



Universidade de Brasília – UnB  
Faculdade de Ceilândia – FCE  
Curso de Farmácia

AIESSA PAGLIARINI BALEST

**Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb).**

Ceilândia

2013

---

Prof. Dr. Elton Clementino da Silva

Orientador



Universidade de Brasília

**Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb).**

Trabalho de conclusão de curso apresentado a Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Elton Clementino da Silva

Ceilândia

2013



Balest, Aiessa Pagliarini.

Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo óleo de pequi (*Caryocar brasiliense Camb*)./ Aiessa Pagliarini Balest. – Ceilândia, 2013.

58 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia – FCE, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Elton Clementino da Silva

1. Pequi 2. *Caryocar brasilienses*. 3. Nanopartículas. 4. Poli(e-caprolactona) I. Universidade de Brasília. Faculdade de Ceilândia. II. Título

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pela saúde, paz e paciência para realização deste trabalho.

Aos meus pais pela compreensão durante minha ausência e a minha irmã que sempre esteve ao meu lado quando mais precisei.

Ao professor Elton Clementino da Silva por todas as oportunidades e pelo companheirismo.

Ao pesquisador da Embrapa, Luciano Paulino da Silva, pela disponibilidade em ajudar nas análises de Microscopia de Força Atômica.

Aos técnicos do Laboratório de Química da Faculdade de Ceilândia pelo apoio técnico e incentivo.

Aos professores Juliano Chaker e Maria Hosana pelo apoio.

Ao técnico Arilson Lehmkuhl da Central Analítica do Instituto de Química da UnB que gentilmente auxiliou nas análises de Cromatografia Gasosa.

E a todos que de alguma forma não deixaram que o desânimo me vencesse.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	5
ABSTRACT .....	6
INTRODUÇÃO .....	7
PARTE 1 - PEQUI .....	7
1.1 Descrição botânica e morfológica .....	7
1.2 Composição físico-química .....	9
1.3 Aplicações .....	12
PARTE 2 – SISTEMAS POLIMÉRICOS.....	14
2.1 Sistemas poliméricas .....	14
2.1.1 Poli(e-caprolactona) .....	17
2.2 Nanopartículas na indústria cosmética .....	17
2.3 Caracterização das nanopartículas poliméricas.....	19
2.3.1 Distribuição do tamanho das nanocápsulas polimérica.....	20
2.3.2 Potencial zeta ( $\zeta$ ) das nanocápsulas poliméricas .....	20
2.3.3 Teor de encapsulação .....	21
2.3.4 Morfologia externa .....	22
2.4 Estudo de estabilidade .....	24
OBJETIVOS .....	24
1. OBJETIVO GERAL .....	24
2 .OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
METODOLOGIA .....	24
1. MATERIAL.....	24
2 . MÉTODOS .....	25
2.1 Extração do óleo de pequi .....	25
2.2 Nanoestruturação do óleo de pequi .....	25

2.2.1 Preparo das nanocápsulas.....	25
2.2.2 Caracterização físico-química das nanocápsulas.....	26
2.2.2.1 Análise macroscópica.....	26
2.2.2.2 Determinação do diâmetro das partículas em suspensão.....	26
2.2.2.3 Determinação do potencial zeta.....	26
2.2.2.4 Análise de pH.....	27
2.2.2.5 Avaliação morfológica.....	27
2.2.2.6 Eficiência de encapsulamento do óleo.....	27
2.2.2.6.1 Extração do óleo das nanocápsulas.....	27
2.2.2.6.2 Metilação do óleo de pequi.....	28
2.2.2.6.3 Cromatografia Gasosa.....	28
2.3 Estudo de estabilidade das nanocápsu.....	29
2.4 Análise estatística.....	29
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
1 Óleo de pequi .....	29
2 Caracterização físico-química das formulações.....	30
2.1 Análise macroscópica.....	30
2.2 Análise de pH.....	31
2.3 Determinação do tamanho médio .....	31
2.4 Determinação do potencial zeta.....	33
2.5 Eficiência de encapsulamento do óleo.....	34
2.6 Avaliação morfológica.....	37
3. Estudo de estabilidade .....	39
CONCLUSÃO .....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	44



## RESUMO

Nanocápsulas poliméricas têm sido utilizadas para proteger compostos naturais da oxidação e da isomerização, além de aumentar e controlar a penetração dos ativos na pele. O objetivo deste trabalho foi desenvolver, caracterizar as propriedades físico-químicas, bem como avaliar a estabilidade física de nanopartículas poliméricas contendo óleo de pequi (*Caryocar brasiliense Camb.*) para uso tópico. As suspensões de nanocápsulas contendo óleo de pequi (NP) ou não (NC) foram produzidas, caracterizadas e sua estabilidade determinada. A suspensão de NP apresentou pH  $5,61 \pm 0,11$ , potencial zeta  $-35,16 \pm 1,34$  mV, diâmetro médio  $343,33 \pm 12,43$  nm, índice de polidispersão 0,3, forma esférica e 100 % de eficiência de encapsulamento. As suspensões de NC apresentaram pH  $5,60 \pm 0,03$ , e potencial zeta  $-29,93 \pm 2,22$  mV, tamanho  $341,5 \pm 9,07$ , índice de polidispersão 0,3 e forma esférica. As suspensões NP apresentaram boa estabilidade física em termos de tamanho, polidispersabilidade e potencial zeta, uma vez que estes parâmetros não se alteraram com o tempo. Os resultados demonstram que as nanocápsulas contendo óleo de pequi são estáveis e sistemas promissores para aplicação tópica.

**Palavras-chave:** pequi, *Caryocar brasiliense Camb.*, nanocápsulas, poli (ε-caprolactona)

## ABSTRACT

Polymeric nanocapsules have been used to protect natural compounds from oxidation, isomerization, in addition increase and control the permeability of active in the skin. The aim of this work is synthesize, characterize the physicochemical properties, as well as evaluating the physical stability of polymeric nanoparticles containing oil Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). The suspension of nanocapsules containing pequi oil (NP) or not (NC) were produced, characterized and their stability determined. The NP suspension showed pH  $5.61 \pm 0.11$ , zeta potential  $-35.16 \pm 1.34$  mV, mean diameter  $343.33 \pm 12.43$  nm and polydispersity 0.3, spherical shape and 100% encapsulation efficiency. Suspensions of NC showed pH  $5.60 \pm 0.03$ , and zeta potential  $-29.93 \pm 2.22$  mV, size  $341.5 \pm 9.07$ , polydispersity 0.3 and spherical shape. The NP suspensions presented good physical stability as a function of time, in terms of size, polydispersity and zeta potential, since these parameters doesnt altered with time. Results demonstrate that the nanocapsules containing oil pequi are stable and are therefore promising systems for dermal application.

**Keywords:** Pequi, *Caryocar brasiliense* Camb., Nanocapsules, Poly (ε-caprolactone)

# INTRODUÇÃO

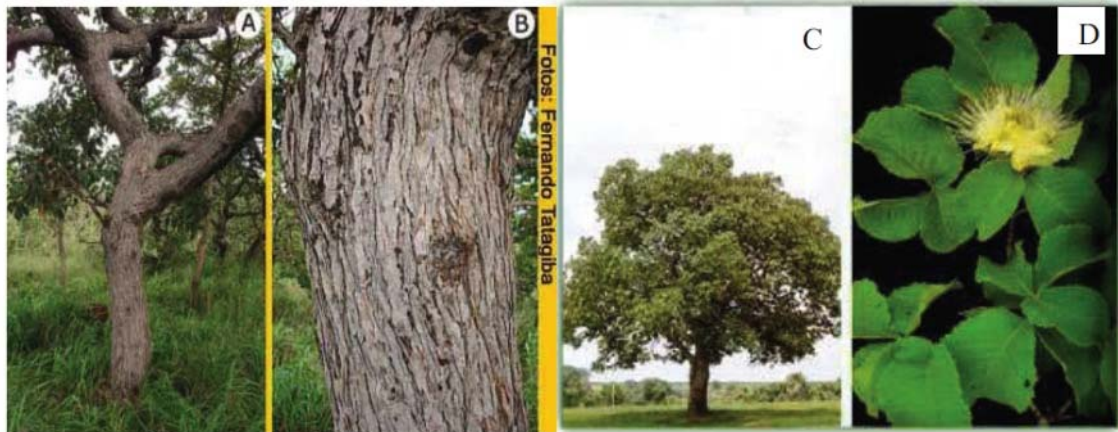
## PARTE 1 – PEQUI (*Caryocar brasiliense* Camb.)

### 1.1 DESCRIÇÃO BOTÂNICA E MORFOLÓGICA

O *Caryocar brasiliense* Camb. é uma árvore frutífera originária da América do Sul popularmente chamada de pequi, piqui, piquiá, piqui-do-cerrado, piquiá bravo, pequerim, amêndoa-de- espinho, grão-de-cavalo ou suarí (PRANCE & SILVA, 1973). No Brasil é freqüentemente encontrada nos estados de Goiás, Rondônia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Tocantins, Maranhão, Piauí, Bahia, Distrito Federal e Minas Gerais (DAMIANI, 2006).

Pertence à classe Magnoliopdida (Dicotyledonae), ordem Guttiferales, família Caryocaraceae e ao gênero *Caryocar* L., abrangendo cerca de 20 espécies. Das 8 espécies encontradas no Brasil, a *Caryocar brasiliense* é a mais comum e a que possui o menor porte (ALMEIDA & SILVA, 1994).

É uma planta arbórea que pode atingir cerca de 20 m de altura (PRANCE & SILVA, 1973). Seu tronco tem circunferência de 2 a 3 m, casca áspera, rugosa, cinza escura e fendida. Os galhos são longos, grossos e pouco inclinados. A copa é larga, com folhas compostas, trifoliadas, opostas, limbo oval, base aguda e obtusa no folíolo central e desigual nos folíolos laterais, verdes e brilhantes, sem pêlos e glândulas, com laterais serradas, denteadas. As flores são grandes, amarelas normalmente encontradas no racemo terminal dos galhos conforme apresenta a Figura 1 (SILVA et.al., 1994).



**Figura 1.** a) pequizeiro b) tronco c) altura da árvore d) flor e folha do pequizeiro. Fonte: Deus (2008).

O fruto do pequizeiro é composto de exocarpo de cor marrom-esverdeada, mesocarpo externo formado por polpa branca que pode ter de 1 a 6 caroços, e mesocarpo interno, que é a parte comestível, de coloração amarela pálida a alaranjado intenso com odor forte característico. O endocarpo é espinhoso e protege a amêndoa revestida por um tegumento fino e marrom e que também é comestível conforme Figura 2 (ALMEIDA, 1998; SILVA et.al., 1994).



**Figura 2.** Aspectos morfológicos do fruto do pequizeiro – pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). Fonte: Alves et.al. (2012).

O período de safra do fruto ocorre geralmente nos meses de setembro a fevereiro. O diâmetro médio dos frutos no estado de Goiás é entre 5,54 cm e 6,48 cm. O peso médio do fruto é em torno de 120g,

sendo que a casca representa 82% do fruto, o endocarpo 4,6%, a polpa 7% e a amêndoa cerca de 1%. A polpa pesa em média 8,14g (VIERA et al., 2005).

## 1.2 COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Nos últimos anos, o pequi tem recebido atenção pelos pesquisadores tanto pela sua importância nutricional quanto terapêutica. O fruto do pequizeiro é rico em óleos, proteínas e carotenóides. Segundo Almeida et.al (1998) a polpa do pequi contém cerca de 60% de óleos comestíveis e 17,10% de fibras. Outros trabalhos concluíram que tanto a polpa quanto a amêndoa é rica em pró-vitamina A (retinol), complexo B (timina, riboflavina e niacina) e vitamina C (ácido ascórbico) (FRANCO, 1992). Almeida et.al. (1998) compararam o pequi com outros alimentos e constataram que o teor de caroteno é maior que nos óleos de dendê e de pupunha. Possui riboflavina equivalente à gema de ovo, teores de timina equivalentes aos valores encontrados no morango e niacina equivalente ao tomate.

Em relação aos minerais, possui cálcio comparativamente ao caju, pupunha, lima e maracujá; fósforo tanto quanto às carnes de boi, carneiro, galinha e coelho e ferro tanto quanto ao tomate. Além disso, a polpa do pequi é rica em sódio, manganês, zinco, cobre, magnésio, potássio. Porém esses teores de minerais variam sazonalmente (ALMEIDA et.al., 1998).

O teor de proteínas varia entre 2% e 47% no óleo (FERREIRA et. al., 1988; OLIVEIRA, 1998, LIMA, 1980). De acordo com Débora (2011) os maiores teores de proteínas são encontrados na polpa do pequi das regiões de Minas Gerais e Mato Grosso. Alguns estudos concluíram que o percentual de proteínas encontrados no pequi é equivalente ao encontrado nas outras frutas e que a ingestão de proteínas deve ser complementada com proteína animal (LIMA, 1980). Por conter alta porcentagem de fibras bruta, o pequi é uma boa fonte de fibras quando comparado com o araticum e o baru (ALMEIDA, 1998).

De acordo com a literatura, a polpa da fruta também é constituída de compostos fenólicos. O teor de compostos fenólicos é inferior somente à acerola e à manga (Débora, 2011). Em um estudo realizado por Lima et.al. (2007) foram encontrados teores de fenóis consideráveis ( $209 \text{ mg} \cdot 100^{-1} \text{ g}$ ) em pequis do Piauí.

Os compostos fenólicos são compostos fitoquímicos que possuem pelo menos um anel aromático unido a uma ou mais hidroxilas. Quando são formados por dois anéis aromáticos unidos por um heterociclo oxigenado são classificados como flavonóides. Estes podem estar ligados a açúcares formando os glicosídeos (KARAKAYA, 2004). Quando possuem um anel aromático com pelo menos uma hidroxila e outros grupos funcionais tais como aldeídos, cetonas ou ácidos são classificados como não-flavonóides. Nos vegetais estes compostos são responsáveis por algumas características: cor, adstringência e o aroma (MANACH et al., 2004).

A polpa do pequi tem elevada capacidade antioxidante por possuir altos teores de polifenóis. Porém sua concentração varia conforme a região geográfica de plantio, à exposição solar, método de cultivo e fertilizantes aplicados, cultivar analisado, dentre outros (FALLER; FIALHO, 2009).

A polpa do pequi é rica em carotenos totais (OLIVEIRA et al, 2006). O teor de  $\beta$ -caroteno é considerado próximo aos encontrados na cenoura (NIIZU; RODRIGUEZ, 2004). Entre os principais carotenóides encontrados na polpa do pequi estão a violanxantina, luteína e zeaxantina,  $\beta$ -criptoxantina,  $\beta$ -caroteno e neoxantina. De acordo com a literatura, os valores médios de carotenóides totais e beta-caroteno são de 231,09 e 14,67  $\mu\text{g/g}$  respectivamente. Em decorrência disso pode ser considerada uma fonte potencial de vitamina A, pois a quantidade diária recomendada pela ANVISA (RES 360/2003) na dieta humana é de 2000 U.I, o equivalente a 600  $\mu\text{g}$  (RAMOS et al., 2001).

Estes compostos são extremamente sensíveis à variação térmica e a quantidade de água é crítica para sua estabilidade. Por outro lado, na extração do óleo a secagem da polpa facilita o processo no que diz respeito ao contato entre o solvente e o soluto (óleo) a ser extraído,

resultando em maiores rendimentos (TANGO; CARVALHO; SOARES, 2004), mas muitas vezes destruindo os princípios ativos.

Porém, de acordo com Aquino et.al. (2009) a melhor condições para a secagem da polpa de pequi é em estufa a 40 °C, pois retém mais carotenóides durante o pré-tratamento da polpa de pequi, mantém menor índice de peróxido do óleo extraído com hexano e confere maior rendimento de óleo.

O pequi é a fruta nativa do cerrado com maior concentração de lipídios, cerca de 60 % (SANO et.al. 1998). O teor de lipídios do pequi é comparável ao da macaúba, do babaçu e do abacate (FRANCO, 1982). De acordo com a literatura, o pequi apresenta predominância de ácido oléico e palmítico. De acordo com Débora (2011), a prevalência de ácidos graxos monoinsaturados é maior nos frutos provenientes do estado de Tocantins. Os pequis oriundos do estado de Goiás são mais ricos em ácidos graxos poliinsaturados.

É considerado de alta qualidade por conter em sua maior parte ácidos graxos insaturados. A composição está descrita na Tabela 1 comparando os resultados de quatro pesquisadores diferentes.

**Tabela 1.** Composição de ácidos graxos (%) no pequi encontrada por outros autores.

Acidos Graxos	Óleo da polpa de Pequi		
	Fascioli; Gonçalves, 1998	Deus, 2008	Debora, 2011
Palmítico	40,2	41,1	36,78
Palmitoléico	1,4	0,5	1,18
Oléico	53,9	54	50,72
Linoléico	1,5	1,0	1,13
Linolênico	0,7	0,3	-
Saturados	-	-	39,41
Insaturados	-	-	52,15

Pode-se observar que os valores encontrados pelos autores são muito próximos e há uma predominância de dois ácidos graxos: oléico e

palmítico. O ácido oléico é insaturado e juntamente com outros ácidos graxos completam mais de 50 % de óleos insaturados. Por isso o pequi é considerado uma fonte de óleo de alto aspecto salutar. O ácido graxo palmítico é saturado e é responsável pelo valor calórico do pequi, chegando a 225 Kcal por 100g de matéria seca de polpa (SANO et.al., 1998). A composição de ácidos graxos varia conforme o tipo de matéria-prima, safra e posições na molécula do triglicerídeo.

Outros frutos brasileiros também apresentam altas concentrações de ácidos graxos. O bacuri (*Scheelea phalerata* Mart.) apresenta 53% de ácido graxo oléico e 17% de ácido graxo palmítico, este último inferior aos valores encontrados na polpa de pequi (HIANE et.al., 1990). A polpa de buriti (*Mauritia flexuosa*) possui teor de ácidos graxos oléicos (média de 75%) maior que o encontrado no óleo de pequi e 20% de ácido graxo palmítico (VASQUEZ-OCMIN et.al., 2010).

O óleo é sensível às altas temperaturas, à presença de oxigênio, luz, metais, meios ácidos, atividade de água, enzimas, metaloproteínas (O'BRIEN, 2004). Os ácidos graxos insaturados de importância cosmética e terapêutica são susceptíveis à isomerização e oxidação.

### **1.3 APLICAÇÕES**

O pequi tem aplicação na culinária regional devido à presença de vitaminas C, B1, B2, pró-vitamina A, niacina e caroteno da polpa (CARVALHO; BURGER, 1960). Na indústria cosmética pode ser usado na produção de sabonetes e cremes (PIANOVSKI et. al., 2008) devido à alta concentração de ácidos graxos e às características químicas antioxidantes dos carotenos e polifenóis, além da alta capacidade de ser absorvido pela pele (ARAÚJO, 1994) o que lhe confere boa qualidade como matéria-prima (SILVA, 1994).

Na medicina popular, as cascas e os frutos têm sido utilizados em forma de infusão como antifebris e diuréticos (CORRÊA, 1926). O óleo do fruto tem sido usado para tratamento de queimaduras e as folhas para



tratamento de resfriados, gripe, edemas (VIEIRA; MARTINS, 2000) e o bálsamo no tratamento de reumatismo (BRANDÃO et. al., 2002).

Além disso, o extrato da cera apicular das folhas, o óleo essencial da semente, os óleos fixos da amêndoa e da semente demonstraram atividade antifúngica contra *Cryptococcus neofarmans* (PASSOS et.al., 2002). O extrato da cera apicular das folhas combate o hospedeiro intermediário da esquistossomose (ROMANCINI; AQUINO, 2007), inibe proliferação da forma promastigota da *Leishmania amazonensis* e inibe o crescimento e enterobactérias (PAULA-JÚNIOR et.al., 2006). Além disso, foi demonstrado que o extrato da casca reduz o número de parasitas de *Trypanosoma cruzi* no sangue (HERZOG-SOARES et.al., 2002). De acordo Miranda-Vilela et.al., (2008) o óleo extraído da polpa apresenta atividade antioxidante. Essa propriedade é devida a presença de carotenóides como violaxantina, luteína, zeaxantina, b-criptoxantina, b-caroteno e neoxantina (RAMOS et.al., 2001).

O alto teor de ácidos graxos insaturados no óleo de pequi faz deste produto uma boa alternativa terapêutica para a cicatrização. O óleo pode ser usado como curativo úmido oleoso, o qual proporciona uma barreira protetora contra microrganismos, evita desidratação tecidual, mantêm a temperatura corpórea e diminui os traumatismos. Os ácidos graxos insaturados presentes no óleo atuam como poderosos mediadores pró-inflamatórios, estimulando a produção de fatores de crescimento, promovendo a fibroplasia, e a neovascularização, além de serem bactericidas (HATANAKA; CURI, 2007). São úteis para a indústria cosmética por suas propriedades emoliente e para recompor a oleosidade em peles ressecadas e com problemas de escamação (Silva, 2012).

De acordo com a literatura, os compostos fenólicos possuem ação antioxidante por possuírem a capacidade de suportar um elétron desemparelhado através do deslocamento deste ao redor de todo o sistema de elétrons da molécula interrompendo a cadeia de reação de oxidação; quelando metais de transição, como o  $Fe^{2+}$  e o  $Cu^{+}$ ; interrompendo a reação de propagação dos radicais livres na oxidação lipídica; modificando o potencial redox do meio ou reparando a lesão das moléculas atacadas por radicais livres (KYUNGMI; EBELER, 2008).

Os carotenóides presentes nos vegetais podem ser convertidos em vitamina A. Devido a esta propriedade funcionam como antioxidantes capazes de sequestrar formas altamente reativas de oxigênio e desativar radicais livres (COSTA; VIEIRA, 2004). Dessa forma podem atuar na prevenção de alguns tipos de câncer, na inibição das mucosas contra úlceras gástricas, na capacidade de prevenir a fotossensibilização em certas doenças de pele, no aumento da resposta imunológica a determinados tipos de infecção e nas propriedades antienvhecimento (RODRIGUEZ-AMAYA, 1993).

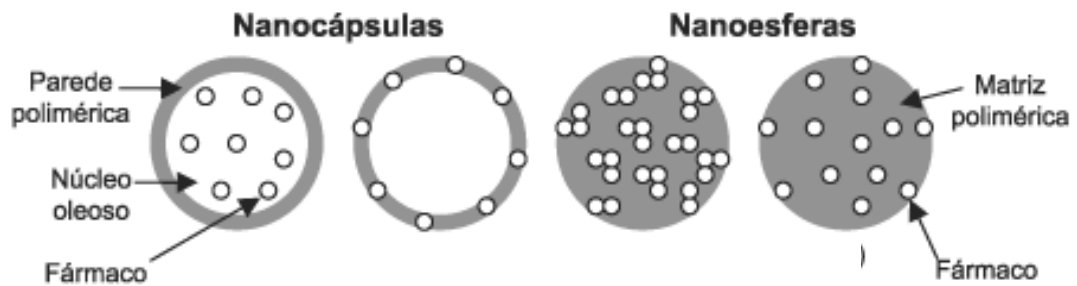
## **2. SISTEMAS POLIMÉRICOS – NANOPARTÍCULAS**

### **2.1 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS**

Nos últimos anos o interesse por liberação de ativos no sítio de ação de forma controlada onde vetores seriam capazes de otimizar a velocidade de cedência e a dosagem cresceu muito. As micropartículas e os sistemas coloidais (lipossomas e nanopartículas) são os vetores mais estudados atualmente (SCHAFFAZICK et.al., 2003).

As nanopartículas produzidas com polímeros biodegradáveis e biocompatíveis têm sido mais estudadas que os lipossomas por causa das suas potencialidades terapêuticas e estabilidade em fluidos biológicos e durante o armazenamento (SCHAFFAZICK et.al., 2003).

Basicamente as nanopartículas poliméricas são divididas em nanocápsulas e nanoesferas. As nanocápsulas possuem um envoltório polimérico que reveste o núcleo oleoso composto por substâncias ativas. Já as nanoesferas são estruturas matriciais que retêm princípio ativo na sua superfície, no seu interior ou dissolvido na matriz e não possuem óleo em sua composição conforme a Figura 3 (ALLÉMANN, et.al., 1993).



**Figura 3-** Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas. Fonte: SCHAFFAZICK et.al., 2003

Os métodos de preparação de nanocápsulas são baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos em solução (LAMBERT, et. al., 2000) ou na precipitação de polímero pré-formado (SANTOS-MAGALHÃES et.al., 2000).

A técnica por polimerização interfacial de monômeros dispersos é desvantajosa por usar em sua composição polímeros não biodegradável e biocompatíveis, formar resíduos tóxicos durante as reações, podendo haver reação do fármaco durante a reação de polimerização *in situ* e degradação dos componentes nas nanopartículas (QUINTANAR-GUERRERO et.al., 1998).

A dispersão de polímero pré-formado é mais facilmente controlável, de maior rendimento quando comparado com outros métodos de produção de nanopartículas poliméricas a partir da polimerização de monômeros. É um método particularmente adaptados para incorporar princípios ativos lipofílicos (SEVERINO et.al., 2011). Formam suspensões poliméricas onde cada nanopartícula é formada por uma fase orgânica interna e uma fase aquosa externa (QUINTANAR-GUERRERO et.al., 1998).

O método de polímero pré-formado pode ser classificado preparado por quatro métodos: emulsificação-evaporação do solvente (WANG et.al., 2010), por deslocamento do solvente (TAHARA et. al., 2010), por *salting-out* (WHEATLEY et.al., 2010) ou por emulsificação-difusão do solvente (OZTURK et.al., 2010).

O método de deslocamento do solvente ou nanoprecipitação consiste na precipitação ou deposição interfacial de polímero pré-formado

(QUINTANAR-GUERRERO et.al., 1998). A fase interna é constituída por um polímero dissolvido em um solvente orgânico polar no qual o princípio ativo está disperso (LEGRAND et.al., 2007) e um tensoativo que previne a coalescência das partículas. Já a fase externa é uma solução aquosa contendo tensoativo do tipo óleo/água. A fase oleosa é dispersa na fase aquosa sob agitação magnética. Espontaneamente ocorrem emulsificação e formação de sistema opalescente. As nanopartículas são resultado da difusão rápida da fase oleosa através da aquosa (BESHEER et. al., 2009). A utilização de copolímeros anfipáticos bem como polímeros eletricamente carregados podem substituir os tensoativos já que formam espontaneamente estruturas micelares.

Nanocápsulas são formadas quando o princípio ativo é previamente dissolvido num óleo o qual é emulsificado na solução orgânica polimérica antes de ser veiculado à fase externa (MARTINS et.al., 2010) e ao final precipitada. As características das nanocápsulas obtidas por este método dependem da solubilidade do princípio ativo, concentração do tensoativo, natureza e do volume do óleo.

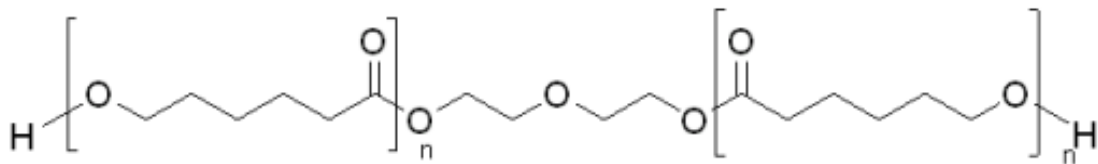
Quanto maior o coeficiente de partilha O/A menor será a tendência de o princípio ativo abandonar a fase oleosa. Quanto mais solúvel na fase oleosa, maior é a capacidade de carga das nanocápsulas (SCHAFFAZICK et.al., 2003).

Independente do método de preparação as nanocápsulas formam suspensões coloidais aquosas, as quais podem precipitar durante o armazenamento devido à agregação das nanopartículas (SCHAFFAZICK et.al., 2002).

A adição de tensoativo é importante para a redução das dimensões das nanocápsulas. Núcleos oleosos muito ácidos aumentam a degradação do polímero. Óleos muito viscosos são resistentes à tensão durante a emulsificação resultando em gotículas oleosas maiores e consequentemente nanocápsulas maiores (ZHANG et.al., 2011).

### 2.1.1 POLI ( $\epsilon$ -CAPROLACTONA)

A Poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) é um polímero sintético, biodegradável, biocompatível, biotransformados por hidrólise das suas ligações ésteres e seus metabólitos excretados pelo organismo por vias metabólicas normais (ALEXIS et al., 2008). É um tipo de poliéster, linear, hidrofóbico, semicristalino e sua estrutura é mostrada na Figura 4.



**Figura 4** – Estrutura do polímero Poli ( $\epsilon$ -caprolactona).

O polímero é solúvel em clorofórmio, tetracloreto de carbono, benzeno, tolueno, ciclohexano e 2-nitroporpano à temperatura ambiente. É pouco solúvel em acetona, 2-butanona, acetato de etila, dimetilformamida e acetonitrila, e é insolúvel nos álcoois isopropanol, 1- butanol, 2-butanol, 1-propanol, e em éter de petróleo e dietílico (SANTOS, 2011). Segundo Albini (2012) o PCL é também insolúvel em n-hexano.

A PCL tem atraído o interesse comercial por ser mais biodegradável em comparação com os outros poliésteres, boas propriedades físicas, relativamente barato, além disso, de não causar reação inflamatória nem tóxica, ser estável, degradar-se de acordo com o processo em que está sendo utilizado, ser permeável e ser facilmente excretados pelo organismo (NAIR; LAURENCIN, 2007). Porém, sua baixa temperatura de fusão, em torno de 65°C, limita seu uso. O uso combinado de vários polímeros ou formação de ligações cruzadas podem melhorar suas propriedades (SINGH et al., 2006).

## 2.2 NANOPARTÍCULAS NA INDÚSTRIA COSMÉTICA

Nos últimos anos o desenvolvimento tecnológico tem atraído a atenção das indústrias de medicamentos e de cosméticos. Essas novas

tecnologias tem sido úteis para aumentar e controlar a penetração de drogas na pele (ALVAREZ-ROMÁN et al 2004).

As nanopartículas são sistemas poliméricos que formam uma barreira física ao redor do fármaco e que quando entra em contato com fluidos biológicos se dissolve, desintegra e se desagrega, liberando o princípio ativo. A liberação do ativo se dá por três mecanismos diferentes combinados ou não: difusão do fármaco pelo polímero desencadeado por reação química ou enzimática de degradação do polímero ou por osmose ou intumescimento do sistema (LANGER, 1998).

Além disso, estes sistemas conservam substâncias que se degradam a temperaturas acima de 40°C e são sensíveis à oxidação em presença de água, variação de pH e efeito da ultravioleta (MULLER et.al., 2004). A nanoestruturação é um método rápido, simples, eficiente e produz suspensões com pequenas partículas que tem alta capacidade de armazenamento (JIMÉNEZ et.al., 2004).

As nanocápsulas tem sido úteis para otimizar a velocidade de cedência e o regime de dosagem de fármacos. Apresentam maior estabilidade em fluidos biológicos e durante o armazenamento quando comparadas com outros sistemas coloidais, além de possibilitar produção em escala industrial (SOPPIMATH et.al., 2001).

Existem vários exemplos da aplicação das nanocápsulas para uso tópico na literatura. Alvarez-Roman et. al. (2001) estudaram nanocápsulas contendo metoxicinamato de octila (OMC), um filtro solar lipofílico, e verificaram que a liberação da substância e a proteção contra eritema induzido por radiação ultravioleta foi significativamente maior no gel contendo nanocápsulas de PCL.

Bouchemal et al. (2004) produziu nanocápsulas de alfatocoferol, utilizando o polímero poliuretano e poli(éter-uretano) através da técnica de policondensação interfacial. Os pesquisadores relatam que os nanocarreadores protegem as moléculas contra a degradação.

Nanocápsulas de ácido lipóico contendo poli( $\epsilon$ -caprolactona) como polímero e preparadas pela técnica de deposição interfacial do polímero mostraram-se mais estáveis em comparação com suspensões contendo ácido lipoico livre (KULKAMP, et.al., 2009).

Lara, 2008 desenvolveu nanocapsulas poliméricas contendo ácido retinóico. De acordo com os resultados, a encapsulação do ácido retinóico permitiu penetração do fármaco na pele garantindo a biodisponibilidade local e reduzindo potenciais reações adversas ocorridas com a entrada do fármaco na derme.

Barrios, 2010 encapsulou óleo de melaleuca para tratamento de diversas infecções cutâneas, dentre elas, a acne. O método de deposição interfacial do polímero pré-formado mostrou-se viável mediante o emprego de PCL como polímero.

Muitas indústrias de cosméticos têm demonstrando interesse em desenvolver formulações contendo nanocápsulas destacando-a como diferencial do produto. Entre as vantagens citadas estão o aumento da eficácia dos produtos, a melhoria na resistência natural da pele, ajuda no reparo e fortalecimento das camadas mais profundas, o incremento na eficácia de ação da substância, o aumento da estabilidade, da eficiência de ação do ativo e a liberação gradual em doses favoráveis. A L'Oreal Paris, Lancôme, Vichy, Ziaja Cosmetics e Matis são alguns exemplos de laboratórios que disponibilizam produtos oferecendo as vantagens da nova tecnologia. A existência de empresas do gênero pode indicar uma tendência em adotar a nanotecnologia como ferramenta de uso corrente num futuro próximo (SCHMALTZ et. al., 2005).

### **2.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS**

As nanocápsulas poliméricas são caracterizadas por apresentar diâmetro entre 200 e 500 nm, baixa polidispersão, por ter a capacidade de controlar a liberação de substâncias e manter sua estabilidade tanto durante o armazenamento quanto nos fluidos biológicos (SCHAFFAZICK et.al., 2003).

O uso das nanocápsulas tem sido limitado em decorrência da instabilidade física, por agregação ou por fusão da partícula, ou da instabilidade química decorrenteda hidrólise do polímero, de reações químicas durante o armazenamento ou agregação do fármaco a nanopartícula (ABDELWAHED et al., 2006).

Entre os métodos usados para caracterização físico-química das nanopartículas em suspensão estão: distribuição de tamanho, distribuição de massa molar do polímero, determinação do potencial zeta e pH, eficiência de encapsulamento, cinética de liberação do fármaco, estudo de estabilidade e avaliação morfológica (LEGRAND et.al., 1999).

### **2.3.1 DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS**

As nanopartículas poliméricas apresentam distribuição unimodal, baixo índice de polidispersão (CALVO et.al., 1996), diâmetro médio entre 100 e 300 nm (SCHAFFAZICK et.al, 2002) e podem chegar a 500 nm (SEIJO et.al., 1990).

Entre os fatores que afetam o diâmetro das nanopartículas estão a composição quantitativa dos reagentes, método de preparação e natureza do óleo utilizado como núcleo. Isso é devido à diferença de viscosidade (YU et.al., 1993), hidrofobicidade (LOSA et.al., 1993) ou tensão interfacial (MOSQUEIRA et.al., 2000) das substâncias usadas.

### **2.3.2 POTENCIAL ZETA (Z) DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS**

O Potencial Zeta é uma técnica usada para caracterizar o potencial da superfície das nanopartículas (LEGRAND et al., 1999) que é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, devido a dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou pela adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Os grupos carboxila do polímero podem gerar cargas negativas na superfície da nanocápsula. Devido ao menor número de grupamentos terminais os polímeros de maior massa molar têm influência menor sobre a carga da superfície quando comparados aos polímeros menores (MOSQUEIRA et al., 2000).

De acordo com Magenheim & Benita (1991) cargas superficiais relativamente altas comumente pressupõem uma boa estabilidade da



suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas previnem a agregação e colisões ao acaso de nanopartículas adjacentes. Também determina a interação entre os carreadores nanoparticulados e os meios biológicos (ALONSO, 1996).

Calvo et.al., (1996) verificaram a influencia da composição das suspensões no valor do potencial zeta e observaram que a fase oleosa em nanocápsulas e nanoemulsões produz potencial zeta mais negativo do que nas nanoesferas. Este resultado provavelmente é devido à camada polimérica ao redor da partícula oleosa. Com relação à influência do núcleo oleoso Mosqueira et.al., (2000) não observaram alteração do valor do potencial zeta em função da natureza do óleo.

### **2.3.3 TEOR DE ENCAPSULAÇÃO**

Normalmente o teor de encapsulação é medido pela subtração das concentrações total e livre de princípio ativo ou marcador na suspensão. Para isso é necessário recorrer a técnicas de separação da parte livre e da encapsulada. A ultracentrifugação é bastante utilizada. A concentração de fármaco livre, presente na suspensão, é determinada no sobrenadante após a centrifugação. A concentração total de fármaco, por sua vez, é geralmente determinada pela completa dissolução das nanopartículas em um solvente adequado. A ultrafiltração-centrifugação é empregada para separar parte da fase aquosa dispersante da suspensão coloidal.

Segundo Felippi, (2008) a taxa de associação ou eficiência de encapsulamento está relacionada à solubilidade do fármaco na fase orgânica. Na literatura, os teores de associação utilizando a técnica de polímero pré-formado variam muito. A eficiência de encapsulamento de atrazina varia entre 89,4 e 94,3% (SOUZA et.al., 2012). Schaffazick et. al., conseguiu encapsular 100% do diclofenaco em suspensões preparadas com um poliéster [poli( $\epsilon$ -caprolactona)]. A eficiência de encapsulamento de ácido retinoico foi de aproximadamente 90% (LARA, 2008) e de ácido lipóico entre 77 e 90% (KÜLKAMP et.al., 2009).

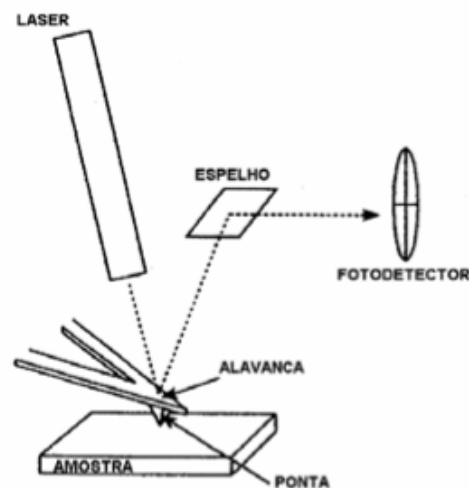
Diversos são os fatores que influenciam o teor de encapsulamento do fármaco. Os mais importantes são as características físico-químicas do

fármaco (CALVO et.al., 1996), o pH do meio (BRASSEUR et.al., 1991), a superfície das partículas ou a natureza do polímero (VILA et.al., 2002), a quantidade de fármaco adicionada à suspensão (BRASSEUR et.al., 1991), a ordem de adição do fármaco na suspensão (FRESTA et.al., 1995), a natureza do óleo utilizado (LOSA et.al., 1993) e o tipo de tensoativo utilizado (MARCHAL-HEAUSSLER, et.al, 1990).

#### **2.3.4 MORFOLOGIA EXTERNA DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS**

A análise morfológica tem sido amplamente utilizada para caracterizar a forma e o tamanho das nanocápsulas. A microscopia de força atômica (MFA), um tipo de microscopia de varredura por sonda mecânica, tem sido útil para caracterizar nanocápsulas (MOSQUEIRA et.al., 2005). Esta técnica oferece algumas vantagens em relação a outras técnicas para caracterização morfológica. O MFA possui resolução molecular, mínima preparação de amostras, sem necessidade de recobrimento metálico como para microscopia de transmissão ou microscopia de varredura. O MFA também apresenta informações quantitativas acerca topologia das amostras e é possível observar detalhes da superfície da partícula e obter imagens em três dimensões (NEVES et.al., 1998).

O princípio do método consiste em uma varredura da superfície da amostra com uma agulha extremamente fina suportada por uma alavanca conforme mostrado na Figura 5. Através da repulsão ou atração da agulha com a amostra gera-se uma deflexão na alavanca (eixo Z) para as diversas posições da amostra (eixos X e Y). Um feixe de laser é utilizado para monitorar a deflexão da alavanca o qual reflete sobre o verso da alavanca e incide sobre um fotodetector de quatro quadrantes (OSIRO et.al., 1998).



**Figura 5** – Desenho esquemático do funcionamento do MFA.

Através desta técnica é possível determinar o tamanho das nanocápsulas, suas propriedades estruturais, possíveis deformações e diferentes constituintes.

## 2.4 ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

O processo de sedimentação de suspensões coloidais é lento. Normalmente não possuem tendência à separação de fases até alguns meses após a preparação. Porém pode ocorrer a sedimentação das partículas após alguns meses. Entre os fatores que influenciam a estabilidade das suspensões coloidais estão a adsorção de moléculas ativas à superfície das nanopartículas, presença de tensoativos adsorvidos, agregação das partículas, estabilidade química do polímero, do fármaco ou de outras matérias-primas e, ainda, a liberação prematura da substância ativa (SCHAFFAZICK et.al., 2003). Portanto, a avaliação da estabilidade química dos polímeros formadores dos colóides é de fundamental importância (MOLPECERES et.al., 1997).

Os parâmetros físico-químicos que normalmente são avaliados durante os estudos de estabilidade são o tamanho de partícula, o potencial zeta, a distribuição da massa molar do polímero, o teor de fármaco e o pH (CALVO et.al., 1996; LOSA, et.al., 1993; FESSI et.al., 1989).

## **OBJETIVOS**

### **1. OBJETIVOS GERAIS**

Desenvolver nanopartículas contendo óleo de Pequi *Caryocar brasilienses Camb.* para uso tópico.

### **2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Contribuir para o aproveitamento sustentável do pequi (*Caryocar brasiliense Camb.*)

Desenvolver suspensões de nanocápsulas contendo óleo do pequi;

Caracterizar as nanocápsulas quanto ao tamanho das partículas, potencial zeta, pH, teor de encapsulação e morfologia;

Avaliar estabilidade das nanocápsulas encapsuladas com óleo de pequi;

## **METODOLOGIA**

### **1. MATERIAL**

O ácido oléico foi adquirido na Sigma-Aldrich® (EUA), monoestearato de sorbitano (Span 60) e o polissorbato 80 (Tween 80) foram obtidos da Delaware (Porto Alegre, Brasil), Poli (E-caprolactona) - PM 60.000 Daltons foi obtido da Aldrich (Estrasburgo, França), Miglyol 810 (uma mistura de triglicerídeos dos ácidos capríco/caprilico) foi adquirido da Brasquim (Porto Alegre, Brasil).

Os solventes utilizados na Cromatografia Gasosa (CG) foram de grau CG. As demais substâncias químicas usadas foram de grau analítico. Água deionizada foi utilizada para todos os experimentos (Deionizador Elga, Brasil).

Os equipamentos usados na preparação e caracterização das nanocápsulas foram: rotavapor (Heidolph), microscópico de força atômica modelo SPM 9600 (Shimadzu), Zetasizer Nano (Malvern), cromatógrafo a gás GC-2010 (SHIMADZU), espectrofotômetro modelo DU 70 (BECKAM), e phametro PG 1800 (GEHAKA)

## **2. MÉTODOS**

### **2.1 EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE PEQUI**

Os frutos de pequi foram colhidos no município de Buritis, noroeste do estado de Minas Gerais. Foram coletados diretamente do chão e deixados por três dias em sua forma intacta à temperatura ambiente para completo amadurecimento das polpas. Foram então lavados em água corrente, sanitizados com solução de hipoclorito de sódio, descascados e despulpados manualmente. Em seguida, a polpa de pequi foi colocada em bandejas de aço inox e seca em estufa à 40°C por 20 horas.

Para a extração do óleo utilizou-se a metodologia de Soxhlet com emprego de hexano como solvente no período de 4 horas de extração. Para separar o óleo do solvente foi utilizado rotaevaporador. O rendimento de óleo foi expresso em porcentagem (g de óleo/100 g de amostra seca).

### **2.2 NANOESTRUTURAÇÃO DE ÓLEO DE PEQUI**

#### **2.2.1 Preparo das nanocápsulas**

Para a obtenção das nanocápsulas contendo óleo de pequi (NP) utilizou-se a técnica de deposição interfacial de polímeros pré-formados (FESSI et.al., 1989). Para preparar as nanocápsulas contendo óleo de pequi (NP) foram adicionados 10 mg de óleo de *Caryocar brasiliense Camb* na fase orgânica contendo o polímero poli (E-caprolactona) (100 mg), acetona (26,7 mL) e monoestearato de sorbitan (76,6 mg), uma mistura de triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico (0,33 mL) sobre uma fase aquosa (53,3 mL) contendo polissorbato 80 (76,6 mg)

mantida sob agitação magnética durante 10 min. Em seguida os solventes foram evaporados em rotavapor sob temperatura de 45°C, pressão 40 mbar e 210 rpm até volume final de 10 ml. Foi também preparada uma suspensão contendo todos os componentes da suspensão, exceto óleo de pequi, denominada nanocápsula controle (NC). Todas as suspensões foram preparadas em triplicata.

## **2.2.2 Caracterização físico-química das nanopartículas**

### **2.2.2.1 Análise macroscópica**

As suspensões foram analisadas sob aspecto visual.

### **2.2.2.2 Determinação do diâmetro das partículas em suspensão**

A amostra de nanocápsulas controle e as contendo óleo de pequi foram diluídas 500 vezes em água deionizada e então analisada pelo método de espalhamento de luz utilizando Zetasizer Nano (Malvern). Os valores obtidos correspondem à média  $\pm$  desvio padrão de dez medidas de cada suspensão de nanocápsulas. Neste teste também foi observado o índice de polidispersão.

### **2.2.2.3 Determinação do potencial zeta**

A amostra de nanocápsulas controle e as contendo óleo de pequi foram diluídas 500 vezes em água deionizada foram analisadas utilizando um ângulo de incidência do laser em relação à amostra de 90° luz utilizando Zetasizer Nano (Malvern). Todas as determinações foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão.

#### 2.2.2.4 Análise de pH

As medidas de pH foram efetuadas diretamente nas amostras utilizando potenciômetro previamente calibrado com soluções tampão para calibração pH 4 e 7.

#### 2.2.2.5 Avaliação morfológica

A análise morfológica das nanocápsulas foi realizada por microscopia de força atômica. Para a realização dessa análise foi utilizado o equipamentos modelo SPM 9600 Shimadzu (Japão).

As imagens foram obtidas no modo de operação dinâmico e de aquisição por fase. As amostras foram diluídas 1:1000 em água destilada e então depositados em placas de mica clivada. Depois de secas à temperatura ambiente, a varredura foi efetuada com velocidade de 5 Hz e resolução de 512 x 512 pixels. A análise das amostras foi realizada utilizando o programa de análise do sistema (Section Analysis).

#### 2.2.2.6 Eficiência de encapsulamento

A eficiência de encapsulação foi determinada por cromatografia gasosa por método indireto que consiste na razão entre a diferença entre a concentração de um marcador presente no óleo (CT) e a concentração livre deste marcador no sobrenadante (CL) dividido pela CT, multiplicado por 100 (Equação 1).

**Equação 1-** Eficiência de encapsulamento

$$EE (\%) = \frac{(CT - CL)}{CT} \times 100$$

##### 2.2.2.6.1 Extração do óleo das nanocápsulas

Para as análises em cromatografia gasosa o óleo de pequi teve que ser extraído das suspensões. Para calcular a concentração total (CT), 1

mL da suspensão NP foi adicionada à 4 ml de acetonitrila. Em seguida, a mistura foi filtrada (Filtro 0,45  $\mu\text{m}$ ) e lavada com 5 ml de n-hexano.

Para a quantificação do óleo livre (CL), 1 ml da suspensão NP foi centrifugada durante 5 min a 4.500 rpm e 4 °C. Em seguida o sobrenadante foi filtrado (Filtro 0,45  $\mu\text{m}$ ) e lavado com 5 mL de n-hexano. Por diferença de densidade, o hexano foi separado da acetonitrila. O hexano extraído foi transferido para um Eppendorf e deixado evaporar a 50 °C.

#### **2.2.2.6.2 Metilação do óleo de pequi**

Depois de evaporar o hexano foram adicionados ao óleo de pequi obtido da extração das nanocápsulas 100  $\mu\text{l}$  de uma solução de KOH 1mol/L em etanol. Após agitação em vórtex por 10s, o óleo foi aquecido a 100 °C por 5 minutos em banho-maria. Após resfriamento, adicionou-se 400 $\mu\text{L}$  de HCl a 20%, uma ponta de espátula de NaCl (~20mg) e 600  $\mu\text{l}$  de acetato de etila. Após agitação em vórtex por 10s e repouso por 5min, uma alíquota de 300 $\mu\text{L}$  da camada orgânica foi retirada e evaporada em banho-maria à 70°C obtendo-se assim os ácidos graxos livres. Os ácidos graxos livres foram metilados com 100  $\mu\text{l}$  trifluoreto de boro (BF<sub>3</sub>) / metanol (14%) e aquecidas durante 12min em banho de água a 80 °C. Foram em seguida diluídos com 400  $\mu\text{l}$  de metanol e analisados por cromatografia gasosa (CHRISTIE, 1989).

Para construir a curva de calibração foi usado padrão de ácido oléico (Sigma-Aldrich). Para metilar o ácido graxo padrão, 1 mg do ácido oléico foi adicionada à 1 ml de BF<sub>3</sub>/metanol sob aquecimento de 70 oC em sistema fechado por 12 minutos em banho maria. Após resfriamento, foram realizadas diluições em metanol para as seguintes concentrações: 3  $\mu\text{g/mL}$ , 15  $\mu\text{g/mL}$ , 35,5  $\mu\text{g/mL}$ , 75  $\mu\text{g/mL}$  e 150  $\mu\text{g/mL}$ . As amostras foram armazenadas à - 20°C até análise em cromatografia gasosa.

#### **2.2.2.6.3 Cromatografia Gasosa**

Após a metilação do óleo extraído das nanocápsulas, as amostras foram então injetadas em cromatógrafo a gás GC-2010 (SHIMADZU)



equipado com detector por ionização de chamas (FID). Utilizou-se uma coluna RESTEK RTX – 5 MS 30m x 0,25mm x 0,25 µm com gradiente de temperatura: 150°C, 0min, 7°C/min até 250°C; injetor (split de 1/50) a 250°C e detector a 250°C. Hélio como gás de arraste (1 mL/min) e volume de injeção de 1µL.

### **2.3 Estudo de estabilidade das nanocápsulas**

O estudo de estabilidade foi realizado nas nanocápsulas poliméricas controle e nas que continham óleo de pequi. Logo depois de manipuladas, as nanocápsulas foram acondicionadas em frascos de vidro incolor, envoltos em papel pardo, armazenados à temperatura ambiente de 25°C ± 1°C e protegidos da luz. Foram avaliadas suas características físico-químicas, como tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e pH nos tempos inicial, 7, 15 e 30 dias e estabilidade molecular nos tempos de 7 dias e 2,5 meses e meio após o preparo das mesmas.

### **2.4 Análise estatística**

Os dados experimentais foram avaliados estatisticamente por análise de variancia (ANOVA) ou test “t” considerando o nível de significancia de 0,05.

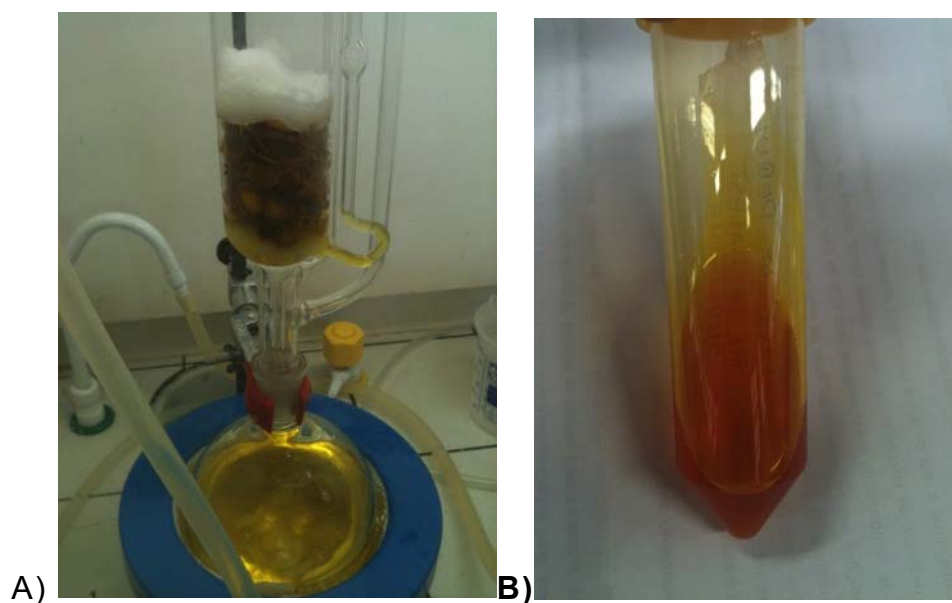
## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **1. Óleo de pequi**

Os frutos coletados apresentaram tamanhos variados e amadurecimento homogêneo evidenciado pela coloração amarelo-avermelhada das polpas. De acordo com a literatura, variações nas características dos frutos, como cor, tamanho, peso, forma da amêndoa e

da polpa podem variar conforme o local de plantio, colheita, ponto de maturação e fatores ambientais (ALMEIDA et al., 1998).

A polpa picada após secagem em estufa à 40°C apresentou aspecto desidratado e oleoso. O óleo foi facilmente extraído por método de Soxhlet e depois da evaporação do solvente apresentou coloração amarelo-avermelhada intensa (Figura 7). O óleo produzido por Deus, (2008) também apresentou coloração amarelo-alaranjada está de acordo com o resultado encontrado neste estudo.



**Figura 6** - A) Fotografia da montagem da vidraria e extração do óleo de pequi pelo método de Soxhlet; B) Fotografia do óleo de pequi após a extração.

O rendimento do óleo foi de 23%. Segundo Deus, 2008 o rendimento da extração do óleo de pequi por método de soxhlet usando hexano como solvente pode chegar a 36,05%. Em outro estudo foi possível extrair quantidades maiores de óleo utilizando o mesmo método, cerca de 50% em base seca (AQUINO et.al., 2009).

## **2. Caracterização físico-química das nanocápsulas poliméricas**

### **2.1 Análise macroscópica**

Todas as suspensões apresentaram aspecto macroscópico de acordo com os resultados anteriormente relatados na literatura para outras nanocápsulas (SCHAFFAZICK, S R. et al., 2006; KÜLKAMP I.C. et al., 2009). Após a preparação, as suspensões NC apresentaram aparência macroscópica homogênea, aspecto leitoso, brancas, opalescente e sem odor. As suspensões de nanocápsulas contendo óleo de pequi ficaram homogêneas, de aspecto leitoso-amarelado, opalescentes e com leve odor característico do fruto.

## **2.2 Análise de pH**

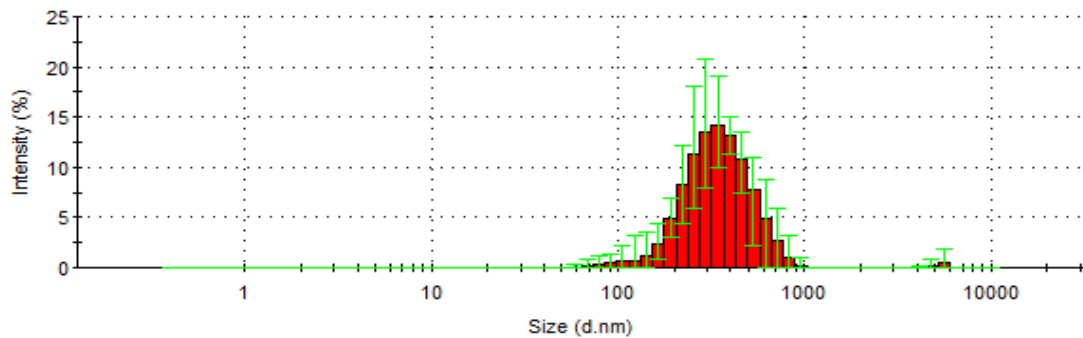
O pH de todas as suspensões controle e as com óleo de pequi apresentaram pH  $5,60 \pm 0,03$  e  $5,61 \pm 0,11$  respectivamente. A presença do polímero contribuiu para a obtenção de suspensões de caráter ácido visto à presença do grupo éster (DÚRAN et al., 2006). Outros estudos que desenvolveram nanopartículas de poli ( $\epsilon$ -caprolactona) obtiveram pH levemente ácido. Nanocápsulas poliméricas de ácido retinóico apresentaram pH menor do que cinco e as controle em torno de seis (LARA, 2008). Ácido lipóico estabilizado com PLC apresentaram pH próximo à quatro (KÜLKAMP et al., 2009). O pH de nanocápsulas poliméricas contendo amido aniônico hidrolisado para formulação tópica também apresentaram pH igual à 5 (SANTOS; BARBOZA, 2013).

Apesar do caráter ácido, as suspensões produzidas estão de acordo com a faixa de pH adequada para uso tópico, tendo em vista pH ideal entre 5 e 7 (NAKAZONE, 2012). Irritação e sensibilidade na pele, além de diminuição de permeabilidade podem ser causados pelo baixo pH (GREEN, et al., 2009).

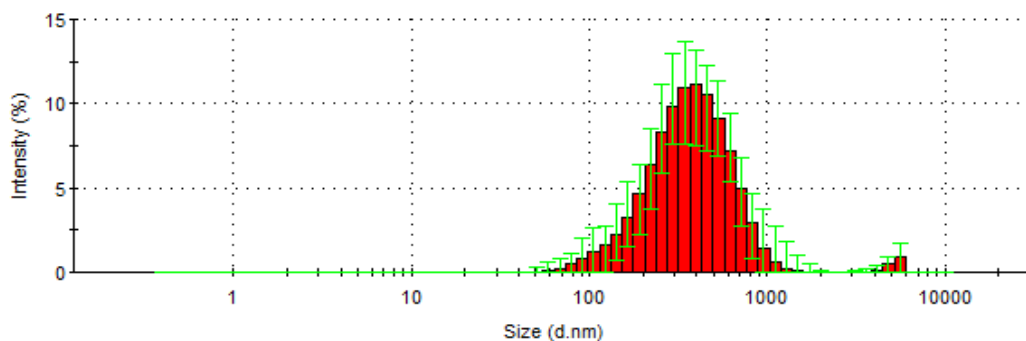
## **2.3 Determinação do tamanho das partículas e índice de polidispersão**

Todas as suspensões apresentaram partículas com diâmetro submicrométrico adequado e compatível com sistemas preparados pelo método de nanoprecipitação. Pelo método de espalhamento de luz visível

das as NC apresentaram diâmetro médio igual a  $341,5 \pm 9,07$  (Figura 11). As nanocápsulas contendo óleo de pequi apresentaram diâmetro de  $343,33 \pm 12$  (Figura 12). Outros estudos encontraram nanopartículas poliméricas com tamanhos próximos a 400 nm os quais corroboram com os resultados encontrados (MULLER, C R et.al., 2004; KULLKAMP, I.C. et.al., 2009; LARA, 2008)



**Figura 7-** Distribuição estatística do diâmetro hidrodinâmico da NC.



**Figura 8 –** Distribuição estatística do diâmetro hidrodinâmico das NP.

Não foi observada diferença estatística entre o diâmetro das nanocápsulas controle e as que continham óleo de pequi ( $p=0,3171$ ). Portanto a incorporação do óleo não modifica o tamanho das nanocápsulas. Outros estudos que utilizaram o método de precipitação de polímeros pré-formados para preparação de nanocápsulas observaram que a adição do fármaco após o término da polimerização não influencia no diâmetro médio de partículas (DINIZ, 2008; KÜLKAMP et.al., 2009, NEMEN; LEMOS-SENNA, 2011).

Segundo Guterres et.al., (1995) e Schaffazick et.al., (2002), o fármaco na fase orgânica pode não influenciar no tamanho de nanopartículas poliméricas. Fatores como a concentração do fármaco (LARA, 2008), do tensoativo (ALVES et.al., 2007), à viscosidade (YU, et.al, 1993), hidrofobicidade (LOSA, Et.al., 1993) ou tensão interfacial (MOSQUEIRA, 2000) das substâncias empregadas podem aumentar ou não o diâmetro da nanopartícula.

O índice de polidispeção (PDI) é um parâmetro usado para indicar a distribuição do tamanho das nanocápsulas. O PDI das NC e das NP foram iguais à 0,300. Índices de polidispersão de até 0,3 são considerados adequados para aplicação cutânea, pois indicam que a suspensão é monodispersa apresentando uma faixa estreita de tamanhos (KÜLKAMP, 2009; NEMEN; LEMOS-SENNA, 2011). Lara (2008) considerou satisfatório PDI menores que 0,5 para nanopartículas contendo ácido retinóico para uso tópico.

## **2.4 Potencial Zeta**

O potencial zeta é um importante indicador de estabilidade. Está relacionado com cargas de superfície provocadas pela dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula e o meio dispersante ou pela adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso onde a nanocápsula está dispersas (MOSQUEIRA, 2000). As NC apresentaram potencial zeta  $-29,93 \pm 2,22$  mV enquanto que as NP  $-35,16 \pm 1,34$  mV.

Na literatura, trabalhos com nanopartículas que apresentaram potenciais zeta próximos à -40 mV indicaram formação de nanocápsulas, enquanto que potenciais zeta próximo à -16 mV, nanoesferas (CALVO et.al., 1996).

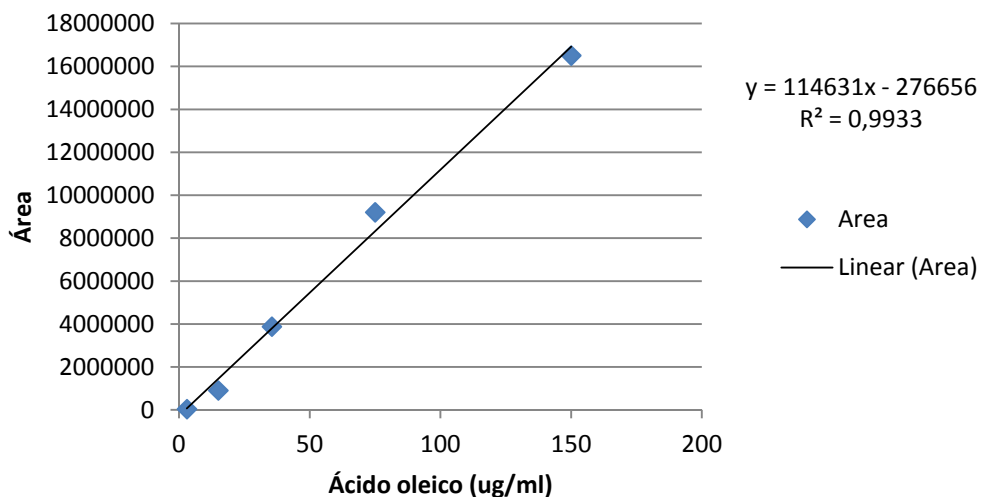
Nanopartículas de resveratrol (NEMEN; LEMOS-SENNA, 2011) e ácido retinóico (LARA, 2008), ambas para aplicação tópica, apresentaram potencial zeta negativo entre 30 e 40 mV. São descritos na literatura potencial zeta negativo e positivo para aplicação cutânea (SONAVANE et.al., 2008; OURIQUE et.al., 2008; HOELLER et.al., 2009). Segundo

Leonardi et.al., 2002, sua adequação para aplicação tópica se dá a partir do pH, que deve ser levemente ácido.

## 2.5 Eficiência de encapsulamento

Por método de cromatografia gasosa foi possível quantificar o ácido oléico. Apesar de haver necessidade de extração prévia e posterior metilação do óleo, a técnica foi útil para prever a eficiência de encapsulamento.

A Figura 13 apresenta a curva de calibração obtida por cromatografia gasosa para o ácido oléico com a respectiva equação da reta e o coeficiente de determinação ( $r^2$ ).



**Figura 9** - Representação gráfica da curva de calibração do ácido oléico, obtida por CG.

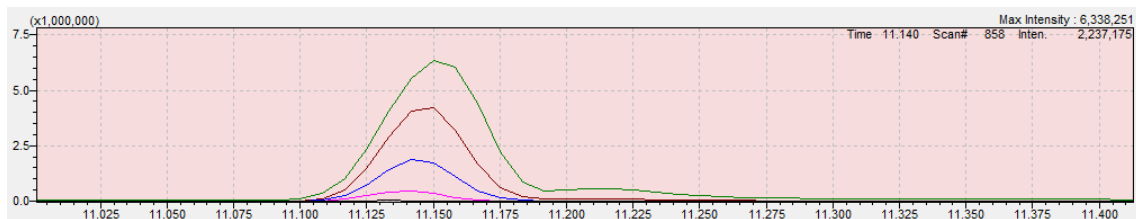
A Tabela 2 apresenta os valores das áreas absolutas obtidas da diluição do padrão de ácido oléico.

**Tabela 2** – Diluições do padrão de ácido oleico e suas respectivas áreas sob o pico.

Concentração (ug/mL)	Área
3	38772
15	906898
35	3879927
75	9207982
150	16507840

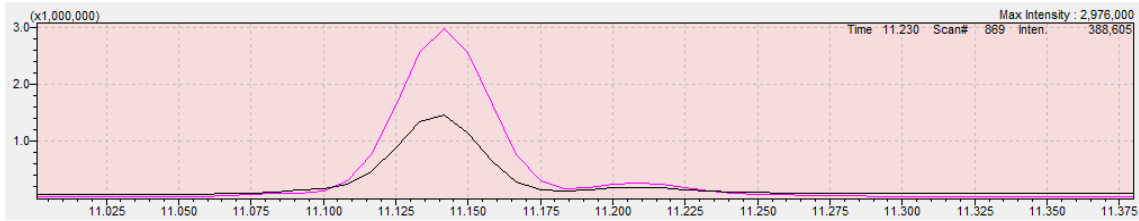
Através da curva de calibração (Figura 13) e pela análise de regressão é possível observar a relação linear entre as áreas sob os picos e as concentrações de ácido oléico no intervalo proposto de 3 a 150 ug/ml. Apresenta linearidade ( $r^2= 0,9933$ ), indicando que 99,33% da variação no eixo de y é explicada pela variação no eixo de x, e, conseqüentemente, há uma boa correlação ou linearidade na curva dentro da faixa de concentração proposta.

O tempo de retenção do marcador foi entre 11.1 e 11.2 minutos como pode ser observado na figura 14.



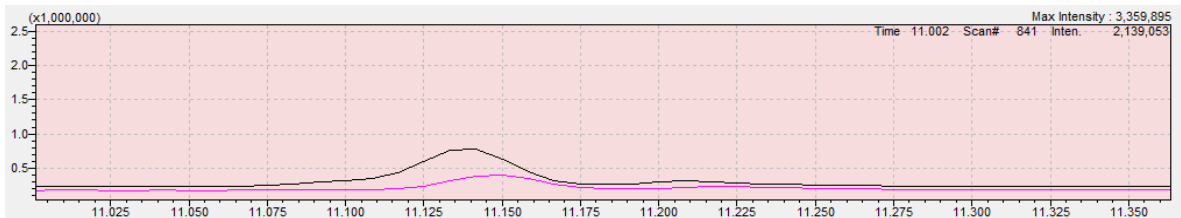
**Figura 10** – Área do sinal de C18:1 9n nas concentrações 3, 15, 35, 75, 150 ug/ml.

A presença do ácido oléico no óleo de pequi é evidenciada pelos picos entre 11,1 e 11,2 minutos (Figura 15). As áreas correspondentes a cada pico são 6229947 e 2982574. A diferença entre os picos pode ter sido devido à evaporação do solvente ou a erros aliados à técnica. Portanto, a concentração do ácido oléico no óleo variou entre 56,76 e 28,43 ug/mg de óleo.



**Figura 11** – Área do sinal de C18:1 9n no óleo de *Caryocar brasiliense* Camb.

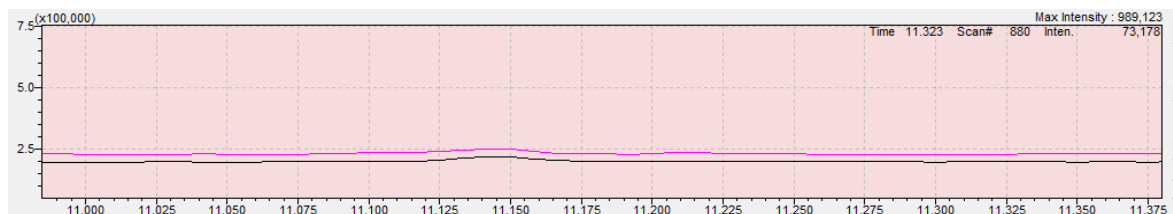
A concentração total de ácido oléico do óleo de pequi presente na suspensão de nanopartículas é demonstrada na Figura 16. O área do pico entre os tempos 11.1 e 11.2 corresponde a quantidade de ácido oléico presente em 1 mL de suspensão de nanopartículas.



**Figura 12** – Área do sinal de C18:1 9n da concentração total de fármaco nanoencapsulado.

As áreas dos picos são 2585330 e 2517847 e correspondem á 23,46  $\mu\text{g}$  de ácido oléico por mL de suspensão.

A figura 17 corresponde ao cromatograma do sobrenadante das nanopartículas contendo óleo de pequi. Não foi observado pico entre 11.1 e 11.2 minutos, o que infere ausência de óleo livre.



**Figura 13** – Área do sinal de C18:1 9n no sobrenadante da suspensão.

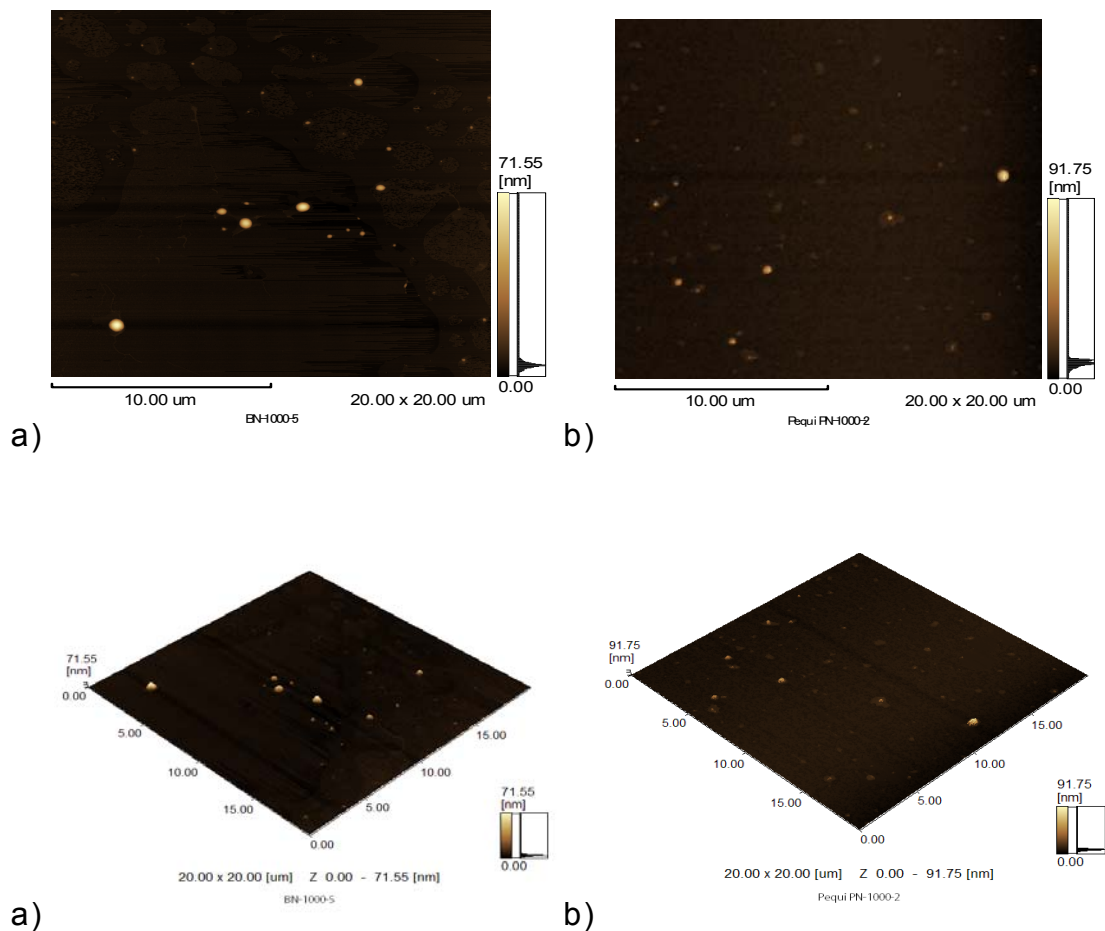
Por não haver presença de ácido oléico no sobrenadante a eficiência de encapsulamento foi de 100%. Porém, perdas de ácido oléico

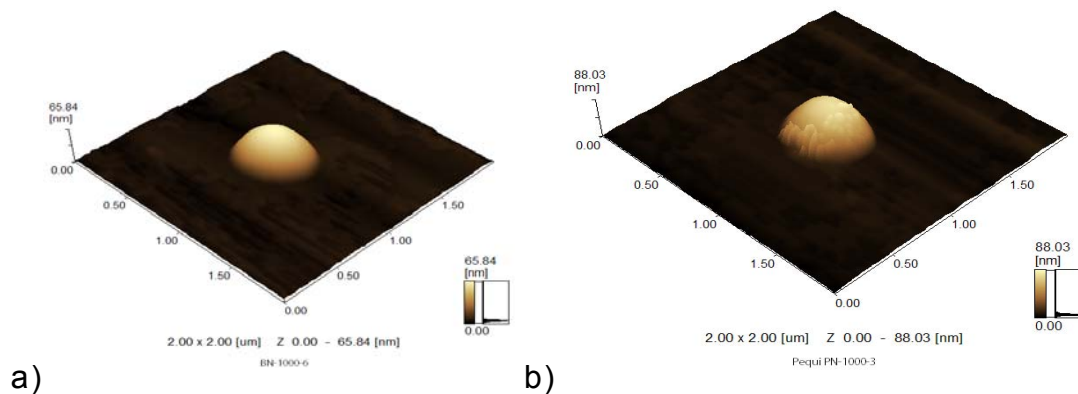


foram observadas evidenciadas pela diferença entre o teor de ácido oléico presente no óleo de pequi puro e o obtido das nanopartículas. A extração do óleo das nanopartículas, a presença de água na suspensão, a reação de metilação dos ácidos graxos, a temperatura, a evaporação do solvente e a formação de artefatos podem reduzir a quantificação dos ácidos graxos (KLOPFENSTEIN et.al., 1971). Além disso, caso durante a reação haja perdas de metanol e, portanto, aumento na concentração de  $\text{BF}_3$ , a destruição dos ácidos graxos poliinsaturados poderia ser significativa.

## 2.6 Morfologia externa das nanocápsulas poliméricas

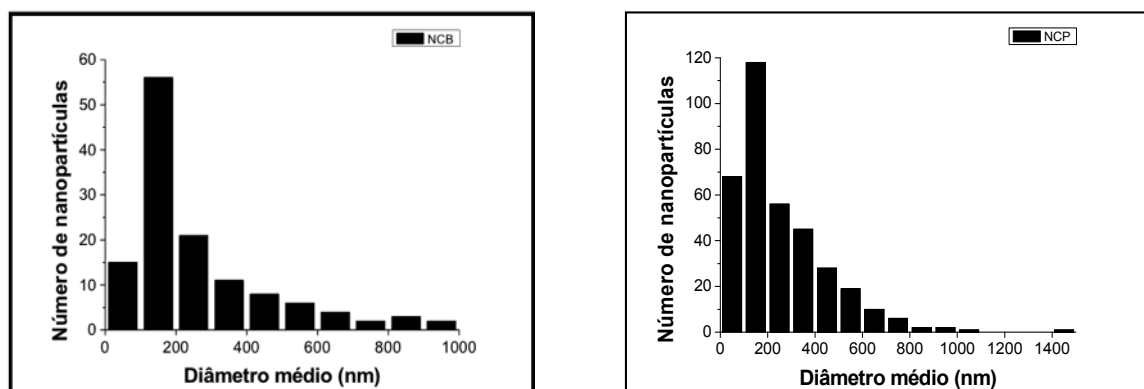
A morfologia externa das nanopartículas controle e as contendo óleo de pequi foram avaliadas por microscopia de força atômica (MFA). As imagens são tridimensionais, em escala nanométrica e de elevada resolução.





**Figura 14** – Microscopia de força atômica das nanopartículas controle (a) e das contendo óleo de pequi (b).

Tanto as NC quanto as NP apresentaram forma esférica e formato regular. Análises realizadas mostraram que a associação do óleo não alterou a estrutura arredondada das nanopartículas. Porém, as NC apresentaram distribuição homogênea com diâmetro médio de  $262,1 \pm 18$  nm, enquanto que as NP tiveram distribuição heterogênea com diâmetro médio de  $258,6 \pm 10,3$  nm como pode ser observado na Figura 18.



**Figura 15**– Distribuição do diâmetro médio das nanopartículas controle e contendo óleo de pequi.

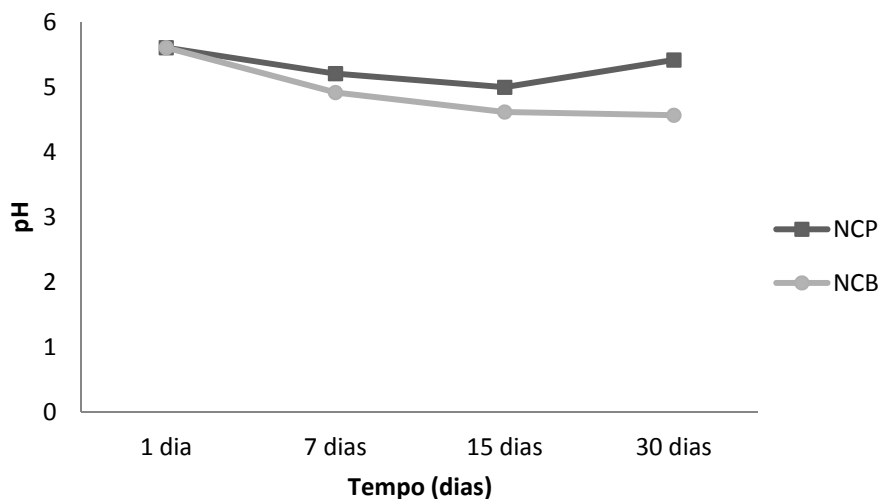
A diminuição do diâmetro da nanopartícula na técnica de MFA em relação ao diâmetro hidrodinâmico pode ser devido à desidratação da

amostra a qual pode reduzir o volume das nanopartículas (ARAÚJO, 2009; GOTO, 2011).

### 3. Estudo de estabilidade

Durante o estudo de estabilidade, todas as suspensões estudadas se mantiveram estáveis na forma de suspensões coloidal com aspecto leitoso característico das nanocápsulas. Não foi observado cremagem, sedimentação, divisão de fases ou floculação nas suspensões durante o período avaliado. O cheiro característico de óleo de pequi não foi mantido até o fim do estudo.

O monitoramento do pH em função do tempo é um importante indicativo de estabilidade das nanopartículas. O pH das NC se manteve levemente ácido com variação significativa ( $p < 0,05$ ) de 0,41 no decorrer dos 30 dias de estudo. Já as suspensões contendo óleo de pequi (NP) não apresentaram mudança de pH significativa ( $p > 0,05$ ), se mantendo em torno de  $5,33 \pm 0,22$  durante o armazenamento (Gráfico 3).



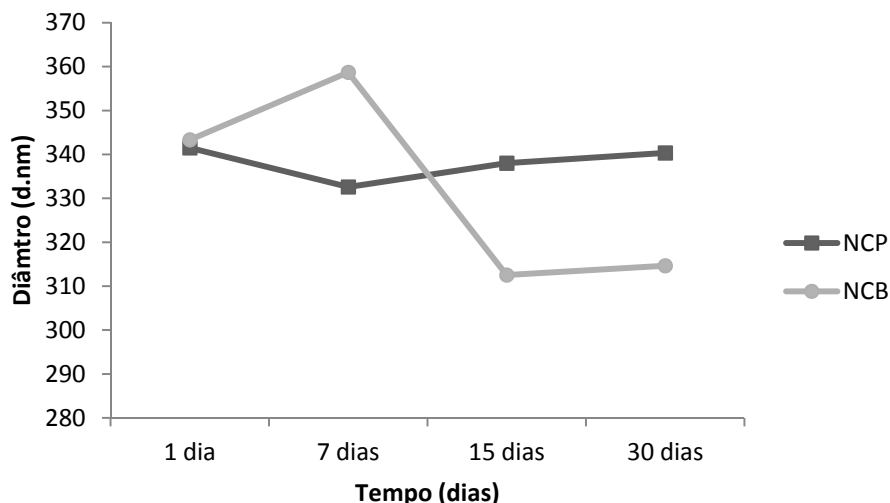
**Figura 16-** Medidas de pH das suspensões durante o tempo de armazenamento.

Vários outros autores também observaram redução do pH das suspensões após alguns meses de armazenamento. Porém, em todos, a

redução do pH ocorreu e ambas suspensões, controle e as contendo fármaco de interesse. O aumento da acidez foi justificado pela hidrólise dos triglicerídeos do Miglyol, do tensoativo, pela degradação do polímero (CALVO et.al., 1996; SCHAFFAZICK et.al., 2002; PAESE, 2008) ou pelo princípio ativo livre (KULKAMP et.al., 2009).

No caso deste trabalho, as nanopartículas contendo óleo de pequi se mantiveram mais estáveis que as controle.. Pode-se inferir que o óleo de pequi reduziu a exposição de grupos ácidos carboxílicos terminais do polímero e a hidrólise dos triglicerídeos, mantendo o pH durante todo o tempo de armazenamento (SCHAFFAZICK et.al., 2002). Além disso, pode estar relacionado à permanência do óleo encapsulado, visto que a diminuição do pH poderia decorrer devido a oxidação da fase oleosa com formação de hidroperóxidos ou em decorrência da hidrólise de triglicerídeos levando à formação de ácidos graxos livres (MASMOUDI *et al.*, 2005).

A tendência de agregação e sedimentação das nanopartículas podem ser medidas a partir da mudança do diâmetro médio em função do tempo. Não houve variação significativa ( $p > 0,05$ ) no diâmetro médio das partículas presentes nas suspensões de NC e NP durante o tempo de armazenamento estudado.



**Figura 17-** Diâmetro médio das partículas durante o armazenamento.

O teste-t demonstrou diminuição significativa no diâmetro das nanopartículas controle ( $t= 0,02$ ) quando comparado o tempo inicial e final de armazenamento. Cabe ressaltar que a diminuição foi de 29 nm, ou seja 0,09 vezes o valor do início do estudo. Diferentemente deste trabalho, outros estudos observaram aumento de 0,2 e 2,4 vezes no tamanho das nanopartículas devido agregação das partículas no final do estudo de estabilidade (KULKAMP et.al., 2009; SOUTO et.al., 2004). A diminuição pode ser devida a perda do Miglyol para o meio. Portanto, as nanopartículas de óleo de pequi mantiveram-se mais estáveis que as NC e quando comparadas à literatura.

A tendência de agregação e sedimentação das nanopartículas podem ser medidas a partir da mudança da distribuição do tamanho em função do tempo. Os índices de polidispersão referentes às medidas de triplicatas apresentados na Tabela 2 encontram-se na faixa de 0,256 a 0,368.

**Tabela 3** – Índice de polidispersão médio das partículas contendo óleo de pequi (NP) e as controle (NC) durante o armazenamento.

Tempo (dias)	NP	NC
1 dia	0,306 ± 0,07	0,300 ± 0,03
7 dias	0,344 ± 0,05	0,321 ± 0,09
15 dias	0,368 ± 0,159	0,256 ± 0,01
30 dias	0,378 ± 0,06	0,263 ± 0,02

Cada valor é a média de 3 amostras.

Ao longo do tempo de armazenamento, não houve variação estatística ( $p>0,05$ ) do índice de polidispersão das NP e das NC demonstrando que o diâmetro das partículas das amostras não variou durante o armazenamento. Cabe ressaltar que após 30 dias de armazenamento o PDI das amostras se mantiveram inferiores à 0,4, valor considerado satisfatório para uso tópico (LARA, 2008).

Quanto ao potencial zeta, não foi observado diferenças estatísticas ( $p> 0,05$ ) das suspensões contendo óleo de pequi durante o tempo de armazenamento. Porém, na suspensão controle, foi observada diferença

significativa ( $p=0,02$ ) tornando-se mais negativo nas amostras após 30 dias de armazenamento. Kulkamp et.al., 2009 também observaram aumento significativo do potencial zeta, para mais negativo, durante 28 dias de armazenamento de nanopartículas de ácido lipóico, justificado pela ionização de grupos ácido da parede polimérica.

**Tabela 4-** Potencial zeta das NP e NC durante o armazenamento

Tempo (dias)	Potencial	Zeta (mV)
	NP	NC
1 dia	$-35,16 \pm 1,34$	$-29,93 \pm 2,22$
7 dias	$-37,56 \pm 0,92$	$-34,33 \pm 0,579$
15 dias	$-37,266 \pm 1,82$	$-32,66 \pm 3,43$
30 dias	$-39,033 \pm 3,90$	$-37,1 \pm 0,85$

Cada valor é a media de 3 medidas

O potencial zeta das nanopartículas contendo óleo de pequi não mudou, pois a presença do óleo impede a exposição dos grupos negativos do polímero e dos ácidos graxos presentes na fase oleosa mantendo constante a carga da partícula, o que não ocorre no controle (Lara, 2008).

## CONCLUSÕES

- A encapsulação do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) a partir da técnica de deposição interfacial de polímeros pré-formados mostrou-se viáveis para as nanocápsulas na concentração de 1 mg/mL.
- As suspensões de nanocápsulas contendo óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) apresentaram características próprias para uso tópico, tais como pH de  $5,61 \pm 0,11$ , potencial zeta de  $-35,16 \pm 1,34$  mV, diâmetro médio de  $343,33 \pm 12,43$  nm, índice de polidispersão de 0,3, forma esférica e 100 % de eficiência de encapsulamento.

- As nanocápsulas contendo óleo se mantiveram estáveis sem variações macroscópicas, de pH, diâmetro, PDI e potencial zeta durante 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente.

## REFERÊNCIAS

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

ALBINI, L T. *Solubilidade do biopolímero PCL em solventes para aplicação no processo de microencapsulação*. 2012. 83 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Curitiba. Universidade Federal de Curitiba, Curitiba, 2012.

ALEXIS, F.; RHEE, J.; RICHIE, J.P.; RADOVIC-MORENO, A.F.; LANGER, R.; FAROKHZAD, O.C. New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, v. 26, p. 74 – 85, 2008.

ALLÉMANN, E.; GURNY, R.; DOELKER, E.; Drug loaded nanoparticles - preparation methods and in vivo studies. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* v. 39, n.5. p.173 – 191,1993.

ALONSO, M. J. Nanoparticulate drug carrier technology. In: COHEN, S. BERNSTEIN, H. *Microparticulate systems for the delivery of proteins and vaccines*. New York: Marcel Dekker, 1996. Cap. 7, p. 203-242.

ALMEIDA, S. P; SILVA, J. A. Piqui e buriti: importância alimentar para a população dos cerrados. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1994. 38p.

ALMEIDA, S. P. Cerrado: aproveitamento alimentar. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1998. 188p.



ALVAREZ-ROMÁN, R., NAIK, A., KALIA, Y.N., GUY, R.H. AND FESSI, H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *J. Control Release*, v. 99, p.53–62, 2004.

ALVES, A.M.; FERNANDES, D. C.; SOUSA, A. G.O.; NAVES, M. M. V. Caracterização física e química de frutos do pequi oriundos de três estados brasileiros. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília, 2012. (No prelo).

ALVES, M.P., SCARRONE, A.L., SANTOS, M., POHLMANN, A.R., GUTERRES, S.S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. *International Journal of Pharmaceutics*. V. 341, n.16, p 215–220, 2007.

AQUINO, L P; FERRUA, F Q; BORGES, S V; ANTONIASSI, J; CORREA, L.G; CIRILLO, M A. Influência da secagem do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) na qualidade do óleo extraído. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 29, n. 2. p. 354-357, 2009.

ARAÚJO, F.D. The Ecology, ethnobotany and management of *Caryocar brasiliense* Camb. around Montes Claros, MG, Brasil. 1994. 174 f. Tese (Doutorado em Ecologia) - University of Oxford, Oxford, 1994.

BARRIOS, J.G. Desenvolvimento e caracterização de suspensões contendo nanocápsulas de adapaleno com diferentes núcleos oleosos. 2010. 103f. Dissertação (Mestrado em Nanociências) – Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, 2010.

BESHEER, A.; VOGEL, J.; GLANZ, D.; KRESSLER, J.; GROTH, T. & MADER, K. Characterization of PLGA Nanospheres Stabilized with Amphiphilic Polymers: Hydrophobically Modified Hydroxyethyl Starch vs Pluronic. *Mol. Pharmaceutics*, v. 6, n. 2, p. 407–415, 2009.

BILATI U, ALLÉMANN E, DOELKER, E. Nanoprecipitation versus emulsion-based techniques for the encapsulation of proteins into biodegradable nanoparticles and process-related stability issues. *AAPS PharmSciTech*. v.6, n.4, p. 594-604, 2005.

BRANDÃO, M.; LACA-BUENDÍA, J.P.; MACEDO, J.F. *Árvores nativas e exóticas do Estado de Minas Gerais*. Belo Horizonte: EPAMIG, 2002. 528p.

BRASSEUR, N.; BRAULT, D.; COUVREUR, P. Adsorption of hematoporphrin onto polyalkylcyanoacrylate nanoparticles: carrier capacity and drug release. *Int. J. Pharm.* v. 70. p. 129-135, 1991.

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. *J. Pharm. Sci.* v. 85, p. 530- 536, 1996.

CARVALHO, M. C.; BURGER, O. N. Contribuição ao estudo do pequi de Brasília. Brasília, DF: SPS, 1960. 15 p.

CHRISTIE, W.W. Gas Chromatography and Lipids. *The Oily Press*, p. 307, 1989.

COSTA, T. A., VIEIRA, R. F. **Frutas do cerrado: frutas nativas do cerrado qualidade nutricional e sabor peculiar**. 2004. Disponível em: <<http://www.cenarger.embrapa.br>> Acesso em: 09 jan 2013.

CORRÊA, M.P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1926, v.1., 747p.

CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C. K.; PROCOPIO, J. *Entendendo a gordura: Os ácidos graxos*. Barueri-SP: Editora Manole, v. 5, p. 40, 2002.

DAMIANI, C. Qualidade e Perfil Volátil de Pequi (*Caryocar brasiliense* camb.) Minimamente Processado, Armazenado e Sob Diferentes Temperaturas. Dissertação de mestrado, UFLA-Lavras, 2006. 136p.

DEUS, T. N. Extração e caracterização de óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* camb.) para o uso sustentável em formulações cosméticas óleo/água. Dissertação de Mestrado Multidisciplinar, Universidade Católica de Goiás, 2008.

DINIZ, T.N. Extração e caracterização de óleo do pequi (*Caryocar brasiliensis* Camb.) para uso sustentável em formulações cosméticas óleo/água. Dissertação de Mestrado Multidisciplinar, Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2008. 158 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Convênio UnB-UFG-UFMG, Univeridade de Brasília, Brasília, 2008.

DÉBORA, M. R. Propriedades físicas, químicas e bioquímicas de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) de diferentes regiões do cerrado. 2011. 64p. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana) – Universidade de Brasília, Brasília. 2011.

DURÁN, N.; MATOSSO, L.H.C.; MORAIS, P.C. Nanotecnologia, introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. 1.ed. São Paulo: Artliber, 2006, p. 161-164.

FALLER, A. K.; FIALHO, E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. *Rev Saúde Pública*. v. 43, n. 2. p. 211-208, 2009.

FACIOLI, N. L.; GONÇALVES, L. A. G. Modificação por via enzimática da composição triglicéridica do óleo de piqui (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 16-19, 1998.

FELIPPI, C. C. Nanopartículas contendo isotretinoína: Preparação, caracterização físico-química, estudo de estabilidade e avaliação da penetração cutânea. Dissertação de Mestrado, Porto Alegre-RS, 2008.

FERREIRA, F. R.; BIANCO, S.; DURIGAN, J.F.; BELINGIERI, P.A. Caracterização física e química de frutos maduros de pequi. In: CONGRESSO FRANCO, G. **Nutrição**: texto básico e tabela de composição química de alimentos. \_\_\_\_\_. In: Composição química dos alimentos e valor energético. 6.ed. In. Rio de Janeiro: Atheneu, 1982. p.180- 193.

FRESTA, M.; PUGLISI, G.; GIAMMONA, G.; CAVALLARO, G.; MICALI, N.; FURNERI, P. M. Pefloxacin mesilate and ofloxacin loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles: characterizations of the colloidal drug carrier formulation. *J. Pharm. Sci.* v. 84, p. 895 – 90, 1995.

KARAKAYA, S. Bioavailability of phenolic compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.44, n.6, p.453-464, 2004.

KLOPFENSTEIN, W. E. On methylation of unsaturated acids using boron trihalide-methanol reagents. *Journal Lipid Research*, v. 12, p. 773-776, 1971.

KYNGMI, M, S.; EBELER, E. Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p. 96-104, 2008.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-PH.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* v. 55, p. 1-4, 1989.

GOTO, P L. Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas por polimerização in situ a partir de nanoemulsões produzidas por inversão de fases [manuscrito]. 2011. 108 f. Dissertação (Mestrado), Programa de

Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto, 2011.

GUTERRES S. S.; FESSI H.; BARRATT G.; DEVISSAGUET J. P.; PUISIEUX F. Poly (DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. *International Journal of Pharmaceutical*, Amsterdam. v.113, p. 57–63, 1995.

GREEN, B. A., YU, R. J. & VAN SCOTT, E. J. Clinical and cosmeceutical uses of hydroxyacids. *Clin Dermatol.* v. 27, p. 495- 501, 2009.

HATANAKA, E.; CURI, R. Fatty acids and wound healing: a review. *Revista Brasileira de Farmácia*, v.88, n.2, p.53-58, 2007.

HERZOG-SOARES, J. D.; ALVES, R. K.; ISAC, E.; BEZERRA, J. C. B.; GOMES, M. H.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H. Atividade tripanocida *in vivo* de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.12, p.1-2, 2002. Suplemento.

HIANE, P. A.; PENTEADO, M.V. C.; ADOLATO. E. Teores de ácidos graxos e composição centesimal do fruto e da farinha da bocaiúva (*Acrocomia mokayayba* Barb. Robr.). *Alimentos e Nutrição*. São Paulo, v.2, n.1, p. 21-26, 1990.

HOELLER, S.; SPERGER, A.; VALENTA, C. Lecithin based nanoemulsions: A comparative study of the influence of non-ionic surfactants and the cationic phytosphingosine on physicochemical behaviour and skin permeation. *International Journal of Pharmaceutics*. *Int. J. Pharm.* v. 370, n.1, p. 181- 186, 2009.

HOLLAND, R. D.; WILKES, J. G.; RAFII, F.; SUTHERLAND, J. B.; PERSONS, C. C.; VOORHEES, K. J.; LAYJR., J. O. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrixassisted laser

desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v.10, p.1227–1232, 2006.

JIMÉNEZ, M.M., PELLETIER, J., BOBIN, M.F. AND MARTINI, M.C. Poly-epsilon-caprolactone nanocapsules containing octyl methoxycinnamate: preparation and characterization. *Int. J. Pharm.*, v. 272, p. 45–55, 2004.

KULKAMP, I.; PAESE, K; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Estabilização do ácido lipoico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 32, n. 8, 2009 .

LAMBERT, G.; FATTAL, E.; PINTO-ALPHANDARY, H.; GULIK, A.; COUVREUR P.; Polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules containing an aqueous core as a novel colloidal carrier for the delivery of oligonucleotides. *Pharm.Res.*,v. 17, p.707- 714, 2000.

LANGER, R. Drug delivery and targeting. *Nature*, v. 392, p. 5-10, 1998.

LARA, V.C.D., Desenvolvimento de nanocápsulas contendo ácido retinóico para tratamento tópico da acne. 2008. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais. 2008.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. *An. Bras. Dermatol.*, v.77, n.5, p.563-569, 2002.

LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J-Ph.; S.T.P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: A review. *Pharma Sci.*, v. 9, p. 411 418, 1999.

LEGRAND, P.; LESIEUR, S.; BOCHOT, A.; GREF, R.; RAATJES, W.; BARRATT, G.; VAUTHIER, C. Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. *Int. J. Pharm.*, v. 344, p. 33, 2007.

LIMA, A.; SILVA, A. M.O.; TRINDADE, R. A.; TORRES, R. P.; MANCINI-FILHO, J. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa de pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal*, v. 29, n. 3, p. 695-698, 2007.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. (2002). High-performance liquid chromatography of fatty acids in biological samples. *Analytica Chimica Acta*, 465, 81-91.

LIMA, M.T. Caracterização química e física do fruto do pequizeiro, *caryocar cariaceum* Wittm. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1980, 61p.

LOSA, C.; MARCHAL-HEUSSLER, L.; ORALLO, F.; VILA JATO, J. L.; ALONSO, M. J.; Design of new formulations for topical ocular administration: Polymeric nanocapsules containing metipranolol. *Pharm. Res.* v. 10, p. 80- 87, 1993.

MARTINS, D.; FRUNGILLO, L.; ANAZZETTI, M. C.; MELO, P. S. & DURAN, N. Antitumoral activity of L-ascorbic acid-poly-D,L-(lactide-co-glycolide) nanoparticles containing violacein - *Int. J. Nanomedicine*, v. 5, p. 77-85, 2010.

MASMOUDI, H.; LE DRÉAU, Y.; PICCERELLE, P.; KISTER, J. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. *Int. J. Pharm.*, v.289, n.1/2, p.117-131, 2005.

MAGENHEIM, B.; BENITA, S.; S.T.P. Nanoparticles characterization. A comprehensive physicochemical approach. *Pharma Sci.* v. 1, p. 221- 241, 1991.

MARCHAL-HEUSSLER, L.; MAICENT, P.; HOFFMAN, M.; SPITTLER, J.; COUVREUR, P. Antiglaucomatous activity of betaxolol chlorhydrate sorbed onto different isobutylcyanoacrylate nanoparticle preparation. *Int. J. Pharm.*, v. 58, p. 115. 1990.

MANACH, C.; DONOVAN, J. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radical Research*, v.38, n.8, p.771-785, 2004.

MIRANDA-VILELA, A.L.; RESCK, I.S.; GRISOLIA, C.K. Antigenotoxic activity and antioxidant properties of organic and aqueous extracts of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp. *Genetics and Molecular Biology*, v.31, p.956-963, 2008.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEITE, E. A.; BARROS, C. M.; VILELA J. M. C.; ANDRADE M. S. Polymeric nanostructures for drug delivery: characterization by atomic force microscopy. *Microscopy & Microanalysis*, v. 11, n.3, p. 36-39, 2005.

MOLPECERES, J.; ABERTURAS, M. R.; CHACON, M.; BERGES, L.; GUZMAN, M.; *J. Microencapsulation*, v. 14, p. 777, 1997.

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. *J. Pharm. Sci.* v. 89, p. 614- 626, 2000.

MULLER, Claudia Regina et al. Degradação e estabilização do diclofenaco em nanocápsulas poliméricas. *Quím. Nova*, v. 27, n. 4, 2004 .



MULLER, Claudia Regina et al .Degradação e estabilização do diclofenaco em nanocápsulas poliméricas. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 27, n. 4, Aug. 2004.

NAIR, L.S.; LAURENCIN, C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*, v. 32, p. 762 – 798, 2007.

NAKAZONE, P H. Desenvolvimento de formulações multifuncionais líquido cristalinas contendo nanopartículas de dióxido de titânio e alfa-tocoferol. Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de graduação em farmácia- bioquímica da faculdade de ciências farmacêuticas de araraquara, da universidade estadual paulista para obtenção do grau de farmacêutica- bioquímico. Araraquara, 2012.

NEVES, B.R.A., VILELA, J.M.C., ANDRADE, M.S. Microscopia de varredura por sonda mecânica: uma introdução. *Cerâmica*, v.44, n. 290, p. 212-219, 1998.

NIIZU, P.Y.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. New data on the carotenoid composition of raw salad vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, San Diego, v.18, n.8, p.739-749, 2004.

O'BRIEN, R. D. Fats and oils: formulating and processing for applications .London: Crc Press, 2. Ed, 2004. 592 p.

OLIVEIRA M. N. S.; GUSMÃO, E.; LOPES P. S. N.; SIMÕES M. O. M.; RIBEIRO, L. M.; DIAS, B. A. S. Estádio de maturação dos frutos e fatores relacionados aos aspectos nutritivos. *Rev. Bras. Frutic. Jaboticabal*, v. 28, n. 3, p. 380-386, 2006.

OLIVEIRA, K. A. K .B. de. Variabilidade genética entre e dentro de populações de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb). 1998. 92 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

OURIQUE, A. F.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. *Int. J. Pharm.* v.1, p 352, 2008.

OSIRO, D.; CALNAGO, L.A.; FILHO, R.B., JORGE, L.A.C. Uso siarcs na quantificação das dimensões de bactérias em imagens de microscopia de força atômica. Boletim de pesquisa. N 6/98, julho, 1998.

OZTURK, K.; CABAN, S.; KOZLU, S.; KADAYIFCI, E.; YERLIKAYA, F. & CAPAN, Y. The influence of technological parameters on the physicochemical properties of blank PLGA nanoparticles. *Pharmazie*, v. 65, p. 665 – 669, 2010.

PASSOS, X.S.; SANTOS, S.C.; FERRI, P.H.; FERNANDES, O.F.L.; FREITAS PAULA, T.; GARCIA, A.C.F.; SILVA, M.R.R. Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.35, n.6, p.623-627, 2002.

PAULA-JUNIOR, W.; ROCHA, F.H.; DONATTI, L.; FADEL-PICHETH, C.M.T.; WEFFORT-SANTOS, A.M. Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* Cambess leave hydroethanolic extract. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.16, p.625-630, 2006.

PAESE. K. Desenvolvimento tecnológico, estudo de fotoestabilidade e avaliação da permeação cutânea in vitro da benzofenona-3 a partir de nanocápsulas poliméricas incorporadas em diferentes veículos semi-sólidos. Dissertação de mestrado.UFRGS, Curso de Pós Graduação, 2008.

PIANOVSKI, A.R.; VILELA, A.F.G.; SILVA, A.A.S.; LIMA, C.G.; SILVA, K.K.; CARVALHO, V.F.M.; MUSIS, C.R.; MACHADO, S.R.P.; FERRARI, M. Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliensis*) em emulsões cosméticas: de-

envolvimento e avaliação da estabilidade física. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.44, n.2, p.249-259, 2008.

PRANCE, G. T.; SILVA, M. F. Caryocaraceae: Flora Neotrópica. New York: Hafner. (Monografia, 12), 1973. 75p.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLÉMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 24, p. 1113- 1128, 1998.

RAMOS, M.I.L.; UMAKI, M.C.S.; HIANE, P.A.; RAMOS FILHO, M.M. Efeito do cozimento convencional sobre os carotenóides pró-vitamínicos "A" da polpa do piqui (*Caryocar brasiliense*). *Boletim CEPPA*, Curitiba, v.19, n.1, p.23-32, 2001.

ROMANCINI, R.M.; AQUINO, F.G. Aspectos da biologia reprodutiva do pequizeiro-anão (*Caryocar brasiliense* ssp. *intermedium* Camb., Caryocaraceae) em plantio experimental. In: ENCONTRO DE JOVENS TALENTOS DA EMBRAPA CERRADOS, 3., 2007, Planaltina, DF. *Resumo*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. p.49.

SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. Cerrado: ambiente e flora. Planaltina: Embrapa Cerrados, 1998. 556 p.

SANTOS, R. D..Produção enzimática de poli( $\epsilon$ -caprolactona) em dióxido de carbono supercrítico. 2011. 79.f. Dissertação de mestrado – Centro Tecnológico.Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, 2011.

SANTOS, E.P.; BARBOZA, J.C.S. Avaliação do uso de amidos aniônicos hidrolisados como estabilizantes em nanocápsulas poliméricas para formulações tópicas. *Polímeros Ciência e Tecnologia*, p.0, 2013.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; PONTES, A.; PEREIRA, V. M. W; CAETANO, M. N. P. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules. *Int. J. Pharm.*, v. 208, p. 71, 2000.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; DE LUCCA FREITAS, L; GUTERRES, S. S. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. *Acta Farm. Bonaerense*, v. 21, p. 99 - 106, 2002.

SCHAFFAZICK, Scheila R. et al .Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. *J. Braz. Chem. Soc.*, São Paulo, v. 17, n. 3, 2006 .

SCHMALTZ, C.; SANTOS, J.V.; GUTERRES, S.S. Nanocápsulas como uma tendência promissora na área cosmética: a imensa potencialidade deste pequeno grande recurso. *Infarma*, v.16, no 13-14, 2005.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; DALLA-COSTA, T. & GUTERRES, S. S. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* v. 56, n. 3, p. 501–505, 2003.

SEIJO, B.; FATTAL, E.; TREUPEL, L. R.; COUVREUR, P. Design of nanoparticles of less than 50 nm diameter: preparation, characterization and drug loading. *Int. J. Pharm.* n.62, v. 1, 1990.

SILVA, M.L., Obtenção de derivados químicos de produtos naturais empregando catálise convencional e enzimática. 2012. 202 f. Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química. Salvador. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

SILVA, J.A. da.; SILVA, D.B.da.; JUNUEIRA, N. T.V.; ANDRADE, L. R. M. de. Frutas nativas do cerrado. Planaltina: Embrapa Cerrados/Brasília: Embrapa – SPI, 1994. 166p.

SIUZDAK, G. The expanding role of mass spectrometry in biotechnology. 2. ed. San Diego: MCC Press, 2006. 257 p.

SINGH, J.; PANDIT, S.; BRAMWELL, V.W.; ALPAR, H.O. Diphtheria toxoid loaded poly-( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles as mucosal vaccine delivery systems. *Methods*, v. 38, p. 96 – 105, 2006.

SEVERINO, P., SANTANA, M. H.; MALMONGE, S.M.; SOUTO, E.B. Polímeros usados como sistemas de transporte de princípios ativos. *Polímeros*, v.21, n.5, p.361-368, 2011.

SOUZA, P M S; LOBO, F A; ROSA, A H; FRACETO L F. Desenvolvimento de nanocápsulas de poli- $\epsilon$ -caprolactona contendo o herbicida atrazina. *Quim. Nova*, v. 35, n. 1, p. 132-137, 2012.

TAHARA, K.; FURUKAWA, S.; YAMAMOTO, H. & KAWASHIMA Y. - *Int. J. Pharm.*, v.392, p. 311 (2010).

TANGO, J. S.; CARVALHO, C. R. L.; SOARES, N. B. Caracterização física e química de frutos de abacate visando a seu potencial para extração de óleo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 26, n. 1, p. 17-23, 2004.

VÁSQUEZ-OCMÍN, P. G.; ALVARADO, L. F.; SOLIS, V. S.; TORRES, R.P.; MANCINI-FILHO. J. Chemical characterization and oxidative stability of the oils from three morphotypes of *Mauritia fluxuosa* L.f, from the Peruvian Amazon. *Grasas y Aceites*. Madrid, v.61, n.4, p. 390-397, 2010.

VIEIRA, F. A.; PACHECO, M. V.; LOPES; P. S. N. Método de Escarificação de Putâmens de *Caryocar brasiliense* Camb. *Revista Científica Eletrônica de Agronomia*. Ano IV, número 08, Garça/FAEF, 2005.

VIEIRA, R.F.; MARTINS, M.V.M. Recursos genéticos de plantas medicinais do cerrado. Uma compilação de dados. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.3, n.1, p.13-36, 2000.

VILA, A.; SÁNCHEZ, A.; TOBÍO, M.; CALVO, P.; ALONSO, M. J. Design of biodegradable particles for protein delivery. *J. Controlled Release*. v.78, p.15-24, 2002.

WHEATLEY, M. A. & LEWANDOWSKI, J. Hybrid-modified poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres for a novel cellular drug delivery system. *Mol. Imaging*. v. 9, p. 96, 2010,

WANG, J.; LIU, W.; TU, Q.; SONG, N.; ZHANG, Y. & NIE, N. - *Biomacromolecules*, v.10, p. 228 (2010).

YU, W.; TABOSA DO EGITO, E. S.; BARRATT, G.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J- PH.; LOSA, C.; MARCHAL-HEUSSLER, L.; ORALLO, F.; VILA JATO, J. L.; ALONSO, M. J.; *Pharm. Res.* 1993, 10, 80, Puisieux, F.; *Int. J. Pharm.*, v. 89, p. 139, 1993.