

Larissa Probst dos Santos

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS
CONTENDO EXTRATO PADRONIZADO DE *Ilex paraguariensis*
A. St.-Hil. VISANDO À OBTENÇÃO DE PRODUTO
FITOTERÁPICO TÓPICO COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia.
Orientador: Prof^a. Dr^a. Angela Machado de Campos

Florianópolis
2016

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

Santos, Larissa Probst dos

Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados contendo extrato padronizado de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. visando à obtenção de produto fitoterápico tópico com atividade antioxidante / Larissa Probst dos Santos ; orientadora, Angela Machado de Campos - Florianópolis, SC, 2016.

109 p.

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

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Nanotecnologia. 3. Sistemas nanoestruturados. 4. *Ilex paraguariensis*. I. Campos, Angela Machado de. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Larissa Probst dos Santos

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS
CONTENDO EXTRATO PADRONIZADO DE *Ilex paraguariensis*
A. St.-Hil. VISANDO À OBTENÇÃO DE PRODUTO
FITOTERÁPICO TÓPICO COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Farmácia e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Farmácia.

Florianópolis, 18 de março de 2016.

Prof.^a Dr.^a Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Farmácia

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Angela Machado de Campos
Orientadora - Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Cláudia Maria Oliveira Simões
Membro Titular - Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Simone Gonçalves Cardoso
Membro Titular - Universidade Federal de Santa Catarina

Dr.^a Letícia Mazzarino
Membro Titular - Universidade Federal de Santa Catarina

Á minha família, em especial aos meus pais, pelo constante incentivo à busca do conhecimento.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela saúde que me torna capaz de alcançar meus sonhos.

Agradeço à minha família, meus pais Joanete e Márcio, meus irmãos Deyse e Victor, pela compreensão, compartilhamento, incentivo e apoio durante toda minha vida. Tenho muito orgulho de vocês. Assim como agradeço a todos os meus familiares pelo carinho.

Ao Thiago, meu companheiro de todas as horas, obrigada pelo carinho, paciência e por estar ao meu lado me incentivando em todos os momentos! Você fez a jornada ser muito mais fácil.

À Prof^ª. Angela, minha orientadora, por todo o apoio, dedicação, paciência, mesmo com tantos imprevistos, obrigada por compartilhar comigo uma etapa tão importante na minha vida.

Ao Prof. Dr. Thiago Caon pela colaboração e parceria. Obrigada por disponibilizar seu tempo e compartilhar conhecimentos durante os experimentos de permeação.

Agradeço ao Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto pela colaboração e estrutura laboratorial cedida.

À Prof^ª. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões por disponibilizar o equipamento de célula de difusão de Franz para os experimentos de permeação/retenção.

Aos amigos do Laboratório de Farmacotécnica Talitha, Gecioni, Thaisa, Jana, Mariana Dalagnol, Marta, Simone, Aline, Jonas, Samantha, Crislaine, Rosane, Diva, Elenara, Sandra, Nilson, por compartilharem as minhas alegrias e dificuldades durante a realização deste trabalho. Em especial ao André, Mari, Priscila, Georgia e Bárbara pelos momentos de descontração e boas risadas, além do apoio nas etapas mais difíceis.

Agradeço imensamente à Mari, pela paciência e por compartilhar sua experiência comigo. Seus ensinamentos foram essenciais para o cumprimento desse trabalho no prazo. Muito obrigada por tudo!

Aos colegas do Laboratório de Farmacognosia, em especial ao Carlos e a Carol, pela colaboração e incentivo durante o trabalho.

Às minhas amigas, Moni, Ste, Joi e Fê pela companhia desde o início da faculdade, pelas risadas e apoio em todos os momentos.

Aos meus colegas de trabalho Roni, Dirce, Lisi, Marco, Vladimir e Raquel. Obrigada pela risadas, paciência e compreensão nos momentos difíceis.

“Daqui a vinte anos, você não terá arrependimento das coisas que fez, mas das que deixou de fazer. Por isso, veleje longe do seu porto seguro. Pegue os ventos. Explore. Sonhe. Descubra.”

(Mark Twain)

RESUMO

Ilex paraguariensis A. St.-Hil. (mate) é uma planta nativa da região subtropical da América do Sul, sendo amplamente consumida, através da infusão das folhas. É uma planta rica em diferentes compostos biologicamente ativos, como os fenólicos, com destaque para o ácido clorogênico (ACG), que possui atividade antioxidante, mas pode sofrer degradação. Com a intenção de aumentar a estabilidade desse composto, nanopartículas poliméricas contendo extrato de suas folhas foram desenvolvidas pela técnica de dupla emulsão seguida de evaporação do solvente, para administração tópica, visando atividade antioxidante. Nanopartículas podem aumentar a retenção de compostos ativos na camada superficial da pele, atuando como um reservatório e prolongando a liberação. Um estudo de extração foi realizado, por turbo-extração, sendo estabelecidas as condições ótimas como 10% de material vegetal (m/v), etanol 20% (v/v), 5 min e 13500 rpm. O potencial antioxidante desse extrato foi avaliado, utilizando o radical livre DPPH, mostrando um valor de IC₅₀ satisfatório (51,70 µg/ml) quando comparado com o padrão de ácido gálico (11,83 µg/ml). Um estudo de formulação indicou como promissora formulações preparadas com polímero policaprolactona (PCL) (50 e 100 mg), poloxamer 188 (PLU) 1% como tensoativo, 200 µl de fase interna da primeira emulsão, que apresentaram tamanho de partícula de 134 a 194 nm, índice de polidispersão (PDI) de 0,076 a 0,113 e potencial zeta de -18,0 a -15,6 mV. Um segundo estudo de formulação demonstrou que formulações contendo 30 mg de extrato e 196 ml de volume na fase dispersante apresentaram, em relação ao ACG, uma eficiência de encapsulação (EE) de 38,4 e 41,0% e teor de 18,7 e 10,9%, para 50 ou 100 mg de PCL, respectivamente. A formulação contendo 100 mg de PCL apresentou melhor estabilidade ao final de 60 dias, sendo esta a escolhida para dar continuidade aos experimentos. Esta formulação apresentou uma liberação inicial *in vitro* de 75 % em tampão fosfato pH 5,5 mantendo-se constante até o final do experimento. O extrato livre permeou até a derme, enquanto que as nanopartículas ficaram retidas na epiderme, em estudo realizado em câmara de difusão de Franz utilizando pele de orelha de porco. As nanopartículas protegeram o extrato de degradação frente a homogeneizado de pele suína, que induziu a degradação do extrato livre, provavelmente por degradação enzimática.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. Ácido clorogênico. Nanotecnologia. Nanopartículas poliméricas. Administração tópica. Atividade antioxidante.

ABSTRACT

Development of nanostructured systems containing standardized extract of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. for topical delivery aiming antioxidant activity

Ilex paraguariensis A. St.-Hil. (mate) is a native plant of southern Latin American countries, being widely consumed as an herbal tea beverage made from leaf infusion. This herb is rich in many bioactive components, such as phenolic, especially chlorogenic acid (CGA), which has antioxidant activity, but this compound may suffer degradation. With the intent to increase the stability of this compound, polymeric nanoparticle delivery system was developed, by double emulsion solvent evaporation technique, for topical administration, targeting the antioxidant action of mate extract. Besides, nanoparticles could enhance the retention of compounds in superficial layers of the skin, acting as a reservoir for sustained release. Therefore, a study of the optimum conditions for extraction was performed, using shear extraction, where 10% of plant material (w/v), ethanol 20% (v/v), 5 min and 13500 rpm were selected. The antioxidant potential of this extract was evaluated using the DPPH free radical, pointing satisfactory IC₅₀ value (51.70 µg/ml) when compared to the standards of gallic acid (11.83 µg/ml). A pre-formulation study was performed and showed satisfactory composition as polycaprolactone (PCL) polymer (50 to 100 mg), poloxamer 188 (PLU) 1% as surfactant, 200 µl of internal phase of the first emulsion, with a particle size of 134 to 194 nm, polydispersity index (PDI) of 0.076 to 0.113 and zeta potential of -18.0 to -15.6 mV. Different parameters were evaluated, in relation to CGA, for entrapment efficiency (EE) and loading. The standardized formulations contains 30 mg of extract, 196 ml volume in the dispersing phase and 50 or 100 mg of PCL, with EE of 38.4 and 41.0% and loading of 18.7 and 10.9%, respectively. Subsequently, stability study showed that formulation with 100 mg of PCL has good stability in 60 days of the experiment. This formulation provided an initial *in vitro* release of 75%, in phosphate buffer pH 5.5, throughout the assay. The free extract permeated into the dermis, while the nanoparticles were retained in the epidermis, in a study performed in Franz diffusion chamber using pig ear skin. Nanoparticles protected the extract front degradation in pigskin homogenized, which induced degradation of free extract, probably by enzymatic degradation.

Keywords: *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. Chlorogenic acid. Ácido clorogênico. Nanotechnology. Polymeric nanoparticles. Topical delivery. Antioxidant activity.

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação (1).....	52
Equação (2).....	57
Equação (3).....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Detalhes das folhas, flores e frutos de <i>Ilex paraguariensis</i>	31
Figura 2. Estrutura química do ácido clorogênico.	37
Figura 3. Ilustração da técnica de preparação de nanopartículas poliméricas através do método de dupla emulsão por evaporação do solvente.	43
Figura 4. Representação de uma secção transversal de pele humana.	46
Figura 5. Rotas de permeação de nanopartículas através da pele humana.	48
Figura 6. Esquema da câmara de difusão tipo Franz.	49
Figura 7. Cromatograma típico do método por cromatografia líquida de alta eficiência para amostras de <i>Ilex paraguariensis</i> . (1) Ácido clorogênico com tempo de retenção de 20,5 minutos.	62
Figura 8. Esquema da técnica de turbo-extração usada para obtenção das soluções extrativas.	63
Figura 9. Gráfico obtido a partir do planejamento experimental analisando a variável velocidade de agitação (9500 e 13500 rpm) em relação ao resíduo seco (mg/ml) versus concentração de matéria-prima vegetal (% m/v).	67
Figura 10. Gráfico obtido a partir do planejamento experimental analisando a variável velocidade de agitação (9500 e 13500 rpm) em relação a concentração de ACG (mg/g) versus concentração de matéria-prima vegetal (% m/v).	68
Figura 11. Percentagem de eficiência de encapsulação e teor do marcador ácido clorogênico nas nanopartículas poliméricas. Para 20 mg de extrato = (A) 96 mL e (B) 196 mL usando 50mg de PCL; (C) 96 mL e (D) 196 mL usando 100 mg de PCL. Para 30 mg de extrato = (E) 96 mL e (F) 196 mL usando 50 mg de PLC; (G) 96 mL e (H) 196 mL usando 100 mg de PCL.	77
Figura 12. Fotos representativas do estudo de estabilidade durante 60 dias em relação aos parâmetros físicos a 4 e 25 °C. (BR) branca, sem extrato encapsulado; (BR+EXT) mistura física de nanopartículas brancas com extrato; (EXT) extrato seco padronizado em água; (F50) formulação com 50 mg de PCL; (F100) contendo 100 mg de polímero.	80
Figura 13. Gráficos de estabilidade das formulações no período de 60 dias na temperatura de 4 °C e 25 °C. (1) Tamanho médio de partícula a 4 °C; (2) Tamanho médio de partícula a 25 °C; (3) Índice de polidispersão a 4 °C; (4) Índice de polidispersão a 25 °C.	81
Figura 14. Gráficos de potencial zeta para avaliação da estabilidade das formulações no período de 60 dias à 4 °C e 25 °C. (1) 4 °C; (2) 25 °C.	83
Figura 15. Análise do pH das suspensões durante dos 60 dias para a avaliação da estabilidade.	84
Figura 16. Teor de ácido clorogênico nas amostras para a avaliação da estabilidade durante os 60 dias.	85
Figura 17. Cromatogramas representativos do estudo de estabilidade a 4 °C para o extrato aquoso. Tempos: (A) 0 e (B) 60 dias de experimento. Destaque: surgimento e aumento da área do pico com tempo de retenção de 25,8 min.	86
Figura 18. Espectro obtido usando detector ultravioleta por arranjo de diodos para (1) ACG e (2) novo pico.	87

Figura 19. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão para as nanopartículas poliméricas.	88
Figura 20. Perfil de liberação das nanopartículas otimizadas contendo extrato padronizado de <i>Ilex paraguariensis</i>	89
Figura 21. Perfil de permeação em pele de orelha suína do ácido clorogênico a partir do extrato seco padronizado em solução aquosa. Os dados são representados pela média \pm DP (n = 3).	91
Figura 22. Quantidade do ácido clorogênico do extrato seco padronizado em solução aquosa e da nanopartícula padronizada retidas na derme e epiderme e permeado no tempo de 12 (Q12) e 24 horas (Q24) em pele de orelha suína. Os dados são representados pela média \pm DP (n = 5).	92
Figura 23. Percentagem do ácido clorogênico ao longo de 24 horas de experimento.	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Revisão sobre atividade antioxidante de <i>Ilex paraguariensis</i>	35
Tabela 2. Planejamento fatorial para determinar os fatores que influenciam na obtenção da solução extrativa de <i>I. paraguariensis</i> . Os fatores avaliados foram (A) concentração de matéria-prima vegetal (2,5, 5,0 e 10,0%; m/v), (B) líquido extrator (água e etanol 20%; v/v), (C) tempo de extração (3, 5 e 10 minutos), (D) velocidade de agitação (9.500 e 13.500 rpm).	53
Tabela 3. Proporção de fase móvel para a análise em cromatografia líquida de alta eficiência.	54
Tabela 4. Composição das formulações para a obtenção de nanopartículas. (A) tipo e (B) concentração do tensoativo (% m/V), (C) tipo e (D) concentração do polímero (mg) e (E) volume de fase aquosa na primeira emulsão (µl)	55
Tabela 5. Formulações avaliadas no estudo de otimização da eficiência de encapsulação e teor de ácido clorogênico das nanopartículas poliméricas.	56
Tabela 6. Descrição das diferentes formulações utilizadas no estudo de estabilidade, sendo: (F50) formulação com 50 mg de PCL; (F100) contendo 100 mg de polímero; (BR) branca, sem extrato encapsulado; (BR+EXT) mistura física de nanopartículas brancas com extrato; (EXT) extrato seco padronizado em solução aquosa.	58
Tabela 7. Caracterização das frações folha e caule de <i>Ilex paraguariensis</i>	61
Tabela 8. Resultados de resíduo seco e teor do ácido clorogênico obtidos dos extratos a partir do planejamento experimental. Fatores analisados: (A) concentração de matéria-prima vegetal (% m/v), (B) líquido extrator (% v/v), (C) tempo de extração (min), (D) velocidade de agitação (rpm). Respostas: (RS) resíduo seco (mg/ml) e (ACG) teor de ácido clorogênico (mg/g).	65
Tabela 9. Caracterização físico-química das nanopartículas poliméricas quanto ao tamanho de partícula (nm), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (mV). Variáveis de formulação: (A) tipo e (B) concentração do tensoativo (% m/V), (C) tipo e (D) concentração do polímero (mg) e (E) volume da primeira emulsão (µl).	72
Tabela 10. Parâmetros físicos analisados no estudo de estabilidade durante 60 dias, nas temperaturas de 4 e 25 °C. (C = alteração de cor e S = sedimentação; (-) = ausência, (+) = pouca presença, (++) = moderada presença, (+++) = muita presença). (BR) branca, sem extrato encapsulado; (BR+EXT) mistura física de nanopartículas brancas com extrato; (EXT) extrato seco padronizado em solução aquosa; (F50) formulação com 50 mg de PCL; (F100) contendo 100 mg de polímero.	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACG	Ácido clorogênico
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
IC₅₀	Concentração necessária para reduzir em 50% o DPPH
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
DAD	Detector espectroscópico de arranjo de diodos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2- difenil-1-picril-hidrazila
EE	Eficiência de encapsulação
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ESP-<i>Ip</i>	Extrato seco padronizado contendo <i>Ilex paraguariensis</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FRAP	Capacidade de redução de ferro
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LCME	Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MPV	Matéria-prima vegetal
NP-<i>Ip</i>	Nanopartícula otimizada contendo extrato seco padronizado de <i>Ilex paraguariensis</i>
PCL	Poli (ϵ -caprolactona)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDI	Índice de polidispersão
PGFAR	Programa de Pós-graduação em Farmácia
pH	Potencial hidrogeniônico
PLA	Poliácido láctico
PLGA	Ácido poli láctico-co-glicólico
PLU	Pluronic® F68
PVA	Álcool polivinílico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TR	Tempo de Retenção
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UV	Ultravioleta
UV/Vis	Detector espectroscópico na região ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
1.1 OBJETIVOS	30
1.1.1 Objetivo Geral.....	30
1.1.2 Objetivos Específicos	30
2 REVISÃO DA LITERATURA	31
2.1 <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.....	31
2.1.1 Aspectos botânicos	31
2.1.2 Aspectos econômicos.....	32
2.1.3 Aspectos farmacológicos.....	32
2.1.4 Aspectos fitoquímicos	37
2.1.4.1 Ácido clorogênico.....	37
2.1.5 Aspectos tecnológicos.....	38
2.2 SISTEMAS NANOESTRUTURADOS	40
2.2.1 Nanopartículas poliméricas.....	41
2.2.2 Métodos de preparação das nanopartículas poliméricas.....	41
2.2.2.1 Emulsificação/Evaporação do solvente.....	41
2.2.2.2 Difusão do solvente/ Deposição interfacial do polímero/ Nanoprecipitação	43
2.2.2.3 <i>Salting-out</i>	43
2.2.3 Nanopartículas poliméricas para administração tópica	44
2.3 PELE.....	45
2.3.1 Fatores que influenciam a permeação de fármacos na pele	47
2.3.2 Permeação de nanopartículas através da pele.....	47
2.4 MODELO DE DIFUSÃO POR CÉLULA DE FRANZ	48
3 MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1 MATERIAIS	51
3.2 MÉTODOS	51
3.2.1 Aquisição da matéria-prima vegetal (MPV).....	51
3.2.2 Caracterização da matéria-prima vegetal	51

3.2.2.1 Perda por dessecação	51
3.2.2.2 Teor de extrativos	52
3.2.3 Preparação das soluções extrativas	52
3.2.4 Caracterização das soluções extrativas	53
3.2.4.1 Resíduo seco	53
3.2.4.2 Quantificação do ácido clorogênico por cromatografia líquida de alta eficiência	53
3.2.4.3 Determinação da atividade antioxidante total do extrato seco padronizado de <i>Ilex paraguariensis</i> pela captura do radical livre DPPH	54
3.2.5 Secagem do extrato	54
3.2.6 Estudo de formulação 1: obtenção das nanopartículas poliméricas... 54	54
3.2.7 Caracterização dos sistemas nanoestruturados poliméricos	56
3.2.7.1 Tamanho de partícula e índice de polidispersão (PDI)	56
3.2.7.2 Potencial zeta	56
3.2.8 Estudo de formulação 2: otimização das condições de preparação das nanopartículas	56
3.2.8.1 Determinação da eficiência de encapsulação (EE) e teor do ácido clorogênico nas nanopartículas	57
3.2.9 Estudo de estabilidade das nanopartículas	57
3.2.10 Avaliação da morfologia das nanopartículas..... 58	58
3.2.11 Avaliação da especificidade do método de cromatografia líquida de alta eficiência..... 58	58
3.2.12 Estudo de liberação <i>in vitro</i> do ácido clorogênico das nanopartículas poliméricas	59
3.2.13 Avaliação da permeação/retenção cutânea <i>ex vivo</i> das nanopartículas poliméricas em células de difusão de Franz	59
3.2.14 Estudo de degradação do ácido clorogênico usando células de difusão de Franz..... 60	60
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL	61

4.2. QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	62
4.3 ESTUDO DE PADRONIZAÇÃO DO PROCESSO EXTRATIVO.....	63
4.3.1 Determinação da atividade antioxidante total do extrato seco padronizado pela captura do radical livre DPPH	69
4.4 ESTUDO DE FORMULAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	70
4.5 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO E TEOR DE ÁCIDO CLOROGÊNICO NAS NANOPARTÍCULAS	75
4.6 ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS	78
4.7 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DAS NANOPARTÍCULAS.....	88
4.8 LIBERAÇÃO <i>in vitro</i> DO ÁCIDO CLOROGÊNICO A PARTIR DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	88
4.9 AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO/RETENÇÃO CUTÂNEA <i>ex vivo</i> DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS EM CÉLULAS DE DIFUSÃO DE FRANZ	90
4.10 AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO EM CÉLULAS DE DIFUSÃO DE FRANZ	92
5 CONCLUSÕES	95
6 REFERÊNCIAS	99

1 INTRODUÇÃO

O mate ou erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) é uma planta nativa da região subtropical da América do Sul e é amplamente consumida e industrializada no sul do Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai. Nesses países, a infusão ou decocção das folhas são utilizadas para a preparação de bebidas tradicionais como chimarrão e tererê (BRACESCO et al., 2011).

A erva-mate é uma planta composta de diferentes componentes biologicamente ativos, como fenólicos (ácido clorogênico, galocatequina, ácido gálico, rutina, quercetina), que representam a classe majoritária, metilxantinas (caféina e teobromina), saponinas, além de minerais, entre outros (BRACESCO et al., 2011; DE SOUZA et al., 2011; HECK; DE MEJIA, 2007; MURAKAMI et al., 2013).

Na etapa de beneficiamento, para a comercialização da planta visando à preparação do chimarrão, as folhas de *I. paraguariensis* são submetidas ao sapeco, que consiste na exposição rápida dos ramos a uma temperatura elevada (250 a 550 °C), gerada por uma fogueira, inativando as enzimas presentes na matéria-prima vegetal. Folhas sapecadas apresentam teores superiores de flavonoides totais e polifenóis quando comparadas às secas ao ar (ISOLABELLA et al., 2010).

Nos últimos anos, inúmeros estudos foram realizados para avaliar as propriedades farmacológicas da erva-mate, sendo já constatadas as atividades antiviral (LÜCKEMEYER et al., 2012), antiedematogênica (BRACESCO et al., 2011), antiobesidade (ARÇARI et al., 2013), antidiabética (PEREIRA et al., 2012), cicatrizante (ROMANA-SOUZA; PIRES; MONTE-ALTO-COSTA, 2015) e anti-inflamatória (PUANGPRAPHANT; DE MEJIA, 2009).

A atividade antioxidante da *I. paraguariensis* tem sido alvo de diversos estudos (DE MORAIS et al., 2009; ANESINI et al., 2012; VALERGA; RETA; LANARI, 2012; OH et al., 2013; SOUZA et al., 2015). O elevado efeito antioxidante do mate está correlacionado à alta concentração de polifenóis (BLUM-SILVA et al., 2015; SOUZA et al., 2015), principalmente de ácido clorogênico (BRACESCO et al., 2011; FILIP et al., 2001). Entretanto, esse composto pode sofrer degradação quando exposto ao calor, irradiação UV, pH e oxigênio (BAKOWSKA; KUCHARSKA; OSZMIANSKI, 2003). Com o intuito de aumentar a estabilidade do ácido clorogênico, sistemas nanoestruturados são uma opção promissora.

O uso de sistemas coloidais como uma estratégia para melhorar o perfil biofarmacêutico de fármacos e moléculas biologicamente ativas

vem sendo proposto com sucesso, devido às suas potencialidades terapêuticas. Moléculas biologicamente ativas podem ser incorporadas nestas nanoestruturas e, dessa forma, apresentarem modificações nas suas propriedades físicas, química e/ou biológicas quando veiculadas em sistemas convencionais, no que se refere à disponibilidade biológica, à modulação da liberação, à biodistribuição, à estabilização de compostos lábeis e ao direcionamento a sítios específicos (KÜCHLER et al., 2010; WEBER; ZIMMER; PARDEIKE, 2014). Mais especificamente, sistemas nanoestruturados permitem a maximização da ação farmacológica, graças à vetorização da ação do princípio ativo, proteção contra a degradação prematura da substância encapsulada no organismo, administração mais segura e com diminuição do número de doses, diminuição de problemas de formulação devido à solubilidade e a diminuição significativa da toxicidade e dos possíveis efeitos indesejados (IQBAL et al., 2015a; MISHRA; PATEL; TIWARI, 2010; POHLMANN et al., 2013).

Dentre os sistemas nanoestruturados existentes, as nanopartículas poliméricas apresentam um interesse crescente no desenvolvimento de produtos farmacêuticos (PINTO REIS et al., 2006; RIBEIRO et al., 2016; ZAMBAUX et al., 1998). Entre as técnicas de preparação destes sistemas, a de dupla emulsão, seguida de evaporação do solvente, é a mais usada para a encapsulação de compostos hidrofílicos (ADITYA et al., 2015; COHEN-SELA et al., 2009; MILADI et al., 2015), como por exemplo, o ácido clorogênico (BARROSO et al., 2014). Esse método consiste em emulsificar a solução aquosa contendo o composto hidrofílico e o tensoativo com a fase orgânica (polímero) formando uma emulsão primária a/o. Após, essa emulsão é dispersa em uma segunda fase aquosa com tensoativo, formando a dupla emulsão a/o/a (IQBAL et al., 2015a).

A administração tópica de fármacos é destinada para um efeito local. Dentre as vantagens desse sistema estão a eliminação da necessidade de terapias por via sistêmica, requerem menores doses para obter a ação esperada na pele, além de reduzirem os efeitos adversos sistêmicos (GOYAL et al., 2015). Além disso, nanopartículas podem aumentar o tempo de retenção na camada superficial da pele (epiderme) (WATKINSON et al., 2013; ZHANG et al., 2010), prolongando a liberação a partir desses sistemas.

Como o estresse oxidativo é um dos principais mecanismos de envelhecimento da pele e distúrbios dermatológicos, substâncias fenólicas podem ser úteis para tratar ou prevenir essas condições (SINGH; AGARWAL, 2009). Zhu e colaboradores (2015) desenvolveram nanopartículas poliméricas com o intuito de melhorar a retenção cutânea do flavonoide quercetina, pois esse apresenta elevada capacidade de

proteção contra efeitos deletérios causados por radiação UV. Como resultados, após a deposição das partículas no dorso de ratos e exposição à irradiação UVB, as alterações macroscópicas e histopatológicas na pele dos camundongos foram significativamente reduzidas na presença de quercetina encapsulada em nanopartículas, indicando que o carreador potencializa a ação da quercetina contra danos na pele causados pela radiação.

Portanto o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico contendo nanopartículas para uso tópico almejando o efeito antioxidante pode ser considerado promissor (KAUR; KAPILA; AGRAWAL, 2007).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar sistemas nanoestruturados visando à obtenção de um produto fitoterápico de uso tópico, com ação antioxidante, contendo extrato padronizado de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Preparar e caracterizar extratos de *Ilex paraguariensis* visando obter a máxima concentração em compostos fenólicos, principalmente ácido clorogênico;
- Quantificar o ácido clorogênico nas amostras utilizando metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Determinar o potencial antioxidante do extrato padronizado avaliando a capacidade de captação de radicais livres pelo método de DPPH;
- Realizar um estudo preliminar de formulação visando estabelecer as condições ideais de nanoencapsulação do extrato padronizado;
- Preparar e caracterizar o sistema nanoestruturado quanto à morfologia, tamanho de partícula, polidispersão e potencial zeta;
- Realizar estudo de formulação visando obter a máxima eficiência de encapsulação e teor do extrato nas nanopartículas utilizando CLAE;
- Avaliar a estabilidade física dos sistemas desenvolvidos em condições específicas de temperatura;
- Estudar a cinética de liberação *in vitro* dos marcadores químicos a partir das nanopartículas;
- Avaliar a capacidade de retenção e permeação *ex vivo* das nanopartículas em células de difusão de Franz utilizando pele de orelha de porco;
- Determinar a degradação do extrato e das nanopartículas em presença de homogeneizado de pele de orelha de porco utilizando células de difusão de Franz.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.

2.1.1 Aspectos botânicos

Ilex paraguariensis A. St.-Hil., família Aquifoliaceae, é uma árvore que possui característica perene dióica, alcançando cerca de oito a quinze metros de altura. As folhas possuem cerca de oito centímetros de comprimento e cinco centímetros de largura, de cor verde escuro, simples, inteiras, do tipo coriáceo, com bordos dentados, pouco profundos e base em forma de cunha (Figura 1). Os pecíolos têm até quinze milímetros de comprimento. O período de floração ocorre durante a primavera. Suas flores apresentam quatro pétalas brancas e pequenas, porém este número pode variar em algumas espécies tropicais ou sub-tropicais. Estas podem ser agrupadas em pequenos fascículos com até quinze flores, que aparecem na axila das folhas. A frutificação ocorre de março a junho e o fruto é caracterizado por uma baga-drupa globular de quatro a seis milímetros, geralmente de cor vermelha, contendo quatro a cinco sementes que darão origem a um novo arbusto (HECK; DE MEJIA, 2007; BERTÉ; RUCKER; HOFFMANN-RIBANI, 2011; BRACESCO et al., 2011).

Figura 1. Detalhes das folhas, flores e frutos de *Ilex paraguariensis*.



Fonte: Berté e colaboradores (2011).

2.1.2 Aspectos econômicos

Ilex paraguariensis, planta nativa da região subtropical da América do Sul (sul do Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai), é amplamente consumida nestes países para a preparação de bebidas tradicionais como chimarrão e tererê (HECK; DE MEJIA, 2007; BRACESCO et al., 2011).

Em relação ao consumo do mate, o Uruguai é o maior consumidor per capita (6-8 kg/pessoa/ano), seguido pela Argentina (5 kg/pessoa/ano). No Brasil, o consumo é acentuado na região Sul, sendo responsável por 70% da ingestão diária de chimarrão (BRACESCO et al., 2011).

No Brasil, em 2013, a maior produção da erva-mate nativa ocorreu no Paraná, com 73% da quantidade obtida no país (cerca de 344.594 toneladas) e os outros Estados foram Santa Catarina (21%), Rio Grande do Sul (6%) e Mato Grosso do Sul (IBGE, 2013).

2.1.3 Aspectos farmacológicos

Nos últimos anos, inúmeros estudos foram realizados para avaliar as propriedades farmacológicas da erva-mate, sendo já constatadas as atividades antiviral (LÜCKEMEYER et al., 2012), antiobesidade (ARÇARI et al., 2013), antidiabética (PEREIRA et al., 2012), cicatrizante (ROMANA-SOUZA; PIRES; MONTE-ALTO-COSTA, 2015), anti-inflamatória (PUANGPRAPHANT; DE MEJIA, 2009) e antioxidante (ANESINI et al., 2012).

Luckemeyer e colaboradores (2012) analisaram o efeito do extrato bruto de folhas de erva-mate contra o Herpes Simplex vírus (HSV) tipos 1 e 2. O extrato foi obtido por refluxo a 90 °C, durante 30 minutos, utilizando como líquido extrator uma solução hidroetanólica a 40% e sub-frações deste extrato foram obtidas a partir de fracionamento bioguiado. A atividade antiviral foi avaliada *in vitro* em duas cepas do vírus: HSV-1 e -2. Todas as amostras testadas mostraram atividade anti-herpética, porém, a fração enriquecida de acetato de etila foi a mais ativa (CI₅₀ = 188,7 e 264,7 µg/mL para os vírus tipos 1 e 2, respectivamente.) Esta fração exerceu atividade antiviral pela redução da infectividade viral, inibição da entrada do vírus nas células, na transmissão célula-célula do vírus, assim como pelos níveis de deficiência de proteínas ICP27, ICP4, gD e gE da cepa HSV-1. A análise por cromatografia em camada delgada constatou a presença de saponinas, rutina, ácidos cafeico e clorogênico. Os autores sugerem que estes compostos podem ter um efeito sinérgico e serem os responsáveis pela atividade antiviral.

Em relação ao efeito anti-adipogênico do extrato de mate e seus principais compostos bioativos (ácido clorogênico, quercetina e rutina), Arçari e colaboradores (2013) demonstraram seu potencial *in vitro* usando células 3T3-L1 e PCR e *in vivo* em ratos através do modelo de dieta com elevado teor de gordura. O extrato de mate foi preparado diariamente, solubilizando em água um pó instantâneo de mate, obtido comercialmente e administrado nos animais por gavagem. Os resultados demonstraram que houve diminuição da expressão dos genes que regulam a adipogênese, tais como Creb-1 e C/EBP α e inibem os Dlk1, GATA2, GATA3, Klf2, LRP5, Pparg2, Sfrp1, TCF7L2, Wnt10b, e Wnt3a. No geral, os animais submetidos a uma dieta rica em gordura e tratados com o extrato exibiram uma redução no peso corporal e de gordura epididimal.

Diferentes extratos foram avaliados em relação à homeostasia da glicose *in vivo*, de forma aguda, e em *in vitro*, de curta e longa duração (PEREIRA et al., 2012). Extratos foram produzidos por maceração das folhas de mate usando etanol 70% e, posteriormente, frações enriquecidas em diferentes solventes (diclorometano, ácido acético e butanol) foram obtidas. Além desses, também foram obtidos extratos por infusão de folhas verdes ou sapecadas. Os resultados mostraram que as frações e os extratos de ambas os tipos de folhas foram capazes de melhorar o teste oral de tolerância à glicose. As frações induziram a secreção de insulina, aumentaram o conteúdo de glicogênio hepático em comparação com ratos normais em jejum, além de inibirem a atividade *in vitro* das dissacaridases e reduzirem a glicação das proteínas por glicose ou frutose. Face a estes resultados, os autores concluíram que a erva-mate apresenta potencial anti-hiperglicêmico e é, provavelmente, fonte de vários compostos capazes de induzir hipoglicemia.

Puangpraphant e De Mejia (2009) investigaram o potencial anti-inflamatório do extrato bruto preparado por infusão das folhas de mate, um extrato bruto descafeinado e dos compostos isolados (ácidos clorogênico, ursólico e oleanólico, cafeína, quercetina e saponinas). Entre esses, a quercetina demonstrou o maior potencial inibidor da resposta inflamatória, medida pelo bloqueio da enzima COX-2 e óxido nítrico, em uma concentração dez vezes menor do que a utilizada dos outros compostos. A combinação de quercetina e saponinas resultou em uma ação sinérgica inibindo a produção de óxido nítrico e prostaglandina 2.

Romana-Souza, Pires e Monte-Alto-Costa (2015) demonstraram o efeito antioxidante e cicatrizante de extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* obtido pela solubilização de mate instantâneo em pó obtido comercialmente. Ratos submetidos a teste de estresse por rotação ingeriram, por gavagem, o extrato de mate diariamente até a eutanásia.

Uma lesão excisional foi produzida em cada animal e analisada após 4 ou 10 dias. Ainda, fibroblastos isolados de pele de ratos não estressados e tratados com água ou mate foram expostos a elevados níveis de epinefrina e a atividade dos fibroblastos foi avaliada. Análises histológicas, imunquímicas e bioquímicas indicaram que a suplementação de mate na dieta acelerou a cicatrização cutânea nos ratos cronicamente estressados pela redução da síntese de catecolaminas, normalizando a resposta inflamatória e diminuindo o dano oxidativo, melhorando a deposição de colágeno, a diferenciação miofibroblástica e a contração da ferida. Adicionalmente, o tratamento com erva-mate reverteu a redução da deposição de colágeno, o acúmulo de peróxidos de lipídios induzidos pela epinefrina, bem como promoveu o aumento na proliferação de células expostas a altos níveis de epinefrina.

A participação dos principais compostos bioativos (cafeína, ácidos cafeico e clorogênico e rutina) no efeito antioxidante de extratos obtidos por infusão de folhas verde e sapecadas de *Ilex paraguariensis* foi investigado por Anesini e colaboradores (2012), usando a determinação da capacidade de captação de radicais livres pelo método de DPPH e prevenção da peroxidação lipídica. Os resultados demonstraram que os ácidos cafeico e clorogênico e rutina isolados podem contribuir para a atividade antioxidante. A cafeína, por outro lado, age como um composto pró-oxidante através da peroxidação lipídica induzida pela ação do ácido linoleico. Os efeitos antagonistas antioxidante e pró-oxidante dos compostos isolados resultaram em um elevado potencial antioxidante dos extratos avaliados, com destaque para o extrato obtido de folhas verdes.

Como a atividade antioxidante é foco desse trabalho, uma revisão extensiva da literatura foi feita sobre esse tema (Tabela 1):

Tabela 1. Revisão sobre atividade antioxidante de *Ilex paraguariensis*.

Parte do vegetal	Modo de preparo dos extratos	Metodologia	Resultados	Referências
Produto comercial sapecado	Extrato aquoso	<i>In vivo</i> – oxidação de LDL, inibição de TBARS foram avaliados em plasma de humanos.	Os compostos antioxidantes do extrato parecem ter sido absorvidos e atingido uma quantidade suficiente no plasma para inibir a oxidação de LDL.	(GUGLIUCCI, 1996)
Folhas verdes ou sapecadas de diferentes espécies de <i>Ilex</i> spp.	Infusão de água quente a 5% (m/v)	<i>In vitro</i> – inibição do TBARS.	<i>Ilex paraguariensis</i> apresentou maior atividade, proporcional a concentração de derivados cafeólicos.	(FILIP et al., 2000)
Diferentes marcas de produtos comerciais sapecados	Infusão com água quente a 5% (m/v)	<i>In vitro</i> – peroxidação lipídica e membrana eritrocitária, regeneração do radical superóxido, hidroxila e DPPH.	O extrato apenas não apresentou atividade na regeneração do radical hidroxila. De modo geral, os extratos podem aumentar a defesa dos organismos contra a ação dos radicais livres.	(SCHINELLA et al., 2000)
Produto comercial sapecado	Infusão com água quente a 5% (m/v)	<i>In vitro</i> – oxidação da LDL, inibição do TBARS, redução do radical DPPH, dano ao DNA.	Diminuição do dano ao DNA, inibição da oxidação do LDL, TBARS e redução do DPPH.	(BRACESCO et al., 2003)

Produto comercial sapecado	Infusão com água quente a 1% (m/v)	<i>In vitro</i> – atividade da redutase de quinona e índice ORAC	O extrato apresentou alta capacidade antioxidante por ORAC e pouca redução de atividade da quinona.	(CHANDRA; DE MEJIA, 2004)
Produto comercial sapecado	Infusão com água quente a 2% (m/v) e fração fenólica com acetona, DMF, etanol e metanol (50, 80 e 100%)	<i>In vitro</i> – redução do radical livre DPPH	50% de acetona extraiu mais compostos polifenólicos. Quanto mais fenólicos, maior foi a atividade antioxidante observada.	(TURKMEN; SARI; VELIOGLU, 2006)
Folhas verdes	Infusão com água quente a 10% (m/v)	<i>In vitro</i> – redução do radical DPPH e hidroxila, oxidação de LDL, teste de FRAP e TBARS foram realizados em tecido de coração de ratos.	O extrato protegeu o miocárdio contra lesão de isquemia-reperfusão e atenua os danos causados pela oxidação.	(SCHINELLA et al., 2009)
Frutos maduros	Maceração com água ou etanol 70% a 1% (m/v)	<i>In vitro</i> – DPPH <i>In vivo</i> – testes bioquímicos (ALT, colesterol, glicose, ureia, triglicérides) em amostras de sangue de ratos.	Extratos de etanol apresentaram maior concentração de antocianinas e compostos fenólicos e melhor inibição da DPPH. Os ratos tiveram melhora nos parâmetros bioquímicos testados.	(FERNANDES et al., 2016)

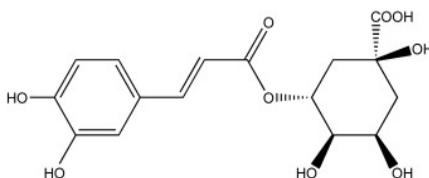
2.1.4 Aspectos fitoquímicos

A erva-mate é uma planta rica em diferentes substâncias biologicamente ativos, como compostos fenólicos (ácido clorogênico, galocatequina, ácido gálico, rutina, quercetina), os quais representam a classe majoritária, metilxantinas (cafeína e teobromina), além de saponinas, minerais, entre outros (HECK; DE MEJIA, 2007; BRACESCO et al., 2011; DE SOUZA et al., 2011; MURAKAMI et al., 2013). O ácido clorogênico, por ser um dos responsáveis pela atividade antioxidante da erva-mate e um dos seus compostos majoritários, será usado como marcador químico no presente estudo, com finalidade de ser um controle de qualidade do extrato.

2.1.4.1 Ácido clorogênico

O ácido clorogênico é um dos compostos majoritários de *Ilex paraguariensis* (FILIP et al., 2001; NEGRÃO MURAKAMI et al., 2011), representando cerca de 42% de todos os componentes orgânicos da planta (BRACESCO et al., 2011). O ácido clorogênico é um éster formado pelo ácido quínico e um ácido trans-cinâmico, comumente o cafeico (Figura 2) (JAISWAL et al., 2010; BRACESCO et al., 2011).

Figura 2. Estrutura química do ácido clorogênico.



O efeito antioxidante do ácido clorogênico foi investigado por Bagdas e colaboradores (2015) por meio da avaliação de sua capacidade de cicatrização de feridas crônicas em ratos diabéticos. O composto foi administrado por via intraperitoneal em doses de 50mg/kg/dia. Ao final do experimento, os autores sugeriram um efeito benéfico do ácido clorogênico administrado por via sistêmica na cicatrização das feridas, além reduzir os níveis de peroxidação lipídica em órgãos vitais como rins, fígado, coração, músculo esquelético, bem como medula óssea. No grupo cujo tratamento foi prolongado se observou uma diminuição nos níveis de glicemia, porém efeitos colaterais indicaram a incidência de cito/genotoxicidade.

Chen e colaboradores (2013) avaliaram os efeitos terapêuticos tópicos de uma pomada com ácido clorogênico e uma comercial com sulfadiazina de prata 1%. O experimento foi realizado *in vivo* usando modelo animal com ratos. Uma excisão foi realizada no dorso dos animais e tratados com as diferentes pomadas durante 15 dias. A pomada com ácido clorogênico apresentou potente cicatrização da excisão, semelhante à sulfadiazina de prata, com evidente contração da ferida e aumento da síntese de colágeno. Os resultados indicam que o ácido clorogênico possui atividade antioxidante por meio do aumento da superóxido dismutase, catalase e glutatona, diminuição da peroxidação lipídica. Por isso, os resultados demonstram que a aplicação tópica do ácido clorogênico pode acelerar a cicatrização das feridas quando comparadas com a sulfadiazina de prata.

A aplicação tópica de compostos antioxidantes pode ser útil devido ao direcionamento da ação no local de proteção. Entretanto, vários obstáculos devem ser superados. Por serem compostos instáveis, que permitem a reação redox, podem apresentar baixa estabilidade dificultando a obtenção de um produto farmacêutico (PINNELL, 2003). Especificamente, o ácido clorogênico pode sofrer degradação quando exposto ao calor, irradiação UV, pH e oxigênio (BAKOWSKA; KUCHARSKA; OSZMIANŃSKI, 2003).

Considerando ser o ácido clorogênico um dos compostos majoritários e um dos responsáveis pela atividade antioxidante do extrato de *Ilex paraguariensis*, o desenvolvimento de produtos tecnológicos que possam conferir proteção contra a degradação química desse composto e dos produtos extrativos deste vegetal parece ser uma estratégia interessante.

2.1.5 Aspectos tecnológicos

Considerando que as inúmeras atividades biológicas descritas para *Ilex paraguariensis* (PUANGPRAPHANT; DE MEJIA, 2009; ANESINI et al., 2012; LÜCKEMEYER et al., 2012; PEREIRA et al., 2012; ARÇARI et al., 2013; ROMANA-SOUZA; PIRES; MONTE-ALTO-COSTA, 2015) sejam consequência da concentração dos seus metabólitos secundários, a produção tecnológica de derivados deste vegetal se torna promissora. O objetivo pode ser aumentar a concentração de constituintes químicos, protege-los frente à degradação físico-química, bem como melhorar as características biofarmacêuticas. Inclusive, já existem alguns estudos relatando a obtenção de produtos tecnológicos a partir da erva-

mate (DA SILVA, 2007; DELADINO et al., 2008; HARRIS et al., 2011; NUNES et al., 2014).

Da Silva (2007) desenvolveu produtos secos por *spray-drying* a partir de solução extrativa aquosa obtida por decocção de erva-mate e de frações polifenólicas. Os produtos secos continham diferentes adjuvantes, como Aerosil® 200, Avicel® e Glucidex®, variando sua concentração entre 15 e 30%. O produto contendo 30% de Aerosil® apresentou as melhores características tecnológicas e de estabilidade frente à fotodegradação. Os produtos secos e as frações apresentaram atividade antioxidante *in vitro* (TRAP, TBARS) e *ex vivo* (modelo de estresse oxidativo com secções de fígado de ratos) de maneira dose-dependente. No modelo *in vivo*, o produto com 30% de Aerosil® foi administrado via oral em ratos e resultou em redução no dano hepático devido a menores níveis de lipoperoxidação e maior atividade das enzimas superóxido desmutase e catalase. Portanto, o desenvolvimento tecnológico de produtos secos de erva-mate e as frações purificadas apresentaram atividade antioxidante.

Deladino e colaboradores (2008) prepararam *beads* (grânulos) a partir do extrato aquoso liofilizado de erva-mate com alginato de cálcio e este complexado com quitosana. Os grânulos preparados foram secos em temperatura ambiente (20 °C, 65% de umidade relativa do ar), em estufa (85 °C, por 24 horas) ou liofilizados. Análises realizadas por microscopia e espectroscopia de infravermelho permitiram observar a formação do complexo alginato-quitosana. Os métodos de secagem influenciaram principalmente na porosidade dos grânulos; grânulos extremamente porosos foram obtidos por liofilização, permitindo a liberação do extrato durante a formação dos grânulos, mas resultando em uma baixa eficiência de encapsulação. Os grânulos revestidos com quitosana apresentaram uma eficiência de encapsulação menor (50%) quando comparados com apenas alginato (85%), mas o controle na liberação dos polifenóis mostrou-se dependente da presença da quitosana.

Microcápsulas contendo extrato aquoso de erva-mate concentrado foram preparadas pela técnica de secagem por aspersão (*spray-drying*) usando diferentes concentrações de maltodextrina (20, 30 e 40%) (NUNES et al., 2014). Propriedades como atividade antioxidante, eficiência de encapsulação, morfologia, tamanho de partícula, teor de umidade, dissolução, higroscopicidade, cor e propriedades térmicas das microcápsulas obtidas foram investigadas. As formulações contendo maiores concentrações de maltodextrina apresentaram uma maior capacidade de encapsulação, maior tamanho de partícula, menor higroscopicidade e apresentando um maior tempo de dissolução em água.

Os autores concluíram que a presença da maltodextrina nas microcápsulas resultou em uma maior retenção do extrato e um aumento na estabilidade das microcápsulas durante o período avaliado de 45 dias.

Harris e colaboradores (2011) encapsularam erva-mate em nanopartículas e microesferas revestidas com quitosana. As nanopartículas foram preparadas pelo método de gelificação iônica de tripolifosfato de sódio, quitosana e os componentes ativos. Já as microesferas foram obtidas pelo método de secagem em *spray-drying*, na qual a quitosana foi misturada com os antioxidantes do mate. O estudo de liberação *in vitro* dos polifenóis a partir das microesferas pela técnica de diálise em pH 6,5 evidenciou que estes sistemas permitiram controlar a liberação dos antioxidantes da planta. Por outro lado, as nanopartículas não foram capazes de exercer o controle da liberação, mas os autores sugerem que estes sistemas poderiam contribuir na manutenção da estabilidade dos compostos ativos, sendo necessários mais estudos para isto.

2.2 SISTEMAS NANOESTRUTURADOS

O uso de sistemas coloidais como uma estratégia para melhorar o perfil biofarmacêutico de fármacos vem sendo proposto com sucesso, devido às suas potencialidades terapêuticas. Moléculas biologicamente ativas podem ser incorporadas nestas nanoestruturas e, dessa forma, apresentarem modificações nas suas propriedades físicas, químicas e/ou biológicas de quando veiculadas em sistemas convencionais, no que se refere à disponibilidade biológica, à modulação da liberação, à biodistribuição, à estabilização de compostos lábeis e ao direcionamento a sítios específicos (KÜCHLER et al., 2010; WEBER; ZIMMER; PARDEIKE, 2014). Mais especificamente, sistemas nanoestruturados permitem a maximização da ação farmacológica graças à vetorização da ação do princípio ativo, proteção contra a degradação prematura do fármaco no organismo, administração mais segura e com diminuição do número de doses, diminuição de problemas de formulação devido à solubilidade do fármaco e a diminuição significativa da toxicidade do fármaco e dos possíveis efeitos indesejados (MISHRA; PATEL; TIWARI, 2010; POHLMANN et al., 2013; IQBAL et al., 2015a).

As nanopartículas podem ser preparadas com diferentes materiais como proteínas, polissacarídeos, polímeros e lipídios. A escolha do material e da técnica de preparação das partículas dependem de fatores como tamanho de partícula ideal, solubilidade e estabilidade aquosa das substâncias ativas, características de superfície da partícula,

biocompatibilidade e toxicidade do material e perfil de liberação desejado para o fármaco (MOHANRAJ; CHEN, 2006).

2.2.1 Nanopartículas poliméricas

Os métodos de preparação de nanopartículas poliméricas podem ser classificados com base em (i) polimerização de monômeros ou (ii) dispersão de polímeros pré-formados (SCHAFFAZICK et al., 2003). A técnica de polimerização de monômeros apresenta algumas desvantagens, como a presença de resíduos tóxicos decorrentes da reação química e limitações para controlar o peso molecular do polímero formado, além da possibilidade de inativação dos compostos ativos como resultado de reações cruzadas (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998). Dentre os polímeros pré-formados utilizados destacam-se o poli ácido láctico (PLA), o poli ácido láctico-co-glicólico (PLGA) e a poli- ϵ -caprolactona (PCL) (IQBAL et al., 2015a). Estes são polímeros biodegradáveis com habilidade em serem reabsorvidos pelo organismo, além de poliésteres dos ácidos láctico e glicólico serem aprovados pelo FDA para uso humano (AMASS; AMASS; TIGHE, 1998). Os sistemas nanoestruturados obtidos a partir de polímeros sintéticos apresentam um interesse crescente no desenvolvimento de produtos farmacêuticos (ZAMBAUX et al., 1998; PINTO REIS et al., 2006; RIBEIRO et al., 2016).

2.2.2 Métodos de preparação das nanopartículas poliméricas

As principais características físico-químicas dos sistemas coloidais, como tamanho, morfologia e polidispersão, entre outras, são afetadas pela técnica utilizada na produção de nanopartículas. Além da metodologia, as características dos materiais usados como massa molecular do polímero, concentração dos compostos ativos e dos tensoativos também podem influenciar na capacidade de encapsulação e liberação do sistema desenvolvido (ASTETE; SABLIOV, 2006).

Os principais métodos que utilizam polímeros pré-formados são: evaporação do solvente, difusão do solvente/nanoprecipitação e *salting-out* (ASTETE; SABLIOV, 2006; PINTO REIS et al., 2006; RAO; GECKELER, 2011).

2.2.2.1 Emulsificação/Evaporação do solvente

Este é o método mais antigo utilizado para a formação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados

(BLANCO; ALONSO, 1997; ZAMBAUX et al., 1998; HAN et al., 2001). Sucintamente, baseia-se na formação de emulsões nas quais uma fase orgânica contém um polímero hidrofóbico. Estas emulsões são submetidas a agitação vigorosa com elevado cisalhamento, normalmente por ultrassom ou agitação à alta pressão, com o intuito de obter gotículas de dimensões coloidais. A seguir, o solvente orgânico é evaporado sob pressão reduzida, ocorrendo a precipitação do polímero com a consequente formação das nanopartículas.

As técnicas baseadas na emulsificação/evaporação do solvente são consideradas simples e apresentam alto consumo de energia, devido à necessidade de elevada força de cisalhamento. O tamanho final das nanopartículas geralmente é afetado pela adição do fármaco e a técnica de dupla emulsão é adequada para encapsulação de compostos hidrofílicos (PINTO REIS et al., 2006).

Nanopartículas podem ser obtidas por este método a partir de emulsões simples ou dupla (PINTO REIS et al., 2006).

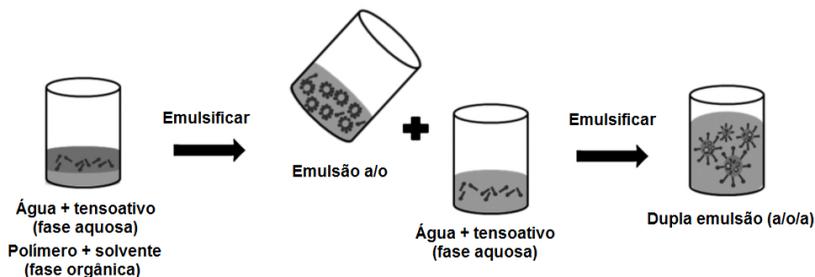
Emulsão simples

O polímero é dissolvido em um solvente orgânico imiscível com a água e o fármaco é adicionado a esta solução. Esta mistura é vertida sobre uma fase aquosa estabilizada com um tensoativo, formando uma emulsão óleo em água (o/a). Esta emulsão é submetida a cisalhamento e posteriormente à evaporação, sob pressão reduzida, para formação das nanopartículas (SOPPIMATH et al., 2001).

Dupla emulsão

Este método, que vem sendo utilizado com sucesso para a encapsulação de substâncias hidrofílicas, consiste em emulsificar uma solução aquosa contendo o composto e o tensoativo com uma fase orgânica que contém o polímero, formando uma emulsão primária a/o. A seguir, esta emulsão é dispersa em uma segunda fase aquosa contendo tensoativo, formando a dupla emulsão a/o/a. Da mesma maneira que a técnica baseada em emulsões simples, a dupla emulsão é exposta à agitação com elevado cisalhamento para garantir a redução do tamanho das gotículas a dimensões coloidais. A remoção do solvente por evaporação sob pressão reduzida induz a solidificação do polímero e a formação das nanopartículas (Figura 3) (RAO; GECKELER, 2011; IQBAL et al., 2015a).

Figura 3. Ilustração da técnica de preparação de nanopartículas poliméricas através do método de dupla emulsão por evaporação do solvente.



Fonte: Adaptado de Rao e Geckeler (2011).

2.2.2.2 Difusão do solvente/ Deposição interfacial do polímero/ Nanoprecipitação

O polímero e os compostos ativos são dissolvidos em solvente orgânico polar miscível em água (acetona, etanol, metanol). Esta solução orgânica é então vertida de forma lenta e gradual sobre uma fase aquosa estabilizada por um tensoativo. As nanopartículas se formam instantaneamente pela rápida difusão do solvente, que será posteriormente evaporado sob pressão reduzida (ASTETE; SABLIOV, 2006; PINTO REIS et al., 2006; RAO; GECKELER, 2011).

As vantagens da técnica de nanoprecipitação são o uso de solvente de baixa toxicidade e o reduzido consumo de energia, pois é necessária apenas agitação magnética para formação das partículas. A principal desvantagem desta técnica é a necessidade do fármaco ser solúvel no solvente orgânico e pouco em água, para aumentar a eficiência de encapsulação. Além disso, o tamanho das nanopartículas é influenciado pela concentração total do polímero utilizada (ASTETE; SABLIOV, 2006).

2.2.2.3 *Salting-out*

Este método pode ser considerado uma modificação da difusão do solvente. Resumidamente, o polímero é dissolvido na fase orgânica, que deve ser miscível com água (normalmente acetona), a seguir, é emulsificada em uma fase aquosa, sob agitação magnética. A fase aquosa contém tensoativo e uma elevada concentração de sais, que não são

solúveis na fase orgânica (cloreto de sódio, acetato de magnésio, cloreto de magnésio). A adição rápida de água à emulsão reduz a força iônica e conduz à migração do solvente orgânico para a fase aquosa, induzindo a formação de nanoesferas (ASTETE; SABLIOV, 2006; PINTO REIS et al., 2006; RAO; GECKELER, 2011).

Essa metodologia é considerada rápida e tem consumo de energia reduzido, pois requer apenas agitação magnética. Já as desvantagens são exigência de purificação para eliminação dos sais e é considerada uma técnica apropriada apenas para fármacos hidrofóbicos (ASTETE; SABLIOV, 2006).

2.2.3 Nanopartículas poliméricas para administração tópica

A utilização de nanopartículas oferece várias vantagens sobre outros sistemas de liberação de fármacos, tais como (i) melhorar a solubilidade de bioativos; (ii) proporcionar uma liberação controlada de fármacos encapsulados; (iii) aumentar a estabilidade dos componentes terapêuticos; (iv) fornecer maiores concentrações de fármaco no local de ação devido a uma melhor permeação e efeito de retenção; e (v) fornecer tratamentos vetorizados para a célula alvo quando o carreador estiver ligado com moléculas específicas (POHLMANN et al., 2013; GOYAL et al., 2015; IQBAL et al., 2015a).

A administração tópica de fármacos é destinada para um efeito local. Dentre as vantagens desse sistema estão a eliminação da necessidade de terapias por via sistêmica, uso de menores doses para obter a ação esperada na pele, além de redução dos efeitos adversos sistêmicos (GOYAL et al., 2015). Dentre as partículas com crescente interesse para o desenvolvimento de sistemas tópicos para a liberação de fármaco estão as nanopartículas poliméricas (DOMÍNGUEZ-VILLEGAS et al., 2014; ZHU et al., 2015).

Domínguez-Villegas e colaboradores (2014) desenvolveram nanopartículas poliméricas e nanoemulsões para uso tópico a partir de quatro flavanonas isoladas das folhas de *Eysenhardtia platycarpa* que apresentaram potente atividade anti-inflamatória. As nanopartículas de PLGA obtidas pelo método de nanoprecipitação apresentaram tamanho homogêneo de cerca de 200 nm, estabilidade baseada em potencial zeta elevado, além de alta eficiência de encapsulação e carga (*loading*). Estudos de liberação *in vitro* e permeação *ex vivo* foram realizados em células de difusão de Franz. Todos os sistemas exerceram controle sobre a liberação e promoveram um aumento da permeação cutânea das flavanonas quando comparados a uma solução das mesmas. Da mesma

maneira, a atividade anti-inflamatória das flavanonas, avaliada em modelo de indução de edema em orelha de camundongo, foi significativamente aumentada por sua inclusão nos sistemas nanoestruturados, resultando em redução significativa da inflamação.

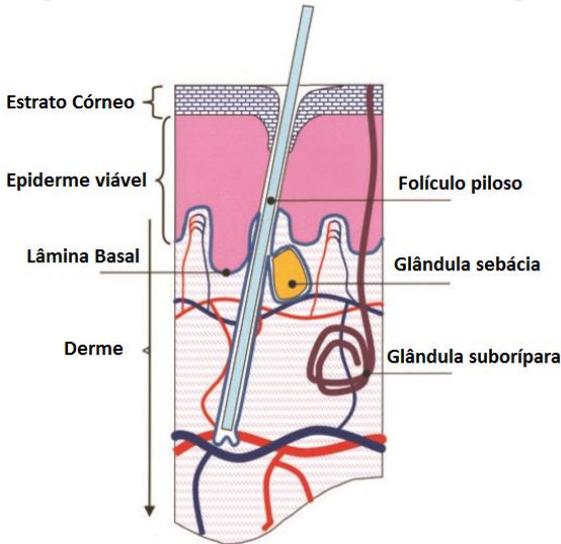
Com o intuito de melhorar a permeação cutânea da quercetina, flavonoide que apresenta elevada capacidade de proteção contra efeitos deletérios causados por radiação UV, mas também dificuldade de absorção devido à sua elevada hidrofobicidade, Zhu e colaboradores (2015) desenvolveram nanopartículas poliméricas utilizando como material polimérico o PLGA-TPGS (TPGS: succinato de D- α -tocoferil-poletilenoglicol 1000). Quercetina livre, encapsulada e nanopartículas brancas foram depositados no dorso de ratos cuja pele foi removida e, a seguir, expostos à irradiação UVB. Os resultados evidenciaram que as alterações macroscópicas e histopatológicas na pele dos camundongos foram significativamente reduzidas na presença de quercetina encapsulada em nanopartículas, indicando que o carreador potencializa a ação da quercetina contra danos na pele causados pela radiação.

2.3 PELE

A pele, maior órgão do corpo humano, atua como primeira barreira física (contra choques, radiação ultravioleta), química (impede a passagem de substâncias exógenas) e microbiológica (tem ação imunológica). Esta também regula a temperatura corpórea, evita a desidratação, apresenta função neurossensorial responsável pelas sensações de calor, dor e tato, permite o metabolismo de vários compostos, além da biossíntese de substâncias constitutivas, tais como colágeno, queratina, melanina, lipídios e hidratos de carbono (LARESE FILON et al., 2015).

A pele é composta por três camadas: epiderme, derme e hipoderme (Figura 4). Entretanto, a hipoderme, constituída basicamente de células adiposas, não participa ativamente na permeação de substâncias. A derme, além de eliminar os produtos metabólicos, traz nutrientes e oxigênio para a epiderme. Por ser altamente vascularizada, substâncias que atingem a derme podem atingir a circulação sistêmica (BAROLI, 2009).

Figura 4. Representação de uma secção transversal de pele humana.



Fonte: Adaptado de Baroli (2009).

A derme, camada intermediária da pele, é composta por proteínas fibrosas como colágeno e elastina, um gel interfibrilar de glicosaminoglicanas, sais e água, apresentando, portanto, características hidrofílicas. Ela é extremamente vascularizada, além de possuir vasos linfáticos, terminações nervosas e anexos como glândulas sebáceas, sudoríparas e folículos pilosos. Os pelos e os dutos de suor têm abertura na superfície da pele e podem proporcionar uma rota alternativa para a permeação de substâncias. (EL MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008).

A epiderme possui várias camadas de células, que são estratificadas em diferentes camadas: estrato germinativo (camada basal) que está em contato com a derme, estrato espinhoso (camada espinhosa), estrato granuloso (camada granulosa) e estrato córneo. As células se tornam queratinizadas à medida que migram à superfície. A camada mais externa é o estrato córneo, que funciona como a primeira barreira a agentes externos e modula a passagem de substâncias exógenas para as camadas mais profundas da pele. É composta por corneócitos, dispostos em bicamadas lamelares, e lipídios como ácidos graxos, colesterol e ceramidas, com um baixo conteúdo hídrico. A sua espessura varia de acordo com as regiões corporais (EL MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008; LARESE FILON et al., 2015).

2.3.1 Fatores que influenciam a permeação de fármacos na pele

A pele é um tecido estratificado, composto de epiderme, derme e hipoderme, com uma organização anatômica e composição química variadas. O estrato córneo, camada mais externa da epiderme, é composto por várias camadas de corneócitos, além das junções intercelulares a base de lipídicos como os corneócitos e as desmossomas, estruturas com função de adesão. Por isso, a quantidade e qualidade dos lipídios no estrato córneo são responsáveis pela barreira da pele. Dessa forma, o estrato córneo é o principal obstáculo para a permeação de fármacos por via tópica (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; EL MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008; GOYAL et al., 2015; LARESE FILON et al., 2015).

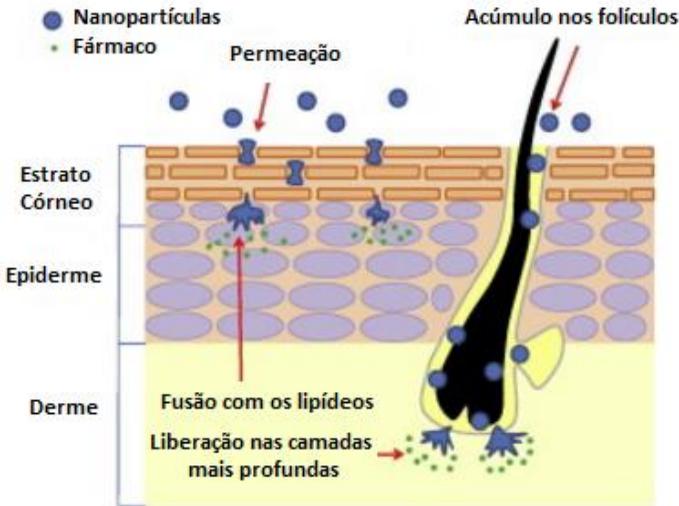
Muitos fatores são capazes de regular a liberação do fármaco na pele após a administração de formulações tópicas, tais como (i) peso molecular e lipofilicidade da substância; (ii) tipo de formulação e carreador utilizado; (iii) estado físico da epiderme; (iv) grau de hidratação do estrato córneo; (v) atividade metabólica da pele, embora a biotransformação de fármacos seja considerada baixa nesse tecido; (vi) coeficiente de partição entre o veículo e o estrato córneo; e (vii) características físico-químicas do fármaco ou do carreador (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

2.3.2 Permeação de nanopartículas através da pele

Para desenvolver um produto farmacêutico nanoestruturado otimizado para a liberação dérmica existe a necessidade de compreender as interações e os mecanismos de transporte dessas na pele. As nanopartículas podem atravessar a pele sem serem degradadas; atuar como promotores, liberando o fármaco e incrementando sua penetração nas diferentes camadas; e usar os apêndices como forma de permeação cutânea. Existem três vias principais que permitem a permeação de nanopartículas: via intercelular (a passagem do fármaco ocorre entre as células), intracelular (passagem através das células) ou folicular (fármaco permeia pelos apêndices) (DESAI; PATLOLLA; SINGH, 2010).

Existem evidências que a maioria das nanopartículas não atravessam o estrato córneo e a via folicular parece ser dominante para a entrada na pele (Figura 5) (DESAI; PATLOLLA; SINGH, 2010).

Figura 5. Rotas de permeação de nanopartículas através da pele humana.



Fonte: Adaptado de Hung e colaboradores (2015).

Alvarez-Román e colaboradores (2004) investigaram a permeação de nanopartículas poliméricas contendo marcadores fluorescentes, com 20 e 200 nm de tamanho de partícula, por via tópica, em modelo de pele suína, usando microscopia confocal de fluorescência. Diferentes tempos (0,5, 1 e 2 horas) foram analisados para observar o perfil de retenção dos nanocarreadores na pele. Os autores concluíram que, independentemente do tamanho de partícula, o acúmulo das nanopartículas ocorre nos apêndices da pele, especialmente nos folículos capilares, sendo tempo-dependente.

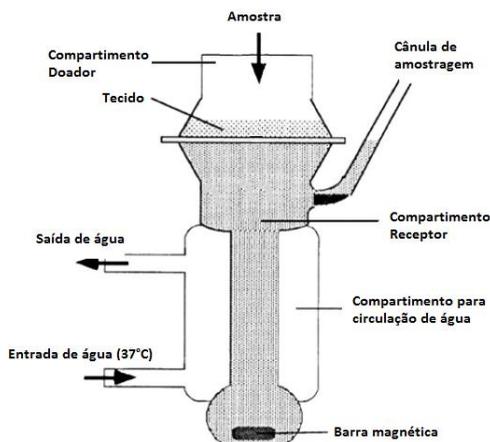
Um estudo demonstrou a permeação de nanopartículas poliméricas em modelos *in vitro* (tecido de orelha suína) e *in vivo* (modelo animal com hamsters) (MORGEN et al., 2011). As partículas foram bem toleradas, sem irritação visível na pele. A preferência de permeação desses sistemas foi pela via folicular capilar, apesar das menores partículas (100 nm) também apresentarem acúmulo nas glândulas sebáceas.

2.4 MODELO DE DIFUSÃO POR CÉLULA DE FRANZ

Experimentos com células de difusão de Franz estão sendo cada vez mais aceitos para avaliar as características da permeação de fármacos (LIU et al., 2015). O modelo contém dois compartimentos, o denominado

doador (superior) e o receptor (inferior). O tecido, como os epitélios cutâneo e oftálmico, entre outros, é posicionado entre os compartimentos. A câmara receptora é preenchida com uma solução ideal para o experimento, normalmente tamponante. Já no compartimento doador é colocado uma solução do fármaco ou outro material que será testado. Cada câmara de Franz é aquecida a uma temperatura ideal, normalmente 37 °C, pois é a temperatura fisiológica corporal e a solução do compartimento doador é mantida sob agitação constante. Alíquotas, tanto da solução receptora quanto da doadora, são coletadas em tempos pré-determinados, e o fármaco é quantificado com metodologias padronizadas (eletroforese, cromatografia, espectroscopia). Após a quantificação, os parâmetros de permeabilidade são calculados (Figura 6) (MARTI-MESTRES et al., 2007; ZHANG et al., 2010; CAON et al., 2015; LUCCA et al., 2015).

Figura 6. Esquema da câmara de difusão tipo Franz.



Fonte: Adaptado de Pineau e colaboradores (2012)

Zhang e colaboradores (2010) estudaram a permeação de nanopartículas de PLGA usando pele abdominal humana no modelo de permeação com células de Franz. Os resultados mostraram que muito mais nanopartículas se depositaram na epiderme do que na derme, a permeação foi dependente do tamanho das partículas e aumentou com a quantidade de nanopartículas depositadas. Portanto, o modelo foi útil para a compreensão do perfil de permeação tópica dessa formulação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Os materiais, solventes e reagentes utilizados para a realização desse trabalho foram: álcool etílico absoluto (Vetec, Brasil), ácido acético e acetonitrila grau CLAE (Vetec, Brasil), ácido clorogênico (ácido 3-cafeioiquínico) padrão primário (Sigma-Aldrich, EUA), água ultrapura em sistema Milli-Q (Millipore, EUA), poloxamer 188 (Pluronic® F68, BASF, EUA), álcool polivinílico (Vetec, Brasil), poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) PLGA503 (Boehringer Ingelheim, Alemanha), policaprolactona (Sigma-Aldrich, Alemanha), acetato de etila (Vetec, Brasil), fosfato de potássio monobásico (Synth, Brasil), fosfato de sódio dibásico (Synth, Brasil), 2,2- difenil-1-picril-hidrazila (Sigma-Aldrich, EUA).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Aquisição da matéria-prima vegetal (MPV)

Folhas e caules de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. foram industrialmente processadas (sapecadas e moídas) e embaladas a vácuo pela Erva-Mate Charrua®, no município de Ouro-SC, Brasil.

O material vegetal foi fracionado de acordo com a faixa granulométrica usando um conjunto de tamises de abertura de malha de 0,5 a 2,8 mm. A fração folha (menor do que 1,0 mm) e caule (superior a 1,0 mm) foram trituradas em moinho de facas (Macmont), utilizando uma malha de 0,5 mm, obtendo-se duas frações, e foram caracterizados por meio de testes de perda por dessecação e teor de extrativos.

3.2.2 Caracterização da matéria-prima vegetal

3.2.2.1 Perda por dessecação

Cerca de 2,0 g da MPV, exatamente pesados, foram transferidos para pesa-filtros previamente dessecados e levados a estufa (105 °C) durante 5 horas. A seguir, os pesa-filtros permaneceram em dessecador por 20 minutos para resfriamento e, posteriormente, foram recolocados na estufa por mais 30 minutos. Este procedimento foi repetido até atingir peso constante. A perda por dessecação foi determinada através da percentagem ponderal de três determinações (BRASIL, 2010).

3.2.2.2 Teor de extrativos

De acordo com Bundesvereinigung (1986), cerca de 1,0 g de MPV foram pesados e submetidos à extração a quente, por decocção, com 100,0 g de água, por 10 min. Após essa etapa, o peso foi reconstituído e a solução extrativa foi filtrada, descartando-se os primeiros 20 ml. Este processo foi realizado duas vezes.

Previamente dessecados, os pesa-filtros contendo 20,0 g da solução extrativa foram evaporados em banho-maria até a secura para a obtenção dos resíduos sólidos. Em seguida, foram dessecados em estufa a 105 °C, durante 2 horas. Os pesa-filtros foram mantidos em dessecador até o resfriamento e, então, pesados. Esse procedimento foi realizado em triplicata.

Os resultados do teor de extrativos foram expressos como a média de seis repetições, de acordo com a equação 1:

$$TE = (RS \cdot fd \cdot 100) / m - (m \cdot PD/100) \quad (1)$$

Onde:

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

RS = massa do resíduo seco (g)

fd = fator de diluição (5)

m = massa da MPV (g)

PD = perda por dessecação (%)

3.2.3 Preparação das soluções extrativas

Um planejamento fatorial foi desenvolvido, usando o software *Design-Expert*® 7.0.0, para determinar a influência de diferentes fatores na obtenção da solução extrativa de *I. paraguariensis*. Os fatores avaliados foram (A) concentração de MPV (2,5, 5,0 e 10,0%; m/v), (B) líquido extrator (água e etanol 20%; v/v), (C) tempo de extração (3, 5 e 10 minutos), (D) velocidade de agitação (9.500 e 13.500 rpm) (Tabela 2). As soluções extrativas foram preparadas pela técnica de turbo-extração utilizando um homogeneizador Ultra-turrax® (modelo T25 Basic, IKA, Alemanha), com haste de agitação S25N-10G. Após a aplicação do delineamento experimental, um total de 24 soluções extrativas, incluindo três replicatas do ponto central, foram preparadas e analisadas. Como respostas, foram avaliados: (1) teor de ACG (mg/ml), (2) resíduo seco (%; m/m). As metodologias de caracterização das soluções extrativas estão descritas abaixo na seção 3.2.4.

Tabela 2. Planejamento fatorial para determinar os fatores que influenciam na obtenção da solução extrativa de *I. paraguariensis*. Os fatores avaliados foram (A) concentração de matéria-prima vegetal (2,5, 5,0 e 10,0%; m/v), (B) líquido extrator (água e etanol 20%; v/v), (C) tempo de extração (3, 5 e 10 minutos), (D) velocidade de agitação (9.500 e 13.500 rpm).

Fatores	Tipo	Níveis		
		Mínimo	Central	Máximo
(A) (%; m/v)	Numérico	2,5	5,0	10,0
(B) (%; v/v)	Catégorico	0	-	20
(C) (min)	Numérico	3	5	10
(D) (rpm)	Catégorico	9.500	-	13.500

3.2.4 Caracterização das soluções extrativas

3.2.4.1 Resíduo seco

Em pesa-filtros previamente tarados, alíquotas de 20,0 g de cada solução extrativa foram levadas à secura em banho-maria, em seguida à estufa (105 °C) por 2 horas. Após a evaporação, o resíduo seco foi pesado e expresso em percentagem através da média de três determinações (% m/m) (BRASIL, 2010).

3.2.4.2 Quantificação do ácido clorogênico por cromatografia líquida de alta eficiência

O marcador químico, ácido clorogênico (ACG), foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com metodologia desenvolvida pelo doutorando Carlos Henrique Blum da Silva, sob orientação do Prof. Flávio Henrique Reginatto no Laboratório de Farmacognosia da UFSC. A análise foi realizada em cromatógrafo (PerkinElmer, Estados Unidos) equipado com um injetor automático (PerkinElmer Series 200), bomba binária (Serie 200), detector UV/Vis (Serie 200), e desgaseificador (PerkinElmer Serie 200), utilizando uma coluna cromatográfica VertiSep GES C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm, Vertical Chromatography Co.). O volume de injeção da amostra foi de 20 µl, com detecção no UV na região de 340 nm e taxa de fluxo de 1 ml/min. A fase móvel utilizada foi um gradiente de acetonitrila e ácido acético 1% (Tabela 3). Os dados foram analisados utilizando o software TotalChrom® Workstation.

Tabela 3. Proporção de fase móvel para a análise em cromatografia líquida de alta eficiência.

Tempo (min)	Modo	Acetonitrila (%)	Ác. acético 1% (%)
0-5	Isocrático	92	8
5-15	Gradiente	92-90	8-10
15-30	Gradiente	90-85	10-15
30-50	Gradiente	85-75	15-25
50-55	Gradiente	75-50	25-50

3.2.4.3 Determinação da atividade antioxidante total do extrato seco padronizado de *Ilex paraguariensis* pela captura do radical livre DPPH

A técnica de determinação da atividade antioxidante total pela captura de radical livre foi realizada pelo método de DPPH modificado de Brand-Williams e colaboradores (1995). Sucintamente, 100 µl de quatro concentrações diferentes do extrato seco padronizado de *Ilex paraguariensis* (ESP-*Ip*) foram adicionados a 3,90 ml de uma solução metanólica de DPPH (60 µM). A reação foi incubada, ao abrigo da luz, em temperatura ambiente, durante 30 minutos. Após, usando um espectrofotômetro Lambda 25 UV/Vis, PerkinElmer®, as absorvâncias foram medidas em 515 nm. Para determinar os valores de IC₅₀ (concentração antioxidante necessária para reduzir em 50% a quantidade inicial de DPPH) a percentagem de DPPH residual foi calculada e plotada frente à concentração da amostra. O composto usado como controle positivo do método foi o ácido gálico.

3.2.5 Secagem do extrato

A solução extrativa selecionada foi concentrada sob evaporação em pressão reduzida (MA-120, Marconi, Brasil) para eliminação do etanol. Essa solução foi congelada a -20 °C por 24 horas e liofilizada durante 48 horas (LD1500, Terroni), com temperatura do condensador a -40 °C, sob pressão constante, após estabilização do sistema. Assim, o ESP-*Ip* foi obtido, o qual foi armazenado em dessecador.

3.2.6 Estudo de formulação 1: obtenção das nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas foram preparadas pela técnica de dupla emulsão seguida de evaporação do solvente (BLANCO; ALONSO,

1997) com pequenas modificações. Sucintamente, o polímero solubilizado em 2,0 ml de acetato de etila e volumes pré-determinados de uma solução aquosa estabilizada com tensoativo foram emulsificados, formando a emulsão primária água em óleo (a/o). Para isso, foi utilizado um homogeneizador ultrassônico (Ultrassom UP200S, Marconi, Alemanha) com amplitude de 90 W, por 1 minuto, utilizando um banho de gelo. Esta primeira emulsão foi vertida sobre 2,0 ml de solução de tensoativo e submetida a agitação por ultrassom, nas mesmas condições descritas anteriormente, formando a dupla emulsão (a/o/a). A dupla emulsão foi rapidamente dispersa, sob agitação magnética, em solução com tensoativo, seguido de eliminação do solvente e concentração até 10 ml em rotaevaporador (MA-120, Marconi, Brasil). O efeito de variáveis de formulação sobre a formação e características dos sistemas obtidos foram analisados, como (A) tipo e (B) concentração do tensoativo (% m/V), (C) tipo e (D) concentração do polímero (mg) e (E) volume de fase aquosa na primeira emulsão (μl) (Tabela 4).

Tabela 4. Composição das formulações para a obtenção de nanopartículas. (A) tipo e (B) concentração do tensoativo (% m/V), (C) tipo e (D) concentração do polímero (mg) e (E) volume de fase aquosa na primeira emulsão (μl)

Formulação	A	B (%, m/V)	C	D (mg)	E (μl)
F1	PLU	1,0	PCL	50	200
F2	PLU	1,0	PCL	100	200
F3	PLU	1,0	PCL	50	400
F4	PLU	1,0	PCL	100	400
F5	PVA	1,0	PCL	50	200
F6	PVA	1,0	PCL	100	200
F7	PVA	1,0	PCL	50	400
F8	PLU	0,50	PCL	50	200
F9	PLU	0,75	PCL	50	200
F10	PLU	5,0	PCL	50	200
F11	PLU	1,0	PLGA	50	200
F12	PLU	1,0	PLGA	100	200
F13	PLU	1,0	PLGA	50	400
F14	PLU	1,0	PLGA	100	400
F15	PVA	1,0	PLGA	50	200
F16	PVA	1,0	PLGA	100	200
F17	PVA	1,0	PLGA	50	400

3.2.7 Caracterização dos sistemas nanoestruturados poliméricos

3.2.7.1 Tamanho de partícula e índice de polidispersão (PDI)

O tamanho de partícula e o PDI foram determinados usando o equipamento Zetasizer Nano® (Malvern, Worcestershire, Reino Unido) através do método de espalhamento de luz dinâmico. As amostras foram diluídas usando água ultrapura Milli-Q® e a análise foi realizada a 25 °C em triplicata.

3.2.7.2 Potencial zeta

A determinação do potencial zeta das formulações foi realizada por anemometria laser Doppler em Zetasizer Nano®. Após a diluição em água ultrapura, a amostra foi colocada em célula eletroforética e os resultados foram expressos por meio da média de três repetições.

3.2.8 Estudo de formulação 2: otimização das condições de preparação das nanopartículas

Com o intuito de maximizar a encapsulação do ACG nos nanocarreadores, tanto no que se refere à eficiência de encapsulação como no teor de flavonoide encapsulado, um novo estudo de formulação foi realizado. Com base nas formulações F1 e F2, o efeito do volume da fase dispersante (96 ou 196 ml) e a quantidade de extrato (20 ou 30 mg) sobre estes parâmetros foi avaliada (Tabela 5).

Tabela 5. Formulações avaliadas no estudo de otimização da eficiência de encapsulação e teor de ácido clorogênico das nanopartículas poliméricas.

Formulação	Conc. de extrato (mg)	Conc. PCL (mg)	Vol. Fase dispersante (ml)
A	20	50	96
B	20	50	196
C	20	100	96
D	20	100	196
E	30	50	96
F	30	50	196
G	30	100	96
H	30	100	196

3.2.8.1 Determinação da eficiência de encapsulação (EE) e teor do ácido clorogênico nas nanopartículas

A EE é definida como a porcentagem do marcador associado ou incorporado nas nanopartículas em relação ao total adicionado (MUCHOW; MAINCENT; MULLER, 2008). A EE foi calculada indiretamente, sendo a diferença percentual entre a quantidade total de ACG adicionada na formulação com aquela encontrada no ultrafiltrado. A separação das nanopartículas foi realizada por ultrafiltração/centrifugação, durante 15 min, a 2.000 x g utilizando os dispositivos de filtração Ultracel-100 (100 kDa, Millipore Corp., Estados Unidos). A EE foi determinada como sendo a média de três determinações. O ACG presente no ultrafiltrado foi quantificado usando CLAE, como descrito anteriormente, utilizando a equação 2:

$$EE (\%) = 100 - ((Cr \cdot 100) / Ci) \quad (2)$$

onde:

Cr: quantidade do ACG encontrada no ultrafiltrado;

Ci: quantidade inicial do ACG adicionado

O teor de ACG corresponde à porcentagem de marcador químico encapsulado nas nanopartículas em relação ao peso total de sólidos adicionado (MUCHOW; MAINCENT; MULLER, 2008), calculado de acordo com a equação 3:

$$\text{Teor} (\%) = ((100 \cdot EE) / mt) \quad (3)$$

onde:

mt = massa total de sólidos adicionados (polímero e extrato bruto)

3.2.9 Estudo de estabilidade das nanopartículas

Cinco diferentes suspensões foram avaliadas, sendo duas formulações e três controles (Tabela 6), armazenadas a diferentes temperaturas (4 °C e 25 °C) e diferentes tempos (0, 5, 15, 30 e 60 dias). O efeito das condições de armazenamento sobre as propriedades físicas dos sistemas, tamanho de partícula, PDI, potencial zeta, pH e concentração do ACG foi determinado.

Tabela 6. Descrição das diferentes formulações utilizadas no estudo de estabilidade, sendo: (F50) formulação com 50 mg de PCL; (F100) contendo 100 mg de polímero; (BR) branca, sem extrato encapsulado; (BR+EXT) mistura física de nanopartículas brancas com extrato; (EXT) extrato seco padronizado em solução aquosa.

Formulação	Controle	Conc. PCL (mg)	Conc. de extrato (mg)	Vol. fase dispersante (ml)
F50		50	30	196
F100		100	30	196
	BR	50	-	196
	BR + EXT	50	30	196
	EXT	-	30	-

A avaliação das propriedades físicas foi feita por observação da cor da formulação e sedimento, e as alterações foram analisadas em ausência (-), pouca (+), moderada (++) e muita (+++) presença. Outros parâmetros foram determinados com as metodologias anteriormente descritas (tamanho e PDI, espalhamento de luz dinâmico; e potencial zeta: anemometria laser Doppler). A concentração do ACG nas formulações de nanopartículas foi determinada no ultrafiltrado, após ultrafiltração/centrifugação, como descrito no item 3.2.8.1. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados analisados com o auxílio do software GraphPad Prism® 5. A análise estatística foi realizada utilizando análise de variância *one-way* (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

3.2.10 Avaliação da morfologia das nanopartículas

A morfologia da nanopartícula otimizada contendo ESP-II (NP-Ip) foi avaliada usando um microscópio eletrônico de transmissão (MET) (JEM-1011 MET, Peabody, Estados Unidos) no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. As amostras foram dispersas em grids de carbono e coradas com acetato de uranila 2% (m/v).

3.2.11 Avaliação da especificidade do método de cromatografia líquida de alta eficiência

A especificidade foi avaliada por meio da análise comparativa de cromatogramas obtidos com o ESP-Ip e as nanopartículas brancas, as

quais foram separadas do ultrafiltrado utilizando o método de ultrafiltração/centrifugação, durante 15 min, a 2.000 x g utilizando os dispositivos de filtração Ultracel-100. Neste estudo também foram avaliadas condições do estudo de permeação, como a presença do tampão e de componentes da pele suína, que foram solubilizadas utilizando solvente acetonitrila. Para o método ser considerado específico nenhum dos demais componentes presentes na formulação devem eluir com o mesmo tempo de retenção do ACG.

3.2.12 Estudo de liberação *in vitro* do ácido clorogênico das nanopartículas poliméricas

Dez mililitros da NP-*Ip* ou ESP-*Ip* solubilizado em água (30 mg/ml) foram adicionados a 40 ml de tampão fosfato pH 5,5, em condições *sink*, e mantidos em banho-maria, a 37 °C, com agitação constante a 175 rpm. Em intervalos de tempo pré-determinados (0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 e 12h), alíquotas de 500 µl foram coletadas e imediatamente filtradas em dispositivos de ultrafiltração/centrifugação durante 15 minutos. A quantidade do ACG liberada da NP-*Ip* foi determinada por CLAE, como descrito anteriormente. O experimento foi realizado em triplicata.

3.2.13 Avaliação da permeação/retenção cutânea *ex vivo* das nanopartículas poliméricas em células de difusão de Franz

O comportamento da permeação/retenção da NP-*Ip* e ESP-*Ip* foram investigados utilizando um equipamento de difusão tipo câmara de Franz (DIST Indústria, Comércio e Serviços Ltda, Brasil), com uma área de superfície disponível para difusão de 1,77 cm² e um volume do compartimento receptor de 10 ml. A pele de orelha suína foi obtida em um matadouro local (Antônio Carlos, Brasil) e transportada em tampão KBR pH 7,4 e gelo. Antes do experimento, a pele foi limpa, sendo retirado o tecido adiposo subcutâneo e os pelos.

As peles selecionadas foram fixadas entre os compartimentos doador e receptor da célula de Franz. A solução receptora foi tampão fosfato pH 5,5, mantida sob agitação magnética contínua (800 rpm) e temperatura controlada (37 °C) durante todo o experimento. O compartimento doador foi preenchido com 2,0 ml de ESP-*Ip* solubilizado em água ou de NP-*Ip* (3 mg/ml). No tempo de 3, 6, 9, 12 e 24 horas, alíquotas de 400 µl foram retiradas da câmara receptora e o volume foi completado com tampão. Posteriormente, 100 µl da alíquota foram

tratadas com 100 μ l de acetonitrila, para precipitar as proteínas da pele. A seguir, a solução desproteïnada foi analisada por CLAE para verificar a permeação do ACG através da pele. Ao final do experimento, a pele foi retirada da câmara de Franz e lavada para retirada da amostra da superfície. A derme foi separada da epiderme com a ajuda de um bisturi. Em seguida, o ACG foi extraído das camadas da pele usando 5 ml de acetonitrila em banho de ultrassom (1 hora) com posterior centrifugação (2.000 x g durante 10 min). Todas as amostras (alíquotas do compartimento receptor e doador, derme e epiderme) foram analisadas por CLAE, como descrito anteriormente.

Os resultados foram avaliados utilizando o software GraphPad Prism® 5. O fluxo de permeação e o coeficiente de permeabilidade foram estimados usando o gráfico da quantidade permeada (μ g.cm⁻²) *versus* tempo (h).

3.2.14 Estudo de degradação do ácido clorogênico usando células de difusão de Franz

O objetivo desse estudo foi avaliar se o ACG sofre degradação durante o período de 24 horas de duração do experimento usando células de difusão de Franz. Sucintamente, o tampão fosfato pH 5,5 foi homogeneizado com pedaços de pele da orelha suína utilizando um turboextrator (Ultra-TURRAX® modelo T25, IKA, Alemanha), com haste de agitação S25N-10G (IKA, Alemanha), velocidade de agitação de 11.000 rpm. Após homogeneização por 2 min, a mistura foi filtrada. No compartimento receptor da câmara de difusão de Franz foi colocado o tampão fosfato pH 5,5 (controle) ou o tampão homogeneizado com pele suína com 2,0 mL de ESP-Ip ou NP-Ip (3 mg/ml). Em tempos pré-determinados (3, 6, 9, 12 e 24 horas), alíquotas de 100 μ l foram retiradas e tratadas com 100 μ l de acetonitrila. Posteriormente, a concentração de ACG foi quantificada utilizando CLAE, como descrito anteriormente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

A produção da erva-mate para a comercialização envolve, comumente, o sapeco das folhas de *I. paraguariensis*. Nesta operação, após a colheita, os ramos passam por uma esteira rolante em um tambor giratório aquecido por uma fogueira em uma das extremidades. O material vegetal permanece neste tambor durante cerca de três minutos, a uma temperatura de 250 a 550 °C. Como consequência, ocorre a inativação das enzimas presentes na matéria-prima vegetal, que faz com que as folhas sapecadas apresentem teores superiores de flavonoides totais e polifenóis quando comparadas às secas ao ar (ISOLABELLA et al., 2010). As folhas de erva-mate utilizadas para a execução deste trabalho foram submetidas a este processo, tendo sido, portanto, previamente sapecadas e grosseiramente moídas. O material vegetal foi fracionado de acordo com a faixa granulométrica, obtendo-se a fração folha (menor do que 1,0 mm) e a caule (superior a 1,0 mm), que foram, posteriormente, caracterizadas de acordo com a perda por dessecação e teor de extrativos, como descrito na seção 3.2.2.1 e 3.2.2.2.

A presença de umidade no material vegetal permite a ação de enzimas, podendo gerar degradação enzimática dos componentes químicos, além da proliferação de microrganismos (FARIAS, 1999). Na perda por dessecação, definida com o percentual de material volatilizado após a análise, os resultados mostraram baixo teor de umidade, em torno de 6 % (m/m), em ambas as frações analisadas (Tabela 7). O processamento industrial da erva-mate pode explicar esse fato, pois a planta foi submetida à técnica do sapeco, onde a MPV é seca por exposição a calor. Considerando que o valor máximo de teor de umidade preconizado pela Farmacopéia Brasileira (1988) é de 14%, os valores encontrados foram considerados satisfatórios.

Tabela 7. Caracterização das frações folha e caule de *Ilex paraguariensis*.

Caracterização	Fração	
	Folha	Caule
Perda por dessecação (% , m/m)	6,12 ± 0,13	5,99 ± 0,14
Teor de extrativos (% , m/m)	39,73 ± 0,8	25,35 ± 0,52

O teor de extrativos permite a comparação entre materiais vegetais através do percentual de material extraído de forma padronizada.

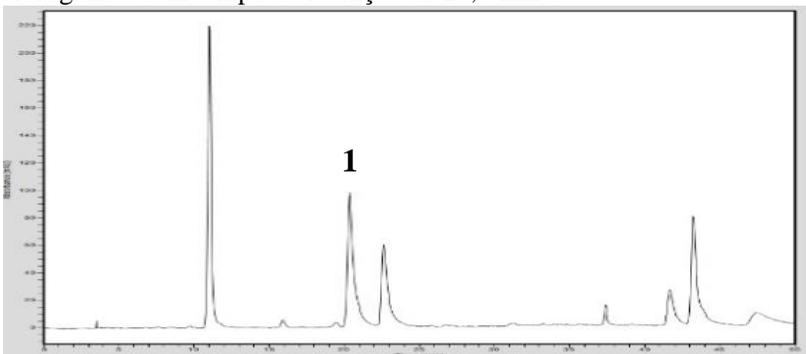
Portanto, essa caracterização representa um importante parâmetro na análise da qualidade da MPV. Analisando os resultados obtidos, a fração folha apresentou cerca de 64% mais teor de extrativos do que a fração caule. Portanto, as folhas possuem maior concentração de substâncias solúveis em água, tendo sido escolhidas para dar continuidade a esse estudo.

A granulometria também é considerada um importante parâmetro de qualidade na obtenção de extrativos vegetais, porque a extração dos compostos químicos tem relação direta com a área superficial e, conseqüentemente, com o contato com o líquido extrator. No caso da turbo-extração, o elevado cisalhamento, que caracteriza a técnica, reduz e padroniza o tamanho das partículas durante o processo extrativo, desta forma diminuindo a influência deste parâmetro sobre a qualidade da extração. Neste estudo, foi realizada a separação da fração caule (fração de partículas com diâmetro superior a 1,0 mm), diminuindo a amplitude de tamanho de partícula do material vegetal previamente à extração.

4.2 QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

O método foi previamente desenvolvido e validado pelo doutorando Carlos Henrique Blum da Silva, sob orientação do Prof. Flávio Henrique Reginatto no Laboratório de Farmacognosia da UFSC. A Figura 7 mostra um cromatograma típico (absorbância *versus* tempo de retenção) utilizado para a quantificação do ACG nas amostras contendo *Ilex paraguariensis*.

Figura 7. Cromatograma típico do método por cromatografia líquida de alta eficiência para amostras de *Ilex paraguariensis*. (1) Ácido clorogênico com tempo de retenção de 20,5 minutos.



4.3 ESTUDO DE PADRONIZAÇÃO DO PROCESSO EXTRATIVO

O processo extrativo tem por finalidade a retirada, da forma mais seletiva e completa possível, dos compostos biologicamente ativos contidos na droga vegetal. Para isso, deve-se usar um líquido extrator eficiente, seletivo e adequado tecnologicamente, pois deve ser facilmente eliminado, além de apresentar baixa toxicidade para o ser humano. A técnica escolhida para a extração do marcador ACG das folhas de *I. paraguariensis* foi a turbo-extração. Este método consiste na redução do tamanho de partícula do material vegetal, através da aplicação de elevadas forças de cisalhamento entre o estator e um rotor de alta velocidade. Com isso, há um aumento da área de extração, facilitando o acesso do solvente ao material vegetal. Concomitantemente, ocorre a quebra das células vegetais, o que facilita a difusão dos componentes químicos do interior das células para a solução extrativa (SONAGLIO et al., 1999) (Figura 8).

Figura 8. Esquema da técnica de turbo-extração usada para obtenção das soluções extrativas.



Fonte: Beringsh (2015)

As vantagens dessa técnica quando comparada a outros métodos extrativos são o quase esgotamento da matéria-prima vegetal e a rápida extração (em minutos). Arend e colaboradores (2011) usaram a técnica de maceração para a extração do ACG a partir de folhas de *Cecropia glaziovii*. Entretanto, o longo tempo de contato do solvente com o material vegetal, característicos desta técnica de extração, pode resultar em degradação química, enzimática ou microbiológica desse composto. De

fato, estes autores observaram uma redução nos níveis do ACG quando o tempo de extração aumentou de 4 para 8 dias, mantendo constantes todos os outros parâmetros de extração. Em outro trabalho, Da Silveira e colaboradores (2014) avaliaram a extração do flavonoide rutina a partir de folhas de erva-mate utilizando a infusão como método de extração. Neste estudo, por meio de planejamento experimental, foram avaliados, entre outros fatores, o tempo de extração (3 a 15 min) e a temperatura (58 a 90 °C), evidenciando que o aumento desses dois fatores resulta em menor concentração do flavonoide nas soluções extrativas. Com a técnica de turbo-extração estas desvantagens são minimizadas, pois o tempo de extração é curto devido à aplicação de elevadas forças de cisalhamento. Por outro lado, a elevada velocidade de agitação e o cisalhamento produz calor, o que poderia conduzir à degradação de compostos lábeis.

No intuito de padronizar o processo extrativo de folhas de *Ilex paraguariensis* usando a técnica de turbo-extração, e para maximizar a extração do ACG, um delineamento experimental foi proposto para verificar quais fatores interferem na padronização. As condições de preparação das soluções extrativas e os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 8.

Tabela 8. Resultados de resíduo seco e teor do ácido clorogênico obtidos dos extratos a partir do planejamento experimental. Fatores analisados: (A) concentração de matéria-prima vegetal (%; m/v), (B) líquido extrator (%; v/v), (C) tempo de extração (min), (D) velocidade de agitação (rpm). Respostas: (RS) resíduo seco (mg/ml) e (ACG) teor de ácido clorogênico (mg/g).

(continua)

Extrato	A (%; m/v)	B (%; v/v)	C (min)	D (rpm)	RS (mg/ml)	ACG (mg/g)
1	2,5	Água	3	9.500	5,1	8,2
2	2,5	Etanol 20%	3	9.500	4,2	9,0
3	10	Água	3	9.500	18,5	28,8
4	10	Etanol 20%	3	9.500	18,7	31,7
5	5	Etanol 20%	5	9.500	11,3	15,3
6	10	Água	5	9.500	17,3	34,6
7	2,5	Água	10	9.500	4,6	1,8
8	2,5	Etanol 20%	10	9.500	4,4	8,8
9	5	Água	10	9.500	10,7	12,7
10	10	Água	10	9.500	18,7	3,1
11	10	Etanol 20%	10	9.500	17,0	28,8
12	2,5	Etanol 20%	3	13.500	5,8	4,8
13	5	Água	3	13.500	11,6	2,0
14	10	Água	3	13.500	19,6	21,8
15	10	Etanol 20%	3	13.500	17,5	7,7
16	2,5	Água	5	13.500	6,7	11,3
17	10	Etanol 20%	5	13.500	17,6	29,2
18	2,5	Água	10	13.500	7,5	3,1
19	2,5	Etanol 20%	10	13.500	7,2	1,4

Tabela 8. Resultados de resíduo seco e teor do ácido clorogênico obtidos dos extratos a partir do planejamento experimental. Fatores analisados: (A) concentração de matéria-prima vegetal (%; m/v), (B) líquido extrator (%; v/v), (C) tempo de extração (min), (D) velocidade de agitação (rpm). Respostas: (RS) resíduo seco (mg/ml) e (ACG) teor de ácido clorogênico (mg/g).

(conclusão)

Extrato	A (%; m/v)	B (%; v/v)	C (min)	D (rpm)	RS (mg/ml)	ACG (mg/g)
20	5	Etanol 20%	10	13.500	12,9	3,8
21	10	Água	10	13.500	20,2	11,1
22	5	Etanol 20%	5	13.500	12,0	6,6
23	5	Etanol 20%	5	13.500	12,7	1,8
24	5	Etanol 20%	5	13.500	12,8	2,1

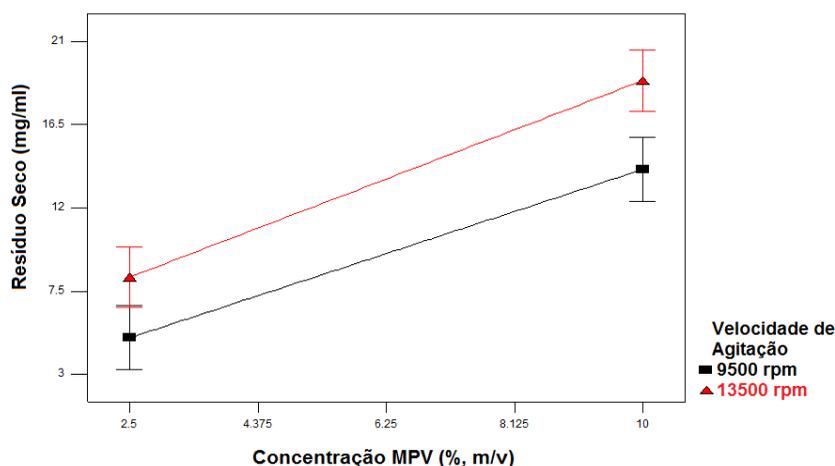
Resíduo seco

O resíduo seco é um importante parâmetro de qualidade dos extratos vegetais, pois traduz a quantidade total de substâncias extraídas em condições específicas de método, tempo e solvente, como descrito anteriormente.

A influência dos fatores estudados em relação ao resíduo seco das diferentes soluções extrativas foi estimada por meio da análise da variância (ANOVA) com auxílio do software *Design-Expert*® 7.0.0. O modelo matemático foi estatisticamente significativo ($p = 0,0448$) com coeficiente de correlação de 0,9320.

O resíduo seco das soluções extrativas obtidas variou de 4,2 a 20,2%, evidenciando que os fatores avaliados têm grande repercussão sobre este parâmetro. O tempo e o tipo de líquido extrator não apresentaram influência significativa ($p = 0,1241$ com coeficiente de $+0,75$ e $p = 0,1543$ com coeficiente de $-0,60$, respectivamente). Entretanto, a concentração de MPV ($p = <0,0001$, coeficiente = $+5,74$) e a velocidade de agitação ($p = 0,0029$, coeficiente = $+1,45$) demonstraram relevância estatística. Os coeficientes positivos indicam que à medida que aumentam estes dois fatores, mais elevado será o teor de resíduo seco obtido (Figura 9).

Figura 9. Gráfico obtido a partir do planejamento experimental analisando a variável velocidade de agitação (9500 e 13500 rpm) em relação ao resíduo seco (mg/ml) *versus* concentração de matéria-prima vegetal (% m/v).



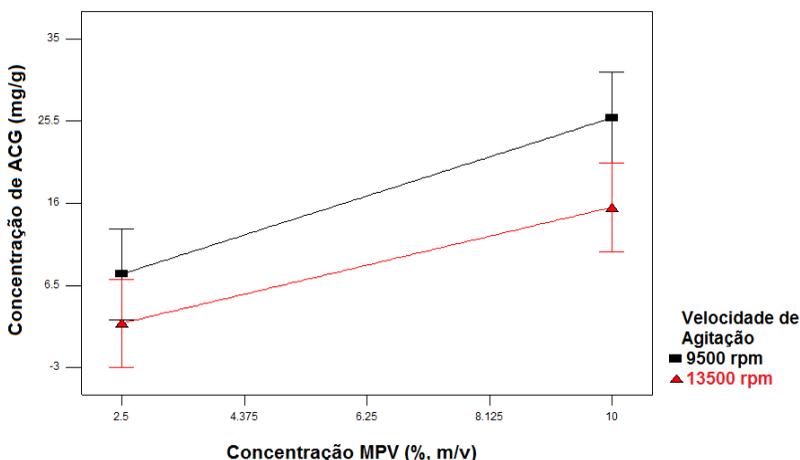
Concentração do ACG

O modelo matemático utilizado para análise dos dados por meio da análise de variância (ANOVA) foi considerado estatisticamente significativo ($p = 0,0010$) com coeficiente de correlação de 0,7434.

Dos fatores analisados, a concentração de MPV ($p = 0,0009$; coeficiente = +7,86) e a velocidade de agitação ($p = 0,0249$; coeficiente = -4,01) apresentaram variação significativa na extração do ACG. A técnica de turbo-extração é considerada exaustiva, pois permite o esgotamento do material vegetal. Portanto, uma maior concentração de MPV leva a um aumento no teor de ACG, indicando que não ocorreu a saturação da solução extrativa. Entretanto, como mostra o modelo matemático, a velocidade de agitação do rotor apresentou interação negativa. A técnica de turbo-extração consiste no cisalhamento do material vegetal, podendo gerar calor. Como o ACG é um éster de ácido cafeico e ácido quínico, ele pode sofrer hidrólise, portanto, a elevação da temperatura resultante da operação de turbo-extração pode favorecer sua degradação (Figura 10).

Já os fatores líquido extrator ($p = 0,6489$; coeficiente = +0,73) e tempo de extração ($p = 0,1825$; coeficiente = -0,84) não apresentaram variação significativa nos teores do ACG para os parâmetros analisados.

Figura 10. Gráfico obtido a partir do planejamento experimental analisando a variável velocidade de agitação (9500 e 13500 rpm) em relação a concentração de ACG (mg/g) *versus* concentração de matéria-prima vegetal (% m/v).



Avaliando os resultados obtidos com o planejamento fatorial, observou-se que o líquido extrator e o tempo de extração não apresentaram relevância estatística no processo extrativo. Portanto, como líquido extrator foi selecionado o etanol 20%, que resulta em soluções extrativas de menor viscosidade e, conseqüentemente, facilita a etapa de separação do resíduo sólido. Além disso, a presença do etanol tende a inibir a proliferação de microrganismos. Em relação ao tempo de extração, foi selecionado um tempo intermediário, de 5 minutos. Em contrapartida, os fatores que influenciaram a extração de forma significativa foram a concentração de MPV e a velocidade de agitação. A concentração de MPV teve influência positiva na extração, pois seu aumento resultou em maiores teores de ACG e de resíduo seco, por isso foi padronizado em 10% a quantidade de MPV. Entretanto, uma maior velocidade de agitação apresentou interação positiva para o resíduo seco e negativa para o teor do ACG. Dessa forma, para a obtenção dos extratos foi escolhida a velocidade de 13500 rpm, pois extraiu uma maior concentração de resíduo seco, por tanto maior quantidade de substâncias solúveis em água que podem ter atividade antioxidante e não foram quantificadas.

Dessa forma, as condições que se mostraram adequadas para a extração dos compostos de interesse foram com 10% de MPV, usando etanol 20% como líquido extrator, com o tempo de 5 minutos e velocidade de agitação de 13.500 rpm.

4.3.1 Determinação da atividade antioxidante total do extrato seco padronizado pela captura do radical livre DPPH

O método se baseia na redução do radical livre DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazila) pelos compostos antioxidantes da amostra e conseqüente mudança de coloração violeta para amarela, proporcional à concentração da substância redutora da amostra. Por isso, a atividade antioxidante pode ser determinada pelo decréscimo da absorbância do sistema reacional (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

A atividade antioxidante pode ser expressa pela IC_{50} , que é a concentração necessária do antioxidante para reduzir em 50% o radical livre DPPH, sendo que menores valores de IC_{50} traduzem uma maior atividade da amostra. O ESP-*Ip* apresentou IC_{50} de 51,70 $\mu\text{g/ml}$ e o padrão de ácido gálico de 11,83 $\mu\text{g/ml}$. O extrato padronizado e o padrão apresentaram baixos valores de IC_{50} , portanto, a amostra tem potencial atividade antioxidante, o que pode estar relacionado ao elevado teor de ACG. Bixby e colaboradores (2005), usando o método de DPPH para

determinar a capacidade de captação de radicais livres de extratos, observaram elevada atividade antioxidante para extratos de *Ilex paraguariensis*, seguido da *Camelia sinensis* (chá-verde), *Achyrocline satureoides* (macela), além de alguns tipos de vinhos tintos e brancos. Os autores concluíram que a atividade antioxidante está diretamente relacionada à concentração de compostos fenólicos.

Assim, como relatado na literatura a atividade antioxidante para a erva-mate (BIXBY et al., 2005; ANESINI et al., 2012; ROMANA-SOUZA; PIRES; MONTE-ALTO-COSTA, 2015), tudo indica que o extrato padronizado de *Ilex paraguariensis* é promissor para o desenvolvimento de um produto farmacêutico.

4.4 ESTUDO DE FORMULAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

A técnica escolhida para o desenvolvimento de nanocarreadores poliméricos foi a de dupla emulsão seguida de evaporação do solvente. Esse método consiste em emulsificar uma solução aquosa de tensoativo contendo o composto (geralmente hidrofílico) com uma fase orgânica na qual o polímero está solubilizado, formando uma emulsão a/o. Após, essa emulsão é dispersa em uma segunda fase aquosa com tensoativo, formando a dupla emulsão a/o/a. O solvente geralmente é removido por evaporação sob pressão reduzida (Figura 3, página 43) (RAO; GECKELER, 2011; IQBAL et al., 2015a). A principal razão para se utilizar a técnica de dupla emulsão é o fato de ela ser adequada para a encapsulação de compostos hidrofílicos (PINTO REIS et al., 2006; IQBAL et al., 2015a). No entanto, as características físico-químicas das nanopartículas obtidas por esta técnica são afetadas por um conjunto de parâmetros tecnológicos, que incluem não somente a solubilidade da substância ativa, mas também a natureza do solvente orgânico, a natureza e a concentração do polímero, o tipo e a concentração do tensoativo, bem como o modo e a duração da agitação durante a preparação da emulsão (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012). Desta forma, para o desenvolvimento de um sistema nanoestruturado adequado para a encapsulação de um composto hidrofílico, foi necessário realizar um estudo de formulação para avaliar a influência de cada um destes fatores.

Por outro lado, a caracterização adequada dos sistemas nanoestruturados fornece um conjunto de informações que auxiliam na compreensão da liberação do composto encapsulado, assim como na interação desses sistemas com o órgão alvo. A composição e a técnica de preparação das nanopartículas são fatores que influenciam no tamanho de

partícula, PDI e potencial zeta. Visando a liberação tópica, quanto menor a partícula, mais facilmente ela permeia a pele, por isso partículas entre 50 e 200 nm são ideais para retenção nas camadas superiores da pele (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2004; ZHANG et al., 2010; LARESE FILON et al., 2015). O PDI reflete a homogeneidade de tamanho de partícula; sistemas nanoestruturados são considerados monodispersos quando o valor de PDI é inferior a 0,200. O potencial zeta, por sua vez, traduz a carga superficial das partículas, que é influenciada 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 (SCHAFFAZICK et al., 2003). Em módulo, um elevado valor de potencial zeta faz com que haja grandes forças repulsivas, evitando a agregação das partículas, contribuindo para uma boa estabilidade físico-química do sistema. Os resultados da caracterização do tamanho de partícula, PDI e potencial zeta estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9. Caracterização físico-química das nanopartículas poliméricas quanto ao tamanho de partícula (nm), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (mV). Variáveis de formulação: (A) tipo e (B) concentração do tensoativo (% m/V), (C) tipo e (D) concentração do polímero (mg) e (E) volume da primeira emulsão (μ l).

Formulação	A	B (%, m/v)	C	D (mg)	E (μ l)	Tamanho (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
F1	PLU	1,0	PCL	50	200	134,9 \pm 1,9	0,076 \pm 0,009	-18,0 \pm 0,7
F2	PLU	1,0	PCL	100	200	194,5 \pm 4,1	0,113 \pm 0,031	-15,6 \pm 1,0
F3	PLU	1,0	PCL	50	400	132,2 \pm 1,2	0,084 \pm 0,017	-17,7 \pm 0,8
F4	PLU	1,0	PCL	100	400	178,5 \pm 3,0	0,129 \pm 0,014	-13,2 \pm 0,3
F5	PVA	1,0	PCL	50	200	1174,0 \pm 94,7	0,600 \pm 0,017	-0,469 \pm 0,03
F6	PVA	1,0	PCL	100	200	958,6 \pm 35,4	0,360 \pm 0,007	-0,450 \pm 0,05
F7	PVA	1,0	PCL	50	400	1014,7 \pm 89,4	0,578 \pm 0,070	-0,430 \pm 0,01
F8	PLU	0,50	PCL	50	200	214,0 \pm 9,19	0,041 \pm 0,035	-17,8 \pm 3,2
F9	PLU	0,75	PCL	50	200	198,4 \pm 7,8	0,066 \pm 0,019	-18,7 \pm 0,6
F10	PLU	5,0	PCL	50	200	76,4 \pm 0,82	0,212 \pm 0,01	-15,9 \pm 0,82
F11	PLU	1,0	PLGA	50	200	190,7 \pm 7,7	0,113 \pm 0,028	-13,5 \pm 1,2
F12	PLU	1,0	PLGA	100	200	231,8 \pm 14,4	0,112 \pm 0,026	-16,2 \pm 1,3
F13	PLU	1,0	PLGA	50	400	203,1 \pm 17,3	0,084 \pm 0,031	-16,5 \pm 1,7
F14	PLU	1,0	PLGA	100	400	221,1 \pm 15,9	0,096 \pm 0,023	-14,6 \pm 1,2
F15	PVA	1,0	PLGA	50	200	1030,5 \pm 19,0	0,609 \pm 0,006	-0,403 \pm 0,01
F16	PVA	1,0	PLGA	100	200	991,8 \pm 68,1	0,391 \pm 0,01	-0,382 \pm 0,01
F17	PVA	1,0	PLGA	50	400	965,5 \pm 77,0	0,424 \pm 0,015	-0,424 \pm 0,03

Tipo de tensoativo

Os tensoativos permitem a manutenção do estado físico de uma dispersão de duas ou mais fases imiscíveis, evitando a separação de fases, portanto, tornando a emulsão estável (IQBAL et al., 2015a). Sabendo disso, o efeito de dois tensoativos (PLU e PVA) foram estudados e os parâmetros de caracterização físico-químicos das nanopartículas obtidas foram analisadas. O poloxamer 188 (Pluronic F68) é um tensoativo não-iônico, não tóxico e aprovado pelo FDA (BASF, 2004; YAN et al., 2010). Já o álcool polivinílico (PVA) é um polímero hidrofílico também não-iônico, biocompatível, com boa resistência mecânica e estabilidade em diferentes pHs (IQBAL et al., 2015a).

Vários estudos mostraram a capacidade destes tensoativos de formar nanopartículas com parâmetros físico-químicos adequados (BLANCO; ALONSO, 1997; MILADI et al., 2015; YAN et al., 2010; ZAMBAUX et al., 1998). Entretanto, no presente estudo, o uso do PVA resultou na formação de partículas com tamanho e PDI elevados (cerca de 1.000 nm e >0,300, respectivamente), com potencial zeta próximo de zero. Em contrapartida, quando se utilizando PLU foi possível obter formulações com tamanho médio de partícula de 134 nm, PDI de 0,076 e potencial zeta de -18,0 mV. Com base nestes resultados, o tensoativo PLU foi selecionado para a preparação das nanopartículas por dupla emulsão com parâmetros físico-químicos adequados.

Concentração de tensoativo

O aumento na concentração de tensoativo pode reduzir o tamanho das gotículas da primeira emulsão e por sua vez, diminuir o tamanho final das partículas. Phromviyo e colaboradores (2014) avaliaram o efeito do tipo e concentração de tensoativos nas características de nanopartículas poliméricas. Estes autores observaram que, com o aumento da concentração de PVA de 5 para 10% (m/v), o tamanho de partícula diminuiu de 660 para 280 nm.

Neste estudo, as concentrações de 0,5; 0,75; 1,0 e 5,0% de PLU foram avaliadas para testar sua capacidade de estabilizar a emulsão, com consequente repercussão sobre o tamanho e a dispersão das partículas. Apenas a suspensão com maior concentração do tensoativo (5,0%) causou redução de tamanho, atingindo 76,4 nm. Contudo, a formulação apresentou agregados, sugerindo que essa concentração é muito alta para a formação das partículas, gerando instabilidades que resultaram na agregação das partículas. Por isso, a concentração intermediária, de 1,0%, foi selecionada para dar continuidade aos estudos.

Tipo de polímero

A seleção do polímero apropriado é um passo crítico, principalmente na etapa de encapsulamento, o que depende da natureza química do fármaco e do polímero, além de sua utilização pretendida. Para o estudo de formulação foram escolhidos dois polímeros: PCL e PLGA, ambos polímeros biocompatíveis e biodegradáveis, além de serem aprovados pelo FDA para uso em humanos. A PCL é hidrofóbica, semi-cristalina, com baixa temperatura de fusão (60 °C), alto peso molecular e considerado não-tóxica (AMASS; AMASS; TIGHE, 1998). O PLGA está disponível em diferentes proporções dos ácidos lático e glicólico. Como o ácido lático é mais hidrofóbico que o ácido glicólico, polímeros com maiores proporção do primeiro são menos hidrofílicos, por isso se degradam lentamente (IQBAL et al., 2015a). Ambos os polímeros são apropriados para o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas (BLANCO; ALONSO, 1997; PINTO REIS et al., 2006 COHEN-SELA et al., 2009; RIBEIRO et al., 2016).

As formulações preparadas com o PLGA apresentaram agregados visíveis na superfície da formulação devido à solidificação do polímero, sugerindo instabilidade do sistema durante a formação das nanopartículas. Este fenômeno não foi observado nas formulações que utilizaram PCL como agente polimérico. Iqbal e colaboradores (2015b) desenvolveram nanopartículas de PCL pela técnica de dupla emulsão seguida de evaporação do solvente e obtiveram partículas com tamanho de 342 a 375 nm, com potencial zeta de 0,1 a -7,4 mV. Usando a mesma técnica e polímero, Miladi e colaboradores (2015) formularam suspensões com 211 a 430 nm e -0,57 a -10,4 mV de potencial zeta. Em nosso estudo, nanopartículas preparadas com o polímero PCL apresentaram boa estabilidade, reprodutibilidade e formulações com parâmetros adequados para nanopartículas (134 nm, 0,076 e -18,0 mV). Portanto, o PCL foi considerado ideal para a obtenção das nanopartículas poliméricas de dupla emulsão por evaporação do solvente.

Concentração de polímero

Teoricamente, quanto maior a concentração de polímero, mais fármaco será encapsulado na nanoestrutura, entretanto, maiores diâmetros de partícula são esperados, principalmente devido à maior quantidade de polímero em cada gotícula da emulsão (ASTETE; SABLIOV, 2006). Foram testadas duas concentrações de polímero (50 e 100 mg) e foram constatadas diferenças no tamanho de partícula ($134,9 \pm 1,9$ e $194,5 \pm 4,1$ nm, respectivamente). Entretanto, considerando que, mesmo com a maior quantidade testada de polímero o tamanho de partícula permaneceu

dentro de uma faixa aceitável para o tipo de administração pretendida, essa variável foi mantida no estudo visando maximizar a eficiência de encapsulação.

Volume da primeira emulsão

Objetivando o aumento da quantidade de extrato associada às nanopartículas, volumes de 200 e 400 μl de fase interna foram testados. Um aumento do volume da fase aquosa da primeira emulsão repercute na quantidade de extrato dissolvido, conseqüentemente, na quantidade de extrato associado à partícula. Por outro lado, este maior volume de fase interna pode causar a desestabilização da emulsão primária, levando a uma menor eficiência de encapsulação ou ainda causando instabilidade ao sistema. Outra consequência do aumento de volume na primeira emulsão pode ser a obtenção de tamanhos maiores de partícula. Apesar dos parâmetros físico-químicos analisados não apresentarem diferença significativa no momento da preparação, a formulação com maior volume mostrou-se instável em poucos dias de armazenamento, com o aparecimento de aglomerados e precipitados. Portanto, o volume considerado satisfatório para a fase aquosa da primeira emulsão foi de 200 μl .

Os resultados mostraram que, para a obtenção das nanopartículas poliméricas pela técnica de dupla emulsão seguida de evaporação do solvente, a composição que mostrou melhores resultados foi aquela que utilizou PCL como polímero, PLU a 1,0% como tensoativo e com volume de fase interna aquosa de 200 μl . A única variável que não foi definida neste estudo foi a concentração de polímero. Desta forma, ambas as concentrações (50 e 100 mg) foram mantidas na continuidade dos estudos.

4.5 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO E TEOR DE ÁCIDO CLOROGÊNICO NAS NANOPARTÍCULAS

A determinação da eficiência de encapsulação da substância incorporada e/ou associada às nanopartículas é complexa devido ao tamanho do sistema, que dificulta a separação da fração livre da fração efetivamente associada. Uma técnica de separação bastante utilizada é a ultrafiltração-centrifugação, na qual uma membrana é empregada para separar parte da fase aquosa dispersante da suspensão coloidal. A concentração livre da substância ativa é determinada no ultrafiltrado e a fração de fármaco associada às nanoestruturas é calculada pela subtração

das concentrações total adicionada e livre (SCHAFFAZICK et al., 2003). Já o teor se refere à percentagem de marcador químico associado às nanopartículas em relação ao peso total dos sólidos que compõem a formulação (MUCHOW; MAINCENT; MULLER, 2008). O teor e a EE dependem de propriedades físico-químicas, tais como interações entre o composto ativo, a matriz e o meio circundante.

A encapsulação de substâncias hidrofílicas em sistemas nanoestruturados é um desafio, pois o composto hidrofílico tem afinidade pela fase aquosa externa da dispersão e tende a ficar fora da matriz (IQBAL et al., 2015a). Isto ocorre, principalmente, pela probabilidade de migração durante a etapa de formação da partícula, na qual ocorre a difusão do solvente orgânico para a fase externa aquosa causando a solidificação do polímero. Esta etapa é crítica para o alcance de uma eficiência de encapsulação elevada, tanto quanto o perfeito ajuste da proporção entre os componentes da formulação.

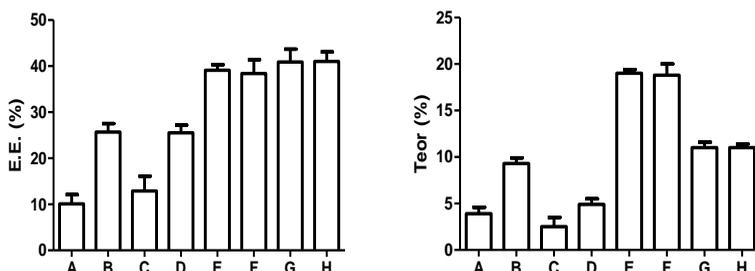
Com o intuito de otimizar a nanoencapsulação do ACG, um composto hidrofílico, nas formulações F1 e F2, o efeito da quantidade de extrato (20 ou 30 mg), da concentração de PCL (50 ou 100 mg) e do volume da fase dispersante (96 ou 196 ml) foram avaliados, por meio da comparação de oito diferentes formulações apresentadas na Tabela 5, página 56.

Após a evaporação do solvente, ocorre a precipitação do polímero em forma de nanopartículas. Por isso, a etapa de eliminação do solvente orgânico é crítica para o aumento da eficiência de encapsulação para fármacos hidrofílicos. No intuito de acelerar a retirada do acetato de etila, no momento da formulação, foi aumentado o volume de água da fase dispersante. Com isso, aumenta-se a taxa de difusão do solvente para a água e a formação mais rápida da nanopartículas, aumentando a chance de aprisionamento do extrato no interior da partícula. Também visando à maior quantidade do ACG encapsulado na nanopartícula, concentrações crescentes de extrato e polímero foram testadas. Teoricamente, quanto mais polímero e ACG adicionados, maior a EE.

Os resultados deste estudo estão expostos na Figura 11. Para as formulações contendo 20 mg de ESP-*Ip*, observou-se um aumento significativo da EE com o aumento do volume da fase dispersante. Entretanto, não houve diferença em relação a quantidade de polímero adicionada. Em suma, apenas maiores quantidades de água na fase dispersante aumentaram a EE nas formulações contendo 20 mg de extrato. Este resultado foi atribuído à difusão mais rápida do solvente orgânico na água, havendo formação mais rápida da partícula. Por outro lado, quando uma maior concentração de polímero foi utilizada, observou-se uma

diminuição do teor, que é representado pelo peso total de sólidos adicionados. Este resultado indica que, nestas condições, seria possível encapsular uma quantidade de ESP-*Ip* superior a 20 mg.

Figura 11. Percentagem de eficiência de encapsulação e teor do marcador ácido clorogênico nas nanopartículas poliméricas. Para 20 mg de extrato = (A) 96 mL e (B) 196 mL usando 50mg de PCL; (C) 96 mL e (D) 196 mL usando 100 mg de PCL. Para 30 mg de extrato = (E) 96 mL e (F) 196 mL usando 50 mg de PLC; (G) 96 mL e (H) 196 mL usando 100 mg de PCL.



As formulações contendo maior quantidade de ESP-*Ip* (30 mg) não apresentaram diferença de EE. Contudo, uma maior concentração de polímero levou à obtenção de um teor menor. As formulações contendo 30 mg apresentaram EE mais elevadas (cerca de 40,0%) do que aquelas contendo 20 mg de ESP-*Ip* (de 10,1 a 25,7%).

Miladi e colaboradores (2015) desenvolveram nanopartículas poliméricas através do método de dupla emulsão por evaporação do solvente e nanoprecipitação. O fármaco de escolha foi o alendronato de sódio, altamente hidrofílico. A técnica mais eficiente para a encapsulação deste fármaco foi a de dupla emulsão, obtendo uma EE de 15 a 34%. Considerando o desafio que é nanoencapsular compostos hidrofílicos, uma EE de 40,0% pode ser considerada bastante alta, como a obtida nesse estudo.

Portanto, as formulações F e H foram selecionadas para dar continuidade aos estudos, compostas de 30 mg de ESP-*Ip*, 196 ml de volume na fase dispersante e 50 ou 100 mg de PCL. Estas duas formulações, com diferentes percentagens de teor, foram selecionadas para analisar se há diferenças em outros parâmetros que serão estudados, como liberação e estabilidade.

4.6 ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS

A avaliação da estabilidade é um parâmetro importante para o controle de qualidade das formulações farmacêuticas. Fatores que podem influenciar a estabilidade das suspensões coloidais estão relacionados, por exemplo, com a adsorção de moléculas ativas à superfície das nanopartículas, presença de tensoativos adsorvidos, agregação das partículas, instabilidade química do polímero, das substâncias ativas ou de outras matérias-primas e, ainda, a liberação prematura da substância ativa (SCHAFFAZICK et al., 2003).

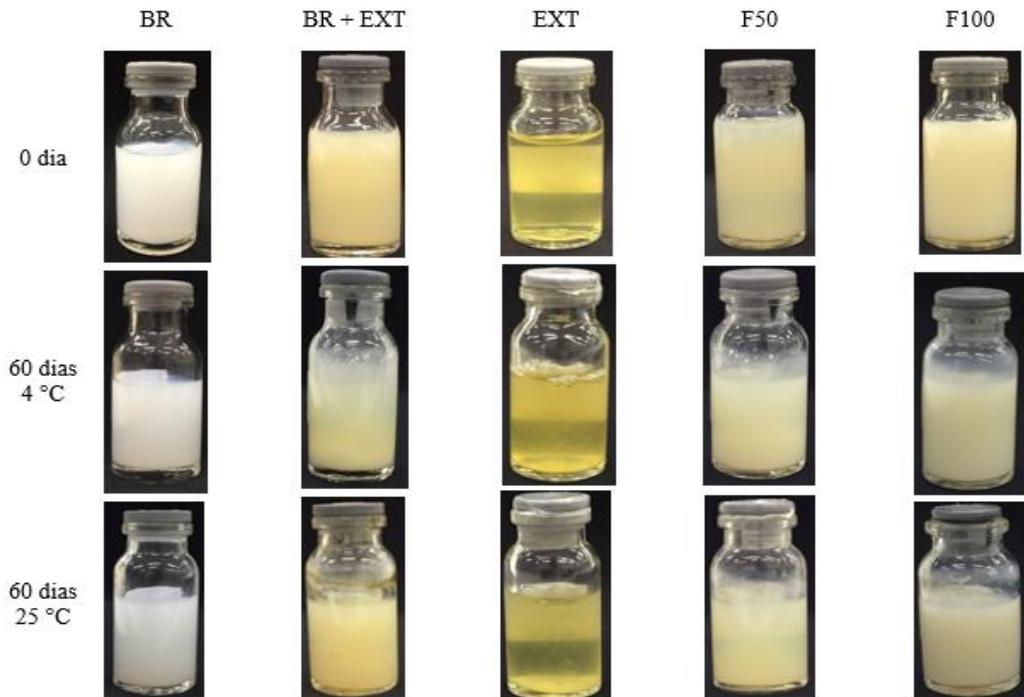
Como comentado anteriormente, as formulações F e H foram selecionadas para análise da estabilidade. Estas formulações apresentam em sua composição 30 mg de ESP-*Ip* e um volume de fase dispersante de 196 ml, diferindo apenas pela presença de 50 (F50) ou 100 mg do polímero PCL (F100). Adicionalmente, como controles, foram avaliadas uma formulação branca (BR), uma mistura física do extrato com nanopartículas (BR+EXT) e o ESP-*Ip* em solução aquosa (EXT), totalizando cinco formulações (Tabela 6, página 58). A análise foi realizada nas temperaturas de 4 e 25 °C e os tempos avaliados foram 0, 5, 15, 30 e 60 dias. Nos tempos pré-determinados, foram avaliados o tamanho médio de partícula, PDI, potencial zeta, pH, concentração do ACG e propriedades físicas.

As propriedades físicas do estudo de estabilidade estão descritas na Tabela 10 e ilustradas na Figura 12. A alteração de cor e a presença ou ausência de sedimentos foram avaliados para todas as cinco amostras, nas temperaturas de 4 e 25 °C. De um modo geral, todas as amostras analisadas apresentaram alteração de cor ao final do experimento, a 25 °C. Os controles extrato aquoso e mistura física da nanopartícula com o extrato mostraram grande instabilidade. As formulações mais estáveis foram a branca e a F100 (com 100 mg de PCL).

Tabela 10. Parâmetros físicos analisados no estudo de estabilidade durante 60 dias, nas temperaturas de 4 e 25 °C. (C = alteração de cor e S = sedimento; (-) = ausência, (+) = pouca presença, (++) = moderada presença, (+++) = muita presença). (BR) branca, sem extrato encapsulado; (BR+EXT) mistura física de nanopartículas brancas com extrato; (EXT) extrato seco padronizado em solução aquosa; (F50) formulação com 50 mg de PCL; (F100) contendo 100 mg de polímero.

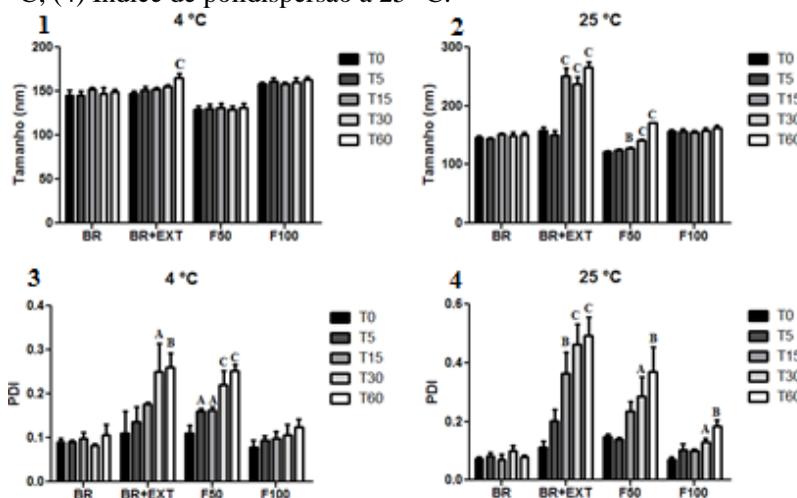
Tempo (dias)	Temperatura (°C)	BR		BR + EXT		F50		F100		Extrato	
		C	S	C	S	C	S	C	S	C	S
0	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	4	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
15	4	-	-	++	++	-	-	-	-	-	+
	25	-	-	++	++	+	-	-	-	+	+
30	4	-	-	+++	+++	+	-	-	-	+	++
	25	+	-	+++	+++	++	+	+	-	+++	+++
60	4	-	-	+++	+++	++	+	-	-	+++	+++
	25	+	-	+++	+++	+++	+	++	-	+++	+++

Figura 12. Fotos representativas do estudo de estabilidade durante 60 dias em relação aos parâmetros físicos a 4 e 25 °C. (BR) branca, sem extrato encapsulado; (BR+EXT) mistura física de nanopartículas brancas com extrato; (EXT) extrato seco padronizado em água; (F50) formulação com 50 mg de PCL; (F100) contendo 100 mg de polímero.



A Figura 13 mostra o tamanho médio de partícula e o PDI obtidos no tempo total de 60 dias em diferentes temperaturas. Via de regra, as suspensões coloidais não apresentam tendência à separação de fases, pois a sedimentação é lenta para partículas de dimensões submicrométricas, sendo ainda minimizada pelo movimento Browniano. Entretanto, o tempo pode induzir a sedimentação, assim como outros fatores podem comprometer a estabilidade destes sistemas (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Figura 13. Gráficos de estabilidade das formulações no período de 60 dias na temperatura de 4 °C e 25 °C. (1) Tamanho médio de partícula a 4 °C; (2) Tamanho médio de partícula a 25 °C; (3) Índice de polidispersão a 4 °C; (4) Índice de polidispersão a 25 °C.



A = $p < 0,05$; B = $p < 0,01$; C = $p < 0,001$

Para a formulação branca, tanto a 4 como em 25 °C, não houve diferenças significativas entre o diâmetro médio e o PDI do tempo inicial ao final do experimento, mostrando uma boa estabilidade do sistema desenvolvido. A estabilidade de sistemas poliméricos nanoestruturados pode variar de acordo com o método de preparação da partícula, pH do meio, temperatura, tempo e radiação a que o sistema foi exposto. Entretanto, alguns estudos avaliaram a estabilidade de nanopartículas poliméricas, por mais de três meses, e observaram que suspensões com PCL apresentaram maior estabilidade quando comparados a outros

polímeros (LEMOINE et al., 1996; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2002).

A inclusão da mistura física do extrato bruto com as nanopartículas poliméricas brancas teve como objetivo avaliar dois aspectos que poderiam afetar a estabilidade da preparação. Por um lado, permitiu analisar o impacto da presença dos componentes da formulação sobre a integridade química do ACG livre, presente em concentração conhecida na fase externa da formulação. Além disso, possibilitou inferir se esta concentração elevada do ACG na fase externa teria efeito sobre as principais características do sistema nanoestruturado. Para esta formulação, na temperatura de 25 °C, não houve alteração significativa de tamanho e PDI apenas nos 5 dias iniciais de experimento, a partir dos quais foi observada a presença de grande quantidade de sedimentos, confirmado pela elevação do tamanho médio de partícula e do PDI. Quando armazenada em geladeira, a suspensão mostrou alteração significativa no PDI a partir do 30º dia quando comparado ao tempo inicial. A alta concentração de extrato no sobrenadante pode ter sido responsável pela sedimentação do polímero nessa suspensão, e principalmente a relação extrato:polímero parece ter influenciado neste sentido, uma vez que F50 também teve alteração do PDI a partir do 15º dia de estudo. Por outro lado, a formulação F100, na qual a concentração de extrato em relação à quantidade de polímero é menor, apresentou boa estabilidade nos 60 dias de experimento. O extrato, quando em meio aquoso, pode sofrer degradação química principalmente pela ação da temperatura (BAKOWSKA; KUCHARSKA; OSZMIANŃSKI, 2003), produzindo compostos que poderiam acelerar a degradação do polímero, e, conseqüente, sedimentação da suspensão.

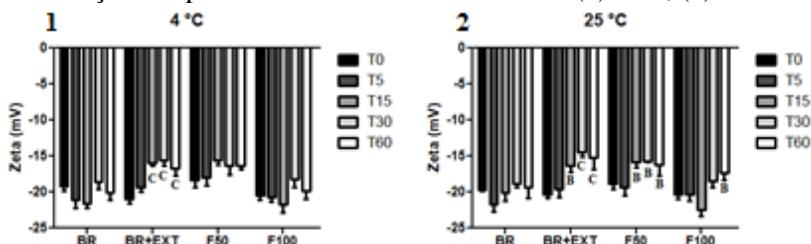
Em temperatura de geladeira, a F50 não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os diâmetros médios de partícula. Entretanto, o PDI, estável até o décimo quinto dia do estudo, aumentou significativamente de valor (0,253) ao final dos 60 dias de análise. É desejável que o PDI, sendo um indicador da dispersão de tamanhos de partícula, apresente um valor inferior ou igual a 0,2, que caracteriza uma população monodispersa (GOVENDER et al., 1999; SCHAFFAZICK et al., 2003; COHEN-SELA et al., 2009). O aumento observado para F50, apesar de significativo, não compromete a qualidade da formulação, uma vez que indica a homogeneidade de tamanhos. Já as formulações F50 armazenadas a 25 °C foram estáveis apenas nos primeiros cinco dias, quando os resultados não apresentaram diferenças estatísticas significantes quando comparados aos do tempo inicial do experimento. A

partir do 15º dia foi observada uma alteração na coloração da formulação e, no mesmo período, um aumento do tamanho médio de partícula e PDI.

A formulação F100 foi considerada estável à 4 °C, pois não apresentou diferenças estatísticas significativas nos parâmetros analisados até o final do experimento. Quando analisada a 25 °C, observou-se diferença estatística significativa no PDI a partir do 30º dia (0,128) quando comparado com o tempo zero (0,070). Contudo, em 60 dias começou a haver alteração de coloração e acentuado aumento no PDI (0,185). Mesmo assim, o PDI é inferior a 0,200, e portanto, a formulação ainda é considerada monodispersa. Estes resultados indicam que uma maior concentração de polímero em relação aos outros componentes da formulação parece contribuir decisivamente para a manutenção do diâmetro médio de partícula e PDI, indicadores de estabilidade.

Os gráficos para a avaliação do potencial zeta das formulações ao longo dos 60 dias estão expostos na Figura 14. O potencial zeta negativo das suspensões deve-se provavelmente à presença de grupos carboxílicos terminais na molécula do polímero PCL (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2011). No período de 60 dias, à temperatura de 4 °C, apenas a mistura física (BR+EXT) apresentou diferença estatística significativa em relação ao tempo inicial. Este resultado já era esperado devido aos resultados anteriores de aumento de tamanho de partícula e PDI evidenciando uma alteração do sistema. As outras suspensões analisadas nesta temperatura não mostraram mudanças significativas nos valores de potencial zeta ao longo dos 60 dias. Entretanto, analisando as suspensões armazenadas na temperatura de 25 °C, apenas a formulação branca não apresentou alteração no potencial zeta ao longo dos 60 dias. A mistura física e a F50 mostraram diferenças a partir do 15º dia e a F100 no final da análise. Estes dados concordam com o início da alteração dos valores de tamanho de partícula dessas suspensões.

Figura 14. Gráficos de potencial zeta para avaliação da estabilidade das formulações no período de 60 dias à 4 °C e 25 °C. (1) 4 °C; (2) 25 °C.

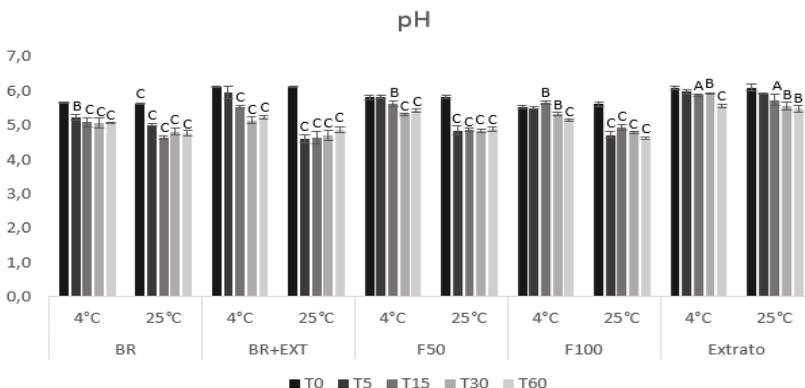


A = $p < 0,05$; B = $p < 0,01$; C = $p < 0,001$

O potencial zeta traduz a carga superficial das partículas de um sistema coloidal. Considera-se que elevados valores de potencial zeta, acima de 20 mV em módulo, conferem boa estabilidade físico-química à formulação, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação que possa ocorrer em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes (SCHAFFAZICK et al., 2003). No caso das formulações avaliadas, apesar dos valores encontrados não serem considerados muito elevados, a estabilidade das formulações pode estar relacionada com a proteção conferida pelo emulsionante utilizado. O tensoativo poloxamer oferece estabilidade para a partícula, através de impedimento estérico, evitando a agregação de partículas finas no sistema coloidal (YAN et al., 2010).

A Figura 15 mostra os valores de pH das suspensões e do ESP-*Ip* em solução aquosa durante os 60 dias de análise. Foram observadas diferenças estatísticas significantes no modelo utilizado entre os tempos inicial e final para todas as análises de pH, independente da temperatura analisada. Como a formulação sem extrato encapsulado também mostrou redução significativa dos valores de pH, este fato pode estar relacionado à degradação do polímero. O aumento da acidez poderia ocasionar a hidrólise do poliéster, induzindo o relaxamento das cadeias poliméricas do PCL, fato que poderia gerar uma maior exposição de grupos ácidos carboxílicos terminais e a produção do ácido hidroxicapróico como resultado da degradação do PCL (LACOULONCHE et al., 1999; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2002).

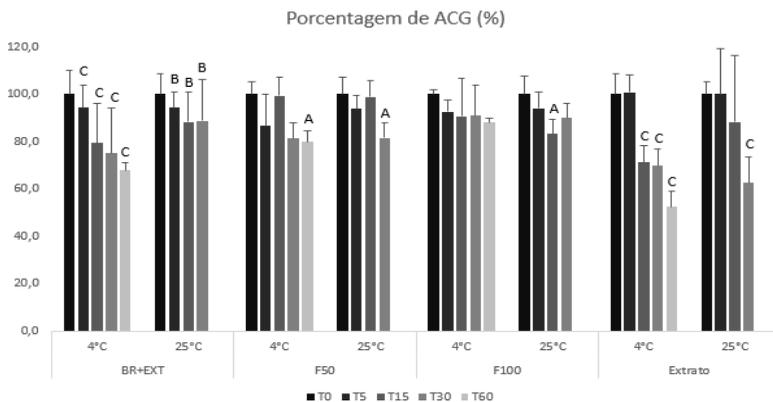
Figura 15. Análise do pH das suspensões durante dos 60 dias para a avaliação da estabilidade.



A redução do pH no restante das suspensões pode indicar, além de uma possível hidrólise do polímero, provável degradação do ACG do ESP-*Ip*. Narita e Inouye (2013) demonstraram que a degradação do ACG é tempo e pH dependente e essa taxa é maior em pH mais altos.

O decaimento do pH com o passar o tempo, sugerindo degradação do ACG, é confirmada na Figura 16, no qual todas as amostras tiveram redução da concentração do ACG em relação ao tempo inicial.

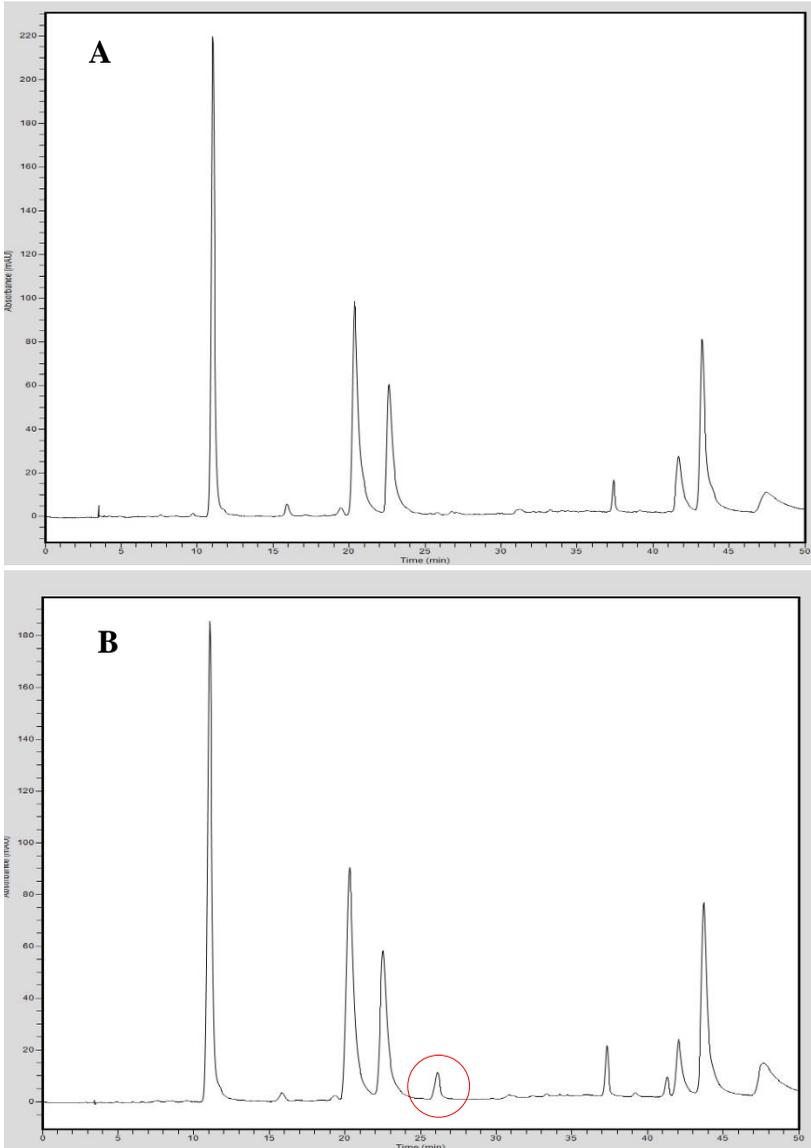
Figura 16. Teor de ácido clorogênico nas amostras para a avaliação da estabilidade durante os 60 dias.



* Em 25 °C não foi possível quantificar o ACG no tempo 60 dias em todas as suspensões.

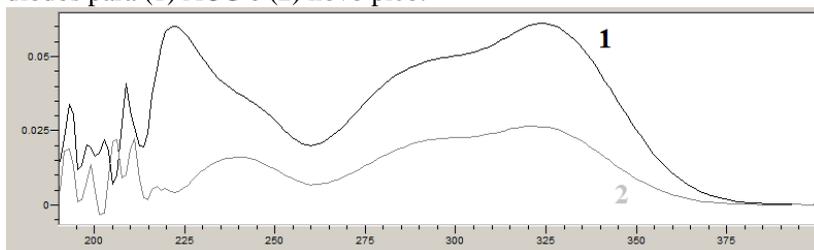
Um dos principais benefícios atribuídos à nanoencapsulação é a proteção das substâncias ativas, especialmente no que se refere à manutenção de sua estabilidade química. Na quantificação do ACG nas formulações por CLAE foi possível evidenciar este efeito. No armazenamento a 4 °C, a maior redução na concentração do ACG foi observada nos controles ESP-*Ip* em solução aquosa e mistura física de nanopartículas com extrato. Analisando minuciosamente os cromatogramas obtidos (Figura 17) foi possível observar o aparecimento de um pico, com tempo de retenção (TR) de 25,8 min, a partir do 5° dia, cuja área foi aumentando em função do tempo. Para as amostras de ESP-*Ip* em solução aquosa e BR+EXT, com o passar do tempo, a concentração do ACG diminuiu à medida que esse novo pico aparece, o que não acontece em F50 e F100.

Figura 17. Cromatogramas representativos do estudo de estabilidade a 4 °C para o extrato aquoso. Tempos: (A) 0 e (B) 60 dias de experimento. Destaque: surgimento e aumento da área do pico com tempo de retenção de 25,8 min.



O ACG é um éster conjugado do ácido quínico com ácido cafeico. Estudos sugerem que o ACG em solução aquosa pode degradar por hidrólise com a subsequente formação de ácidos fenólicos livres (quínico, cumárico, cafeico e ferúlico) (DE OLIVEIRA; BASTOS, 2011; OLTHOF et al., 2003; RECHNER; PANNALA; RICE-EVANS, 2001). A Figura 18 mostra os espectros totais obtidos no detector ultravioleta por arranjo de diodos (DAD) do ACG e do novo pico. Os comprimentos de onda máximos para o ACG foram de 220, 290 e 320 nm, e para o novo pico foram 240, 290 e 320 nm, sendo considerados similares. Desta maneira, o aparecimento do novo pico no cromatograma pode ser consequência da hidrólise de ACG e indicar a presença de um composto fenólico.

Figura 18. Espectro obtido usando detector ultravioleta por arranjo de diodos para (1) ACG e (2) novo pico.



Em contrapartida, a 4 °C, as suspensões F50 e F100 mostraram menor degradação do ACG com o passar do tempo. A F100 apresentou os melhores resultados, tendo sido observada uma redução de apenas 9,1% do total do ACG adicionado, ao final dos 60 dias de análise. Contudo, com essa análise não foi possível determinar se houve erosão das nanopartículas e consequente liberação do extrato para o meio aquoso ou, ainda, a degradação do ACG presente no meio externo. Entretanto, é evidente que a presença do polímero confere estabilidade para o ACG, sendo proporcional à quantidade de PCL adicionada na formulação.

Para a temperatura de 25 °C não foi possível quantificar o ACG no tempo de 60 dias, devido à elevada alteração física do sistema (presença de sedimento e mudança de cor). De um modo geral, a percentagem do ACG apresenta um acentuado decaimento, mas não foi possível a análise no tempo total de experimento.

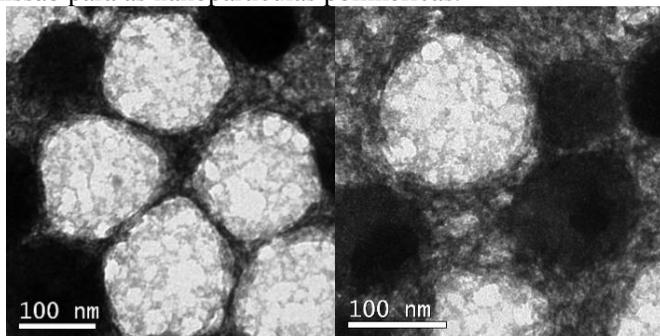
Este estudo evidenciou a proteção conferida pelas nanopartículas ao marcador químico do extrato, bem como a manutenção das principais características das suspensões, especialmente quando uma maior

quantidade de polímero foi adicionada à formulação. Portanto, a formulação F100 foi selecionada para dar continuidade aos estudos (NP-Ip).

4.7 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DAS NANOPARTÍCULAS

A Figura 19 mostra a morfologia da NP-Ip obtidas por MET. Essa técnica tem sido muito empregada na obtenção de informações relativas à forma e ao tamanho da partícula (SCHAFFAZICK et al., 2003). As micrografias mostram partículas de formato esférico, isoladas, com dispersão de tamanho, e com um diâmetro de partícula que concorda com o observado pela técnica de espalhamento de luz dinâmico. Além disso, a imagem mostra uma estrutura heterogênea, na qual podem ser percebidos domínios com um aspecto diferenciado da matriz da nanopartícula. Esta estrutura é compatível com imagens de nanopartículas obtidas pela técnica de dupla emulsão, nas quais a substância encapsulada está dispersa na matriz polimérica em função de sua localização na fase interna aquosa da primeira emulsão (FLORENCE; WHITEHILL, 1981).

Figura 19. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão para as nanopartículas poliméricas.



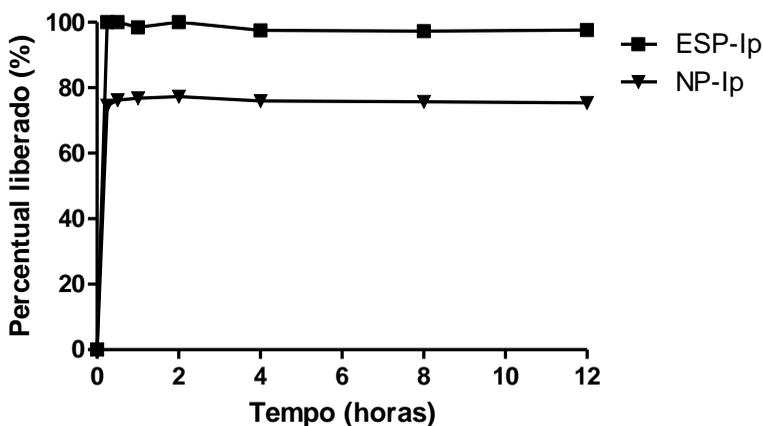
4.8 LIBERAÇÃO *in vitro* DO ÁCIDO CLOROGÊNICO A PARTIR DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

A liberação da substância encapsulada a partir de nanoestruturas poliméricas, assim como a biodegradação do polímero, são fatores importantes para o desenvolvimento de uma formulação bem sucedida. O perfil de liberação depende da dessorção da substância ativa da superfície

das partículas, da difusão através do polímero, além da degradação da matriz (SOPPIMATH et al., 2001).

A Figura 20 mostra os perfis de liberação da NP-Ip e de uma mesma concentração do ESP-Ip em solução aquosa em 24 horas. No primeiro tempo de experimento, houve a liberação total do ACG do ESP-Ip, demonstrando que as condições do ensaio favoreceram a difusão do marcador. Em relação ao perfil de liberação dos nanocarreadores, nos 15 minutos iniciais foi observada uma liberação de cerca de 75% do marcador. Isso pode ser atribuído à porção do ACG não encapsulado (cerca de 60%, considerando uma EE de aproximadamente 40%) e associado à superfície da partícula (IQBAL et al., 2015a). Quando a encapsulação é feita com um fármaco hidrofílico, este tende a se adsorver na superfície da partícula (KO et al., 2015), apresentando, via de regra, uma rápida liberação inicial.

Figura 20. Perfil de liberação das nanopartículas otimizadas contendo extrato padronizado de *Ilex paraguariensis*.



Após a liberação inicial, não houve aumento da liberação até o final do experimento. A principal forma de degradação do polímero PCL é por hidrólise, através da difusão da água, inicialmente nas zonas amorfas, seguido por fragmentação aleatória e, por fim, difusão e metabolismo pelas células imunológicas (LACOULONCHE et al., 1999). Para isso, o polímero pode necessitar de tempo para a hidratação. Quando o polímero se torna hidratado, a temperatura de transição vítrea é reduzida, assim como a resistência à transferência de massa. Isso permite a degradação do

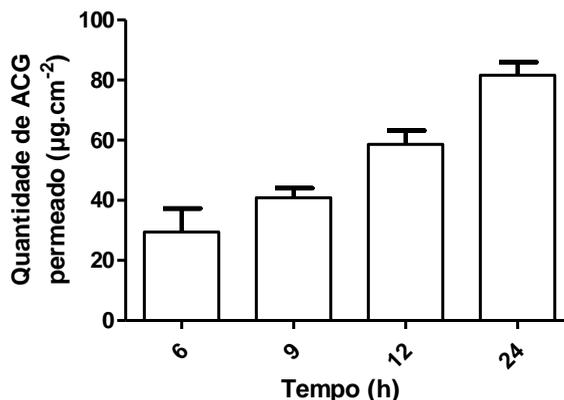
polímero e posterior difusão dos compostos encapsulados (LEE et al., 2013). Miladi e colaboradores (2015) encapsularam alendronato de sódio, um fármaco altamente hidrofílico, por dupla emulsão utilizando a PCL como material polimérico. Esses autores, após análise dos dados matemáticos, concluíram que o mecanismo de liberação do fármaco foi uma combinação de difusão do fármaco com fenômenos de relaxamento do polímero, entretanto, o tempo total de experimento foi superior a 24 horas.

4.9 AVALIAÇÃO DA PERMEACÃO/RETENÇÃO CUTÂNEA *ex vivo* DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS EM CÉLULAS DE DIFUSÃO DE FRANZ

A interação das nanopartículas com a pele depende de propriedades físico-químicas, como tamanho, carga da superfície, características do material usado, além do modo de aplicação da formulação (DESAI; PATLOLLA; SINGH, 2010). O modelo de permeação usando tecido animal foi proposto para verificar a retenção/permeação de sistemas nanoestruturados na pele. A pele de orelha suína foi selecionada devido à similaridade anatômica em relação à humana, além de ser considerado um tecido viável para o modelo de permeação (SIMON; MAIBACH, 1982).

O perfil de permeação do ESP-*Ip* em solução aquosa na pele suína é mostrado na Figura 21. Quando comparado com o total do ACG inicialmente adicionado no estudo, 31,60% permeia a pele. O coeficiente de permeabilidade ($1,5 \times 10^{-2} \text{ cm.h}^{-1}$) e o fluxo ($4,85 \mu\text{g.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$) em 12 horas foram maiores do que os relatados na literatura ($2,4 \times 10^{-3} \text{ cm.h}^{-1}$, e $0,48 \mu\text{g.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$, respectivamente, em 72 horas) (MARTI-MESTRES et al., 2007). O diferente tempo experimental considerado em cada uma das abordagens explica este resultado. O ACG é instável em pH próximo do fisiológico (NARITA; INOUE, 2013) e, como consequência, parte do que é permeado acaba sendo degradado ao longo do tempo. Tendo conhecimento deste fato, o nosso estudo priorizou uma solução tamponante na qual o composto fosse mais estável e ensaios de estabilidade foram também posteriormente considerados. Para o cálculo dos parâmetros de permeabilidade (fluxo e coeficiente de permeabilidade), considerou-se apenas o intervalo até 12 horas, que é o período no qual foi obtida uma relação linear entre quantidade permeada e tempo, indicando indiretamente que o fármaco é estável nesta faixa.

Figura 21. Perfil de permeação em pele de orelha suína do ácido clorogênico a partir do extrato seco padronizado em solução aquosa. Os dados são representados pela média \pm DP (n = 3).



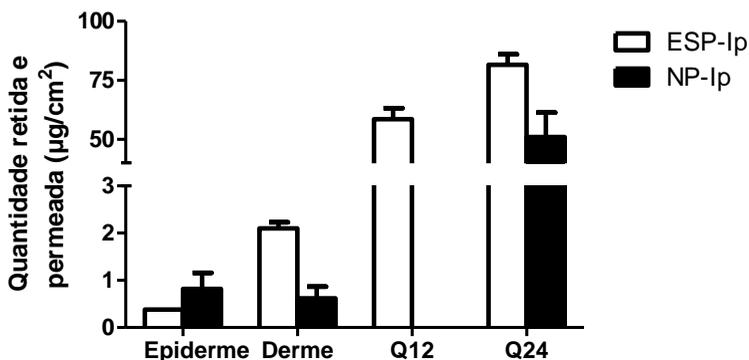
* Parâmetros de permeação consideraram apenas a faixa linear (intervalo até 12 horas de experimento).

Embora o ACG, a partir do ESP-*Ip* em solução aquosa, tenha sido absorvido, o mesmo não ocorreu após o tratamento com o NP-*Ip*, que só permeou a pele em 24 horas, portanto não foi possível realizar os cálculos de permeabilidade para essa amostra. O ACG mostrou alta afinidade pelos componentes da nanoestrutura, que resultou em baixa taxa de liberação e, conseqüentemente, permeação. Cabe reforçar que o composto necessita primeiramente ser liberado para, na sequência, permear as diferentes camadas da pele.

A Figura 22 mostra que o ESP-*Ip* em solução aquosa apresentou maior retenção do ACG na derme do que na epiderme. Isto se deve ao caráter hidrofílico do ACG ($\log P = -1$) e ao fato da derme apresentar maior hidrofiliicidade que a epiderme. Para permear o estrato córneo até a derme, o ACG pode sofrer difusão através dos poros na pele ou utilizar vias alternativas (MITRAGOTRI, 2003). Marti-Mestres e colaboradores (2007) avaliaram a permeação do ACG através de pele suína. Estes autores evidenciaram, por meio da avaliação dos parâmetros de fluxo, perfil de permeação e fotos utilizando microscopia de fluorescência, que o ACG é capaz de ultrapassar a principal barreira da pele, o estrato córneo. A absorção de compostos químicos na pele é determinada pelas propriedades físico-químicas. O ACG tem baixo peso molecular (354 g/mol) e $\log P = -1$, características que possibilitam absorção percutânea.

Já para as NP-*Ip*, o perfil de retenção foi oposto. O ACG teve maior retenção nas camadas superiores da pele, o que já era esperado. Há vários estudos mostrando que as nanopartículas aumentam a quantidade de fármaco nas camadas mais superficiais (CAON et al., 2014; JEAN et al., 2016). Este acúmulo de nanopartículas depositadas na epiderme pode ser devido ao fato da permeação estar relacionada com o tamanho de partícula (ZHANG et al., 2010) e serem grandes para permear por difusão passiva (WATKINSON et al., 2013). Portanto, o sistema nanoestruturado pode servir como reservatório na epiderme para a liberação controlada do ACG, que seria um comportamento ideal para o uso tópico.

Figura 22. Quantidade do ácido clorogênico do extrato seco padronizado em solução aquosa e da nanopartícula padronizada retidas na derme e epiderme e permeado no tempo de 12 (Q12) e 24 horas (Q24) em pele de orelha suína. Os dados são representados pela média \pm DP (n = 5).

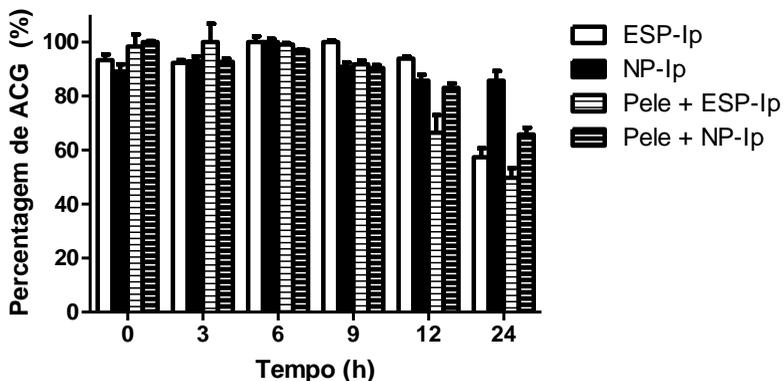


4.10 AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO EM CÉLULAS DE DIFUSÃO DE FRANZ

Quando se considera o balanço de massa final, que nada mais é do que o percentual total de composto recuperado em relação à quantidade inicial, observou-se que foi obtida uma baixa recuperação para o tratamento apenas com o ESP-*Ip* (Figura 23). Utilizando tampão fosfato pH 5,5 como meio de liberação, após 24 horas, o ACG apresentou degradação de 42,7% do total do ESP-*Ip* em solução aquosa inicialmente adicionado. Entretanto, para os NP-*Ip*, no final do teste, apenas 14,4% do ACG foram degradados. Estes dados mostram que o ACG foi estável em tampão pH 5,5 nas primeiras 12 horas, demonstrando que a degradação

desse composto foi tempo dependente (NARITA; INOUE, 2013). Além disso, os resultados mostraram que o polímero da suspensão de nanopartículas protegeu o ACG.

Figura 23. Percentagem do ácido clorogênico ao longo de 24 horas de experimento.



Quando o tampão foi homogeneizado com pele de orelha suína, logo após 12 horas, foi observado 33,6% de degradação do ACG no ESP-Ip e, após 24 horas, 50,2%. Quando as NP-Ip foram analisadas, na metade do tempo total experimental, 17,0% e, após 24 horas, 34,2% do ACG foram degradados. A maior degradação do composto observada na presença da pele em relação ao tratamento apenas com a solução tampão sinalizou para uma possível ação enzimática, o que parece ser bem plausível visto que o ACG apresenta sítios lábeis para a ação de esterases (FARAH; DUARTE, 2015).

5 CONCLUSÕES

- O material vegetal, folhas sapecadas de *Ilex paraguariensis*, foi fracionado de acordo com a faixa granulométrica. A fração folha apresentou maior concentração de teor de extrativos e foi selecionada para continuar o estudo.
- O estudo de padronização da extração, utilizando a técnica de turbo-extração, evidenciou como condições eficientes para a extração dos compostos de interesse uma concentração de MPV de 10 %, com etanol 20 % como líquido extrator, com o tempo de extração de 5 minutos e velocidade de agitação de 13.500 rpm, tendo sido este extrato posteriormente seco por liofilização.
- O potencial antioxidante do extrato padronizado foi avaliado, utilizando o radical DPPH, mostrando um valor de IC₅₀ satisfatório (51,70 µg/ml) quando comparado com o padrão de ácido gálico (11,83 µg/ml).
- Nanopartículas de poli-ε-caprolactona contendo extrato seco padronizado foram desenvolvidas pela técnica de dupla emulsão seguida de evaporação do solvente. Os componentes selecionados foram PLU 1% como tensoativo, volume de fase aquosa da primeira emulsão de 200 µl e PCL como material polimérico. Duas concentrações de polímero foram utilizadas, 50 e 100 mg, e a caracterização das formulações brancas mostrou tamanho de partícula de 134 e 194 nm, PDI com 0,076 e 0,113 e potencial zeta de -18 e -15 mV, respectivamente.
- O aumento do volume da fase dispersante influenciou positivamente a EE das formulações, provavelmente devido a uma mais rápida difusão do solvente para a fase externa aquosa, resultando na diminuição do tempo de formação das partículas. Da mesma forma, uma maior EE foi obtida pela adição de maior quantidade de ESP-*Ip*. As duas formulações selecionadas para dar continuidade aos estudos continham 30 mg de extrato, 196 ml de volume na fase dispersante e 50 mg de PCL (EE de 38% e teor de 18%) ou 100 mg do polímero (41% de EE e 10% de teor). Mesmo quando se utiliza uma técnica de preparação específica

para a encapsulação de compostos hidrofílicos, estes valores de EE e teor podem ser considerados elevados.

- A formulação que apresentou maior estabilidade com relação às propriedades físicas, tamanho e PDI, potencial zeta e concentração do ACG depois de 60 dias, em temperatura de armazenamento de 4 °C, foi a preparada com 100 mg de PCL. Este melhor desempenho foi atribuído a uma maior concentração de polímero em relação à quantidade de extrato presente na formulação.
- As micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão evidenciaram a formação de nanopartículas esféricas e com pouca variação de tamanho.
- O perfil de liberação da NP-IP evidenciou uma rápida liberação do marcador ACG, o que pode ser atribuído à porção de marcador químico livre e associado à superfície da partícula. Após a liberação inicial, a percentagem do ACG liberada se manteve constante até o final do experimento.
- No estudo de estabilidade durante 60 dias, foi possível observar a diminuição da concentração do ACG simultaneamente ao aparecimento de um novo pico nos cromatogramas, o que pode estar relacionado à hidrólise deste ácido. O espectro obtido no DAD mostrou que o novo composto tem similaridade com fenólicos. No entanto, esta redução foi menor nas NP-IP, indicando que a encapsulação pode proteger o ACG da degradação.
- O perfil de permeação da solução aquosa de ESP-IP e da NP-IP foi avaliado em pele suína usando o modelo de permeação em célula de Franz durante 12 horas. Neste período foi obtida uma relação linear entre a quantidade permeada e o tempo, indicando indiretamente a estabilidade do fármaco.
- Durante o tempo de ensaio da permeação das NP-IP, não foi detectada a presença de ACG no compartimento receptor da célula de difusão de Franz, sugerindo que a nanoestrutura não foi absorvida através da pele.

- O ESP-*Ip* apresentou maior retenção de ACG na derme do que na epiderme. Isso se deve ao caráter hidrofílico do ACG e a derme apresentar maior hidrofilicidade que a epiderme.
- A partir do perfil de retenção, o ACG encapsulado nas nanopartículas apresentou maior acúmulo nas camadas superiores da pele. Portanto, o sistema nanoestruturado desenvolvido tem potencial para atuar como reservatório de ACG na epiderme, podendo ser utilizado como um sistema de controle da liberação tópica deste polifenol.
- No estudo de degradação do ACG realizado em modelo de célula de Franz utilizando tampão fosfato pH 5,5 ou tampão com homogeneizado de pele suína foi observada uma maior degradação do composto na presença da pele, sinalizando para uma possível ação enzimática, o que parece ser bem plausível visto que o ACG apresenta sítios lábeis para a ação de esterases.
- Face aos resultados apresentados, a formulação desenvolvida e caracterizada neste estudo pode ser considerada promissora no intuito de obter um produto fitoterápico de uso tópico, com ação antioxidante, contendo extrato padronizado de *Ilex paraguariensis*.

6 REFERÊNCIAS

- ADITYA, N. P. et al. Co-delivery of hydrophobic curcumin and hydrophilic catechin by a water-in-oil-in-water double emulsion. **Food Chemistry**, v. 173, p. 7–13, 2015.
- ALVAREZ-ROMÁN, R. et al. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 99, n. 1, p. 53–62, 2004.
- AMASS, W.; AMASS, A; TIGHE, B. A review of biodegradable polymers: Uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies. **Polymer International**, v. 47, n. 2, p. 89–144, 1998.
- ANESINI, C. et al. Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). **Food Science and Technology**, v. 45, n. 2, p. 299–304, 2012.
- ARÇARI, D. P. et al. The in vitro and in vivo effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on adipogenesis. **Food chemistry**, v. 141, n. 2, p. 809–15, 2013.
- AREND, D. P. et al. Experimental design as a tool to evaluate chlorogenic and caffeic acids extracted from *Cecropia glaziovii* Sneth. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n. 1, p. 58–68, 2011.
- ASTETE, C. E.; SABLIOV, C. M. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. **Journal of Biomaterials Science**, v. 17, n. 3, p. 247–289, 2006.
- BAGDAS, D. et al. *In vivo* systemic chlorogenic acid therapy under diabetic conditions: wound healing effects and cytotoxicity/genotoxicity profile. **Food and Chemical Toxicology**, v. 81, p. 54–61, 2015.
- BAKOWSKA, A.; KUCHARSKA, A. Z.; OSZMIAŃSKI, J. The effects of heating, UV irradiation, and storage on stability of the anthocyanin-polyphenol copigment complex. **Food Chemistry**, v. 81, n. 3, p. 349–355, 2003.
- BAROLI, B. Penetration of Nanoparticles and Nanomaterials in the Skin: Fiction or Reality? **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 1, p. 21–50, 2009.

BARROSO, M. R. et al. Exploring the antioxidant potential of *Helichrysum stoechas* (L.) Moench phenolic compounds for cosmetic applications: Chemical characterization, microencapsulation and incorporation into a moisturizer. **Industrial Crops and Products**, v. 53, p. 330–336, 2014.

BASF. Pluronic F68 Block Copolymer Surfactant. **Technical Bulletin**, 2004.

BERINGHS, A. O. Estratégias tecnológicas para incorporação de microesferas contendo extrato padronizado de *Cecropia glaziovii* Snethl. obtido por turboextração em sistemas carreadores multiparticulados. Dissertação (mestrado) - **Programa de Pós-Graduação em Farmácia**, Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

BERTÉ, K.; RUCKER, N.; HOFFMANN-RIBANI, R. Yerba maté *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. **Phytotherapie**, v. 9, n. 3, p. 180–184, 2011.

BIXBY, M. et al. *Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: A comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. **Life Sciences**, v. 77, n. 3, p. 345–358, 2005.

BLANCO, M.; ALONSO, M. Development and characterization of protein-loaded poly (lactide-co-glycolide) nanospheres. **European Journal of Pharmaceutics and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 287-294, 1997.

BLUM-SILVA, C. H. et al. The influence of leaf age on methylxanthines, total phenolic content, and free radical scavenging capacity of *Ilex paraguariensis* aqueous extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 1, p. 1–6, 2015.

BRACESCO, N. et al. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, p. 378–384, 2011.

BRACESCO, N. M. et al. Antioxidant Activity of a Botanical Extract Preparation. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 9, n. 3, p. 379–387, 2003.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 4^o. ed. Brasília, 1988.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 5°. ed. Brasília, 2010.

BUNDESVEREINIGUNG. Deutscher Apothekerverbaende (Hrgs.). **Deutsche Arzneimittel**, v. 1, n. Codex-Probe, p. 9, 1986.

CAON, T. et al. Chitosan-decorated polystyrene-b-poly(acrylic acid) polymersomes as novel carriers for topical delivery of finasteride. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, p. 165–72, 2014.

CAON, T. et al. Novel perspectives in the tuberculosis treatment: Administration of isoniazid through the skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 494, n. 1, p. 463–70, 2015.

CHANDRA, S.; DE MEJIA, E. G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3583–3589, 2004.

CHEN, W.-C. et al. Effect of Topical Application of chlorogenic acid on excision wound healing in rats. **Planta Medica**, v. 79, n. 08, p. 616–621, 2013.

COHEN-SELA, E. et al. A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 133, n. 2, p. 90–95, 2009.

DA SILVA, F. A. Avaliação tecnológica e atividade antioxidante de produtos secos por spray-drying de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. - Aquifoliaceae (erva-mate). Tese (doutorado) - **Programa de Pós-Graduação em Farmácia**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2007.

DA SILVEIRA, T. F. F. et al. The effect of the duration of infusion, temperature, and water volume on the rutin content in the preparation of mate tea beverages: An optimization study. **Food Research International**, v. 60, p. 241–245, 2014.

DE MORAIS, E. C. et al. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL - cholesterol reduction in individuals on statin therapy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 8316–8324, 2009.

DE OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1051–1056, 2011.

DE SOUZA, L. M. et al. Comprehensive analysis of maté (*Ilex paraguariensis*) compounds: Development of chemical strategies for matesaponin analysis by mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 41, p. 7307–7315, 2011.

DELADINO, L. et al. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 1, p. 126–134, 2008.

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

DOMÍNGUEZ-VILLEGAS, V. et al. Development and characterization of two nano-structured systems for topical application of flavanones isolated from *Eysenhardtia platycarpa*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 116, p. 183–192, 2014.

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

FARAH, A.; DUARTE, G. Bioavailability and Metabolism of Chlorogenic Acids from Coffee. **Coffee in Health and Disease Prevention**, p. 789–801, 2015.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: UFRGS, E. DA; UFSC, E. DA (Eds.). . **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 1°. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, p. 210–211, 1999.

FERNANDES, C. E. F. et al. Phytochemical profile, antioxidant and hypolipemiant potential of *Ilex paraguariensis* fruit extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 81, p. 139–146, 2016.

FILIP, R. et al. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v. 72, n. 7, p. 774–778, 2001.

FILIP, R. M. S. et al. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Research**, v. 20, n. 10, p. 1437–1446, 2000.

FLORENCE, A. ; WHITEHILL, D. Some features of breakdown in water-in-oil-in-water multiple emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 79, n. 1, p. 243–256, 1981.

GOVENDER, T. et al. 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.

GOYAL, R. et al. Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery. **Journal of Controlled Release**, 2015.

GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: Induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 344, n. 224, p. 338–344, 1996.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug target insights**, v. 2, p. 147–157, 2007.

HAN, K. et al. Preparation and evaluation of poly(L-lactic acid) microspheres containing rhEGF for chronic gastric ulcer healing. **Journal of Controlled Release**, v. 75, n. 3, p. 259–69, 2001.

HARRIS, R. et al. Chitosan nanoparticles and microspheres for the encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 2, p. 803–806, 2011.

HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. 138–51, 2007.

HUNG, C.-F. et al. Cutaneous penetration of soft nanoparticles via photodamaged skin: Lipid-based and polymer-based nanocarriers for drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 94, p. 94–105, 2015.

IBGE. Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, v. 28, 2013.

IQBAL, M. et al. Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, 2015a.

IQBAL, M. et al. Submicron polycaprolactone particles as a carrier for

imaging contrast agent for *in vitro* applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, p. 488–495, 2015b.

ISOLABELLA, S. et al. Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 695–699, 2010.

JAISWAL, R. et al. Profiling and characterization by LC-MSn of the chlorogenic acids and hydroxycinnamoylshikimate esters in maté (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 5471–5484, 2010.

JEAN, Y. et al. In-vitro evaluation of griseofulvin loaded lipid nanoparticles for topical delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 31, p. 1–10, 2016.

KAUR, I. P.; KAPILA, M.; AGRAWAL, R. Role of novel delivery systems in developing topical antioxidants as therapeutics to combat photoageing. **Ageing Research Reviews**, v. 6, n. 4, p. 271–288, 2007.

KO, P.-T. et al. Polymer microneedles fabricated from PCL and PCL/PEG blends for transdermal delivery of hydrophilic compounds. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 51, p. 1–8, 2015.

KÜCHLER, S. et al. SLN for topical application in skin diseases-Characterization of drug-carrier and carrier-target interactions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 390, n. 2, p. 225–233, 2010.

LACOULONCHE, F. et al. 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.

LARESE FILON, F. et al. Nanoparticles skin absorption: New aspects for a safety profile evaluation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 72, n. 2, p. 310–322, 2015.

LEE, Y. S. et al. Production of nanoparticles-in-microparticles by a double emulsion method: A comprehensive study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 83, n. 2, p. 168–173, 2013.

LEMOINE, D. et al. Stability study of nanoparticles of poly(-caprolactone), poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide). **Biomaterials**, v. 17, n. 22, p. 2191–2197, 1996.

LIU, D. et al. Permeation measurement of gestodene for some biodegradable materials using Franz diffusion cells. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 4, p. 413–420, 2015.

LUCCA, L. G. et al. Determination of β -caryophyllene skin permeation/retention from crude copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne) and respective oil-based nanoemulsion using a novel HS-GC/MS method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 104, p. 144–8, 2015.

LÜCKEMEYER, D. D. et al. Effects of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (yerba mate) on herpes simplex virus types 1 and 2 replication. **Phytotherapy research : PTR**, v. 26, n. 4, p. 535–40, 2012.

MARTI-MESTRES, G. et al. The “*in vitro*” percutaneous penetration of three antioxidant compounds. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 331, n. 1, p. 139–144, 2007.

MILADI, K. et al. Encapsulation of alendronate sodium by nanoprecipitation and double emulsion: From preparation to *in vitro* studies. **Industrial Crops and Products**, v. 72, p. 24–33, 2015.

MISHRA, B.; PATEL, B. B.; TIWARI, S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 9–24, 2010.

MITRAGOTRI, S. Modeling skin permeability to hydrophilic and hydrophobic solutes based on four permeation pathways. **Journal of Controlled Release**, v. 86, n. 1, p. 69–92, 2003.

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

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification–diffusion methods. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 163, n. 2, p. 90–122, 2011.

MORGEN, M. et al. Targeted delivery of a poorly water-soluble compound to hair follicles using polymeric nanoparticle suspensions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 416, n. 1, p. 314–322, 2011.

MUCHOW, M.; MAINCENT, P.; MULLER, R. H. Lipid nanoparticles with a solid matrix (SLN, NLC, LDC) for oral drug delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 34, n. 12, p. 1394–405, 2008.

MURAKAMI, A. N. N. et al. Concentration of biologically active compounds extracted from *Ilex paraguariensis* St. Hil. by nanofiltration. **Food Chemistry**, v. 141, n. 1, p. 60–65, 2013.

NARITA, Y.; INOUE, K. Degradation Kinetics of Chlorogenic Acid at Various pH Values and Effects of Ascorbic Acid and Epigallocatechin Gallate on Its Stability under Alkaline Conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 966–972, 2013.

NEGRÃO MURAKAMI, A. N. et al. Concentration of phenolic compounds in aqueous mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) extract through nanofiltration. **Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 2211–2216, 2011.

NUNES, G. L. et al. Microencapsulation of freeze concentrated *Ilex paraguariensis* extract by spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 151, p. 60–68, 2014.

OH, J. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 403–409, 2013.

OLTHOF, M. R. et al. Chlorogenic Acid, Quercetin-3-Rutinoside and Black Tea Phenols Are Extensively Metabolized in Humans. **The Journal of Nutrition**, v. 133, p. 1806–1814, 2003.

PEREIRA, D. F. et al. Influence of the traditional Brazilian drink *Ilex paraguariensis* tea on glucose homeostasis. **Phytomedicine**, v. 19, n. 10, p. 868–877, 2012.

PHROMVIYO, N.; SWATSITANG, E.; CHOMPOOSOR, A. Effect of a surface stabilizer on the formation of polyoxalate nanoparticles and their release profiles. **Vacuum**, v. 107, p. 208–212, 2014.

PINEAU, A. et al. In vitro study of percutaneous absorption of aluminum from antiperspirants through human skin in the FranzTM diffusion cell. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 110, p. 21–26, 2012.

PINNELL, S. R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. **Journal of the American Academy of**

Dermatology, v. 48, n. 1, p. 1–22, 2003.

PINTO REIS, C. et al. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 8–21, 2006.

POHLMANN, A. R. et al. Poly (ε-caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 10, n. 5, p. 623–638, 2013.

PUANGPRAPHANT, S.; DE MEJIA, E. G. Saponins in yerba mate tea (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) and quercetin synergistically inhibit iNOS and COX-2 in lipopolysaccharide-induced macrophages through NFB pathways. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 19, p. 8873–8883, 2009.

QUINTANAR-GUERRERO, D. et al. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. **Pharmaceutical Research**, 1998.

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

RECHNER, A. R.; PANNALA, A. S.; RICE-EVANS, C. A. Caffeic acid derivatives in artichoke extract are metabolised to phenolic acids in vivo. **Free Radical Research**, v. 35, n. 0, p. 195–202, 2001.

RIBEIRO, R. F. et al. Spray-dried powders improve the controlled release of antifungal tioconazole-loaded polymeric nanocapsules compared to with lyophilized products. **Materials Science and Engineering: C**, v. 59, p. 875–884, 2016.

ROMANA-SOUZA, B.; PIRES, T. C.; MONTE-ALTO-COSTA, A. Mate Tea-Mediated Reduction In Catecholamine Synthesis Improves Cutaneous Wound Healing Of Chronically Stressed Mice. **Food Research International**, v. 71, p. 32–40, 2015.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R. Caracterização e Estudo de

Estabilidade de Suspensões de Nanocápsulas e de Nanoesferas Poliméricas Contendo Diclofenaco. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 21, n. 2, p. 99–106, 2002.

SCHINELLA, G. et al. Antioxidant and cardioprotective effects of *Ilex brasiliensis*: A comparative study with *Ilex paraguariensis* (yerba mate). **Food Research International**, v. 42, n. 10, p. 1403–1409, 2009.

SCHINELLA, G. R. et al. Antioxidant Effects of an Aqueous Extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 360, p. 357–360, 2000.

SIMON, G. A.; MAIBACH, H. I. The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations - an overview. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**, v. 13, n. 5, p. 229–234, 1982.

SONAGLIO, D. et al. Desenvolvimento Tecnológico e Produção de Fitoterápicos. In: UFRGS/UFSC (Ed.). . **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 1º. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 1999. p. 221 – 258.

SOPPIMATH, K. S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n. 1-2, p. 1–20, 2001.

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

SOUZA, A. H. P. et al. Phytochemicals and bioactive properties of *Ilex paraguariensis*: An *in-vitro* comparative study between the whole plant, leaves and stems. **Food Research International**, 2015.

TURKMEN, N.; SARI, F.; VELIOGLU, Y. S. Food Chemistry Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin – Ciocalteu methods. **Analytical, Nutritional and Clinical Methods**, v. 99, p. 835–841, 2006.

VALERGA, J.; RETA, M.; LANARI, M. C. Polyphenol input to the antioxidant activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extracts. **Food Science and Technology**, v. 45, n. 1, p. 28–35, 2012.

WATKINSON, A. C. et al. Nanoparticles Do Not Penetrate Human Skin—A Theoretical Perspective. **Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 8, p. 1943–1946, 2013.

WEBER, S.; ZIMMER, A.; PARDEIKE, J. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for pulmonary application: A review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 1, p. 7–22, 2014.

YAN, F. et al. The effect of poloxamer 188 on nanoparticle morphology, size, cancer cell uptake, and cytotoxicity. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 170–178, 2010.

ZAMBAUX, M. F. et al. 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.

ZHANG, W. et al. 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.

ZHU, X. et al. The effects of quercetin-loaded PLGA-TPGS nanoparticles on ultraviolet B-induced skin damages in vivo. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, p. 1–10, 2015.