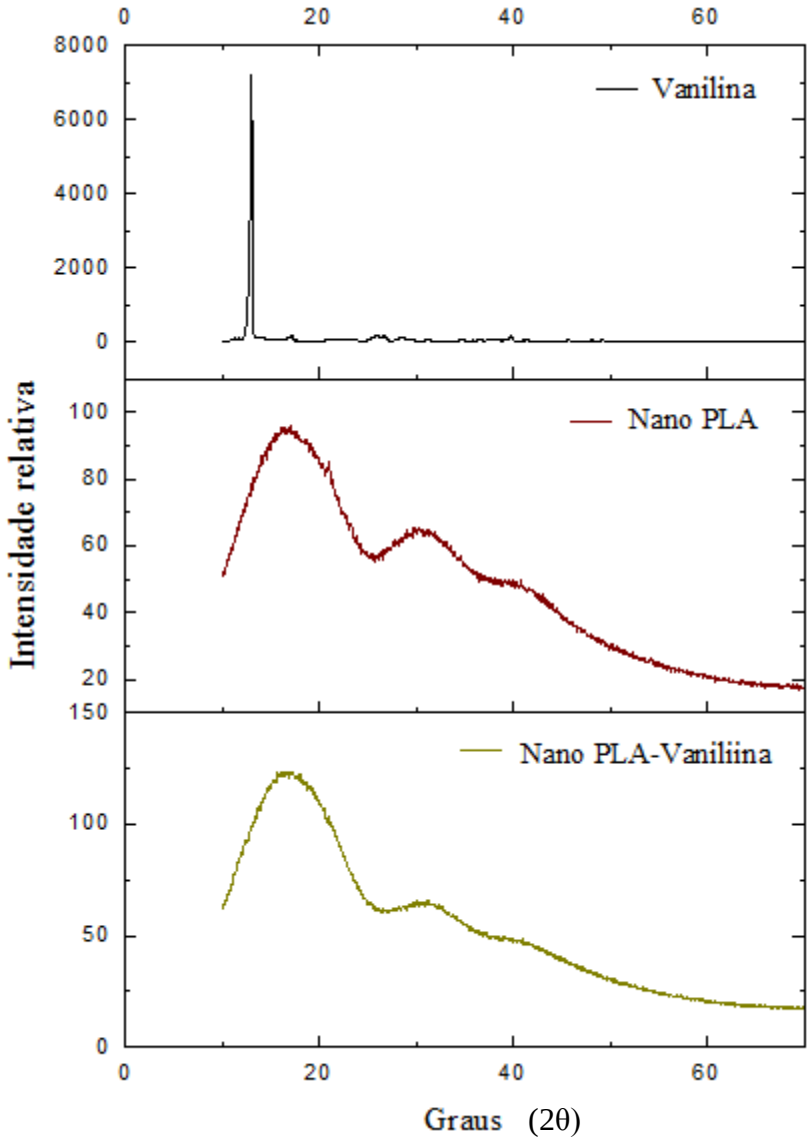
A análise de difração de raio-X permite diferenciar compostos sólidos cristalinos de compostos sólidos amorfos e sua aplicação na caracterização de nanopartículas é de grande

importância, uma vez que sólidos amorfos requerem menor energia no processo de dissolução e portanto, são mais solúveis que os cristalinos (RIEKES et al., 2011).

Os materiais cristalinos possuem um arranjo ordenado de átomos e moléculas e nos difratogramas são reconhecidos por apresentarem picos estreitos e bem definidos. Já no estado amorfo, as moléculas e átomos estão dispostas aleatoriamente e os picos observados são alargados (ESSA, RABANEL e HILDGEN, 2010; DHIRENDRA et al., 2009).

Os resultados da análise de difração de raio-X obtidos para a vanilina, nanopartículas de PLA vazias e nanopartículas de PLA contendo a vanilina estão apresentados na figura 11.

Figura 11 - Difratogramas de raio-X da vanilina, nanopartículas vazias de PLA (Nano PLA) e nanopartículas de PLA contendo vanilina (Nano PLA-Vanilina).



O difratograma correspondente a análise da vanilina pura revela a estrutura cristalina de sua forma sólida, podendo se observar um pico característico estreito e de grande intensidade em aproximadamente 13º.

Diferentemente, os difratogramas tanto das nanopartículas de PLA vazias quanto das nanopartículas de PLA contendo a vanilina apresentam picos largos e pouco intensos entre 10 e 40 º.

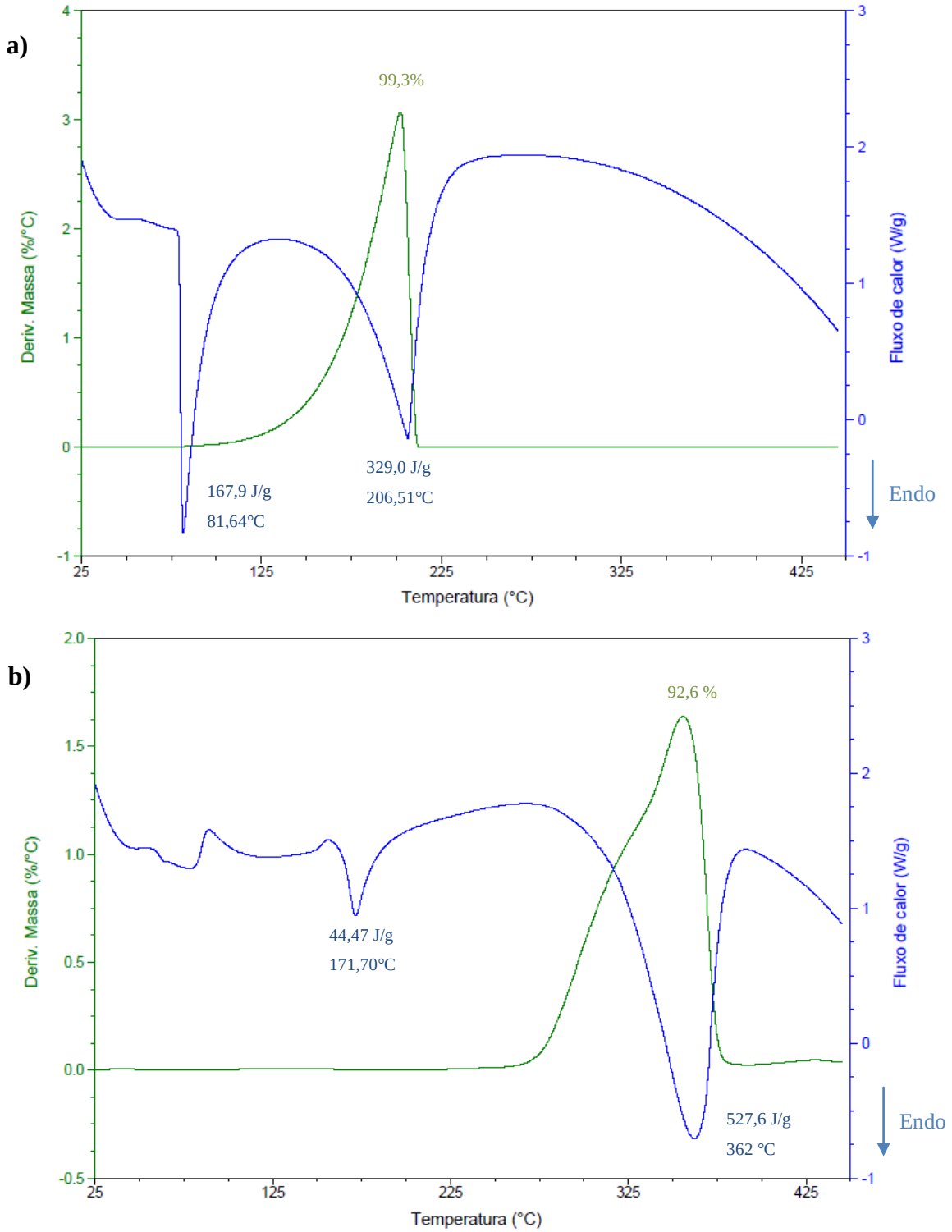
O resultado obtido para as nanopartículas desenvolvidas contendo a vanilina encapsulada demonstra que ocorreu a amorfização da vanilina, característica desejável que contribui para melhorar sua taxa de dissolução e que corrobora com outros estudos que demonstram o caráter amorfo dos sistemas nanoestruturados (JEON et al., 2000; JAIN et al., 2011; KÜRTI et al., 2011).

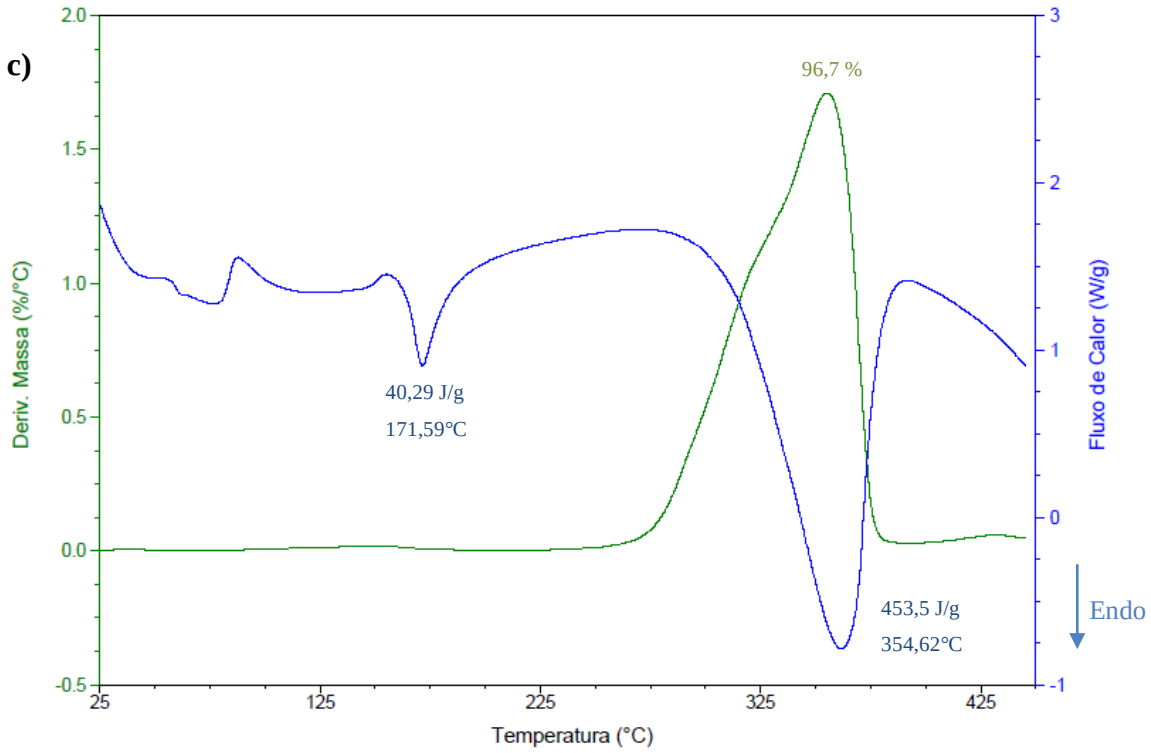
5.3.6 DSC e TG

A calorimetria exploratória diferencial é um método de caracterização complementar a difração de raio-X que pode ser utilizado para determinar características de cristalinidade dentro de nanopartículas através da análise das temperaturas de fusão e transição vítrea dos constituintes e suas entalpias associadas (GUPTA e KOMPELLA, 2006).

Os perfis termoanalíticos da vanilina pura, das nanopartículas de PLA vazias e das nanopartículas de PLA contendo vanilina estão apresentados na figura 12.

Figura 12 - Curva de DSC (fluxo de calor x temperatura) e DTG (massa x temperatura): a) vanilina pura; b) nanopartículas de PLA vazias e c) nanopartículas de PLA contendo vanilina.





A curva de DSC da vanilina pura (figura 12-a) exibiu um pico endotérmico acentuado em 81,64 ºC (ΔH = 167,9 J/g) que caracteriza o ponto de fusão da sua molécula, que varia de 80 a 82 ºC (SINHA, SHARMA e SHARMA, 2008). Resultados semelhantes a esse foram obtidos por Kayaci e Uyar (2012), Karathanos et al. (2007) e Kayaci e Uyar (2011) que relataram pico de fusão da vanilina em 82, 84 e 77 ºC, respectivamente. O outro pico endotérmico presente em 206,51 ºC (ΔH = 329,0 J/g) refere-se ao processo de decomposição da vanilina que é acompanhado pela perda de massa observada (99,3%).

As nanopartículas de PLA vazias (figura 12-b) exibiram um pico endotérmico em 171,70 ºC (ΔH = 44,47 J/g) característico do ponto de fusão do polímero que é de 175 ºC (KULKARNI et al., 1971). Outro pico endotérmico em 362 ºC (ΔH = 527,6 J/g) pode ser visualizado e caracterizado como referente à decomposição do polímero, já que a curva da TG demonstra uma perda de massa de 92,6% aproximadamente, nesta mesma temperatura.

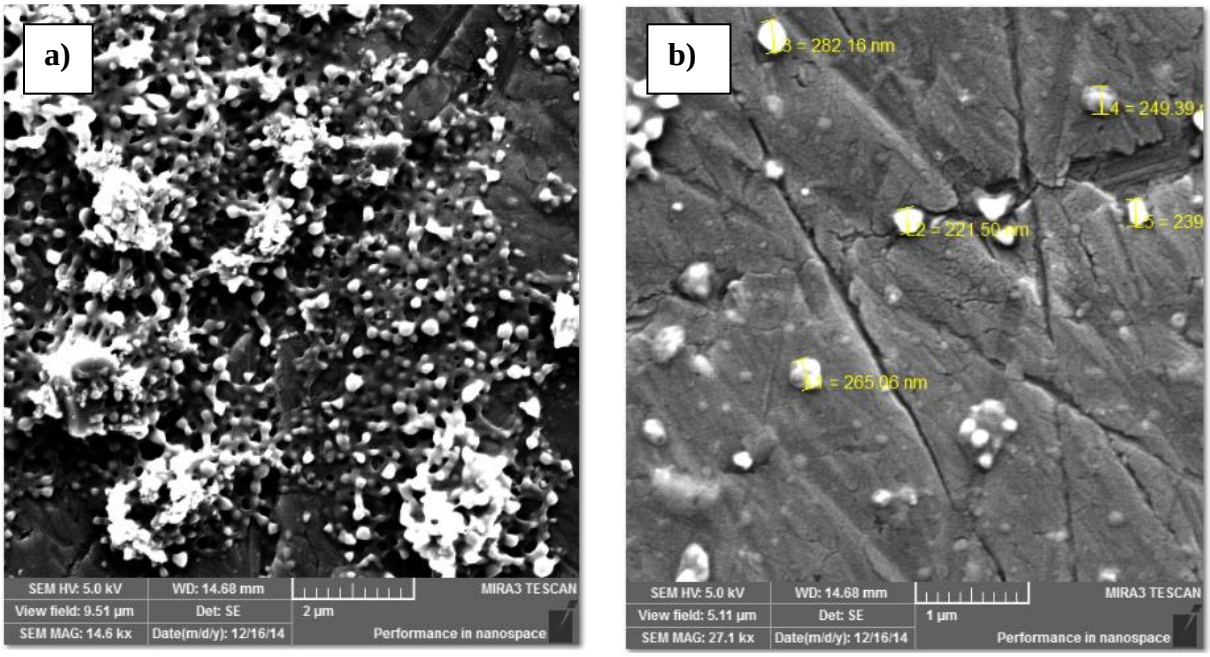
Na análise da curva de DSC das nanopartículas de PLA contendo vanilina não foi evidenciado o pico endotérmico do ponto de fusão da vanilina, indicando que o processo de nanoencapsulação tornou amorfa a vanilina dispersa na matriz polimérica, corroborando com os resultados do ensaio de difração de raio-X, que também demonstraram esta característica estrutural.

5.3.7 Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo

A técnica de micrografia é uma importante ferramenta para a análise morfológica das nanopartículas e para a confirmação do tamanho nanométrico das mesmas.

Através das imagens obtidas pela técnica de MEV-FEG, observou-se a formação de estruturas esféricas que se apresentaram de forma isolada (figura 13b) ou formando aglomerados de nanopartículas (figura 13a), que comprovam a formação de nanoesferas através do método de preparo utilizado. Na figura 13b é possível verificar que existe homogeneidade no diâmetro médio das partículas presentes na micrografia, as quais apresentaram tamanhos que variaram de 221 a 282 nm, valor que se aproxima e comprova a média do diâmetro das nanopartículas obtido na análise por espectroscopia de correlação de fótons que foi de 239,78 nm.

Figura 13 - Micrografias das nanopartículas de PLA contendo vanilina obtidas através de MEV-FEG: a) aumento de 14,6k x; b) aumento de 27,1k x.



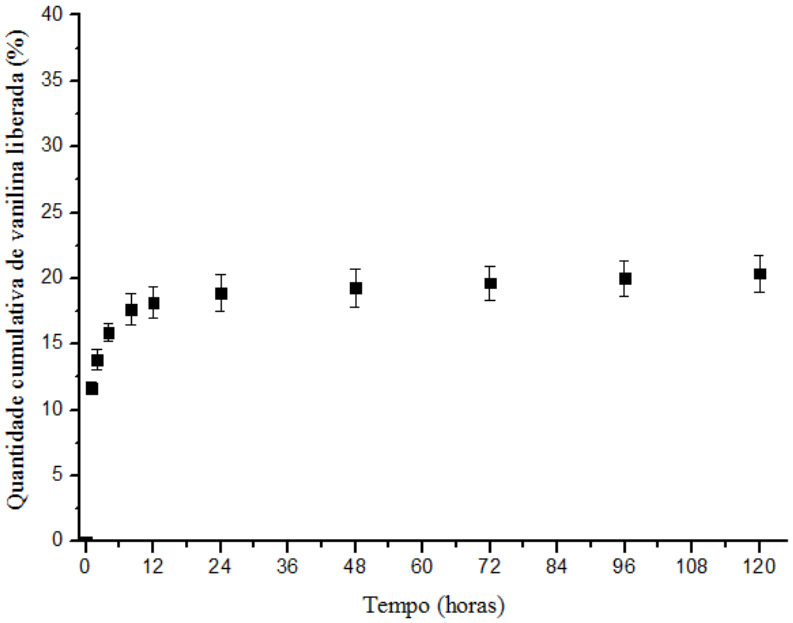
5.3.8 Liberação *in vitro*

O perfil de liberação da vanilina a partir das nanopartículas de PLA foi avaliado e, como previsto para as nanopartículas poliméricas, uma liberação sustentada foi observada.

Para garantir o processo difusivo ao longo do estudo de liberação e evitar o acúmulo de fármaco no meio de dissolução, as condições *sink* (em meio de dissolução com concentração do fármaco até 10% da concentração de saturação) foram mantidas durante todo o experimento (MARCOLONGO, 2003), sendo que de acordo com o estudo de solubilidade previamente realizado, a solubilidade média determinada da vanilina em tampão fosfato 10 mM, pH 7,4 contendo PVA 1% (p/v) foi de 9,25 ± 0,12 mg/mL (n=3) e a quantidade máxima esperada para a dissolução de acordo com a massa de vanilina utilizada é de 0,2 mg/mL (1 mg de vanilina em 5 mL do meio de dissolução), bem abaixo dos 10% da solubilidade da vanilina.

De acordo com a figura 14, observa-se que a liberação da vanilina a partir das nanoesferas apresentou um perfil bifásico, onde é possível verificar uma liberação inicial rápida, seguida de uma fase de liberação extremamente lenta, sendo que em 6 horas aproximadamente 15% da vanilina já havia sido liberada e ao final das 120 horas pouco mais de 20%, sendo a quantidade de vanilina liberada extremamente pequena a partir das 24h. Esta alta quantidade inicial de fármaco liberado é conhecida como efeito "burst" e se deve, provavelmente, a rápida dissolução de moléculas de vanilina que encontram-se adsorvidas na superfície das nanoesferas e estão mais prontamente disponíveis para serem liberadas a partir da matriz polimérica (CRUZ et al., 2006).

Figura 14 - Perfil de liberação da vanilina a partir das nanopartículas de PLA em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4 contendo PVA 1% (p/v) a 37ºC.



Os resultados obtidos da liberação *in vitro* das nanopartículas de PLA contendo vanilina foram analisados através de diferentes equações matemáticas para descrever o perfil cinético e o modelo de liberação do fármaco a partir das nanoesferas. Os modelos cinéticos utilizados para a análise foram: Higuchi, ordem zero, primeira ordem (monoexponencial) e segunda ordem (biexponencial).

Considerando os melhores resultados do critério de seleção de modelo (MSC) e principalmente do modelo que apresentou o melhor coeficiente de correlação (R) comparado aos demais, verificou-se que o modelo de segunda ordem corresponde ao que melhor explica a cinética de liberação das nanopartículas de vanilina (Tabela 8). Desta forma, é possível estabelecer que o comportamento de liberação do fármaco a partir das nanopartículas foi orientado por duas constantes de liberação, α e β. A constante α, cujo valor obtido foi de $1{,}43.10^{-18}$ h^{-1}, indica a velocidade de dissolução da vanilina na etapa rápida da liberação enquanto que a constante β corresponde a velocidade de dissolução da etapa lenta e portanto o valor obtido foi de 0,19646 h^{-1} (ANTONOW, 2012).

Uma porcentagem inicial alta de fármaco liberado é importante para atingir rapidamente uma concentração plasmática adequada ao início do efeito terapêutico, assim como uma fase de liberação lenta posterior é útil na manutenção de uma concentração efetiva do fármaco por mais tempo no sangue, sendo assim, o modelo de segunda ordem da liberação se torna vantajoso para os sistemas nanoestruturados (PENG et al., 2010).

Apesar da porcentagem de fármaco liberado ao longo de todo o período de experimento ter sido baixa, esta análise serviu para predizer o comportamento do perfil de liberação da vanilina através das nanoesferas no organismo e demonstrar que o sistema nanoestruturado desenvolvido é efetivo em promover uma liberação lenta e gradual do fármaco no meio de dissolução.

Tabela 8 - Análise cinética da liberação de vanilina a partir de nanopartículas de PLA em tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 7,4) contendo PVA 1%.

	R	**MSC**	**k (h^{-1})**
Ordem zero	0,74006	-3,07972	0,23879
Primeira ordem	0,75519	-3,02693	0,00284
Segunda ordem	0,98585	2,77232	$\alpha=1{,}43.10^{-18}$/ $\beta=0{,}19646$
Higuchi	0,74006	-3,07972	0,14484

R = coeficiente de correlação, MSC= critério de seleção do modelo k= constante de liberação.

O modelo de Korsmeyer-Peppas foi também aplicado, permitindo a obtenção de um valor de n igual a 0,09235 que proporcionou informações a respeito do mecanismo de liberação do fármaco a partir das nanoesferas, uma vez que se $n \leq 0{,}43$ significa que a liberação ocorre por um processo de difusão do fármaco através da parede polimérica, $n \geq 0{,}85$ indica um processo de erosão da matriz polimérica e se $0{,}43 < n < 0{,}85$ significa que há uma combinação dos processos de erosão e difusão (SIEPMANN e PEPPAS, 2001). Sendo assim, é possível afirmar que o mecanismo que ditou a liberação da vanilina foi a sua difusão através da matriz polimérica das nanopartículas, durante o período avaliado.

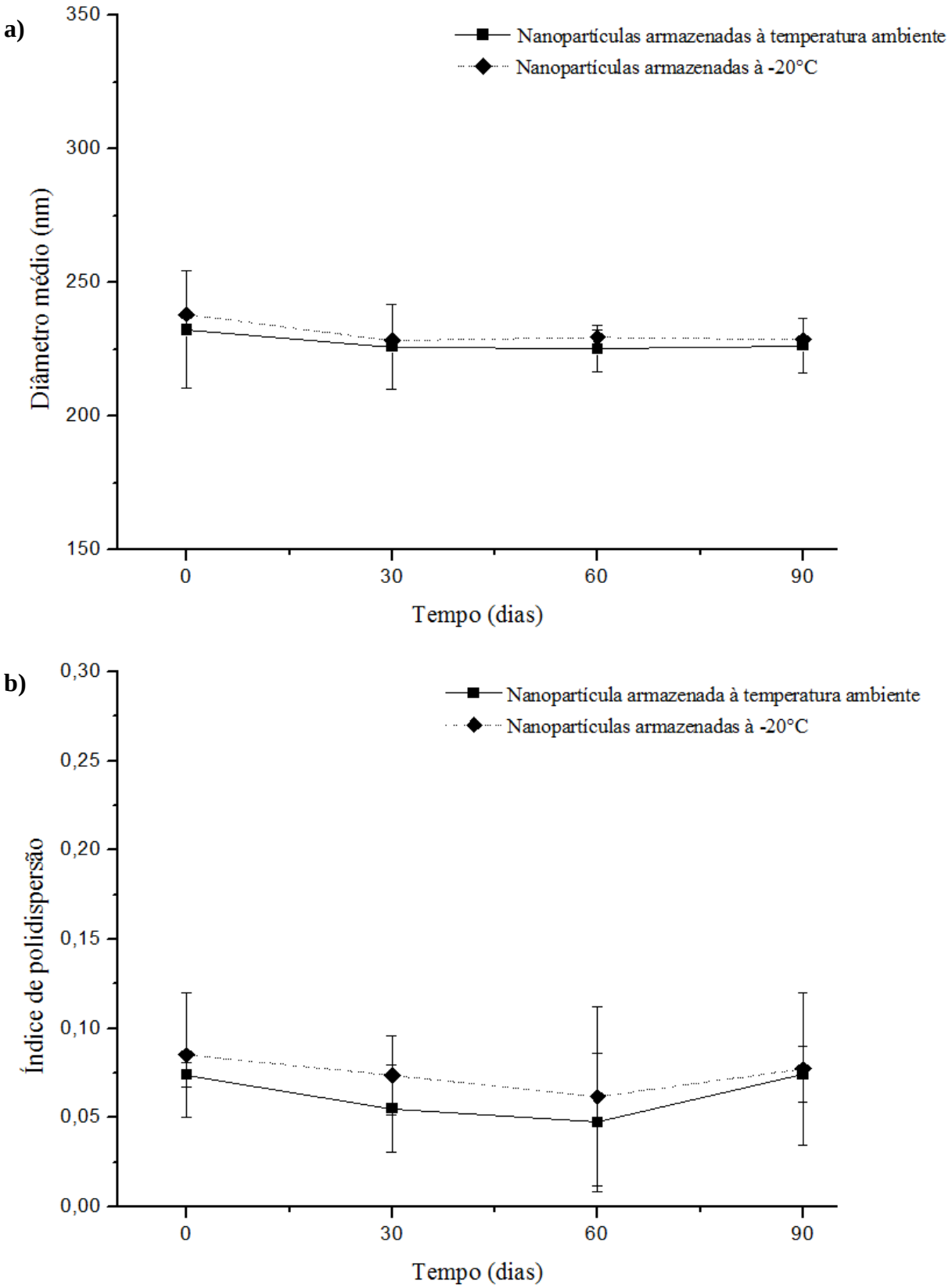
5.4 Estudo de estabilidade

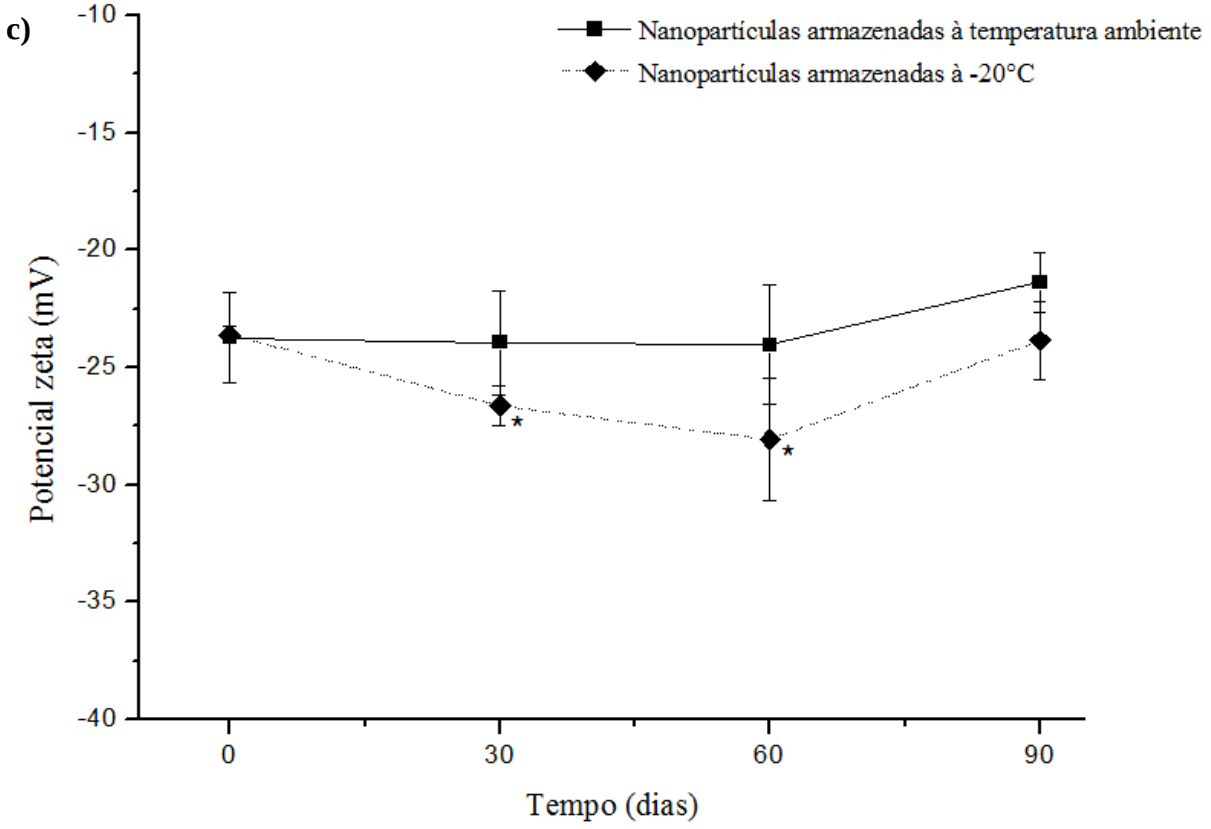
A estabilidade de nanopartículas é avaliada em termos da estabilidade química, que leva em consideração a degradação química que os componentes da formulação podem sofrer com o passar do tempo ou sob diferentes condições de temperatura, e em termos da estabilidade física, ou seja, da capacidade de manutenção dos parâmetros físicos das nanopartículas de acordo com o tempo de armazenamento (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Neste caso, avaliamos a estabilidade física das nanopartículas de vanilina desenvolvidas por meio da análise do diâmetro, índice de polidispersão, potencial zeta e teor de vanilina nas nanopartículas em função do tempo, sob duas diferentes condições de armazenamento: à temperatura ambiente e à -20°C.

Os resultados obtidos estão apresentados na figura 15.

Figura 15 - Estabilidade das nanopartículas de PLA contendo vanilina em função do tempo quanto ao: a) diâmetro médio; b) índice de polidispersão e c) potencial zeta.





* indica diferença significativa (p<0,05) em relação ao tempo 0.

De acordo com os resultados obtidos é possível observar que as formulações não apresentaram diferença significativa em relação ao diâmetro médio e o índice de polidispersão com o passar dos 3 meses.

Os valores de diâmetro médio das nanopartículas armazenadas à temperatura ambiente variaram de 232,3 nm para 226,3 nm após os 3 meses. Para as nanopartículas armazenadas à -20 °C a variação foi de 237,9 nm para 228,6 nm após os 3 meses.

O valor do índice de polidispersão para as nanopartículas armazenadas à temperatura ambiente após os 3 meses foi o mesmo do ínicio do experimento, 0,074 e a variação do índice de polidispersão para as nanopartículas armazenadas a -20 °C foi de 0,085 para 0,077 após os 3 meses.

Já em relação ao potencial zeta, as nanopartículas armazenadas a -20 °C apresentaram diferença significativa no valor medido após 30 e 60 dias em relação ao valor obtida no tempo 0, os quais foram -26,6 mV, -28 mV e -23,6 mV, respectivamente. Nota-se que houve um pequeno aumento em módulo no valor do potencial zeta após 30 e 60 dias, mas que este valor

após 90 dias voltou a diminuir, sendo de -23,8 mV e não demonstrou mais diferença estatística em relação ao tempo 0.

Quanto à análise do teor (tabela 9) as amostras não demonstraram redução significativa após os três meses de armazenamento em nenhuma das condições de temperatura de armazenamento utilizadas.

Tabela 9 - Teor de vanilina contida nas nanopartículas de PLA após três meses de armazenamento (n=3).

Condição de armazenamento	Teor (%) ± desvio padrão
Temperatura ambiente	98,5 ± 0,55
-20 °C	98,6 ± 0,17

Macroscopicamente nenhuma das amostras sofreu alterações de coloração, aspecto ou odor. Isto é o ideal já que se sabe que partículas nanométricas não possuem tendência a separação de fases até alguns meses após a preparação, pois seu processo de sedimentação é lento e minimizado pelo movimento Browniano das partículas (MAGENHEIM e BENITA, 1991).

De maneira geral, pode-se dizer que as nanopartículas de PLA contendo vanilina dispersas em sacarose 5% (p/v) mantém a estabilidade física quanto ao diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e teor após 3 meses da preparação tanto se armazenadas à temperatura ambiente quanto se armazenadas à -20°C.

5.5 Atividade antioxidante *in vitro*

O método do ABTS para a verificação da atividade antioxidante *in vitro* permite a monitoração da redução do agente oxidante através da mudança de coloração e está baseado em uma reação de transferência de elétrons que ocorre pela habilidade dos antioxidantes em capturarem o cátion $ABTS^{\bullet+}$. A captura é acompanhada também pelo decréscimo da absorbância (SUCUPIRA et al., 2012).

Este método foi escolhido pela excelente estabilidade que apresenta, além da reprodutibilidade dos resultados, rapidez, praticidade e boa solubilidade, permitindo análises de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos (KUSKOSKI et al., 2005; APAK et al., 2007).

Para um fármaco ser considerado antioxidante ele deve ser capaz de, em baixas concentrações, retardar ou prevenir a oxidação do substrato. Para isso, deve apresentar como

característica em sua molécula a presença de substituintes doadores de elétrons ou de hidrogênio (HALLIWEL et al., 1995). Fármacos que demonstram capacidade antioxidante *in vitro* podem vir a serem fundamentais no combate do excesso de radicais livres gerados como resultado de processos metabólicos que ocorrem a nível celular em nosso organismo. O estresse oxidativo ocorre como conseqüência deste excesso de radicais livres e é definido como um processo fisiopatológico que causa danos no DNA, podendo levar ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, diabetes, doenças neurodegenerativas e até mesmo câncer (APAK et al., 2007; KHALIL et al., 2012).

As nanopartículas de PLA vazias não demonstraram capacidade antioxidante em nenhuma das concentrações testadas. Os resultados obtidos com as nanopartículas de PLA contendo vanilina demonstraram um perfil de inibição tempo-dependente e concentração-dependente como pode ser observado na tabela 10 (dados analisados com teste ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, com α de 0,05).

Tabela 10 - Porcentagem de inibição do radical $ABTS^{\bullet+}$ obtida pelas diferentes concentrações do fármaco livre e das nanopartículas de PLA contendo vanilina, em 0, 24, 48, 72 e 96 horas.

Concentração (µg/mL)	**Vanilina livre Média (± desvio padrão)**	**Nanopartículas de PLA contendo vanilina Média (± desvio padrão)**
	0 hora	
1,95	33,03 % (± 0,73) [a]	7,22 % (± 4,78) [b]
3,91	58,35 % (± 5,61) [a]	13,23 % (± 0,74) [b]
7,81	82,64 % (± 0,73) [a]	18,58 % (± 0,40) [b]
15,625	98,65 % (± 0,46) [a]	29,42 % (± 2,41) [b]
31,25	100 % (± 0,33) [a]	44,56 % (± 0,40) [b]
	24 horas	
1,95	25,56 % (± 0,93) [a]	4,58 % (± 0,28) [b]
3,91	47,51 % (± 0,63) [a]	9,96 % (± 0,88) [b]
7,81	78,29 % (± 1,86) [a]	19,36 % (± 0,56) [b]
15,625	94,17 % (± 0,63) [a]	33,49 % (± 2,32) [b]
31,25	99,03 % (± 0,12) [a]	49,98 % (± 4,91) [b]
	48 horas	

1,95	38,48 % (± 0,88) [a]	7,83 % (± 4,87) [b]
3,91	60,27 % (± 3,66) [a]	16,32 % (± 3,69) [b]
7,81	89,94 % (± 0,56) [a]	28,23 % (± 1,21) [b]
15,625	98,01 % (± 1,08) [a]	44,04 % (± 3,69) [b]
31,25	99,40 % (± 0,16) [a]	70,14 % (± 3,17) [b]
72 horas		
1,95	39,33 % (± 1,03) [a]	14,84 % (± 2,63) [b]
3,91	64,56 % (± 0,49) [a]	20,01 % (± 1,23) [b]
7,81	90,20 % (± 0,87) [a]	38,00 % (± 3,73) [b]
15,625	98,67 % (± 0,44) [a]	56,87 % (± 6,04) [b]
31,25	99,95 % (± 0,08) [a]	78,48 % (± 6,27) [b]
96 horas		
1,95	27,81 % (± 3,66) [a]	11,84 % (± 2,89) [b]
3,91	58,33 % (± 6,99) [a]	12,895 % (± 1,99) [b]
7,81	92,763 % (± 0,80) [a]	31,97 % (± 9,36) [b]
15,625	98,46 % (± 0,27) [a]	68,33 % (± 1,21) [b]
31,25	99,25 % (± 0,33) [a]	92,02 % (± 2,50) [b]

[a, b] médias de triplicada ± desvio padrão analisadas por linha, onde letras iguais significam igualdade estatística e letras diferentes significam desigualdade estatísticas (ANOVA com pós teste Tukey e α 0,05).

Diferentemente, a vanilina livre possui um perfil de inibição somente concentração-dependente. Esta diferença característica está associada ao perfil de liberação mais lento da vanilina através das nanopartículas em comparação com a vanilina livre que já se encontra totalmente disponível no meio reacional desde as primeiras horas.

Após 96 horas de experimento, apesar da análise ainda revelar a existência de diferença estatística, observa-se que na maior concentração (31,25 µg/mL) as nanopartículas de PLA contendo vanilina apresentaram porcentagem de inibição acima de 90%, próxima a da vanilina livre que foi de 99,25%.

Estes resultados podem ser correlacionados com o perfil de liberação *in vitro* obtido para as nanopartículas, uma vez que como ocorre uma liberação lenta e gradual do fármaco, o potencial antioxidante da vanilina encapsulada nas nanopartículas só se iguala ao do fármaco livre a medida com que o fármaco é liberado, ou seja, com o passar do tempo.

Outra característica que pode ser notada analisando-se a tabela 10 é que as duas maiores concentrações de vanilina livre (31,25 e 15,625 µg/mL), em qualquer um dos tempos,

apresentam valores de porcentagem de inibição bem próximos, indicando que, em determinada concentração, o potencial antioxidante já atinge um limiar máximo. O mesmo não é observado ao analisar as nanopartículas de PLA contendo vanilina, já que um perfil concentração-dependente pode ser notado em todas as concentrações utilizadas. Devido a isso, nota-se de acordo com os valores de concentração de IC_{50} obtidos (tabela 11) que em todos os tempos de análise a vanilina livre apresenta valores inferiores de IC_{50} em relação a aqueles obtidos para as nanopartículas de vanilina.

Tabela 11 - IC50 da vanilina livre e da vanilina encapsulada nas nanopartículas de PLA demonstrado sobre a captura do radical $ABTS^{\bullet+}$ em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4, λ = 734nm.

Tempo (horas)	**IC_{50} (µg/mL) (média ± desvio padrão)**	
	Vanilina livre	**Nanopartículas de PLA contendo vanilina**
0	3,182 ± 0,378 [a]	34,569 ± 1,000 [b]
24	4,925 ± 0,135 [a]	29,765 ± 2,827 [b]
48	2,781 ± 0,296 [a]	20,169 ± 0,191 [b]
72	2,803 ± 0,097 [a]	16,124 ± 1,708 [b]
96	3,647 ± 0,419 [a]	14,390 ± 0,697 [b]

[a, b] médias de triplicada ± desvio padrão analisadas por linha, onde letras iguais significam igualdade estatística e letras diferentes significam desigualdade estatísticas (ANOVA com pós teste Tukey e α 0,05).

A vanilina livre praticamente não apresentou diferença no valor de IC_{50} com o passar do tempo. Já os valores de IC_{50} obtidos para as nanopartículas de PLA contendo vanilina apresentaram uma diminuição ao longo do tempo ($p < 0,05$).

Sendo assim, os resultados demonstram a potencialidade da atividade antioxidante da vanilina e sua manutenção quando encapsulada nas nanopartículas de PLA obtidas pelo método de emulsificação evaporação do solvente, o que pode vir a ser ainda melhor de acordo com seu comportamento *in vivo* a partir do sistema de liberação utilizado, o qual provavelmente acarretará melhora das características biofarmacêuticas e farmacocinéticas permitindo serem atingidos melhores resultados no tratamento de doenças onde o estresse oxidativo está envolvido no surgimento e desenvolvimento dos processos patológicos.

6 CONCLUSÕES

Um método por CLAE simples, rápido e confiável foi desenvolvido e validado para a quantificação de vanilina em nanopartículas de acordo com os requisitos preconizados para os parâmetros de linearidade, especificidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e quantificação. O método apresentou alta sensibilidade e mostrou-se adequado para a quantificação da vanilina.

As nanopartículas de PLA contendo vanilina foram eficientemente produzidas pelo método de emulsificação evaporação do solvente. A caracterização físico-química demonstrou que o método utilizado foi capaz de encapsular satisfatória quantidade do fármaco nas nanopartículas desenvolvidas e que as mesmas apresentaram tamanho reduzido, na escala de nanômetros, forma esférica, com baixo índice de polidispersão e consequentemente alta homogeneidade, arranjo estrutural amorfo, assim como um potencial zeta negativo e distante da neutralidade e um perfil de liberação *in vitro* prolongado.

No estudo da estabilidade física, as nanopartículas desenvolvidas se mantiveram estáveis quanto ao diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e teor do fármaco durante o período de armazenamento de 3 meses.

Quando avaliadas quanto à capacidade sequestrante do radical ABTS, as nanopartículas demonstraram um perfil de inibição tempo e concentração-dependente.

Sendo assim, o conjunto de resultados demonstra que o sistema nanoestruturado produzido com PLA para a veiculação da vanilina possui adequadas características físico-químicas e é capaz de aumentar a atividade antioxidante *in vitro* com o decorrer da liberação do fármaco.

7 REFERÊNCIAS

ABRAHAM, D. J.; MEHANNA, A. S.; WIREKO, F. C.; WHITNEY, J.; THOMAS, R. P.; ORRINGER, E. P. Vanillin, a potential agent for the treatment of sickle cell anemia. **Blood**, v. 77, n. 6, p. 1334-1341, 1991.

AKAGI, K.; HIROSE, M.; HOSHIYA, T.; MIZOGUCHI, Y.; ITO, N.; SHIRAI, T. Modulating effects of elagic acid, vanillin and quercetin in a rat medium term multi-organ carcinogenesis model. **Cancer Letters**, v. 94, n. 1, p. 113-121, 1995.

ALEXIS, F.; PRIDGEN, E.; MOLNAR, L. K.; FAROKHZAD, O. C. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 4, p. 505-515, 2008.

ALI, S. M.; AZAD, M. A.; JESMIN, M.; AHSAN, S.; RAHMAN, M. M.; KHANAM, J. A.; ISLAM, M. N.; SHAHRIAR, S. M. *In vivo* anticancer activity of vanillin semicarbazone. **Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 6, p. 438-442, 2012.

ANDERSON, J. M.; SHIVE, M. S. Biodegradable and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. **Advanced Drug Release Reviews**, v.28, n. 1, p. 5-24, 1997.

Antonow, Michelli Barcelos. Desenvolvimento tecnológico e avaliação dos perfis de liberação *in vitro* de suspensões contendo nanocápsulas de desonida com diferentes polímeros / Michelli Barcelos Antonow; orientação Renata Platcheck Raffin. – Santa Maria: Centro Universitário Franciscano, 2012. 98 f. Dissertação (Mestrado em Nanociências) – Centro Universitário Franciscano, 2012.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para a validação de métodos analíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília: 02 de julho de 2003.

APAK, R.; GÜÇLÜ, K.; DEMIRATA, B.; ÖZYÜREK, M.; ÇELIK, S. E.; BEKTAPOOLU, B.; BERKER, K. I.; OZYURT, D. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC Assay. **Molecules**, v. 12, n. 7, p. 1496-1547, 2007.

BARRATT, G. Colloidal drug carriers: achievements and perspectives. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, n. 1, p. 21-37, 2003.

BEAUDRY, F.; ROSS, A.; LEMA, P. P.; VACHON, P. Pharmacokinetics of Vanillin and its Effects on Mechanical Hypersensitivity in a Rat Model of Neuropathic Pain. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 4, p. 525-530, 2010.

BOONCHIRD, C.; FLEGEL, T. W. *In vitro* antifungal activity of eugenol and vanillin against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 28, n. 11, p. 1235-1241, 1982.

BRANNON-PEPPAS, L. Recent advances on the use of biodegradable micorparticles and nanoparticles in controlled drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 116, n.1, p. 1-9, 1995.

CASTAN, L.; TORO, G.; FERNÁNDEZ, A. A.; GONZÁLEZ, M.; ORTÍZ, E.; LOBO, D. Biological activity of liposomal vanillin. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 6, p. 551-557, 2013.

CLARK, G. S. Vanillin. **Perfurmer Flavorist**, v. 15, p. 45-54, 1990.

COUVREUR, P.; VAUTHIER, C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 7, p. 1417-1450, 2006.

CRUZ, L.; SOARES, L. U.; COSTA, T. D.; MEZZALIRA, G.; DA SILVEIRA, N. P.; DEVALAPALLY, H.; CHAKILAM, A.; AMIJI, M. M. Role of nanotechnology in pharmaceutical product development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 10, p. 2547-2565, 2007.

DHIRENDRA, K.; LEWIS, S.; UDUPA, N.; ATIN, K. Solid Dispersions: A Review. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences.**, v. 22, n. 2, p. 234-246, 2009.

DUPEYRÓN, D.; KAWAKAMI, M.; FERREIRA, A. M.; CÁCERES-VÉLEZ, P. R.; RIEUMONT, J.; AZEVEDO, R. B.; CARVALHO, J. C. T. Design of indomethacin-loaded nanoparticles: effect of polymer matrix and surfactant. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 3467–3477, 2013.

EMERICH, D. F. e C. G. THANOS. The pinpoint promise of nanoparticle-based drug delivery and molecular diagnosis. **Biomolecular Engineering**, v. 23, n. 4, p. 171-184, 2006.

ESSA, S.; RABANEL, J. M.; HILDGEN, P. Effect of polyethylene glycol (PEG) chain organization on the physicochemical properties of poly(D, L-lactide) (PLA) based

nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, n. 2, p. 96-106, 2010.

FARAJI, A. H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 8, p. 2950-2962, 2009.

FERNANDES, M. F. M.; FILGUEIRAS, C. A. L. Um panorama da nanotecnologia no Brasil (e seus macro-desafios). **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2205-2213, 2008.

FITZGERALD, D. J.; STRATFORD, M.; GASSON, M. J.; NARBAD, A. Structure_function analysis of the vanillin molecule and its antifungal properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1769-1775, 2005.

FITZGERALD, D. J.; STRATFORD, M.; GASSON, M. J.; UECKERT, J.; BOS, A.; NARBAD, A. Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 1, p. 104-113, 2004.

FONTANA, G.; PITARRESI, G.; TOMARCHIO, V.; CARLISI, B.; SAN BIAGIO, P. L. Preparation, characterization and in vitro antimicrobial activity of ampicillin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles. **Biomaterials**, v. 19, n. 11-12, p. 1009-1017, 1998.

FREYTAG, T.; DASHEVSKY, A.; TILLMAN, L.; HARDEE, G. E.; BODMEIER, R.; Improvement of the encapsulation efficiency of oligonucleotide-containing biodegradable microspheres. **Journal of Controlled Release**, v. 69, n. 1, p.197–207, 2000.

GREGORIADIS, G.; WILLS, E. J.; SWAIN, C. P.; TAVILL, A. S. Drug carrier potential of liposomes in cancer chemotherapy. **Lancet**, v. 1, n. 7870, p. 1313-1316, 1974.

GUARINO, P. A.; BROWN, S. M. Liquid chromatographic determination of vanillin and related flavor compounds in vanilla extract: cooperative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 68, n. 6, p. 1198–1201, 1985.

GUPTA, R. B.; KOMPELLA, U. B. **Nanoparticles Technology for Drug Delivery.** 1ª edição, New York: Taylor & Francis, v. 159, 2006.

GUSTAFSON, D. L.; FRANZ, H. R.; UENO, A. M.; SMITH, C. J.; DOOLITTLE, D. J.; WALDREN, C. A. Vanillin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde), inhibit mutation induced by hydrogen peroxide, *N*-methyl-*N*-nitrosoguanidine and mitomycin C but not ^{137}Cs

gammaradiation at the CD59 locus in human-hamster hybrid A(L) cells. **Mutagenesis**, v. 15, n. 3, p. 207–213, 2000

GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 313, n. 1-2, p. 198–205, 2006.

HALLIWEL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; AROUMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.

HERRMANN, A.; STOCKLI, M. Rapid control of vanilla-containing products using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 246, n. 2, p. 313–316, 1982.

HO, K.; YAZAN, L. S.; ISMAIL, N.; ISMAIL, M. Toxicology study of vanillin on rats via oral and intra-peritoneal administration. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 1, p. 25-30, 2011.

HOCKING, M.B. Vanillin: synthetic flavoring from spent sulfite liquor. **Journal of Chemical Education**, v. 74, n.9, p. 1055-1059, 1997.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requeriments for Registration of Pharmaceuticals for Human use: **Q2B – validation of Analytical procedures: methodology**, 2005.

JAIN, A. K., SWARNAKAR, N. K., GODUGU, C., SINGH, R. P., JAIN, S. The effect of the oral administration of polymeric nanoparticles on the efficacy and toxicity of tamoxifen. **Biomaterials**. v. 32, p. 503-515, 2011.

JAIN, R.A. The manufacturing techniques of various loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide)(PLGA) devices. **Biomaterials**, v.21, n. 23, p. 2475-2490, 2000.

JEON ,H. J.; JEONG, H. I.; JANG, M. K.; PARK, Y. H.; NAH, J. W. Effect of solvent on the preparation of surfactant-free poly(dl-lactide-co-glycolide) nanoparticles and norfloxacin release characteristics. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 207, p. 99-108, 2000.

KAMAT, J. P.; GHOSH, A.; DEVASAGAYAM, T. P. A. Vanillin as an antioxidant in rat liver mitochondria: Inhibition of protein oxidation and lipid peroxidation induced by photosensitization. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 209, n. 1-2, p. 47-53, 2000.

KARATHANOS, V. T.; MOURTZINOS, I.; YANNAKOPOULOU, K.; ANDRIKOPOULOS, N. K. Study of the solubility, antioxidant activity and structure of inclusion complexo f vanillin with β-ciclodextrin. **Food Chemistry**, v. 101, p. 652–658, 2007.

KAYACI, F.; UYAR, T. Solid inclusion complexes of vanillin with cyclodestrins: their formation, characterization, and high-temperature stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 21, p. 11772-11778, 2011.

KHALIL, O. A. K.; OLIVEIRA, O. A. M. M. F.; VELLOSA, J. C. R.; QUADROS, A. U.; DALPOSSO, L. M.; KARAM, T. K.; MAINARDES, R. M.; KHALIL, N. M. Curcumin antifungal and antioxidant activities are increased in the presence of ascorbic acid. **Food Chemistry**, v. 133, n. 3, p. 1001‑1005, 2012.

KIM, S.; NG, W. K.; DONG, Y.; DAS, S.; TAN, R. B. H. Preparation and physicochemical characterization of trans-resveratrol nanoparticles by temperature-controlled antisolvent precipitation. **Journal of Food Engineering**, v. 108, n. 1, p. 37-42, 2012.

KING, A. A.; SHAUGHNESSY, D. T.; MURE, K.; LESZCZYNSKA, J.; WARD, W. O.; UMBACH, D. M.; XU, Z.; DUCHARME, D.; TAYLOR, J. A.; DEMARINI, D. M.; KLEIN, C. B. Antimutagenicity of cinnamaldehyde and vanillin in human cells: Global gene expression and possible role of DNA damage and repair. **Mutation Research**, v. 616, n. 1-2, p. 60-69, 2007.

KULKARNI, R. K.; MOORE, E. G.; HEGYELI, A. F.; LEONARD, F. Biodegradable Poly(1actic acid) Polymers. **Journal of Biomedical Materials Research,** v. 5, n. 3, p. 169-181, 1971.

KUMAR, S. S.; PRIYADARSINI, K. I.; SAINIS, K. B. Free radical scavenging activity of vanillin and o-vanillin using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical. **Redox Report**, v. 7, n. 1, p. 35–40, 2002.

KUMAR, S. S.; PRIYADARSINI, K. I.; SAINIS, K. B. Inhibition of peroxynitrite-mediated reactions by vanillin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 1, p. 139–145, 2004.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids Surf B**, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.

KÜRTI, L.; KUKOVECZ, A.; KOZMA, G.; MÁRIA, R. A.; DELI, A.; SZABÓ-RÉVÉSZ, P. Study of the parameters influencing the co-grinding process for the production of meloxicam nanoparticles. **Powder Technology**, v. 212, n. 1, p. 210-217, 2011.

KUSKOSKI E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; FILHO J. M.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. **Food Science and Technology**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

KWON, J.; KIM, J.; PARK, S.; KHANG, G.; KANG, P. M.; LEE, D. Inflammation-responsive antioxidant nanoparticles based on a polymeric prodrug of vanillin. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 5, p. 1618-1626, 2013.

LAMPRECHT, G.; PICHLMAYER, F.; SCHMID, E. R. Determination of the authenticity of vanilla extracts by stable isotope ration analysis and component analysis by HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 8, p. 1722–1727, 1994.

LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems. A review. **STP Pharma Sciences**, v. 9, n. 5, p. 411-418, 1999.

LI, T.; ROSAZZA, J. P. N. Biocatalytic synthesis of vanillin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 684−687, 2000.

LIANG, J.; WU, S.; LO, H.; HSIANG, C.; HO, T. Vanillin inhibits matrix metalloproteinase-9 expression through down-regulation of nuclear factor-κb signaling pathway in human hepatocellular carcinoma cells. **Molecular Pharmacology**, v. 75, n. 1, p. 151-157, 2009.

LIRDPRAPAMONGKOL, K.; SAKURAI, H.; KAWASAKI, N.; CHOO, M.; SAITOH, Y.; AOZUKA, Y.; SINGHIRUNNUSORN, P.; RUCHIRAWAT, S.; SVASTI, J.; SAIKI, I. Vanillin suppresses *in vitro* invasion and *in vivo* metastasis of mouse breast cancer cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, n. 1, p. 57-65, 2005.

LIU, G. A.; ZHENG, R. L. Protection against damaged DNA in the single cell by polyphenols. **Pharmazie**, v. 57, n. 12, p. 852–854, 2002.

LOMASCOLO, A.; STENLELAIRE, C.; ASTHER, M. e LESAGE-MEESSEN, L. Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for the food industry. **Trends in Biotechnology**, v. 17, n. 7, p. 282-289, 1999.

LÓPEZ-MALO, A.; ALZAMORA, S. M. Effect of natural vanillin on germination time and radial growth of moulds in fruit based agar systems. **Food Microbiology**, v. 12, p. 213-219, 1995.

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

MAINARDES, R. M.; EVANGELISTA, R. C. PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 290, n. 1-2, p. 137-144, 2005.

MARCOLONGO, R**.** Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica. Universidade de São Paulo. Dissertação, (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), 2003.

MARIN, M. T.; MARGARIT, M. V.; SALCEDO, G. E. Characterization and solubility study of solid dispersions of flunarizine and polyvinylpyrrolidone. **Farmaco**, v. 57, n. 9, p. 723-727, 2002.

MOHANRAJ, V.; CHEN, Y. Nanoparticles – a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, p. 561-573, 2006.

MOKSHAGUNDAM, L. R. V.; MOKSHAGUNDAM, S. L. 2003. **Triglyceride reducing agent**. US Patent 6,599,522.

MUKHOPADHYAY, A. K. Industrial chemical cresols and downstream derivateds. New York: CRC, 2005.

MULLER, R. H.; JACOBS, C.; KAYSER, O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy. Rationale for development and what we can expect for the future. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n. 1, p. 3–19, 2001.

MYKOLAIIVNA, D. T.; PETRIVNA, Z. L. 2005. Method of inhibiting the auto oxidation of milk fat. Ukraine patent UA7492U.

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

PARAISO, R. L. M.Determinação da solubilidade e permeabilidade de fármacos conforme o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB). São Pauo, 2012 (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de São Paulo, USP.

PATRAVALE, V. B.; DATE, A. A.; KULKARNI, R. M. Nanosuspensions: a promising drug delivery strategy. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 7, p. 827-840, 2004.

PENG, H.; XIONG, H.; LI, J.; XIE, M.; LIU, Y.; BAI, C.; CHEN, L. Vanillin crosslinked chitosan microspheres for controlled release of resveratrol. **Food Chemistry**, v. 121, n. 1, p. 23-28, 2010.

POOLE, J.P.; OWENS, F.J. Introduction to Nanotechnology. Ed. Wiley-Interscience, New Jersey, 2003.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLÉMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, n. 12, p. 1113-1128, 1998.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 7, 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, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 2, n. 1, p. 8-21, 2006.

RIEKES, M. K.; BARBOZA, F. M.; VECCHIA, D. D.; BOHATCH, M. JR.; FARAGO, P. V.; FERNANDES, D.; SILVA, M. A. S.; STULZER, H. K. Evaluation of oral carvedilol microparticles prepared by simple emulsion technique using poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) and polycaprolactone as polymers. **Materials Science and Engineering C,** v. 31, n. 5, p. 962–968, 2011.

ROSSI-BERGMANN, B. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 2, p. 54-57, 2008.

SAHOO, S. K. e V. LABHASETWAR. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 24, p. 1112-1120, 2003.

SAMMONS, H. G.; WILLIAMS, R. T. The metabolism of vanillin and vanillic acid in the rabbit. The identification of glucurovanillin and the structure of glucurovanillic acid. **The Biochemical Journal**, v. 35, n. 10-11, p. 1175‑1189, 1941.

SASAKI, Y. F.; IMANISHI, H.; WATANABE, M.; OHTA, T.; SHIRASU, Y. Suppressing effect of antimutagenic flavorings on chromosome aberrations induced by UV-light or X-rays in cultured Chinese hamster cells. **Mutation Research**, v. 229, n. 1, p. 1–10, 1990.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SEIJO, B.; FATTAL, E.; TREUPEL, L. R.; COUVREUR, P. Design of nanoparticles of less than 50 nm diameter: preparation, characterization and drug loading. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 62, n. 1, p. 1-7, 1990.

SHAFIQ-UN-NABI, S., SHAKEEL, F., TALEGAONKAR, S., ALI, J., BABOOTA, S., AHUJA, A., KHAR, R. K., ALI, M. Formulation Development and Optimization Using Nanoemulsion Technique: A Technical Note. **AAPS PharmSciTech**, v. 8, n. 2, p. E1-E6, 2007.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 2-3, p. 139-157, 2001.

SIGMA ALDRICH. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/material-matters/polyester-based-nanoparticle-formation.html> Acesso em: 15 de outubro de 2014.

SINGH, R.; LILLARD Jr., J. W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 86, n. 3, p. 215-223, 2009.

SINHA, A. K.; SHARMA, U. K.; SHARMA, N. A comprehensive review on vanilla flavor: Extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 59, n. 4, p. 299-326, 2008.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados: parte II. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 101-106, 2012.

SUN-WATERHOUSE, D.; WADHWA, S. S.; WATERHOUSE, G. I. N. Spray-Drying microencapsulation of polyphenol bioactives: a comparative study using different natural fibre polymers as encapsulants. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 9, p. 2376-2388, 2013.

TAI, A.; SAWANO, T.; YAZAMA, F.; ITO, H. Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 10, n. 2, p. 170-177, 2011.

TOKIWA, Y.; CALABRIA, B.P. Biodegradability and biodegradation of poly(lactide). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 2, p. 244-251, 2006.

TRAPERO, Y. M.; GONZÁLEZ, C. A.; OLIVERA, L.; CORREA, A. Influencia de vehículos en la farmacocinética a dosis única de la vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) [Influence of vehicles on the single-dose pharmacokinetics of vanillin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde)]. **Bioquimia**, v. 32, n. 1, p. 5-9, 2007.

VAGHASIYA, Y. K.; NAIR, R.; SONI, M.; BALUJA, S.; CHANDA, S. Synthesis, structural determination and antibacterial activity of compounds derived from vanillin and 4-aminoantipyrine. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 69, n. 12, p. 991-998, 2004.

VANDERHOFF , J. W.; EL AASSER, M. S.; UGELSTAD, J. Polymer emulsification process. US Patent, v. 4, p.177, p. 1979.

VOISINE, R.; CARMICHAEL, L.; CHALIER, P.; CORMIER, F.; MORIN, A. Determination of glucovanillin and vanillin in cured vanilla pods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 10, p. 2658–2661, 1995.

WALISZEWSKI, K. N.; PARDIO, V. T.; OVANDO, S. L. A simple and rapid HPLC technique for vanillin determination in alcohol extract. **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p. 1059–1062, 2006.

WALTON, N. J.; MAYER, M. J.; NARBAD, A. Vanillin. **Phithochemistry**, v. 63, n. 5, p. 505-515, 2003.

WANG, G.; LI, P.; PENG, Z.; HUANG, M; KONG, L. Formulation of vanillin cross-linked chitosan nanoparticles and its characterization. **Advanced Materials Research**, v. 335-336, p. 474-477, 2011.

WANG, J.; LIU, W.; TU, Q.; SONG, N.; ZHANG, Y.; NIE, N. Folate-Decorated Hybrid Polymeric Nanoparticles for Chemically and Physically Combined Paclitaxel Loading and Targeted Delivery. **Biomacromolecules**, v. 12, n.1, p. 228-234, 2011.

WATTS, P. J.; DAVIES, M. C.; MELIA, C. D. Microencapsulation using emulsification/solvent evaporation: an overview of techniques and applications. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 7, n. 3, p. 235-259, 1990.

WU, S. L.; CHEN, J. C.; LI, C. C.; LO, H. Y.; HO, T. Y.; HSIANG, C. Y. Vanillin improves and prevents trinitrobenzene sulfonic acid induced colitis in mice. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 330, n. 2, p. 370-376, 2009.