EMILLI ANTÔNIO

OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DE NANOPARTÍCULAS DE POLI (ÁCIDO LÁCTICO) CONTENDO ÁCIDO URSÓLICO

GUARAPUAVA

2016

EMILLI ANTÔNIO

OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DE NANOPARTÍCULAS DE POLI (ÁCIDO LÁCTICO) CONTENDO ÁCIDO URSÓLICO

Dissertação apresentada como requisito parcial para 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, da Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação ampla com a Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientadora: Prof.ª Dr.ª Rubiana Mara Mainardes
Co-orientador: Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil

GUARAPUAVA

2016

Catalogação na Publicação
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

M827d

Antônio, Emilli
Obtenção, caracterização e avaliação da atividade antioxidante e citotóxica de nanopartículas de poli (ácido láctico contendo ácido ursólico / Emilli Antônio. – – Guarapuava, 2016
xix, 129 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, 2016

Orientadora: Rubiana Mara Mainardes
Coorientador: Najeh Maissar Khalil
Banca examinadora: Taiana Bonadio, Flávia Lada Degaut Pontes

Bibliografia

1. Ciências Farmacêuticas. 2. Nanopartículas. 3. Ácido ursólico. 4. Poli(ácido láctico). 5. Estabilidade. 6. Antioxidante. 7. Citotoxicidade. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

CDD 615

TERMO DE APROVAÇÃO

Emilli Antônio

Obtenção, caracterização e avaliação da atividade antioxidante e citotóxica de nanopartículas de Poli (ácido láctico) contendo ácido ursólico.

Dissertação aprovada em 23/02/2016 como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas, associação ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO e Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, pela seguinte Banca Examinadora:

Profa. Dra. Rubiana Mara Mainardes, UNICENTRO
Presidente

Profa. Dra. Taiana Gabriela Morêtti Bonadio, UNICENTRO
Membro

Profa. Dra. Flávia Degaut Pontes, UFPR
Membro

Guarapuava- PR
2016

Dedico esse trabalho...

Aos meus exemplos de vida, Margarete e Marcos Antônio

À minha querida irmã, Natália

E ao meu grande amor Junio

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois em minha vida sempre pude contar com uma força maior, que guiou o meu caminho e me acompanhou em todos os momentos na busca pelos meus objetivos;

Ao meus pais Margarete e Marcos, que de forma trabalhadora, honesta, sacrificada e exemplar fizeram de tudo por mim. Por minha formação ética e moral, pelo zelo à minha educação e por não me deixarem desanimar em nenhum momento. Não se orgulhem de mim, mas sim de vocês, pelo o que sou hoje;

À minha "pequena" irmã, que do seu jeitinho sempre me apoiou;

Ao meu amor Junior por ser durante esses anos um companheiro incondicional, que sempre esteve ao meu lado, me apoiando e incentivando. Tua força, coragem, generosidade e amor me fazem querer seguir em frente sempre ao seu lado. Esse trabalho também é um pouco seu!

Aos meus avós, pelos exemplos de dedicação, bondade, amor ao próximo;

À minha orientadora Drª Rubiana por todo o conhecimento e oportunidades, e por ter me apresentado a Nanotecnologia. Assim como a co-orientação repleta de dedicação do Professor Dr Najeh;

Aos meus queridos companheiros do Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica, Dyenifer que se tornou uma grande amiga... Suelen, Michel que foram sempre companheiros... Soraia, Daniel, Lígia, Luciana Camargo, Rossana, Isabela, Rebeca, Clescila, Aline, Luciana, Leizi, Diane, Thaysa, Lori, Guilherme "pai", Guilherme "filho", Joci... por dividirem comigo o peso das dificuldades e multiplicarem a alegria das vitórias alcançadas;

Agradeço aos meus amigos de todo o sempre, e familiares que me deram total apoio e incentivos e tiveram compreensão e companheirismo nos momentos em que não pude estar presente;

Às queridas colegas
Ísis e Ariane, pelo empenho no antitumoral. A contribuição de vocês foi essencial;

Ao Matheus e Joslaine pela importante colaboração nas análises de potencial zeta, obrigada pela disponibilidade, interesse e pelas horas de descontração;

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Romano por sempre ser gentil e disponibilizar o uso do Laboratório de Fisiologia e Toxicologia Reprodutiva – UNICENTRO;

Ao Prof. Dr. Fauze Jaco Anaissi por disponibilizar e auxiliar nas análises no difratômetro de raios X;

Ao Prof. Dr. Ricardo Yoshimitsu Miyahara e Taiana Bonadio por permitirem a utilização do equipamento de calorimetria exploratória diferencial;

À todos os meus colegas de turma, pela convivência, amizade e bons momentos compartilhados;

À CAPES pelo auxílio com a bolsa de estudos;

Por fim, agradeço a todos que, mesmo não nomeados, participaram e me deram apoio durante a realização deste projeto. Este Trabalho é uma conquista não só minha, mas de todos vocês. É uma prova de que o investimento de vocês não foi em vão.

À todos vocês uma única palavra: Obrigada!

“Não é o que possuímos, mas o que somos, que faz a pobreza ou a riqueza de nossa vida.”

Philips Brooks

RESUMO

O ácido ursólico (AU) é um triterpenoide pentacíclico presente em diversas espécies alimentícias e medicinais, que se destacou devido à sua ação antioxidante, e atualmente ampliou-se sua pesquisa devido sua capacidade de inibir diversos estágios no desenvolvimento de tumores. No entanto, sua aplicação clínica é limitada devido à sua baixa solubilidade aquosa, que resulta em baixa biodisponibilidade oral e restringe sua eficácia. Na tentativa de vencer essas limitações, no presente trabalho desenvolveu-se nanopartículas poliméricas (NP's) à base de poli (ácido láctico) (PLA) contendo AU através do método da emulsificação-evaporação do solvente. A fim de se obter uma ferramenta capaz de quantificar o AU presente nas nanopartículas, um método analítico utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a um detector de arranjo de diodos (DAD) foi desenvolvido e validado de acordo com as normatizações vigentes. As NP's de PLA contendo AU foram obtidas com êxito e apresentaram eficiência de encapsulação de 96% e diâmetro médio de 246 nm, com morfologia esférica ou levemente ovalada. O potencial zeta da formulação foi de -24,6 mV, valor que garante uma boa estabilidade físico-química. As análises de espectroscopia no infravermelho, difração de raios X, calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria sugerem a interação/complexação do AU com a matriz polimérica e amorfização do fármaco, promovidas pelo processo de nanoencapsulação. O estudo de estabilidade revelou que a melhor condição para armazenamento das NP's foi à temperatura ambiente, já que nessas condições todos os parâmetros analisados se mostraram estáveis durante 6 meses. O estudo de liberação *in vitro* mostrou que o AU foi liberado da matriz polimérica através de 2 constantes (α, β), sugerindo uma cinética de segunda ordem. Ao final de 120 h cerca de 60% de AU encapsulado foi liberado por meio de difusão. No teste de citotoxicidade frente a hemácias, foi possível verificar que as NP's contendo AU apresentaram menor toxicidade sobre as células do que o fármaco livre. Quando avaliada a citotoxicidade sobre a linhagem tumoral B16-F10, o AU nanoencapsulado demonstrou manter a capacidade antitumoral do fármaco. Através do estudo do potencial antioxidante via inibição do ácido hipocloroso, observou-se que o processo de nanoencapsulação não influenciou na capacidade antioxidante do AU, visto que após 72 h, as NP's apresentaram capacidade de inibição semelhante ao AU livre. Assim, conclui-se que as NP's contendo AU desenvolvidas neste estudo apresentam características físico-químicas adequadas, o que as tornam potenciais sistemas de liberação controlada, mantendo a atividade antioxidante e antitumoral do AU e diminuindo sua citotoxicidade sobre células normais.

Palavras chaves: nanopartículas, ácido ursólico, poli(ácido láctico), estabilidade, antioxidante, citotoxicidade.

ABSTRACT

Ursolic acid (UA) is a pentacyclic triterpenoid present in many food and medicinal species, which was consecrated due to its antioxidant action, and currently has expanded its research due to its ability to inhibit various stages in the development of tumors. However, its clinical application is limited due to its low aqueous solubility, which results in low oral bioavailability, restricting its effectiveness. In an attempt to overcome these limitations, the present work developed nanoparticles of poly (lactic acid) (PLA) containing UA through the method of emulsification-solvent evaporation. In order to obtain a tool able to quantify the UA present in nanoparticles, an analytical method using high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to a photodiode detector array (PDA) was developed and validated in accordance with current norms. PLA nanoparticles containing UA were successfully obtained and presented an encapsulation efficiency of 96%, and 246 nm in mean size, with spherical or slightly oval morphology. Zeta potential of the formulation was -24,6 mV, a value which ensures a good physicochemical stability. The spectroscopic in infrared, X-ray diffraction, differential scanning calorimetry and thermogravimetric analysis suggests interaction/complexation of UA with the polymeric matrix and amorphization of the drug promoted by nanoencapsulation process. Stability study showed that the best condition for storage of NP's was at room temperature, since in this condition all parameters were stable for 6 months. The *in vitro* release study showed that UA was released from the polymeric matrix over two constants (α, β), suggesting a second order kinetics. At the end of 120 h about 60% of the encapsulated UA was released by diffusion. In cytotoxicity test front red blood cells, it was observed that the NP's containing UA showed less toxicity on cells than free drug. When evaluated the cytotoxicity over tumor cells line B16 -F10, UA nanoencapsulated keeped the antitumor capacity of the drug. By studying the antioxidant activity via inhibition of hypochlorous acid, it was observed that the nanoencapsulation process does not influence the UA antioxidant capacity, whereas after 72 h, the NP's presented inhibition capacity similar to free UA. Thus, it is concluded that NP's containing UA developed in this study had adequate physic chemical characteristics, which make them potential drug delivery systems while maintaining the antioxidant and antitumor activity of the UA and decreasing its cytotoxicity on normal cells.

Keywords: nanoparticles, ursolic acid, poly (lactic acid), stability, antioxidant, citotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema da ação dos agentes antineoplásicos sobre o ciclo celular. 25
Figura 2. Estrutura química do ácido ursólico.....26
Figura 3. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco dissolvido na parede das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas.....32
Figura 4. Representação da fórmula estrutural do PLA. 34
Figura 5. Representação das técnicas de preparação de nanopartículas poliméricas. 35
Figura 6. Imagem ilustrativa do método de emulsificação-evaporação do solvente.....36
Figura 7. Fluxograma ilustrativo das etapas desenvolvidas nesta pesquisa. 45
Figura 8. Esquema ilustrativo do método utilizado para obtenção das NP's. 49
Figura 9. Cromatograma da solução padrão de AU em metanol (50 $\mu g.mL^{-1}$) em função do tempo (min). Fase móvel acetonitrila: água (90:10 v/v), fluxo de 1 $mL.min^{-1}$, detecção no comprimento de onda de 203 nm, temperatura da coluna de 25 °C, volume de injeção de 60 μL.....60
Figura 10. Curva analítica de AU em metanol (área do pico versus concentração de AU). Fase móvel acetonitrila: água (90:10 v/v), λ: 203 nm (n=3). A equação da reta e o coeficiente de correlação (r) são relatados.....61
Figura 11. Curva analítica para o LD e LQ (área do pico *versus* concentração de AU). Fase móvel acetonitrila: água (90:10 v/v), λ: 203 nm (n=3). A equação da reta e o coeficiente de correlação (r) são relatados.....62
Figura 12. Comparação dos cromatogramas de amostras de AU frente ao potencial interferente PVA, presente na formulação das nanopartículas. Em A observa-se o cromatograma de uma amostra de AU proveniente do sobrenadante de nanopartículas. Em B, análise do cromatograma do sobrenadante obtido a partir das nanopartículas vazias. Fase móvel acetonitrila: água (90:10 v/v), 203 nm.....66
Figura 13. Comparação dos cromatogramas de amostras de AU frente ao potencial interferente PBS - 5% tween 80, meio receptor no teste de liberação *in vitro*. Em A observa-se o cromatograma do tampão fosfato de sódio 50 mM, pH=7,4, contendo AU, diluído em metanol. Em B, análise do cromatograma de uma amostra de tampão diluída em metanol. Fase móvel acetonitrila:água (90:10 v/v), 203 nm. 67

Figura 14. Distribuição do tamanho de uma amostra representativa das nanopartículas de AU. Diâmetro médio de 237,7 nm e índice de polidispersão de 0,135, perfil bimodal. 70
Figura 15. Potencial zeta das NP's-PLA-AU (-26,8± 0,4). 72
Figura 16. Potencial zeta das NP's-PLA (-30,1 ± 3,6). 73
Figura 17. Espectros na região do infravermelho: a) PLA, b) AU, c) Nanopartículas de PLA vazias e d) Nanopartículas de PLA contendo AU. 74
Figura 18. Difratogramas de: a) PLA, b) AU, c) Nanopartículas de PLA vazias e d) Nanopartículas de PLA contendo AU. 77
Figura 19. Curvas de DSC e DTG das amostras: a) AU, b) PLA, c) Nanopartículas de PLA vazias e d) Nanopartículas de PLA contendo AU. 80
Figura 20. Fotomicrografia das nanopartículas de PLA contendo AU obtidas através do MEV-FEG: a) aumento de 40 mil vezes; b) aumento de 88 mil vezes. 82
Figura 21. Diâmetro médio das nanopartículas de PLA contendo AU em função do tempo, em diferentes condições de armazenamento, n=3. 84
Figura 22. Índice de polidispersão das nanopartículas de PLA contendo AU em função do tempo, em diferentes condições de armazenamento, n=3. 85
Figura 23. Potencial zeta das nanopartículas de PLA contendo AU em função do tempo, em diferentes condições de armazenamento, n=3. 86
Figura 24. Teor de fármaco das nanopartículas contendo AU em função do tempo, em diferentes condições de armazenamento, n=3. 87
Figura 25. Porcentagem de liberação cumulada *in vitro* do AU a partir das nanopartículas de PLA em solução de PBS 50 mM contendo 5% de Tween 80, pH=7,4 a 37 °C. 89
Figura 26. Porcentagem de hemólise produzida pelo controle positivo (CP), tampão, etanol, nanopartículas de PLA vazias (NP's-PLA), ácido ursolico (AU) (25, 50 e 100 $\mu g.mL^{-1}$) e nanopartículas de PLA contendo ácido ursólico (NP's-PLA-AU) (25, 50 e 100 $\mu g.mL^{-1}$) em a) 4 h; b) 8 h; c)24 h; d)48 h; e) 72 h. 93
Figura 27. Poços de uma microplaca de Elisa utilizada para leituras dos sobrenadantes resultantes da centrifugação das suspensões de hemácias, em 72 h. 94
Figura 28. Porcentagem de viabilidade celular das concentrações de AU encapsulado e não encapsulado sobre a linhagem B16-F10, em a) 24 h, b) 48 h e c)72 h. 96

Quadro 1. Principais funções das fases do ciclo celular. 24
Quadro 2. Propriedades físico-químicas do ácido ursólico. 27

Quadro 3. Inibição da proliferação celular do ácido ursólico e ácido oleanólico em diferentes linhagens celulares.....28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Equações matemáticas para os modelos utilizados para descrever as características de liberação de nanopartículas de PLA carregadas com AU.....54
Tabela 2. Condições cromatográficas utilizadas para validação do método analítico em CLAE.....60
Tabela 3. Avaliação da precisão do método analítico para quantificação de AU através da análise da variação intra e inter-corridas. 63
Tabela 4. Avaliação da exatidão do método analítico para quantificação de AU. 64
Tabela 5. Porcentagem de recuperação e DPR obtido nas análises de robustez após modificações nas condições originais do método.....64
Tabela 6. Sistema de adequação do método de CLAE (n=6) 68
Tabela 7. Análise do tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação das dispersões coloidais preparadas na presença e na ausência de AU (n=10)..69
Tabela 8. Solubilidade do AU em diferentes soluções receptoras a 37 ºC, 150 rpm, para o ensaio da liberação *in vitro* (n=3). 88
Tabela 9. Análise cinética de liberação do AU a partir de nanopartículas de PLA em tampão PBS (50 mM, pH=7,4, contendo 5% de Tween 80). 90
Tabela 10. Porcentagem de Inibição do ácido hipocloroso pelo ácido ursólico (livre e nanoencapsulado) nas concentrações de 10, 20, 30 e 50 $\mu g.mL^{-1}$ em tampão fosfato (50 mM, pH 7.4) (λ =650 nm) nos tempos de 0, 24,48, 72 e 96 h. 100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AO	Ácido oleanólico
AU	Ácido ursólico
BCG	Bacillus Calmette Guérin
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta eficiência
CMC	Concentração Micelar Crítica
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DLS	*Dynamic Light Scattering*
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
DRX	Difração de Raios X
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTG	Termogravimetria Derivada
EE	Eficiência de encapsulação
EPR	*Enhanced permeability and retention*
ERO's	Espécies Reativas de oxigênio
FDA	*Food and Drug Administration*
FT-IR	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier
h	Horas
HPLC	*High-performance liquid chromatography*
ICH	*International Conference on Harmonisation*
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP	Índice de Polidispersão
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MEV-FEG	Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo

MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil tetrazólio
NP’s	Nanopartículas poliméricas
NP’s-PLA	Nanopartículas poliméricas de Poli (ácido láctico)
NP’s-PLA-AU	Nanopartículas Poliméricas de Poli (ácido láctico) contendo ácido ursólico
O/A	Óleo em água
OMS	Organização Mundial da Saúde
PB	Tampão Fosfato
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCL	Poli (ε-caprolactona)
PDA	*Photodiode detector array*
PLA	Poli (ácido láctico)
PLGA	Ácido Poli (láctico-co-glicólico)
PVA	Poli (álcool vinílico)
r	Coeficiente de correlação
r^2	Coeficiente de determinação
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotação por minuto
TGA	Termogravimetria
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 21
2.1. Câncer 21
2.1.1. Tratamentos para o câncer 23
2.2. Ácido ursólico 25
2.3. Nanotecnologia 29
2.3.1. Nanopartículas poliméricas 31
2.3.1.1 Poli (ácido láctico) - PLA 33
2.3.1.2 Métodos de obtenção: emulsificação-evaporação do solvente 35
2.4. Caracterização físico-química 38
2.4.1. Diâmetro médio das partículas 38
2.4.2. Potencial zeta 38
2.4.3. Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) 39
2.4.4. Difratometria de Raios X (DRX) 39
2.4.5. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e Termogravimetria (TGA) 39
2.4.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) 40
3. OBJETIVOS 41
3.1. Objetivo geral 41
3.2. Objetivos específicos 41
4. MATERIAIS E MÉTODOS 42
4.1. Reagentes 42
4.2. Equipamentos e acessórios 43
4.3. Metodologia 44
4.3.1. Desenho experimental 44
4.3.2. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE para análise quantitativa de AU 46
4.3.2.1. Adequação do sistema cromatográfico desenvolvido 48
4.3.3. Obtenção das nanopartículas de PLA contendo AU 48
4.3.4. Caracterização físico-química do sistema obtido 49
4.3.4.1. Diâmetro médio e índice de polidispersão das partículas 49
4.3.4.2. Determinação da eficiência de encapsulação 50
4.3.4.3. Potencial zeta 51
4.3.4.4. Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier 51
4.3.4.5. Difração de Raios X 51

4.3.4.6. Análise térmica 51
4.3.4.7. Análise microscópica 52
4.3.5. Avaliação da estabilidade das nanopartículas contendo AU.....52
4.3.6. Estudo de liberação *in vitro* 53
4.3.6.1. Estudo da solubilidade do AU no meio receptor.....53
4.3.6.2. Perfil de liberação *in vitro* 53
4.3.7. Aplicabilidade das nanopartículas 54
4.3.7.1. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas de PLA contendo AU sobre hemácias 54
4.3.7.2. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas de PLA contendo AU sobre linhagem tumoral B16-F10.....55
4.3.7.3. Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante das nanopartículas de AU.....57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....59
5.1. Validação do método analítico para quantificação do AU nas nanopartículas.....59
5.1.1. Desenvolvimento do método cromatográfico.....59
5.1.2. Validação do método 61
5.1.2.1. Linearidade.....61
5.1.2.2. Limite de detecção e limite de quantificação.....62
5.1.2.3. Precisão.....62
5.1.2.4. Exatidão 63
5.1.2.5. Robustez.....64
5.1.2.6. Seletividade 65
5.1.3. Adequação do sistema cromatográfico 67
5.2. Obtenção dos sistemas nanoparticulados 68
5.3. Caracterização físico-química das nanopartículas.....68
5.3.1. Diâmetro médio e índice de polidispersão das partículas.....68
5.3.2. Determinação da eficiência de encapsulação 71
5.3.3. Potencial zeta.....71
5.3.4. Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier 73
5.3.5. Difração de Raios X 76
5.3.6. Calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria 78
5.3.7. Análise microscópica.....81
5.4. Avaliação da estabilidade das nanopartículas contendo AU.....83
5.5. Estudo de liberação *in vitro* 88
5.5.1. Estudo da solubilidade do AU no meio receptor.....88
5.5.2. Perfil de liberação *in vitro* 88
5.6. Aplicabilidade das nanopartículas 91

5.6.1. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas de PLA contendo AU sobre hemácias 91
5.6.2. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas de PLA contendo AU sobre linhagem tumoral B16-F10. 95
5.6.3. Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante das nanopartículas de AU 98
6. CONCLUSÃO 102
7. ANEXO 104
7.1. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos 104
REFERÊNCIAS 108

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida da população, o câncer passa a preocupar cada vez mais devido ao seu alto índice e seu perfil de morbidade e mortalidade, tornando-se um dos principais problemas de saúde pública mundial. Câncer é o termo utilizado para caracterizar o conjunto de doenças que tem por comum, o desvio dos mecanismos de controle que dirigem a proliferação e diferenciação celular, causando o crescimento desordenado de células que podem se espalhar para várias regiões do corpo (KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2005; ALMEIDA et al., 2005).

O tratamento para essa doença depende do tipo e gravidade desta. Os tumores podem ser tratados a partir de técnica cirúrgica, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia, imunoterapia ou ainda através da combinação dessas técnicas (SALMONN, 1998), sendo o tratamento quimioterápico o mais utilizado nas últimas quatro décadas. Este consiste na utilização de fármacos citotóxicos para células tumorais, porém que podem também afetar células normais (SASSE, 2009; MARTINEZ et al., 2012).

Devido à dimensão que tal doença tem alcançado, grandes esforços estão voltados para a busca da cura e/ou controle desta patologia. Atualmente, diversos produtos farmacêuticos, sintéticos ou naturais são utilizados para o tratamento de neoplasias. No entanto, as particularidades biológicas inerentes a cada tipo de tumor, juntamente com os efeitos colaterais e a resistência aos quimioterápicos que as células tumorais podem desenvolver, impulsionam a pesquisa de novas substâncias potencialmente ativas para o tratamento do câncer (MA, WANG, 2009).

Nos últimos anos, o potencial de produtos naturais foi reconhecido pela comunidade científica como ponto de partida para identificação de novos medicamentos que atuem contra células cancerígenas (GELDENHUYS et al., 2012; KAUR, VERMA, 2015; SERAFIM et al., 2014). Um exemplo é o ácido ursólico, triterpeno presente em diversas plantas e ervas medicinais, que se consagrou por sua ação antioxidante (HAIDA et al., 2011, ZHANG et al., 2014).

Atualmente o interesse pelo ácido ursólico tem aumentado, devido à descoberta de variados efeitos farmacológicos, dentre estes, o efeito antitumoral (OVESNÁ, KOZICS, SLAMENOVÁ, 2006; ES-SAADY et al., 1996; LI, GUO, YANG, 2002; HSU, KUO, LIN, 2004; KASSI et al., 2007; SHANMUGAM et al., 2012; SHANMUGAM et al., 2013). Inúmeros estudos têm explorado esse efeito, uma vez que o ácido ursólico pode atuar em

diversos estágios do desenvolvimento tumoral, como inibição da progressão do tumor e inibição da tumorigênese, além de também ter ação quimiopreventiva (OVESNÁ et al., 2004). No entanto, apesar da gama de efeitos farmacológicos atribuídos à esse triterpenoide, sua aplicação clinica é limitada, devido principalmente à sua baixa solubilidade aquosa, que acarreta em baixa biodisponibilidade oral *in vivo,* o que restringe a sua eficácia (LIU, 1995; LIU, 2005; ZHANG et al., 2013). Dessa maneira é desejável explorar novas formulações de ácido ursólico que vençam as limitações mencionadas.

O desenvolvimento de sistemas nanoparticulados contendo ácido ursólico podem representar uma melhora na solubilidade da droga e eficientes sistemas de liberação prolongada, já que a associação do fármaco a um sistema transportador altera a sua distribuição, uma vez que este passa a depender das características físico-químicas do carreador e não mais de suas propriedades. Além disso, a liberação prolongada permitirá a manutenção constante dos níveis plasmáticos, contribuindo para adequação do regime posológico e proporcionando maior adesão do paciente à terapia (MAINARDES et al., 2005).

Entre os sistemas de liberação de fármacos, as nanopartículas poliméricas são consideradas excelentes carreadores, protegendo as moléculas do fármaco contra degradação do meio fisiológico e as liberando prolongadamente, a fim de diminuir assim os efeitos colaterais. A utilização das nanopartículas poliméricas no tratamento do câncer baseia-se no seu efeito de permeabilidade e retenção aumentadas aos tecidos neoplásicos. Esse efeito ocasiona o extravasamento das nanopartículas para o interstício de tumores sólidos, liberando doses concentradas do fármaco em locais específicos. Como consequência, reduz a exposição aos tecidos saudáveis, diminuindo a possibilidade de efeitos colaterais (BARRATT, 2003; MOHANRAJ, CHEN, 2006).

No que diz respeito aos polímeros empregados para obtenção das nanopartículas poliméricas, estes podem ser naturais tais como albumina e quitosana (KAYSER, LEMKE, HERNÁNDEZ-TREJO, 2005; NAHAR et al., 2008), ou sintéticos (CRUCHO, BARROS, 2015; SCSUKOVA et al., 2014; ZHANG et al., 2011). Dentre os sintéticos, destaca-se o poli (ácido láctico) (PLA), que é aprovado para uso humano (THOMAS, BURG, 2004) e biodegradável a subprodutos atóxicos, sendo dessa maneira o polímero de escolha para aplicação na área médica e farmacêutica (BRANNON-PEPPAS, 1995).

Diante dessas considerações, entende-se como relevante o desenvolvimento de nanopartículas contendo ácido ursólico visando melhorar suas propriedades farmacocinéticas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Câncer

A incidência do número de câncer, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem aumentado significativamente, alcançando aproximadamente 10 milhões de novos casos a cada ano, tornando-se um dos principais problemas de saúde pública mundial. Esse aumento pode ser justificado pela maior expectativa de vida e a urbanização e industrialização, que favorece o aumento de agentes cancerígenos ambientais. O cálculo mais recente da estimativa do Câncer no Brasil, válido para 2016, estima a ocorrência de aproximadamente 596 mil novos casos de câncer, sendo o tumor mais incidente o câncer de pele do tipo não melanoma (176 mil casos), seguido pelos cânceres de próstata (61,2 mil), mama (57,9 mil), intestino (34,3 mil) e pulmão (28,2 mil) (INCA a, 2015).

Câncer é o termo utilizado para caracterizar um desvio dos mecanismos de controle que dirigem a proliferação e diferenciação celular, causando o crescimento desordenado de células que podem se espalhar (metástase) para várias regiões do corpo através do sangue, sistema linfático ou superfícies cerosas (RUDDON, 1995; ALMEIDA et al., 2005; KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2005).

Existem mais de 200 tipos de câncer, os quais correspondem aos diversos sistemas ou células que atacam. A maioria deles é nomeada a partir do órgão ou célula em que se originam, como por exemplo, o câncer que se inicia na próstata, é chamado câncer de próstata. Mas existem também, os cânceres agrupados em categorias mais amplas, como os carcinomas e sarcomas, que se referem aos cânceres que se iniciam respectivamente nos tecidos epiteliais e nos tecidos conjuntivos (NCI, 2014).

As alterações tumorais podem ocorrer em genes especiais denominados proto-oncogênes, inativos em células normais. Uma vez ativos estes se transformam em oncogênes, responsáveis pela malignidade de células normais, que ao se diferenciarem nos tecidos onde se encontram, originam células patológicas, chamadas cancerígenas (ALMEIDA et al., 2005). Dividindo-se rapidamente, tendem a ser incontroláveis e muito agressivas.

Segundo Brunner e Suddarth (1993), existem diversos padrões de crescimentos celulares, que são nomeados pelos termos:

- Hiperplasia: é o aumento no número de células de determinado tecido, é um processo comum durante períodos de crescimento rápido.

- Metaplasia: um tipo de célula madura é convertido em outro tipo, por meio de estímulos externos que afetem a célula germinativa-mãe.

- Displasia: crescimento desordenado das células, resultando em células de diferentes tamanhos, formas e disposições, quando comparadas às células do mesmo tipo de tecido.

- Anaplasia: grau inferior de diferenciação das células displásicas. São destituídas das características celulares normais, e são quase sempre malignas.

- Neoplasia: crescimento celular descontrolado, que não segue nenhuma demanda fisiológica, podendo ser benigna ou maligna.

Com a multiplicação acelerada da célula anormal, ocorrerá a formação de uma massa tumoral que capta os nutrientes disponíveis, deixando o tecido sadio com insuficiência nutricional. Assim sendo, as células normais são eliminadas e a função do órgão é comprometida. As células periféricas do tumor também terão um melhor acesso aos nutrientes disponíveis e dessa forma continuarão a proliferar-se, enquanto que as células do interior do tumor irão formar um núcleo necrótico. Quando a taxa de proliferação se igualar a taxa de morte celular, o tumor estará no seu tamanho máximo, e esse ciclo continuará até que novos vasos sanguíneos se formem para fornecer nutrientes necessários para a expansão do mesmo (BRANNON-PEPPAS, BLANCHETTE, 2004).

As causas do câncer são multifatoriais, podendo ser internas ou externas ao organismo relacionado. As causas internas são em grande parte geneticamente predeterminadas, e dependem do organismo se defender ou não dessas agressões. As causas externas estão relacionadas aos hábitos do ambiente social e cultural. Esses fatores podem também estar inter-relacionados, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais. De todos os casos, 80 a 90% dos cânceres estão relacionados a fatores ambientais, alguns deles são bem conhecidos como: a exposição excessiva a radiação UV que pode levar ao câncer de pele, o tabaco que pode causar câncer de pulmão e alguns vírus que podem ocasionar leucemia. Segundo a OMS, 30% dos cânceres poderiam ser evitados, principalmente pelo não uso do tabaco, adoção de um estilo de vida saudável, e prevenção de infeções que podem causar câncer (INCA b, 2014).

2.1.1. Tratamentos para o câncer

O tratamento para a doença depende do tipo e gravidade desta. Os tumores podem ser tratados principalmente a partir de técnica cirúrgica, radioterapia e tratamento clínico, que engloba quimioterapia, hormonioterapia e imunoterapia, podendo ainda ser feita a combinação entre essas técnicas (ANDRADE, SILVA, 2007; SALMONN, 1998).

A intervenção cirúrgica é bastante eficaz na remoção de tumores, geralmente reservada para pacientes operáveis que não apresentam metástase (SPENCE, JOHNSTON, 2003). A radioterapia é uma opção de tratamento que utiliza feixe de radiações ionizantes no local do tumor, geralmente utilizada em associação com cirurgias e quimioterapia, a fim de melhorar a eficácia do tratamento. Isoladamente, a radioterapia pode diminuir o tamanho do tumor, a recorrência e a possível formação de metástase (ALMEIDA et al., 2005).

A hormonioterapia, inicialmente utilizada no câncer de mama, tem como objetivo impedir a ação dos hormônios que fazem as células cancerígenas crescerem, podendo somente ser utilizada em pacientes que apresentem pelo menos um receptor hormonal para o câncer. Essa terapia no geral é feita via oral, e as drogas agem bloqueando ou suprimindo os efeitos do hormônio sobre o órgão afetado. Atualmente vem sendo aplicada a outros tumores hormoniossensíveis, como carcinomas de próstata e endométrio, e tumores tireoideanos captantes de iodo. Por sua vez, a imunoterapia tem buscado estimular as próprias defesas do corpo, com o interferon α, interleucina-2 e mesmo o BCG (Bacillus Calmette Guérin). Porém apesar de promissora, ainda é uma técnica antineoplásica adjuvante, usada especialmente para destruir as células cancerosas residuais após intervenção cirúrgica ou outro tratamento (BRASIL, 1993; MACHADO, 2000).

O tratamento quimioterápico, tem sido o mais utilizado nas últimas quatro décadas, sendo a terapia de escolha para os cânceres do sistema hematopoiético e tumores sólidos que apresentam metástases. Podem ser utilizados com fins curativos ou paliativos, dependendo do tipo de tumor, da extensão da doença e da condição física do paciente (BONASSA, SANTANA, 2005). Este tratamento consiste na utilização de fármacos citotóxicos, que impedem a reprodução celular, pois atuam em alguma das fases do ciclo celular (G_0, G_1, S, G_2 e M), e consequentemente levam as células malignas à morte (BONASSA, SANTANA, 2005). No Quadro 1 estão descritas as principais funções de cada fase do ciclo celular.

Quadro 1. Principais funções das fases do ciclo celular.

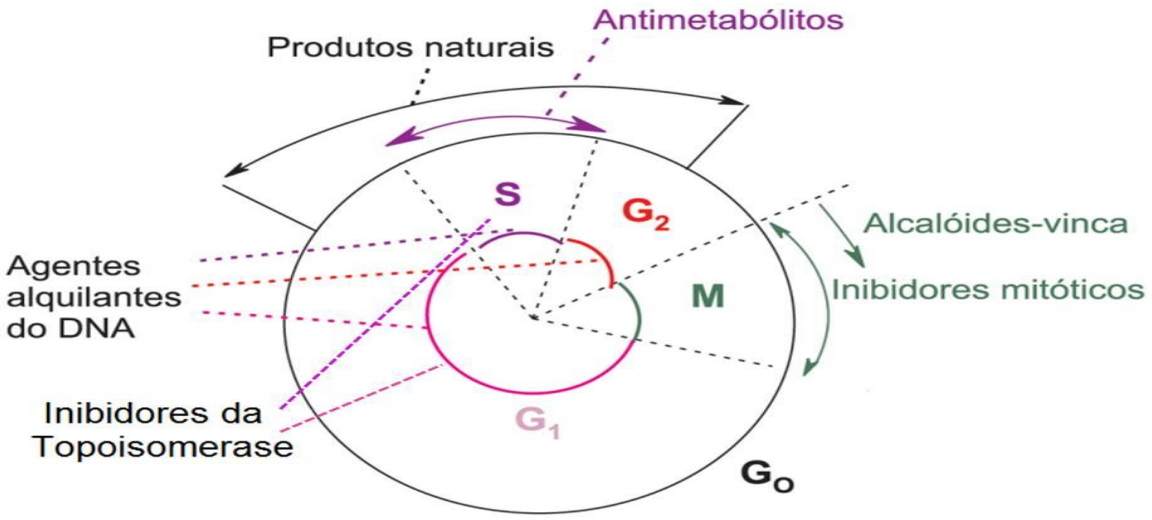
Fase	Função
G_0	Ausência de replicação
G_1	Preparação da célula para multiplicação, produção de constituintes celulares essenciais para a célula nova, preparação para a síntese de DNA.
S	Síntese de DNA.
G_2	Síntese dos componentes para mitose.
M	Produção do fuso mitótico.

(Adaptado de ALMEIDA et al., 2005)

Os fármacos citotóxicos podem ser administrados de maneira isolada (monoquimioterapia) ou combinada (poliquimioterapia), a qual apresenta resultados mais eficazes, pois consegue uma resposta maior a cada aplicação, conseguindo atingir diferentes fases do ciclo celular e diminuindo o risco de resistência aos fármacos (SALMONN, 1998).

Os quimioterápicos antineoplásicos podem ser classificados como agentes antimetabólitos, alquilantes do DNA, inibidores das topoisomerases e derivados vegetais como alcaloides da vinca e compostos relacionados (CUNHA, LEHMANN, 2003). Os agentes antimetabólitos interferem na síntese de RNA e DNA ou alteram a síntese das bases púricas e pirimidínicas endógenas, uma vez que alguns desses fármacos possuem estruturas parecidas com os precursores endógenos de alguns ácidos nucleicos. Os agentes alquilantes atuam através de ligações covalentes com o DNA impedindo assim sua replicação. Já os derivados vegetais afetam a formação dos fusos mitóticos, enquanto que os inibidores das topoisomerases inibem a atividade dessas enzimas, e impedem, portanto, o relaxamento do DNA durante a replicação e transcrição (RANG et al., 2007). Os quimioterápicos citados agem de maneiras diferentes, porém todos possuem sua atividade em uma das fases do ciclo celular. A Figura 1 mostra em que fase do ciclo cada quimioterápico age (ALMEIDA et al., 2005).

Figura 1. Esquema da ação dos agentes antineoplásicos sobre o ciclo celular.



(Adaptado de ALMEIDA et al., 2005)

Os quimioterápicos não atuam exclusivamente sobre as células tumorais, uma vez que as células normais também sofrem ações desses antineoplásicos. As estruturas que se renovam constantemente como medula óssea, pêlos e mucosa do tubo digestivo também são atingidas pela sua ação, podendo provocar dessa maneira efeitos colaterais, como desfiguração do paciente, alterações gastrointestinais e queda de cabelo (SASSE, 2009). A falta de especificidade desses fármacos implica na elevação da sua dose terapêutica e, consequentemente, em aumento da toxicidade sistêmica.

Atualmente, pesquisas vêm sendo desenvolvidas no intuito de produzir novos agentes, ou medicamentos análogos aos já conhecidos, visando à redução da toxicidade dos quimioterápicos, à manutenção da quimioterapia e a intensificação dessas drogas antineoplásicas (FRANZI, SILVA, 2003).

2.2. Ácido ursólico

Ainda que a biologia molecular ofereça alternativas viáveis para a produção de novos medicamentos obtidos por modelos computacionais, as espécies vegetais representam uma estratégia para a inovação farmacêutica, tendo em vista a singularidade das estruturas e a efetividade terapêutica (OLIVEIRA, BRAGA, 2003). Nos últimos anos, o potencial de produtos naturais como agentes anticancerígenos foi reconhecido pela comunidade científica, uma vez que fitoquímicos possuem grandes potencialidades e podem servir como possível

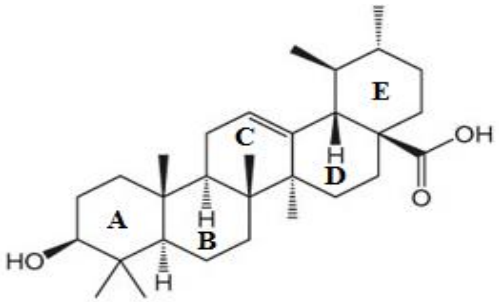
material de partida para a identificação de novos medicamentos que atuem contra células cancerígenas (GELDENHUYS et al., 2012; KAUR, VERMA, 2015; SERAFIM et al., 2014).

Os triterpenoides ($C_{30}H_{48}$) compõe uma classe importante de fitoquímicos bioativos, que estão largamente distribuídos no reino vegetal, e tem recebido grande atenção nos últimos anos (OVESNÁ et al., 2004). São formados por unidades de isoprenos, e sintetizados nas plantas por ciclização do esqualeno (CONNOLLY, 2010; CONNOLLY, 2012), sendo conhecidos cerca de 4000 triterpenoides naturais, com mais de 40 esqueletos identificados, podendo ser divididos em duas classes principais: os tetracíclicos e os pentacíclicos (DEWICK, 2001).

Quimicamente, triterpenos pentacíclicos são baseados em um esqueleto de 30 átomos de carbono, constituído por quatro anéis de seis membros e um anel de cinco (tipo lupano) ou por cinco anéis de seis membros (tipo ursano e oleano). Os triterpenos ácido ursólico (AU) e ácido oleanólico (AO) são isômeros constitucionais, distinguindo-se apenas quanto à localização de dois grupos metila no anel E. Nos oleanos situam-se os dois no C20, enquanto nos ursanos, um grupo metila encontra-se também no C20, mas o outro está localizado no C19.

O AU (ácido 3β-hidroxi-urs-12-en-28-óico) tem um peso molecular de 456,68 $g.mol^{-1}$ e fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_3$. Foi isolado pela primeira vez em 1949, da planta *Thymus vulgaris*, e desde então, mais de 1000 artigos já foram publicados, os quais relatam sua presença em diversos gêneros e famílias, bem como suas variadas atividades biológicas e farmacológicas. Normalmente, o AU surge associado ao seu isômero, o AO (FERREIRA et al., 2010; LIU, 2005), e pode se apresentar tanto na forma livre (agliconas) ou como heterosídeos (saponinas). Sua estrutura química está representada na Figura 2 e suas características físico-químicas estão apresentadas no Quadro 2.

Figura 2. Estrutura química do ácido ursólico.



Quadro 2. Propriedades físico-químicas do ácido ursólico.

Aparência	Sólido branco
Ponto de Fusão	285-288 ºC
Densidade	1,10 g/cm^3
pKa	5,29
Log-P	8,73
Solubilidade	Metanol; Etanol (5 mg.mL^{-1}); DMSO (>25 mg.mL^{-1}); Praticamente insolúvel em água.

(Fonte: SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, 2015)

Este triterpenoide está onipresente em folhas e frutos de espécies alimentícias e medicinais, incluindo ginseng (*Panax ginseng*), calêndula (*Callendula officinalis*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), melaleuca (*Melaleucaleuca dendron*), orégano (*Origanum vulgare*), alfavaca (*Ocimum basilicum L.*) e nos revestimentos cerosos da maçã (*Malus domestica*), pera (*Pyruspyrifolia*), ameixa (*Prunus domestica*), entre outras (NGO, WILLIAMS, HEAD, 2011). O AU se consagrou na cosmetologia devido sua ação antioxidante e renovação celular (HAIDA et al., 2011), porém o interesse por esse composto tem aumentado devido à descoberta de novos e variados efeitos farmacológicos.

O AU apresenta baixa toxicidade (LEUNG, FOSTER, 1996) e tem sido relatado em estudos devido ao seu poder anti-inflamatório (BANNO et al., 2004), antihiperlipidêmico (SOMOVA et al., 2003), antidiabético (LIU, 1995; WANG et al., 2010), hepatoprotetor (SARAVANAN, VISWANATHAN, PUGALENDI, 2006), neuroprotetor (LU et al., 2007), antiobesidade (KUNKEL et al., 2012) e principalmente como antitumoral (OVESNÁ, KOZICS, SLAMENOVÁ, 2006; ES-SAADY et al., 1996; LI, GUO, YANG, 2002; HSU, KUO, LIN, 2004; KASSI et al., 2007; SHANMUGAM et al., 2012; SHANMUGAM et al., 2013), atuando como agente antimutagênico, inibidor da iniciação, diferenciação e proliferação de células tumorais (HSU, KUO, LIN, 2004; RESENDE et al., 2006). Portanto, esse composto pode potencialmente inibir diversos estágios do desenvolvimento de tumores (OVESNÁ et al., 2004).

Estudos *in vitro* usando uma variedade de linhagens de células tumorais têm demonstrado a possível utilidade do AU em quimioprevenção e no tratamento da doença (HONDA et al., 2000). Pesquisas anteriores mostraram que o AU pode inibir o crescimento de células cancerígenas do cólon, células de câncer do endométrio, e células de melanoma (ANDERSSON et al., 2003; LI, GUO, YANG, 2002; ACHIWA et al., 2005; HARMAND et al., 2005). O AU mostrou ainda atividade *in vitro* contra leucemia, hepatoma, carcinomas de

pulmão (A549) e ovário (SK-OV-3) (NAJID et al.,1992; CIPAK et al., 2006; TIAN et al., 2006; MIN et al., 2000; OVESNÁ et al., 2004).

Alguns estudos com AU, descritos na literatura são apresentados no Quadro 3, com seu respectivo IC_{50} para as diferentes linhagens tumorais, comparado ao seu isômero, o AO. Analisando-se os valores de IC_{50} para inibição da proliferação celular, pode se afirmar que o esqueleto ursano apresenta uma atividade antitumoral mais potente, quando comparada ao esqueleto oleano (DALLA VECHIA, GNOATTO, GOSMAN, 2009).

Quadro 3. Inibição da proliferação celular do ácido ursólico e ácido oleanólico em diferentes linhagens celulares.

	LINHAGEM CELULAR	**IC_{50} (µM)**	**REFERÊNCIA**
Ácido Oleanólico	L1210 - Leucemia murina	32,3	(CIPAK et al., 2006)
	HL-60 – Leucemia humana pró mielocitica	70,6	(CIPAK et al., 2006)
	K562 – Leucemia humana mielogênica	>100	(OVESNÁ,KOZICX, SLAMENOVÁ, 2006)
	HSC-2 – Carcinoma oral escamoso humano	285	(TANIGUCHI et al., 2002)
	HCT15 – Carcinoma de cólon humano	60	(LI, GUO, YANG, 2002)
Ácido Ursólico	L1210 - Leucemia murina	14,6	(CIPAK et al., 2006)
	HL-60 – Leucemia humana pró mielocitica	10,9	(CIPAK et al., 2006)
	K562 – Leucemia humana mielogênica	24	(OVESNÁ, KOZICX, SLAMENOVA, 2006)
	HSC-2 – Carcinoma oral escamoso humano	63,6	(TANIGUCHI et al., 2002)
	HCT15 – Carcinoma de cólon humano	30	(LI, GUO, YANG, 2002)
	M4Beu – Melanoma humano	12,5-15	(HARMAND et al., 2005)
	PC-3 – Carcinoma de próstata	32,6	(KASSI et al., 2007)
	LNCap – Carcinoma de próstata	15,7	(KASSI et al., 2007)
	NUGC-3- Carcinoma estomacal humano	30	(MIZUSHINA et al., 2000)
	HepG2 – Carcinoma hepatocelular humano	18	(TIAN et al., 2006)
	R-HepG2 – Carcinoma hepatocelular humano resistente à quimioterapia	15	(TIAN et al., 2006)

IC_{50}= Concentração inibitória de 50%.

(Adaptado de DALLA VECHIA, GNOATTO, GOSMAN, 2009)

Embora o AU tenha se mostrado bastante eficaz, seu mecanismo de ação antitumoral ainda não foi completamente desvendado e as tentativas para elucidação desse mecanismo se baseiam principalmente nas propriedades anti-inflamatória, citotóxica e antioxidante do AU. A explicação mais aceita, baseia-se no fato do AU regular a ativação de vários mediadores pró inflamatórios incluindo, NF-kB, STAT3, AKT/PKB e COX-2 (SHANMUGAM et al., 2012), uma vez que estes têm sido associados com diferentes fases de progressão do câncer e são relatados como reguladores da proliferação do tumor.

Todavia, muitos trabalhos surgiram na tentativa de associar a apoptose mediada por este triterpeno com a inibição de enzimas importantes nos mecanismo de reparo e replicação celular, como DNA polimerase β (DENG, STARCK, HECHT,1999; CHATURVEDULA et al., 2003), DNA ligase (TAN et al., 1996) e as topoisomerases I e II (MIZUSHINA et al., 2000). Outros pesquisadores acreditam ainda que as atividades quimiopreventiva e antitumoral estão relacionadas ao poder antioxidante do AU, uma vez que o estresse oxidativo pode causar danos ao DNA provocando mutações que podem levar a malignidade. Por isso, estes atribuíram ao AU a capacidade de inibir a geração de superóxidos em leucócitos (CHEN et al., 2002) e a quebra na fita de DNA que é induzida por peróxido de hidrogênio (OVESNÁ, KOZICX, SLAMENOVÁ, 2006). Porém, essa abordagem é menos utilizada do que as anteriores.

No entanto, apesar da gama de efeitos farmacológicos atribuídos ao AU, a aplicação clínica deste triterpenoide é limitada devido à problemas como a sua baixa solubilidade aquosa ($1{,}02 \times 10^{-4}$ $mg.L^{-1}$), que acarreta em baixa biodisponibilidade oral *in vivo* e restringe sua eficácia (LIU, 1995; LIU, 2005; ZHANG et al., 2013). Outra restrição é a distribuição não específica em todo o organismo quando administrado por via intravenosa. Dessa maneira é desejável explorar novas formulações de AU que vençam as limitações mencionadas. Para isso, estratégias farmacotécnicas como complexação com ciclodextrinas (LI et al., 2009), dispersões sólidas (ELOY et al., 2012; ELOY, MARCHETTI, 2014) e sistemas nanopartículados (ZHANG et al., 2013; ZHANG et al., 2015; ZHOU et al., 2009; YANG et al., 2012) têm sido explorados.

2.3. Nanotecnologia

A tecnologia tem grande poder de transformação, pois tem como função facilitar a interação entre o homem e a sociedade, é também necessária para alcançar novas formas e suprir necessidades. Uma tecnologia que está emergindo nos últimos tempos é a

nanotecnologia, que se fundamenta na habilidade de caracterizar, manipular e organizar materiais em escala nanométrica (BARIL et al., 2012). A aplicação da nanotecnologia nas mais diversas áreas, especialmente na área da saúde, está em crescente evolução (PARVEEN, MISRA, SAHOO, 2012).

Para aplicações farmacêuticas ou biomédicas, uma partícula é considerada nanométrica quando apresenta tamanhos entre 5 – 1000 nm (FARAJI, WIPF, 2009; HAMIDI, AZADI, RAFIEI, 2008). O princípio dessa ciência, é que os componentes em tamanhos nanométricos podem apresentar propriedades químicas, físico-químicas e comportamentais diferenciadas daquelas já conhecidas, permitindo assim inúmeras novas possibilidades (CARLES, HERMOSILLA, 2008; WIPO, 2011; PINA et al., 2006). Na área da medicina e farmácia, é possível destacar algumas das diversas aplicações da nanoteconologia, tais como: biossensores para uso diagnóstico (JAIN, 2005), vacinas (PEEK, MIDDAUGH, BERKLAND, 2008), material genético (PARVEEN, MISRA, SAHOO, 2012), proteínas (JAHANSHAHI, BABAEI, 2008), cosméticos (MIHRANYAN, FERRAZ, STROMME, 2012), implantes, próteses (LIU, WEBSTER, 2007) e veiculação de fármacos (BARRATT, 2000; SAHOO, PARVEEN, PANDA, 2007; KUMARI, YADAV, YADAV, 2010; PARVEEN, MISRA, SAHOO, 2012).

Frente a essa emergência da nanotecnologia, a veiculação de fármacos vem despertando grande interesse de pesquisas e indústrias farmacêuticas (PARVEEN, MISRA, SAHOO, 2012), uma vez que apresenta diversas vantagens comparadas ao tratamento convencional como diminuição da toxicidade; maior eficácia terapêutica devido o fármaco ser liberado de maneira progressiva e controlada; direcionamento das nanopartículas para o local de ação; maior tempo na circulação sanguínea; redução das dosagens e frequência de administração; tal como redução dos custos (ALLEMANN, GURNY, DOELKER, 1993; CHELLAT et al., 2005; HANS, LOWMAN, 2002).

Considerando todas as vantagens da veiculação de fármacos a partir de sistemas nanoestruturados, a vetorização de fármacos antitumorais é uma das mais promissoras aplicações dessas formulações. A associação entre agentes antineoplásicos e sistemas nanoestruturados é capaz de minimizar os efeitos colaterais, limitações e as inconveniências do tratamento de câncer (FERRARI, 2005; YIH, WEI, 2005), pois em alguns casos, essa tecnologia pode aumentar em até 70 vezes a concentração do fármaco encapsulado nos tumores sólidos (LIECHTY, PEPPAS, 2012). Diversos estudos na literatura têm relatado aumento significativo na eficiência terapêutica em modelos experimentais, e baixa toxicidade

quando feita associação entre nanopartículas e fármacos antineoplásicos, como actinomicina D, 5-fluorouracil, doxorrubicina e metotrexato (GUTERRES et al., 2006).

A utilização das nanopartículas para tratamento oncológico baseia-se na sua capacidade de extravasar para o interstício de tumores sólidos, liberando dessa maneira doses concentradas nos locais específicos, pelo efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (*Enhanced permeability and retention* – EPR), reduzindo a exposição dos tecidos saudáveis e consequentemente diminuindo a possibilidade de efeitos tóxicos. Esse efeito acontece devido à fisiologia anormal dos neovasos presentes nos tumores sólidos. Normalmente o endotélio vascular apresenta fenestrações entre 5 e 10 nm, porém nas neoplasias sólidas, os neovasos possuem fenestrações bem maiores entre 100 e 780 nm (HOBBS et al., 1998; SHUBICK, 1982). Por conseguinte, nanopartículas com diâmetro médio de 200 nm, são capazes de entrar nas fenestrações mais largas dos neovasos dos tecidos tumorais, mas não conseguem entrar nas fenestrações estreitas dos endotélios normais. Como o EPR é causado por uma redução na drenagem linfática, ocorre acúmulo das nanopartículas nas regiões tumorais.

Os dispositivos nanométricos utilizados na terapia do câncer como carreadores de fármacos podem apresentar arranjos estruturais diferenciados, podendo ser sintetizados a partir de diferentes matérias primas. Dentre diversos tipos, pode-se destacar: lipossomas, nanoemulsões, nanotubos, dendrímeros, nanopartículas lipídicas-sólidas, nanopartículas poliméricas, dentre outros (JAIN, HIRST, O'SOLLIVAN, 2012). A escolha do dispositivo a ser usado no carreamento do fármaco depende da ação desejada e da compatibilidade físico-química.

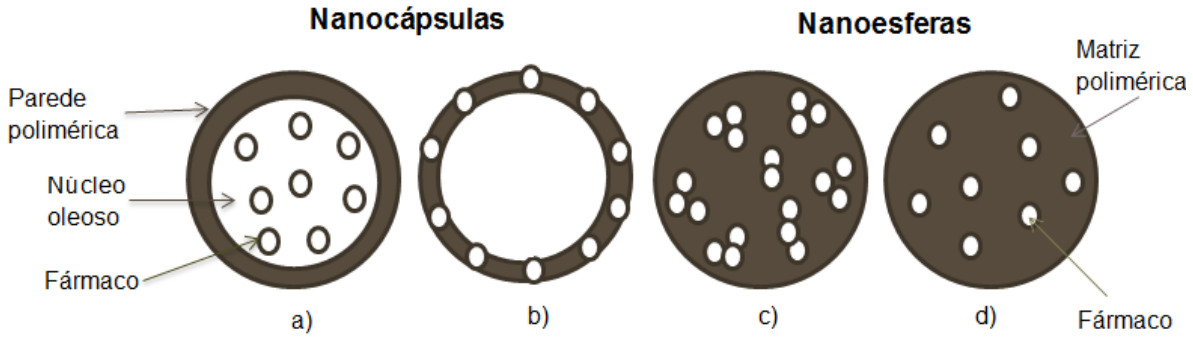
As nanopartículas constituídas por polímeros biodegradáveis têm chamado mais atenção dos pesquisadores, principalmente devido à sua maior estabilidade nos fluidos biológicos e durante o armazenamento. Além disso, podem ser administradas por via endovenosa sem causar embolia (COUVREUR et al., 2002). Em virtude disso, o estudo focou na classe das nanopartículas poliméricas.

2.3.1. Nanopartículas poliméricas

Nanopartículas poliméricas (NP's) são sistemas coloidais sólidos de natureza polimérica, que apresentam diâmetro inferior a 1000 nm. Dependendo do processo de preparação das NP's, diversas estruturas podem ser obtidas, dentre as mais comuns estão as nanocápsulas e nanoesferas (Figura 3), que diferem entre si na composição e organização

estrutural (SOPPIMATH et al., 2001). As nanocápsulas constituem-se de um fino invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica, sendo esses considerados sistemas "reservatórios" (QUINTANAR – GUERRERO, 1998; SCHAFFAZICK et al., 2003; COUVREUR et al., 2002). Já as nanoesferas não possuem óleo em sua composição e são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (SCHAFFAZICK et al., 2002). Esses sistemas, devido às suas dimensões reduzidas, podem ser administrados por qualquer via, incluindo oral (CHELLAMPILLAI, PAWAR, 2011), parenteral (LIU et al., 2010), nasal (SEJU, KUMAR, SAWANT, 2011), ocular (MUSUMECI et al., 2013) e tópica (ZHANG et al., 2010).

Figura 3. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco dissolvido na parede das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas



(Adaptado de SCHAFFAZICK, GUTERRES, 2003)

As NP's apresentam vantagens adicionais a outros sistemas nanométricos, pois possibilitam o carreamento de grande quantidade de fármaco, possuem grande estabilidade, e grande capacidade de melhoria na farmacocinética da droga carreada. Ainda, proporcionam maior controle sobre a cinética de liberação do fármaco e proteção contra a degradação prematura, permitem facilmente as modificações superficiais, possuem uma diversidade de métodos para obtenção e, propiciam segurança adicional, uma vez que polímeros apresentam uma longa história de segura utilização *in vivo* (SOPPIMATH et al., 2001; OLIVIER, 2005; PATEL et al., 2013; KAYSER, LEMKE, HERNÁNDEZ-TREJO, 2005; PUISIEUX et al., 1994; BENOIT et al., 1986),

A utilização de polímeros para a encapsulação de diversos fármacos é uma opção para mascarar as propriedades físico-químicas da substância, e melhorar sua interação com membranas, bem como o transporte através delas, já que após a associação, a distribuição biológica passa a depender das características físico-químicas do carreador e não mais das propriedades do fármaco (COUVREUR, VAUTHIER, 2006). Além disso, são ainda excelentes controladores da farmacocinética, uma vez que a biodegradabilidade aliada à solubilidade da matriz polimérica está diretamente relacionada às taxas de liberação do fármaco a partir das NP's. A liberação sustentada, grande vantagem dessas NP's, pode ocorrer por dessorção das moléculas do fármaco ligado à superfície; por difusão através da matriz polimérica ou no núcleo quando for o caso; erosão da matriz da partícula ou da parede polimérica e; através da combinação dos processos de difusão e erosão (VAN et al., 2010).

Quanto aos polímeros utilizados para obtenção das NP's, estes em geral são constituídos, por mais de 50 unidades repetitivas, e ao se agregarem em um padrão regular, formam um reservatório ou matriz onde o fármaco estará inserido. Podem ser naturais, como albumina, alginato, gelatina e quitosana (KAYSER, LEMKE, HERNÁNDEZ-TREJO, 2005; NAHAR, et al., 2008), ou sintéticos (CRUCHO, BARROS, 2015; SCSUKOVA et al., 2014; ZHANG et al., 2011), tais como poli (ácido-láctico) (PLA), ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA), poli (ε-caprolactona) (PCL). A vantagem dos polímeros sintéticos está relacionada à versatilidade quanto à manipulação de sua organização monomérica, que resulta em boa degradabilidade e compatibilidade com meios biológicos, além de apresentarem superior pureza em relação aos polímeros naturais (MORA-HUERTAS, FESSI, ELAISSARI, 2010).

2.3.1.1 Poli (ácido láctico) - PLA

Dentre os diversos poliésteres conhecidos, destacam-se os de cadeia aberta, formados por uma sucessão de unidades monoméricas de PLA ou de dímeros de PLGA, que são aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para uso humano (JAIN, 2000; THOMAS, BURG, 2004), devido à excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade. Possuem ainda ótima capacidade de encapsulação de fármacos hidrofóbicos (ESSA, RABANEL, HILDGEN, 2010).

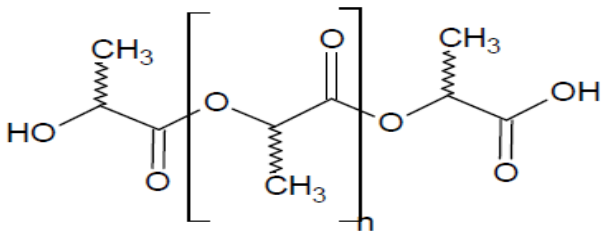
A escolha do polímero a ser utilizado, deve ser feita de maneira criteriosa e específica, uma vez que este influenciará na cinética de liberação, estabilidade do fármaco, bem como na biocompatibilidade (ANDERSON, SHIVE, 1997). Além disso, o peso

molecular do polímero poderá influenciar na uniformidade da amostra, geralmente polímeros com alto peso molecular geram sistemas com baixa taxa de polidispersão (ZAMBAUX et al., 1998).

O PLA é o polímero de escolha para aplicação na área médica e farmacêutica principalmente quando se trata da liberação de fármacos anticancerígenos, antimaláricos, contraceptivos e anestésicos (MENEMSE, GUNDAY, 1999). Vários estudos têm demonstrado a importância do emprego deste material polimérico no desenvolvimento de nanosistemas (KUMARI, KUMAR, YADAV, 2012; HOU et al., 2011; XING, ZHANG, TAN, 2007).

Este poliéster alifático, cuja estrutura química se encontra representada na Figura 4, tem alto grau de transparência (BRANNON-PEPPAS, 1995; JAIN, 2000) e pode ser obtido através de dois monômeros, o ácido láctico e o lactídeo, dependendo do peso molecular. O PLA de baixo peso molecular (<3000 Da) é produzido pela condensação direta do ácido láctico, enquanto que o PLA de elevado peso molecular é normalmente obtido através da abertura do anel do lactídeo seguida de polimerização (SODERGARD, STOLT, 2002). Como se trata de um α-hidróxi com um carbono assimétrico, apresenta dois isômeros opticamente ativo, o dextrógiro (D) e o levógiro (L), que diferem entre si pela maneira como os átomos estão dispostos (DRUMRIGHT, GRUBER, HENTON, 2000).

Figura 4. Representação da fórmula estrutural do PLA.



n = número de unidades repetitivas

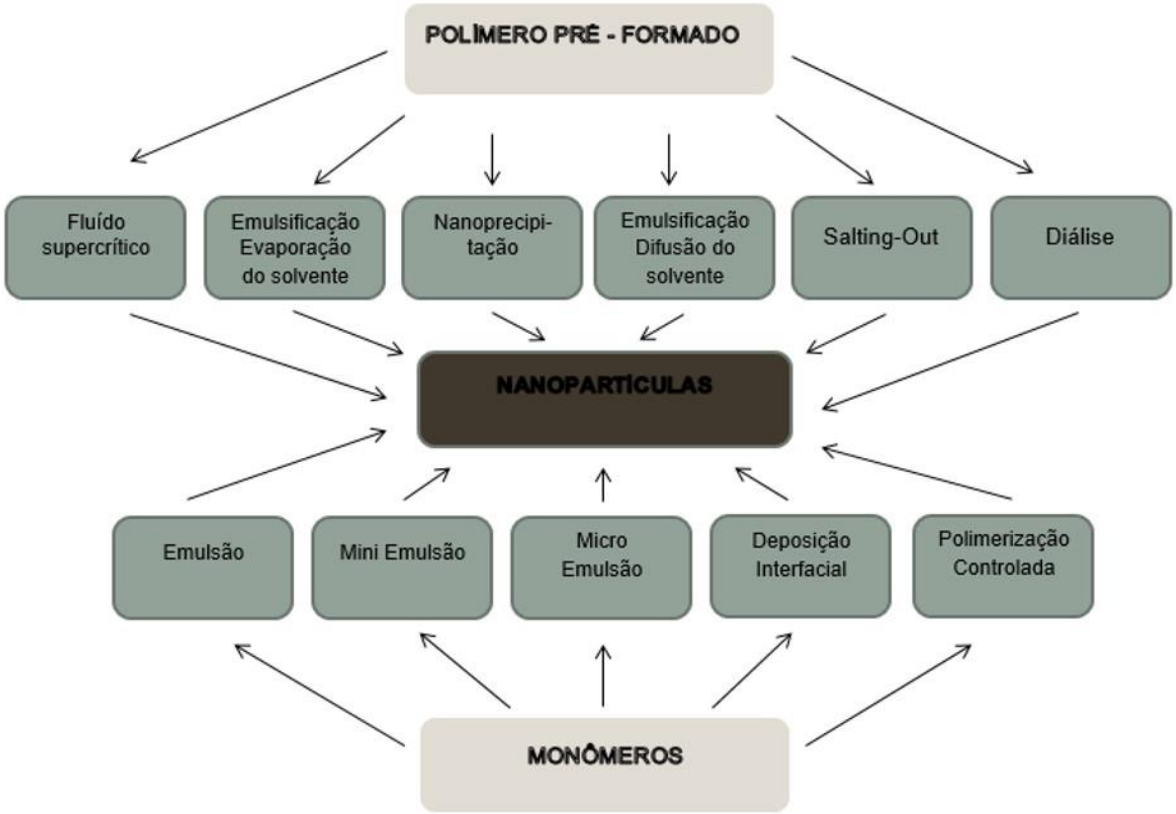
A presença das ligações éster na cadeia do polímero permite a sua degradação hidrolítica em um ambiente com elevada porcentagem de umidade relativa (VERT, 2005; GRIZZI et al., 1995). Quando ocorre a degradação do PLA, é gerado ácido láctico, o qual é metabolizado em piruvato pela lactato desidrogenase presente no fígado, músculos e coração, o que leva a sua eliminação via ciclo de Krebs, em forma de dióxido de carbono e água. O índice de degradação do PLA é dependente de diversos fatores, como cristalinidade, peso

molecular, propriedade do meio e morfologia das partículas (BELBELLA et al., 1996). O PLA é insolúvel em álcoois (como etanol) e em água, mas é solúvel em solventes orgânicos, como clorofórmio e diclorometano (SCHLIECKER et al., 2003; PARK, 1994).

2.3.1.2 Métodos de obtenção: emulsificação-evaporação do solvente

Tradicionalmente, as NP's podem ser obtidas através da polimerização de monômeros (polimerização *in situ*), onde os polímeros são formados simultaneamente às nanopartículas, ou por métodos que trabalham com a dispersão de polímeros pré-formados (REIS et al., 2006; RAO, GECKLER, 2011). Devido aos métodos baseados na polimerização *in situ*, apresentarem moléculas residuais (monômeros, oligômeros) que podem resultar em toxicidade da formulação, métodos que obtém NP's a partir dos polímeros pré-formados são os mais seguros e comumente utilizados para uso farmacêutico (REIS et al., 2006). As principais técnicas para obtenção de NP's estão esquematizadas na Figura 5.

Figura 5. Representação das técnicas de preparação de nanopartículas poliméricas.

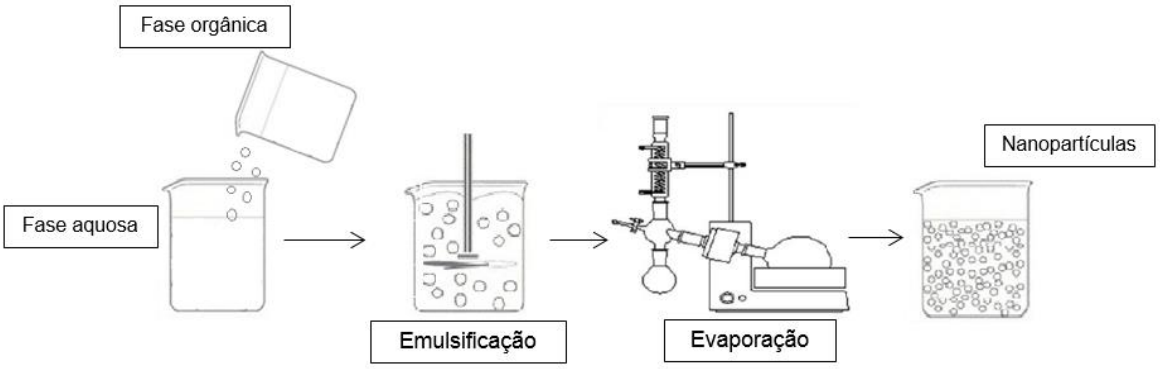


(Adaptado de RAO, GECKELER, 2011)

Muitas das características das nanopartículas, tais como tamanho, índice de polidispersão e eficiência de encapsulação são advindas do método de preparação escolhido (FREITAS, MERKLE, GANDER, 2005). A técnica apropriada para a preparação de NP's deve atender alguns critérios básicos como: estabilidade química e manutenção da atividade biológica do fármaco durante o processo; alta eficiência de encapsulação e alto rendimento, o suficiente para produção em massa; diâmetro médio das partículas compatível com a via de administração desejada; perfil de liberação reprodutível e ainda, a formulação precisa apresentar um baixo índice de polidispersão e ser facilmente ressuspensa em água (PARK, YE, PARK, 2005).

Um dos métodos mais empregados para encapsulação de fármacos hidrofóbicos a partir de polímeros pré-formados é a emulsificação-evaporação do solvente (VANDERHOFF, EL AASSER, UGELSTAD, 1979). A técnica consiste em dissolver o polímero e o fármaco em um solvente orgânico volátil imiscível em água, constituindo a fase orgânica da formulação. Prepara-se também uma fase aquosa, contendo um tensoativo, como o poli (álcool vinílico) (PVA), que tem como função formar e estabilizar o tamanho das partículas, evitando que ocorra agregação (SURASSMO et al., 2010). A fase orgânica é então vertida na fase aquosa, aplicando-se uma alta energia para homogeneização do meio (sonicação) de modo a formar a emulsão. A agitação da emulsão é a etapa determinante para obtenção das NP's e deve ser realizada antes da precipitação do polímero. Por fim, promove-se a remoção do solvente orgânico, através da evaporação com elevação da temperatura sob pressões reduzidas ou agitação, levando a formação das NP's sólidas devido à diminuição da solubilidade do polímero e sua consequente precipitação (Figura 6) (REIS et al., 2006).

Figura 6. Imagem ilustrativa do método de emulsificação-evaporação do solvente.



Por conseguinte, as nanopartículas são recolhidas da suspensão por ultracentrifugação, e submetidas a lavagens consecutivas com água destilada para remoção de quaisquer interferentes, tal como o PVA (RAO, GECKLER, 2011).

Segundo Gupta e Kompella (2006), para que o transporte de um veículo contendo fármaco seja eficiente através da circulação sanguínea, é recomendado que essas estruturas não ultrapassem 300 nm de diâmetros. Sendo assim, é importante levar em consideração os inúmeros fatores que podem alterar o tamanho dessas nanopartículas quando obtidas pelo método da emulsificação-evaporação do solvente, tais como:

- Natureza e concentração do tensoativo: quando se trata do PVA, o tamanho das partículas diminui com aumento da concentração de PVA até sua concentração micelar crítica (CMC) (GANEA et al., 2008);

- Taxa de agitação: para se obter gotículas com dimensões inferiores a 1 μm, torna-se necessário submeter a emulsão a uma tensão de cisalhamento elevada (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998);

- Tipo e quantidade dos solventes: O solvente orgânico selecionado deverá ser apolar, ter a capacidade para solubilizar o polímero e difundir-se através da fase aquosa, permitindo a precipitação do polímero e a formação de nanopartículas. Para uma distribuição homogênea e partículas com tamanho reduzido, deve se utilizar preferencialmente um baixo volume de solvente orgânico (KANAKUBO, ITO, MURAKAMI, 2010; XU et al., 2010);

- Concentração de polímero: O aumento da concentração do polímero aumenta a viscosidade da fase, obtendo nanopartículas com maiores dimensões, devido à maior dificuldade de dispersão da fase interna na fase externa (ARAUJO et al., 2009).

Poucos trabalhos foram descritos na literatura realizando a nanoencapsulação do AU. E menores ainda são os estudos publicados que avaliam o resultado de NP's. Zhang e colaboradores (2013) e (2015) obtiveram NP's, utilizando como carreador para o AU o copolímero mPEG-PCL, afim de avaliar seu efeito contra câncer gástrico e contra carcinoma hepatocelular, respectivamente. Os demais estudos relatam a formação de outros tipos de nanopartículas, como é o caso do trabalho de Zhou e colaboradores (2009) que utiliza fosfolipídeos como carreador, e de Yang e colaboradores (2012) que desenvolveram nanopartículas contendo AU, através da técnica do CO_2 supercrítico. Porém, a associação de PLA ao AU nunca foi avaliada, e parece ser bastante promissora.

2.4. Caracterização físico-química

2.4.1. Diâmetro médio das partículas

O tamanho das nanopartículas pode ser determinado pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (Do inglês, *Dynamic Light Scattering*, DLS). Nesta técnica, um raio luminoso atravessa uma dispersão coloidal e atinge a nanopartícula em movimento browniano, ocorrendo o espalhamento da luz em todas as direções sem perda ou ganho de energia, de modo que quanto maiores são as partículas, mais lentamente se movem, sendo também menor a velocidade das flutuações da luz dispersada. O equipamento relaciona a quantidade de luz espalhada com o tamanho das partículas (XU, 2008).

2.4.2. Potencial zeta

O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão. Portanto, potencial zeta é o nome que damos para a diferença de tensão elétrica entre a superfície de cada coloide e sua suspensão líquida (MAGENHEIM, BENITA, 1991; MOSQUEIRA et al., 2000). Os fosfolipídeos, poloxamers e os polímeros constituintes das nanopartículas são os principais componentes presentes nas formulações capazes de influenciar o potencial zeta.

O Potencial zeta não pode ser medido diretamente, por isso é calculado através do rastreamento do movimento de partículas carregadas em um campo de tensão, chamada mobilidade eletroforética. Na prática, uma suspensão coloidal diluída é introduzida em uma cuba com dois eletrodos e um potencial elétrico é aplicado à suspensão. As partículas com carga elétrica líquida irão se mover na direção do eletrodo de carga contrária, tão mais rapidamente quanto maior a sua carga elétrica e maior o campo elétrico aplicado. A carga superficial pode influenciar significativamente a estabilidade de uma partícula em suspensão. De modo geral, são estáveis eletrostaticamente partículas com potencial zeta próximo a +/- 30 mV (ANDRADE, 2008).

2.4.3. Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

A radiação infravermelha está compreendida no espectro eletromagnético entre as regiões do visível e das micro-ondas. A porção mais útil para a análise de grupos funcionais de estruturas orgânicas está situada entre 4000 e 400 cm^{-1}. As ligações covalentes que compõe as moléculas orgânicas estão em constante movimento axial e angular. A radiação no infravermelho faz com que átomos e grupos de átomos destes compostos, tais como -CH, -NH e -OH vibrem com amplitude aumentada ao redor das ligações covalente que os ligam. Os espectros de infravermelho são representados de modo que a porcentagem de transmitância aparece como uma função do número de onda, que é o inverso do comprimento de onda (REICH, 2005).

Os espectros obtidos por meio da técnica de FT-IR permitem caracterizar polímeros e fármaco em função da detecção de grupos funcionais e auxilia no estudo das interações moleculares entre o fármaco e o carreador nas NP's, através da observação de quaisquer mudanças nas bandas de absorção dos grupos funcionais das moléculas presentes (VERHEYEN et al., 2002).

2.4.4. Difratometria de Raios X (DRX)

Os Raios X são gerados quando um elétron (partícula de alta energia cinética), gerado no cátodo de um tubo catódico, colide com um alvo metálico (ânodo). A difração de Raios X é uma técnica versátil e não destrutiva que revela informações sobre a estrutura cristalográfica de materiais naturais e sintéticos. Materiais cristalinos são capazes de difratar os Raios X de maneira característica, dependendo de seu arranjo cristalino (DONG, BOYD, 2011).

DRX é fundamental para caracterizar as NP's, pois pode efetivamente distinguir sistemas/materiais entre cristalinos e amorfos. Substâncias cristalinas apresentam padrões bem definidos e compostos amorfos não apresentam os mesmos planos nítidos característicos dos cristais (DHIRENDRA et al., 2009).

2.4.5. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e Termogravimetria (TGA)

As técnicas de análise térmica são amplamente utilizadas para a caracterização de substâncias farmacêuticas no estado sólido, apesar do grande número de técnicas

termoanalíticas, as mais usadas são a calorimetria exploratória diferencial (DSC) e a termogravimetria (TGA).

A calorimetria exploratória diferencial pertence ao grupo das análises térmicas onde as propriedades físicas de uma substância e/ou seus produtos de reação são medidos em função de um programa com temperatura controlada (WENDHAUSEN, 2005). A técnica mede a diferença de energia fornecida à substância de interesse e uma substância de referência, termicamente inerte em função da temperatura (IONASHIRO, GIOLITO, 1980; GIOLITO, IONASHIRO, 1988). As medidas propiciam dados qualitativos e quantitativos em relação à mudanças físicas e químicas que envolvem processos endotérmicos e exotérmicos ou mudanças de massa (MOTHÉ, AZEVEDO, 2002). Dessa maneira, informações como ocorrência de polimorfismo de fármacos, nível de amorficidade de materiais e temperatura de transição vítrea de polímeros amorfos podem ser determinadas (FORD, MANN, 2012).

A termogravimetria (TGA) por sua vez, mede a variação de massa em função da temperatura aplicada, sendo restrita às transições que envolvem tanto ganho quanto perda de massa. É muito usada na análise de processos de dessolvatação, decomposição de substâncias e também em estudos de estabilidade, já que geralmente, quanto mais alta for a temperatura de decomposição de um determinado composto, maior será a sua estabilidade à temperatura ambiente (BRITTAIN, 1999).

As técnicas são muito importantes para a caracterização de NP’s, uma vez que através delas é possível identificar interações intermoleculares e também amorfização do fármaco, ocasionada pela sua nanoencapsulação (MAULVI et al., 2011).

2.4.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica de caracterização que fornece informações detalhadas da superfície e morfologia de estrutura, com aumentos de até 300.000 vezes. A amostra é submetida a um feixe de elétrons, sob condições de vácuo. O feixe interage com a região de incidência da amostra até uma profundidade que pode variar alguns microns, dependendo da natureza da amostra, e gera elétrons secundários ou retroespalhados em relação ao feixe primário. A imagem obtida representa em tons de cinza o mapeamento e a contagem de elétrons emitidos pelo material analisado (DUARTE et al., 2003).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo geral o desenvolvimento, caracterização e a avaliação da atividade antioxidante e citotóxica de nanopartículas de PLA contendo AU.

3.2. Objetivos específicos

a) Desenvolvimento e validação da metodologia analítica por CLAE/DAD para análise quantitativa de AU em nanopartículas de PLA, bem como em meio de dissolução utilizado no ensaio de liberação *in vitro*;

b) Desenvolvimento das NP's contendo ácido AU, através do método de emulsificação-evaporação do solvente;

c) Determinação da eficiência de encapsulação do AU nas nanopartículas, por meio do método de CLAE/DAD desenvolvido;

d) Caracterização dos sistemas obtidos quanto aos seus aspectos físico-químicos: diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta, interação fármaco-polímero (espectroscopia na região do infravermelho, difração de raios X, calorimetria exploratória diferencial, termogravimetria) e morfologia das partículas;

e) Investigação da estabilidade das nanopartículas em suspensão, levando-se em consideração diferentes temperaturas de armazenamento;

f) Determinação do perfil de liberação do AU a partir das nanopartículas produzidas;

g) Avaliação da atividade citotóxica *in vitro* das nanopartículas de PLA contendo AU sobre eritrócitos e células tumorais;

h) Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* proveniente do fármaco nanoencapsulado.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes

- 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina - TMB (Sigma Aldrich, EUA);
- Acetonitrila grau HPLC (Sigma Aldrich, EUA);
- Ácido acético 99,9% (Vetec, Brasil);
- Ácido ursólico (≥ 90%, Sigma - Aldrich Chemistry, EUA);
- Água ultrapura (sistema Milli-Q Gradiente Millipore®, resistividade de 18,2 MΩ/cm);
- Álcool isopropílico (Fmaia, Brasil);
- Azul de Tripan (Sigma-Aldrich, EUA);
- Brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2il) -2,5-difenil tetrazólio - MTT (Sigma-Aldrich, EUA);
- D(+) Sacarose P.A. (Vetec, Brasil);
- Diclorometano (Fmaia, Brasil);
- Dimetilformamida 99,8% (Dinâmica - Química Contemporânea, Brasil);
- Dimetilsulfóxido - DMSO (Biotec, Brasil);
- Estreptomicina (Sigma-Aldrich, EUA);
- Etanol 95% (Fmaia, Brasil);
- Fosfato de sódio dibásico P.A. (Biotec, Brasil);
- Fosfato de sódio monobásico anidro P.A. (Vetec, Brasil);
- Glicose (Sigma-Aldrich, EUA);
- Heparina sódica (Hipolabor, Brasil);
- Iodeto de potássio (Vetec, Brasil);
- Meio de cultura Dulbecco modificado por Iscove’s (Sigma-Aldrich, EUA);
- Metanol grau HPLC (J.T. Baker, EUA);
- NaCl (Biotec, Brasil);
- NaOCl (comercial);
- NaOH (Biotec, Brasil);
- Penicilina (Sigma-Aldrich, EUA);
- Poli (álcool vinílico) - PVA (Sigma Aldrich EUA);
- Poli (L-ácido láctico) - PLA (Sigma Aldrich EUA) (85.000 - 160.000 Da);
- Soro fetal bovino (Gibco, EUA);
- Tripsina (Gibco, EUA);

- Tween 80 (CRQ - Cromato produtos químicos, Brasil);

4.2. Equipamentos e acessórios

- Autoclave vertical AV Plus - Phoenix (Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica - UNICENTRO);
- Balança analítica M214A - Tecnal® (Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica - UNICENTRO);
- Banho ultratermostático - Solab (Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica - UNICENTRO);
- Bomba a vácuo TE 058 - Tecnal (Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica - UNICENTRO);
- Calorímetro SDT Q600 - TA Instruments® (DEFIS - UNICENTRO);
- Capela de fluxo laminar vertical - Veco (Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica - UNICENTRO);
- Capela para exaustão de gases - Lucadema (Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica - UNICENTRO);
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência - Waters® Alliance a um detector de Arranjo de Diodo (DAD) e coluna Xterra C18 (125mm x 4mm; 5 μm) Waters (Milford, EUA) - (Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica - UNICENTRO);
- Difratômetro de Raios X - D2 PHASER - Bruker (DEQ – UNICENTRO);
- Dispersor Ultrasônico - Unique (Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica - UNICENTRO);
- Disruptor de células ultrasônico - Unique (Laboratório de Toxicologia Reprodutiva - UNICENTRO);
- Equipamento para análise do potencial zeta - ZetaSizer ZS, Malvern (DEQ - UNICENTRO);
- Equipamento para medida do espalhamento dinâmico da luz (*Dynamic Light Scattering)* - Brookhaven 90 Plus (Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica - UNICENTRO);
- Espectrômetro de Infravermelho IR200 FT-IR - Nicolet (Thermo Scientific, EUA) (DEQ - UNICENTRO);

- Estufa de CO_2 (Quimis®) (Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica - UNICENTRO);
- Evaporador rotatório TE 120 - Tecnal® (Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica - UNICENTRO);
- Incubadora de Bancada com Agitação Orbital Q816M22 - Quimis (Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica - UNICENTRO);
- Lavadora ultrasônica - Unique (Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica - UNICENTRO);
- Leitor de microplacas Spectra Max 190 - Molecular Devices (Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica - UNICENTRO);
- Liofilizador - Terroni (Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica - UNICENTRO);
- Membranas filtrantes (acetato de celulose 0,22 μm e PTFE 0,45 μm) - Millipore;
- Microscópio CX21 - Olympus® (Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica - UNICENTRO);
- Microscópio de varredura eletrônico com emissão de campo (MEV-FEG) - MIRA3 LM, Tescan Orsay Holding, Czech Republic (C-LABMU/PROPESP - UEPG);
- Osmose reversa laboratorial - Vexer Indústria e Comércio de Equipamentos LTDA;
- Pipetas monocanal - Labmate;
- Sistema de filtração por membranas;
- Sistema de ultrapurificação de água - MilliQ Gradiente Millipore®;
- Ultracentrifuga refrigerada Hermle - Z36HKl (Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica - UNICENTRO);

4.3. Metodologia

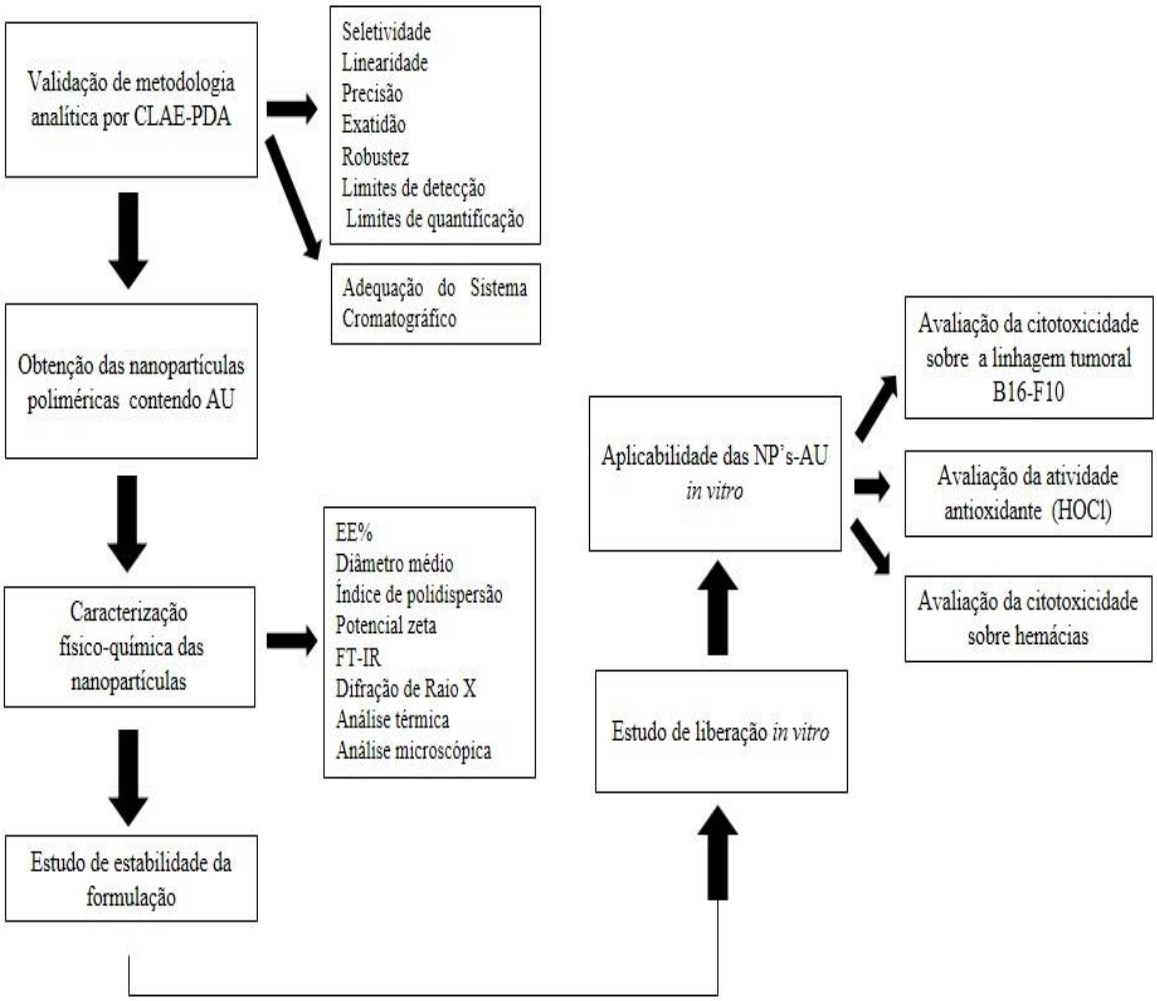
4.3.1. Desenho experimental

O presente trabalho iniciou-se pelo desenvolvimento e validação de um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de Arranjo de Diodo (DAD) a fim de se obter uma ferramenta que pudesse quantificar de maneira confiável e reprodutível a quantidade de AU presente nas amostras. Os parâmetros avaliados foram seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).

Em seguida as NP's de PLA contendo AU foram obtidas pela técnica de simples emulsificação-evaporação do solvente e caracterizadas por estudo de eficiência de encapsulação (EE%), diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta, espectroscopia na região do infravermelho, difração de raios X, análise térmica e análise microscópica. A estabilidade da formulação frente a diversas condições e o seu perfil de liberação também foram avaliados.

Posteriormente, a avaliação da citotoxicidade dos sistemas nanométricos foi conduzida frente a hemácias e células tumorais, e a atividade antioxidante das nanopartículas contendo AU foi determinada pelo ensaio de inativação do ácido hipocloroso (HOCl). As etapas descritas estão esquematizadas no fluxograma da Figura 7.

Figura 7. Fluxograma ilustrativo das etapas desenvolvidas nesta pesquisa.



4.3.2. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE para análise quantitativa de AU

Mediante a escassez de métodos analíticos validados úteis para quantificar o AU em sistemas nanoparticulados poliméricos, torna-se indispensável o desenvolvimento de um método analítico capaz de quantificar o AU presente no sobrenadante obtido através da ultracentrifugação da dispersão de nanopartículas e no meio dissolutor, utilizado na realização do ensaio de liberação *in vitro*. A validação forneceu confiabilidade ao método e consistiu na realização de uma série de procedimentos analíticos, preconizados pela resolução nº 899 de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, (ANVISA, 2003) e pelo ICH *topic Q2 (R1): Validation of analytical procedures: methodology* (ICH, 2005).

O método foi desenvolvido utilizando-se CLAE, acoplado a um detector de Arranjo de Diodo (DAD), primeiramente foram definidas as características cromatográficas, tais como: composição da fase móvel, tipo de fase estacionária, comprimento de onda de detecção e tipo de eluição. Os padrões utilizados nas análises foram preparados em metanol, em triplicata, a partir de uma solução padrão de AU na concentração de 1,0 $mg.mL^{-1}$. A validação seguiu os seguintes parâmetros:

- Seletividade: para atender este parâmetro analítico, o método precisa ser capaz de medir de modo inequívoco um analito em presença de outros componentes, tais como impurezas, componentes da matriz e produtos de degradação. Considerando, portanto o poli (álcool vinínilico) (PVA), e o tampão fosfato de sódio salino (PBS 50 mM, pH 7,4) adicionado de 5% de Tween 80, como possíveis interferentes, foram realizados testes com o sobrenadantes das nanopartículas controle negativo (nanopartículas não carregadas com o AU) e com o PBS-5% Tween 80 para análise do tempo de retenção e característica do possíveis picos formados, comparando-os com cromatogramas das amostras contendo AU. Nenhum pico interferente deve ser observado no mesmo tempo de retenção do AU.

- Linearidade: é a capacidade do método analítico de demonstrar que os resultados obtidos são proporcionais à concentração do analito na amostra, num intervalo especificado. Observando esse parâmetro, foi construída uma curva analítica (área do pico *versus* concentração) a partir de 8 (oito) concentrações 10, 20, 30, 40, 50, 60 80 e 100 $\mu g.mL^{-1}$, derivadas da solução padrão de AU. Os resultados foram tratados estatisticamente para determinação da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e coeficiente de

correlação (r), a fim de estimar a qualidade da curva e, por conseguinte sua linearidade no intervalo testado. O r deve ser superior a 0,99 e nenhum desvio superior a 1% entre as réplicas de cada ponto da sua curva.

- **Precisão:** consiste na habilidade do método em reproduzir os mesmos resultados sempre que o procedimento for executado, ou seja, é a avaliação da proximidade dos resultados em uma série de medidas de uma mesma amostra. A precisão foi comprovada por dois métodos, intra-corrida (repetibilidade) e inter-corridas (precisão intermediária). No primeiro, avaliou-se três níveis de concentração (10, 50 e 100 $\mu g.mL^{-1}$) em triplicata no mesmo dia, e em curto espaço de tempo entre as leituras. A precisão intermediária foi observada através da análise dos padrões, em triplicata por três dias diferentes. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR). Para critério de aceitação, nenhum DPR maior que 5% deve ser observado em cada nível de concentração.

- **Exatidão:** é a

proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão para o presente estudo foi determinada através de três padrões de concentrações conhecidas, baixa (10 $\mu g.mL^{-1}$), média (50 $\mu g.mL^{-1}$) e alta (100 $\mu g.mL^{-1}$), com três réplicas cada. Os resultados encontrados foram expressos em DPR e porcentagem de recuperação que foi calculada pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente. A porcentagem de recuperação deve ficar entre 95 e 105%, e o DPR não deve ultrapassar 5%.

- **Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ):** LD é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que poder ser detectado, porém, não necessariamente quantificado. LQ é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantificado com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais estabelecidas. Para a análise dos limites foi construída uma curva analítica própria utilizando concentrações de: 0.5, 2, 4, 6, 8 e 10 $\mu g.mL^{-1}$ em triplicatas. O LD e LQ foram estabelecidos utilizando os valores da inclinação da curva (*slope*) e o desvio-padrão do intercepto com eixo y, de acordo com as seguintes equações respectivamente, conforme recomenda a ANVISA e o ICH (ANVISA, 2003; ICH, 2005):

LD = σ/*b* x 3,3	Equação 1

LQ = σ/*b* x 10	Equação 2

Onde:

σ = desvio padrão médio do intercepto y.

b = inclinação da curva analítica.

- Robustez: é a medida da capacidade do método em resistir a variações dos parâmetros analíticos. Para testar este parâmetro, variações arbitrárias foram empregadas: alteração no fluxo móvel (de 1 $mL.min^{-1}$ para 0,9 $mL.min^{-1}$ e 1,1 $mL.min^{-1}$) e alteração nas proporções da fase móvel (de 90:10 para 89:11 e 91:09). Para estas análises foram utilizados os padrões de AU em concentrações de 10, 50 e 100 $\mu g.mL^{-1}$, em triplicata. O resultado deste ensaio foi determinado por meio da porcentagem de recuperação e DPR.

4.3.2.1. Adequação do sistema cromatográfico desenvolvido

A adequabilidade do sistema foi avaliada por análise de seis replicatas dos padrões (50 $\mu g.mL^{-1}$). Os parâmetros de adequação do sistema foram estudados para verificar o desempenho do mesmo, fatores tais como o número de pratos teóricos, o fator de cauda e o fator de capacidade foram levados em consideração.

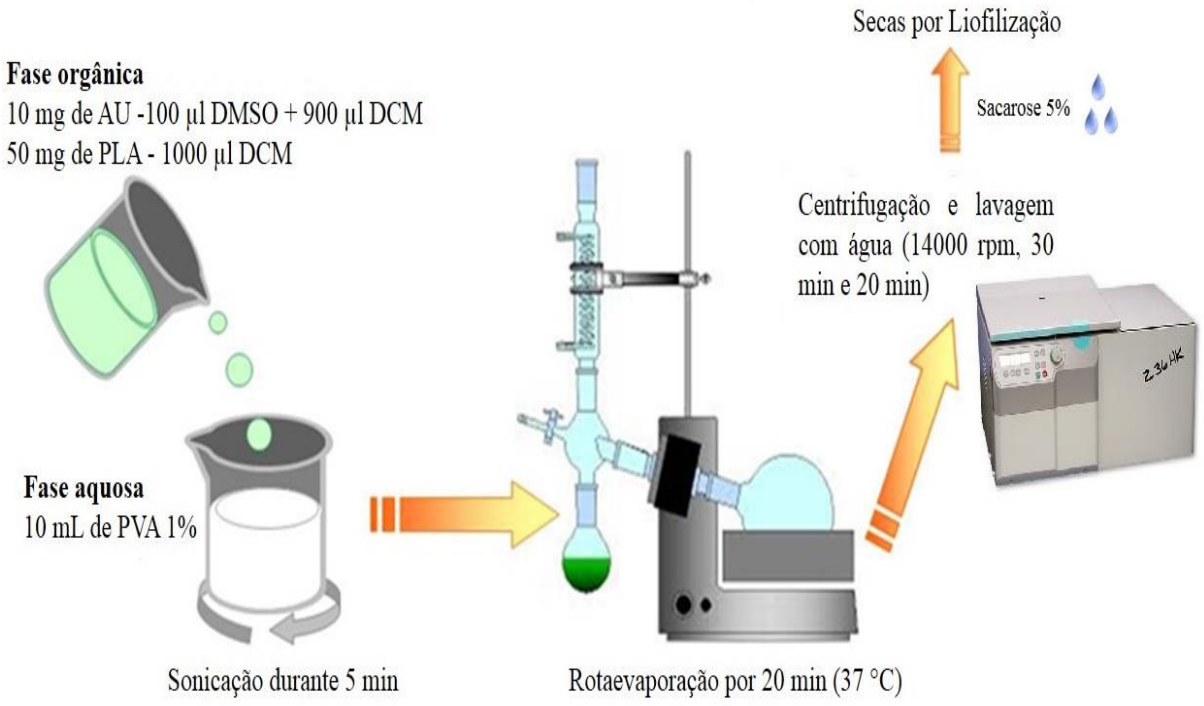
4.3.3. Obtenção das nanopartículas de PLA contendo AU

A escolha do método levou em consideração alguns critérios como, o tipo do polímero utilizado, características físico-químicas do fármaco, tamanho de partículas desejado e a área de aplicação do sistema. Sendo assim, optou-se por utilizar a técnica de emulsificação-evaporação do solvente, a partir de uma emulsão simples óleo em água (O/A) (Figura 8) (VANDERHOFF, EL AASSER, UGELSTAD, 1979; REIS et al., 2006; RAO, GECKELER, 2011).

Para isso, 10 mg de AU foi exatamente pesado e diluído em 100 µL de DMSO e 900 µL de diclorometano. Em seguida, foi adicionado 50 mg de PLA diluído em 1 mL de

diclorometano, constituindo a fase orgânica da emulsão. Esta foi vertida na fase aquosa, contendo 10 mL de PVA na concentração de 1% (p/v), sob sonicação à temperatura ambiente durante 5 min, obtendo-se uma emulsão O/A. Posteriormente, os solventes orgânicos da emulsão foram removidos rapidamente por rotaevaporação a 37 °C (20 min). As partículas foram então recuperadas por 2 processos de ultracentrifugação (14000 rpm, 30 min e 20 min, 4°C), os quais incluíram lavagem com água para remover o tensoativo. Por fim, as nanopartículas foram dispersas no crioprotector sacarose a 5% (p/v, aproximadamente 200 μL), e a nanosuspensão resultante foi subsequentemente congelada a -18 °C e liofilizada, enquanto que o sobrenadante resultante foi armazenado para posterior análise. As nanopartículas vazias (sem AU) foram produzidas da mesma forma, com exceção da adição de AU.

Figura 8. Esquema ilustrativo do método utilizado para obtenção das NP's.



4.3.4. Caracterização físico-química do sistema obtido

4.3.4.1. Diâmetro médio e índice de polidispersão das partículas

A determinação do diâmetro médio das nanopartículas e sua distribuição, foram realizadas pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons também conhecida como *Dynamic Light Scattering*.

Uma alíquota das suspensões de nanopartículas foi diluída em água ultrapura (1:100, v/v) e inserida em uma cubeta. Essa diluição é necessária porque em dispersões concentradas as partículas apresentam movimento Browniano mais lento, levando ao cálculo de um diâmetro maior que o real, gerando um resultado falso. A cubeta foi colocada na câmara de análise e a amostra analisada com ângulo de espalhamento de 90º, em temperatura ambiente e comprimento de onda de 659 nm. Os lotes de nanopartículas foram analisados e os resultados expressos como média e DP.

4.3.4.2. Determinação da eficiência de encapsulação

A determinação da concentração de fármaco incorporado às nanopartículas é bastante complexa devido ao seu tamanho reduzido, o que acaba por dificultar a separação do fármaco incorporado do fármaco livre. Devido à isso, uma técnica de separação frequentemente utilizada é a ultracentrifugação, que permite quantificar a fração de fármaco livre presente no sobrenadante (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Dessa maneira, o AU incorporado às nanopartículas de PLA, foi determinado indiretamente por CLAE/DAD, pelo método previamente validado. Para isso, uma alíquota do sobrenadante contendo o fármaco livre, foi diluída (1:10) em metanol, filtrada em membrana de poro 0,22 μm e injetada no sistema cromatográfico. As análises foram realizadas em triplicata.

Através deste procedimento estipulou-se a concentração de AU não incorporada às nanopartículas. Subsequentemente, a eficiência de encapsulação (EE) foi calculada de acordo com a Equação 3:

$$E.E.\% = AU_{inicial} - AU_{livre} / AU_{inicial} \times 100 \qquad \text{Equação 3}$$

Onde, $AU_{inicial}$ corresponde à quantidade de AU adicionada inicialmente à formulação e, AU_{livre} é a quantidade do fármaco não incorporado à partícula, quantificado pelo método analítico. Os valores de eficiência de encapsulação (E.E%) foram expressos por média e DP.

4.3.4.3. Potencial zeta

O potencial zeta das dispersões de nanopartículas em água foi determinado a partir da mobilidade eletroforética por Anemometria Laser Doppler. As amostras foram acondicionadas em uma célula eletroforética a 25 °C, onde estabeleceu-se um potencial de ±150 mV. Foram realizadas para cada amostra 3 determinações do potencial zeta, calculando-se a média e o DP.

4.3.4.4. Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Para identificação dos principais grupamentos presentes nas nanopartículas, foi realizada a análise por FT-IR. As amostras foram finamente homogeneizadas, compactadas com brometo de potássio (KBr), e comprimidas em prensa hidráulica para obtenção de pastilhas, as quais foram analisadas em um intervalo de 4000 a 400 cm^{-1}.

Os espectros das nanopartículas de PLA contendo AU foram analisados e comparados frente aos espectros obtidos do polímero, do fármaco e das nanopartículas vazias.

4.3.4.5. Difração de Raios X (DRX)

As informações sobre a cristalinidade dos materiais presentes nas nanopartículas foram obtidas através da análise de DRX. Os dados foram adquiridos através de um difratômetro que utiliza radiação Kα do Cu (λ= 1,5418 Å). A tensão e corrente aplicadas foram respectivamente 30 kV e 10 mA. As amostras foram acondicionadas em um suporte de vidro e analisadas em ângulo aberto de 2θ entre 5 e 60º, com uma velocidade de aquisição de $1^{o}.min^{-1}$.

Os difratogramas foram obtidos a partir de amostras de AU livre, do polímero PLA, da formulação de nanopartículas de PLA contendo AU e da formulação correspondente não carregada.

4.3.4.6. Análise térmica

Para o ensaio de DSC e TGA as amostras foram pesadas em cadinho de alumina (10 mg) e aquecidas em atmosfera de nitrogênio, de 30 a 450 ºC, numa razão de aquecimento

de 10 ºC.min^{-1} e com vazão de 100 mL.min^{-1}. A célula de DSC foi calibrada e/ou verificada antes dos ensaios no eixo de temperatura utilizando padrões de zinco, oxalato de cálcio e safira.

Foram analisados o AU e o PLA puro, os quais foram comparados com os dados obtidos para nanopartículas de PLA vazias e preenchidas com AU

4.3.4.7. Análise microscópica

A avaliação morfológica das nanopartículas foi realizada em um microscópio de varredura eletrônico com emissão de campo (MEV-FEG), empregando voltagem de aceleração de 15,0 kV. As nanopartículas de PLA contendo AU em suspensão aquosa foram fixadas em suporte metálico (*stubs*) e levadas à estufa para secagem completa, e formação de um filme. Como a amostra não é condutora, esta foi submetida à metalização com ouro usando um equipamento de recobrimento com 10 mA por 2 min. As micrografias foram obtidas com aumentos de 40 e 88 mil vezes.

4.3.5. Avaliação da estabilidade das nanopartículas contendo AU

A avaliação da estabilidade físico-química das NP's sob diferentes condições de armazenamento é de fundamental importância. O tamanho da partícula, o índice de polidispersão, o potencial zeta e a concentração do fármaco são geralmente os parâmetros físico-químicos que podem ser utilizados para monitorar sua estabilidade. Para isso, 3 lotes de nanopartículas contendo AU foram ressuspensos em água purificada, armazenados à temperatura ambiente, sob refrigeração (8 °C) ou em freezer (-12 °C).

As amostras foram caracterizadas logo após o preparo e em intervalos regulares, até completar 6 meses de armazenamento. Foram realizadas análises macroscópicas das formulações, além de diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta. Além disso, as amostras foram centrifugadas a 15500 rpm por 15 min, e o sobrenadante foi analisado pelo método validado para mensurar a taxa de liberação do AU a partir das nanopartículas. O precipitado foi novamente ressuspenso em água e as NP's armazenadas na temperatura em questão. As comparações estatísticas foram realizadas por ANOVA (intervalo de confiança 95%), com pós-teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

4.3.6. Estudo de liberação *in vitro*

4.3.6.1. Estudo da solubilidade do AU no meio receptor

Os estudos de liberação devem ser conduzidos em condições *sink*, a fim de garantir que não ocorra a saturação do meio. Assim sendo, a solubilidade do AU nos possíveis receptores foi previamente avaliada.

Para o teste de solubilidade foram preparadas soluções saturadas de AU em um volume definido (10 mL) de: (a) PBS Tween 1% pH 7,4; (b) PBS Tween 5% pH 7,4; (C) PB PVA 1% pH 7,4; (d) PB PVA 5% pH 7,4; (e) solução Lauril Sulfato de Sodio 2,5%. Essas suspensões foram mantidas sob agitação (150 rpm) a temperatura de 37 ± 1 ºC, durante um período prolongado (48 h) para que o equilíbrio fosse atingido. Após esse período, as suspensões foram centrifugadas (15500 rpm, 30 min), filtradas (0,45 µm) e diluídas em metanol para uma faixa de concentração linear (STAVCHANSKY, PADE, 1998; LARA, 2008). A concentração do AU solúvel no líquido receptor foi determinada pelo método analítico validado e calculada através da curva analítica. Este procedimento foi realizado em triplicata.

4.3.6.2. Perfil de liberação *in vitro*

As nanopartículas de PLA contendo AU foram submetidas ao teste de liberação *in vitro* pelo método de agitação em shaker, com posterior ultracentrifugação (CASA et al., 2015). Amostras contendo aproximadamente 650 µg de AU encapsulado foram diluídas em 12 mL de solução tampão PBS (50 mM, pH 7,4), contendo 5% de Tween 80. As dispersões foram incubadas (37 ± 1 ºC, 150 rpm) em um agitador do tipo shaker. Nos tempos predeterminados (0.5, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96 e 120 h) as dispersões foram ultracentrifugadas (15500 rpm, 4 ºC, 15 min) e os sobrenadantes coletados e analisados pelo método analítico validado. O precipitado foi ressuspenso em PBS contendo 5% de Tween 80 e retornado à agitação. A partir dos resultados calculados, uma curva do percentual cumulativo do AU liberado em função do tempo foi plotada.

A fim de se obter informações sobre o mecanismo de liberação do AU a partir das nanopartículas, os dados de liberação foram analisados de acordo com os modelos matemáticos de ordem zero, primeira ordem, segunda ordem e Higuchi, além do expoente *n* de liberação segundo o modelo Peppas (RITGER, PEPPAS, 1987). As expressões matemáticas que descrevem os modelos utilizados encontram-se resumidas na Tabela 1.

Tabela 1. Equações matemáticas para os modelos utilizados para descrever as características de liberação de nanopartículas de PLA carregadas com AU.

Modelo	Equação	Parâmetros de definição
Zero Ordem	$Qt = Q_0+K_0t$	**Qt =** quantidade de fármaco dissolvido no tempo **t**; **Q_0** = quantidade inicial de fármaco na solução;
Primeira Ordem	$\ln Qt = \ln Q_0+K_1t$	**t** = tempo do ensaio; **K_0** = constante de ordem zero; **K_1** = constante de primeira ordem;
Segunda Ordem	$Q_t /Q_\infty (Q_\infty - Q_t)K_2t$	**K_2** = constante de segunda ordem; **K_H** = constante de Higuchi;
Higuchi	$Qt=k_H\sqrt{t}$	**Q_∞** = fração de droga liberada em tempo infinito; **a** = constante de velocidade de liberação;
Korsmeyer-Peppas	$Qt/Q_\infty = at^n$	**n** = expoente de liberação, que é indicativo do mecanismo de liberação.

4.3.7. Aplicabilidade das nanopartículas

4.3.7.1. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas de PLA contendo AU sobre hemácias

O protocolo de experimento da avaliação de citotoxicidade frente a hemácias humanas foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética Humana da Universidade Estadual do Centro-Oeste, sob registro nº 1.174.406/2015 (Anexo 1).

Para estudar o efeito citotóxico *in vitro* do AU e das nanopartículas de PLA, foram coletados 10 mL de sangue total de três indivíduos voluntários adultos sadios. O

sangue coletado foi adicionado em tubo de vidro contendo 10 µL de heparina sódica e homogeneizado. Em seguida foi centrifugado (10 min a 2500 rpm) e o plasma e a camada de leucócitos foram retirados por aspiração e descartados. A suspensão de hemácias foi lavada, por três vezes, com solução de tampão PBS 10 mM, pH 7,4. Ao final da terceira lavagem as hemácias foram ressuspensas em PBS 10 mM, pH 7,4, acrescidos de glicose (1,08 $mg.mL^{-1}$) e dos antibióticos penicilina (0,3 $mg.mL^{-1}$) e estreptomicina (0,5 $mg.mL^{-1}$), acertando-se o volume globular para 2% (CRUZ SILVA et al., 2000).

Para o ensaio, diferentes concentrações do AU livre e nanoencapsulado (25, 50 e 100 $\mu g.mL^{-1}$) foram incubadas com suspensão de hemácias a 2%, por 4, 8, 24, 48 e 72 h, a temperatura de 37 ± 1 ºC, sob constante homogeneização. Foram realizados controles com água destilada, PBS 10 mM (pH 7,4), etanol e nanopartículas vazias de PLA.

Após os tempos predeterminados, as soluções foram centrifugadas (2500 rpm a 4 ºC por 5 min) e a citotoxicidade foi avaliada pelo conteúdo de hemoglobina liberado, o qual foi determinado no sobrenadante por meio da medida da absorbância em 540 nm, no leitor de microplacas (CRUZ SILVA et al., 2001). A análise foi efetuada em triplicata e os dados foram exibidos em percentual de hemólise, o qual foi calculado de acordo com a Equação 4:

$\% \text{ Hemólise} = (Abs_a / Abs_{cp}) \times 100$	Equação 4

Onde:

Abs_a: absorbância da amostra

Abs_{cp}: absorbância do controle positivo, o qual apresentou 100% de hemólise, que no estudo correspondeu a amostra incubada com água destilada.

As comparações estatísticas foram realizadas por ANOVA de uma via, com pós-teste Tukey, com 95% de confiança. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

4.3.7.2. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas de PLA contendo AU sobre linhagem tumoral B16-F10

Para os ensaios de citotoxicidade foram utilizadas células da linhagem B16-F10 (Melanoma murino), as quais foram mantidas em garrafas de poliestireno em meio de cultura

Dulbecco modificado por Iscove's, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 $U.mL^{-1}$ de penicilina e 10 $\mu g.mL^{-1}$ de estreptomicina, a 37 °C em atmosfera úmida, contendo 5% de CO_2.

Em ambiente estéril e com materiais estéreis, foram realizados repiques semanais, utilizando tripsina para manter a viabilidade celular, de modo que a cada repique uma concentração de 2 x 10^5 $células.mL^{-1}$ foi mantida. A viabilidade celular foi analisada pelo método de exclusão do Azul de Tripan 0,4% (HARRISON, RAE, 1997), com contagem em câmara de Newbauer. O azul de Tripan é um corante que é incorporado seletivamente pelas células mortas nas quais a integridade da membrana celular é danificada. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada pela seguinte equação:

% Viabilidade = (n° células não coradas / n° total de células) x 100	Equação 5

Para o ensaio citotóxico, 200 µL de uma suspensão com 2 x 10^4 $células.mL^{-1}$ foram semeadas em placas de 96 poços, e incubadas por 24 h a 37 °C, com 5% de CO_2, para adesão celular. Após as 24 h, o meio de cultura foi substituído pelas diluições seriadas da solução do fármaco livre e das dispersões de nanopartículas e completou-se os volumes para 200 µL com meio Iscove's. As concentrações finais utilizadas de AU livre e nanoencapsulado foram de 31,25; 15,62; 7,81; 3,9; 1,95; 0,97 $\mu g.mL^{-1}$. Foram realizados também, os controles com o meio Iscove's, solventes (metanol e DMSO) e nanopartículas de PLA vazias. As células foram incubadas nos tempos de 24, 48 e 72 h a 37 °C, com 5% de CO_2. Após os tempos de incubação, o meio foi retirado e em seguida adicionado 50 µL de MTT (1$mg.mL^{-1}$) (brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazólio), e deixado em incubação por 3 h. A técnica empregada do MTT baseia-se na sua redução, sendo que o MTT é um corante amarelo que quando reduzido por células com integridade mitocondrial (principalmente a atividade das desidrogenases) se transforma em um composto azul, a formazana. A quantidade de formazana pode ser determinada espectroscopicamente após solubilização em etanol absoluto (DENIZOT, LANG, 1986). Após as três horas de incubação, o MTT foi retirado e adicionou-se 50 µl de etanol, para diluição dos cristais e 150 µl de uma mistura de PBS pH 7,4 com álcool isopropílico na proporção 1:2. A absorbância proveniente da solução resultante de cada poço da placa foi lida em leitor de placas nos comprimentos de onda de 570 nm e 630 nm.

A leitura dos poços foi realizada em dois comprimentos de onda, para posterior subtração para obtenção do valor real, pois a formazana possui absorção em 570 nm e as

células viáveis presentes nos poços causam uma turvação observada em 630 nm. A viabilidade celular foi calculada usando a equação 6 (MENEZES et al., 2007):

Viabilidade (%): $(Abs_a / Abs_c) \times 100$	Equação 6

Onde: Abs_a: absorbância da amostra

Abs_c: absorbância do controle

As comparações estatísticas foram realizadas por ANOVA de uma via com 95% de confiança, com pós teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

4.3.7.3. Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante das nanopartículas de AU

O rastreamento da atividade antioxidante foi analisado por meio do estudo de inibição do ácido hipocloroso (HOCl), que foi preparado imediatamente antes da utilização, por meio da adição de 50 µL de uma solução de hipoclorito de sódio em 10 mL de água pH 12. A concentração de hipoclorito foi determinada espectrofotometricamente a 292 nm antes de sua utilização ($\varepsilon_{292nm} = 350\ M^{-1}\ cm^{-1}$) (MORRIS, 1996).

Alíquotas de diferentes concentrações do AU livre ou nanoencapsulado (10, 20, 30 e 50 $\mu g.mL^{-1}$) e nanopartículas brancas foram incubadas em temperatura controlada de 37 °C com agitação de 150 rpm. Em tempos determinados (0, 24, 48, 72 e 96 h), alíquotas das amostras foram adicionadas ao HOCl (50 µM) e completado com tampão fosfato (50 mM, pH 7,4) até o volume final de 200 µL. Após 15 min de incubação a 37 ºC e 150 rpm, foi adicionado à reação 20 µl de uma solução contendo 10 $mmol.L^{-1}$ de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) dissolvida em dimetilformamida 50%, 100 $\mu mol.L^{-1}$ de iodeto de potássio e 400 $mmol.L^{-1}$ de ácido acético (DYPBUKT et al., 2005). Passados 5 minutos, a absorbância foi medida a 650 nm em um leitor de microplacas. Como controle foi utilizado a solução tampão na presença do HOCl. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e a porcentagem de inibição foi calculada pela Equação 7.

% de inibição = $(Abs_c - Abs_a) / Abs_c \times 100$	Equação 7

Onde Abs_c é a absorção de controle e Abs_a é a absorção da amostra. Os dados foram analisados com teste t' student e diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Validação do método analítico para quantificação do AU nas nanopartículas

5.1.1. Desenvolvimento do método cromatográfico

Alguns métodos analíticos já foram desenvolvidos, principalmente para avaliar e quantificar o AU em plantas (XU, SU, ZANG, 2012; LI et al., 2011; KONTOGIANI et al., 2009) e também em algumas formulações de dispersões sólidas (ELOY et al., 2012). Porém para NP's, poucos são os estudos que relatam análise quantitativa do AU (ZHANG et al., 2013; ZHANG et al., 2015). Tais métodos apenas mencionam as condições cromatográficas, porém não apresentam a validação. Diante desse contexto justificou-se o desenvolvimento e validação de um método analítico capaz de quantificar o AU nas nanopartículas.

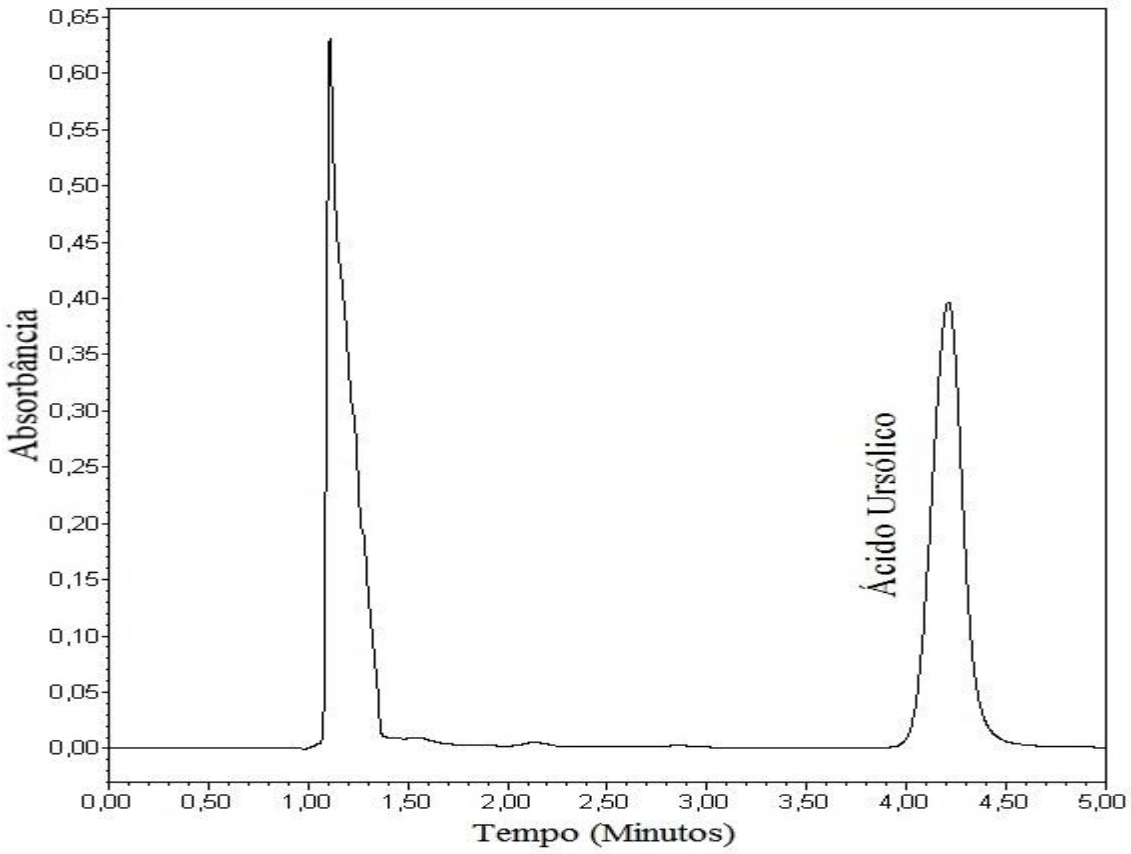
Os parâmetros cromatográficos iniciais utilizados para desenvolver o método foram baseados nos dados de revisão bibliográfica (XU, SU, ZANG, 2012; ELOY et al., 2012). Para isso foi utilizada um coluna Xterra Waters C18 (125 mm x 4mm; 5µm) mantida a 25 ºC. Os testes iniciais contemplaram diferentes proporções de metanol e água, tais como 95:05, 90:10, 85:15 v/v, entretanto não se obteve um bom perfil cromatográfico. Nesse sentido substituiu-se a água por água acidificada com 0,5% de ácido acético, entretanto nenhum melhora foi observada. Visando obter um perfil cromatográfico e curto tempo de corrida, substituiu-se o metanol por acetonitrila. Várias proporções de acetonitrila e água foram avaliadas (95:05, 85:15, 80:20 v/v) porém a com 90:10 v/v promoveu a obtenção de picos estreitos e simétricos. A detecção incialmente foi realizada em quatro comprimentos de onda, 200, 203, 210 e 215 nm. Porém, observou-se que o comprimento de onda de 203 nm foi o mais apropriado, sendo posteriormente utilizado nas análises. Os parâmetros cromatográficos definidos para o método estão descritos na Tabela 2.

A fase móvel estipulada mostrou-se eficaz na quantificação do AU, já que resultou em um pico simétrico, conforme demonstrado na Figura 9, além de um tempo reduzido de corrida para leitura das amostras, o que constituiu um dos pontos positivos encontrados nesta validação, pois idealmente se deseja que a corrida analítica seja mais breve possível, usando menores quantidades de solvente orgânico, com consequências diretas para a redução do custo das análises.

Tabela 2. Condições cromatográficas utilizadas para validação do método analítico em CLAE.

Parâmetros	
Fase móvel	Acetonitrila: água – 90:10 (v/v)
Vazão da fase móvel	1,0 mL.min^{-1}
Tipo de eluição	Isocrática
Detector	DAD
Coluna	Fase reversa C18 (125 mm x 4 mm) tamanho de partícula 5µm – Xterra Waters.
Temperatura da Coluna	25 ºC
Comprimento de onda	203 nm
Volume de injeção	60 µL
Tempo de retenção	4,2 min

Figura 9. Cromatograma da solução padrão de AU em metanol (50 µg.mL^{-1}) em função do tempo (min). Fase móvel acetonitrila: água (90:10 v/v), fluxo de 1 mL.min^{-1}, detecção no comprimento de onda de 203 nm, temperatura da coluna de 25 °C, volume de injeção de 60 µL**.**



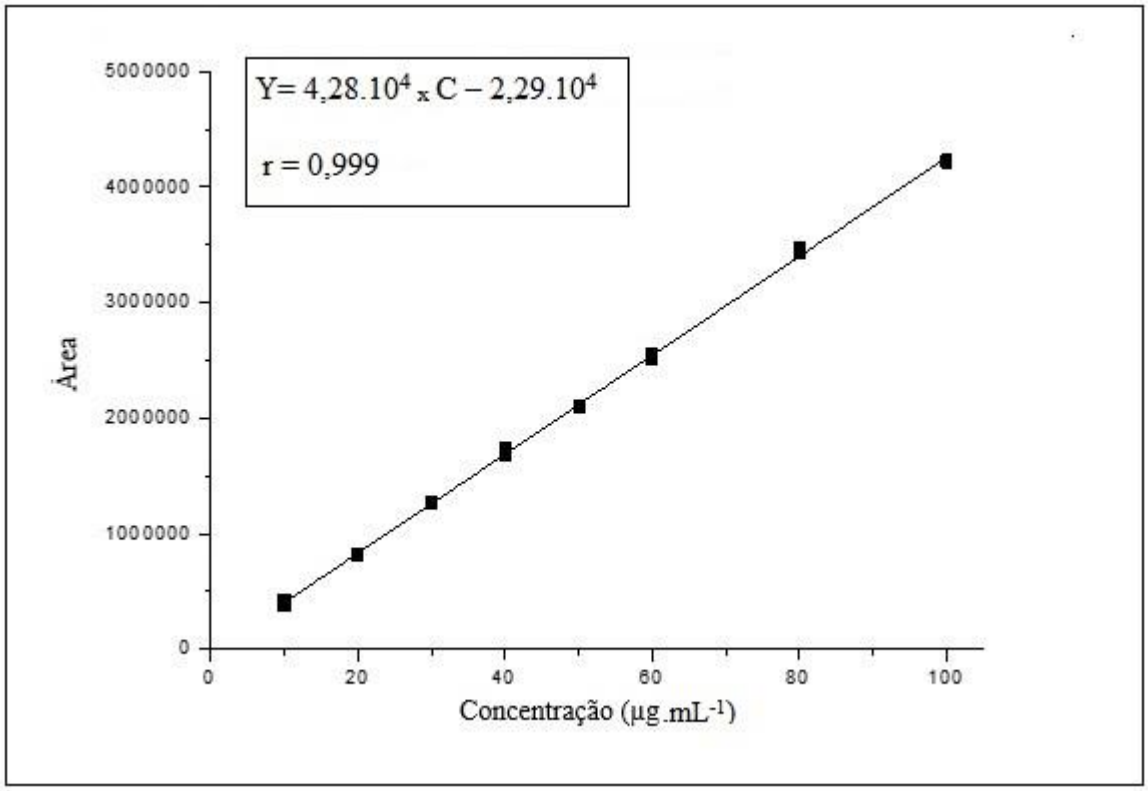
5.1.2. Validação do método

5.1.2.1. Linearidade

A curva analítica foi obtida a partir de oito níveis de concentração (10 a 100 $\mu g.mL^{-1}$), intervalo no qual foi observada a linearidade do método analítico, conforme demonstrado na Figura 10.

Além dos coeficientes de regressão (*a* e *b*) dados pela equação $Y= 4{,}28.10^4 \times C - 2{,}29.10^4$, foi obtido o coeficiente de correlação (r) de 0,999. Este é um resultado importante, uma vez que esse parâmetro indica a qualidade da curva analítica, pois quanto mais próximo a 1 o r, menor a dispersão dos pontos experimentais e mais confiável será a determinação das concentrações dos analitos a partir do método estabelecido (RIBANI, 2004). A validade do teste foi confirmada por uma análise de variância, que mostrou que a regressão linear foi significativa e o desvio da linearidade não foi significativo ($p < 0{,}01$).

Figura 10. Curva analítica de AU em metanol (área do pico *versus* concentração de AU). Fase móvel acetonitrila: água (90:10 v/v), λ: 203 nm (n=3). A equação da reta e o coeficiente de correlação (r) são relatados.

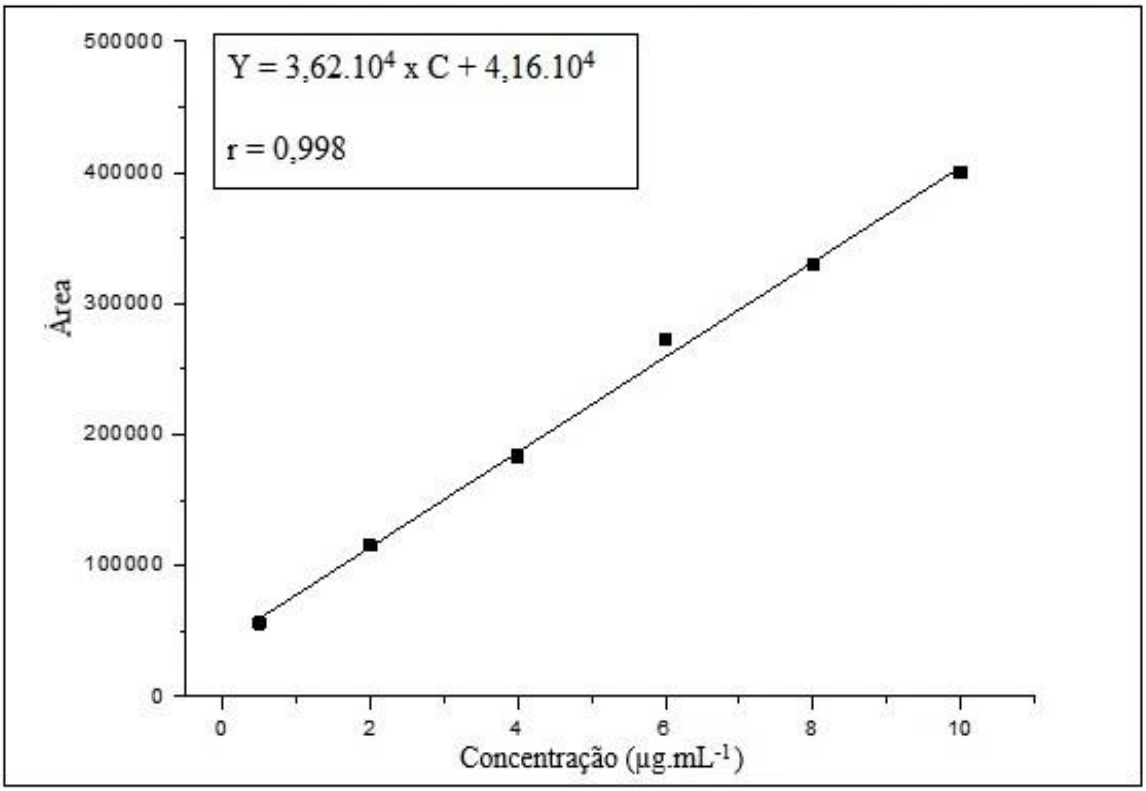


5.1.2.2. Limite de detecção e limite de quantificação

Os LD e LQ foram calculados empregando-se as equações 1 e 2, a partir de uma curva de calibração específica com seis níveis de concentrações (0,5 a 10 $\mu g.mL^{-1}$), a qual é apresentada na Figura 11. O método foi linear neste intervalo (r = 0,998).

O LD foi de 0,50 $\mu g.mL^{-1}$ e o LQ foi de 1,53 $\mu g.mL^{-1}$, valores que apesar de não serem tão baixos denotam sensibilidade do método e confiabilidade para análises de concentrações baixas de analito, como é o caso da quantificação de AU no sobrenadante das nanopartículas e detecção em ensaios de liberação prolongada. Os limites obtidos através do cálculo foram confirmados experimentalmente. Valores muito próximos a esses também foram encontrados por Eloy e colaboradores (2012).

Figura 11. Curva analítica para o LD e LQ (área do pico *versus* concentração de AU). Fase móvel acetonitrila: água (90:10 v/v), λ: 203 nm (n=3). A equação da reta e o coeficiente de correlação (r) são relatados.



5.1.2.3. Precisão

Três concentrações de AU (10, 50 e 100 $\mu g.mL^{-1}$) foram preparadas cuidadosamente e analisadas com o método proposto em um dia ou três dias diferentes, com a finalidade de avaliar a variação intra-corrida e inter-corridas, respectivamente. Os desvios

padrão relativos das respostas foram calculados em cada caso, e podem ser visualizados na Tabela 3.

Tabela 3. Avaliação da precisão do método analítico para quantificação de AU através da análise da variação intra e inter-corridas.

Solução padrão (μg.mL^{-1})	Concentração quantificada ± DP (μg.mL^{-1})	DPR (%)
	Análise intra-corrida (n=3)	
10	9,75 ± 0,03	0,38
50	50,17 ± 0,39	0,79
100	99,31 ± 0,38	0,39
	Análise inter-corridas (n=3)	
Dia 1		
10	9,75 ± 0,03	0,38
50	49,86 ± 0,25	0,49
100	99,31 ± 0,39	0,39
Dia 2		
10	10,80 ± 0,35	3,21
50	50,30 ± 0,66	1,31
100	100,86 ± 0,96	0,96
Dia 3		
10	10,40 ± 0,22	2,14
50	50,80 ± 0,69	1,35
100	100,23 ± 1,14	1,14

Os resultados confirmaram a precisão, já que segundo a Resolução da ANVISA e Guia internacional de validação analítica, o DPR para a precisão não deve exceder 5%. Assim, pode-se observar que os valores encontrados (valor máximo de 3,21%) estão de acordo com o preconizado para este parâmetro nos dois níveis avaliados.

5.1.2.4. Exatidão

Soluções controle de 10, 50 e 100 μg.mL^{-1} foram preparadas cuidadosamente e analisadas com o método proposto. Os resultados detalhados estão apresentados na Tabela 4.

A porcentagem média de recuperação de AU para as amostras foi de 98,86 ± 0,42%, (n = 9). Esses dados demonstraram a concordância entre os valores experimentais e os teóricos, com critério de aceitação compreendido entre os valores de 95 e 105% de recuperação, o que indica que o método é exato para a faixa de concentração empregada.

Tabela 4. Avaliação da exatidão do método analítico para quantificação de AU.

Solução padrão (µg.mL^{-1})	Recuperação (%)	DPR (%)
10 (n=3)	97,55	0,39
50 (n=3)	99,72	0,49
100 (n=3)	99,31	0,39

5.1.2.5. Robustez

A fim de testar a capacidade do método em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos, algumas alterações no método cromatográfico foram aplicadas, como: alterações no fluxo de vazão do aparelho (0,9 e 1,1 mL.min^{-1}) e alterações da fase móvel (89:11 e 91:09). A robustez foi avaliada com base na porcentagem de recuperação e DPR, que está detalhado na Tabela 5.

Tabela 5. Porcentagem de recuperação e DPR obtido nas análises de robustez após modificações nas condições originais do método.

Modificações no método original	Porcentagem de recuperação ± DPR		
	10 µg.mL^{-1}	50 µg.mL^{-1}	100 µg.mL^{-1}
Fluxo 0,9 mL.min^{-1}	101,31 ± 0,92	103,85 ± 1,67	102,18 ± 1,52
Fluxo 1,1 mL.min^{-1}	96,97 ± 2,17	98,86 ± 0,81	100,48 ± 0,34
Fase móvel 89:11	98,35 ± 1,18	101,02 ± 0,72	100,52 ± 0,36
Fase móvel 91:09	104,49 ± 3,11	104,32 ± 2,99	103,45 ± 3,40

Os resultados mostraram que o método analítico desenvolvido e validado se revelou robusto frente as alterações na vazão e composição da fase móvel, já que para todas as

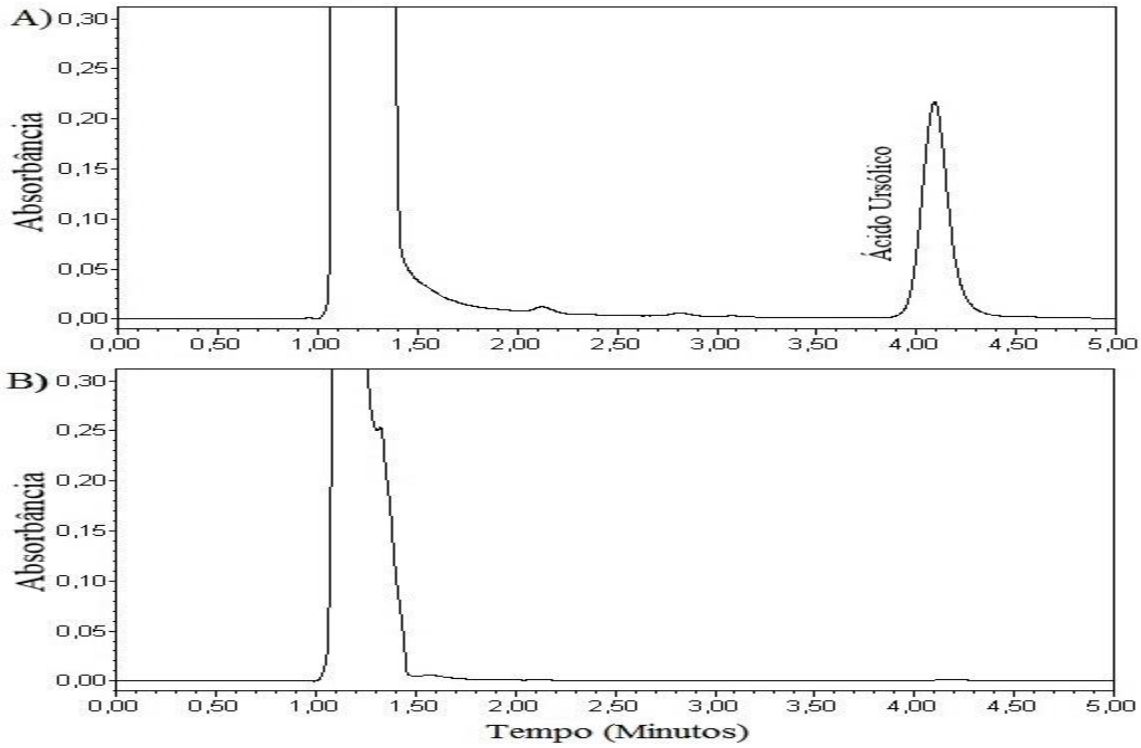
condições avaliadas o método demonstrou pequenas variações e manteve uma porcentagem de recuperação entre 96,97 e 104,49%, além do DPR máximo de 3,4 %.

5.1.2.6. Seletividade

Alguns componentes da formulação, ou de outros testes que necessitem posterior quantificação do AU, podem interferir no momento da leitura, uma vez que podem aparecer picos indesejáveis no mesmo tempo de retenção do AU. Um possível interferente na quantificação indireta do AU a partir de nanopartículas é o PVA, pois permanece no sobrenadante após a etapa de centrifugação no desenvolvimento das partículas. Para tanto, as nanopartículas controle negativo foram preparadas como descrito na seção 4.3.3 e o sobrenadante obtido após centrifugação foi diluído em metanol da mesma maneira que as amostras e analisado pelo método de CLAE descrito, com intuito de visualizar o cromatograma referente ao PVA 1%. Também foi realizado a leitura de um sobrenadante de nanopartículas contendo AU nas mesmas condições.

O cromatograma da amostra representativa de AU (Figura 12-A) mostrou um pico em aproximadamente 4,2 min, o que estava de acordo com o obtido para o padrão AU (Figura 9), enquanto que para as nanopartículas controle negativo não foram observados picos interferentes neste mesmo tempo de retenção (Figura 12-B), o que indica que não houve interferência na determinação quantitativa de AU a partir dos componentes da formulação.

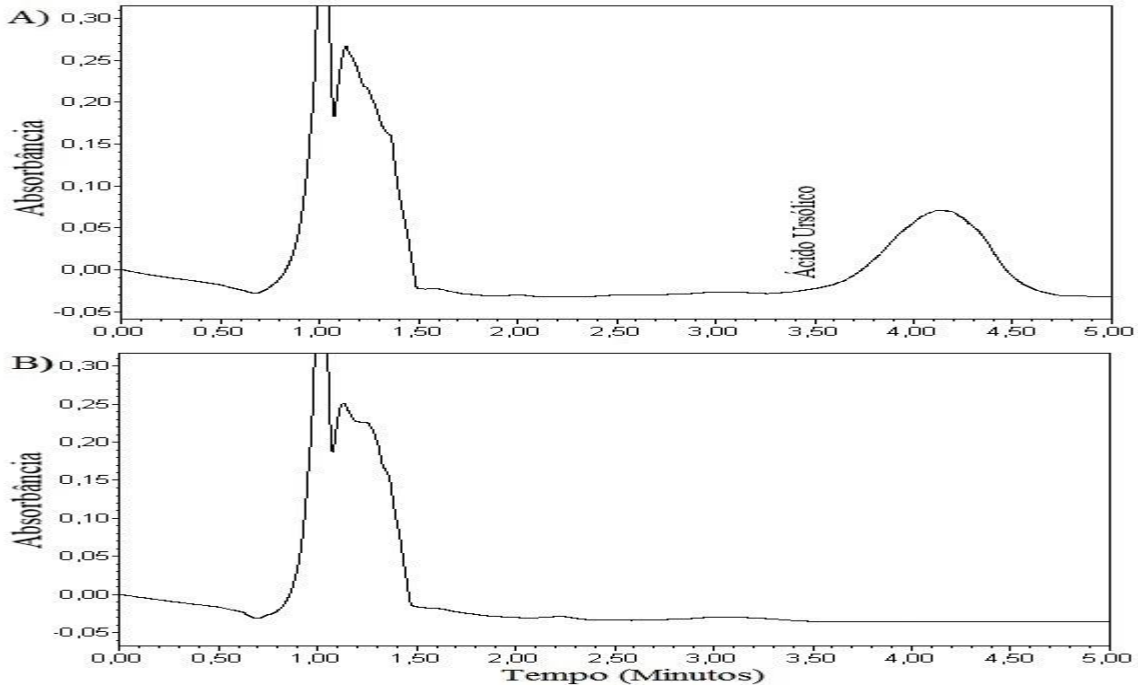
Figura 12. Comparação dos cromatogramas de amostras de AU frente ao potencial interferente PVA, presente na formulação das nanopartículas. Em A observa-se o cromatograma de uma amostra de AU proveniente do sobrenadante de nanopartículas. Em B, análise do cromatograma do sobrenadante obtido a partir das nanopartículas vazias. Fase móvel acetonitrila: água (90:10 v/v), 203 nm.



Outro possível interferente na quantificação do AU é o PBS (50 mM, pH 7,4) adicionado de 5% de Tween 80, presente nos ensaios de liberação *in vitro*, pois o mesmo também permanece no sobrenadante após a centrifugação. Para avaliar essa possível interferência, uma amostra contendo apenas o PBS com Tween 80 foi analisada, com intuito de visualizar o cromatograma referente ao tampão de forma isolada. E em seguida foi realizada a leitura do tampão fosfato de sódio - 5% Tween 80 contendo AU, nas mesmas condições preestabelecidas.

No cromatograma resultante do tampão contendo AU, Figura 13-A, é possível observar dois picos: o primeiro referente ao solvente, e possivelmente ao tampão fosfato de sódio e ao Tween 80 (~1 min), e o segundo referente ao AU (4,2 min). O cromatograma da amostra do tampão, na ausência do AU, apresentou somente em aproximadamente 1,0 min o pico referente ao solvente, ao tampão fosfato de sódio e ao Tween 80 (Figura 13-B).

Figura 13. Comparação dos cromatogramas de amostras de AU frente ao potencial interferente PBS - 5% tween 80, meio receptor no teste de liberação *in vitro*. Em A observa-se o cromatograma do tampão fosfato de sódio 50 mM, pH=7,4, contendo AU, diluído em metanol. Em B, análise do cromatograma de uma amostra de tampão diluída em metanol. Fase móvel acetonitrila:água (90:10 v/v), 203 nm.



Assim, é possível afirmar que tanto o PVA presente na formulação das nanopartículas, quanto o PBS contendo tween 80 utilizado como receptor no ensaio de liberação *in vitro,* não interferiram na quantificação do AU, podendo-se concluir dessa maneira que o método desenvolvido é seletivo para o AU nas condições testadas.

5.1.3. Adequação do sistema cromatográfico

A adequação do sistema foi avaliada através da análise da simetria do pico, do número de pratos teóricos da coluna, e do fator de capacidade durante a execução da solução de AU em seis repetições. O método desenvolvido produziu um número de pratos teóricos superior a 2000, um fator de cauda inferior a 1,1 e um fator de capacidade superior a 2. Os resultados de adequação do sistema estão resumidos na Tabela 6, e pode-se observar que os parâmetros analisados estão de acordo com os critérios de aceitação (SUTARIYA, WEHRUNG, GELDENHUYS, 2012; HUSSEN, SHENOY, KRISHNA, 2013).

Tabela 6. Sistema de adequação do método de CLAE (n=6).

Parâmetros Cromatográficos	Resultados*	Critério Aceitação
Fator de cauda (T)	1,0002 ± 0,038	T < 2
Números de pratos teóricos (N)	2867 ± 69,88	N > 2000
Fator de capacidade (K')	2,444 ± 0,043	K' > 2

*Apresentado valor como média ± desvio padrão.

5.2. Obtenção dos sistemas nanoparticulados

As NP's contendo AU foram obtidas com êxito através do método de emulsificação-evaporação do solvente por meio de uma emulsão simples O/A, sendo esta uma das primeiras técnicas desenvolvidas, e atualmente a mais utilizada para obtenção de nanopartículas, devido propiciar maior segurança, reprodutibilidade e fácil transposição em larga escala (COUVREUR et al., 2002). Além do mais, sabe-se que o método origina nanoesferas e é capaz de associar tantos ativos hidrofílicos quanto hidrofóbicos (RAO, GECKELER, 2011).

No caso do AU, um fármaco hidrofóbico, as taxas de encapsulação foram ótimas, e os diâmetros das partículas satisfatórios, além de não terem sido encontradas dificuldades para a produção das nanopartículas. Após a liofilização, o pó resultante apresentou aspecto macroscópico pulverulento de coloração branca.

5.3. Caracterização físico-química das nanopartículas

5.3.1. Diâmetro médio e índice de polidispersão das partículas

O tamanho e o índice de polidispersão (IP) são importantes parâmetros para a caracterização das nanopartículas, pois influenciam as características biofarmacêuticas e o perfil de liberação do fármaco a partir da nanoestrutura, além de serem úteis também nos estudos de estabilidade. O diâmetro das nanopartículas pode variar entre 10 e 1000 nm (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998), porém o tamanho ideal depende da finalidade. Por exemplo, nanopartículas produzidas a fim de carrear fármacos devem apresentar diâmetros inferiores a 300 nm (GUPTA, KOMPELLA, 2006). Quanto aos valores de IP, estes podem variar entre 0 e 1, sendo que, valores próximos a 0 indicam uniformidade da dispersão e

valores maiores indicam uma alta heterogeneidade nos diâmetro das partículas (AVADI et al., 2010).

Como demonstra a Tabela 7, a formulação contendo AU desenvolvida no presente estudo, apresentou diâmetros submicrométricos (246 ± 10 nm) de acordo com o desejado, haja visto que os vasos sanguíneos que permeiam os tecidos tumorais apresentam poros de 300 a 700 nm (LEMBO, CAVALLI, 2010). Por conseguinte, nanopartículas com diâmetro médio de 200 nm, são capazes de entrar nas fenestrações dos neovasos dos tecidos tumorais, mas não conseguem entrar nas fenestrações estreitas dos endotélios normais.

Tabela 7. Análise do tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação das nanopartículas preparadas na presença e na ausência de AU (n=10).

	Diâmetro médio ± DP (nm)	**Índice de polidispersão ± DP**	**Potencial zeta ± DP (mV)**	**Eficiência de encapsulação ± DP (%)**
NP's-PLA	215 ± 9[a]	0,100 ± 0,02[a]	-27,2 ± 6,2[a]	___
NP's-PLA-AU	246 ± 10[b]	0,148 ± 0,014[b]	-24,6 ± 3,1[a]	95,8 ± 2,3

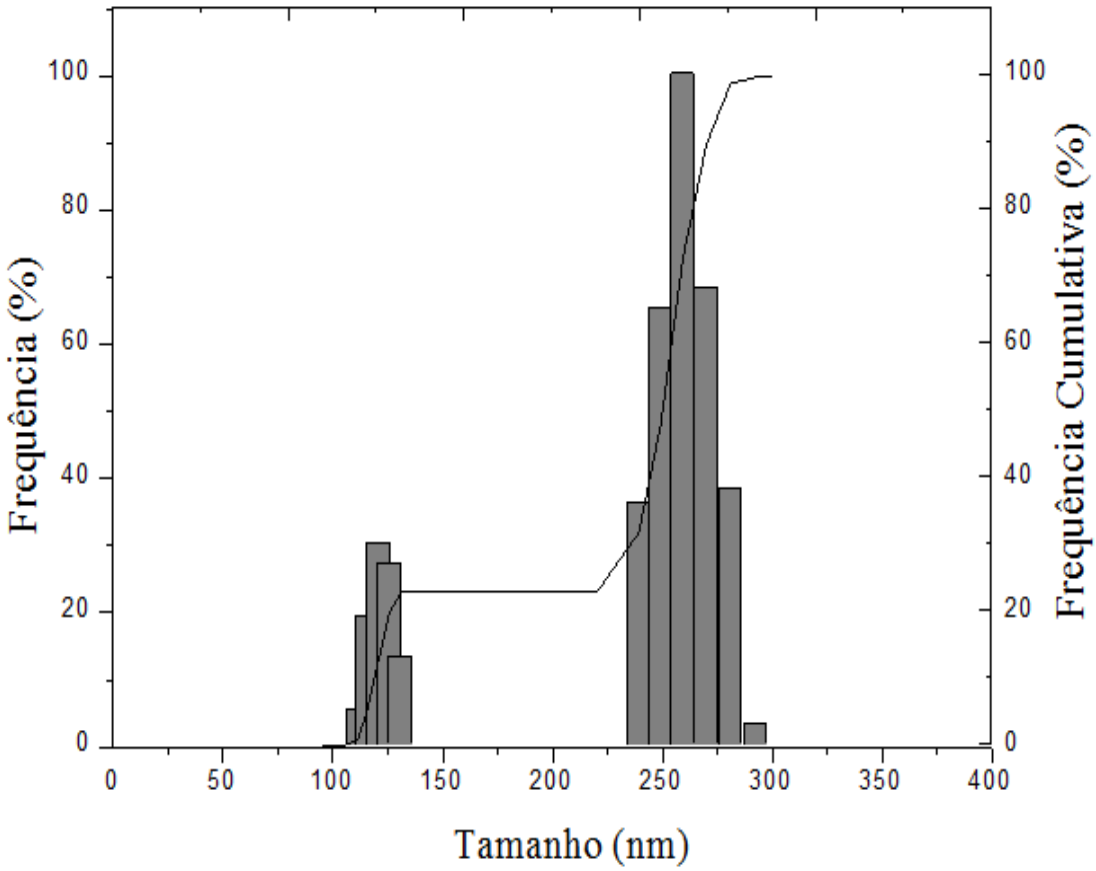
[a,,b] Diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação ± desvio padrão analisados por coluna. Mesmas letras significam igualdade estatística e estatísticas de desigualdade são indicadas por letras diferentes (Student's t test e α 0,05).

Com referência aos tamanhos médios das partículas, valores semelhantes foram obtidos em outros trabalhos que empregaram este mesmo método de emulsão simples e o mesmo polímero (PLA), para encapsulação de variados fármacos. Karam (2015), por exemplo, encapsulou o álcool perílico e obteve nanopartículas com diâmetro médio de 229 nm, Lindner e colaboradores (2013), obtiveram NP's de resveratrol com tamanhos de aproximadamente 227 nm.

O IP das nanopartículas obtidas foi de 0,148. Valores de polidispersão entre 0,1 e 0,25 indicam uma distribuição de tamanho relativamente estreita (PATRAVALE, DALE, KULKARNI, 2004), porém mesmo com o baixo IP foi observada a formação de duas famílias. O perfil de distribuição de uma amostra representativa das nanopartículas de AU está representado na Figura 14, a qual apresentou um diâmetro médio de 237 nm e um índice de polidispersão de 0,135. Essa amostra apresentou um perfil bimodal, onde 11% da

distribuição dos diâmetros médio das nanopartículas ficaram no intervalo de 91 a 109 nm, e os outros 89% ficaram entre 236 e 297 nm.

Figura 14. Distribuição do tamanho de uma amostra representativa das nanopartículas de AU. Diâmetro médio de 237,7 nm e índice de polidispersão de 0,135, perfil bimodal.



Comparando-se o diâmetro médio e o IP das NP's-PLA-AU frente aos resultados das nanopartículas brancas, observa-se um ligeiro aumento causado pela incorporação do fármaco. Esse mesmo fenômeno já foi observado por Schaffazick e colaboradores (2002), quando a adição do diclofenaco gerou um acréscimo de 20% no diâmetro médio em relação à mesma formulação sem o fármaco, e também por Zatta (2011) onde a presença de Palmitato de ascorbila também fez com que as nanopartículas aumentassem de tamanho. De acordo com Govender e colaboradores (1999), a incorporação do ativo na fase orgânica antes da precipitação do polímero em meio aquoso, pode realmente influenciar o diâmetro médio final das partículas.

As nanopartículas de PLA contendo AU mesmo após liofilizadas apresentaram tamanho médio de 258,25 ± 7,65 nm, e o índice de polidispersão de 0,168± 0,021, indicando que o procedimento não alterou esses parâmetros.

5.3.2. Determinação da eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação foi determinada de maneira indireta pela leitura do sobrenadante obtido após ultracentrifugação das nanopartículas, valor este que foi subtraído da quantidade de AU utilizado na formulação (10 mg). De acordo com a Tabela 7 pode-se observar que o AU foi altamente encapsulado nas nanopartículas (95,8 ± 2,3%), o que se deve ao fato do fármaco apresentar grande afinidade pelo polímero. Esse elevado índice de eficiência de encapsulação constitui um resultado significativo para o estudo, comprovando que a formulação desenvolvida é eficiente para associar o fármaco à estrutura polimérica.

A técnica de emulsão simples seguida de evaporação do solvente é umas das mais usadas por pesquisadores para incorporar compostos terapêuticos em NP's (MUNDARGI et al., 2008). Um método deve sempre ser escolhido baseando-se principalmente nas características de solubilidade do composto, visando uma alta encapsulação do fármaco no interior da matriz polimérica (SCHAFFAZICK et al., 2003). Neste trabalho pode-se afirmar que o método escolhido mostrou-se adequado para o fármaco em questão, da mesma maneira que o polímero e o tensoativo utilizado.

O resultado obtido foi ligeiramente superior a outros estudos já realizados contendo AU, como o de Zhang e colaboradores (2013), que trabalhou com a encapsulação do AU a partir do copolímero mPEG-PCL, e obteve eficiência de encapsulação de 87 ± 5,3%. Zhou e colaboradores (2009) também obtiveram uma encapsulação próxima de 86 ± 0,4% do AU em nanocarreadores fosfolipídicos. Esse ligeiro aumento na encapsulação pode ser considerado uma vantagem obtida a partir da associação entre polímero, fármaco e metodologia utilizados nesse trabalho, e tem uma importância significativa, uma vez que se trata de um fármaco com alto custo agregado.

5.3.3. Potencial zeta

O potencial zeta é a técnica mais comumente utilizada para caracterizar as propriedades de superfície das nanopartículas. As partículas de uma suspensão coloidal

podem conter grupamentos químicos ou adsorver íons capazes de conferir uma carga superficial à partícula. A medida dessa carga dá informações sobre a sua estabilidade em suspensão e permite inferir propriedades como o tempo de decantação e a redispersibilidade das mesmas. Neste contexto, é importante que um sistema nanoestruturado apresente carga de superfície elevada, em módulo, um valor de potencial zeta relativamente alto, em torno de 30 mV, garante que grandes forças repulsivas evitem a agregação em função das colisões ocasionais de partículas adjacentes (LEGRAND et al., 1999; SCHAFFAZICK et al., 2003; MOHANRAJ, CHEN, 2006).

Nanopartículas de PLA, um polímero aniônico, geralmente apresentam elevadas cargas superficiais negativas devido à presença de grupos carboxílicos terminais do polímero localizados na superfície das partículas (DONG, FENG, 2004). Como mostrado na Tabela 7 e nas Figuras 15 e 16, as NP's-PLA-AU apresentaram valores de potencial zeta negativo, próximos a -25 mV o que corrobora com essa hipótese e demonstra que os sistemas apresentam uma boa estabilidade físico-química, já que, segundo Muller (1991), valor de potencial elevado, de cerca -25 mV, assegura uma barreira de alta energia que estabiliza a formulação. As NP's brancas apresentaram um potencial zeta muito próximo das carregadas, sugerindo que o fármaco não alterou significativamente as propriedades de superfície das nanopartículas.

Figura 15. Potencial zeta das NP's-PLA-AU (-26,8± 0,4).

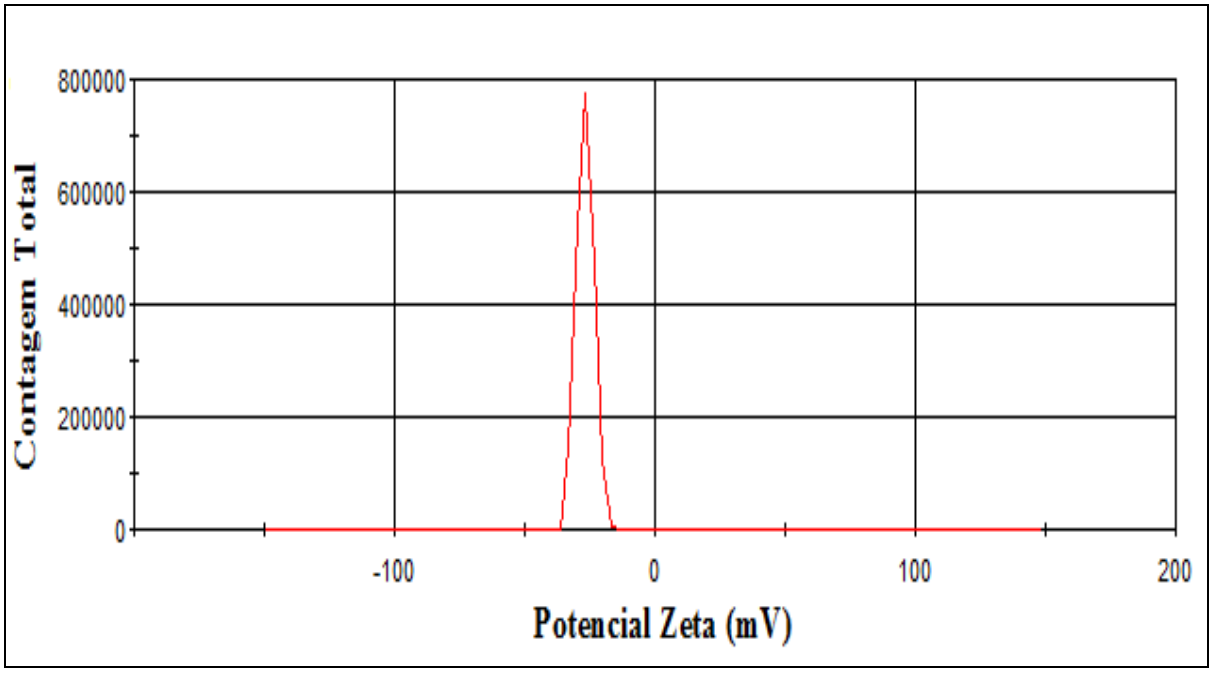
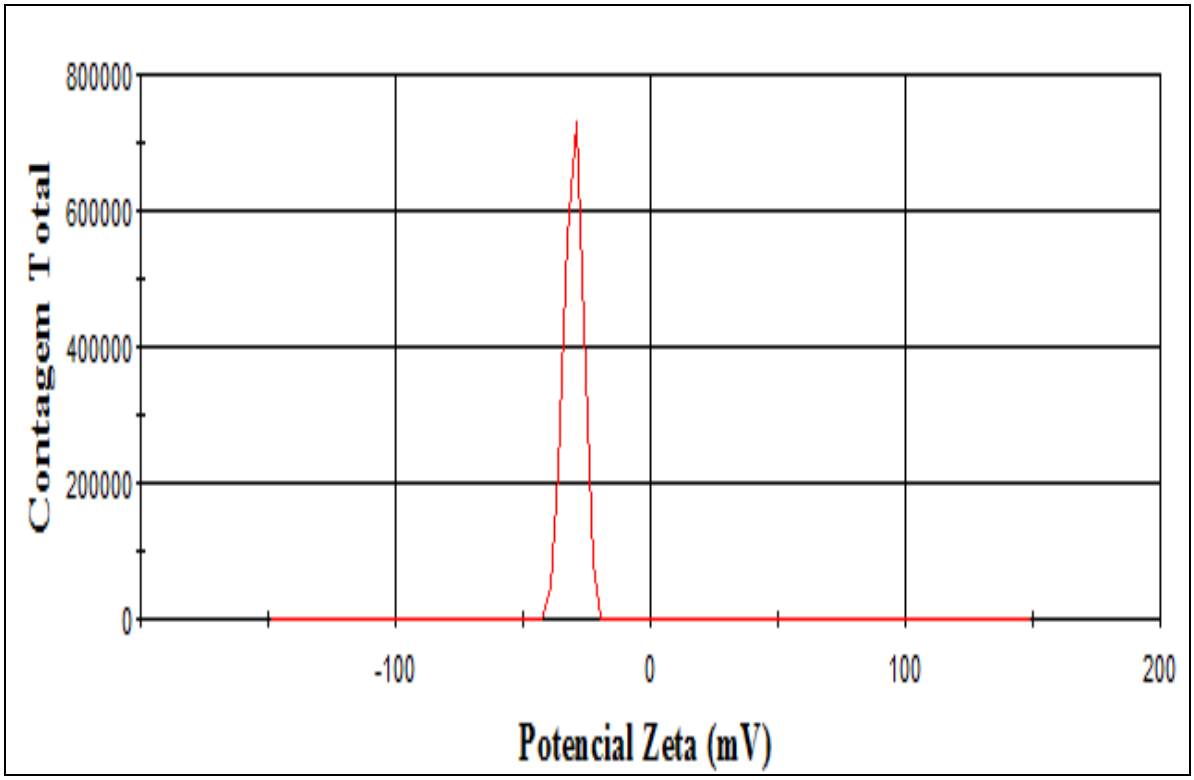


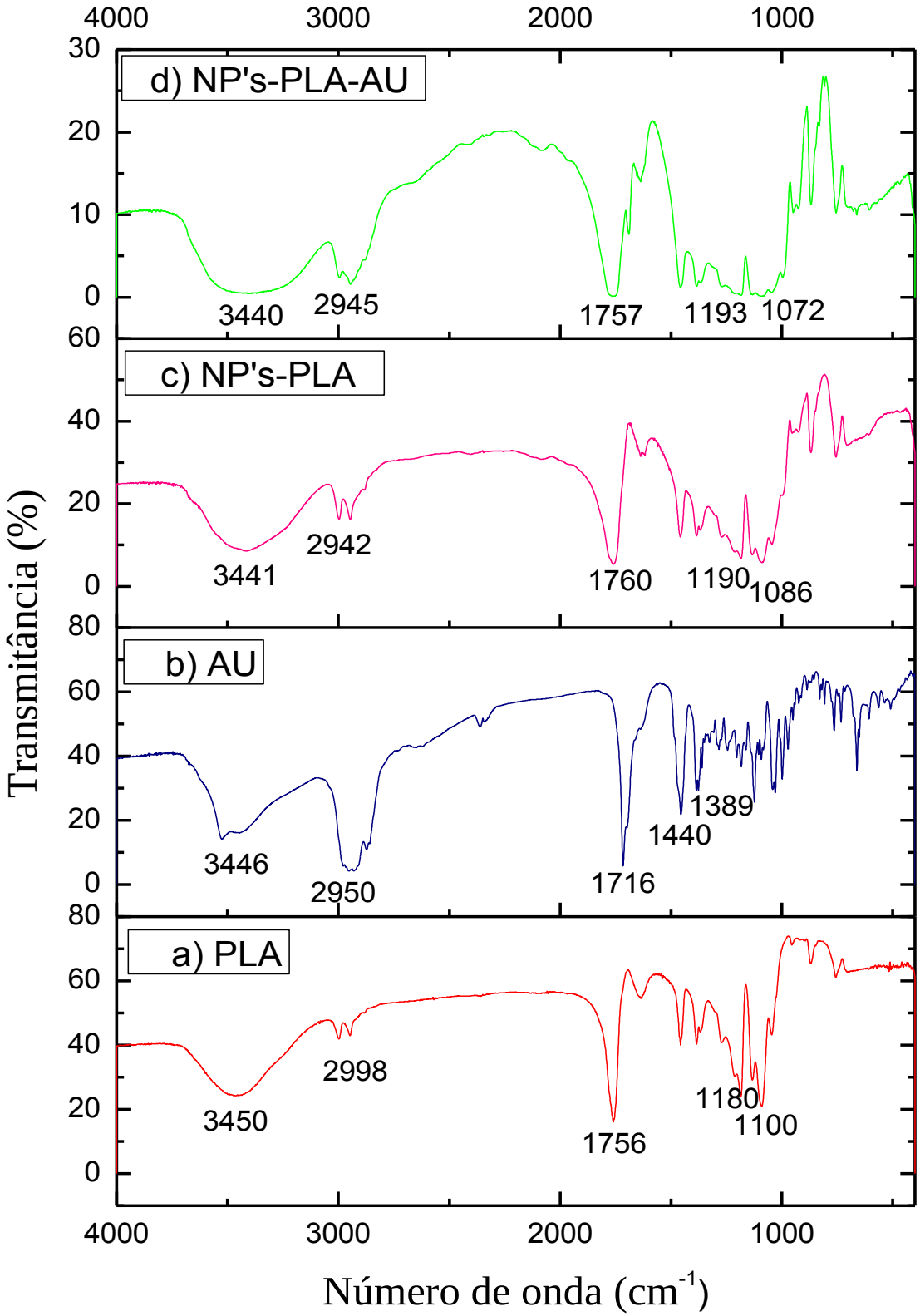
Figura 16. Potencial zeta das NP's-PLA (-30,1 ± 3,6).



5.3.4. Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

A análise por FT-IR é essencial na caracterização de NP's, pois é capaz de confirmar os principais grupos químicos dos compostos presentes nas nanopartículas e verificar a integridade do fármaco após sua encapsulação. Na Figura 17 são apresentados os espectros de infravermelho obtidos na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} do polímero PLA (a), do AU puro (b), das nanopartículas de PLA vazias (c) e das nanopartículas de PLA contendo AU (d).

Figura 17. Espectros na região do infravermelho: a) PLA, b) AU, c) Nanopartículas de PLA vazias e d) Nanopartículas de PLA contendo AU.



O poliéster PLA (Figura 17-a) apresentou bandas características, podendo-se notar principalmente a presença de uma banda larga em aproximadamente 3450 cm^{-1} referente aos grupamentos hidroxila, em 2998 cm^{-1} relativa às vibrações das ligações C-H, já a banda em 1756 cm^{-1} refere-se ao estiramento do C=O, ainda foram observadas as bandas relativas ao estiramento assimétrico do C-O em 1180 cm^{-1} e ao estiramento simétrico C-O-C em 1100 cm^{-1} (SILVERSTEIN, BASSLER, MORRILL, 2006).

O espectro de FT-IR obtido para o AU (Figura 17-b) foi condizente com os resultados encontrados na literatura (YANG et al., 2012; ELOY, MARCHETTI, 2014), apresentando principalmente, a banda característica dos ácidos carboxílicos em 3446 cm^{-1} referente as vibrações do grupamento OH, em 2950 cm^{-1} relativa as ligações C-H, em aproximadamente 1716 cm^{-1} observa-se uma banda intensa atribuída a carbonila do ácido carboxílico e em 1440 cm^{-1} a banda corresponde à vibrações de deformação angular de C-H de alquenos . Em 1389, 1367, 1356, 1317, 1290 e 1254 cm^{-1} observa-se bandas características dos triterpenoides ursanos.

As nanopartículas de PLA vazias (Figura 17-c), apresentaram as mesmas bandas características da molécula de PLA isolada. Na análise do espectro das nanopartículas contendo AU (Figura 17-d), observa-se a sobreposição das principais bandas do AU com as do PLA. A banda larga em aproximadamente 3440 cm^{-1} refere-se provavelmente à deformação axial de O-H em ligação de hidrogênio entre o grupamento álcool e a carboxila do AU assim como do polímero. As bandas em aproximadamente 2945 cm^{-1} referem-se às ligações de C-H de hidrocarbonetos presentes tanto na estrutura do AU como do PLA, da mesma forma, a absorção em 1757 cm^{-1}, atribuída à ligação C=O está presente tanto no AU quanto no PLA. Além disso, as bandas em 1193 e 1072 cm^{-1} podem ser atribuídas ao estiramento assimétrico de C-O, e ao estiramento simétrico C-O-C do PLA, respectivamente. (SILVERSTEIN, BASSLER, MORRILL, 2006).

Cabe ressaltar que mesmo havendo sobreposição das bandas relativas ao polímero e ao AU, esses resultados demonstram que o processo de nanoencapsulação não promoveu nenhuma alteração química que descaracterizasse os componentes utilizados (polímeros e fármaco), uma vez que não foram observadas mudanças significativas nos espectros apresentados. Além disso, o FT-IR serve como uma técnica complementar às demais análises realizadas para comprovar a encapsulação do fármaco.

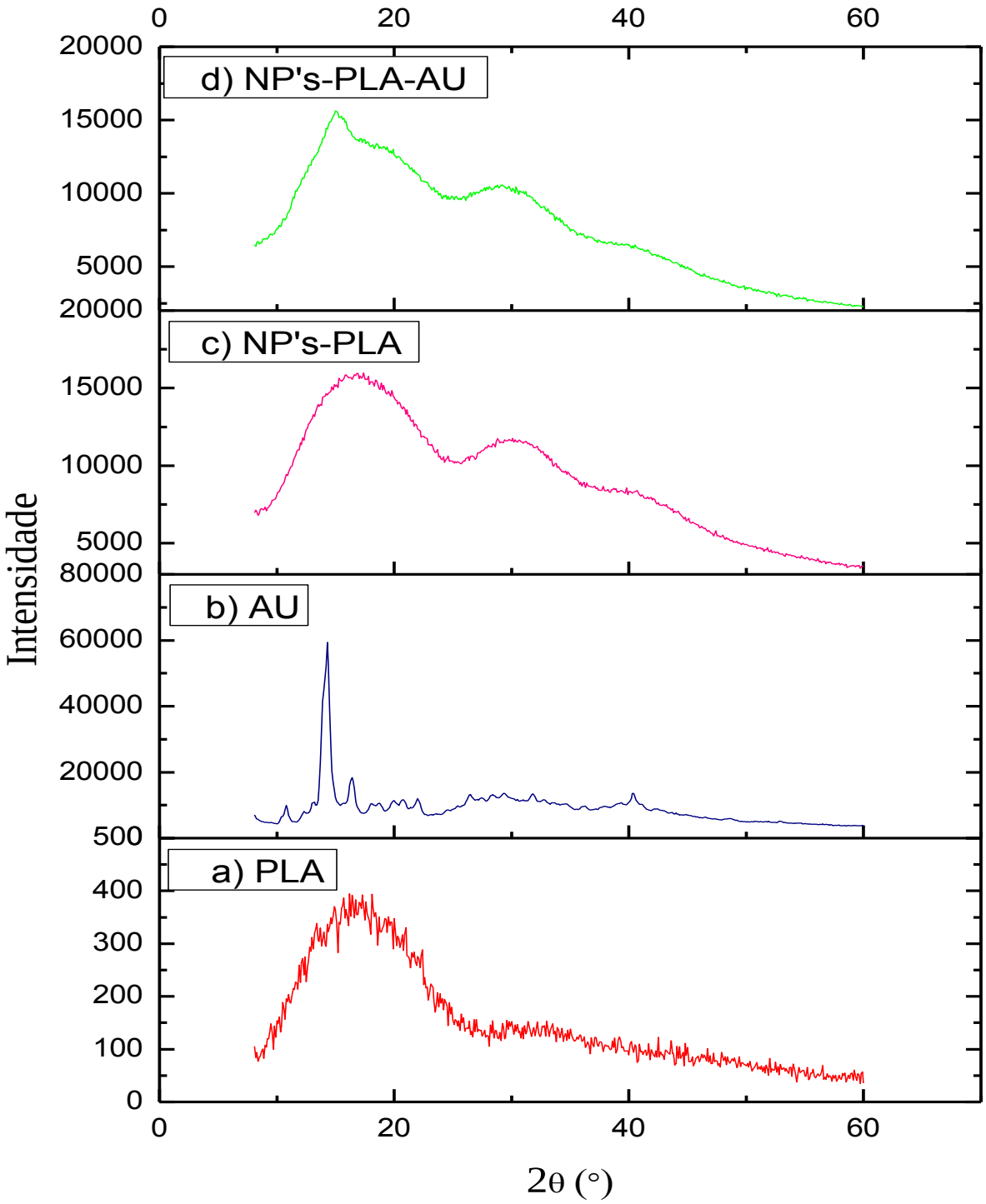
5.3.5. Difração de Raios X (DRX)

Substâncias sólidas podem revelar características cristalinas ou amorfas ou uma combinação de ambas. Este aspecto é importante uma vez que influencia demais características, tais como a saturação da solubilidade e a velocidade de dissolução no processo de entrega (DHIRENDRA et al., 2009). Substâncias cristalinas são aquelas nas quais as moléculas estão dispostas segundo uma ordem definida, que se repete ao longo de toda a partícula. Uma das propriedades características dos cristais é o ponto de fusão, que é definido como a temperatura na qual a rede cristalina é desestruturada, sendo assim quanto mais fortes as forças de atração de uma estrutura cristalina, maior será seu ponto de fusão. Já as estruturas amorfas possuem moléculas dispostas aleatoriamente e não apresentam, por sua vez, ponto de fusão, uma vez que não existe organização do retículo cristalino (VLACK, 1970; BRITTAIN, 1999; YU, 2001).

Em geral, sólidos amorfos são mais solúveis do que as formas cristalinas devido à energia livre envolvida no processo de dissolução, portanto fármacos cristalinos, como é o caso da AU, possuem baixa solubilidade aquosa em comparação com sua forma amorfa e, por conseguinte, baixa biodisponibilidade em meio fisiológico (SENNA, NAKAYAMA, 2009). Devido à isso, vários trabalhos buscam, através da incorporação desses fármacos cristalinos à nanopartículas, melhorar o perfil de dissolução e biodisponibilidade do fármaco (KÜRTI et al., 2011; SEJU, KUMAR, SAWANT, 2011; PAPADIMITRIOU et al., 2008).

O DRX distingue sistemas/materiais entre cristalinos e amorfos, pois substâncias cristalinas apresentam picos bem definidos enquanto que os compostos amorfos não apresentam os mesmos planos nítidos característicos dos cristais (DHIRENDRA et al., 2009). Os difratogramas das matérias-primas PLA, AU, das nanopartículas de PLA vazias e nanopartículas de PLA contendo AU produzidas pelo método de emulsão-evaporação estão apresentados na Figura 18.

Figura 18. Difratogramas de: a) PLA, b) AU, c) Nanopartículas de PLA vazias e d) Nanopartículas de PLA contendo AU.



O PLA pode apresentar característica amorfa ou semicristalina, dependendo da sua estereoquímica e do tratamento térmico recebido, sendo estas características, que determinam também a sua utilização comercial (HENTON et al., 2005). A Figura 18-a,

mostra o difratograma obtido para uma amostra de PLA (Sigma Aldrich – Poly (L-lactide) – P1566-5G) utilizado na produção das nanopartículas. A análise revelou o polímero na sua forma semicristalina.

De acordo com a literatura (YANG et al., 2012; ELOY, MARCHETTI, 2014) o AU apresenta-se na forma cristalina com intensos picos bem definidos em 2θ: 5,14; 8,82; 10,32; 14,40; 16,42; 21,40 e 27,22. Na análise por DRX realizada neste trabalho (Figura 18-b), foi registrada a presença de picos intensos nos ângulos de difração em 2θ: 10,76; 14,15; 16,49; 21,9; 26,4; 40,22 confirmando o padrão cristalino da AU. Pequenas variações podem ser devido à diferente natureza do AU em questão.

De acordo com os difratogramas obtidos para as formulações de nanopartículas na ausência ou presença de AU, representados respectivamente na Figura 18, como (c) e (d), foi possível observar difratogramas com grandes semelhanças entre si, porém notadamente diferente do padrão exibido pelo AU, que apresenta estrutura altamente cristalina (Figura 18-b). O desaparecimento dos picos intensos no intervalo de 10º a 30º, indica que houve a amorfização do fármaco, sugerindo que o AU foi molecularmente disperso no sistema polimérico, formando um possível complexo fármaco-polímero.

A amorfização do AU encontrada nesse estudo é corroborada pelos achados de outras análises de DRX envolvendo a nanoencapsulação do AU, como é o caso de Yang e colaboradores (2012), que analisaram o padrão de difração de nanopartículas contendo AU obtidas a partir do método do anti-solvente supercrítico e constataram que os picos característicos da cristalinidade da droga haviam desaparecido, comprovando a amorfização que o fármaco havia sofrido.

Com a obtenção de nanopartículas de carácter amorfo, espera-se melhores características de dissolução do AU, uma vez que as moléculas passam a se dispor de maneira aleatória, diferentemente dos cristais, o que resulta em menor consumo de energia e uma dissolução mais rápida (SENNA, NAKAYAMA, 2009).

5.3.6. Calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria

O emprego da técnica de DSC possibilita medir a quantidade de energia que é absorvida ou liberada pela amostra sólida em função da temperatura, sendo possível realizar análises estruturais, térmico-comportamentais e variações físicas. Adicionalmente, a técnica é utilizada como forma de se obter informações sobre as propriedades físicas, como natureza

cristalina ou amorfa da matéria e de investigar as possíveis interações químicas e incompatibilidades entre os componentes das NP's produzidas (NARANG, DELMARRE, GAO, 2007).

As observações para tal fim são realizadas analisando-se alterações nos perfis termoanalíticos das espécies, como deslocamentos, redução significativa ou desaparecimento de pico na curva de DSC, quando comparados aos perfis dos compostos analisados individualmente (FORD, MANN, 2012; CALVO, VILA-JATO, ALONSO, 1996). Normalmente esses dados são confirmados por meio de uma curva de TGA, que analisa a perda ou ganho de massa do composto.

A curva de DSC do AU puro (Figura 19-a) mostra um primeiro evento exotérmico em 203 ºC, o qual está relacionado à uma transição de fases, uma vez que ocorreu em uma faixa de temperatura onde a curva derivada da TGA (DTG) não evidenciou perda de massa (ALMEIDA, 2012). O pico endotérmico em 283,13 °C corresponde ao ponto de fusão, indicando a natureza cristalina do fármaco. Depois do processo de fusão (a partir de 300° C), inicia-se o processo de decomposição térmica do AU, caracterizado por um pico endotérmico intenso na faixa de temperatura entre 306 e 420 ºC. Estes dados são confirmados pela curva da TGA derivada (DTG) que, além disso, mostra que a perda máxima de peso (100%) ocorre em 388,04 °C.

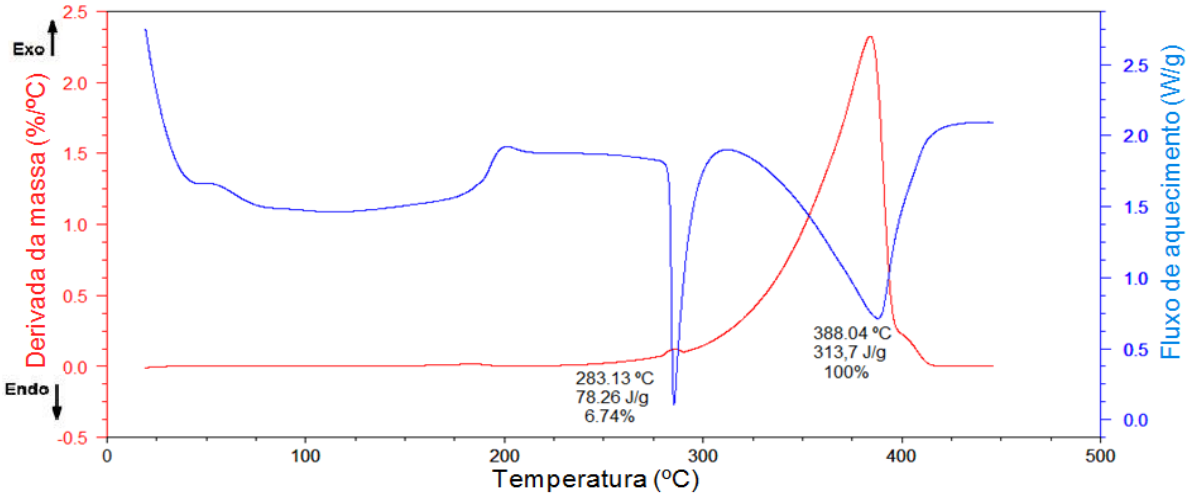
O PLA (Figura 19-b) exibiu um pico de relaxamento endotérmico relacionado à transição vítrea do polímero em aproximadamente 65 ºC, seguido por um pico endotérmico em 172,43 ºC (51,58 $J.g^{-1}$) indicativo do ponto de fusão do polímero, devido o PLA se apresentar na forma semicristalina (FRONE et al., 2013). Os dois picos endotérmicos observados em 306,34 ºC (51,58 $J.g^{-1}$) e 365,86 (283,3 $J.g^{-1}$) são devido à decomposição térmica do polímero.

Na curva de DSC das nanopartículas de PLA vazias (Figura 19-c) observou-se o relaxamento endotérmico relacionado à transição vítrea do PLA em 59 ºC. A fusão do PLA foi observada em dois picos (171,11 e 185,13 ºC), uma vez que o PLA tem tendência de formar dois picos de fusão, baseado na diferença entre os cristais presentes na amostra (RIGOLIN, 2014). O pico endotérmico intenso em 296,76 ºC (333,9 $J.g^{-1}$) corresponde à decomposição térmica do polímero em questão. Através da curva DTG, pode-se observar uma perda de 14,79% de massa antes de atingir 250 ºC, e em 296,76 ºC uma perda de massa próxima aos 75%.

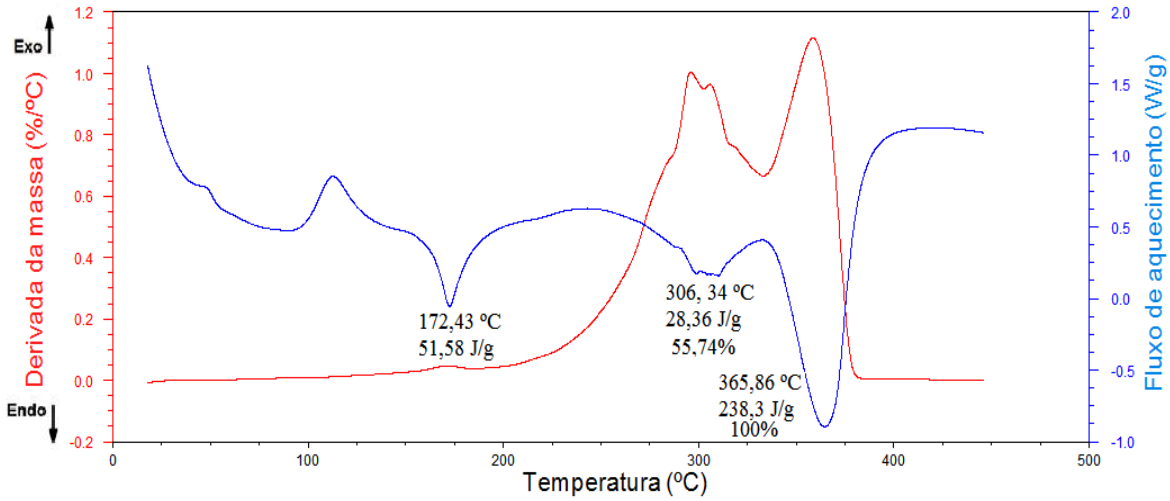
A curva de DSC das nanopartículas de PLA contendo AU (Figura 19-d) mostra um primeiro evento endotérmico relacionado à transição vítrea do PLA iniciando em 58 ºC. Não foram observados picos endotérmicos relativos à fusão do AU, somente os picos de fusão do PLA (169,83 e 182,89 ºC). O pico intenso em torno de 353 ºC está relacionado com a decomposição térmica da amostra. Através da DTG observa-se que a perda de massa, atribuída à decomposição térmica, ocorreu em duas principais etapas (230,58ºC – 10,76% e 353,38 °C – 83,48%).

Figura 19. Curvas de DSC e DTG das amostras: a) AU, b) PLA, c) Nanopartículas de PLA vazias e d) Nanopartículas de PLA contendo AU.

a) AU

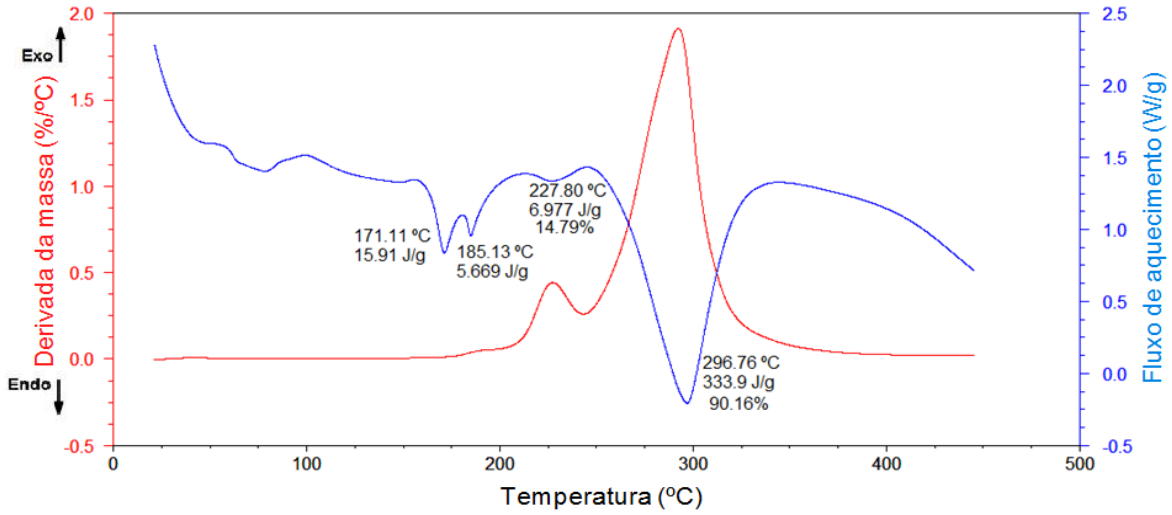


b) PLA

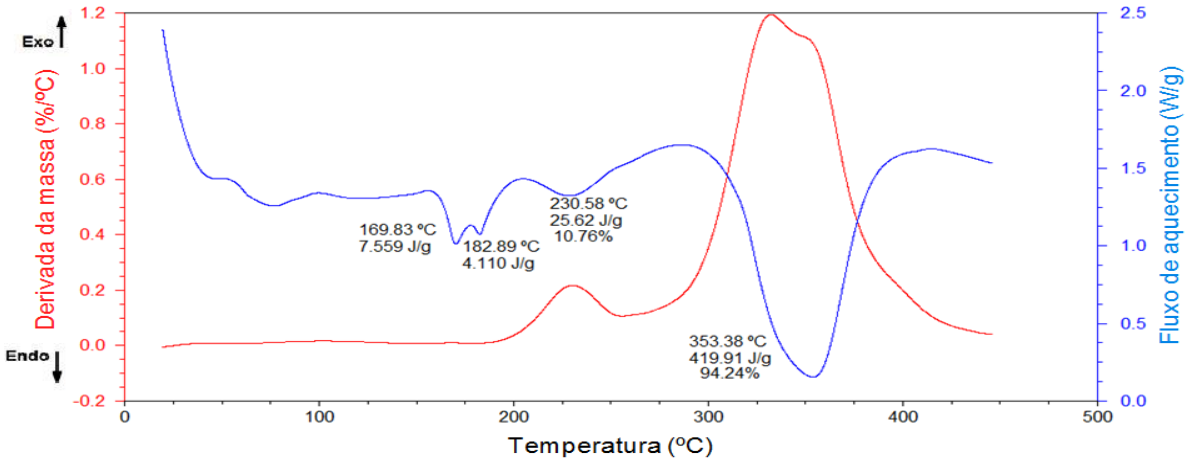


Continuação da **Figura 19**.

c) NP's-PLA



d) NP's-PLA-AU



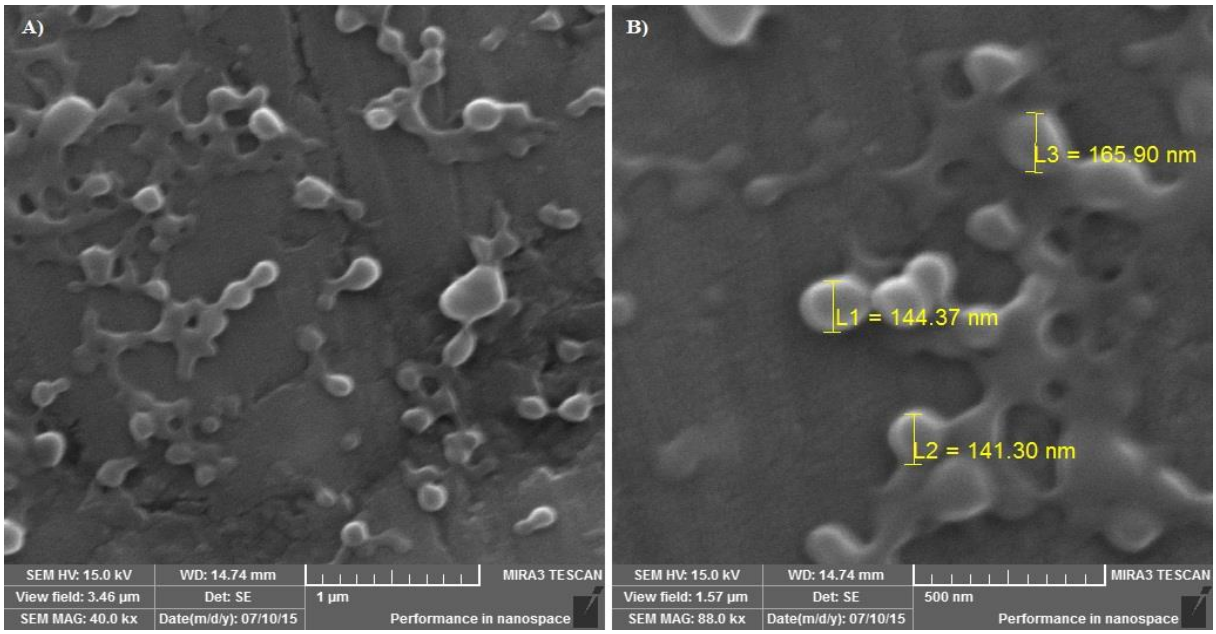
A similaridade entre os perfis das nanopartículas vazias e das nanopartículas contendo AU e a ausência do pico endotérmico relativo à fusão cristalina do AU no termograma da nanopartícula, indicam que o fármaco após o processo de nanoencapsulação, apresenta-se em um estado amorfo de dispersão molecular na matriz polimérica. Essas informações corroboraram com os resultados encontrados no DRX e FT-IR.

5.3.7. Análise microscópica

A análise morfológica das partículas foi realizada através de microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo, pois esta técnica é capaz de produzir imagens

de alta resolução da superfície de uma amostra. As imagens obtidas por este equipamento possuem uma aparência tridimensional e são importantes para avaliar a estrutura superficial de qualquer tipo de amostra. A técnica mostrou-se bastante adequada para verificar o formato das nanopartículas obtidas e confirmar o seu tamanho nanométrico. Na Figura 20, são mostradas as fotomicrografias obtidas.

Figura 20. Fotomicrografia das nanopartículas de PLA contendo AU obtidas através do MEV-FEG: a) aumento de 40 mil vezes; b) aumento de 88 mil vezes.



A análise das fotomicrografias mostrou que as partículas obtidas pelo método de simples emulsificação-evaporação do solvente apresentaram forma esférica ou levemente ovalada e confirmou a presença de um sistema nanoparticulado com relativa homogeneidade de tamanhos, comprovando a eficiência do método utilizado. Através desta técnica, observou-se o tamanho médio das partículas próximo a 150 nm, bastante inferior quando comparado ao diâmetro médio obtido através do DLS, que foi de 246 nm.

A discrepância dos valores entre os dois métodos provavelmente se deve às diferenças de princípios entre estes. Enquanto a espectroscopia de correlação de fótons considera a camada de hidratação que envolve as partículas, possibilitando a determinação do raio hidrodinâmico uma vez que as partículas estão em suspensão, a microscopia fornece a imagem das partículas secas, de forma isolada e por isso normalmente apresentam diâmetros inferiores (HOFFMANN et al., 1997; COUVREUR et al., 2002).

5.4. Avaliação da estabilidade das nanopartículas contendo AU

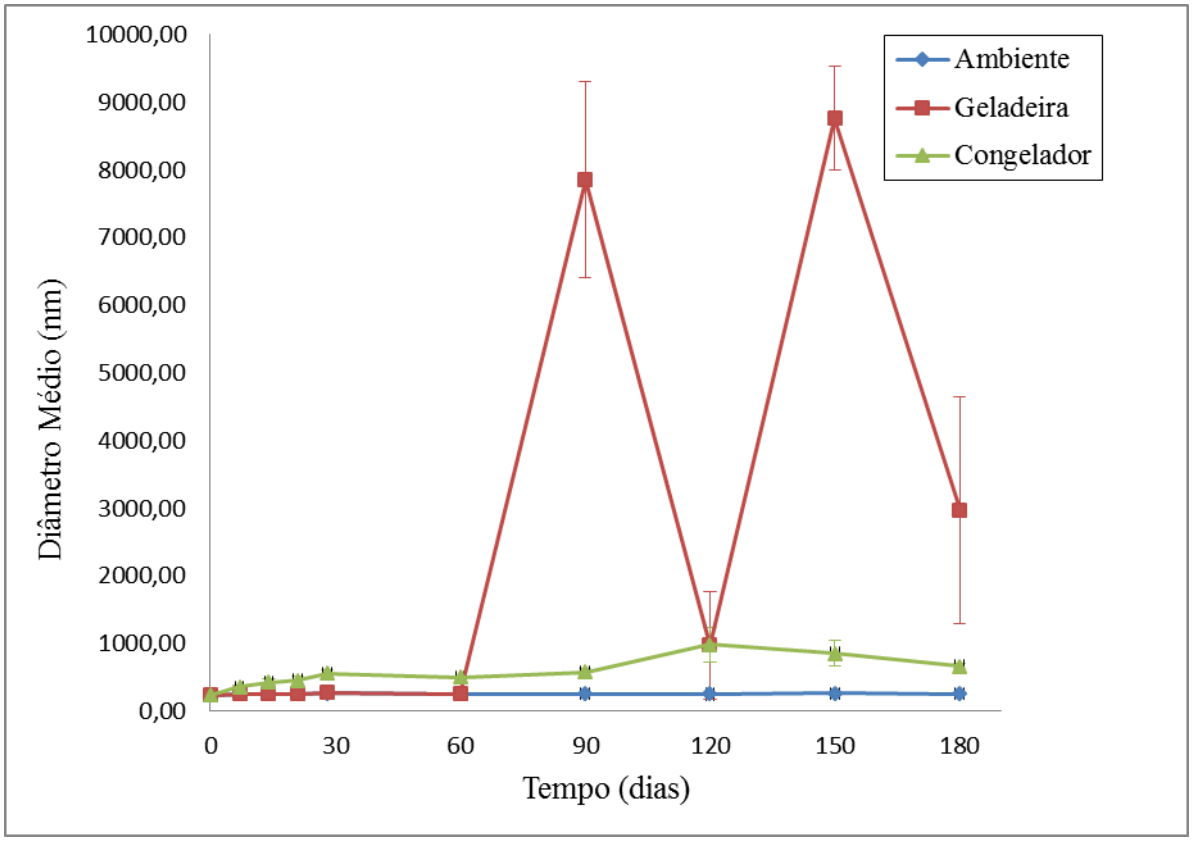
As suspensões coloidais geralmente não apresentam tendência à separação de fases durante alguns meses após a preparação, pois o processo de sedimentação é lento para partículas submicrométricas, sendo minimizado pelo movimento Browniano. No entanto, é possível que com o tempo ocorra aglomeração das partículas e, consequente sedimentação. Apesar de poucos estudos referentes à estabilidade de nanopartículas contendo diferentes fármacos serem encontrados na literatura (SCHAFFAZICK et al., 2002; LACOULONCHE et al., 1999; POHLMANN et al., 2002), a avaliação da estabilidade química e física sob diferentes condições de armazenamento é de fundamental importância, por fornecerem indicações sobre o comportamento do produto em determinado intervalo de tempo, frente a diversas condições (MAGENHEIM, BENITA, 1991; MOLPECERES et al., 1997).

Considerando tal importância, nanopartículas de PLA contendo AU foram armazenadas à temperatura ambiente, sob refrigeração (8 ºC) ou em freezer (-12 ºC), sendo avaliados após 7, 14, 21, 28, 60, 90, 120, 150 e 180 dias os parâmetros de concentração total de fármaco, alterações macroscópicas, tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta.

Todas as formulações estudadas apresentaram inicialmente um aspecto leitoso característico de nanopartículas em suspensão aquosa. As nanopartículas mantidas à temperatura ambiente apresentaram boa estabilidade físico-química e nenhuma alteração macroscópica foi observada durante todo período avaliado. Porém, para as nanopartículas armazenadas sob refrigeração, observou-se a partir do 3º mês a presença de grânulos, proveniente de aglomerações. E para as nanopartículas mantidas em freezer (- 12 °C), logo na primeira semana houve separação de fases, com precipitado branco e sobrenadante incolor.

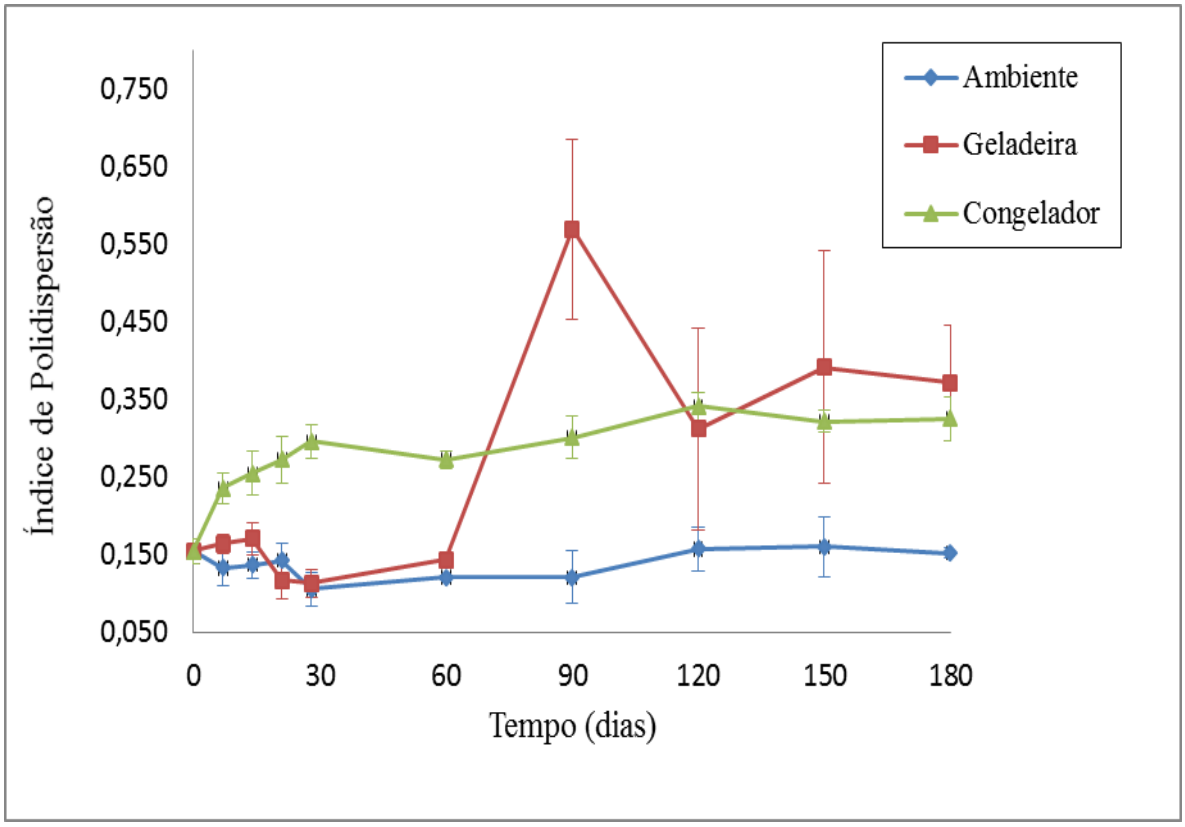
Através da avaliação do diâmetro médio (Figura 21), pode-se observar que as amostras armazenadas sob temperatura ambiente não apresentaram diferença estatística quando comparadas ao diâmetro inicial durante todo o período avaliado, porém as nanopartículas armazenadas sob refrigeração (8 ºC) após 90 dias apresentaram tamanhos que diferiram dos iniciais, enquanto que as congeladas (-12 °C) apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) desde a primeira semana de armazenamento.

Figura 21. Diâmetro médio das nanopartículas de PLA contendo AU em função do tempo, em diferentes condições de armazenamento, n=3.



Situação semelhante foi analisada em relação ao índice de polidispersão (Figura 22), apenas as nanopartículas mantidas à temperatura ambiente mostraram valores significativamente iguais aos iniciais até o ultimo tempo avaliado. Nas demais temperaturas, diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) quando comparados aos valores iniciais foram observadas na primeira semana para as nanopartículas armazenadas congeladas (-12 ºC), e após 90 dias para aquelas armazenadas sob refrigeração (8 ºC). Um valor aumentado para o índice de polidispersão ao longo do experimento indica a presença de diferentes populações de partículas dentro da mesma formulação, o que não é o ideal.

Figura 22. Índice de polidispersão das nanopartículas de PLA contendo AU em função do tempo, em diferentes condições de armazenamento, n=3.

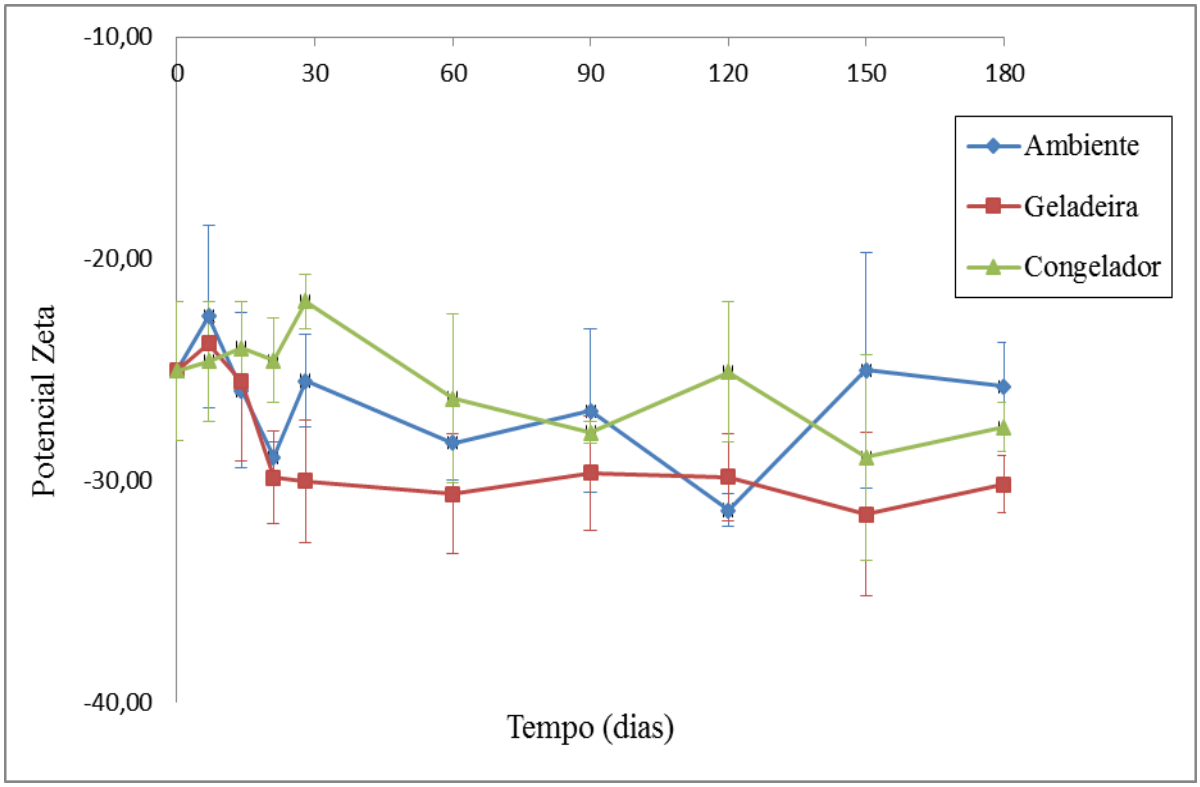


Já se esperava um aumento no tamanho e no índice de polidispersão das nanopartículas em suspensão armazenadas sob congelamento (-12 ºC), já que não foi utilizado nenhum tipo de crioprotetor, e a presença deste é fundamental nesses casos, para manutenção das características iniciais. O efeito crioprotetor dos açúcares é atribuído à formação de uma matriz amorfa ao redor das nanopartículas, que promove um espaçamento entre as mesmas, evitando assim, a agregação durante o congelamento e tornando-as ressuspendíveis (SAEZ et al., 2000; KONAN, GURNY, ALLÉMANN, 2002). Porém, as alterações encontradas nas suspensões armazenadas sob refrigeração foram inesperadas, uma vez que se parte do princípio, que a baixa temperatura proporciona um ambiente mais favorável para a conservação do polímero e do fármaco, retardando assim seus processos de degradação (SARTORI, 2007).

O terceiro parâmetro a ser avaliado no estudo de estabilidade foi o potencial zeta (Figura 23), pois representa um indicativo da estabilidade física, devido à repulsão eletrostática causada na superfície das nanopartículas (FAZIL et al., 2012; RIDOLFI et al., 2012). É possível observar que o potencial zeta mensurado logo após a preparação das

nanopartículas foi de -25,05 ± 3,13 mV, sendo que ao final dos 6 meses os potenciais encontrados para o armazenamento em temperatura ambiente, 8 ºC e -12 ºC foram respectivamente de –25,77 ± 1,99; -30,17 ± 1,31 e -27,60 ± 1,10 mV. Apesar de apresentarem algumas variações no período de estudo, os valores mantiveram-se sempre próximo a -25 mV, e analisando-se estatisticamente essa variação não foi significativa ($p > 0,05$).

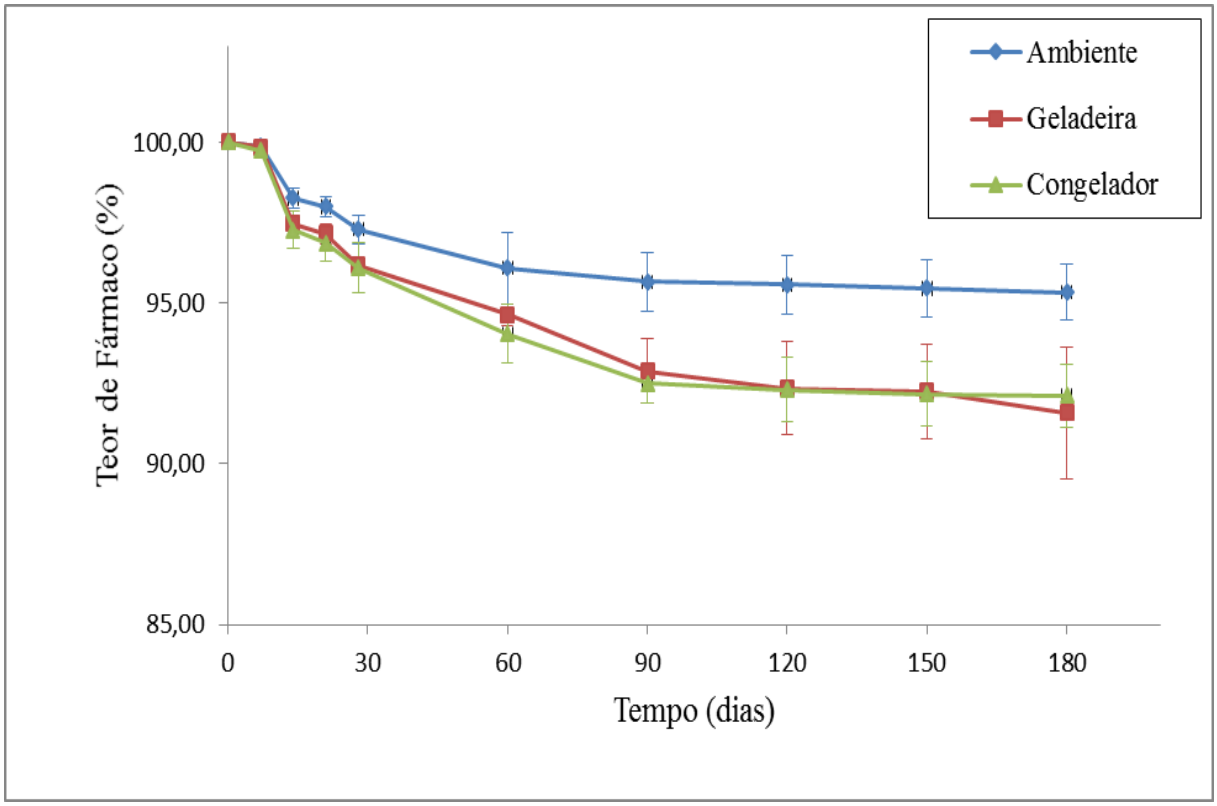
Figura 23. Potencial zeta das nanopartículas de PLA contendo AU em função do tempo, em diferentes condições de armazenamento, n=3.



A liberação prematura do fármaco é um dos fatores que limita a utilização industrial de nanopartículas dispersas em meio aquoso, por isso, esse parâmetro também foi analisado durante a estocagem. O teor de fármaco liberado foi mensurado periodicamente utilizando o método validado em CLAE, onde foi realizada a leitura do sobrenadante resultante da ultracentrifugação, sendo então calculada a porcentagem de AU liberada, em relação ao total encapsulado. De acordo com os resultados obtidos (Figura 24) é possível observar que em todas as temperaturas de armazenamento houve uma diminuição do teor de fármaco, porém esta alteração foi mais intensa para as amostras contendo AU nanoencapsulado mantidas a 8 °C e a -12 ºC. Ao final dos 180 dias, as nanopartículas

dispersas em água e armazenadas em temperatura ambiente liberaram apenas cerca de 4,7% da quantidade inicial de fármaco, enquanto que as armazenadas a 8 ºC e -12 ºC liberaram aproximadamente 8,4 e 7,9% respectivamente.

Figura 24. Teor de fármaco das nanopartículas contendo AU em função do tempo, em diferentes condições de armazenamento, n=3.



A análise da estabilidade das nanopartículas, apesar de muitas vezes ignorada, é de fundamental importância, pois dessa maneira é possível prever quais as melhores condições para o armazenamento, bem como por quanto tempo essas amostras podem ser mantidas sem que sofram alterações. Portanto, para cada formulação específica, o estudo de estabilidade deve ser realizado para garantir a qualidade do produto (ABDELWAHED et al., 2006). Analisando-se de forma conjunta todos os parâmetros levados em consideração no estudo da estabilidade (características macroscópicas, tamanho médio, índice de polidispersão, potencial zeta e teor de fármaco liberado) foi possível determinar que a melhor condição para armazenamento das nanopartículas em água, na ausência de crioprotetores, foi em temperatura ambiente, uma vez que nessa condição todos os parâmetros avaliados se mantiveram estáveis, garantindo estabilidade à formulação no período de 6 meses em que foi avaliada.

5.5. Estudo de liberação *in vitro*

5.5.1. Estudo da solubilidade do AU no meio receptor

Durante um estudo de liberação deve-se assegurar que as condições *sink* sejam mantidas (concentração do soluto não deve alcançar mais do que 10-15% da sua solubilidade máxima (ABDOU, 1989)), para evitar que a velocidade de dissolução seja influenciada artificialmente pela aproximação da saturação durante a realização do teste (MARQUES, BROWN, 2002). Nos testes de solubilidade do AU em meios utilizados para os ensaios de liberação, observou-se menor solubilização em tampão PB tanto com PVA 1% quanto com PVA 5% conforme demonstrado na Tabela 8. A solução com tampão PBS contendo 5% de Tween 80 foi a que demonstrou melhor solubilidade do AU e por isso foi selecionada para continuação dos estudos de liberação *in vitro*.

Tabela 8. Solubilidade do AU em diferentes soluções receptoras a 37 ºC, 150 rpm, para o ensaio da liberação *in vitro* (n=3).

Soluções	**Solubilidade ($\mu g.mL^{-1}$ ± DP)**
Solução PBS Tween 1%	89,15 ± 4,17 [a]
Solução PBS Tween 5%	542,75 ± 8,55 [b]
Solução PB PVA 1%	13,85 ± 0,35 [c]
Solução PB PVA 5%	19,2 ± 3,67 [c]
Solução Lauril Sulfato de Sódio 2,5%	178,55 ± 27,08 [d]

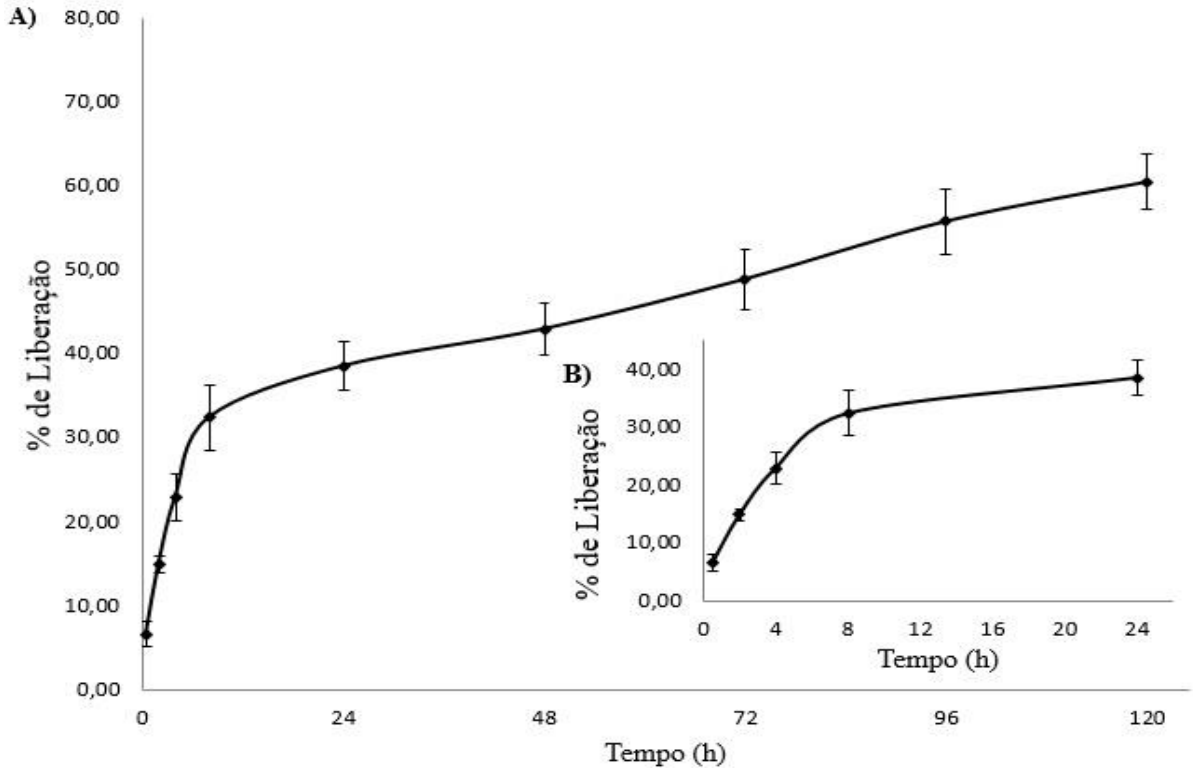
[a,b,c,d] Solubilidade ± desvio padrão analisados por coluna. Letras iguais significam igualdade estatística e letras diferentes desigualdade estatística (ANOVA de uma via, com pós-teste de Tukey e $\alpha < 0,05$)

5.5.2. Perfil de liberação *in vitro*

O teste de liberação é descrito como um ensaio físico-químico para prever a quantidade de fármaco que será liberada a partir do sistema nanométrico em um determinado tempo (MANADAS, PINA, VEIGA, 2002). O perfil de liberação *in vitro* de um fármaco associado às nanopartículas depende de diversos fatores, tais como natureza, biodegradabilidade, peso molecular e concentração do polímero; concentração e características físico-químicas do fármaco (principalmente sua solubilidade e coeficiente de partição óleo/água); tamanho das nanopartículas; mecanismo de como o sistema farmacêutico libera o fármaco e condições do ensaio de liberação (pH do meio, temperatura, tempo de contato, entre outros) (MORA-HUERTAS, FESSI, ELAISSARI, 2010).

O perfil de liberação da formulação foi avaliado e como previsto para NP's, uma liberação sustentada foi observada. Na Figura 25 pode-se observar o perfil de liberação do AU a partir das nanopartículas nas primeiras 24 h (Figura 25-b), e durante todo o experimento de 120 h (Figura 25-a). Em 8 h (Figura 25-a) as nanopartículas de PLA liberaram aproximadamente 30% do AU que estava encapsulado. Após esse tempo, a liberação continuou de forma constante e mais lenta, sendo que ao final das 120 h, houve uma liberação acumulada de 60,53% do AU contido nas nanopartículas de PLA. Utilizando a equação da reta gerada pelo gráfico, calculou-se ainda o tempo para liberar 50% do fármaco (t50%), que foi de aproximadamente 80 h.

Figura 25. Porcentagem de liberação cumulada *in vitro* do AU a partir das nanopartículas de PLA em solução de PBS 50 mM contendo 5% de Tween 80, pH=7,4 à 37 °C.



A partir desses dados é possível observar que a primeira etapa da liberação foi rápida (efeito "*burst*"), causada por uma dissolução do fármaco na superfície da partícula, seguido por uma segunda etapa lenta (liberação controlada), devido à difusão do fármaco do interior das nanopartículas. Essa liberação inicial pode ajudar a atingir rapidamente uma concentração adequada de AU no plasma, enquanto a liberação controlada pode manter uma concentração plasmática efetiva do fármaco por um período mais longo (PENG et al., 2010).

Com isso, a baixa biodisponibilidade do AU pode ser parcialmente evitada pelo processo de nanoencapsulação, prolongando assim a sua meia-vida biológica *in vivo*.

O perfil de liberação encontrado foi muito semelhante ao relatado no estudo de Zhang, em que nas primeiras 12 h ocorreu uma liberação de 30% do AU contido nas nanopartículas de mPEG–PCL, sendo também descrito que ocorreu o efeito "*burst*" inicialmente. Ao final do ensaio, em 120 h, a porcentagem liberada de AU foi de aproximadamente 60%, demonstrando igualmente um efeito de liberação prolongada e sustentada (ZHANG et al., 2013).

A compreensão adequada do mecanismo de liberação do ativo a partir do nanocarreador é essencial (ABDEL-MOTTALEB, NEUMANN, LAMPRECHT, 2010). A liberação de agentes terapêuticos das nanopartículas é baseada na dessorção do fármaco na superfície das partículas, na difusão do fármaco, na degradação do polímero ou na combinação dos processos de difusão e degradação (LABHASETWAR, SONG, LEVY, 1997). Por isso, existem muitos modelos matemáticos que podem ser utilizados para descrever a dissolução do fármaco a partir de uma forma farmacêutica (SU et al., 2003).

A avaliação matemática dos perfis de liberação *in vitro* foi realizada pelo ajuste dos dados experimentais aos modelos matemáticos considerando os valores do critério de seleção de modelo (MSC) e do coeficiente de correlação (r) encontrados. A seleção do modelo matemático é baseada no maior r e MSC, pois demonstra melhor adequação. Os resultados estão descritos na Tabela 9 e revelam um melhor ajuste dos dados experimentais para o modelo de Segunda Ordem. Sendo assim, é possível estabelecer que o comportamento de liberação do fármaco a partir das nanopartículas é guiado por duas constantes de liberação, a α ou constante cinética da etapa rápida de liberação e a β, constante cinética verificada na etapa lenta de liberação (PEREIRA et al., 2006).

Tabela 9. Análise cinética de liberação do AU a partir de nanopartículas de PLA em tampão PBS (50 mM, pH=7,4, contendo 5% de Tween 80).

Modelo	**R**	**CSM**	**K (h^{-1})**	
Ordem Zero	0,9133	-0,083	0,6145	
Primeira Ordem	0,9413	0,291	0,0102	
Segunda Ordem	0,9593	1,639	$\alpha=4,29_{x}10^{-18}$	$\beta=0,035$
Higuchi	0,9133	-0,083	0,3727	

r=coeficiente de correlação, CSM = critério de seleção de modelo, k= constante de liberação.

Para predizer qual o mecanismo de liberação do fármaco, aplicou-se o modelo de Korsmeyer-Peppas ($Qt/Q_\infty = at^n$). Esse modelo genericamente é utilizado para analisar a liberação de formas farmacêuticas cujo mecanismo de liberação não é bem conhecido ou quando envolve mais do que um tipo de mecanismo e deve ser aplicado aos dados dos primeiros 60% de liberação do fármaco (KORSMEYER, PEPPAS, 1981; KORSMEYER et al., 1983; PEPPAS, 1985). Geralmente, em matrizes esféricas o valor do coeficiente *n* que pode ser calculado com a equação, está relacionado ao tipo de liberação apresentado pela matriz, assim $n \leq 0{,}43$ indica um processo de difusão do fármaco através da parede polimérica; $n \geq 0{,}85$ indica um processo de erosão da matriz, devido relaxamento das cadeias poliméricas; $0{,}43 < n < 0{,}85$ indica o transporte anômalo, que é a combinação dos processos de erosão e difusão (SIEPMANN, PEPPAS, 2001). A formulação de nanopartículas de PLA contendo AU mostrou um valor de $n = 0{,}30$, indicando que durante o experimento a liberação do AU ocorreu por meio de difusão através da matriz polimérica.

5.6. Aplicabilidade das nanopartículas

5.6.1. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas de PLA contendo AU sobre hemácias

Como já dizia Paracelsus no século XVI, todas as substâncias são tóxicas, a dose correta é que diferencia um veneno de um remédio. O AU é um exemplo disso, embora seja um triterpenoide natural relativamente seguro, a toxicidade pode ocorrer em determinadas circunstâncias, dependendo da dose administrada (FERREIRA et al., 2010; LIU et al., 2005).

Eritrócitos (hemácias) são considerados bons modelos para estudo de toxicidade, devido à sua eficiência, facilidade de trabalho e baixo custo. Uma vez ocorrendo hemólise, acontece liberação de hemoglobina, que pode ser facilmente quantificada por leitura espectrofotométrica, onde a absorbância é proporcional à lise dos eritrócitos (NETO, 2006; CÓTICA et al., 2012). Quando um fármaco possui alto poder de causar hemólise, uma das alternativas para reduzir esse dano é através de sistemas carreadores nanométricos, tais como as NP’s, que são capazes de fornecer uma liberação lenta e controlada do fármaco, fazendo com que este não atinja seus limites tóxicos (CASA et al., 2015; LASA-SARACÍBAR et al., 2014).

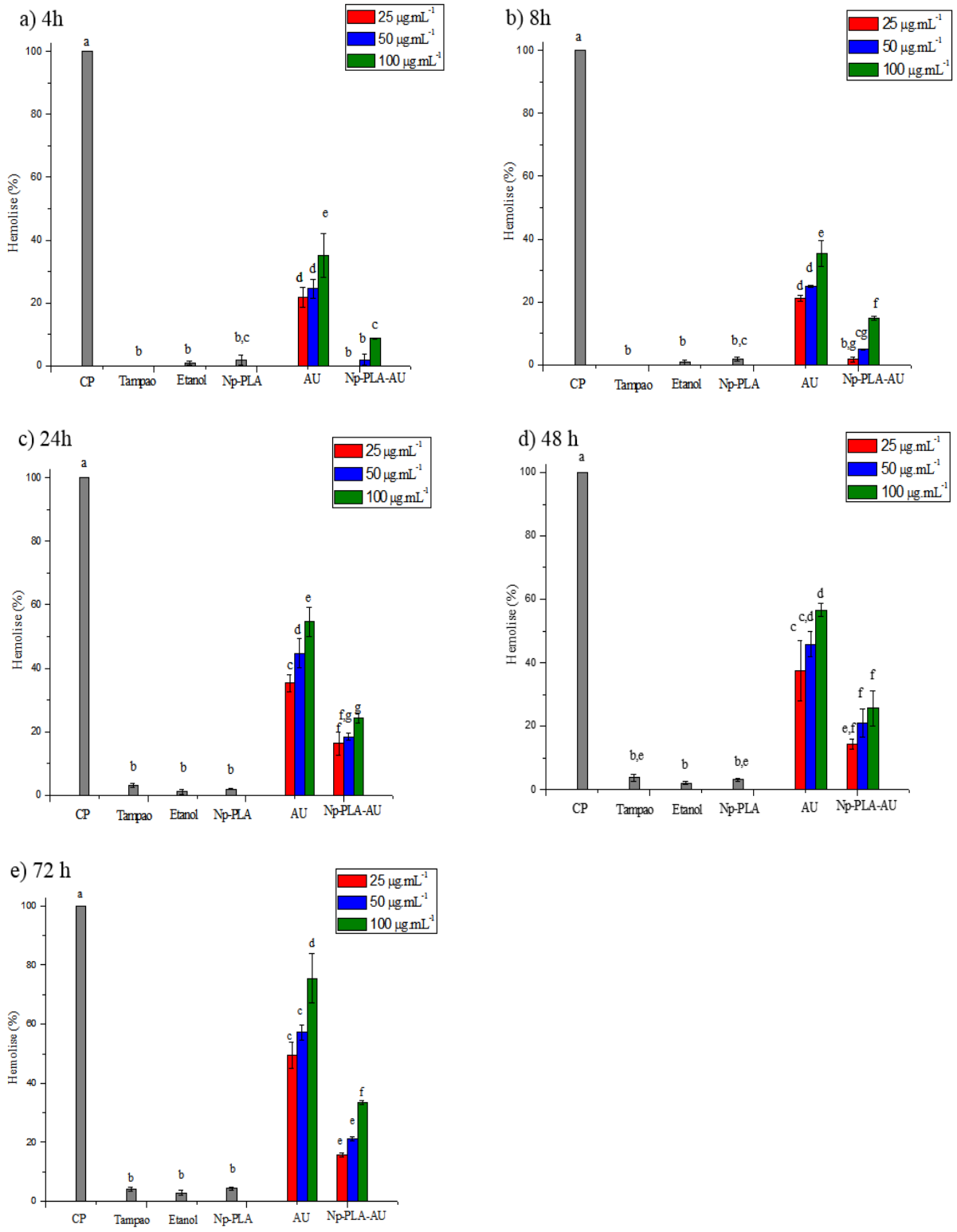
Diante disso é essencial a verificação do potencial hemolítico das nanopartículas, pois caso estas sejam administradas de maneira intravenosa, entrariam em contato

primeiramente com as células vermelhas do sangue (eritrócitos), que estão em maior proporção na corrente sanguínea (NAAHIDI et al., 2013). Portanto, o estudo de citotoxicidade sobre hemácias foi realizado a fim de verificar se o AU e as nanopartículas de PLA contendo AU apresentariam ou não efeito tóxico para esse modelo experimental.

O ensaio foi realizado por 4, 8, 24, 48 e 72 h, e os resultados estão apresentados na Figura 26. A atividade hemolítica das amostras mostrou-se tempo-dependente e concentração-dependente, sendo que a capacidade hemolítica do tampão, do etanol (solvente) e das nanopartículas brancas não ultrapassou 5% ao final do experimento, enquanto que o controle positivo (água) apresentou hemólise total (100%) desde as primeiras 4 h. Como mostrado na Figura 26, após 4 h de exposição das células com as nanopartículas de PLA contendo AU, a hemólise máxima (100 $\mu g.mL^{-1}$) foi cerca de 8%. Ao contrário, o AU livre mostrou atividade hemolítica superior ($p < 0,05$), próxima dos 35% para a mesma concentração. Com o passar do tempo, foi demonstrado um aumento na toxicidade celular tanto para o AU livre quanto para o nanoencapsulado. Ao final das 72 h, o AU livre hemolisou cerca de 50, 57 e 75% dos eritrócitos para as concentrações de 25, 50 e 100 $\mu g.mL^{-1}$ respectivamente, enquanto que as nanopartículas contendo o fármaco mostraram uma atividade hemolítica bem inferior (16, 21 e 33 %) ($p < 0,05$). Essa diferença pode ser também visualizada através da coloração dos sobrenadantes obtidos após a ultracentrifugação (Figura 27).

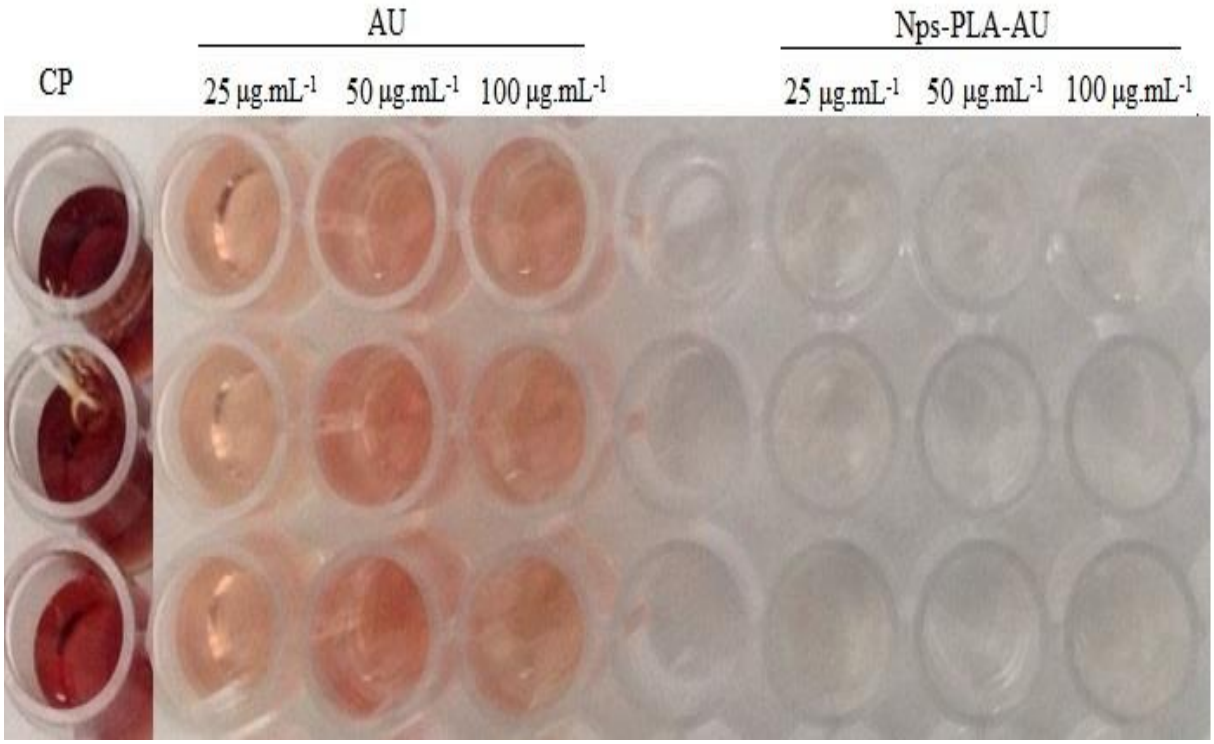
Porém, se fizermos uma correlação com o teste de liberação *in vitro*, vamos verificar algumas discrepâncias nos resultados de hemólise, já que o valor de AU liberado para o teste de hemólise não seguiu o mesmo perfil quantitativo obtido no teste de liberação *in vitro*, (em 72 h de ensaio de hemólise, as nanopartículas contendo 100 µg de AU deveriam liberar cerca de 50% de AU (de acordo com os resultados de liberação *in vitro*), que corresponde a uma liberação de 50 µg de AU, portanto a hemólise apresentada por essas nanoparticulas deveria ser semelhante à hemólise causada pela concentração intermediária de AU livre, porém isso não foi obtido). Uma possível explicação para esse resultado, pode ser devido à utilização do surfactante Tween 80 durante o estudo liberação *in vitro* (para manter as condições sink). A presença deste agente tensoativo provavelmente permitiu que uma maior quantidade de AU fosse liberado das nanopartículas.

Figura 26. Porcentagem de hemólise produzida pelo controle positivo (CP), tampão, etanol, nanopartículas de PLA vazias (NP's-PLA), ácido ursolico (AU) (25, 50 e 100 µg.mL^{-1}) e nanopartículas de PLA contendo ácido ursólico (NP's-PLA-AU) (25, 50 e 100 µg.mL^{-1}) em a) 4 h; b) 8 h; c)24 h; d)48 h; e) 72 h.



[a,b,c,d,e,f,g] Letras iguais significam igualdade estatística e letras diferentes desigualdade estatística (ANOVA com pós-teste de Tukey e $\alpha < 0,05$).

Figura 27. Poços de uma microplaca de Elisa utilizada para leituras dos sobrenadantes resultantes da centrifugação das suspensões de hemácias, em 72 h**.**



A hemólise não foi constatada nas nanopartículas de PLA vazias (sem AU associado), confirmando a biocompatibilidade do polímero empregado na formulação, o que já era esperado, devido ao PLA ser aprovado pelo FDA por possuir ótima biocompatibilidade e baixa toxicidade. Isso também ressalta o fato de que o padrão hemolítico está associado unicamente ao fármaco (ESSA, RABANEL, HILDGEN, 2010).

De maneira geral, um menor potencial hemolítico foi observado para as nanopartículas de AU, o que sugere que o tipo de polímero e/ou forma da nanopartícula pode reduzir a interação do fármaco com as células sanguíneas, provavelmente devido à liberação do fármaco a partir da nanopartícula se dar de forma gradativa e prolongada. De acordo com as porcentagens de hemólise apresentadas pelas nanoestruturas testadas no presente estudo, as NP’s podem ser consideradas potenciais carreadores de AU, já que estas foram capazes de retardar o rompimento dos eritrócitos. As NP´s se mostraram, portanto, menos tóxicas que o fármaco em sua forma livre, indicando a viabilidade de seu potencial para aplicações farmacêuticas e/ou biotecnológicas.

5.6.2. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas de PLA contendo AU sobre linhagem tumoral B16-F10

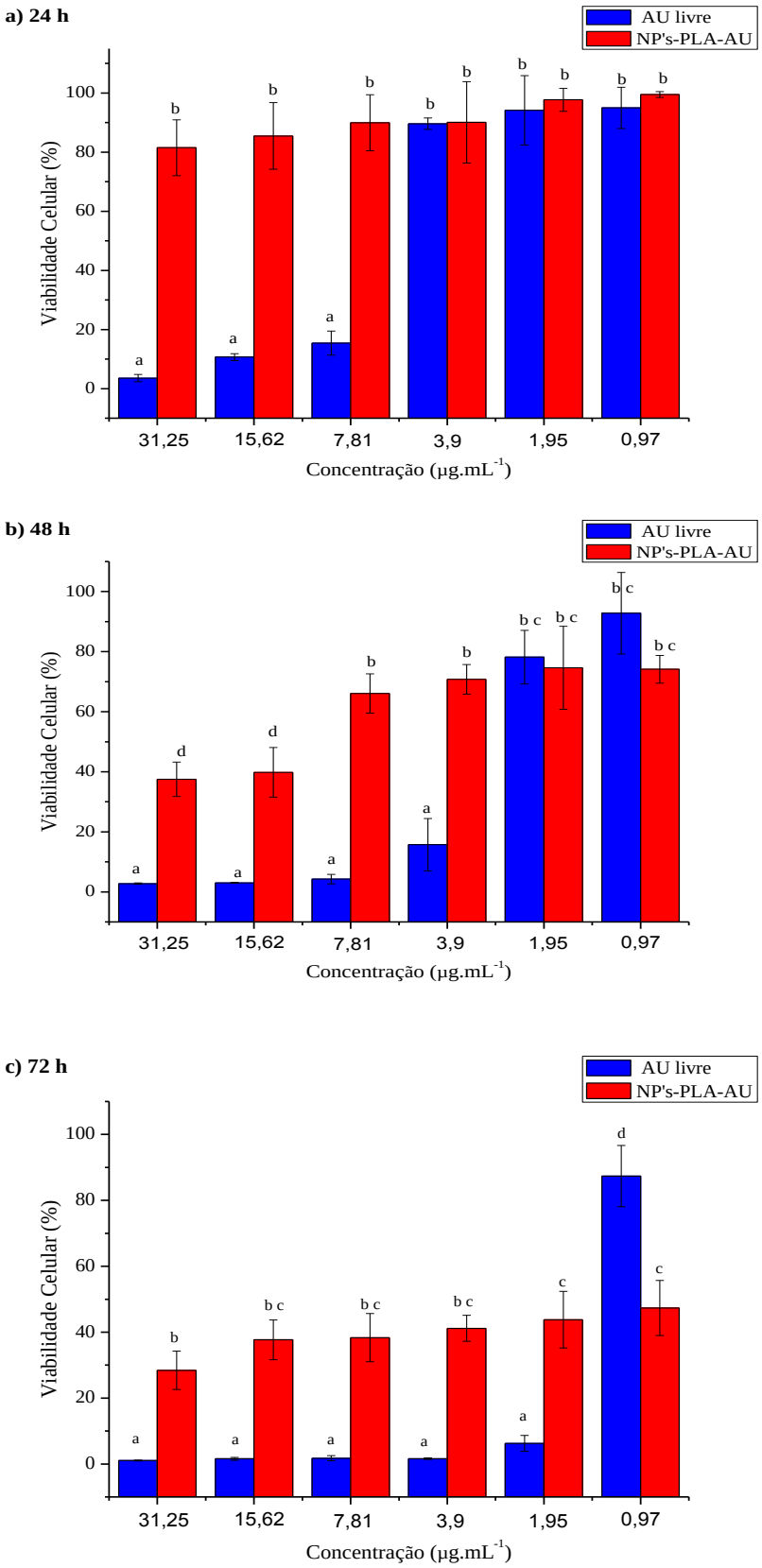
Triterpenos ácidos tal como o AU, podem atuar em vários estágios no desenvolvimento de tumores, como na inibição da tumorigênese, inibição da progressão do tumor e indução da diferenciação tumoral (OVESNA et al., 2004). Além disso, o AU possui alta capacidade de produzir apoptose sem lesar as mitocôndrias. Já foi comprovado em outros estudos sua capacidade de provocar apoptose em grande variedade de neoplasias humanas, como nas células B16 do melanoma humano, parando o ciclo celular na fase G1 e consequentemente levando à supressão de metástases (ES-SAADY et al., 1996).

O melanoma cutâneo maligno é considerado um dos mais perigosos cânceres de pele devido à sua alta possibilidade de metástase. Quando no estado disseminado, possui poucas opções eficazes de tratamento com péssimo prognóstico. A sobrevida média do paciente com melanoma metastático é de 6 a 9 meses e o tratamento quimioterápico sistêmico atual apresenta resposta significativa em apenas uma minoria dos pacientes (HUNCHAREK et al., 2001; LOTZE et al., 2001; WACK et al., 2001). O número de casos de melanoma no mundo está aumentando mais rápido do que qualquer outro câncer, representando cerca de 4 a 5 % de todos os tumores malignos (JEMAL et al., 2009).

A atividade citotóxica do AU livre e nanoencapsulado sobre as células B16-F10 (melanoma murino) foi avaliada nos períodos predeterminados de 24, 48 e 72 h com as concentrações finais de 31,25; 15,62; 7,81; 3,9; 1,95; 0,97 $\mu g.mL^{-1}$. Os resultados estão expressos em percentual de viabilidade celular na Figura 28. Os resultados mostraram que tanto o fármaco livre quanto as nanopartículas de PLA contendo AU exibiram um efeito citotóxico tempo-dependente, com exceção da maior concentração de fármaco livre, ou seja, a medida que aumenta o tempo de incubação com as células, maior é a citotoxicidade.

Em todos os tempos estudados, os controles dos solventes (metanol e DMSO) e as nanopartículas vazias, apresentaram um percentual de viabilidade celular próxima a 100% (dados não apresentados na Figura 28), confirmando dessa maneira que o polímero e os solventes não interferiram nos resultados obtidos.

Figura 28. Porcentagem de viabilidade celular das concentrações de AU encapsulado e não encapsulado sobre a linhagem B16-F10, em a) 24 h, b) 48 h e c)72 h.



[a,b,c,d] Letras iguais significam igualdade estatística e letras diferentes desigualdade estatística (ANOVA com pós-teste de Tukey e $\alpha < 0,05$).

No primeiro tempo, 24 h, o AU livre apresentou perfil semelhante de citotoxicidade, com viabilidade celular próximo a 10% para as três maiores concentrações (31,25; 15,62 e 7,81 $\mu g.mL^{-1}$), mostrando uma citotoxicidade superior em relação aos nanoestruturados que apresentaram viabilidade celular próxima de 80%. Nas concentrações 3,9; 1,95 e 0,97 $\mu g.mL^{-1}$, a viabilidade celular foi estatisticamente semelhante entre o AU livre e as nanopartículas contendo AU.

No tempo de 48 h, as quatro maiores concentrações de AU livre demonstraram uma viabilidade celular inferior a 15%, enquanto que as nanopartículas nessas mesmas concentração apresentaram viabilidade de 37, 39, 66 e 70%. Nas concentrações de 1,95 e 0,97 $\mu g.mL^{-1}$, o AU livre e as nanopartículas apresentaram semelhança estatística no que diz respeito à viabilidade celular.

Após 72 h de incubação, a viabilidade celular para as quatro maiores concentrações de fármaco livre não ultrapassou 2%, e para a concentração 1,9 $\mu g.mL^{-1}$ foi próxima aos 6%. Nessas mesmas concentrações, as nanopartículas de AU demonstraram um menor efeito citotóxico ($p < 0,05$), com 28 a 43% de células viáveis. Porém na menor concentração testada (0,97 $\mu g.mL^{-1}$), a porcentagem de viabilidade celular das nanopartículas contendo AU foi de aproximadamente 47%, enquanto que do AU livre foi de 87%, mostrando dessa maneira que após 72 h de estudo, as nanopartículas na sua concentração menor foram mais citotóxicas que o fármaco livre na mesma concentração.

O menor potencial citotóxico inicialmente apresentado pelas nanopartículas de PLA contendo AU em relação ao AU livre pode ser explicado devido à lenta liberação do AU a partir das nanopartículas. Enquanto o AU livre estava totalmente disponível para interagir com as células e promover o seu efeito citotóxico desde o primeiro momento, o AU encapsulado nas nanopartículas foi sendo liberado progressivamente.

Quando administrada *in vivo*, a atividade biológica das nanopartículas pode ser diferente devido modulações dos parâmetros farmacocinéticos, proteção do fármaco contra degradação, aumento da biodisponibilidade, além do direcionamento passivo, que ocorre no caso de nanopartículas destinadas para tratamento de tumores. Os tamanhos adequados das nanopartículas e as propriedades citadas anteriormente, lhes permitem extravasar através dos vasos sanguíneos e preferencialmente acumular-se no tumor através do efeito permeabilidade e retenção aumentadas (EPR) (PETROS, DESIMONE, 2010; PALEOS et al., 2010; DANHIER, FERON, PREAT, 2010).

Normalmente, o endotélio vascular possui fenestrações entre 5 e 10 nm, porém nos tumores sólidos, os neovasos têm fenestrações bem maiores, entre 100 e 780 nm (HOBBS et al., 1998). Dessa forma, nanopartículas com tamanhos próximos de 200 nm como as obtidas neste trabalho, conseguem entrar nas fenestrações mais largas dos neovasos dos tumores sólidos, mas não conseguem entrar nas fenestrações estreitas dos endotélios dos tecidos normais, ocorrendo um maior acúmulo das nanopartículas com fármaco no tumor e pouca ou nenhuma nanopartícula nos tecidos normais. Devido à esse fato, as nanopartículas são absorvidas com maior seletividade no tumor do que no tecido saudável (PODDUTURI et al., 2013), tornando-se dessa maneira mais eficazes que o próprio fármaco livre.

Apesar das nanopartículas de PLA contendo AU exibirem um menor efeito citotóxico que a droga livre, principalmente nas maiores concentrações, é importante ressaltar que os resultados são promissores, já que o sistema nanoestruturado não inibiu atividade antitumoral do AU, demonstrando ser uma forma interessante de carrear e liberar o fármaco com doses concentradas nas células tumorais.

5.6.3. Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante das nanopartículas de AU

O oxigênio é essencial para a oxidação de compostos orgânicos e produção de energia para o metabolismo celular (COMHAIR, ERZURUM, 2002). Porém, uma pequena quantidade do oxigênio consumido (2 a 5%) é reduzido, produzindo uma variedade de substâncias químicas altamente reativas, denominadas espécies reativas de oxigênio (ERO’s) (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999; DAMASCENO et al., 2002). As principais ERO’s distribuem-se em dois grupos, os radicalares que possuem pelo menos um elétron desemparelhado em seus orbitais externos, o que permite a transferência de elétrons com moléculas vizinhas, alguns exemplos são: hidroxila (HO•), superóxido (O2 •−), peroxila (ROO•) e alcoxila (RO•). E os não-radicalares, como peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso, estes não possuem elétrons livres, sendo portanto menos instáveis que os radicais livres, mas também podem reagir com moléculas na sua redondeza (MAGDER, 2006; CAROCHO, FERREIRA, 2013).

Uma substância antioxidante pode ser definida como qualquer substância que quando presente em baixas concentrações, em comparação as concentrações de um substrato oxidável, minimiza ou inibe de maneira significativa sua oxidação, propiciando assim, a diminuição da produção de ERO’s ou as suas ações (APAK et al., 2007; DEVASAGAYAM

et al., 2004). A importância dessas substâncias está ligada principalmente ao fato de que, ERO's quando em excesso podem causar efeitos deletérios sobre as células, causando ou agravando o envelhecimento celular, doenças cardiovasculares, alterações mutagênicas, neurológicas e o crescimento de tumores cancerosos (APAK et al., 2007).

O AU se consagrou na cosmetologia devido sua ação antioxidante e renovação celular. Existem dados na literatura que relacionam essa atividade antioxidante às atividades antitumoral e quimiopreventiva (RAMACHANDRAN, PRASAD, 2008; CHEN et al., 2002). Portanto, o estudo antioxidante foi realizado neste trabalho com o intuito de confirmar a capacidade antioxidante do AU, e além disso verificar se o processo de nanoencapsulação tem influência no seu poder antioxidante.

A capacidade antioxidante *in vitro* dos compostos pode ser verificada de diversas maneiras. Neste trabalho foi realizado o ensaio de inibição do ácido hipocloroso (HOCl), levando em consideração que em sistemas biológicos o HOCl é o agente oxidante mais tóxico e abundante produzido por neutrófilos nos sítios das inflamações. Ele também pode atacar moléculas importantes e gerar outras ERO's que são altamente prejudiciais (ARUOMA al., 1989). Em condições patológicas o HOCl pode ser encontrado em fluídos corporais em concentrações de até 200 µM (FAVERO et al., 1998). Os resultados da atividade antioxidante do AU livre e em nanopartículas pela inibição HOCl estão apresentados na Tabela 10. Cabe ressaltar que as nanopartículas sem o fármaco apresentaram um efeito antioxidante máximo de 5%.

Os resultados obtidos com o AU livre ou nanoencapsulado mostraram um perfil de inibição concentração-dependente. Observa-se no início do experimento (0 h) que o AU livre atingiu porcentagens de inibição superiores ao das nanopartículas de AU ($p < 0,05$), porém nenhuma das concentrações atingiu o máximo de inibição.

Tabela 10. Porcentagem de Inibição do ácido hipocloroso pelo ácido ursólico (livre e nanoencapsulado) nas concentrações de 10, 20, 30 e 50 µg.mL^{-1} em tampão fosfato (50 mM, pH 7.4) (λ =650 nm) nos tempos de 0, 24,48, 72 e 96 h

	Porcentagem de Inibição	
Concentração (µg.mL^{-1})	**AU livre**	**NP's PLA-AU**
	0 h	
10	20,88 ±3,44^{a}	11,40± 2,21^{b}
20	37,72 ±4,62^{a}	16,44 ± 6,09^{b}
30	41,58 ±0,76^{a}	19,79 ± 3,77^{b}
50	46,75 ± 1,47^{a}	35,79 ± 1,76^{b}
	24 h	
10	25,06 ± 3,87^{a}	15,96 ± 8,75^{a}
20	42,59 ± 2,92^{a}	18,80 ± 8,81^{b}
30	45,16 ±4,48^{a}	26,48 ± 5,26^{b}
50	50,53 ± 3,40^{a}	45,35 ± 8,54^{a}
	48 h	
10	18,76 ± 0,89^{a}	15,61 ± 4,51^{a}
20	23,13 ± 1,76^{a}	18,35 ± 1,36^{b}
30	27,41 ± 5,26^{a}	28,76 ± 4,08^{a}
50	41,69 ± 1,96^{a}	55,71 ±8,32^{b}
	72 h	
10	24,61 ± 4,18^{a}	17,90 ± 0,80^{a}
20	27,83 ± 4,02^{a}	23,72 ± 4,44^{a}
30	32,55 ± 5,50^{a}	32,34 ± 2,56^{a}
50	44,19 ± 3,02^{a}	44,86 ± 1,84^{a}
	96 h	
10	10,46 ± 3,95^{a}	14,01 ± 2,49^{a}
20	29,74 ± 8,41^{a}	26,71 ± 7,51^{a}
30	36,93 ± 4,46^{a}	37,53 ± 1,91^{a}
50	54,84 ± 5,82^{a}	52,78 ± 4,86^{a}

^{a,b} média de triplicata ± desvio padrão analisados por linha. Letras iguais significam igualdade estatística e letras diferentes desigualdade estatística (Teste T'Student e α 0.05)

Em 24 h observamos um aumento na capacidade de inibição pelo AU livre e também pelo AU nanoparticulado. Com isso, as nanopartículas começam a igualar-se com o fármaco livre (10 e 50 $\mu g.mL^{-1}$) ($p > 0,05$). Esse aumento na capacidade de inibir o ácido hipocloroso apresentado pela nanopartícula, provavelmente é devido ao efeito *burst* que ocorre nas primeiras 8 h, conforme foi demonstrado no estudo de liberação *in vitro*. Em 48 h o AU livre apresentou menor capacidade sequestrante, do que em 24 h, e as nanopartículas de PLA-AU nas concentrações de 10 e 30 $\mu g.mL^{-1}$ tiveram a mesma capacidade de inibição que a droga livre ($p > 0,05$), e na maior concentração (50 $\mu g.mL^{-1}$), estas mostraram-se mais efetivas ($p < 0,05$). Após 72 h, as nanopartículas contendo o AU demonstraram atividade semelhante ao AU livre ($p > 0,05$) em todas as concentrações testadas. O fato das nanopartículas liberarem lentamente o fármaco encapsulado e o tornarem disponível progressivamente para efetuar sua ação, justificam o tempo que o AU encapsulado leva para alcançar os mesmo percentuais de inibição da droga livre.

Esses resultados sugerem que a nanoencapsulação pelo método de emulsificação-evaporação do solvente não diminui o potencial antioxidante do AU, além de mostrar que a nanoencapsulação do AU pode expandir seus diversos efeitos biológicos, que são dependentes da propriedade antioxidante. Nanopartículas de PLA são carreadores potenciais do AU e o efeito cumulativo promovido pela liberação contínua do fármaco a partir das nanopartículas, associada com as vantagens farmacocinéticas destas e o direcionamento ao local alvo, torna o desempenho das nanopartículas carregadas com droga superiores à droga livre, quando aplicado *in vivo*.

6. CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- O desenvolvimento e a validação do método analítico por CLAE, com detecção DAD, foi realizado de forma eficaz, com os parâmetros de linearidade, limites, precisão, exatidão, seletividade e robustez dentro das normativas regentes, permitindo a quantificação do AU nas nanopartículas de PLA e no meio de dissolução utilizado no ensaio liberação;
- As nanopartículas de PLA contendo AU foram produzidas com sucesso por meio do método de emulsificação-evaporação do solvente;
- A caracterização físico-química demonstrou que esse método permitiu encapsular elevados teores de fármaco, que as nanopartículas desenvolvidas apresentaram reduzido diâmetro médio, baixo índice de polidispersão, morfologia esférica ou levemente ovalada, potencial zeta negativo e distante da neutralidade, além da interação/complexação do AU com a matriz polimérica e amorfização do fármaco;
- Através do estudo de estabilidade no período de 6 meses, foi possível determinar que a melhor temperatura para armazenamento das nanopartículas de PLA contendo AU foi em temperatura ambiente;
- No ensaio de liberação, cerca de 60% da quantidade total de fármaco foi liberado a partir das nanopartículas de PLA, em um período de 120 h, indicando que a nanoencapsulação prolongou a liberação do AU livre. O perfil de liberação cinética do AU foi determinado como sendo de segunda ordem, onde o mesmo apresentou uma liberação rápida (constante α), seguida de uma liberação lenta e contínua (constante β), sendo possível predizer que a liberação ocorreu por meio de difusão;
- No teste de citotoxicidade frente a hemácias, as nanopartículas de PLA contendo AU mostraram-se menos tóxicas que o fármaco em sua forma livre;
- No ensaio de citotoxicidade sobre as células B16-F10 observou-se que as nanopartículas contendo AU apresentaram efeito citotóxico tempo-dependente, obtendo-se cerca de 72% de morte celular ao final de 72 h;
- As nanopartículas de PLA contendo AU foram avaliadas quanto a capacidade de inativação do ácido hipocloroso (HOCl) e o resultado obtido mostra um perfil concentração-dependente, além de comprovar que o processo de nanoencapsulação não diminuiu o potencial antioxidante do AU;

Até o momento, o conjunto de resultados permite afirmar que as NP´s desenvolvidas apresentam adequadas características físico-químicas que as tornam potenciais sistemas de

liberação controlada de AU, capazes de manter a atividade antioxidante e antitumoral do fármaco e diminuir sua citotoxicidade frente a células normais (eritrócitos). Porém, ainda são necessários demais estudos com outras linhagens tumorais, assim como estudos de biodisponibilidade e ensaios *in vivo*, onde será possível visualizar o direcionamento para os tumores, com uma possível melhora na atividade do AU.

7. ANEXO

7.1. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO OESTE - UNICENTRO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE ÁCIDO URSÓLICO E DE DISSELENETO DE DIFENILA.

Pesquisador: Emilli Antônio **Área Temática:**

Versão: 3

CAAE: 46433715.6.0000.0106

Instituição Proponente: Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.174.406

Data da Relatoria: 04/08/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se da apreciação do projeto de pesquisa intitulado AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE ÁCIDO URSÓLICO E DE DISSELENETO DE DIFENILA., de interesse e responsabilidade do(a) proponente Emilli Antônio. A pesquisa pretende associar ÁCIDO URSÓLICO E DE DISSELENETO DE DIFENILA com as nanopartículas e espera-se que ocorra redução da citotoxicidade sobre outras células não tumorais. Acredita -se que as nanopartículas possam desempenhar um atividade protetora sobre as hemácias e leucócitos polimorfonucleares (LPMN). Avaliação da citotoxicidade in vitro sobre hemácias: Serão coletados 10 mL de sangue total de três indivíduos voluntários sadios adultos, na região da fossa antecubital, em tubo de ensaio contendo 10µL de heparina, no laboratório de nanotecnologia. Esses indivíduos serão abordados e convidados a participar do estudo no próprio laboratório de nanotecnologia, dias antes de realizar a coleta. Os voluntários que aceitarem participar assinarão o TCLE e receberão todas as orientações incluindo a data que deverão retornar para coleta do sangue. A coleta será realizada com materiais descartáveis, pela pesquisadora responsável, que possui graduação em farmácia.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste estudo, que faz parte de um projeto de pós-graduação, é desenvolver um sistema nanoestruturado polimérico capaz de carrear o AU e (PhSe)2, com finalidade de reduzir a

Endereço: Rua Simeão Camargo Varella de Sá, 03 - Campus CEDETEG - (ao lado do Departamento de Nutrição)
Bairro: Vila Carli **CEP:** 85.040-080
UF: PR **Município:** GUARAPUAVA
Telefone: (42)3629-8177 **Fax:** (42)3629-8100 **E-mail:** comep_unicentro@yahoo.com.br

toxicidade sobre hemácias e leucócitos polimorfonucleares (LPMN).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os ricos que podem ocorrer é em relação à contaminação de possíveis doenças transmissíveis por sangue ao coletor, mas utilizando-se de maneira adequada as técnicas de biossegurança, as chances de contaminação serão menores. Para o paciente, há riscos físicos e psicológicos (pela perfuração da fossa antecubital com agulha para a coleta de sangue) como hematomas, dor, lesão de nervos, medo, ansiedade, porém os riscos deste se justificam pelo benefício esperado da pesquisa, e serão minimizados pela permanência do braço esticado, sem dobrar, assim como compressas com gelo no local da coleta, que reduzirão o surgimento de manchas avermelhadas e roxas. No caso da formação de hematomas, abcesso cutâneo ou qualquer dano decorrente da pesquisa, o pesquisador se responsabiliza pela assistência integral, imediata e gratuita.

Benefícios:

O desenvolvimento de nanopartículas de AU e de (PhSe)2 é benéfico, pois pode ser capaz de reduzir os efeitos tóxicos dos fármacos sobre as células normais

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante, uma vez que serão investigadas a redução da citotoxidade dos quimioterápicos sobre células não tumorais pela utilização da nanotecnologia.

Apresenta como critérios de inclusão: Pacientes saudáveis e adultos Não
apresenta critérios de exclusão.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

(1) Folha de rosto: adequada

(2) Carta de anuência: adequada

(3) TCLE: adequado

(4) Cronograma: anexado

(5) Orçamento: anexado

(6) Projeto completo: anexado

(7) Instrumento para coleta dos dados: não se aplica

Recomendações:

Ressalta-se que segundo a Resolução 466/2012:

XI – DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL - f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

PARECER APROVADO: a presente pesquisa está em conformidade com a Resolução 466/2012.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

PROJETO APROVADO.

Em atendimento à Resolução 466/2012 CNS-MS, deverá ser encaminhado ao CEP o relatório parcial assim que tenha transcorrido um ano da pesquisa e final em até trinta dias após o término da Pesquisa.

Qualquer alteração no projeto deverá ser encaminhada para análise deste comitê, por meio de emenda.

Endereço: Rua Simeão Camargo Varella de Sá, 03 - Campus CEDETEG - (ao lado do Departamento de Nutrição)
Bairro: Vila Carli **CEP:** 85.040-080
UF: PR **Município:** GUARAPUAVA
Telefone: (42)3629-8177 **Fax:** (42)3629-8100 **E-mail:** comep_unicentro@yahoo.com.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO OESTE - UNICENTRO

Continuação do Parecer: 1.174.406

GUARAPUAVA, 06 de Agosto de 2015

Assinado por:

Tatiane Baratieri
(Coordenador)

Endereço: Rua Simeão Camargo Varella de Sá, 03 - Campus CEDETEG - (ao lado do Departamento de Nutrição)
Bairro: Vila Carli **CEP:** 85.040-080
UF: PR **Município:** GUARAPUAVA
Telefone: (42)3629-8177 **Fax:** (42)3629-8100 **E-mail:** comep_unicentro@yahoo.com.br

REFERÊNCIAS

ABDEL-MOTTALEB, M. M. A.; NEUMANN, D.; LAMPRECHT, A. In vitro drug release mechanism from lipid nanocapsules (LNC). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 390, n. 2, p. 208–213, 2010.

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; STAINMESSE, S.; FESSI, H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. **Advanced Drug delivery Reviews**, v. 58, n. 15, p. 1688-1713, 2006.

ABDOU, H. M. **Dissolución, biovailability and bioequivalence**. Easton: Mack Printing, 1989. p.554.

ACHIWA, Y.; HASEGAWA, K.; KOMIYA, T.; UDAGAWA, Y. Ursolic acid induces Bax dependente apoptosis through the caspase-3 pathway in endometrial câncer SNG-II cells. **Oncology Report**, v. 13, n. 1 p. 51–57, 2005.

ALLEMANN, E.; GURNY. R.; DOELKER E. Drug-loaded nanoparticles: preparation methods and drug targeting issues. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 39, n. 5, p. 173- 191, 1993.

ALMEIDA, M. M. **Desenvolvimento, caracterização, avaliação da estabilidade e da penetração cutânea de nanopartículas de ácido ursólico incorporadas em formulação cosmética.** 2012. 156 f. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo- SP.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

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

ANDERSSON, D.; LIU, J. J.; NILSSON, A.; DUAN, R. D. Ursolic acid inhibits proliferation and stimulates apoptosis in HT29 cells following activation of alcaline sphingo my elinase. **Anticancer Research**, v. 23, p. 3317–3322, 2003.

ANDRADE, M.; SILVA, S. R. Administração de quimioterápicos: uma proposta de protocolo de enfermagem**. Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 60, n. 3, p. 331-335, 2007.

ANDRADE, J. E. **Medidas de Tamanho e Potencial Zeta de nanopartículas utilizando Espalhamento de Luz**, Universidade Federal do Sergipe, 2008.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE 889 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.; CELIK, S. E.; BEKTASOGLU, 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.

ARAUJO, J.; VEJA, E.; LOPES, C.; EGEA, M. A.; GARCIA, M. L.; SOUTO, E. B. Effect of polymer viscosity on physicochemical properties and ocular tolerance of FB-loaded PLGA nanospheres. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 72, n. 1, p. 48-56, 2009.

ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B.; HOEY, B. M.; BUTLER, J. The antioxidant action of n-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 6, n. 6, p. 593-597, 1989.

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

BANNO, N.; AKIHISA, T.; TOKUDA, H.; YASUKAWA, K.; NISHINO, H. Triterpene acids from the leaves of Perilla frutescens and their anti-inflammatory and antitumor promoting effects. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 68, n. 1, p.85–90. 2004.

BARIL, M. B.; FRANCO, G. F.; VIANA, R. S.; ZANIN, S. M. W. Nanotecnologia aplicada aos cosméticos. **Visão acadêmica**, v. 13, n. 1, p. 45-54, 2012.

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

BARRATT, G. M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 5, p. 163-171, 2000.

BELBELLA, A.; VAUTHIER, C.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F. In vitro degradation of nanospheres from poly (D,L-lactides) of different molecular weights and polydispersities. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 129, n. 1-2, p. 95-102, 1996.

BENOIT, J. P.; COUVREUR, P.; DEVISSAGUET, J. P.; FESSI, H.; PUISIEUX, F.; ROBLOT-TREUPEL, L. Les formes «vectorisees» ou a «distribution modulle», nouveaux systemes d'administration des medicaments. **Journal de pharmacie de Belgique**, v. 41, n. 5, p. 319-329, 1986.

BONASSA, E. M. A.; SANTANA, T. R. Toxicidade dermatológica. In: BONASSA E. M. A.; SANTANA, T. R. **Enfermagem em terapêutica oncológica**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2005, p. 89-100.

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

BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J. O. Nanoparticles and targeted systems for cancer therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 11, p. 1649-1659, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer Instituto Nacional do Câncer. Quimioterapia. **Controle do Câncer: uma proposta de integração ensino serviço.** 2ª ed. rev. atual. - Rio de Janeiro: Pro-Onco. 1993. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101>. Acesso em: 24 de outubro de 2014.

BRITTAIN, H. G. **Methods for the Characterization of Polymorphs and Solvates**. New York: Marcel Dekker, 1999. v. 95, cap. 6: Polymorphism in Pharmaceutical Solids, p. 227-278.

BRITTAIN, H. G. **Polymorphism in Pharmaceutical Solids**. New York: Marcel Dekker, 1999. v. 95, cap. 5: Generation of Polymorphs, Hydrates, Solvates, and Amorphous Solids, p.183-225.

BRUNNER, L. S.; SUDDARTH, D. S. **Tratado de Enfermagem Medico-Cirúrgica**. 7. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 5, p. 530 -536, 1996.

CARLES, M.; HERMOSILLA, L. O futuro da medicina: nanomedicina. **Revista científica eletônica de medicina veterinária**, v. 6, n. 10, p. 1-7, 2008.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.

CASA, D. M.; CARRARO, T. C. M. M.; CAMARGO, L. E. A.; DALMOLIN, L. F.; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R. M. Poly(L-lactide) Nanoparticles reduce Amphotericin B cytotoxicity and maintain its in vitro antifungal activity. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology,** v. 15, n. 1, p. 848-854, 2015.

CHATURVEDULA, P. V. S.; GAO, Z.; HECHT, S. M.; JONES, S. H.; KINGSTON, D. G. I. A New Acylated Oleanane Triterpenoid from Couepia polyandra that Inhibits the Lyase Activity of DNA Polymerase β. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 11, p.1463-1465, 2003.

CHELLAMPILLAI, B.; PAWAR, A. P. Acute and subacute toxicity study of andrographolide bioactive in rodents: Evidence for the medicinal use as an alternative medicine. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 35, n. 3-4, p. 123-129, 2011.

CHELLAT, F.; MERHI. Y.; MOREAU A.; YAHIA L. H. Therapeutic potential of nanoparticulate systems for macrophage targeting. **Biomaterials**, v. 26, n. 35, p. 7260-7275, 2005.

CHEN, G.; LU, H.; WANG, C.; YAMASHITA, K.; MANABE, M.; XU, S.; KODAMA, H. Effect of five triterpenoid compounds isolated from leaves of Diospyros kaki on stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation in human polymorphonuclear leukocytes. **Clinica Chimica Acta**, v. 320, n. 1-2, p. 11-16, 2002.

CIPAK, L.; GRAUSOVA, L.; MIADOKOVA, E.; NOVOTNY, L.; RAUKO, P. Dual activity of triterpenoids: apoptotic versus antidifferentiation effects. **Archives of Toxicology**, v. 80, n. 7, p. 429-435, 2006.

COMHAIR, S. A. A.; ERZURUM, S. C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 283, n. 2, p. L246-L255, 2002.

CONNOLLY J. D.; HILL R. A. Triterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 27, n. 1, p. 79–132, 2010.

CONNOLLY J. D.; HILL R. A. Triterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 29, n. 7, p.780–818, 2012.

CÓTICA, L. F.; FREITAS, V. F.; DIAS, G. S.; SANTOS, I. A.; VENDRAME, S. C.; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R. M.; STARUCH, M.; JAIN, M. Simple and facile approach to synthesize magnetite nanoparticles and assessment of their effects on blood cells. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials,** v. 324, n. 4, p. 559-563, 2012.

COUVREUR, P.; BARRAT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. **Critical reviews in therapeutic drug carrier systems**, v. 19, n. 2, p. 99-134, 2002.

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

CRUCHO, C. I. C.; BARROS, M. T. Formulation of functionalized PLGA polymeric nanoparticles for targeted drug delivery. **Polymer**, v. 68, p. 41–46, 2015.

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

CRUZ SILVA, M. M.; MADEIRA, V. M.; ALMEIDA, L. M.; CUSTODIO, J. B. A. Hemolysis of human erythrocytes induced by tamoxifen is related to disruption of membrane structure. **Biochimica et biophysica Acta**, v. 1464, n. 1, p. 49-61, 2000.

CUNHA K. S.; LEHMANN M. Drogas anticancer e seus efeitos genotóxicos. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUE J. A. P. **Genética toxicológica**, 1. ed. Porto Alegre: Alcance, 2003. p. 424.

DALLA VECHIA, L.; GNOATTO, S. C. B.; GOSMANN, G. Derivados oleanos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1245-1252, 2009.

DAMASCENO, D. C.; VOLPATO, G. T.; CALDERON, I. M. P.; RUDGE, M. V. C. Radicais livres, estresse oxidativo e diabete. **Diabetes Clínica**, v. 5, n. 5, p.355-361, 2002.

DANHIER, F.; FERON, O.; PREAT, V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 148, n. 2, p. 135-146, 2010.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, n. 2, p. 271-277, 1986.

DENG, J. Z.; STARCK, S. R.; HECHT, S. M. DNA polymerase beta inhibitors from Baeckea gunniana. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 12, p. 1624-1626, 1999.

DEVASAGAYAM, T. P.; TILAK, J. C.; BOLOOR, K. K.; SANE, K. S..; GHASKADBI, S. S.; LELE, R. D. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. **Journal of the Association of Physicians of India**, v. 52, p. 794-804, 2004.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products:** A Biosynthetic Approach. 2. ed. New York: John Wiley, 2001. p. 507.

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

DONG, Y. D.; BOYD, B. J. Applications of X-ray scattering in pharmaceutical science. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 417, n. 1-2, p. 101-111, 2011.

DONG, Y.; FENG, S. S. Methoxy poly(ethylene glycol)-poly(lactide) (mPEG-PLA) nanoparticles for controlled delivery of anticancer drugs. **Biomaterials**, v. 25, n. 14, p. 2843-2849, 2004.

DRUMRIGHT, R. E.; GRUBER, P. R.; HENTON, D. E. Polylactic Acid Technology. **Advanced materials**, v. 12, n. 23, p. 1841-1846, 2000.

DUARTE, L. C.; JUCHEM, P. L.; PULZ, G. M.; BRUM, T. M. M.; CHODUR, N.; LICCARDO, A.; FISCHER, A. C.; ACAUAN, R. B. Aplicações de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Sistema de energia dispersiva (EDS) no Estudo de gemas: exemplos brasileiros. **Pesquisas em Geociências**, v. 30, n. 2, p. 3-15, 2003.

DYPBUKT, J. M.; BISHOP, C.; BROOKS, W. M.; THONG, B.; ERIKSSON, H.; KETTLE, A. J. A sensitive and selective assay for chloramine production by myeloperoxidase. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 39, p. 1468-1477, 2005.

ELOY, J. O.; MARCHETTI, J. M. Solid dispersions containing ursolic acid in Poloxamer 407 and PEG 6000: A comparative study of fusion and solvent methods. **Powder Technology**, v. 253, p. 98–106, 2014.

ELOY, J. O.; OLIVEIRA, E. C. V.; MAROTTA-OLIVEIRA, S. S.; SARAIVA, J.; MARCHETT, J. M. Desenvolvimento e validação de um método analítico por CLAE para quantificação de ácido ursólico em dispersões sólidas. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1036-1040, 2012.

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.

ES-SAADY, D.; SIMON, A.; OLLIER, M.; MAURIZIS, J. C.; CHULIA, A. J.; DELAGE, C. Inhibitory effect of ursolic acid on B16 proliferation through cell cycle arrest. **Cancer Letters**, v. 106, n. 2, p. 193–197, 1996.

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

FAVERO, T. G.; COLTER, D.; HOOPER, P. F.; ABRAMSON, J. J. Hypochlorous acid inhibits Ca (2+) - ATPase from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. **Journal of Applied Physiology**, v. 84, n. 2, p. 425–430, 1998.

FAZIL, M.; MD, S.; HAQUE, S.; KUMAR, M.; BABOOTA, S.; SAHNI, J. K; ALI, J. Development and evaluation of rivastigmine loaded chitosan nanoparticles for brain targeting. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 1, p. 6–15, 2012.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. **Nature Reviews**, v. 5, n. 3, p. 161-171, 2005.

FERREIRA, D. S.; ESPERANDIM, V. R.; TOLDO, M. P. A.; SARAIVA, J.; CUNHA, W. R.; ALBUQUERQUE, S. Trypanocidal activity and acute toxicity assessment of triterpene acids. **Parasitology Research**, v. 106, n. 4, p. 985-989, 2010.

FORD, J. L., MANN, T. E. Fast-Scan DSC and its role in pharmaceutical physical form characterisation and selection. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 5, p. 422–430, 2012.

FRANZI, A. S; SILVA, P. G. Avaliação da qualidade de vida em pacientes submetidos à quimioterapia ambulatorial no Hospital de Heliópolis**. Revista brasileira de cancerologia**, v. 49, n. 3, p.153-158, 2003.

FREITAS, S.; MERKLE, H. P.; GANDER, B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. **Journal of Controlled Release,** v. 102, n. 2, p. 313-332, 2005.

FRONE, A. N.; BERLIOZ, S.; CHAILAN, J-F.; PANAITESCU, D. M. Morphology and thermal properties of PLA–cellulose nanofibers composites. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 377-384, 2013.

GANEA, G. M.; SABLIOV, C. M.; ISHOLA, A. O.; FAKAYODE, S. O.; WARNER,I. M. Experimental design and multivariate analysis for optimizing poly (D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticle synthesis using molecular micelles. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, n. 1, p. 280-292, 2008.

GELDENHUYS, W. J.; BISHAYEE, A.; DARVESH, A. S.; CARROLL, R. T. Natural products of dietary origin as lead compounds in virtual screening and drug design. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 117–124, 2012.

GIOLITO, I.; IONASHIRO, M. A nomenclatura em análise térmica-parte II. **Cerâmica**, v. 34, n. 225, p. 163-164, 1988.

GOVENDER, T.; STOLNIK, S.; GARNET, M. C.; ILLUM, L.; DAVIS, S. S. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. **Journal of Controlled Release**, v. 57, n. 2, p. 171-185, 1999.

GRIZZI, I.; GARREAU, H.; LI, S.; VERT, M. Hydrolytic degradation of devices based on poly (D,L-lactic acid) size dependence. **Biomaterials**, v. 16, n. 4, p. 305-311, 1995.

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

GUTERRES, S.; BENVENUTTI, E.; POHLMANN, A. Nanopartículas poliméricas para administração de fármacos. In: DURÁN, N.; MATTOSO, L.; MORAIS, P. **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo: Artliber, 2006. p. 161-166.

HAIDA, K. S.; BARON, A.; SILVA, F. J.; ARCELES, M. L.; FERNANDES, A.; ANDREAZZA, A. P.; COSTA, J. H. B. Propriedade sequestrante de radicais livres e determinação do teor de fenólicos totais da Sálvia e Eucalipto. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 4, n. 1, p. 61–66, 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. In:___ **Free radical in biology an medicine**. New York: Oxford University, 1999. p. 189- 276.

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

HANS, M. L.; LOWMAN, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Opinion in Solid State & Materials Science**, v. 6, n. 4, p. 319-327, 2002.

HARMAND, P. O.; DUVAL, R.; DELAGE, C.; SIMON, A. Ursolic acid induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway and caspase-3 activation in M4Beu melanoma cells. **International Journal of Cancer**, v. 114, n. 1, p. 1-11, 2005.

HARRISON, M. A.; RAE, I. F. **General techniques of cell culture**. New York: Cambridge University Press. p. 162, 1997.

HENTON, D. E.; GRUBER, P.; LUNT, J.; RANDALL, J. **Polylactic Acid Technology. Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites.** Boca Raton: CRC Press, 2005. Cap. 16.

HOBBS, S. K.; MONSKY, W. L, YUAN, F.; ROBERTS, W. G.; GRIFFITH, L.; TORCHILIN, V. P.; JAIN, R. K. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 8, p. 4607-4612, 1998.

HOFFMANN, F.; CINATL JR. J.; KABIC'KOVÁ, H.; CINATL, J.; KREUTER, J.; STIENEKER, F. Preparation, characterization and cytotoxicity of methylmethacrylate copolymer nanoparticles with a permanent positive surface charge. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 157, n. 2, p. 189-198, 1997.

HONDA, T.; GRIBBLE, G. W.; SUH, N.; FINLAY, H. J.; ROUNDS, B. V.; BORE, L.; FAVALORO, F. G.; WANG, Y.; SPORN, M. B. Novel synthetic oleanane and ursane triterpenoids with various enone functionalities in ring A as inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 9, p. 1866-1877, 2000.

HOU, Z.; ZHOU, C.; LUO, Y.; ZHAN, C.; WANG, Y.; XIE, L.; ZHANG, Q. PLA nanoparticles loaded with an active lactone form of hydroxycamptothecin: Development, optimization, and in vitro–in vivo evaluation in mice bearing H22 solid tumor. **Drug Development Research**, v. 72, n. 4, p. 337-345, 2011.

HSU, Y.; KUO, P.; LIN, C. Proliferative inhibition, cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by ursolic acid in human non-small cell lung cancer A549 cells. **Life Sciences**, v. 75, n. 19, p. 2303-2316, 2004.

HUNCHAREK, M.; CAUBET, J. F.; MCGARRY, R. Single agent DTIC versus combination chemotherapy with or without immunotherapy in metastatic melanoma: a meta-anal ysis of 3273 patients from 20 randomized trials. **Melanoma Research**, v. 11, n. 1, p. 75-81, 2001.

HUSSEN, S. S.; SHENOY, P.; KRISHNA, M. Development and validation of stability indicating RP-HPLC method for tenofovir nanoparticle formulation. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 245-248, 2013.

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

INCA a. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2016**. **Incidência de câncer no Brasil.** Disponível em: <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/index.asp>. Acesso em: 08 de dezembro de 2015.

INCA b. Instituto Nacional do Câncer. **O que causa o câncer?** Disponível em: < http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 14 de abril de 2014.

IONASHIRO, M. A.; GIOLITO, I. Nomenclatura, padrões e apresentação dos resultados em análise térmica. **Cerâmica**, v. 26, n. 121, p. 17-24, 1980.

JAHANSHAHI, M.; BABAEI, Z. Protein nanoparticle: a unique system as drug delivery vehicles. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 25, p. 4926-4934, 2008.

JAIN, K. K. Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics. **Clinica Chimica Acta**, v. 358, n. 1-2, p. 37-54, 2005.

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

JAIN, S.; HIRST, D. G.; O'SULLIVAN, J. M. Gold nanoparticles as novel agents for câncer therapy. **The British Journal of Radiology**, v. 85, n. 1010, p. 101-113, 2012.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; HAO, Y.; XU, J.; THUN, M. J. Cancer statistics, 2009. **CA Cancer Journal for Clinicians**, v. 59, n. 4, p. 225-49, 2009.

KANAKUBO, Y.; ITO, F.; MURAKAMI, Y. Novel one-pot facile technique for preparing nanoparticles modified with hydrophilic polymers on the surface via block polymer-assisted emulsification/evaporation process. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 78, n. 1, p. 85-91, 2010.

KARAM, T. K. **Obtenção, Caracterização físico-química e Avaliação biológica de nanopartículas de blendas de PLA-PEG contendo Álcool Perílico**. 2015. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual do Centro Oeste, Guarapuava - PR.

KASSI, E.; PAPOUTSI, Z.; PRATSINIS, H.; ALIGIANNIS, N.; MANOUSSAKIS, M.; MOUTSATSOU, P. Ursolic acid, a naturally occurring triterpenoid, demonstrates anticancer activity on human prostate cancer cells. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 133, n. 7, p. 493–500, 2007.

KAUR, G.; VERMA, N. Nature curing cancer – review on structural modification studies with natural active compounds having anti-tumor efficiency. **Biotechnology Reports**, v. 6, p. 64-78, 2015.

KAYSER, O.; LEMKE, A.; HERNÁNDEZ-TREJO, N. The impact of nanobiotechnology on the development of new drug delivery systems**. Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 3-5, 2005.

KONAN, Y. N.; GURNY, R.; ALLÉMANN, E. Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 233, n. 1-2, p. 239-252, 2002.

KONTOGIANI, V. G.; EXARCHOUB, V.; TROGANISC, A.; GEROTHANASSIS, I.P. Rapid and novel discrimination and quantification of oleanolic and ursolic acids in complex plant extracts using two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy-Comparison with HPLC methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 635, n. 2, p. 188-195, 2009.

KORSMEYER, R. W.; GURNY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; PEPPAS, N. A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 15, n. 1, p. 25-35, 1983.

KORSMEYER, R. W.; PEPPAS, N. A. Macromolecular and modeling aspects of swelling controlled systems. In: ROSEMAN, T. J.; MANSDORF, S. Z. **Controlled release delivery systems**. New York: Marcel Dekker, 1981. p. 77-90.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran patologia: bases patológicas das doenças.** 7. ed. Campus: Elsevier, 2005.

KUMARI, A.; KUMAR, V.; YADAV, S. K. Plant extract synthesized PLA nanoparticles for controlled and sustained release of Quercetin: A Green Approach. **PLoS One,** v. 7, n. 7, p.1-10, 2012.

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

KUNKEL, S. D.; ELMORE, C. J.; BONGERS, K. S.; EBERT, S. M.; FOX, D. K.; DYLE, M. C.; BULLARD, S. A.; ADAMS, C. M. Ursolic acid increases skeletal muscle and brown fat and decreases diet-induced obesity, glucose intolerance and fatty liver disease. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. 1-8, 2012.

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.

LABHASETWAR, V.; SONG, C.; LEVY, R. J. Nanoparticle drug delivery system for restenosis. **Advanced Drug Devery Reviews**, v. 24, n. 1, p. 63-85, 1997.

LACOULONCHE, F.; GAMISANS, F.; CHAUVET, A.; GARCIA, M. L.; ESPINA, M.; EGEA, M. A Stability and in vitro drug release of flurbiprofen-loaded poly-epsilon-caprolactone nanospheres. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 25, n. 9, p. 983-993, 1999.

LASA-SARACÍBAR, B.; AZNAR, M. A.; LANA, H.; AIZPÚN, I.; GIL, A. G.; BLANCO-PRIETO, M. J. Lipid nanoparticles protect from edelfosine toxicity in vivo. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 474, n. 1-2, p. 1-5, 2014.

LARA, V. C. D. **Desenvolvimento de nanocápsulas contendo ácido retinóico para tratamento tópico da acne**. 2008. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG.

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

LEMBO, D.; CAVALLI, R. Nanoparticulate delivery systems for antiviral drugs. **Antiviral chemistry & chemotherapy**, v. 21, n. 2, p. 53-70, 2010.

LEUNG, A. Y.; FOSTER, S. **Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drug and cosmetics**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons Inc, 1996.

LI, G. L.; ZHANG, X. L.; YOU, J. M.; SONG, C. H.; SUN, Z. W.; XIA, L. A.; SUO, Y. R. Highly sensitive and selective pre-column derivatization high-performance liquid chromatography approach for rapid determination of triterpenes oleanolic and ursolic acids and application to Swertia species: Optimization of triterpenic acids extraction and pre-column derivatization using response surface methodology. **Analytica Chimica Acta**, v. 688, n. 2, p. 208-218, 2011.

LI, J.; GUO, W. J.; YANG, Q. Y. Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15. **World Journal of Gastroenterology**, v. 8, n. 3, p. 493-495, 2002.

LI, R.; QUAN, P.; LIU, D. F.; WEI, F. D.; XU, Q. W. The influence of cosolvent on the complexation of HP-beta-cyclodextrin switch oleanolic acid and ursolic acid. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 4, p. 1137-1144, 2009.

LINDNER, G. R.; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R. M. Resveratrol-loaded Polymeric nanoparticles: Validation of an HPLC-PDA method to determine the drug entrapment and evaluation of its antioxidant activity. **The ScientificWorld Journal**, 506083, 2013.

LIU, D.; WANG, L.; LIU, Z.; ZHANG. C.; ZHANG, N. J. Preparation, characterization, and in vitro evaluation of docetaxel-loaded poly (lactic acid)-poly (ethylene glycol) nanoparticles for parenteral drug delivery. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 6, n. 6, p. 675-682, 2010.

LIU, H.; WEBSTER, T. J. Nanomedicine for implants: A review of studies and necessary experimental tools. **Biomaterials**, v. 28, n. 2, p. 354-369, 2007.

LIU, J. Oleanolic acid and Ursolic acid: Research Perspectives. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 92-94, 2005.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, n. 2, p. 57–68, 1995.

LOTZE, M. T.; DALLAL, R. M.; KIRKWOOD, J. M.; FLICKINGER, J. C. Melanoma: Cutaneous melanoma. In: DEVITA, V. T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. **Cancer: Principles and Practice of Oncology,** 6. ed. v. 2. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001. p. 2012-2069.

LU, J.; ZHENG, Y. L.; WU, D. M.; LUO, L.; SUN, D. X.; SHAN, Q. Ursolic acid ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damage in the brain of senescente mice induced by D-galactose. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, n. 7, p. 1078–1090, 2007.

MA, X.; WANG, Z. Anticancer drug discovery in the future: an evolutionary perspective. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 23-24, p. 1136-1142, 2009.

MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 237-243, 2000.

MAGDER, S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? **Critical Care**, v. 10, n. 1, p. 208, 2006.

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

MAINARDES, R. M.; URBAN, M. C.; CINTO, P. O.; KHALIL, N. M.; CHAUD, M. V.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIAO, M. P. Colloidal carriers for ophthalmic drug delivery. **Current Drug Targets**, v. 6, n. 3, p. 363-371, 2005.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 376-399, 2002.

MARQUES, M. R. C.; BROWN, W. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. **Revista Analytica**, n. 1, p. 48-51, 2002.

MARTINEZ, A.; MUÑIZ, E.; IGLESIAS, I.; TEIJÓN, J. M.; BLANCO, M. D. Enhanced preclinical efficacy of tamoxifen developed as alginate–cysteine/disulfide bond reduced albumin nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, n. 1-2, p. 574-581, 2012.

MAULVI, F. A.; DALWADI, S. J.; TAKKAR, V. T.; SONI, T. G.; GOHEL, M. C.; GANDHI, T. R. Improvement of dissolution rate of aceclofenac by solid dispersion technique. **Powder Technology**, v. 207, n. 1, p. 47-54, 2011.

MENEMSE, K.; GUNDAY, D. Synthesis, characterization and in vitro degradation of poly(DL-Lactide)/poly(DL-Lactide-co-Glycolide) films. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 23, n. 2, p. 153-161, 1999.

MENEZES, P. F. C.; BAGNATO, V. S.; JOHNKE, R. M.; BONNERUP, C.; SIBATA, C. H.; ALLISON, R. R.; PERUSSI, J. R. Photodynamic therapy for Photogem and Photofrinusing different light wavelengths in 375 human melanoma cells. **Laser Physics Letters**, v. 4, n. 7, p. 546-551, 2007.

MIHRANYAN, A.; FERRAZ, N.; STROMME, M. Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. **Progress in Materials Science**, v. 57, n. 5, p. 875-910, 2012.

MIN, B. S.; KIM, Y. H.; LEE, S. M.; JUNG, H. J.; LEE, J. S.; NA, M. K.; LEE, C. O.; LEE, J. P.; BAE, K. Cytotoxic triterpenes from Crataegus pinnatifida. **Archives of Pharmacal Research**, v. 23, n. 2, p. 155-158, 2000.

MIZUSHINA, Y.; IIDA, A.; OHTA, K.; SUGAWARA, F.; SAKAGUCHI, K. Novel triterpenoids inhibit both DNA polymerase and DNA topoisomerase. **Biochemical Journal**, v. 350, p. 757-763, 2000.

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

MOLPECERES, J.; ABERTURAS, M. R.; CHACÓN, M.; BERGES, L.; GUZMÁN, M. Stability of cyclosporine-loaded poly-sigma-caprolactone nanoparticles. **Journal of Microencapsulation**, v. 14, n. 6, p. 777-787, 1997.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1-2, p. 113-142, 2010.

MORRIS, J. C. The acid ionization constant of hypochlorous acid from 5 to 35ºC. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 70, n. 12, p. 3798–3805, 1966.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Poly (D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: Influence of the composition on physicochemical and structural properties. **Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 89, n. 5, p. 614-626, 2000.

MOTHÉ, C. G.; AZEVEDO, A. D. Análise térmica de materiais. São Paulo: ieditora, 2002.

MÜLLER, R. H. **Colloidal carriers for controlled drug delivery and targeting: modification, characterization, and in vivo distribution**. Stuttgart, Germany, and Boca Raton, FL: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft and CRC Press, 1991. p. 57-59.

MUNDARGI, R. C.; BABU, V. R.; RANGASWAMY, V.; PATEL, P.; AMINABHAVI, T. M. Nano/ MicroTechnologies for delivering macromolecular therapeutics using Poly (D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. **Journal of Controlled Release**, v. 125, n. 3, p. 193-209, 2008.

MUSUMECI, T.; BUCOLO, C.; CARBONE, C.; PIGNATELLO, R.; DRAGO, F.; PUGLISI, G. Polymeric nanoparticles augment the ocular hypotensive effect of melatonin in rabbits. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 440, n. 2, p. 135-140, 2013.

NAAHIDI, S.; JAFARRI, M.; EDALAT, F.; RAYMOND, K.; KHADEMHOSSEINI, A.; CHEN, P. Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 166, n. 2, p. 182-194, 2013.

NAHAR, M.; MISHRA, D.; DUBEY, V.; JAIN, N. K. Development, characterization and toxicity evaluation of amphotericin B-loaded gelatin nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 4, n. 3, p. 252-261, 2008.

NAJID, A.; SIMON, A.; COOK, J.; CHABLE-RABINOVITCH, H.; DELAGE, C.; CHULIA, A. J.; RIGAUD, M. Characterization of ursolic acid as a lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitor using macrophages, platelets and differentiated HL60 leukemic cells. **FEBS Letters**, v. 299, n. 3, p. 213-217, 1992.

NARANG, A. S.; DELMARRE, D.; GAO, D. Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 345, n. 1-2, p. 9-25, 2007.

NCI. National Cancer Institute: at the national institutes of health. Disponível em < http://www.cancer.gov/>. Acesso em: 23 de maio de 2014.

NETO, M. B. **Origem da estabilização de eritrócitos por sorbitol**. 2006. 59 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia - MG.

NGO, S. N.; WILLIAMS, D. B.; HEAD, R. J. Rosemary and cancer prevention: preclinical perspectives. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 10, p. 946–54, 2011.

OLIVEIRA, A. B.; BRAGA, F. C. Produtos naturais bioativos de plantas brasileiras e sua contribuição para o desenvolvimento da química medicinal. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina científica**, v. 1, n. 1, p. 49-58, 2003.

OLIVIER, J. C. Drug transport to brain with targeted nanoparticles. **NeuroRx**, v. 2, n. 1, p. 108 –119, 2005.

OVESNÁ, Z.; KOZICS, K.; SLAMENOVÁ, D. Protective effects of ursolic acid and oleanolic acid in leukemic cells. **Mutation Research**, v. 600, n. 1-2, p. 131-137, 2006.

OVESNÁ, Z.; VACHÁLKOVÁ, A.; HORVÁTHOVÁ, D.; TÓTHOVA, D. Pentacyclic triterpenoic acids: new chemoproctive compounds. Minireview. **Neoplasma**, v. 51, n. 5, p. 327-333, 2004.

PALEOS, C. M.; TSIOURVAS, D.; SIDERATOU, Z.; TZIVELEKA, L. A Entrega da droga usando dendrímeros multifuncionais e polímeros hiper**. Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 7, n. 12, p. 1387-1398, 2010.

PAPADIMITRIOU, S.; BIKIARIS, D.; AVGOUSTAKIS, K.; KARAVAS, E.; GEORGARAKIS, M. Chitosan nanoparticles loaded with dorzolamide and pramipexole. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, n. 1, p. 44–54, 2008.

PARK, J. H.; YE, M.; PARK, K. Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs. **Molecules**, v. 10, n. 1, p. 146- 161, 2005.

PARK, T. G. Degradation of poly (D,L-lactic acid) microspheres: effect of molecular weight. **Journal of Controlled Release**, v. 30, n. 2, p. 161-173, 1994.

PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S. K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 8, n. 2, p. 147-166, 2012.

PATEL, S. K.; WONG, A. L.; CUEVAS, M.; HORN, H. V. Parenting stress and neurocognitive late effects in childhood cancer survivors. **Psychooncology**, v. 22, n. 8, p. 1774-1782, 2013.

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.

PEEK, L. J.; MIDDAUGH, C. R.; BERKLAND, C. Nanotechnology in vaccine delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 8, p. 915–928, 2008.

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.

PEPPAS, N. A. Analysis of fickian and non-fickian drug release from polymers. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 60, n. 4, p. 110-111, 1985.

PEREIRA, M. R.; CRUZ, L.; RÉ, M. I.; GUTERRES, S. S. Micropartículas Secas contendo Fármaco Modelo Lipofílico Preparadas a partir de Suspensão Aquosa: Estudo de Formulação. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 25, n. 2, p. 198-205, 2006.

PETROS, R. A.; DESIMONE J. M. Estratégias na concepção de nanopartículas para aplicações terapêuticas. **Nature Reviews Drugs Discovery**, v. 9, p. 615-627, 2010.

PINA, K. V.; PINTO, L. R.; MORATORI, R. B.; SOUZA, C. G.; BARBASTEFANO, R. G. Nanotecnologia e nanobiotecnologia: estudo da arte, perspectivas de inovações e investimentos. **Revista gestão industrial**, v. 2, n. 2, p. 115-125, 2006.

PODDUTURI, V. P.; MAGAÑA, I. B.; O'NEA, D. P.; DEROSA, P. A. Simulation of transport and extravasation of nanoparticles in tumors which exhibit enhanced permeability and retention effect. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 112, n. 1, p. 58–68, 2013.

POHLMANN, A. R.; WEISS, V., MERTINS, O.; PESCE DA SILVEIRA, N.; GUTERRES, S.S. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 4-5, p. 305–312, 2002.

PUISIEUX, F.; BARRAT, G.; COUARRAZE, G.; COUVREUR, P.; DEVISSAGUET, J. P.; DUBERNET, C.; FATTAL, E.; FESSI, H.; VAUTHIER, C.; BENITA, S. Polimeric Micro and Nanoparticles as Drug Carriers. In: DUMITRIU, S. **Polymeric Biomaterials**. New York: Marcel Dekker, 1994, cap. 16.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLEMANN, 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.

RAMACHANDRAN, S.; PRASAD, N. R. Effect of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, on ultraviolet-B radiation-induced cytotoxicity, lipid peroxidation and DNA damage in human lymphocytes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 176, n. 2-3, p. 99-107, 2008.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, v. 7, p. 887-913, 2011.

REICH, G. Near-infrared spectroscopy and imaging: basic principles and pharmaceutical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 8, p. 1109-1143, 2005.

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

RESENDE, F. A.; BARLACA, C. A. M. A.; FARIA, M. C. S.; KATO, F. H.; CUNHA, W. R.; TAVARES, D. C. Antimutagenicity of ursolic acid and oleanolic acid against doxorubicin-induced clastogenesis in Balb/c mice. **Life Sciences**, v. 22, n. 13, p. 1268-1273, 2006.

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

RIDOLFI, D. M.; MARCATO, P. D.; JUSTO, G. Z.; CORDI, L.; MACHADO, D.; DURÁN, N. Chitosan-solid lipid nanoparticles as carriers for topical delivery of tretinoin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 93, p. 36–40, 2012.

RIGOLIN, T. M. **Modificação Química de Poli(ácido láctico) om anidrido maleico por processamento reativo.** 2014. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materias) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**, v. 5, n. 1, p. 37-42, 1987.

RUDDON, R. W. **Cancer Biology**. 3. ed. New York: Oxford University Press, 1995.

SAEZ, A.; GUZMAN, M.; MOLPECERES, J.; ABERTURAS, M. R. Freeze-drying of polycaprolactone and poly(D,L-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 3, p. 379-387, 2000.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, n. 1, p. 20-31, 2007.

SALMONN, S. E. **Em Farmacologia Básica e Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A, 1998. p. 629-655.

SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY. **Terpenes and Terpenoid Compounds: Ursolic Acid.** Disponível em: <http://www.scbt.com/datasheet-200383-ursolic-acid.html>. Acesso em: 12 de agosto de 2015.

SARAVANAN, R.; VISWANATHAN, P.; PUGALENDI, K. V. Protective effect of ursolic acid on ethanol-mediated experimental liver damage in rats. **Life Sciences**, v. 78, n. 7, p. 713–718, 2006.

SARTORI, T. **Preparação e caracterização de nanopartículas contendo metotrexato. Avaliação da estabilidade e viabilidade do tecido corneal após administração tópica ocular**. 2007. 128 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC.

SASSE, A. D. **Quimioterapia - guia do paciente em tratamento**. Disponível em: < www.andre.sasse.com/guiaqt.htm > Acesso em: 22 de maio de 2014.

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

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; FREITAS, L. L.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo Diclofenaco. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 21, n. 2, p. 99-106, 2002.

SCHLIECKER, G.; SCHMIDT, C.; FUCHS, S.; KISSEL, T. Characterization of a homologous series of D.L-lactic acid oligomers; a mechanistic study on the degradation kinetics in vitro. **Biomaterials**, v. 24, n. 21, p. 3835-3844, 2003.

SCSUKOVA, S.; MLYNARCIKOVA, A.; SMOLIKOVA, K.; KISS, A.; ROLLEROVA, E. Endocrine modulating effects of polymeric nanoparticle poly (ethylene glycol)-block-poly (lactic acid) (PEG-b-PLA) on ovarian steroidogenesis. **Toxicology Letters**, v. 229, n. 1, p. S198, 2014.

SEJU, U.; KUMAR, A.; SAWANT, K. K. Development and evaluation of olanzapine-loaded PLGA nanoparticles for nose-to-brain delivery: In vitro and in vivo studies. **Acta Biomaterialia,** v. 7, n. 12, p. 4169-4176, 2011.

SENNA, M.; NAKAYAMA, S. Preparation and properties of nano-amorphous organic and inorganic particles via chemical and mechanochemical routes. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 483, n. 1-2, p. 265–270, 2009.

SERAFIM, T. L.; CARVALHO, F. S.; BERNARDO, T. C.; PEREIRA, G. C.; PERKINS, E.; HOLY, J.; KRASUTSKY, D. A.; KOLOMITSYNA, O. N.; KRASUTSKY, P. A.; OLIVEIRA, P. J. New derivatives of lupane triterpenoids disturb breast cancer mitochondria and induce cell death. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 21, p. 6270-6287, 2014.

SHANMUGAM, M. K.; DAI, X.; KUMAR, A. P.; TAN, B. K.; SETHI, G.; BISHAYEE A. Ursolic acid in cancer prevention and treatment: molecular targets, pharmacokinetics and clinical studies. **Biochemical Pharmacology**, v. 85, n.11, p. 1579–1587, 2013.

SHANMUGAM, M. K.; ONG, T. H.; KUMAR, A. P.; LUN, C. K.; HO, P. C.; WONG, P. T. H.; HUI, K. M.; SETHI, G. Ursolic acid inhibits the initiation, progression of prostate cancer and prolongs the survival of TRAMP mice by modulating pro-inflammatory pathways. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. 1-9, 2012.

SHUBIK, P. Vascularization of tumors: a review. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 103, n. 3, p. 211-226, 1982.

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.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SODERGARD, A.; STOLT, M. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. **Progress in Polymer Science**, v. 27, n. 6, p. 1123-1163, 2002.

SOMOVA, L. O.; NADAR, A.; RAMMANAN, P.; SHODE, F. O. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidante effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. **Phytomedicine**, v. 10, n. 2, p. 115–121, 2003.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n. 1-2, p. 1-20, 2001.

SPENCE, R. A. J.; JOHNSTON, P. G. **Oncologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

STAVCHANSKY, S.; PADE, V. Link between drug absorption solubility and permeability measurements in Caco-2 cells. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, n. 12, p. 1604 - 1607, 1998.

SU, S. F.; CHOU, C. H.; KUNG, C. F.; HUANG, J. D. In vitro and in vivo comparison of two diclofenac sodium sustained release oral formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 260, n. 1, p. 39-46, 2003.

SURASSMO, S.; MIN, S.; BEJRAPHA, P.; CHOI, M. Effects of surfactants on the physical properties of capsicum oleoresin-loaded nanocapsules formulated through the emulsion–diffusion method. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 8–17, 2010.

SUTARIYA, V.; WEHRUNG, D.; GELDENHUYS, W. J. Development and validation of a novel RP-HPLC method for the analysis of reduced glutathione. **Journal of Chromatographic Science**, v. 50, n. 3, p. 271-276, 2012.

TAN, G. T.; LEE, S.; LEE, I. S.; CHEN, J.; LEITNER, P.; BESTERMAN, J. M.; KINGHORN, A. D.; PEZZUTO, J. M. Natural-product inhibitors of human DNA ligase I. **Biochemical Journal**, v. 314, n. 3, p. 993-1000, 1996.

TANIGUCHI, S.; IMAYOSHI, Y.; KOBAYASHI, E.; TAKAMATSU, Y.; ITO, H.; HATANO, T.; SAKAGAMI, H.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; SUGITA, D.; SHIMURA, S.; YOSHIDA, T. Production of bioactive triterpenes by Eriobotrya japonica calli. **Phytochemistry**, v. 59, n. 3, p. 315-323, 2002.

THOMAS, C. B.; BURG, K. J. L. Tissue Engineering Systems**.** In: SHALABY, W. S.; BURG, K. J. L. **Absorbable and Biodegradable Polymers**. Florida: CRC Press LLC, 2004.

TIAN, Z.; LIN, G.; ZHENG, R. X.; HUANG, F.; YANG, M. S.; XIAO, P. G. Anti-hepatoma activity and mechanism of ursolic acid and its derivatives isolated from Aralia decaisnean. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 6, p. 874-879, 2006.

VAN, S.; DAS, S. K.; WANG, X.; FENG, Z.; JIN, Y.; HOU, Z.; CHEN, F.; PHAM, A.; JIANG, N.; HOWELL, S. B.; YU, L. Synthesis, characterization, and biological evaluation of poly (L-γ-glutamyl-glutamine) paclitaxel nanoconjugate. **International Journal of Nanomedicine**, v. 5, p. 825–837, 2010.

VANDERHOFF, J. W.; EL ASSER, M. S.; UGELSTAD, J. **Polymer emulsification process**. US Patent 4 177 177, 4 dez. 4 1979.

VERHEYEN, S.; BLATON, N.; KINGRT, R.; VAN DEN MOOTER, G. Mechanisms of increased dissolution of diazepam and temazepam from polyethylene glycol 6000 solid dispersion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 249, n. 1-2, p. 45-58, 2002.

VERT, M. Aliphatic Polyesters: Great degradable polymers that cannot do everything. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p. 538-546, 2005.

VLACK, V. H. L. **Arranjos Atômicos**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 1970. cap. 3: Princípios de Ciência dos Materiais. p. 45-75.

WANG, Z. H.; HSU, C. C.; HUANG C. N.; YIN, M. C. Anti-glycative effects of oleanolic acid and ursolic acid in kidney of diabetic mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 628, n. 1-3, p. 255-260, 2010.

WACK, C.; BECKER, J. C.; BRÖCKER, E. B.; LUTZ, W. K.; FISCHER, W. H. Chemoimmunotherapy for melanoma with dacarbazine and 2,4-dinitrochlorobenzene:results from a murine tumor model. **Melanoma Research**, v. 11, n. 3, p. 247-253, 2001.

WENDHAUSEN, P. A. caracterização de materiais III. **Análises Térmicas**, v. 1, p. 223-245, 2005.

WIPO - World intelectual property organisation – **Nanotechnology and patents**. Disponível em: <http://www.wipo.int/patentlaw/en/developments/nanotechnology.html> Acesso em: 30 de junho de 2014.

XING, J.; ZHANG, D.; TAN, T. Studies on the oridonin-loaded poly(d,l-lactic acid) nanoparticles in vitro and in vivo. **Internacional Journal of Biological Macromolecules,** v. 40, n. 2, p. 153–158, 2007.

XU, R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. **Particuology**, v. 6, n. 2, p. 112–115, 2008.

XU, X. H.; SU, Q.; ZANG, Z. H. Simultaneous determination of oleanolic acid and ursolic acid by RP-HPLC in the leaves of Eriobotrya japonica Lindl. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n. 3, p. 238-240, 2012.

XU, X.; XIANG, Q.; HE, Z.; LIU, Y.; ZHOU, D.; QIN, X.; FAN, T.; ZHANG, Z.; HUANG, Y. Crystalline Drug Aconitine-loaded Poly(d,l-Lactide-CoGlycolide) Nanoparticles: Preparation and in Vitro Release. **Yakugaku Zasshi**, v. 130, n. 3, p. 409-418, 2010.

YANG, L.; SUN, Z.; ZU, Y.; ZHAO, C.; SUN, X.; ZHANG, Z.; ZHANG, L. Physicochemical properties and oral bioavailability of ursolic acid nanoparticles using supercritical anti-solvent (SAS) process. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 319–325, 2012.

YIH, T. C.; WEI, C. Nanomedicine in câncer treatment. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 1, n. 2, p. 191-192, 2005.

YU, L. Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 1, p. 27-42, 2001.

ZAMBAUX, M. F.; BONNEAUX, F.; GREF, R.; MAINCENT, P.; DELLACHERIE, E.; ALONSO, M. J.; LABRUDE, P.; VIGNERON, C. Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. **Journal of Controlled Release**, v. 50, n. 1-3, p. 31-40, 1998.

ZATTA, K. C. **Desenvolvimento e caracterização de formulações semissólidas contendo palmitato de ascorbila associado à nanocarreadores**. 2011. 119 f. Dissertação (Mestrado em Nanociência) - Centro Universitário Franciscano - Unifra, Santa Maria - RS.

ZHANG, H.; LI, X.; DING, J.; XU, H.; DAI, X.; HOU, Z.; ZHANG, K.; SUN, K.; SUN, W. Delivery of ursolic acid (UA) in polymeric nanoparticles effectively promotes the apoptosis of gastric cancer cells through enhanced inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). **International Journal of Pharmaceutics,** v. 441, n. 1-2, p. 261-268, 2013.

ZHANG, H.; ZHENG, D.; DING, J.; XU, H.; LI, X.; SUN, W. Efficient delivery of ursolic acid by poly(N-vinylpyrrolidone)-block-poly (ε-caprolactone) nanoparticles for inhibiting the growth of hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 1909-1920, 2015.

ZHANG, L.; HE, Y.; YU, M.; SONG, C. Paclitaxel-loaded polymeric nanoparticles based on PCL–PEG–PCL: Preparation, in vitro and in vivo evaluation. **Journal of Controlled Release**, v. 152, s. 1, p. e114–e116, 2011.

ZHANG, T.; SU, J.; WANG. K.; ZHU, T.; LI, X. Ursolic acid reduces oxidative stress to alleviate early brain injury following experimental subarachnoid hemorrhage. **Neuroscience Letters**, v. 579, p. 12–17, 2014

ZHANG, W.; GAO, J.; ZHU, Q.; ZHANG. M.; DING, X.; WANG, X.; HOU, X.; FAN, W.; DING, B.; WU, X.; WANG, X.; GAO, S. Penetration and distribution of PLGA nanoparticles in the human skin treated with microneedles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 402, n. 1-2, p. 205-212, 2010.

ZHOU, X. J.; HU, X. M.; YI, Y. M.; WAN, J. Preparation and body distribution of freeze-dried powder of ursolic acid Phospholipid Nanoparticles. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 35, n. 3, p. 305–310, 2009.