

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ÓLEO E DO
POLÍMERO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-
QUÍMICAS E ESTABILIDADE DE SISTEMAS
NANOESTRUTURADOS CONTENDO UBIQUINONA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Mônica Fabiele Lorensi Stangarlin

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ÓLEO E DO POLÍMERO
SOBRE AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E
ESTABILIDADE DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS
CONTENDO UBIQUINONA**

Mônica Fabiele Lorensi Stangarlin

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Profa. Dra. Letícia Cruz

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Stangarlin, Mônica Fabiele Lorensi

Avaliação da influência do óleo e do polímero sobre as características físico-químicas e estabilidade de sistemas nanoestruturados contendo ubiquinona / Mônica Fabiele Lorensi Stangarlin.-2014.

114 p. ; 30cm

Orientadora: Leticia Cruz

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2014

1. Preparação de nanocápsulas e nanoemulsões 2. Ubiquinona 3. Óleo de argan 4. Óleo de linhaça I. Cruz, Leticia II. Título.

**Universidade federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ÓLEO E DO POLÍMERO SOBRE
AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E ESTABILIDADE DE
SISTEMAS NANOESTRUTURADOS CONTENDO UBIQUINONA**

elaborada por

Mônica Fabiele Lorensi Stangarlin

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

**Letícia Cruz, Prof^a. Dr^a
(Presidente/Orientadora)**

Ana Luiza Maurer da Silva, Prof^a. Dr^a. (UNISINOS)

Marcos Antônio Villetti, Prof. Dr. (UFSM)

Santa Maria, 31 de março de 2014.

***Dedico este trabalho aos meus pais
Airton e Flóra pelo amor, apoio e incentivo
ao longo desta trajetória***

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por iluminar meu caminho e pelas conquistas concedidas, tornando-me confiante a cada etapa superada.

À minha família, Airton, Flora, Márcio e Jaque pela base educacional, pelo amor incondicional, carinho, compreensão e pelo apoio em todos os momentos da minha vida;

Ao Marcelo, por todo amor, apesar de toda a distância, sempre esteve presente me apoiando e confortando; Ao Elemar, Benilde, Ricardo, Regina e Arturzinho, por todo carinho e momentos de descontração;

À Universidade Federal de Santa Maria, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de realização do curso em uma instituição gratuita e de qualidade;

À professora Letícia Cruz, pela oportunidade concedida de realizar este trabalho e pela sua orientação; À professora Scheila Schaffazick, pelas contribuições;

Às professoras Cristiane de Bona da Silva e Andréa Adams pelo empréstimo de equipamentos e materiais;

Aos colegas de laboratório: Felipe, Náthali, Verônica, Mailine, Juliane, Luana, Juliana e Flávio pelas contribuições e coleguismo; e aos demais colegas pelo convívio e auxílios nas atividades de laboratório: Martina, Alessandra, Carol, Dani, Luiz Eduardo, Maíra, Camila, Gabi, Sabrina, Allana, Luan, Tainara e Patrícia.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ÓLEO E DO POLÍMERO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E ESTABILIDADE DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS CONTENDO UBIQUINONA

AUTORA: MÔNICA FABIELE LORENSI STANGARLIN

ORIENTADORA: LETÍCIA CRUZ

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 31 de março de 2014.

Este trabalho avaliou a influência da composição sobre as características físico-químicas, estabilidade e fotoestabilidade de nanoestruturas contendo ubiquinona. As nanocápsulas (NC) e nanoemulsões (NE) foram preparadas por deposição interfacial de polímero pré-formado e emulsificação espontânea, respectivamente. As formulações foram caracterizadas e comparadas quanto à influência do tipo de óleo (óleo de argan ou de linhaça) e de sua quantidade (3% ou 1,5%), quanto ao polímero poli(ϵ -caprolactona), PCL ou Eudragit[®] RL 100, EUD, quanto à presença do fármaco, além da comparação entre ambas as nanoestruturas. Para a quantificação da ubiquinona, o método foi validado, apresentando-se linear, específico, preciso e exato. As formulações apresentaram características físico-químicas adequadas, com teores próximos ao valor teórico de 1mg/mL, além de eficiências de encapsulamento próximas de 100% e de índices de polidispersão inferiores a 0,2 para as formulações com 1,5% de óleo. A redução na concentração de óleo causou diminuição do diâmetro médio e no índice de polidispersão das NC de óleo de argan e PCL e das NE e NC de EUD e óleo de linhaça. Além disso, a adição de ubiquinona foi capaz de alterar o potencial zeta destas formulações. Quanto ao tipo de estrutura, o pH sofreu influência, onde a NC de EUD apresentou valores inferiores à NE e NC de PCL, independente do óleo utilizado. Além disso, a NC de EUD e óleo de linhaça apresentou potencial zeta superior em módulo em relação à NE e NC de PCL. Quanto ao tipo de óleo empregado, o diâmetro de partícula e o índice de polidispersão foram menores para as NC de EUD e óleo de linhaça em relação às NC de EUD e óleo de argan. Além disso, todas as formulações foram capazes de fotoprotoger a ubiquinona em comparação ao fármaco livre, havendo influência do óleo e do polímero. Quanto à estabilidade, as formulações apresentaram redução no teor de fármaco ao longo de 60 dias, sendo que as nanoestruturas de óleo de argan apresentaram teores maiores. As NC apresentaram teores maiores em relação às NE. O aumento no tamanho de partícula só foi significativo para a NC de óleo de argan e PCL aos 15 dias, onde apresentou diâmetro maior em relação às NC de PCL e óleo de linhaça e de EUD e óleo de argan. Um aumento no potencial zeta foi detectado para as NE aos 60 dias, enquanto que a NC de EUD e óleo de argan apresentou decréscimo neste parâmetro. O potencial zeta ainda apresentou-se maior em módulo para as NC de EUD em relação às respectivas NE.

Palavras-chave: Nanocápsulas. Nanoemulsões. Ubiquinona. Óleo de argan. Óleo de linhaça. Poli(ϵ -caprolactona). Eudragit[®] RL 100.

ABSTRACT

Master Dissertation

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

AUTHOR: MÔNICA FABIELE LORENSI STANGARLIN

ADVIDOR: LETÍCIA CRUZ

Place and Date of Defense: Santa Maria, March 31, 2014.

This work evaluated the influence of the composition on the physico-chemical characteristics, stability and photostability of nanostructures containing ubiquinone. Nanocapsules (NC) and nanoemulsions (NE) were prepared by interfacial deposition of preformed polymers and spontaneous emulsification, respectively. The formulations were characterized and compared in relation to the influence of the oil (argan or linseed oil) and its amount in the formulation (3% or 1.5%), the type of polymer (poli(ϵ -caprolactone), PCL or Eudragit[®] RL100, EUD), drug presence, besides the comparison between both nanostructures. To assay ubiquinone, the analytical method was validated and was considered linear, specific, precise and accurate. The formulations had adequate physico-chemical characteristics, with drug contents close to the theoretical value (1mg/mL), encapsulation efficiencies close to 100% and polydispersity index lower than 0.2 for formulations with 1.5% of oil. The reduction of oil concentration caused a decrease in the average diameter and polydispersity index of PCL NC of argan oil and EUD NC and NE of linseed oil. Furthermore, the addition of ubiquinone was able to modify the zeta potential of these formulations. Regarding the type of structure (NE or NC), the pH was influenced. EUD NC presented values lower than NE and PCL NC, regardless of the oil used. In addition, EUD NC with linseed oil had a higher zeta potential in module in relation to the NE and PCL NC. Concerning the type of oil used, particle diameter and polydispersity index were lower for EUD NC of linseed oil in relation to EUD NC of argan oil. Moreover, all formulations were able to photoprotect ubiquinone in comparison with free drug, occurring influence of the oil and the polymer. Regarding the stability, the formulations showed a reduced level of drug over 60 days, while the type of oil influenced this parameter. Nanostructures of argan oil showed higher levels. NC presented higher drug contents in relation to NE. The increase in particle size was only significant for NC of argan oil and PCL at 15 days, which showed a greater diameter than those of PCL NC of linseed oil and EUD NC of argan oil. An increase in zeta potential for NE was detected at 60 days, while EUD NC of argan oil showed a decrease in this parameter. The zeta potential was higher in module for NC of EUD in relation to the respective NE.

Key-words: Nanocapsule. Nanoemulsion. Ubiquinone. Argan oil. Flaxseed oil. Poli(ϵ -caprolactone). Eudragit[®] RL 100.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise da precisão (repetibilidade e precisão intermediária) no doseamento de sistemas nanoestruturados contendo ubiquinona...	52
Tabela 2 - Análise da exatidão para quantificação de sistemas nanoestruturados contendo ubiquinona.....	53
Tabela 3 - Caracterização físico-química das nanoemulsões contendo óleo de argan.....	56
Tabela 4 - Caracterização físico-química das nanocápsulas contendo PCL e óleo de argan.....	60
Tabela 5 - Caracterização físico-química das nanocápsulas de EUD e óleo de argan.....	63
Tabela 6 - Caracterização físico-química das nanoemulsões contendo óleo de linhaça.....	68
Tabela 7 - Caracterização físico-química das nanocápsulas de PCL e óleo de linhaça.....	71
Tabela 8 - Caracterização físico-química das nanocápsulas de EUD e óleo de linhaça.....	73
Tabela 9 - Equações da reta e respectivos coeficientes de correlação (r) de acordo com a ordem de reação para a solução do fármaco, nanoemulsões e nanocápsulas de óleo de argan e de linhaça após 4 horas de exposição à radiação UVC.....	79
Tabela 10 - Constantes de degradação (k) e tempo para degradação de 10% do fármaco ($t_{90\%}$) para a solução de ubiquinona, nanoemulsões e nanocápsulas de óleo de argan e de linhaça após 4 horas de exposição à radiação UVC ($n=3$).....	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da poli(ϵ -caprolactona).....	21
Figura 2 - Estrutura química do Eudragit [®] RL 100.....	22
Figura 3 - Estados oxidativos da ubiquinona.....	33
Figura 4 - Espectro de absorção da ubiquinona na região ultravioleta.....	48
Figura 5 - Cromatogramas das nanocápsulas: NC-ELI-B (a), NC-ELIQ-B (b), NC-PAR-B (c) e NC-PARQ-B (d).....	50
Figura 6 - Curva analítica média ($n=3$) da ubiquinona em acetonitrila.....	51
Figura 7 - Peso dos filmes poliméricos de EUD e PCL ao longo de 60 dias de imersão em óleo de argan.....	54
Figura 8 - Espectro de absorção do óleo de argan na região ultravioleta.....	55
Figura 9 - Gráficos do diâmetro médio das nanoemulsões de óleo de argan: NE-AR-A (a), NE-AR-B (b), NE-ARQ-A (c) e NE-ARQ-B (d).....	58
Figura 10 - Gráficos da distribuição de diâmetro das nanocápsulas de PCL e óleo de argan: NC-PAR-A (a), NC-PAR-B (b), NC-PARQ-A (c) e NC-PARQ-B (d).....	61
Figura 11 - Gráficos da distribuição de diâmetro das nanocápsulas de EUD e óleo de argan: NC-EAR-A (a), NC-EAR-B (b), NC-EARQ-A (c) e NC-EARQ-B (d).....	64
Figura 12 - Peso dos filmes poliméricos de EUD RL100 e PCL ao longo de 60 dias de imersão em óleo de linhaça.....	67
Figura 13 - Espectro de absorção do óleo de linhaça na região ultravioleta.....	67
Figura 14 - Gráficos da distribuição de diâmetro das nanoemulsões de óleo de linhaça: NE-LI-A (a), NE-LI-B (b), NE-LIQ-A (c) e NE-LIQ-B (d)	70
Figura 15 - Gráficos da distribuição de diâmetro das nanocápsulas de PCL e óleo de linhaça: NC-PLI-A (a), NC-PLI-B (b), NC-PLIQ-A (c) e NC-PLIQ-B (d).....	72
Figura 16 - Gráficos da distribuição de diâmetro das nanocápsulas de EUD e óleo de linhaça: NC-ELI-A (a), NC-ELI-B (b), NC-ELIQ-A (c) e NC-ELIQ-B (d).....	74
Figura 17 - Decaimento da concentração de ubiquinona das formulações ao longo de 4 horas de exposição à radiação UVC.....	77
Figura 18 - Concentração de ubiquinona das formulações NE-ARQ-B, NC-PARQ-B, NC-EARQ-B, NE-LIQ-B, NC-PLIQ-B e NC-ELIQ-B após 0, 15, 30 e 60 dias de armazenamento.....	82
Figura 19 - Valores de pH das formulações NE-ARQ-B, NC-PARQ-B, NC-EARQ-B, NE-LIQ-B, NC-PLIQ-B e NC-ELIQ-B após 0, 15, 30 e 60 dias de armazenamento.....	84
Figura 20 - Diâmetro médio de gotícula/partícula para as formulações NE-ARQ-B, NC-PARQ-B, NC-EARQ-B, NE-LIQ-B, NC-PLIQ-B e NC-ELIQ-B após 0, 15, 30 e 60 dias de armazenamento.....	85
Figura 21 - Índice de polidispersão para as formulações NE-ARQ-B, NC-PARQ-B, NC-EARQ-B, NE-LIQ-B, NC-PLIQ-B e NC-ELIQ-B após 0, 15, 30 e 60 dias de armazenamento.....	87
Figura 22 - Potencial zeta das formulações NE-ARQ-B, NC-PARQ-B, NC-EARQ-B, NE-LIQ-B, NC-PLIQ-B e NC-ELIQ-B após 0, 15, 30 e 60 dias de armazenamento.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS

AR	óleo de argan
CLAE	cromatografia a líquido de alta eficiência
DP	desvio padrão
DPR	desvio padrão relativo
EE	eficiência de encapsulamento
EUD	Eudragit [®] RL 100
FA	fase aquosa
FO	fase orgânica
IPD	índice de polidispersão
<i>k</i>	constante de degradação
LI	óleo de linhaça
NC	nanocápsulas
NE	nanoemulsões
PCL	poli(ε-caprolactona)
PLA	poli(ácido lático)
PLGA	poli(ácido lático-co ácido glicólico)
Q	ubiquinona
<i>t</i> _{90%}	tempo necessário para degradar 10% do fármaco
TCM	triglicerídeos de cadeia média

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A – Composição quali-quantitativa das formulações.....	106
Apêndice B – Gráficos da cinética de reação das formulações.....	108

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3 REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1 Sistemas nanoestruturados	18
3.2 Óleo de argan	24
3.3 Óleo de linhaça	28
3.4 Ubiquinona	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Material	39
4.1.1 Matérias-primas.....	39
4.1.2 Solventes.....	39
4.1.3 Equipamentos e outros materiais.....	39
4.2 Métodos	40
4.2.1 Validação do método analítico para determinação da ubiquinona em sistemas nanoestruturados.....	40
4.2.2 Ensaio de inchamento/dissolução dos filmes poliméricos.....	41
4.2.3 Perfil espectrofotométrico da ubiquinonados óleos de argan e de linhaça na região ultravioleta.....	42
4.2.4 Avaliação da solubilidade da ubiquinona nos óleo de argan e de linhaça.....	42
4.2.5 Preparação dos sistemas nanoestruturados.....	42
4.2.6 Caracterização dos sistemas coloidais.....	44
4.2.6.1 Determinação do pH.....	44
4.2.6.2 Determinação do diâmetro, índice de polidispersão e potencial zeta....	44
4.2.6.3 Determinação do teor.....	45
4.2.6.4 Determinação da eficiência de encapsulamento.....	45
4.2.6.5 Avaliação da fotoestabilidade da ubiquinona associada aos sistemas nanoestruturados.....	45
4.2.6.6 Avaliação da estabilidade das formulações após um período de 60 dias.....	46
4.3 Análise estatística	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 Perfil espectrofotométrico da ubiquinona na região ultravioleta	48
5.2 Validação do método analítico para determinação da ubiquinona em sistemas nanoestruturados	48
5.3 Sistemas nanoestruturados a base de óleo de argan	53
5.3.1 Ensaio de inchamento/dissolução dos filmes poliméricos em óleo de argan.....	53
5.3.2 Perfil espectrofotométrico do óleo de argan na região ultravioleta.....	54
5.3.3 Avaliação da solubilidade da ubiquinona em óleo de argan.....	55
5.3.4 Caracterização físico-química dos sistemas nanoestruturados a base de óleo de argan.....	55
5.3.5 Avaliação comparativa entre nanoemulsões e nanocápsulas contendo óleo de argan.....	65
5.4 Sistemas nanoestruturados a base de óleo de linhaça	66

5.4.1 Ensaio de inchamento/dissolução dos filmes poliméricos em óleo de linhaça.....	66
5.4.2 Perfil espectrofotométrico do óleo de linhaça na região ultravioleta.....	67
5.4.3 Avaliação da solubilidade da ubiquinona em óleo de linhaça.....	68
5.4.4 Caracterização físico-química dos sistemas nanoestruturados a base de óleo de linhaça.....	68
5.4.5 Avaliação comparativa entre nanoemulsões e nanocápsulas de óleo de linhaça.....	75
5.5 Avaliação comparativa entre os sistemas preparados com óleo de argan e óleo de linhaça.....	76
5.6 Avaliação da fotoestabilidade da ubiquinona associada aos sistemas nanoestruturados.....	77
5.7 Avaliação da estabilidade das formulações após um período de 60 dias.....	81
6 CONCLUSÕES.....	89
REFERÊNCIAS.....	91

1 INTRODUÇÃO

Os sistemas nanoestruturados vem recebendo destaque no âmbito do desenvolvimento de formulações para liberação de fármacos por possuírem propriedades diferenciadas que permitem uma versatilidade de aplicações (KIM; DOBSOM, 2009). Tais sistemas incluem lipossomas, nanoemulsões, nanopartículas poliméricas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; GUTERRES *et al.*, 2007), nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados (SCHWARZ *et al.*, 2012), dentre outros.

As nanopartículas poliméricas são sistemas promissores no carreamento de substâncias ativas, sendo divididas em nanocápsulas e nanoesferas. As nanocápsulas possuem um núcleo oleoso ou aquoso envolto por polímero, onde a substância ativa apresenta-se dissolvida no núcleo ou adsorvida na parede polimérica. Por sua vez, as nanoesferas são sistemas matriciais poliméricos, onde o ativo pode ficar retido, adsorvido ou molecularmente disperso (COUVREUR *et al.*, 2002; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; GUTERRES *et al.*, 2007; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Por conseguinte, as nanoemulsões apresentam-se como emulsões formadas por gotículas de tamanho submicrométrico, nas quais a combinação de um sistema tensoativo/co-tensoativo é capaz de manter esta dispersão coloidal (PATRAVALE; MANDAWGADE, 2008; SHAH *et al.*, 2010; STRÖHER *et al.*, 2010; BHATT; MADHAV, 2011).

Os sistemas nanoestruturados promovem um tratamento mais eficaz, ao aliar a capacidade de transpor barreiras biológicas e promover o direcionamento do ativo em locais específicos, podendo ocasionar diminuição dos efeitos colaterais ao veicular o fármaco em quantidades menores e reduzir a exposição sistêmica do mesmo (CISMARU; POPA, 2010; DASH; KONKIMALLA, 2012; DESAI, 2012), além de serem capazes de promover a estabilidade do ativo encapsulado frente a condições adversas de degradação, como pH gástrico e proteção contra a fotodegradação (ALMEIDA *et al.*, 2009; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

No desenvolvimento de nanocápsulas e nanoemulsões, a seleção do óleo que constituirá o núcleo destas estruturas é uma etapa imprescindível. A escolha do

óleo deve ser criteriosa, pois pode influenciar nas características físico-químicas da formulação, podendo impactar no tamanho da fase dispersa e na sua distribuição, de acordo com as características intrínsecas de cada óleo, tais como viscosidade, tensão interfacial e caráter hidrofóbico (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Além disso, dependendo das propriedades de cada óleo, este componente pode agregar valor à formulação atuando não somente como um solubilizador do ativo, como também desempenhando alguma atividade farmacológica ou conferindo algum tipo de proteção à substância.

Diante disso, os óleos vegetais tem sido utilizados como componentes no desenvolvimento de nanocápsulas e nanoemulsões e, dentre estes, os óleos de argan e de linhaça tem recebido destaque por sua alta proporção em ácidos graxos insaturados e poli-insaturados, como ácido oleico e linoleico, além de possuírem diferentes compostos antioxidantes, cada qual com suas particularidades, sendo promissores no tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, prevenção de doenças cardiovasculares e na redução dos níveis de LDL e colesterol (BARTSCH *et al.*, 1999; KHALLOUKI *et al.*, 2005; TINWORTH *et al.*, 2010; SALIM *et al.*, 2011; RUBILAR *et al.*, 2012; SOUR *et al.*, 2012).

Além dos óleos, outro componente de fundamental importância é o polímero constituinte do envoltório das nanocápsulas, uma vez que este pode influenciar o perfil de liberação, tamanho de partícula e potencial zeta do sistema nanoestruturado, além de outras propriedades (RIEUX *et al.*, 2006). Neste contexto, diversos polímeros têm sido explorados tais como poliésteres, polissacarídeos e metacrilatos devido, principalmente, à biocompatibilidade e/ou biodegradabilidade destes materiais (DAS *et al.*, 2010; JELVEHGARI *et al.*, 2010; DASH; KONKIMALLA, 2012). Dentre estes, a poli(ϵ -caprolactona) e o Eudragit[®] RL 100 tem sido empregados na preparação de sistemas nanoestruturados (TERROSO *et al.*, 2009; IBRAHIM; EL-LEITHY; MAKKY, 2010; KATARA; MAJUMDAR, 2013; POHLMANN *et al.*, 2013).

Considerando que as matérias-primas empregadas na preparação de sistemas nanoestruturados podem interferir na performance dos mesmos, o presente trabalho foi delineado no sentido de avaliar a influência da composição de nanocápsulas e nanoemulsões sobre as características físico-químicas, estabilidade e fotoestabilidade dos sistemas contendo um modelo de fármaco lipofílico e fotolábil, a ubiquinona. Para tanto, as nanoestruturas foram formuladas com dois tipos de

núcleo oleoso: óleo de argan ou óleo de linhaça. No caso das suspensões de nanocápsulas, estas foram preparadas avaliando-se dois polímeros: a poli(ϵ -caprolactona) ou o Eudragit[®] RL 100. Estes foram selecionados devido à ampla utilização e por conferirem potenciais zeta distintos às partículas, ou seja, negativo e positivo, respectivamente. Por fim, cabe ressaltar que este estudo comparativo é inédito.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a influência do óleo (argan ou linhaça) e do polímero [poli(ϵ -caprolactona) ou Eudragit[®] RL100] sobre as características físico-químicas, estabilidade e fotoestabilidade de sistemas nanoestruturados contendo ubiquinona.

2.2 Específicos

- Validar um método analítico para determinação da ubiquinona em nanocápsulas e nanoemulsões;
- Preparar nanoemulsões de óleo de argan ou de linhaça contendo ubiquinona pelo método da emulsificação espontânea;
- Preparar nanocápsulas contendo ubiquinona com óleo de argan ou de linhaça, como núcleo oleoso, e poli(ϵ -caprolactona) ou Eudragit[®] RL100 como invólucro polimérico, através do método de deposição interfacial de polímero pré-formado;
- Caracterizar as formulações quanto ao tamanho e distribuição de tamanho de partícula, potencial zeta, pH, teor do fármaco e eficiência de encapsulamento;
- Avaliar a fotoestabilidade da ubiquinona incorporada aos sistemas nanoestruturados desenvolvidos mediante exposição à radiação UVC;
- Avaliar a estabilidade dos sistemas durante 60 dias de armazenamento.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Sistemas nanoestruturados

Os sistemas nanoestruturados fazem parte da nanotecnologia moderna, composta por partículas de dimensões na faixa de 1 a 1000 nm, e distinguem-se entre dendrímeros (HASANZADEH *et al.*, 2014), nanotubos de carbono (MUNDRA *et al.*, 2014), micelas poliméricas (ABOLMAALI; TAMADDOM; DINARVAND, 2013), lipossomas, nanoemulsões, nanopartículas poliméricas, que incluem nanocápsulas e nanoesferas (COUVREUR *et al.*, 2002; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010), nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados, dentre outros (SCHWARZ *et al.*, 2012).

As nanoemulsões consistem em dispersões muito finas de água em óleo e apresentam-se como gotículas formadas por uma combinação de componentes, tais como: água, óleos e tensoativos, através dos quais o sistema tensoativo/co-tensoativo envolve o núcleo oleoso (PATRAVALE; MANDAWGADE, 2008; STRÖHER *et al.*, 2010; SHAJI; BHATIA, 2012). Quanto ao tamanho de gotícula, as nanoemulsões podem alcançar de 20 a 500 nm e são estáveis frente a processos de cremagem e sedimentação (SAKEENA *et al.*, 2010).

As nanopartículas poliméricas, por sua vez, apresentam-se como sistemas carreadores de substâncias, compostos por polímeros biocompatíveis, e são divididas entre nanocápsulas e nanoesferas, possuindo diferenças em termos de composição e organização estrutural. As nanocápsulas possuem um núcleo oleoso ou aquoso envolto por polímero, onde a substância ativa apresenta-se dissolvida no núcleo e/ou adsorvida na parede polimérica. Por sua vez, as nanoesferas são sistemas matriciais poliméricos, nos quais o ativo pode ficar retido, adsorvido, ou molecularmente disperso (COUVREUR *et al.*, 2002; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; GUTERRES *et al.*, 2007; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; PAPLIED *et al.*, 2011).

Os sistemas carreadores de fármacos de ordem nanométrica permitem a possibilidade de promover um tratamento mais eficaz, ao aliar a capacidade de transpor barreiras biológicas e promover o direcionamento do fármaco em locais específicos, promovendo um perfil de liberação sustentado e podendo ocasionar diminuição dos efeitos colaterais ao veicular o fármaco em quantidades menores e reduzir a exposição sistêmica do mesmo (KALLINTERI *et al.*, 2005; CISMARU; POPA, 2010; NGWULUKA, 2010; DASH; KONKIMALLA, 2012; DESAI, 2012), além da vantagem de promover estabilidade do ativo encapsulado frente a condições adversas de degradação como pH estomacal e proteção contra a fotodegradação (COUVREUR *et al.*, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2009; TERROSO *et al.*, 2009; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Suas propriedades físico-químicas tornam-se diferenciadas dos sistemas convencionais, devido ao fato de ocorrer um aumento da área superficial das partículas em relação ao seu volume com a redução do seu tamanho, o que pode aumentar a solubilidade, biodisponibilidade e impactar no desempenho das formulações no tratamento de doenças (MARCELINO *et al.*, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2010; DESAI, 2012).

A preparação de nanopartículas possui embasamento nos métodos de polimerização *in situ* de monômeros ou de dispersão de polímeros pré-formados, sendo que este último possui maior aplicabilidade que o primeiro, pois não apresenta resíduos tóxicos e não induz ligações covalentes entre o fármaco e o polímero (SOPIMATH *et al.*, 2001; GUTERRES *et al.*, 2007).

De forma geral, os métodos mais usuais destinados à formação de nanocápsulas consistem em: nanoprecipitação ou deposição interfacial de polímero pré-formado, emulsificação-difusão, dupla-emulsificação, emulsão-coacervação, cobertura por polímero e camada por camada (GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

O método da precipitação do polímero pré-formado ou nanoprecipitação, o qual foi primeiramente descrito por Fessi e colaboradores (1989), consiste na preparação de uma fase orgânica contendo óleo, polímero, solvente miscível em água e presença ou não de tensoativo altamente hidrofóbico, a qual é vertida sobre uma fase aquosa contendo tensoativo altamente hidrofílico. O passo de formação das nanocápsulas ocorre por emulsificação espontânea, onde o polímero, que não é solúvel em água nem no óleo, se deposita na forma de precipitado na interface destes componentes (GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007). É um

método característico na encapsulação de fármacos hidrofóbicos, permitindo obter baixos índices de polidispersão (RIEUX *et al.*, 2006).

No que diz respeito à preparação de nanoemulsões, um método muito utilizado consiste na emulsificação espontânea de uma fase orgânica vertida sobre uma fase aquosa, onde ocorre a difusão do solvente orgânico na fase aquosa, levando à formação de gotículas de tamanho reduzido, sob agitação magnética moderada. O processo de formação das nanoestruturas é semelhante ao método de nanoprecipitação, com exceção da presença do polímero na composição (BOUCHEMAL *et al.*, 2004). Além disso, para a estabilização da dispersão coloidal é necessária a presença concomitante de tensoativo/co-tensoativo (SHAH *et al.*, 2010; BHATT; MADHAV, 2011).

Quanto à caracterização físico-química, existem várias ferramentas que permitem auxiliar a avaliação das propriedades dos sistemas nanoestruturados, dentre as quais as mais utilizadas são as técnicas de avaliação da morfologia, representadas por microscopias como a eletrônica de varredura (MEV), a eletrônica de transmissão (MET) e a de força atômica (MFA); técnicas utilizadas para analisar o tamanho de partícula e distribuição de tamanho, representadas por espalhamento de luz, podendo ser dinâmico ou estático; eletroforese, que auxilia na elucidação do potencial zeta, ultracentrifugação analítica ou ultrafiltração/centrifugação que fornecem informações quanto à taxa de associação do fármaco contido nas nanoestruturas; potenciometria para análise do pH; e difusão em sacos de diálise, a qual fornece um perfil de liberação do fármaco, dentre outras técnicas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; GUTERRES; SHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; DESAI, 2012).

Com relação à preparação, além da presença de tensoativos com diferentes graus de hidrofilia e da presença do óleo, necessária para a formação do núcleo oleoso, torna-se imprescindível o emprego de polímeros para a formação das nanocápsulas. A escolha do polímero baseia-se em suas características intrínsecas, capazes de influenciar nas propriedades físico-químicas das nanopartículas, como por exemplo, na hidrofobicidade do sistema e na carga superficial e diâmetro das partículas, além da capacidade de modular o perfil de liberação (RIEUX *et al.*, 2006; SALAMANCA *et al.*, 2007; PAPLIED *et al.*, 2011).

Diante disso, diversos polímeros tem sido utilizados na preparação de nanopartículas poliméricas, podendo estes ser de origem natural ou sintética, ou

ainda de caráter biodegradável ou não. Como exemplo de polímeros biodegradáveis naturais explorados no desenvolvimento das nanoestruturas, podem ser citados a quitosana, o alginato, a albumina, o colágeno, o dextrano e a gelatina. Quanto aos polímeros sintéticos e biodegradáveis, podem ser citados os polianidridos e poliamidas. Além disso, polímeros termoplásticos como poliésteres possuem grande aplicação, como por exemplo: poli(lactídeo) (PLA), poli(lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA) e poli-(ϵ -caprolactona) (PCL) (NGWULUKA, 2010; VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010; PAPLIED *et al.*, 2011; MARIN *et al.*, 2013).

A PCL é um polímero sintético, de caráter semi-cristalino que vem se destacando na preparação de sistemas para vetorização de fármacos. Este polímero é vantajoso para o desenvolvimento de nanocápsulas, pois é capaz de promover liberação sustentada, aumentar a estabilidade química e fotoestabilidade, além de promover um aumento da atividade biológica do princípio ativo (LABET; THIELEMANS, 2009; POHLMANN *et al.*, 2013). Além de ser biocompatível, de não ser tóxico e ser biodegradável, é compatível com diversas classes de fármacos, tornando homogênea a distribuição destes na matriz polimérica. Sua versatilidade de aplicações se deve às características de flexibilidade da cadeia polimérica (DASH; KONKIMALLA, 2012; GUO; CHU, 2012). Pelo fato de ser um poliéster, confere potencial zeta negativo para sistemas nanoestruturados preparados com esse polímero (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). A figura 1 apresenta a estrutura química da PCL.

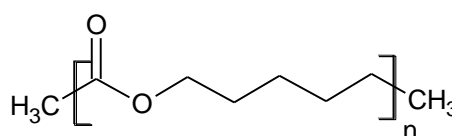


Figura 1 – Estrutura química da poli(ϵ -caprolactona)

Além disso, polímeros sintéticos tem sido extensivamente estudados na preparação de nanopartículas. Uma das vantagens em relação aos polímeros naturais é o grau de pureza mais elevado e maior reprodutibilidade, como por exemplo, os polímeros derivados de poli(metacrilatos) (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; NGWULUKA, 2010). O Eudragit[®] RL 100 (EUD), um co-polímero de poli(etilacrilato, metil-metacrilato e clorotrimetil amonio etilmetacrilato), é insolúvel em pH fisiológico, com boa capacidade de dispersar fármacos e limitada capacidade

de inchamento, o que permite a liberação controlada da substância ativa por expansão de forma independente do pH, permitindo uma liberação do fármaco de forma retardada ou sustentada. Seu uso já foi explorado no desenvolvimento de micropartículas para veiculação de fármacos, com intuito de promover proteção contra degradação estomacal. Por possuir um grupamento amônio quaternário, que lhe confere caráter catiônico, já foi empregado no desenvolvimento de nanopartículas com a finalidade de aumentar o tempo de permanência do princípio ativo na córnea (DAS *et al.*, 2010; JELVEHGARI *et al.*, 2010). A estrutura química do EUD encontra-se na figura 2.

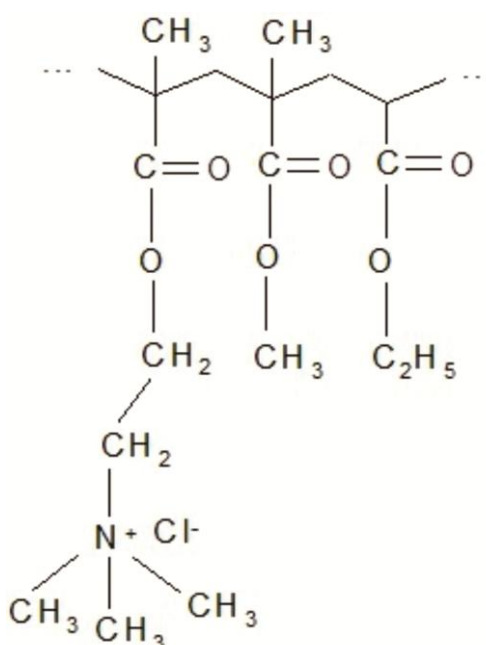


Figura 2 – Estrutura química do Eudragit® RL 100

Levando em consideração o desenvolvimento dos sistemas nanoestruturados, é imprescindível a constituição do núcleo oleoso, tanto para a formação das nanoemulsões, quanto para o preparo das nanocápsulas. A escolha do óleo deve ser criteriosa, pois pode influenciar nas características físico-químicas da formulação, podendo impactar no tamanho de partícula e gotícula, na distribuição de tamanho e na eficiência de encapsulamento, de acordo com as características intrínsecas de cada óleo, como viscosidade, tensão interfacial e caráter hidrofóbico. Além disso, como critérios de escolha, os óleos não devem ser tóxicos e devem apresentar capacidade de dissolver o fármaco, mas não permitir a dissolução da parede polimérica (COUVREUR *et al.*, 2002; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Neste sentido, alguns trabalhos tem reportado o emprego de óleos vegetais no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados para incorporação de substâncias ativas, por serem considerados alternativas viáveis devido à ampla disponibilidade, além de possuírem propriedades terapêuticas que podem vir a potencializar o desempenho das formulações (FRIEDRICH *et al.*, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2009; SANTOS, *et al.*, 2013).

Em um estudo desenvolvido por Mora-Huertas e colaboradores (2012), os autores prepararam nanocápsulas de PCL para incorporar o diclofenaco, onde avaliaram o efeito da composição de diferentes óleos (óleo de milho, óleo de amêndoas doce, triglicerídeos de cadeia média (TCM) e seus ésteres (como Miglyol[®] 810, 812, 829, Labrafac[®] PG e Labrafac[®] lipophile) e dos métodos de preparação utilizados (nanoprecipitação e emulsificação-difusão) na estabilidade e no perfil de liberação do fármaco a partir dos sistemas nanoestruturados. Os resultados obtidos demonstraram que o método de deposição interfacial de polímero pré-formado proporcionou menor tamanho de partícula, além de maior valor absoluto de potencial zeta. Por outro lado, as nanopartículas preparadas com os óleos de milho e de amêndoas doce apresentaram tamanho de partícula ligeiramente maior em relação aos outros óleos quando preparadas pelo método de nanoprecipitação. Quanto ao perfil de liberação, os sistemas preparados pelo método de nanoprecipitação e contendo os óleos Miglyol[®] 810 e Labrafac[®] PG apresentaram liberação do diclofenaco mais lenta (48 horas) em relação àqueles preparados pelo método de emulsificação-difusão (15 minutos).

Em outro trabalho, Contri e colaboradores (2012) desenvolveram nanocápsulas de Eudragit[®] RS 100 onde variaram a constituição do núcleo oleoso utilizando óleos vegetais como óleo de castanha do Pará, de oliva, de semente de girassol, de rosa mosqueta, de semente de uva e de cenoura em comparação com nanocápsulas preparadas a partir de TCM. Os autores observaram que as nanocápsulas preparadas com óleos vegetais apresentaram diâmetro de partícula superiores aquelas preparadas com TCM, devido à menor viscosidade do último. Entretanto, o tamanho não diferiu entre as nanocápsulas preparadas com óleos vegetais. Além disso, o potencial zeta para todas as formulações foi de aproximadamente 7 mV.

Em outro estudo que aborda a incorporação de óleo vegetal em sistemas nanoestruturados, Santos e colaboradores (2013) desenvolveram nanocápsulas de

Eudragit® RS 100 contendo como núcleo oleoso o óleo de coco e incorporaram o fármaco clotrimazol pelo método da deposição interfacial de polímero pré-formado. Os valores de diâmetro de partícula foram abaixo de 200 nm, o índice de polidispersão foi adequado (abaixo de 0,2), o potencial zeta foi positivo (13,3 mV a 14,4 mV), a eficiência de encapsulamento foi em torno de 100% e a liberação foi prolongada, sem efeito burst. Além disso, o sistema nanoestruturado promoveu proteção do clotrimazol frente à radiação UVC e atividade antifúngica contra *Candida albicans* e *Candida glabrata* mais pronunciada em relação ao fármaco livre. Por fim, as formulações foram estáveis durante um período de 60 dias de armazenamento à temperatura ambiente e protegidas da luz.

Devido ao fato das nanoemulsões e nanocápsulas apresentarem-se como suspensões coloidais aquosas, durante o tempo de armazenamento podem ocorrer alterações nas formulações como formação de precipitados referente à agregação das partículas, além da degradação de matérias-primas como hidrólise do polímero, contaminação microbiológica e até mesmo degradação do fármaco (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; TERROSO *et al.*, 2009).

As alterações nas formulações como presença de agregados e sedimentação de nanopartículas podem ser monitoradas através da determinação de mudanças ocorridas na distribuição de tamanho das partículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003), a determinação do potencial zeta permite prever a estabilidade física dos sistemas coloidais (TEERANACHAIDEEKUL *et al.*, 2007), o monitoramento do pH pode dar indícios com relação à degradação de componentes na formulação e a análise macroscópica permite visualizar vestígios de instabilidade (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

3.2 Óleo de argan

Dentre as espécies da família Sapotaceae encontra-se a *Argania spinosa* L., uma árvore de caráter espinhoso sendo nativa do Marrocos, África (KHALLOUKI *et al.*, 2005; BELARBI-BENMAHDI *et al.*, 2009; BELLAHCEN *et al.*, 2012). O local de desenvolvimento da floresta no Marrocos é considerado de clima semi-árido, cercado por montanhas e compreendendo cerca de 2.560.000 hectares. A partir do

ano de 1998, a região que abriga a floresta de argan foi inscrita na Reserva da Biosfera da UNESCO e desde então é considerada um patrimônio sociocultural mundial (UNESCO). Outro habitat relacionado ao desenvolvimento desta planta é o deserto de Negev localizado em Israel, tendo condições ambientais diferentes (YAGHMUR *et al.*, 1999), além de ser reportado seu crescimento na Argélia (BELARBI-BENMAHDI *et al.*, 2009).

Os frutos da árvore de argan possuem formato e tamanho semelhante ao de ameixas, podendo ser encontradas de uma a três sementes em cada fruto (NERD *et al.*, 1994; YAGHMUR *et al.*, 1999). O óleo é obtido a partir das sementes por diferentes métodos de extração, como prensagem a frio das sementes, destilação sob pressão reduzida e extração com solventes (CHARROUF; GUILLAUME, 1999; HARHAR *et al.*, 2010; VENEGAS *et al.*, 2011).

Dependendo do tipo de extração é possível obter diferentes variedades de óleo, assim como diferentes composições físico-químicas, com um rendimento de 30 a 55% (CHARROUF; GUILLAUME, 1999; HILALI *et al.*, 2005), cujas características próprias permitem diferentes aplicações. Na culinária, as sementes torradas são mais empregadas, enquanto que para uso cosmético, as amêndoas frescas são mais exploradas para a extração de seu óleo. Além disso, o óleo apresenta potencialidades no tratamento de diversas doenças, tais como aterosclerose, diabetes melitus, doenças cardiovasculares, dentre outras (CHARROUF; GUILLAUME, 2002; KHALLOUKI *et al.*, 2003; HARHAR *et al.*, 2010; ZOUGAGH *et al.*, 2011; MONFALOUTI *et al.*, 2012).

Seu uso na culinária é propiciado devido às características organolépticas, como aroma forte, sabor acentuado de nozes e coloração levemente avermelhada, sendo usualmente consumido puro no tempero de saladas ou como componente de frituras (CHARROUF; GUILLAUME, 2002; ZOUGAGH *et al.*, 2011). Seu valor nutricional é devido à alta proporção de lipídeos que promove uma dieta rica em ácidos graxos insaturados e antioxidantes (KHALLOUKI, *et al.*, 2003; DRISSI, *et al.*, 2004).

Para fins cosméticos o óleo é utilizado no tratamento da acne, suavização de rugas e, especialmente, na hidratação dos cabelos, promovendo aumento da resistência e manutenção do aspecto saudável (CHARROUF; GUILLAUME, 1999; CHARROUF; GUILLAUME, 2002; GUINDA *et al.*, 2011).

Como em todos os óleos, os triglicerídeos ocupam alta proporção em sua composição. Aproximadamente, 99% do óleo de argan são compostos por triglicerídeos que encontram-se dispostos em moléculas de glicerol esterificadas com ácidos graxos (KHALLOUKI *et al.*, 2005). Estes últimos ocupam uma porcentagem equivalente a 45% de ácidos graxos insaturados (sendo predominantes o ácido oleico), 35% de ácidos graxos poli-insaturados (sendo representados pelo ácido linoleico) e 20% de ácidos graxos saturados (ácido palmítico e esteárico em maior quantidade), dentre outros (KHALLOUKI *et al.*, 2005; SOUR *et al.*, 2012).

Os constituintes que ocupam menor proporção na composição do óleo de argan já foram estudados. Dentre os derivados de ácidos graxos mais abundantes encontram-se os mono e diacilglicerídeos, representados por oleil e linoleil em maior proporção, além de palmitoil e estearoil (KHALLOUKI *et al.*, 2005). Já na fração insaponificável do óleo foi relatada a presença de álcoois triterpênicos na proporção de 20% (que incluem lupano, ursano, oleanano e seus derivados como β -amirina, butirospermol e tirucalol), metil-esteróis em pequena quantidade (como cicloeucatenol e citroestradienol), esteróis na proporção de 20% (representados por espinasterol e escotenol, dificilmente encontrados em outros óleos vegetais), xantofilas ocupando 42% da composição, além de tocoferóis (representados pelas isoformas da vitamina E: α , γ e δ -tocoferol), dentre outros constituintes (CHARROUF; GUILLAUME, 1999; KHALLOUKI *et al.*, 2003; KHALLOUKI *et al.*, 2005). A elucidação dos compostos fenólicos mostrou a presença de antioxidantes como o ácido vanílico, ferúlico e siríngico, consistindo de maior teor, além do ácido *p*-hidroxibenzóico e vanilina, em quantidades traço. A presença de esqualeno já foi reportada, sendo de 0,3% (KHALLOUKI *et al.*, 2005).

Em um estudo desenvolvido recentemente, Venegas e colaboradores (2011) realizaram a quantificação de ubiquinona e melatonina em óleo de argan por cromatografia líquida de alta eficiência com detector eletroquímico e fluorescente. O estudo foi realizado com 34 amostras de óleo provenientes de 2 métodos de extração (tradicional e semi-industrializado) e observaram um teor de $20,2 \pm 9,9$ mg de ubiquinona por quilo de óleo e $60,5 \pm 51,2$ ng de melatonina por quilo de óleo, obtendo valores mais elevados e variados para o método tradicional.

A composição do óleo de argan encontra-se intimamente relacionada à prevenção de doenças, onde o valor nutricional promove um papel importante,

como, por exemplo, nas doenças cardiovasculares, na aterosclerose, nos processos de inflamação e câncer. Devido à alta proporção de ácidos graxos insaturados e poli-insaturados (em torno de 80% de sua composição) e, especialmente, pela presença de ácido oleico que é considerado uma das gorduras mais saudáveis da dieta, seu consumo pode ser capaz de modular lipídeos plasmáticos e lipoproteínas, sendo promissor no tratamento de doenças (BARTSCH *et al.*, 1999; KHALLOUKI *et al.*, 2005). Já foi reportado que a presença concomitante de ácidos graxos insaturados e antioxidantes fenóis como γ -tocopherol são essenciais para a prevenção de doenças cardiovasculares e para promover propriedades hipocolesterolêmicas (CHARROUF; GUILLAUME, 2007; HILALI *et al.*, 2007).

A presença de vitamina E agrega valor nutricional ao óleo, pois encontra-se envolvida na eliminação de espécies reativas de oxigênio, na prevenção da lipoperoxidação de membranas e na regulação de genes (KHALLOUKI *et al.*, 2005; GLEIZE *et al.*, 2012). Outro mecanismo de ação é restaurar o sistema imune, aumentando a proporção de células e produção de citocinas, sendo que a porção γ , que se apresenta em maior quantidade no óleo de argan, segundo Khallouki e colaboradores (2005), possui efeitos mais pronunciados em relação às outras isoformas na prevenção do câncer.

Outros constituintes, como o esqualeno, também presentes no óleo de argan, podem estar relacionados à proteção contra o câncer de pele, excreção de xenobióticos e diminuição dos níveis de colesterol em animais de laboratório. Além disso, a presença do escotanol no óleo já foi relacionada com atividade anticarcinogênica (KHALLOUKI *et al.*, 2005).

Pela atividade biológica devido aos diferentes constituintes, o óleo de argan tem demonstrado potencial no tratamento de diversas doenças, tais como efeito antiproliferativo no tratamento de células cancerosas prostáticas (BENNANI *et al.*, 2007), efeito hipolipidêmico e anticolesterolêmico (BERROUGUI *et al.*, 2003), antiaterogênico (CHERKI *et al.*, 2005), anti-hipertensivo (BERROUGUI *et al.*, 2004), na prevenção de doenças cardiovasculares (CHERKI *et al.*, 2006) e prevenção de diabetes mellitus (BELLAHCEN *et al.*, 2012). Outros estudos ainda demonstraram atividade antitrombótica (MEKHFI *et al.*, 2012), além de propriedades analgésicas e anti-inflamatórias (SAMANE *et al.*, 2006).

O óleo de argan já foi utilizado como matéria-prima de nanoemulsões preparadas pelo método da ultrasonicação para incorporação do diclofenaco,

desenvolvidas por Lococo e colaboradores (2012). Os autores observaram uma influência do aumento da concentração de óleo (de 0,1 g a 0,6 g), que refletiu no aumento do diâmetro médio das gotículas (de 129 ± 10 nm a 231 ± 20 nm). Em contrapartida, a inserção do fármaco na formulação não foi capaz de alterar o tamanho das gotículas. Quanto ao potencial zeta, não foi observada influência do aumento da concentração de óleo, nem mesmo da incorporação do diclofenaco na formulação. Além disso, a eficiência de encapsulamento obtida para o diclofenaco foi de 85%.

O óleo de argan já foi empregado como constituinte de suspensões de nanocápsulas em um estudo desenvolvido por Nassar e colaboradores (2009). Os autores empregaram uma combinação de dois polímeros polimetacrilatos (Eudragit[®] L, cuja solubilidade se dá em pH 5,5 e Eudragit[®] RS, insolúvel, independentemente do pH) pelo método da nanoprecipitação para incorporação do fármaco tacrolimus. As nanocápsulas obtidas apresentaram tamanho de 350 nm a 400 nm e após esta etapa de preparação, os autores promoveram o microencapsulamento das nanocápsulas com hidroxipropilmetilcelulose, um polímero bioadesivo, obtendo de 2 a 10 μ m de tamanho. As formulações preparadas a partir de Eudragit[®]L, apresentaram teor de $6,5 \pm 1,13$ mg/g em relação ao valor teórico de 7,6 mg/g e eficiência de encapsulamento de 85%, enquanto que as formulações preparadas a partir da proporção de polímero (Eudragit L/RS 1:3) apresentaram teor de $6,71 \pm 0,44$ mg/g e eficiência de encapsulamento de 88%, resultado semelhante ao encontrado para as microesferas contendo (Eudragit L/RS 1:1).

3.3 Óleo de linhaça

O linho (*Linum usitatissimum* L.) é uma vegetação herbácea pertencente à família Linnaceae, sendo originário da região do mediterrâneo e sudoeste asiático (MILLAM *et al.*, 2005; CORDEIRO *et al.*, 2009; SALIM *et al.*, 2011). De cultura milenar, quando a produção destinava-se à fabricação de tecidos extraídos da fibra, vem crescendo o interesse pela produção de variedades onde é possível a obtenção de sementes de elevada importância nutricional (BLOEDON *et al.*, 2004). Ultimamente, os países onde se concentram as maiores produções de linho

englobam diferentes regiões geográficas do planeta como, por exemplo, Argentina, China, Canadá, Índia, Estados Unidos e Rússia (MILLAM *et al.*, 2005; JUITA *et al.*, 2012).

A linhaça, também conhecida como semente do linho, apresenta formato ovalado e é encontrada no interior de cápsulas contendo de 4 a 10 sementes que podem ter coloração marrom ou amarelada. É considerada rica em substâncias oleaginosas, da qual se extrai o óleo de linhaça, que é obtido através da prensagem a frio das sementes. Estas são utilizadas como complemento alimentar, pois são consideradas alimento funcional, devido aos seus benefícios nutracêuticos (BLOEDON *et al.*, 2004; MILLAM *et al.*, 2005; NYKTER; KYMALAINEM, 2006).

A produção anual do óleo de linhaça destina a oferecer matéria-prima para aplicações tecnológicas como agentes anti-ferrugem, aditivos em plásticos de PVC, como agente secante em vernizes e tintas, na produção de aromatizantes para a indústria alimentícia, além da disponibilização do óleo comestível (BLOEDON *et al.*, 2004; MILLAM *et al.*, 2005; NYKTER; KYMALAINEM, 2006).

Existem diferentes variedades da planta que são destinadas para a produção da fibra ou para produção do óleo para consumo humano, sendo que é possível a extração do óleo a partir das sementes de ambas as variedades. A semente pode fornecer uma quantidade de óleo numa proporção de 20 a 40% do seu peso original (NYKTER; KYMALAINEM, 2006; ZHANG *et al.*, 2011), além de 25% de fibras, 25% de proteínas e 1% de ligninas (RABETAFIKA *et al.*, 2011). A composição dos constituintes da semente pode diferir quando esta se apresenta na forma inteira ou triturada (BLOEDON *et al.*, 2004).

As lignanas são fitoestrógenos de estrutura fenólica, obtidos através da transformação das ligninas vegetais. Após a ingestão, são metabolizadas pelas bactérias intestinais em enterolactona e enterodiona, com atividade biológica antiestrogênica e fracamente estrogênica, além de apresentar ação antimitótica, antifúngica, antioxidante e anticancerígena. Estudos ainda relatam inibição da agregação plaquetária e mediação de reações inflamatórias (CORDEIRO *et al.*, 2009). Além disso, Herchi e colaboradores (2011) demonstraram pela primeira vez a presença de ligninas no óleo de linhaça empregando um novo método de detecção baseado em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com ionização por spray e espectrometria de massas, através do qual observaram a presença de pinoresinol, metairesinol, difilina e secoisolariciresinol.

Com relação às proteínas extraídas do óleo da linhaça, estas possuem atividade biológica referente à própria composição de aminoácidos ou pela interação com outros componentes do óleo, tais como polissacarídeos e ligninas. Alguns efeitos relatados foram anti-hipertensivo, antioxidante, anti-inflamatório, antifúngico, antidiabético, antitrombótico, dentre outros (RABETAFIKA *et al.*, 2011).

No que diz respeito à composição do óleo, existe uma variação natural que encontra-se relacionada às condições ambientais de crescimento da planta. De forma particular, o clima é capaz de influenciar na proporção de ácidos graxos, sendo que o óleo extraído de plantações em condições climáticas frias possui aumento na concentração de ácidos graxos poli-insaturados. Outras variações na composição do óleo podem ser atribuídas ao método de extração ou às diferentes variedades geneticamente modificadas da planta de onde o óleo é extraído, sendo que estas variações podem influenciar nas propriedades físico-químicas do óleo (MILLAM *et al.*, 2005; NYKTER; KYMALAINEM, 2006; JUITA *et al.*, 2012).

Além disso, a linhaça é fonte de ácidos graxos insaturados (ocupando 90% do total de ácidos graxos), na proporção de 53,3% de ácido α -linolênico (ALA), 21,2% de ácido oleico e 12,7% de ácido linoleico (TZANG *et al.*, 2009; RUBILAR *et al.*, 2012), além de ácidos graxos saturados como ácido palmítico e esteárico (NYKTER; KYMALAINEM, 2006; JUITA *et al.*, 2012). Além disso, já foram reportados fosfolípídeos como fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina e lisofosfatidilcolina (HERCHI *et al.*, 2012).

Os óleos contendo alta quantidade de ácidos graxos poli-insaturados são mais suscetíveis de sofrerem ataque do radical alquil por radicais livres, levando à consequente deterioração oxidativa, embora temperaturas superiores a 60 °C sejam capazes de promover oxidação de ácidos graxos saturados (FANCHIOTTI *et al.*, 2010; SZTERK *et al.*, 2010; JUITA *et al.*, 2012). Uma das características do óleo de linhaça quando oxidado é o forte odor de peixe e rancidez. Isto se deve à oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados α -linolênico e linoleico durante o armazenamento. Estudos relacionando a adição de compostos fenólicos como vitamina E ou antioxidantes sintéticos como butilhidroxitolueno ao óleo de linhaça, demonstraram prevenção desta oxidação. A vitamina E atuaria na ligação com os radicais livres evitando a peroxidação lipídica (FANCHIOTTI *et al.*, 2010; COLLINS *et al.*, 2011; HERCHI *et al.*, 2012). Além disso, os níveis de compostos antioxidantes no óleo tendem a diminuir com o tempo de armazenamento e calor, ao mesmo tempo em

que ocorre um processo de auto-oxidação dos ácidos graxos (NYKTER; KYMALAINEM, 2006).

Os compostos antioxidantes já relatados na literatura compreendem os ácidos ferúlico, vanílico, cumárico, clorogênico, *p*-hidroxibenzóico, além de vanilina e tocoferóis, sendo a isoforma em maior proporção. São considerados potentes antioxidantes, com atividade fisiológica reportada no tratamento de infecções, processos cancerígenos, inflamatórios e na vasodilatação (NYKTER; KYMALAINEM, 2006; HERCHI *et al.*, 2011). O efeito antioxidante e antitumoral proporcionado pela ingestão do óleo de linhaça parece estar relacionado com a presença de compostos fenólicos e grupamentos polares que interagem através de ligações de hidrogênio reversíveis (RABEKAFIKA *et al.*, 2011).

A Organização Mundial da Saúde preconiza a ingestão diária dos diferentes tipos de ácidos graxos saturados, monoinsaturados, poli-insaturados, e de cadeia longa, visto que há uma relação entre dieta balanceada e prevenção de doenças crônicas. A ingestão diária de ácidos graxos de cadeia longa proporciona fonte essencial já que o organismo é incapaz de sintetizá-lo. Já foram relatados estudos que abordam a relação da deficiência destes ácidos graxos essenciais com o desenvolvimento de doenças crônicas como câncer, doenças inflamatórias, cardiovasculares e imunológicas, portanto, sua ingestão é capaz de prevenir e tratar tais doenças (RUBILAR *et al.*, 2012).

Os componentes do óleo promovem efeito fisiológico benéfico, sendo que a maioria dos efeitos deve-se à presença do ácido α -linolênico, que é encontrado numa proporção superior em relação aos outros óleos vegetais (NYKTER; KYMALAINEM, 2006). Seu uso já foi reportado no tratamento de doenças como aterosclerose, câncer e diabetes mellitus (SALIM *et al.*, 2011), além de possuir comprovado efeito cardioprotetor ao mesmo tempo em que promove redução da pressão arterial, aumento da função endotelial, diminuição da inflamação, efeito antiarrítmico, hipotrigliceridêmico e anticoagulante (TINWORTH *et al.*, 2010; RUBILAR *et al.*, 2012). Além disso, existem evidências experimentais de efeitos anticarcinogênicos, tanto *in vitro* como *in vivo*, como inibição da carcinogênese de cólon e outros tumores (SALIM *et al.*, 2011) e redução do crescimento de tumores estabilizados (CORDEIRO *et al.*, 2009).

Em contrapartida, o consumo em excesso do óleo de linhaça é capaz de promover efeitos indesejáveis no trato gastrointestinal como náusea, diarreia e flatulência (TINWORTH *et al.*, 2010).

O óleo de linhaça já foi utilizado como matéria-prima no desenvolvimento de nanoemulsões em alguns estudos. Vyas e colaboradores (2008) desenvolveram nanoemulsão contendo óleo de linhaça para incorporação de saquinavir através do método da ultrasonicação. Os parâmetros de caracterização como tamanho de partícula ($176,6 \pm 18,2$ nm para a nanoemulsão sem o fármaco e $218 \pm 13,9$ nm para a formulação contendo saquinavir) e potencial zeta ($-39,56 \pm 3,67$ mV e $-43,28 \pm 3,79$ mV, respectivamente) foram considerados satisfatórios. Além disso, os autores não observaram alteração no tamanho de gotícula após centrifugação por 20 minutos ou armazenamento a 4°C sob proteção da luz por um período de 2 meses.

Outro estudo que aborda a incorporação de óleo de linhaça em nanoemulsões foi desenvolvido por Ganta e Amiji (2009), onde os autores incorporaram os ativos paclitaxel e curcumina através do método da ultrasonicação com alta energia. Os parâmetros físico-químicos foram avaliados: tamanho de gotícula menor que 200 nm, índices de polidispersão abaixo de 0,3, potenciais zeta de $-35,37 \pm 2,42$ mV a $-44,53 \pm 1,02$ mV, eficiências de encapsulamento próximas de 100%, além de teores de $2,0 \pm 0,02$ mg/mL para a formulação contendo paclitaxel e $1,9 \pm 0,2$ mg/mL para a nanoemulsão de curcumina.

3.4 Ubiquinona

A ubiquinona, sintetizada pela primeira vez por Crane e colaboradores em 1957, é uma substância de ocorrência natural e seu nome refere-se ao termo ubíquo remetendo-se à ampla distribuição nas membranas de tecidos do organismo (PEPE *et al.*, 2007). Possui estrutura e propriedades semelhantes a vitaminas, especialmente vitamina K e E, onde já foi erroneamente denominada de vitamina Q. Também é reconhecida por coenzima Q10, sendo sintetizada no mesmo ano por Morten e colaboradores e sua nomenclatura deve-se à repetição de 10 unidades isoprenóides em sua estrutura (ERNSTER; DALLNER, 1995; CHOI *et al.*, 2005; BOREKOVÁ *et al.*, 2008). Porém, conforme estabelecido pela IUPAC-IUB, em 1975,

seu nome oficial é ubiquinona e segundo Ernster e Dallner (1995), o emprego do termo ubiquinona seria o mais adequado para designar esta substância, pois atua não somente como coenzima, mas também como antioxidante, além de não ser considerada uma vitamina, pois é sintetizada pelo organismo.

A estrutura da ubiquinona foi elucidada por Shunk e colaboradores em 1958 e consiste de um anel benzoquinona ligado a uma cadeia de caráter hidrofóbico denominada de isopreno. Podem ser encontrados na natureza variações na quantidade de unidades isoprenóides, o que leva a distribuição da coenzima em diferentes organismos como, por exemplo, bactérias, vegetais e nos humanos. Neste último, a ubiquinona apresenta repetição de 10 unidades isoprenóides (JAMES *et al.*, 2004; DHANASEKARAN; REN, 2005). A presença desta cadeia lateral é responsável por tornar a molécula altamente lipofílica (ZULLI *et al.*, 2006). Sua nomenclatura química é designada por 2,3-dimetoxi, 5-metil, 6-poliisopreno parabezoquinona e apresenta 3 estados oxidativos intercalados (JAMES *et al.*, 2004; BHAGAVAN; CHOPRA, 2006; BOREKOVÁ *et al.*, 2008). A figura 3 apresenta os estados oxidativos da ubiquinona, ou seja, as formas oxidada (ubiquinona) e reduzida (ubiquinol), através da adição de 2 elétrons e 2 prótons pela enzima ubiquinona redutase. Quanto à sua configuração, existe nas duas formas, cis ou trans, sendo a última de ocorrência natural (BOREKOVÁ *et al.*, 2008).

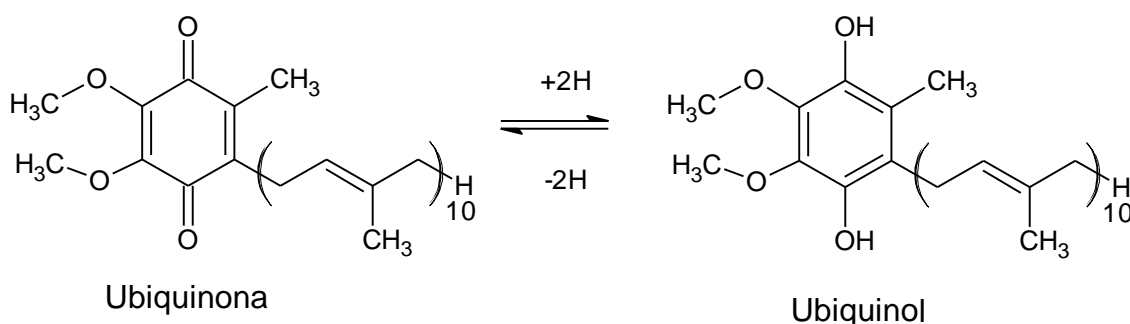


Figura 3 – Estados oxidativos da ubiquinona

A ubiquinona atua por diferentes mecanismos, pelos quais se encontra bem fundamentada sua relação no metabolismo bioenergético, sua atuação como antioxidante, além de ser capaz de promover regulação na expressão de genes atuando na proteção do DNA e possuindo efeito anti-apoptótico (DHANASEKARAN;

REN, 2005). Devido à variedade de mecanismos de ação, é empregada como suplemento alimentar, em formulações cosméticas e no tratamento de doenças devido ao seu potencial terapêutico (LITARRU; TIANO, 2010). Na área cosmética a ubiquinona é bastante explorada devido ao seu potencial antioxidante, evitando a formação de radicais livres e prevenindo o envelhecimento cutâneo (ZULLI *et al.*, 2006).

Uma das funções mais importantes que a ubiquinona desempenha é sua participação na cadeia respiratória e a consequente produção de ATP, onde atua como co-fator no transporte de elétrons. Localizada na membrana interna da mitocôndria, a ubiquinona auxilia o transporte de elétrons de substratos primários para o sistema oxidase, enquanto transfere prótons para o exterior da membrana, criando, dessa forma, um gradiente eletrônico que culmina na formação de ATP (ERNSTER; DALLNER, 1995; CRANE, 2001).

Outra função predominante é sua atuação como antioxidante devido à forma reduzida ubiquinol, que proporciona manutenção da fluidez das membranas biológicas e previne a lipoperoxidação, além de atuar de forma importante na regeneração de outros antioxidantes, como vitamina C e E. Desta forma, possui capacidade de prevenir doenças relacionadas a um aumento no estresse oxidativo ao prevenir a formação de radicais livres (CRANE, 2001; DHANASEKARAN; REN, 2005).

A versatilidade de aplicações deste co-fator promove potencialidade no tratamento de diversas doenças, onde há um desequilíbrio nas funções mitocondriais, tais como: doenças cardiovasculares, hipertensão, doenças neurodegenerativas como doença de Parkinson e Alzheimer (LITARRU; TIANO, 2010), tratamento do câncer e diabetes mellitus (DHANASEKARAN; REN, 2005; BELHAJ *et al.*, 2012). Além disso, apresenta capacidade de atuação na prevenção da oxidação das lipoproteínas de baixa densidade, prevenção da formação de radicais livres nas doenças de caráter inflamatório e prevenção do dano oxidativo causado pelas células endoteliais na isquemia (GEROMEL *et al.*, 2002).

A ubiquinona distribui-se em diversos tecidos do organismo em diferentes concentrações, sendo que seus níveis tendem a diminuir conforme há um aumento na idade devido ao processo natural de envelhecimento (GEROMEL *et al.*, 2002; ONOUE *et al.*, 2012). A dieta é capaz de fornecer ao organismo cerca de 3 a 5 mg de ubiquinona ao dia, sendo que as principais fontes encontradas na alimentação

são as carnes vermelhas, os peixes e as aves. Além disso, a molécula possui maior absorção quando na presença de uma alimentação rica em lipídeos. No entanto, quando o organismo encontra-se em deficiência, a dieta não é capaz de promover níveis substanciais de ubiquinona. Neste caso, é necessária a ingestão de suplementação no equivalente a uma dose de 100 mg por dia (CRANE, 2001; BELHAJ *et al.*, 2012). Porém, sua biodisponibilidade oral sofre intensa variação devido à lipofilia da molécula, influenciada pelo seu alto peso molecular (863 Da) (BHAGAVAN; CHOPRA, 2006; ZULLI *et al.*, 2006; BELHAJ *et al.*, 2012; ONOUE *et al.*, 2012).

Além da vulnerabilidade frente à oxidação e à temperatura, outra característica da ubiquinona que merece ser comentada é sua suscetibilidade frente à luz (FIR *et al.*, 2009; BULE; SINGHAL; KENNEDY, 2010; ONOUE *et al.*, 2012). Um potencial emprego de substâncias fotolábeis veiculadas em carreadores submicrométricos diz respeito à capacidade desses sistemas de promover proteção do fármaco evitando sua degradação química frente à exposição da radiação ultravioleta (FONTANA *et al.*, 2010; DETONI *et al.*, 2012). Por esta razão, alguns estudos relatam o encapsulamento da ubiquinona em diferentes sistemas, com o objetivo de fotoprotoger o fármaco.

A proteção da ubiquinona frente à radiação UVA e à temperatura elevada, já foi avaliada por Kwon e colaboradores (2002), onde os pesquisadores observaram que a incorporação do fármaco em nanocápsulas de poli(metacrilato de metila), preparadas pelo método da microfluidização e evaporação do solvente, protegeram o fármaco da exposição à radiação, obtendo um percentual remanescente de ubiquinona de 68% a 78% durante 25 dias de exposição, a 45°C, enquanto que a solução aquosa contendo o fármaco apresentou 48% e uma dispersão oleosa em torno de 35%.

O encapsulamento da ubiquinona em ciclodextrinas (β -CD e γ -CD) pelo método da co-precipitação foi avaliado por FIR e colaboradores (2009). A fotoestabilidade dos complexos contendo ubiquinona foi analisada sob diferentes temperaturas (25°C e 80°C). Após 120 minutos de exposição à radiação UVC e à temperatura de 80°C, as formulações contendo ciclodextrinas protegeram o fármaco quase totalmente, enquanto que a ubiquinona na forma livre apresentou 27,7% de teor remanescente. Adicionalmente, à temperatura de 25°C, o resultado mostrou-se

semelhante, porém o teor do fármaco remanescente obtido para a ubiquinona na forma livre foi de 72,3%.

Além disso, Bule e colaboradores (2010) promoveram a incorporação da ubiquinona em microcápsulas contendo óleo de linhaça e goma arábica e avaliaram a fotoestabilidade frente à radiação UVC ($\lambda = 254 \text{ nm}$) da formulação comparada com o fármaco não encapsulado. Os resultados obtidos seguiram cinética de primeira ordem (meia-vida de 693 minutos para a microcápsula e 111 minutos para o fármaco livre) e reforçam uma maior proteção conferida pelo encapsulamento em relação à forma livre do fármaco.

Em outro estudo, ONOUE e colaboradores (2012) avaliaram a fotoestabilidade da ubiquinona quando incorporada em diferentes formulações: ubiquinona na forma cristalina, em sistema auto-emulsionado além de um sistema nano-emulsionado, onde observaram constantes de degradação de $0,13 \text{ h}^{-1}$, $1,03 \text{ h}^{-1}$ e $2,67 \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Os autores verificaram uma menor constante de fotodegradação para a ubiquinona na forma cristalina. Este fato foi atribuído à forma sólida da substância, capaz de promover maior proteção do fármaco em relação às formas líquidas.

Teeranachaideekul e colaboradores (2007) promoveram a incorporação da ubiquinona em nanoemulsões e carreadores lipídicos nanoestruturados pelo método da homogeneização a alta pressão, onde os parâmetros avaliados como tamanho de partícula (de 180 nm a 240 nm), índice de polidispersão (menor que 0,2), potencial zeta (de -40 mV a -50 mV) e eficiência de encapsulamento (100%) apresentaram valores adequados. Além disso, não foi observada diferença significativa no tamanho dos carreadores lipídicos nanoestruturados ao aumentar a proporção de óleo na formulação, embora um aumento significativo no tamanho foi observado ao incorporar o fármaco na nanoemulsão (de $180 \pm 3 \text{ nm}$ para $187 \pm 3 \text{ nm}$).

Hatanaka e colaboradores (2008) desenvolveram nanoemulsões contendo ubiquinona pelo método da homogeneização à alta pressão, através do qual obtiveram tamanho de gotícula de 60 nm e potencial zeta de -33 mV. Para efeito de comparação, promoveram a secagem da nanoemulsão (1700 nm e -39 mV) e inclusão do fármaco em complexo de ciclodextrina (2400 nm e 0 mV). Além disso, os autores observaram um aumento no tamanho de gotícula (de 60 nm para 130 nm,

de 1700 nm para 7000 nm e de 2400 nm para 7000 nm) com o aumento no tempo de armazenamento (de 0 a 90 dias).

Além disso, alguns estudos relatam as características físico-químicas da incorporação de ubiquinona em nanoemulsões preparadas por diferentes métodos. Belhaj e colaboradores (2012) desenvolveram nanoemulsões contendo lecitina de salmão extraída do óleo de salmão onde não observaram diferenças significativas entre as formulações com e sem a presença de ubiquinona nos seguintes parâmetros: tamanho de gotícula ($167 \pm 1,07$ nm e $164 \pm 1,34$ nm), potencial zeta ($-3,89 \pm 0,13$ mV e $-4,06 \pm 0,07$ mV) e índice de polidispersão ($0,12 \pm 0,02$ e $0,12 \pm 0,01$).

Além disso, outros estudos abordam o encapsulamento da ubiquinona a partir de poliésteres, como PCL e PLGA, preparados por diferentes métodos. Em um destes estudos, Terroso e colaboradores (2009) desenvolveram nanocápsulas contendo PCL e TCM, para incorporação da ubiquinona pelo método da deposição interfacial de polímero pré-formado. Os parâmetros avaliados foram considerados satisfatórios: tamanho de partícula (218 ± 7 nm a 246 ± 1 nm), índice de polidispersão ($0,15 \pm 0,02$ a $0,16 \pm 0,02$), potencial zeta ($-9,5 \pm 0,80$ mV a $-11,99 \pm 0,46$ mV), teor ($101,83 \pm 2,23\%$ a $105,23 \pm 1,32\%$) e pH ($5,18 \pm 0,2$ a $5,34 \pm 0,04$). Além disso, após um período de 20 dias de armazenamento, não houve mudança significativa no tamanho de partícula.

Nehilla e colaboradores (2008) desenvolveram nanopartículas de PLGA para incorporação da ubiquinona pelo método da nanoprecipitação, sem adição de tensoativos. Neste trabalho, os autores obtiveram um aumento na eficiência de encapsulamento de 49% para 72%, equivalente ao aumento da adição do fármaco (de 1 mg/mL para 10 mg/mL), além de observarem um aumento no teor (de 1% para 19%), tamanho de partícula (de $126 \pm 2,9$ nm a 256 ± 15 nm) e índice de polidispersão (de $0,04 \pm 0,01$ a $0,17 \pm 0,04$).

Em outro estudo, Ankola e colaboradores (2010) prepararam nanopartículas de PLGA pelo método da emulsificação-difusão-evaporação e promoveram a incorporação da ubiquinona (30% p/p) ou o seu co-encapsulamento com ciclosporina e variaram a concentração de tensoativo (brometo de dodeciltrimetilamônio, de 0,1% a 1%). Foi observado que quanto menor a concentração de tensoativo, maior o tamanho de partícula (de 100 ± 8 nm para 206 ± 9 nm) e maior a eficiência de encapsulamento (de $63 \pm 7\%$ para $87 \pm 3\%$), para as

formulações contendo ubiquinona, características que se mantiveram semelhantes durante o co-encapsulamento com ciclosporina (de $63 \pm 4\%$ para $85 \pm 8\%$).

Wang e colaboradores (2010) desenvolveram nanopartículas de PLGA associadas ou não a um modificador de superfície, a quitosana trimetilada, para o encapsulamento da ubiquinona pelo método da nanoprecipitação. Os autores observaram que a incorporação do modificador de superfície foi capaz de aumentar o tamanho de partícula (de $99,6 \pm 6,3$ nm para $146,7 \pm 5,1$ nm) e modificar o potencial zeta (de $-18,3 \pm 1,2$ mV para $21,0 \pm 2,9$ mV). Além disso, a eficiência de encapsulamento da nanocápsula contendo quitosana apresentou 8,8% e teor de 99,97%.

Outro estudo empregando ubiquinona e PLGA como envoltório das nanopartículas foi desenvolvido por Swarnakar e colaboradores (2011). O método de preparação utilizado foi a emulsificação-difusão-evaporação, onde os autores observaram que a adição de diferentes tensoativos pode influenciar nas características físico-químicas da formulação. Ao utilizar brometo de dodeciltrimetilamônio, obtiveram menor tamanho de partícula ($119,4 \pm 2,3$ nm), índice de polidispersão mais adequado ($0,09 \pm 0,015$), maior eficiência de encapsulamento ($93,31 \pm 3,97\%$), além de potencial zeta maior em módulo ($25,82 \pm 2,13$ mV).

Na literatura existem poucos estudos relacionados ao nanoencapsulamento da ubiquinona por poli(metacrilatos), em um destes trabalhos, Kim e colaboradores (2010) prepararam nanocápsulas contendo ubiquinona e polímeros desenvolvidos com os monômeros metacrilato de metila e metacrilato de butila pelo método do deslocamento do solvente, obtendo tamanho de partícula de 100 nm e potencial zeta de -60 mV.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Matérias-primas

- Óleo de argan - Pharma Nostra, São Paulo;
- Óleo de linhaça - Campestre, São Paulo;
- Poli(ϵ -caprolactona) - Sigma Aldrich, São Paulo (70.000 a 90.000 Da);
- Eudragit[®] RL100 - Degussa, Alemanha (150.000 Da);
- Monooleato de sorbitano (Span 80[®]) - Sigma Aldrich, São Paulo;
- Polissorbato 80 (Tween 80[®]) - Delaware, Porto Alegre;
- Ubiquinona - Mapric, São Paulo.

4.1.2 Solventes

- Água destilada - Purificador de água Quimis, São Paulo;
- Água ultrapura - Purificador de água MegaPurity, modelo Mega-UP, Estados Unidos;
- Acetona P. A. - Nuclear, São Paulo; Quimex, Porto Alegre;
- Acetonitrila grau HPLC - Sigma-Aldrich, São Paulo;
- Etanol anidro grau HPLC - Tedia, Rio de Janeiro;
- Metanol grau HPLC - Tedia, Rio de Janeiro.

4.1.3 Equipamentos e outros materiais

- Balança analítica - modelo AY 220, Shimadzu, Japão;

- Agitador magnético - modelo TE-085, Tecnal, São Paulo;
- Evaporador rotatório - modelo 804, Fisatom, São Paulo;
- Potenciômetro - modelo pH 21, HANNA, São Paulo;
- Zetasizer Nanoseries - modelo ZEN 3600, Malvern Instruments, Reino Unido;
- Microcentrífuga - modelo 1 -14, Sigma, Alemanha;
- Câmara de fotoestabilidade - Lâmpada Philips UVC, 30 W, dimensões: 1 x 0,25 x 0,25;
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência - modelo LC-10 A, Shimadzu, Japão
 - Bomba - LC 20AT
 - Controlador - CBM 20A
 - Válvula de injeção - manual, Rheodyne
 - Pré-coluna - C₁₈ 4 x 3,0 mm - Phenomenex
 - Coluna - C₁₈ 250 mm x 4,6 mm ; 5 µm; 110 Å - Nanoseparation
 - Detector UV/VIS - SPD M20A
- Espectrofotômetro - modelo UV-1800, Shimadzu, Japão;
- Vórtex - modelo AP-56, Phoenix Luferco, Brasil;
- Dispositivo de ultrafiltração/centrifugação – modelo Amicon Ultra[®], 10,000 MV, Millipore, Estados Unidos;
- Cubetas de poliestireno – caminho ótico de 10 mm, faixa UV/VIS, Brand.

4.2 Métodos

4.2.1 Validação do método analítico para determinação da ubiquinona em sistemas nanoestruturados

O método de escolha para quantificação da ubiquinona nos sistemas nanoestruturados foi a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), de acordo com as seguintes condições cromatográficas: fase móvel etanol/metanol (90/10, v/v), fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL e comprimento de onda de 275 nm.

A validação foi determinada mediante análise dos parâmetros preconizados pela ANVISA, através da Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003),

a qual estabelece a análise da especificidade, linearidade, precisão intermediária, repetibilidade e exatidão.

A especificidade foi determinada através da comparação dos cromatogramas das nanocápsulas de PCL e EUD na presença e na ausência do fármaco. A pureza do pico foi verificada através do auxílio do detector de arranjo de diodos presente no equipamento.

A fim de analisar a linearidade do método, foi preparada uma solução-estoque de ubiquinona em etanol com auxílio de ultrassom, na concentração de 1 mg/mL, de onde foram retiradas alíquotas que foram diluídas em acetonitrila, de modo a obter uma curva analítica com soluções nas seguintes concentrações: 5, 10, 15, 20 e 25 µg/mL. Foram realizadas 3 curvas analíticas.

A precisão do método foi analisada em termos de repetibilidade e precisão intermediária. Quanto à repetibilidade, foram realizadas 6 diluições de onde foram retiradas alíquotas da solução-estoque referente ao ponto médio da curva (15 µg/mL) e diluídas em acetonitrila, filtradas e injetadas no cromatógrafo, sendo a análise realizada em um único dia. Por conseguinte, a precisão intermediária foi determinada da mesma forma, em um dia consecutivo. O desvio padrão relativo referente às análises dos dois dias foi calculado para avaliar a precisão intermediária.

Para a determinação da exatidão, utilizou-se o método da recuperação, onde foram adicionadas alíquotas crescentes da solução-estoque (7,5; 12,5 e 17,5 µg/mL) às amostras de suspensão de nanocápsulas contendo EUD e óleo de linhaça (NC-ELI-B) e suspensão de nanocápsulas contendo PCL e óleo de argan (NC-PAR-B).

4.2.2 Ensaio de inchamento/dissolução dos filmes poliméricos

Filmes de PCL, obtidos por prensagem hidráulica, e de EUD, obtidos por dispersão em acetona, foram imersos completamente em 2 mL de óleo de argan e de linhaça separadamente. Os filmes foram cuidadosamente retirados do contato com o óleo, secos com papel toalha e pesados em balança analítica calibrada após 1, 3, 5, 7, 11, 28 e 60 dias de imersão. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.2.3 Perfil Espectrofotométrico da ubiquinona e dos óleos de argan e de linhaça na região ultravioleta

Os espectros de absorção da ubiquinona e dos óleos de argan e de linhaça foram obtidos através da varredura das soluções etanólicas contendo o fármaco a uma concentração de 1 mg/mL e da varredura dos óleos separadamente a uma concentração de 1,5 mg/mL em espectrofotômetro na faixa de 190-400 nm, abrangendo os espectros de absorção das radiações UVC, UVB e UVA.

4.2.4 Avaliação da solubilidade da ubiquinona nos óleo de argan e de linhaça

O ensaio de solubilidade foi realizado com a concentração maior de óleo de argan ou de linhaça (3%). Em um *ependorff* foram adicionados 300 µL de óleo de argan ou de linhaça e 0,010 g de ubiquinona. A dispersão de ubiquinona foi submetida à agitação (vórtex) e em seguida submetida à ultracentrifugação, de onde 20 µL do sobrenadante foram retirados e diluídos em etanol. A amostra foi injetada em cromatógrafo para obtenção da área absoluta correspondente à concentração do fármaco.

4.2.5 Preparação dos sistemas nanoestruturados

Foram preparadas nanoemulsões (NE) e suspensões de nanocápsulas (NC) com os polímeros PCL e EUD, contendo o óleo de argan ou óleo de linhaça. As formulações foram nomeadas de acordo com o quadro 1.

As suspensões de nanocápsulas foram preparadas através do método da precipitação de polímero pré-formado (FESSI *et al.*, 1989). A fase orgânica, composta de solvente (acetona: 27 mL), tensoativo lipofílico (Span 80: 0,077 g), polímero (PCL ou EUD: 0,100 g), óleo (argan ou linhaça: 0,15 g ou 0,3 g) e fármaco (ubiquinona: 10 mg), foi mantida sob aquecimento a 40°C e agitação magnética

moderada por uma hora. Sucessivamente, a fase aquosa, composta de água destilada (53 mL) e tensoativo lipofílico (Tween 80: 0,077 g) foi mantida sob agitação magnética pelo mesmo período de tempo. Em seguida, a fase orgânica foi vertida lentamente na fase aquosa com auxílio de um funil e sob agitação magnética moderada por 10 minutos. Posteriormente, o volume final de suspensão de nanopartículas foi concentrado a 10 mL em evaporador rotatório a 40°C.

NE-AR-A	Nanoemulsão com óleo de argan a 3%
NE-AR-B	Nanoemulsão com óleo de argan a 1,5%
NE-ARQ-A	Nanoemulsão com óleo de argan a 3% e ubiquinona
NE-ARQ-B	Nanoemulsão com óleo de argan a 1,5% e ubiquinona
NC-PAR-A	Nanocápsula com PCL e óleo de argan a 3%
NC-PAR-B	Nanocápsula com PCL e óleo de argan a 1,5%
NC-PARQ-A	Nanocápsula com PCL, óleo de argan a 3% e ubiquinona
NC-PARQ-B	Nanocápsula com PCL, óleo de argan a 1,5% e ubiquinona
NC-EAR-A	Nanocápsula com EUD e óleo de argan a 3%
NC-EAR-B	Nanocápsula com EUD e óleo de argan a 1,5%
NC-EARQ-A	Nanocápsula com EUD, óleo de argan a 3% e ubiquinona
NC-EARQ-B	Nanocápsula com EUD, óleo de argan a 1,5% e ubiquinona
NE-LI-A	Nanoemulsão com óleo de linhaça a 3%
NE-LI-B	Nanoemulsão com óleo de linhaça a 1,5%
NE-LIQ-A	Nanoemulsão com óleo de linhaça a 3% e ubiquinona
NE-LIQ-B	Nanoemulsão com óleo de linhaça a 1,5% e ubiquinona
NC-PLI-A	Nanocápsula com PCL e óleo de linhaça a 3%
NC-PLI-B	Nanocápsula com PCL e óleo de linhaça a 1,5%
NC-PLIQ-A	Nanocápsula com PCL, óleo de linhaça a 3% e ubiquinona
NC-PLIQ-B	Nanocápsula com PCL, óleo de linhaça a 1,5% e ubiquinona
NC-ELI-A	Nanocápsula com EUD e óleo de linhaça a 3%
NC-ELI-B	Nanocápsula com EUD e óleo de linhaça a 1,5%
NC-ELIQ-A	Nanocápsula com EUD, óleo de linhaça a 3% e ubiquinona
NC-ELIQ-B	Nanocápsula com EUD, óleo de linhaça a 1,5% e ubiquinona

Quadro 1 - Nomenclatura das formulações

As nanoemulsões contendo os diferentes óleos foram preparadas através do método da emulsificação espontânea (BOUCHEMAL *et al.*, 2004), como descrito para nanocápsulas, excluindo-se o polímero da formulação.

Devido ao fato do fármaco ser fotolábil, todas as formulações foram preparadas sob proteção da luz e armazenadas em frascos âmbar. De modo a promover comparação, foram desenvolvidas formulações sem ubiquinona. As tabelas com a descrição detalhada das formulações encontram-se no Apêndice A.

4.2.6 Caracterização dos sistemas coloidais

4.2.6.1 Determinação do pH

O pH foi determinado diretamente nas amostras mediante a utilização de potenciômetro calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0. A condução do ensaio foi em triplicata.

4.2.6.2 Determinação do diâmetro, índice de polidispersão e potencial zeta

A avaliação do diâmetro e índice de polidispersão das nanoestruturas foi realizada por espectroscopia de correlação de fótons (25 °C), após diluição adequada de uma alíquota da suspensão ou emulsão em água através do equipamento Zetasizer Nanoseries. Por sua vez, os valores de potencial zeta foram determinados por mobilidade eletroforética, após diluição das amostras em NaCl (10 mM) no mesmo equipamento. As análises foram realizadas em triplicata para ambos os procedimentos.

4.2.6.3 Determinação do teor

O doseamento da ubiquinona a partir dos sistemas nanoestruturados foi realizado em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa sob as seguintes condições: coluna C₁₈, à temperatura ambiente, fase móvel isocrática etanol anidro/metanol (90:10 v/v), volume de injeção de 20 µL, fluxo de 1 mL/min e comprimento de onda de 275 nm. Para a determinação do teor, foram retiradas alíquotas das formulações referentes ao ponto médio da curva analítica (15 µg/mL), formando soluções que foram solubilizadas em acetonitrila, filtradas e injetadas no cromatógrafo.

4.2.6.4 Determinação da eficiência de encapsulamento

A determinação da taxa de associação, ou seja, da concentração da ubiquinona associada às nanocápsulas e nanoemulsões foi realizada mediante o método de ultrafiltração/centrifugação. Para tanto, 200 µL da formulação foram inseridos em dispositivo (Amicon[®] Ultra 10000 MW) e após, este foi levado à microcentrífuga por 10 minutos a 2200 xg. O fármaco livre, após separado das nanoestruturas, encontrou-se retido no ultrafiltrado. De modo a determinar a eficiência de encapsulamento (EE), calculou-se a diferença entre as concentrações total e livre da ubiquinona presentes nas nanoestruturas e no ultrafiltrado, conforme representado pela equação (1) abaixo:

$$EE = \frac{\text{Teor total} - \text{Teor livre}}{\text{Teor total}} \times 100 \quad (1)$$

4.2.6.5 Avaliação da fotoestabilidade da ubiquinona associada aos sistemas nanoestruturados

A fotoestabilidade da ubiquinona associada aos sistemas nanoestruturados em função do tempo foi determinada através da adição de 700 µL de cada

formulação em cubetas de poliestireno, as quais foram dispostas de forma equidistante em uma câmara espelhada e submetidas a uma fonte de radiação UVC. Após tempos pré-determinados (0,5; 1; 2; 3 e 4 horas), foram retiradas alíquotas da amostra referentes ao ponto médio da curva analítica (15 µg/mL), diluídas em acetonitrila, filtradas e quantificadas por CLAE, da mesma forma como procedido para o teor. De modo semelhante, um controle contendo a solução etanólica de ubiquinona foi desenvolvido com finalidade comparativa. A fim de verificar possíveis alterações no teor da amostra provenientes de outras condições diferentes da luz ultravioleta, como por exemplo, presença de calor, foram preparados controles escuros de cada formulação, obtidos através do envolvimento da cubeta com papel alumínio. A análise foi realizada em triplicata.

O perfil de degradação foi determinado através da cinética química, onde foram plotados gráficos $C \times t$ (ordem zero), $\ln C \times t$ (primeira ordem) e $1/C \times t$ (segunda ordem) para obtenção da ordem de reação. A escolha do modelo mais adequado foi realizada através da análise do coeficiente de correlação de Pearson (r), para a situação onde a correlação linear entre tempo e concentração foi considerada melhor. Para o cálculo da ordem de reação e do tempo de redução do fármaco para 90% ($t_{90\%}$), foram utilizados os modelos de equação de ordem zero (2), primeira ordem (3) e segunda ordem (4), dispostos a seguir, onde C_o é a concentração inicial, C é a concentração após o tempo de reação t , e k é a cinética de reação.

$$C = C_o - kt \qquad t_{90\%} = (0.1 \times C_o)/k \qquad (2)$$

$$\ln C = \ln C_o - kt \qquad t_{90\%} = 0.106/k \qquad (3)$$

$$1/C = 1/C_o + kt \qquad t_{90\%} = 1/(9k \times C_o) \qquad (4)$$

4.2.6.6 Avaliação da estabilidade das formulações após um período de 60 dias

As formulações após preparadas foram armazenadas em frascos âmbar e estocadas à temperatura ambiente. Foram realizadas análises de teor, tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e pH no dia da preparação e após 15, 30 e 60 dias de armazenamento.

4.3 Análise estatística

A análise estatística dos dados obtidos da caracterização físico-química e estudo de fotoestabilidade foi realizada através da aplicação de análise de variância (ANOVA de uma via) seguido por teste de múltiplas comparações (Teste de Tukey). Além disso, foi aplicado teste t de Student, para comparações de média de 2 grupos. A análise foi realizada a um nível de significância de 5%, através do software Sigma Stat 3.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Perfil espectrofotométrico da ubiquinona na região ultravioleta

De modo a verificar a região de maior absorção da radiação ultravioleta, foi realizada a varredura da ubiquinona em solução etanólica em espectrofotômetro, de acordo com a figura 4.

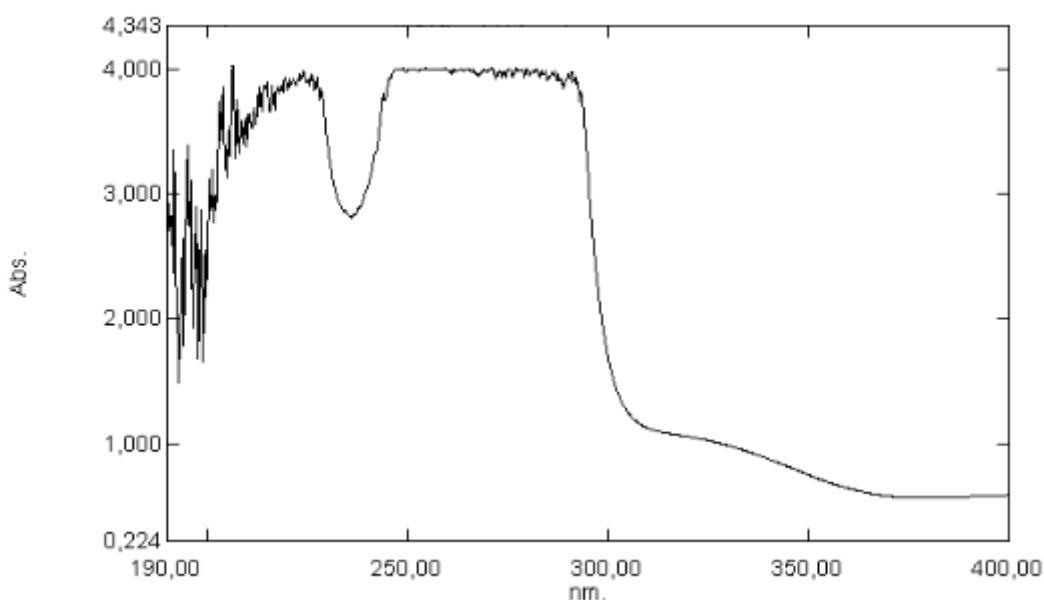


Figura 4 – Espectro de absorção da ubiquinona na região ultravioleta

Foi observada uma maior absorção da radiação na região que abrange a radiação UVC, numa faixa de comprimento de onda de 250 a 300 nm.

5.2 Validação do método analítico para determinação da ubiquinona em sistemas nanoestruturados

A fim de se realizar determinações na amostra, torna-se necessário a utilização de métodos analíticos capazes de gerar informações adequadas sobre o

composto a ser analisado. Os métodos de separação cromatográficos tem se destacado pela capacidade em realizar análises qualitativas e quantitativas em diferentes amostras e, dentre a técnica mais utilizada para tal finalidade, encontra-se a cromatografia líquida de alta eficiência, devido à sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação de substâncias químicas. De modo a assegurar que os métodos analíticos conduzam a resultados confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, a metodologia deve ser validada (RIBANI *et al.*, 2004; SILVA; ALVES, 2006).

Para o desenvolvimento da metodologia foram otimizadas as condições cromatográficas, onde se chegou à proporção de fase móvel de etanol/metanol (90:10), fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL e comprimento de onda de 275 nm. Na literatura, são encontrados métodos validados para a ubiquinona sob o termo de ubidecarenona nas Farmacopéias Americana e Britânica. No entanto, para os dois compêndios oficiais, o fluxo utilizado para a realização da análise é de 2 mL/min, valor considerado alto, além da extração da amostra necessitar de aquecimento. Desta forma, foi desenvolvido e validado um novo método simples e adequado para a determinação da ubiquinona em sistemas nanoestruturados, cujo fluxo é menor em contraste ao descrito nas referidas Farmacopéias.

Dentre os parâmetros a serem cumpridos ao longo do processo de validação, a especificidade refere-se à capacidade que o método possui de detectar a substância de interesse quando na presença de outros compostos, que podem ser produtos de degradação, impurezas ou componentes da matriz (BRASIL, 2003; BRITO *et al.*, 2003). A figura 5 apresenta os cromatogramas das nanocápsulas de EUD e óleo de linhaça (NC-ELI-B), nanocápsulas de PCL e óleo de argan (NC-PAR-B) e suas respectivas formulações contendo o fármaco: NC-ELIQ-B e NC-PARQ.

Após a visualização dos cromatogramas foi possível observar que não houve interferência dos componentes da matriz no pico de absorção do fármaco, pois as formulações sem o fármaco não apresentaram picos de absorção no mesmo tempo de retenção da ubiquinona (21 minutos) em comparação com as respectivas formulações contendo o fármaco, demonstrando que o método é específico para a determinação da ubiquinona. Além disso, com auxílio do detector de arranjo de fotodiodos, foi possível verificar que os picos apresentaram-se puros (Índice de pureza de 0.999).

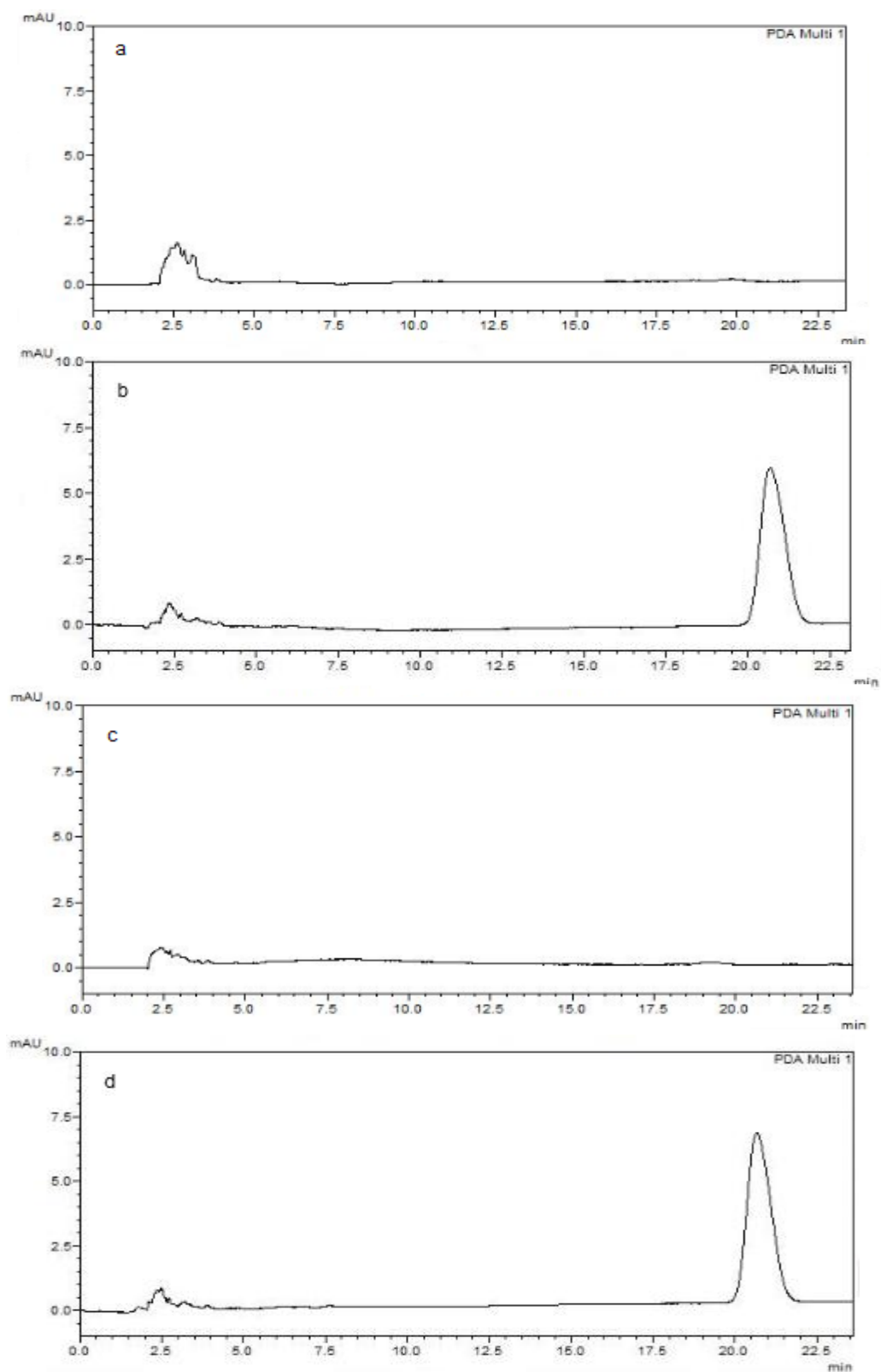


Figura 5 – Cromatogramas das nanocápsulas: NC-ELI-B (a), NC-ELIQ-B (b), NC-PAR-B (c) e NC-PARQ-B (d) Outro parâmetro que deve ser levado em

consideração é a linearidade do método, uma vez que deve existir uma relação linear dentro de um intervalo específico entre a concentração do analito que se quer verificar e a resposta detectada pelo equipamento, representada pela absorção do fármaco, área sob a curva ou altura do pico (ROZET *et al.*, 2011). A relação existente entre o sinal detectado e a concentração do analito pode ser transformado matematicamente em equação da reta, chamado de curva analítica, que deve ter no mínimo 5 pontos, excluindo-se o ponto zero da curva para eliminação de possíveis erros. (RIBANI *et al.*, 2004; CASSIANO *et al.*, 2009). Além disso, como critério de aceitação pela ANVISA, deve-se obter um coeficiente de correlação igual ou superior a 0,99 (BRASIL, 2003).

A figura 6 apresenta o gráfico da área detectada em função da concentração do fármaco, obtido pela média de 3 curvas analíticas da ubiquinona em acetonitrila na faixa de concentração de 5 a 25 µg/mL. Pode ser observado que o coeficiente de correlação obtido de 0,9998 está em conformidade com as normas legais de validação propostas pela ANVISA, indicando que o método é linear.

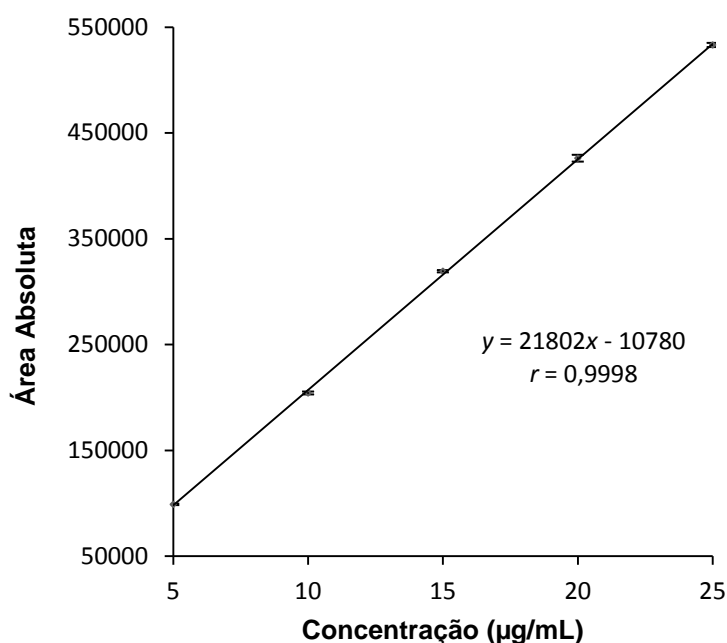


Figura 6 – Curva analítica média ($n=3$) da ubiquinona em acetonitrila

Os principais critérios que definem a qualidade dos métodos analíticos são capazes de determinar os erros da análise e são representados pela precisão e exatidão (CASSIANO *et al.*, 2009). O parâmetro precisão refere-se à proximidade

das medidas realizadas a partir de uma série de repetições em uma mesma amostra e geralmente é expressa em termos de desvio-padrão ou porcentagem do coeficiente de variação, também designado como desvio padrão relativo (DPR) (BRITO *et al.*, 2003).

A precisão pode ser representada de diferentes formas: repetibilidade (precisão intra-dia), precisão intermediária (precisão inter-dia) e reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial). A repetibilidade é considerada como o grau de concordância dos resultados obtidos através de medições sucessivas efetuadas sob um mesmo procedimento, analista, instrumentação e realizados num intervalo curto de tempo. Por sua vez, a precisão intermediária leva em consideração a análise realizada em uma mesma amostra, método e laboratório, mas utilizando condições diferentes de variação, como por exemplo: diferentes analistas, equipamentos e tempos. É uma medida estimativa da variabilidade dos resultados em um mesmo laboratório (BRASIL, 2003; SILVA; ALVES, 2006). Os resultados da análise da precisão estão dispostos na tabela 1.

Através da tabela 1 foi possível observar que o DPR tanto para determinação da repetibilidade (2,32%), quanto para a precisão intermediária (1,80%), apresentou valores aceitáveis, abaixo de 5%, de acordo com o critério de aceitação estipulado pela ANVISA (BRASIL, 2003).

Tabela 1 – Análise da precisão (repetibilidade e precisão intermediária) no doseamento de sistemas nanoestruturados contendo ubiquinona

Precisão	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	Recuperação média (%)	DPR* (%)
Intra-dia (n=6)	15	15,13 ± 0,34	100,92	2,32
Inter-dia (n=12)	15	15,18 ± 0,22	101,07	1,80

* DPR = Desvio padrão relativo

A exatidão do método é a medida da concordância entre os valores real e determinado experimentalmente da substância a ser analisada. Um dos testes mais utilizados para a determinação deste parâmetro é o teste de recuperação, que

consiste na fortificação da amostra com soluções de concentração conhecida do fármaco, abrangendo valores baixo, médio e alto da curva analítica. Reflete a quantidade do fármaco recuperado no processo em relação à quantidade real presente na amostra (BRITO *et al.*, 2003; CASSIANO *et al.*, 2009).

A tabela 2 apresenta os resultados da adição de soluções de concentração conhecida de ubiquinona às amostras de suspensões de nanocápsulas contendo PCL e EUD, sem o fármaco. As amostras apresentaram valores de recuperação média próximos de 100% nos 3 níveis de concentração, indicando que os resultados estão em consonância com os critérios de aceitação regulamentados pela ANVISA (80% a 120%) (BRASIL, 2003).

Tabela 2 – Análise da exatidão para quantificação de sistemas nanoestruturados contendo ubiquinona

Formulação	Níveis de concentração	Concentração adicionada (µg/mL)	Concentração recuperada (µg/mL)	Recuperação média (%)
NC-ELI-B	Baixa	7,5	7,44	99,31
	Média	12,5	12,54	100,36
	Alta	17,5	17,55	100,33
NC-PAR-B	Baixa	7,5	7,34	97,90
	Média	12,5	12,61	100,95
	Alta	17,5	17,18	98,21

5.3 Sistemas nanoestruturados a base de óleo de argan

5.3.1 Ensaio de inchamento/dissolução dos filmes poliméricos em óleo de argan

No desenvolvimento de nanocápsulas, uma questão muito importante a ser respondida é se o óleo pode provocar alterações no polímero, como inchamento e dissolução. De acordo com a literatura (COUVREUR *et al.*, 1995), para a formação da estrutura vesicular é de fundamental importância que o polímero empregado para a formação da parede das nanocápsulas seja insolúvel tanto na água, quanto no

óleo que constitui o núcleo da vesícula. Neste sentido, foram preparados filmes de PCL e EUD em triplicata e estes foram imersos no óleo de argan separadamente para verificar se este óleo é capaz de provocar alguma mudança de massa nos filmes poliméricos. Os resultados do peso dos filmes poliméricos podem ser visualizados na figura 7.

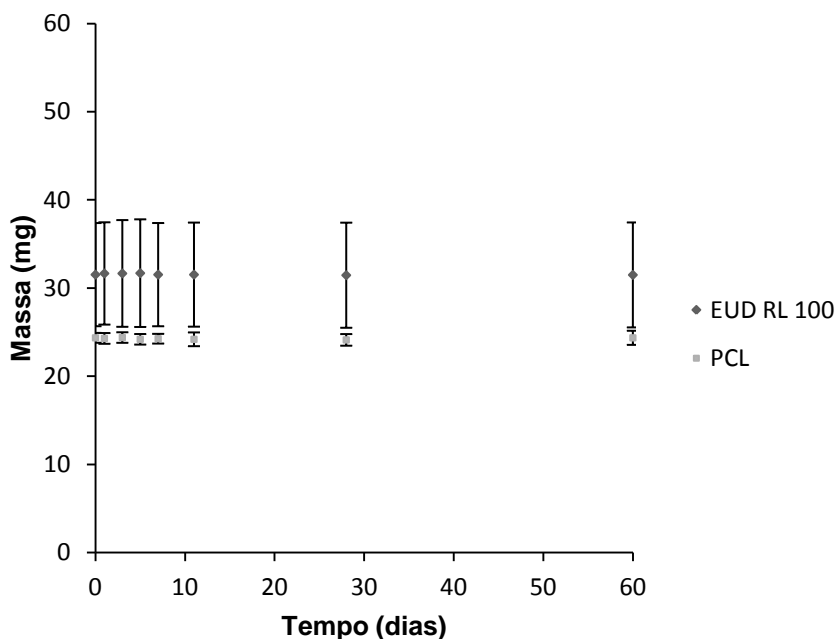


Figura 7 - Peso dos filmes poliméricos de EUD e PCL ao longo de 60 dias de imersão em óleo de argan

O filme de EUD no início do experimento pesava $31,5 \pm 5,9$ mg. Após 60 dias de imersão no óleo, sua massa permaneceu praticamente inalterada. A mesma constatação pode ser atribuída ao filme de PCL. Desta forma, o óleo de argan não foi capaz de promover alteração de peso nos filmes dos polímeros, pois não interagiu com estes, mostrando-se um óleo adequado para a preparação de nanocápsulas contendo PCL ou EUD.

5.3.2 Perfil espectrofotométrico do óleo de argan na região ultravioleta

De modo a avaliar se o óleo de argan é capaz de absorver radiação na região do ultravioleta, uma amostra deste em solução etanólica foi submetida à varredura em espectrofotômetro, a qual pode ser visualizada na figura 8.

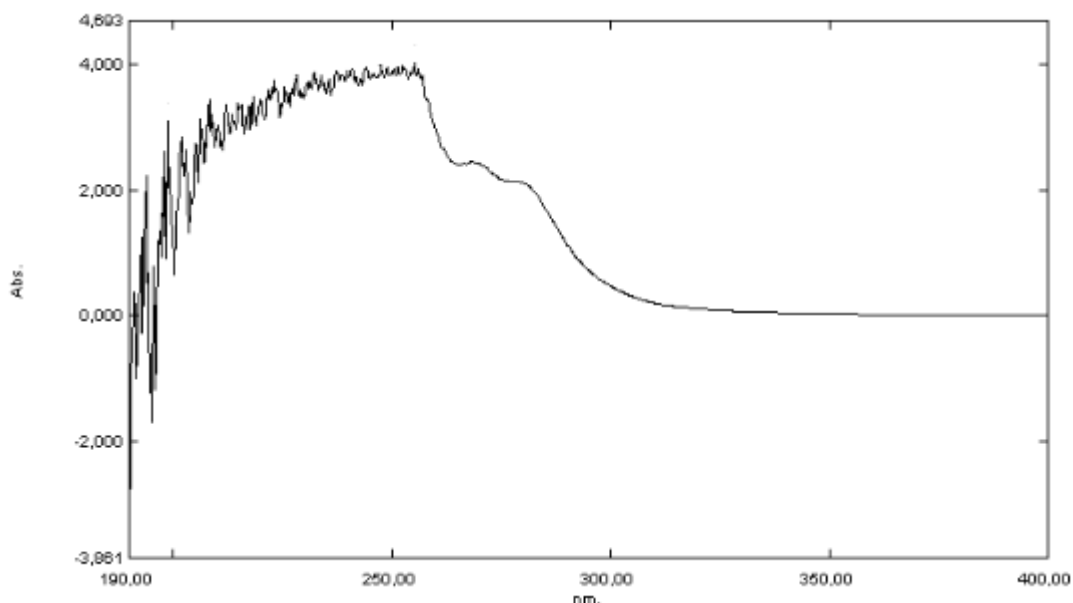


Figura 8 – Espectro de absorção do óleo de argan na região ultravioleta

Foi possível observar que o óleo de argan apresentou absorção na região correspondente à radiação UVC, que abrange a faixa de comprimento de onda de 190 a 290 nm, não sendo observada absorção nas faixas de comprimento de onda correspondentes à radiação UVB (290-320 nm) e UVA (320-400 nm).

5.3.3 Avaliação da solubilidade da ubiquinona em óleo de argan

O valor determinado experimentalmente para a solubilidade da ubiquinona em óleo de argan foi de $20,9 \pm 6,7$ mg/mL. Desta forma, o fármaco é considerado muito solúvel no óleo testado, visto que 10 partes de ubiquinona foram solúveis em menos de 1 parte de óleo de argan. Sendo assim, este óleo foi considerado uma matéria-prima adequada para formulação de nanocápsulas e nanoemulsões contendo ubiquinona.

5.3.4 Caracterização físico-química dos sistemas nanoestruturados a base de óleo de argan

Após a preparação, a análise macroscópica das nanocápsulas e nanoemulsões revelou uma característica comum relacionada ao movimento browniano dos sistemas coloidais, que se deve ao efeito Tyndall, assim como

observado no desenvolvimento de nanopartículas poliméricas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2006; OURIQUE *et al.*, 2011; TERROSO *et al.*, 2009) e nanoemulsões (ZULLI *et al.*, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2010; BELHAJ *et al.*, 2012). As formulações sem o fármaco apresentaram um aspecto leitoso e opalescente com reflexo azulado, enquanto que as formulações contendo ubiquinona apresentaram a mesma característica, porém, com uma tonalidade amarelada devido à presença do fármaco, efeito que se deve à absorção de luz pela molécula, como já relatado por ZULLI e colaboradores (2006). Além disso, não foi observado nenhum sinal de precipitação nas formulações.

Após a preparação, os sistemas foram caracterizados e comparados quanto à influência da natureza do núcleo oleoso e da sua quantidade na formulação, quanto ao tipo de polímero utilizado na constituição da parede polimérica, quanto à presença do fármaco, além da comparação entre nanoemulsão e nanocápsula.

As tabelas a seguir (3, 4, 5, 6, 7 e 8) apresentam os dados de caracterização físico-química das nanoemulsões e nanocápsulas e as figuras (9, 10, 11, 14, 15 e 16) apresentam os gráficos da distribuição de tamanho dos sistemas nanoestruturados.

Tabela 3 – Caracterização físico-química das nanoemulsões contendo óleo de argan

Formulação	Tamanho (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)	pH	Teor (mg/mL)
NE-AR-A	350 ± 87	0,36 ± 0,04	-7,05 ± 4,77	6,35 ± 0,16	-
NE-AR-B	197 ± 8	0,15 ± 0,04	-12,77 ± 1,36	6,30 ± 0,24	-
NE-ARQ-A	275 ± 27	0,29 ± 0,05	-12,76 ± 0,67	6,48 ± 0,20	1,01 ± 0,01
NE-ARQ-B	250 ± 43	0,21 ± 0,03	-12,78 ± 1,18	6,33 ± 0,34	1,00 ± 0,01

A formação das gotículas em uma nanoemulsão é um processo que depende da composição da formulação, sendo que os parâmetros que podem afetar esse processo estão relacionados com a natureza do núcleo oleoso, com o tipo de tensoativo utilizado, além da concentração empregada (BELHAJ *et al.*, 2012). Com relação ao diâmetro médio das gotículas, as nanoemulsões de óleo de argan apresentaram valores submicrométricos, de 197 ± 8 nm a 350 ± 87 nm. Além disso, não houve diferença significativa de tamanho entre as formulações (ANOVA, 1 via, $p > 0,05$). As modificações como diminuição da concentração do óleo e incorporação do fármaco não causaram alterações no tamanho das gotículas. Em contrapartida,

alguns estudos apresentam alterações no tamanho de gotícula com a incorporação de ubiquinona em nanoemulsão (TEERANACHAIDEEKUL *et al.*, 2007) e aumento do diâmetro médio com o aumento da concentração de óleo em nanoemulsões sem o fármaco (LOCOCO *et al.*, 2012).

Os gráficos da distribuição de tamanho podem ser observados na figura 9, onde é possível constatar que as formulações contendo metade da concentração de óleo (NE-AR-B e NE-ARQ-B) apresentaram uma população de gotículas com estreita distribuição de tamanho, de forma unimodal, característica de um sistema homogêneo. No entanto, as formulações com o dobro da concentração de óleo (NE-AR-A e NE-ARQ-A) apresentaram um pico com uma população homogênea, além de uma pequena população de partículas na faixa micrométrica que pode ser devido ao aumento na concentração de óleo na formulação. Este fato já foi constatado por Hanno e colaboradores (2012), onde os autores relacionaram a formação de uma população de micropartículas quando a quantidade de óleo foi aumentada na formulação.

Apesar da diminuição da quantidade de óleo na formulação não ser capaz de alterar o diâmetro das gotículas, esta modificação influenciou no índice de polidispersão das formulações que não continham o fármaco (NE-AR-A e NE-AR-B). Houve uma redução significativa (ANOVA 1via, $p < 0,05$) neste parâmetro da nanoemulsão quando a concentração de óleo foi diminuída na formulação (de $0,36 \pm 0,04$ para $0,15 \pm 0,04$), embora esta constatação não tenha ocorrido para as formulações contendo o fármaco (NE-ARQ-A e NE-ARQ-B). O índice de polidispersão considerado adequado deve ter um valor próximo de 0,2, indicando que o sistema apresenta-se monodisperso, assim como relatado em outros estudos (JUNYAPRASERT *et al.*, 2009; ALMEIDA *et al.*, 2010; BELHAJ *et al.*, 2012). Neste caso, as formulações contendo metade da proporção de óleo (NE-AR-B e NE-ARQ-B) apresentaram valores mais adequados do que as formulações contendo o dobro da concentração de óleo (NE-AR-A e NE-ARQ-A).

O potencial zeta diz respeito ao potencial elétrico, localizado na superfície das gotículas, no caso das nanoemulsões e na superfície das partículas, no caso das nanocápsulas, o qual sofre influência dos componentes da formulação, tais como tensoativos e polímeros (COUVREUR *et al.*, 2002; LOBATO *et al.*, 2013). As alterações ocorridas na interface entre os meios disperso e dispersante conduzem a modificações no potencial zeta que podem ocorrer devido à dissociação de

grupamentos funcionais na superfície da partícula ou devido à adsorção de espécies iônicas localizadas no meio dispersante (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

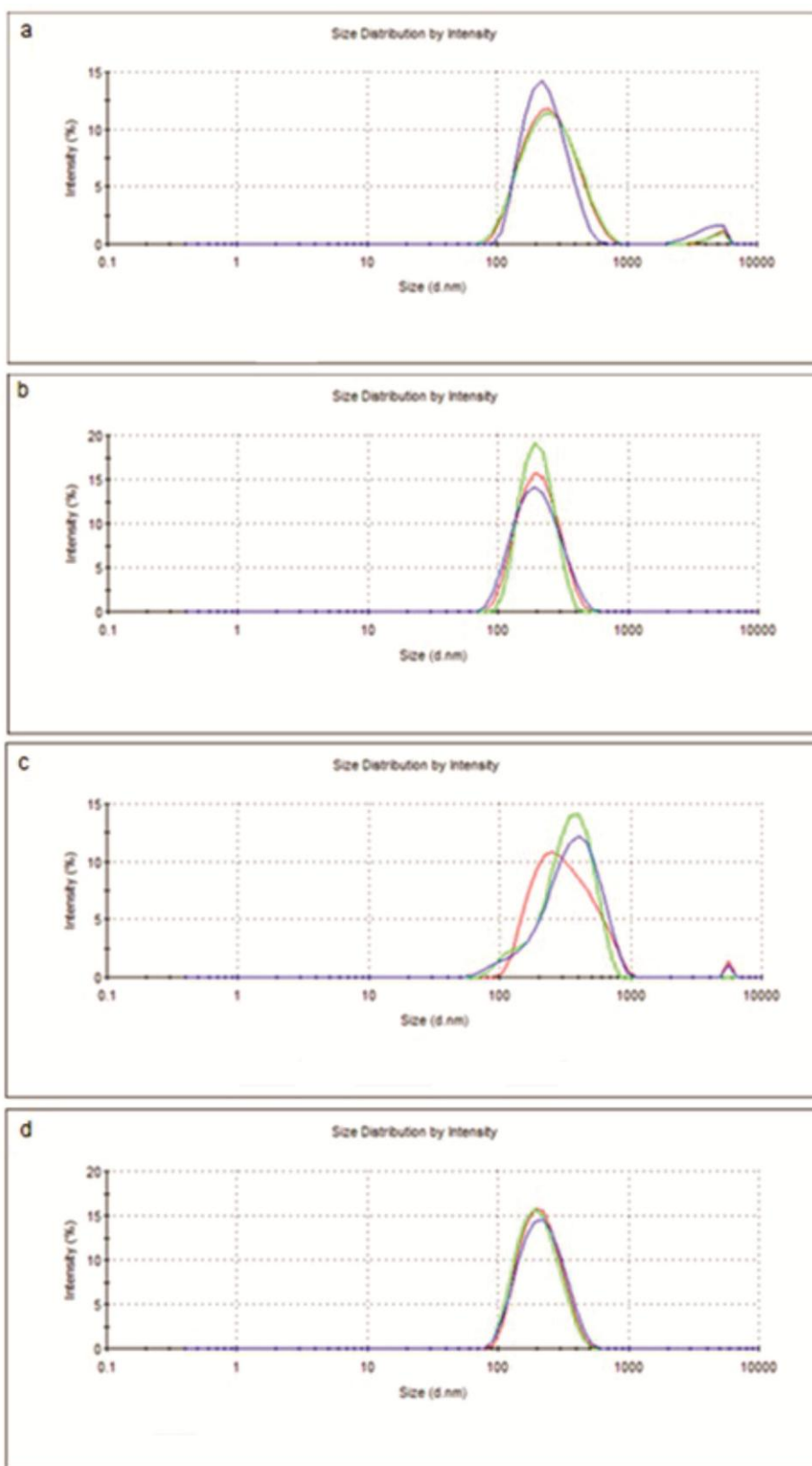


Figura 9 - Gráficos do diâmetro médio das nanoemulsões de óleo de argan: NE-AR-A (a), NE-AR-B (b), NE-ARQ-A (c) e NE-ARQ-B (d)

Com relação ao potencial zeta, as nanoemulsões apresentaram valores de $-7,55 \pm 4,77$ mV a $-12,78 \pm 1,18$ mV. Estes resultados podem ser considerados satisfatórios, uma vez que o valor em módulo para este parâmetro deve ser diferente de zero, de forma que a carga superficial adquirida pelas gotículas/partículas promova forças repulsivas que previna a agregação das mesmas, conduzindo a sistemas mais estáveis (SCHAFFAZICK *et al.*, 2013; SANTOS, 2012). De fato, o valor do potencial zeta obtido para as nanoemulsões contendo óleo de argan foi superior ao encontrado no trabalho de Belhaj e colaboradores (2012) que desenvolveram nanoemulsões de ubiquinona contendo lecitina de salmão apresentando valores de potencial zeta de $-3,89 \pm 0,13$ mV e $-4,06 \pm 0,07$ mV. Além disso, nenhuma diferença significativa no potencial zeta das formulações foi observada ao alterar a concentração de óleo ou inserir o fármaco na formulação (ANOVA, 1 via, $p > 0,05$). A semelhança do valor do potencial zeta em módulo pode estar relacionada à presença de polissorbato 80 na interface das gotículas, necessária para a estabilização física dos colóides (FONTANA *et al.*, 2009).

A avaliação do pH permitiu constatar valores levemente ácidos, de $6,30 \pm 0,24$ a $6,48 \pm 0,20$, não havendo diferença significativa entre os resultados (ANOVA, 1 via, $p > 0,05$). Além disso, o doseamento do fármaco nas nanoemulsões contendo 3% e 1,5% de óleo (NE-ARQ-A E NE-ARQ-B) foi adequado, apresentando valores próximos ao valor teórico de 1 mg/mL.

Quanto à eficiência de encapsulamento, este teste foi realizado para as formulações com menor concentração de óleo (1,5%). O valor obtido para NE-ARQ-B foi de 99,99%, resultado adequado para um fármaco de elevada lipofilia. Levando em consideração a alta eficiência de encapsulamento e a alta solubilidade da ubiquinona no óleo de argan, é muito provável que a ubiquinona esteja internalizada no núcleo oleoso da nanoestrutura. Além disso, uma das vantagens da incorporação de substâncias lipofílicas em sistemas nanoestruturados pelo método da nanoprecipitação, diz respeito à elevada taxa de associação do fármaco às nanoestruturas (FONTANA *et al.*, 2009; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). A eficiência de encapsulamento encontrada para nanocápsulas contendo ubiquinona preparadas por Teeranachaiideekul e colaboradores (2007) apresentou valor semelhante ao obtido neste trabalho.

Com relação às nanocápsulas de PCL e óleo de argan, os resultados encontram-se na tabela 4.

Tabela 4 - Caracterização físico-química das nanocápsulas contendo PCL e óleo de argan

Formulação	Tamanho (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)	pH	Teor (mg/mL)
NC-PAR-A	365 ± 31	0,32 ± 0,06	-16,54 ± 0,06	6,22 ± 0,21	-
NC-PAR-B	253 ± 14	0,17 ± 0,02	-21,16 ± 0,02	6,38 ± 0,24	-
NC-PARQ-A	340 ± 56	0,30 ± 0,07	-16,88 ± 0,05	6,41 ± 0,15	0,98 ± 0,01
NC-PARQ-B	215 ± 18	0,15 ± 0,02	-13,36 ± 1,91	6,39 ± 0,56	0,99 ± 0,02

Quanto ao tamanho de partícula, foram obtidos valores de diâmetro médio de 215 nm a 365 nm. Este resultado é compatível com o método de preparação empregado (deposição interfacial de polímero pré-formado), através do qual geralmente são obtidos tamanhos na faixa de 100 nm a 500 nm (COUVREUR *et al.*, 2002; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010), assim como observado em outros trabalhos (SCHAFFAZICK *et al.*, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2013). Ao compararmos as nanocápsulas de PCL e óleo de argan, foi constatado que a diminuição da concentração de óleo na formulação foi capaz de causar redução significativa no tamanho de partícula (ANOVA, 1 via, $p < 0,05$). As nanocápsulas sem o fármaco (NC-PAR-A e NC-PAR-B) apresentaram tamanho de partícula de 365 ± 31 nm e 253 ± 14 nm, respectivamente. A mesma constatação pode ser observada para as formulações contendo o fármaco (NC-PARQ-A e NC-PARQ-B), onde pode ser visualizada uma redução de 340 ± 56 nm para 215 ± 18 nm (ANOVA, 1 via, $p < 0,05$). Além disso, a incorporação do fármaco na formulação não alterou significativamente o tamanho de partícula (ANOVA, 1 via $p > 0,05$). Com relação ao gráfico da distribuição de tamanho (Figura 10), as formulações apresentaram uma distribuição homogênea com exceção das formulações NC-PAR-B e NC-PARQ-A que apresentaram populações de partículas na faixa micrométrica, que pode ser oriunda da contaminação da amostra.

De acordo com a literatura, além do método de preparação utilizado, a composição quali-quantitativa da formulação pode exercer influência na distribuição de tamanho de partícula e no índice de polidispersão (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Os fatores determinantes que influenciam o tamanho de partícula pelo método da

nanoprecipitação estão relacionados com a natureza e concentração do polímero, tensoativo e polaridade do solvente (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

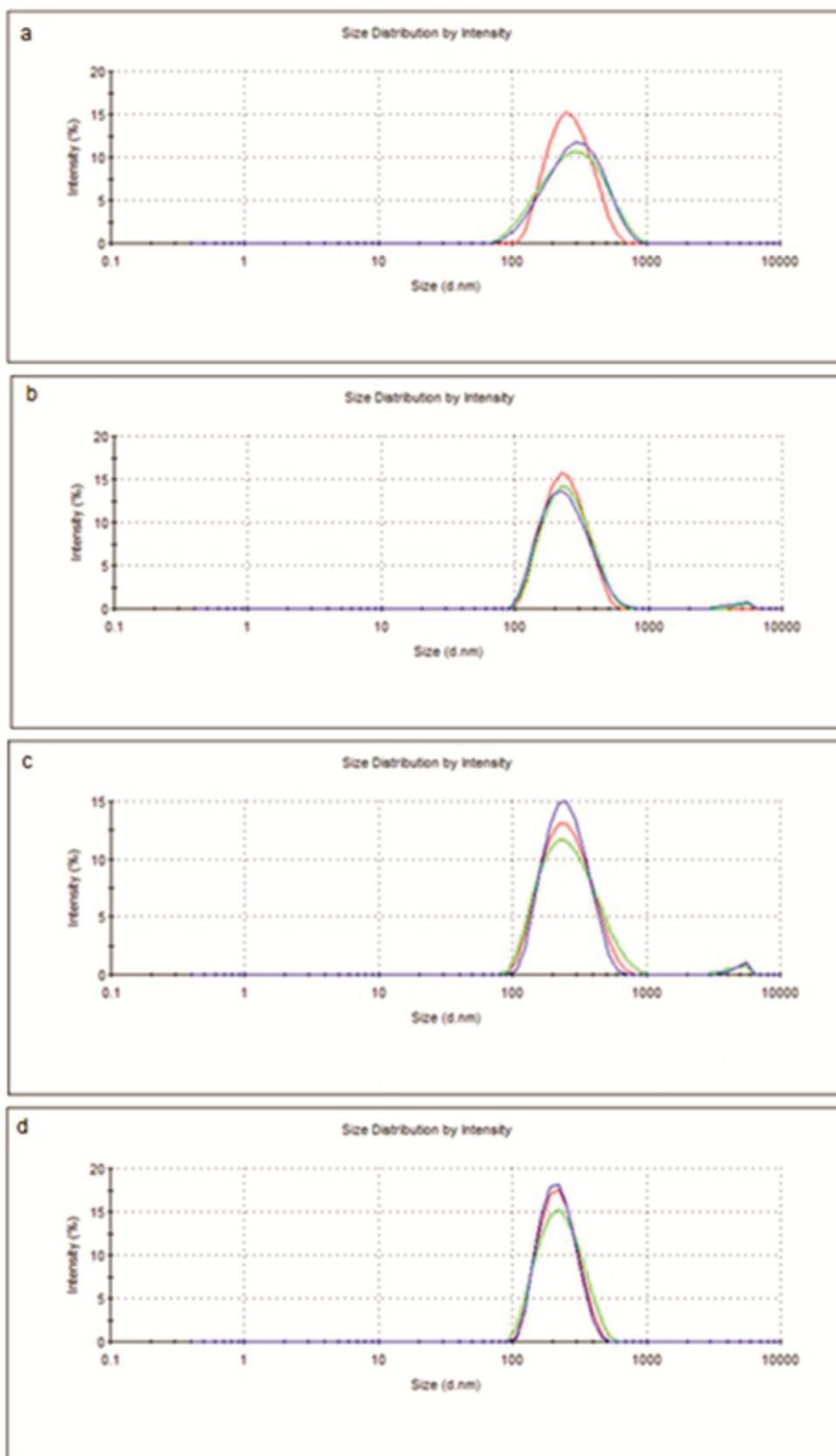


Figura 10 - Gráficos da distribuição de diâmetro das nanocápsulas de PCL e óleo de argan: NC-PAR-A (a), NC-PAR-B (b), NC-PARQ-A (c) e NC-PARQ-B (d)

No que se refere ao índice de polidispersão das formulações, estas apresentaram valores de $0,15 \pm 0,02$ a $0,32 \pm 0,06$, ocorrendo diferença significativa entre os resultados (ANOVA, 1 via, $p < 0,05$). Houve uma redução significativa neste parâmetro ao diminuir a concentração de óleo na formulação para as nanocápsulas com e sem o fármaco (Teste t, $p < 0,05$). Da mesma forma como ocorreu para as nanoemulsões contendo óleo de argan, as nanocápsulas de PCL e óleo de argan contendo menor proporção de óleo (NC-PAR-B e NC-PARQ-B) apresentaram resultados mais apropriados ($0,17 \pm 0,02$ e $0,15 \pm 0,02$) do que as respectivas formulações com o dobro da concentração de óleo (NC-PAR-A e NC-PARQ-A), apresentando valores de $0,32 \pm 0,06$ e $0,30 \pm 0,07$.

Apesar das formulações exibirem valores de potencial zeta de $-13,36 \pm 0,01$ mV a $-21,16 \pm 0,02$ mV, valores superiores aos obtidos para nanocápsulas de PCL contendo ubiquinona desenvolvidas por Terroso e colaboradores (2009), estes resultados não diferiram significativamente entre si (ANOVA, 1 via, $p > 0,05$). Porém, ao compararmos o efeito da incorporação do fármaco na formulação, foi constatada uma diminuição no valor em módulo do potencial zeta ao inserir a ubiquinona na nanocápsula contendo menor quantidade de óleo (NC-PAR-B: $-16,54 \pm 0,06$ mV e NC-PARQ-B: $-13,36 \pm 1,91$ mV) (Teste t, $p < 0,05$). Os valores negativos para o potencial zeta estão de acordo com resultados obtidos em outros estudos que relacionam a natureza química do polímero, um poliéster contendo grupamentos ácidos carboxílicos terminais, quando associado a um tensoativo não iônico na interface da partícula, como o polissorbato 80 (TERROSO *et al.*, 2009; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Geralmente, quando nanocápsulas são preparadas pelo método da nanoprecipitação, os valores de pH situam-se na faixa de 3,0 a 7,5 (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Neste trabalho, as nanocápsulas de PCL e óleo de argan apresentaram valores de pH de $6,22 \pm 0,21$ a $6,41 \pm 0,15$, não apresentando diferença significativa entre si (ANOVA, 1 via, $p > 0,05$). Na literatura foram encontrados valores mais ácidos ($5,18 \pm 0,2$ a $5,34 \pm 0,04$) para as nanocápsulas contendo ubiquinona preparadas com TCM e PCL, desenvolvidas por Terroso e colaboradores (2009).

Com relação ao teor de fármaco, as formulações NC-PARQ-A e NC-PARQ-B apresentaram valores próximos ao valor teórico (1 mg/mL). Quanto à eficiência de encapsulamento, esta foi superior a 99% para NC-PARQ-B. Neste caso, os

resultados obtidos foram mais adequados que os valores encontrados para as nanocápsulas de ubiquinona contendo PLGA sem adição de tensoativos, desenvolvidas por Nehilla e colaboradores (2008), as quais apresentaram 19% de teor e 72% de eficiência de encapsulamento. Além disso, outros estudos apresentaram eficiência de encapsulamento inferior a 100%. Em um destes trabalhos, Ankola e colaboradores (2010) obtiveram eficiência de encapsulamento de $63 \pm 7\%$ e $87 \pm 3\%$, de acordo com a redução na concentração de tensoativo, para nanocápsulas de ubiquinona preparadas com PLGA pelo método da emulsificação-difusão-evaporação.

Além da preparação de nanocápsulas a partir de um poliéster, foram desenvolvidas nanocápsulas contendo um derivado do ácido metacrílico, o EUD, um polímero catiônico. A tabela 5 mostra as características físico-químicas das formulações preparadas.

Tabela 5 - Caracterização físico-química das nanocápsulas de EUD e óleo de argan

Formulação	Tamanho (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)	pH	Teor (mg/mL)
NC-EAR-A	248 ± 24	0,28 ± 0,04	16,24 ± 1,15	5,08 ± 0,30	-
NC-EAR-B	220 ± 50	0,20 ± 0,04	17,63 ± 1,36	5,29 ± 0,52	-
NC-EARQ-A	222 ± 16	0,22 ± 0,02	16,96 ± 0,76	5,77 ± 0,42	1,00 ± 0,02
NC-EARQ-B	208 ± 5	0,21 ± 0,04	19,72 ± 2,34	5,24 ± 0,06	0,99 ± 0,01

Foi interessante constatar que para o grupo das nanocápsulas de EUD e óleo de argan, não foi observada nenhuma diferença significativa nos 4 parâmetros avaliados (ANOVA, 1 via, $p > 0,05$). As formulações apresentaram diâmetro médio de partícula de 208 ± 5 nm a 248 ± 24 nm (os gráficos da distribuição de tamanho destas formulações encontram-se na figura 11), enquanto apresentaram índices de polidispersão variando de $0,20 \pm 0,04$ a $0,28 \pm 0,04$.

Com relação ao potencial zeta, os valores positivos geralmente são obtidos quando polimetacrilatos são associados a tensoativos não-iônicos e estão relacionados à presença do grupo amônio quaternário do polímero (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Além disso, o pH das nanocápsulas de EUD

variou de $5,08 \pm 0,3$ a $5,77 \pm 0,42$, apresentando valores mais ácidos em relação às formulações de nanoemulsões e nanocápsulas de PCL.

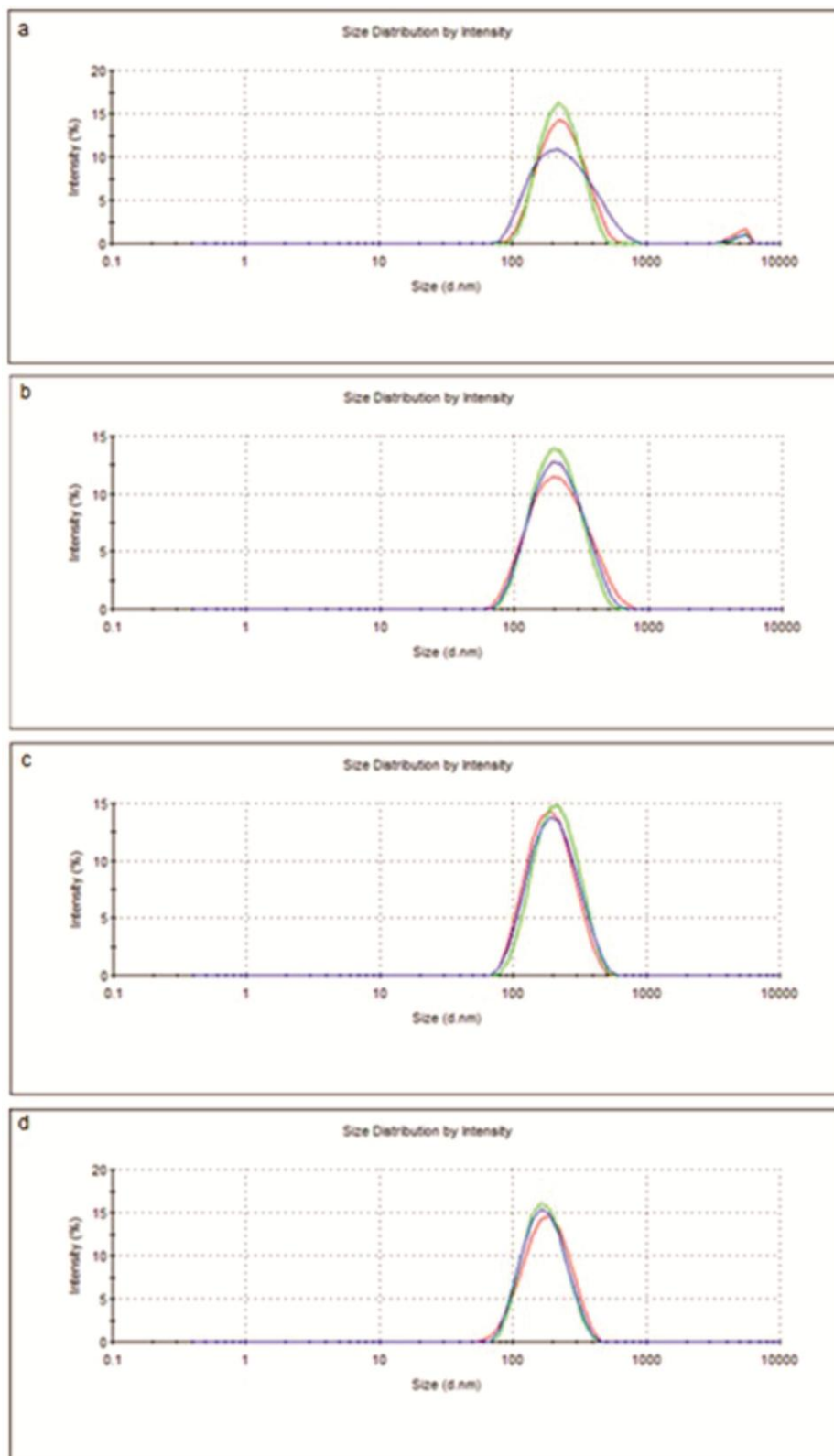


Figura 11 - Gráficos da distribuição de diâmetro das nanocápsulas de EUD e óleo de argan: NC-EAR-A (a), NC-EAR-B (b), NC-EARQ-A (c) e NC-EARQ-B (d)

Os teores obtidos para as nanocápsulas contendo 3 e 1,5% de óleo podem ser considerados adequados ($1,00 \pm 0,02$ e $0,99 \pm 0,01$ mg/mL, respectivamente), enquanto que a formulação NC-EARQ-B apresentou 100% de eficiência de encapsulamento.

No trabalho de Nassar e colaboradores (2009), foram desenvolvidas nanocápsulas de óleo de argan para incorporação do fármaco tacrolimus, e diferentes proporções de Eudragit L e Eudragit RS. A avaliação físico-química mostrou maiores tamanhos de partícula (350 nm a 400 nm) e eficiências de encapsulamento inferiores às obtidas no presente trabalho (85% a 88%).

5.3.5 Avaliação comparativa entre nanoemulsões e nanocápsulas contendo óleo de argan

Os três tipos de formulações de óleo de argan preparadas, nanoemulsões e nanocápsulas de PCL e de EUD foram comparadas de modo a avaliar a influência da presença e composição da parede polimérica nas características físico-químicas das formulações.

Com relação ao tamanho e índice de polidispersão, as formulações não apresentaram diferenças significativas entre si (ANOVA, 1 via, $p > 0,05$). Mesmo ao adicionar um polímero na formulação, este não foi capaz de alterar o tamanho nem mesmo o índice de polidispersão das nanoestruturas. Resultados semelhantes foram encontrados na literatura para nanoemulsões e nanocápsulas preparadas com rutina (ALMEIDA *et al.*, 2010); com palmitato de retinol (TEIXEIRA *et al.*, 2012) e com melatonina (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003), em contraste aos resultados obtidos para nanoemulsões e nanocápsulas contendo o filtro solar Parsol[®], desenvolvidas por Hanno e colaboradores (2012), onde os autores atribuíram a diferença de tamanho aos diferentes métodos de preparação como emulsificação espontânea para a nanoemulsão e policondensação interfacial para a nanocápsula.

Outro estudo comparativo relacionando nanoemulsões e nanocápsulas preparadas com óleo de amêndoas doce e óleo de semente de uva ressaltou a influência do tipo de estrutura vesicular no índice de polidispersão das formulações,

sendo que as nanocápsulas apresentaram valores maiores para estes parâmetros (ALMEIDA *et al.*, 2009).

Entretanto, diferentemente do que foi constatado por Flores e colaboradores (2011) onde o potencial zeta e pH das nanoemulsões e nanocápsulas preparadas com óleo essencial de melaleuca não sofreram alteração, estes parâmetros foram significativamente diferentes para as nanoemulsões e nanocápsulas de óleo de argan desenvolvidas neste trabalho (ANOVA, 1 via, $p < 0,05$). O pH das nanocápsulas de EUD (NC-EARQ-B: $5,24 \pm 0,06$) foi significativamente menor do que o valor encontrado tanto para a nanoemulsão (NE-ARQ-B: $6,33 \pm 0,34$) quanto para a nanocápsula de PCL (NC-PARQ-B: $6,39 \pm 0,56$). Além disso, o valor do potencial zeta em módulo também foi influenciado pela presença do polímero, ao constatar-se que a nanocápsula de EUD apresentou maior valor (NC-EARQ-B: $19,72 \pm 2,34$ mV) em relação à nanoemulsão (NE-ARQ-B, $12,78 \pm 1,18$ mV) e à nanocápsula de PCL (NC-PARQ-B, $13,36 \pm 1,91$ mV). Neste caso, foi evidente que a natureza do polímero, um derivado do ácido metacrílico, promoveu maior estabilização ao sistema, conduzindo ao aumento das forças repulsivas entre as partículas.

5.4 Sistemas nanoestruturados a base de óleo de linhaça

5.4.1 Ensaio de inchamento/dissolução dos filmes poliméricos em óleo de linhaça

Através da figura 12 foi possível verificar que nenhuma alteração significativa (Teste t, $p > 0,05$) ocorreu no peso dos filmes poliméricos de EUD e PCL ao longo de 60 dias de imersão em óleo de linhaça, indicando que este óleo é adequado para o desenvolvimento das nanocápsulas.

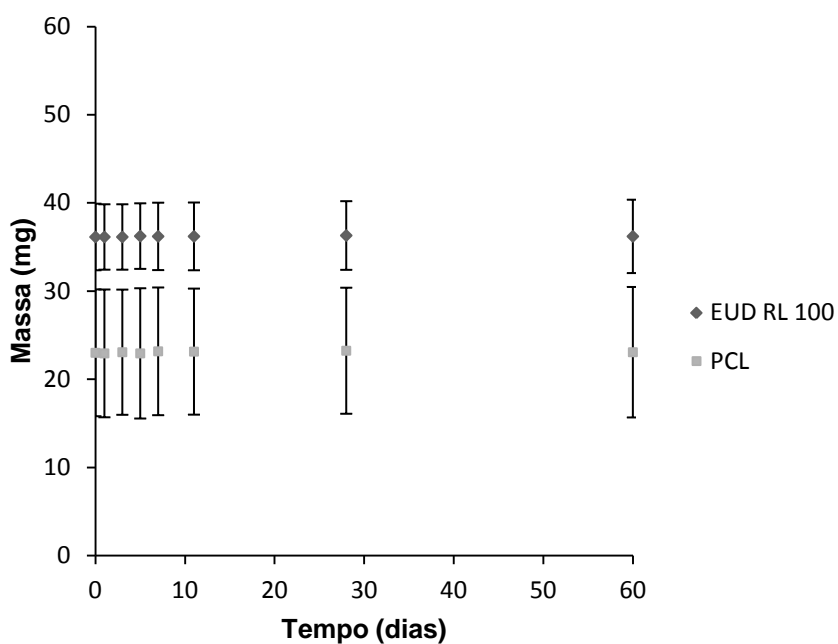


Figura 12 – Peso dos filmes poliméricos de EUD e PCL ao longo de 60 dias de imersão em óleo de linhaça

5.4.2 Perfil Espectrofotométrico do óleo de linhaça na região ultravioleta

O espectro de absorção do óleo de linhaça em solução etanólica na faixa de comprimento de onda de 190 a 400 nm pode ser visualizado na figura 13.

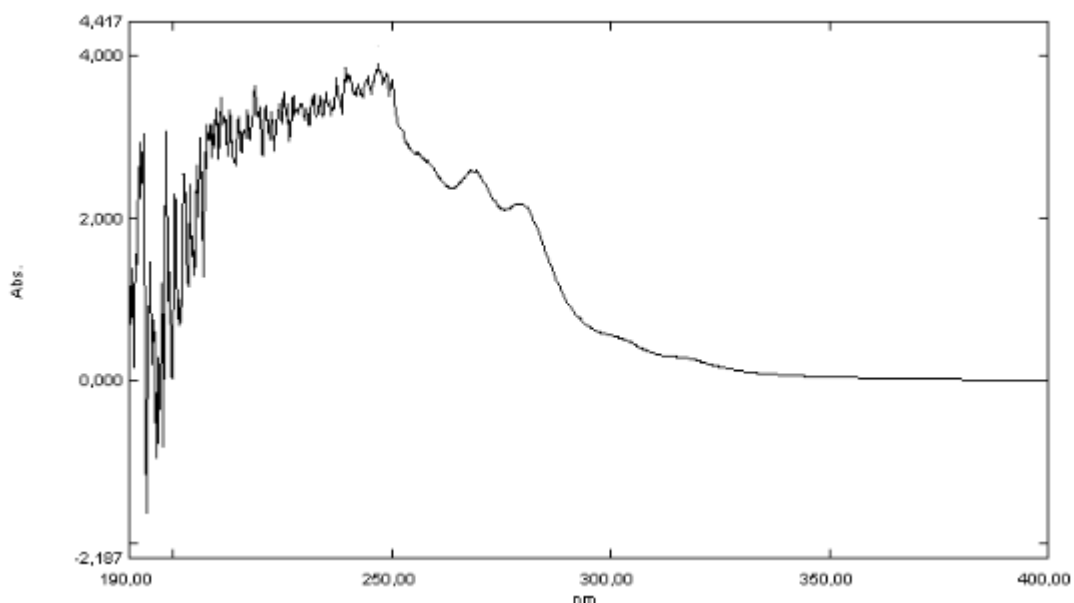


Figura 13 – Espectro de absorção do óleo de linhaça na região ultravioleta

Ao analisar a figura 13, foi observado uma maior absorção da radiação na faixa de comprimento de onda de 190 a 290 nm, que corresponde à região UVC, de forma semelhante ao que foi detectado para a varredura do óleo de argan. Além disso, Zhang e colaboradores (2011) observaram um perfil semelhante ao realizarem a varredura do óleo de linhaça em hexano.

5.4.3 Avaliação da solubilidade da ubiquinona em óleo de linhaça

A solubilidade da ubiquinona no óleo de linhaça foi de $26,85 \pm 7,0$ mg/mL, valor semelhante ao encontrado para a solubilidade no óleo de argan ($20,9 \pm 6,7$ mg/mL), o que implica dizer que ambos os óleos são adequados para a preparação de nanocápsulas e nanoemulsões contendo ubiquinona.

5.4.4 Caracterização físico-química dos sistemas nanoestruturados a base de óleo de linhaça

Assim como ocorreu para as nanoestruturas de óleo de argan, as formulações contendo óleo de linhaça foram preparadas com duas quantidades desta matéria-prima. Na tabela 6 podem ser visualizadas as características destas formulações.

Tabela 6 - Caracterização físico-química das nanoemulsões contendo óleo de linhaça

Formulação	Tamanho (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)	pH	Teor (mg/mL)
NE-LI-A	263 ± 28	$0,28 \pm 0,06$	$-18,68 \pm 3,19$	$6,73 \pm 0,15$	-
NE-LI-B	191 ± 6	$0,12 \pm 0,03$	$-15,07 \pm 3,76$	$6,41 \pm 0,26$	-
NE-LIQ-A	305 ± 40	$0,33 \pm 0,06$	$-9,98 \pm 1,25$	$6,23 \pm 0,11$	$1,01 \pm 0,01$
NE-LIQ-B	211 ± 14	$0,17 \pm 0,04$	$-16,45 \pm 6,02$	$6,59 \pm 0,06$	$1,00 \pm 0,02$

Quanto aos resultados obtidos em relação ao tamanho, diferentemente do que ocorreu para as nanoemulsões contendo óleo de argan, as nanoemulsões contendo óleo de linhaça apresentaram uma variação de diâmetro entre 191 ± 6 nm a 305 ± 40 nm, sendo que as formulações contendo 1,5% de óleo apresentaram valores menores. Houve uma diminuição significativa no tamanho das gotículas com a diminuição da concentração de óleo tanto para as formulações contendo o fármaco, como para aquelas sem ubiquinona (Teste t, $p < 0,05$). Além disso, a adição de ubiquinona não causou alteração significativa no tamanho de gotícula (ANOVA, 1 via, $p > 0,05$). Este fato pode ser corroborado por outro estudo desenvolvido por Ganta e Amiji (2009), onde não foi detectada alteração no diâmetro de gotícula das nanoemulsões contendo óleo de linhaça quando foram adicionados paclitaxel ou curcumina à formulação.

Os gráficos da distribuição de diâmetro de gotícula encontram-se dispostos na figura 14, onde pode ser verificada uma distribuição homogênea das gotículas com a presença de uma população na faixa micrométrica. Este fato pode estar relacionado à contaminação da amostra. Além disso, a formulação NE-LI-A, apresentou mais de uma população de gotículas, fato que pode ser devido à maior proporção de óleo na formulação.

No que diz respeito ao índice de polidispersão, novamente foi observado valores mais adequados, menores do que 0,2 para as formulações com metade da concentração de óleo, da mesma forma como ocorreu para as nanoemulsões e nanocápsulas de óleo de argan. Foi constatada uma redução significativa no índice de polidispersão devido à diminuição da concentração de óleo para as formulações com e sem o fármaco (ANOVA, 1 via, $p < 0,05$). Além disso, a adição do fármaco não causou alteração significativa no índice de polidispersão das nanoemulsões (ANOVA, 1 via, $p > 0,05$).

Com relação ao potencial zeta, os resultados não apresentaram diferenças significativas (ANOVA, 1 via, $p > 0,05$). Porém, ao analisar a influência da presença do fármaco na formulação, foi observada uma diminuição neste parâmetro em módulo, devido à incorporação da ubiquinona na nanoemulsão contendo maior proporção de óleo (NE-LI-A: $-18,68 \pm 3,19$ mV e NE-LIQ-A: $-9,98 \pm 1,25$ mV) (Teste t, $p < 0,05$).

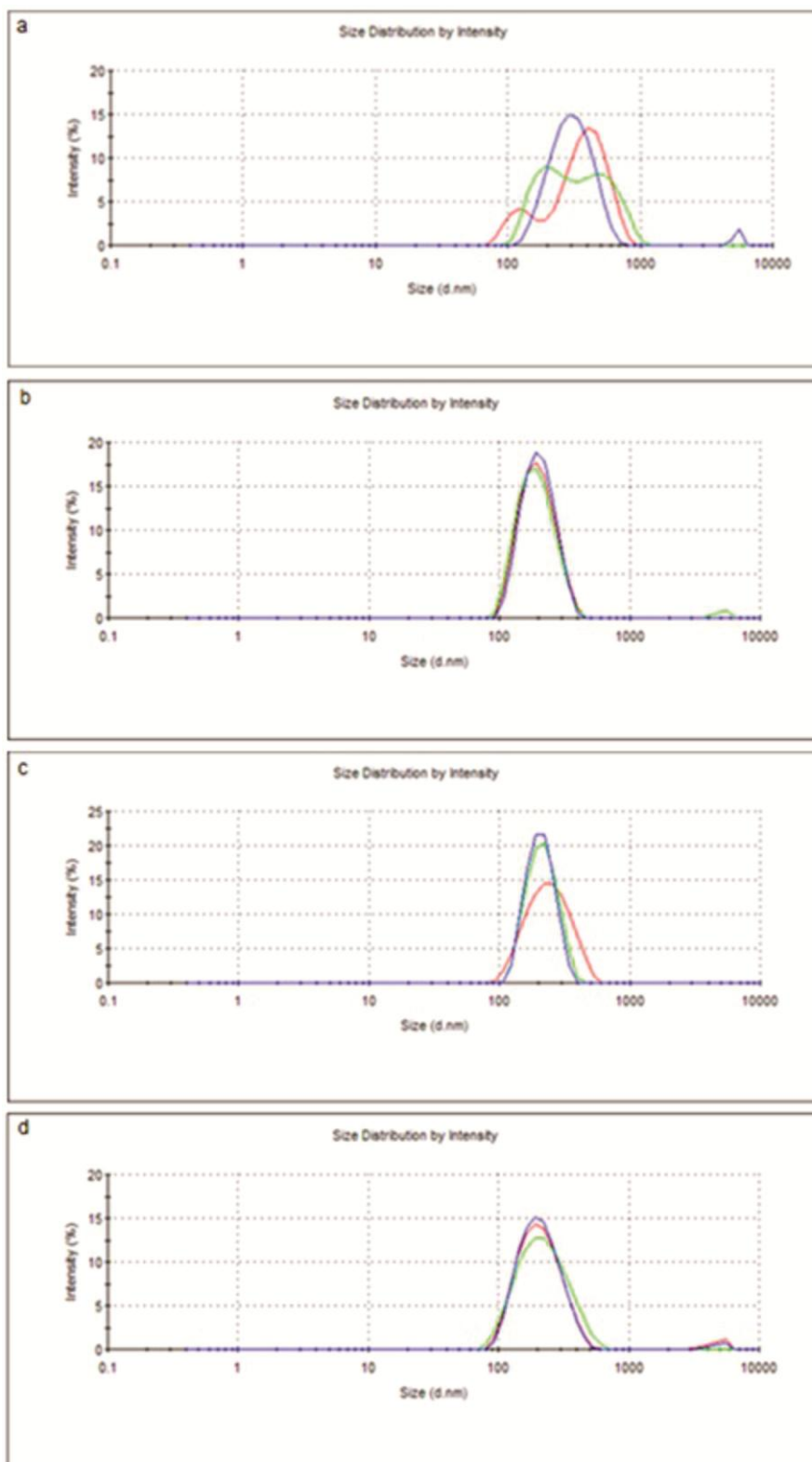


Figura 14 - Gráficos da distribuição de diâmetro das nanoemulsões de óleo de linhaça: NE-LI-A (a), NE-LI-B (b), NE-LIQ-A (c) e NE-LIQ-B (d)

Quanto ao pH das nanoemulsões contendo óleo de linhaça, os resultados não diferiram significativamente entre si (ANOVA, 1 via, $p > 0,05$). A incorporação do fármaco na formulação não foi capaz de modificar o potencial zeta da formulação, assim como observado na nanoemulsão contendo óleo de linhaça e saquinavir preparada pelo método da ultrasonicação. Os autores atribuíram o fato à hidrofobia da molécula do fármaco, onde este estaria distribuído na fase oleosa, não havendo migração para a interface óleo/água (VYAS *et al.*, 2008).

No que diz respeito à determinação do teor, as nanoemulsões de óleo de linhaça apresentaram valores próximos ao teórico, além de elevada eficiência de encapsulamento, de 100% para NE-LIQ-B. A alta eficiência de encapsulamento obtida para as formulações contendo óleo de linhaça deve-se provavelmente à alta solubilidade da ubiquinona neste óleo, onde o fármaco provavelmente encontra-se internalizado no núcleo das nanoemulsões e nanocápsulas.

Em outro estudo que aborda o desenvolvimento de nanoemulsão contendo óleo de linhaça e curcumina ou paclitaxel, os autores verificaram uma alta eficiência de encapsulamento para as formulações, que foi atribuída à presença dos fármacos paclitaxel ou curcumina no núcleo oleoso da formulação (GANTA; AMIJI, 2009).

Quanto aos dados da caracterização físico-química das nanocápsulas de PCL contendo óleo de linhaça, a tabela 7 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 7 - Caracterização físico-química das nanocápsulas contendo PCL e óleo de linhaça

Formulação	Tamanho (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)	pH	Teor (mg/mL)
NC-PLI-A	295 ± 32	0,19 ± 0,03	-17,66 ± 7,23	6,86 ± 0,12	-
NC-PLI-B	260 ± 39	0,20 ± 0,05	-20,90 ± 1,40	6,85 ± 0,01	-
NC-PLIQ-A	260 ± 22	0,22 ± 0,05	-14,68 ± 2,25	6,76 ± 0,07	1,00 ± 0,01
NC-PLIQ-B	227 ± 21	0,18 ± 0,04	-19,47 ± 4,80	6,58 ± 0,18	0,99 ± 0,03

A comparação das médias dos parâmetros avaliados na caracterização dos sistemas como tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e pH, mostrou que estes não diferiram significativamente entre si para as formulações contendo PCL e óleo de linhaça (ANOVA, 1 via, $p > 0,05$). A figura 15 mostra os gráficos da distribuição de tamanho das formulações. Neste caso, todas as formulações

apresentaram uma faixa homogênea em escala nanométrica, além de uma pequena faixa de micropartículas que pode ser devido à contaminação da amostra.

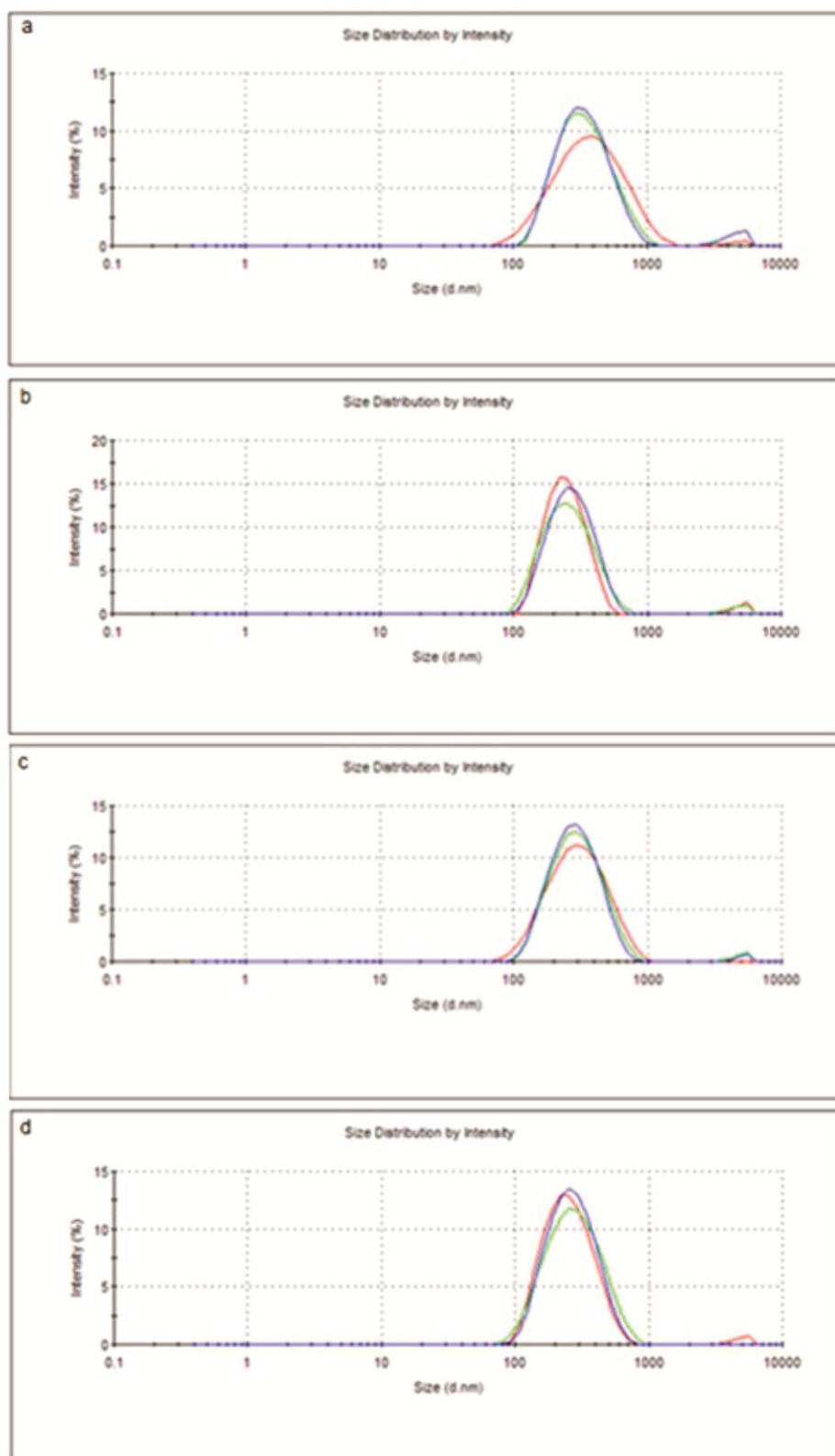


Figura 15 - Gráficos da distribuição de diâmetro das nanocápsulas de PCL e óleo de linhaça: NC-PLI-A (a), NC-PLI-B (b), NC-PLIQ-A (c) e NC-PLIQ-B (d)

O valor de potencial zeta negativo, assim como ocorreu para as nanocápsulas de PCL e óleo de argan, deve-se à exposição dos grupamentos carboxílicos terminais do poliéster (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Os resultados obtidos em relação ao pH mostram valores semelhantes das nanoemulsões e nanocápsulas, independente do óleo utilizado. Além disso, foram obtidos teores de $1,00 \pm 0,01$ mg/mL para NC-PLIQ-A e $0,99 \pm 0,03$ mg/mL para NC-PLIQ-B e eficiência de encapsulamento de 99,23% para NC-PLIQ-B, valores considerados adequados. A caracterização físico-química das nanocápsulas de EUD e óleo de linhaça também foi realizada, os dados encontram-se na tabela 8.

Tabela 8 - Caracterização físico-química das nanocápsulas de EUD RL100 e óleo de linhaça

Formulação	Tamanho (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)	pH	Teor (mg/mL)
NC-ELI-A	236 ± 23	$0,25 \pm 0,05$	$15,38 \pm 1,54$	$5,63 \pm 1,08$	-
NC-ELI-B	193 ± 9	$0,16 \pm 0,02$	$16,67 \pm 2,07$	$5,46 \pm 0,33$	-
NC-ELIQ-A	213 ± 20	$0,22 \pm 0,04$	$19,17 \pm 1,51$	$5,88 \pm 0,45$	$0,99 \pm 0,01$
NC-ELIQ-B	173 ± 9	$0,14 \pm 0,02$	$18,71 \pm 2,07$	$5,69 \pm 0,11$	$0,99 \pm 0,01$

Com relação ao tamanho, as nanocápsulas de EUD e óleo de linhaça apresentaram resultados significativamente diferentes (ANOVA, 1 via, $p < 0,05$). A diminuição da concentração de óleo na formulação promoveu redução significativa no tamanho das nanocápsulas contendo ubiquinona (NC-ELIQ-A: 213 ± 23 nm e NC-ELIQ-B: 173 ± 9 nm) (Teste t, $p < 0,05$). Além disso, foi constatada uma alteração no tamanho de partícula ao incorporar o fármaco na formulação para as nanocápsulas contendo menor proporção de óleo (Teste t, $p < 0,05$).

No que diz respeito ao índice de polidispersão, houve redução significativa neste parâmetro ao diminuir a quantidade de óleo na formulação para as nanocápsulas contendo ubiquinona (NC-ELIQ-A: $0,22 \pm 0,04$ e NC-ELIQ-B: $0,14 \pm 0,02$) (ANOVA, 1 via, $p < 0,05$). Novamente foi constatado que as formulações contendo 1,5% de óleo (NC-ELI-B e NC-ELIQ-B) apresentaram valores inferiores a 0,2 ($0,16 \pm 0,02$ e $0,14 \pm 0,02$), consideradas mais adequadas que as formulações com maior proporção de óleo. Os gráficos da distribuição de tamanho das nanocápsulas de EUD e óleo de linhaça (Figura 16), apresentaram além de uma

população homogênea de partículas, a presença de uma pequena população na faixa micrométrica para NC-ELI-A, NC-ELIQ-A e NC-ELIQ-B, fato que pode estar associado à contaminação da amostra.

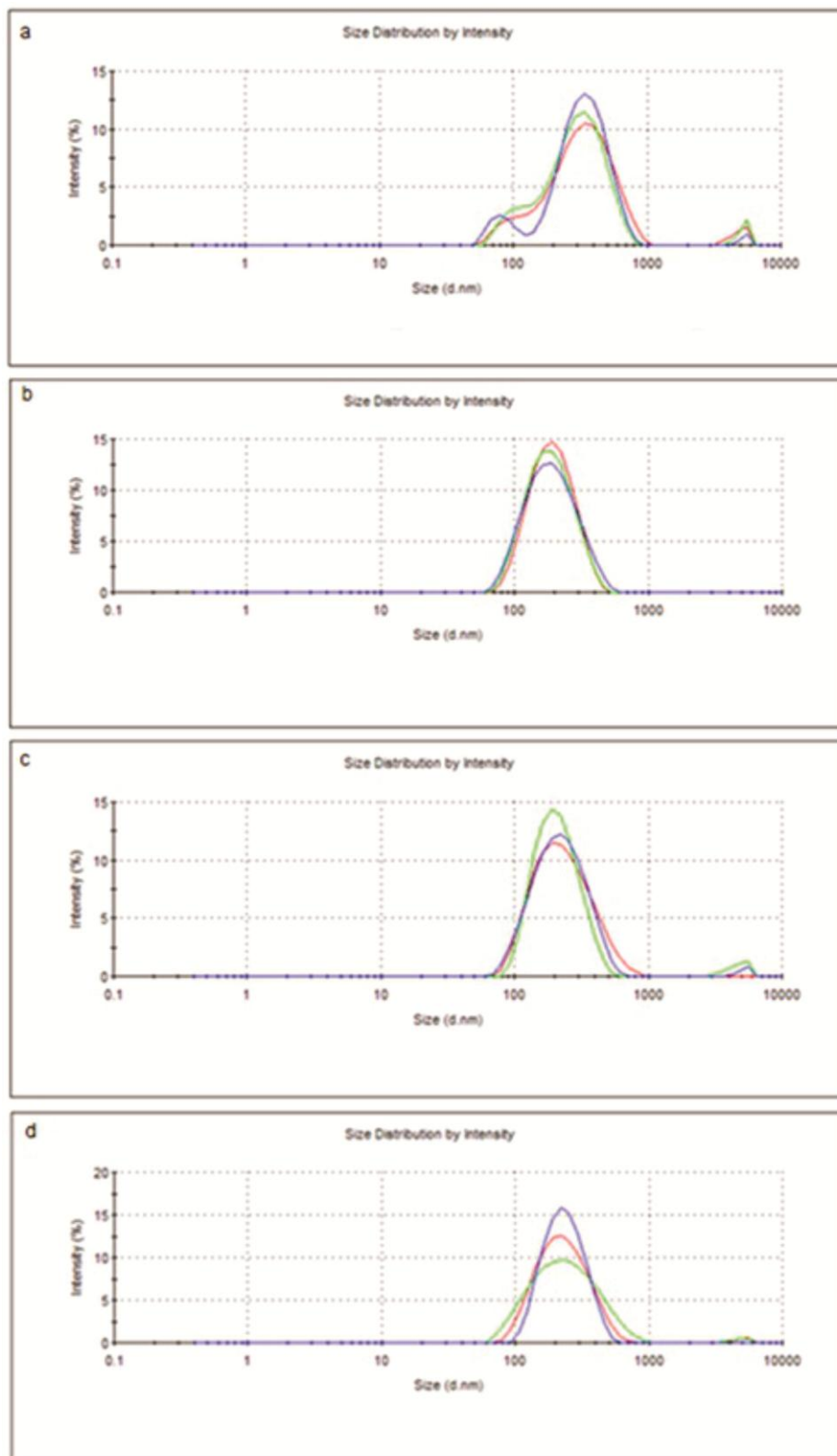


Figura 16 - Gráficos da distribuição de diâmetro das nanocápsulas de EUD e óleo de linhaça: NC-ELI-A (a), NC-ELI-B (b), NC-ELIQ-A (c) e NC-ELIQ-B (d)

Quanto à análise dos valores de potencial zeta obtidos para as nanocápsulas de EUD e óleo de linhaça, não foi observada diferença significativa entre os resultados (ANOVA, 1 via, $p > 0,05$). Porém, ao analisar a incorporação de ubiquinona na nanocápsula contendo maior quantidade de óleo, foi observado aumento significativo neste parâmetro (Teste t, $p < 0,05$). Além disso, a presença de grupamento amônio quaternário na molécula do polímero confere carga positiva à superfície da partícula, refletido pelos valores positivos do potencial zeta, assim como ocorreu para as nanocápsulas de EUD e óleo de argan. Quanto ao pH, as formulações apresentaram valores ácidos, de $5,46 \pm 0,33$ a $5,88 \pm 0,45$, de acordo com o que ocorreu para as nanocápsulas de EUD e óleo de argan. Teores adequados foram obtidos para NC-ELIQ-A ($0,99 \pm 0,01$ mg/mL) e NC-ELIQ-B ($0,99 \pm 0,01$ mg/mL), além de 100% de eficiência de encapsulamento para NC-ELIQ-B.

5.4.5 Avaliação comparativa entre nanoemulsões e nanocápsulas de óleo de linhaça

No que diz respeito à avaliação comparativa entre nanoemulsão e nanocápsulas, a caracterização referente ao tamanho e índice de polidispersão não apontou diferença significativa com relação a estes parâmetros, assim como observado para as formulações contendo óleo de argan (ANOVA, 1 via, $p > 0,05$). No entanto, não foi observada alteração significativa no potencial zeta das formulações, de forma contrária ao que foi constatado para as formulações contendo óleo de argan (ANOVA, 1 via, $p > 0,05$). Quanto à análise do pH, foi observada uma alteração significativa, assim como ocorreu quando o óleo de argan foi empregado como núcleo oleoso das nanoestruturas (ANOVA, 1 via, $p < 0,05$). Quando o EUD foi empregado para constituir o envoltório da nanocápsula (NC-ELIQ-B), a formulação apresentou pH significativamente menor ($5,69 \pm 0,11$) em relação à nanoemulsão contendo óleo de linhaça (NE-LIQ-B: $6,59 \pm 0,06$) e à nanocápsula contendo PCL (NC-PLIQ-B: $6,58 \pm 0,18$).

5.5 Avaliação comparativa entre os sistemas preparados com óleo de argan e óleo de linhaça

De modo a avaliar a influência do tipo de óleo nas características físico-químicas das formulações objetivou-se comparar entre si as nanoemulsões, nanocápsulas de PCL e nanocápsulas de EUD na presença dos óleos de argan e de linhaça.

Ao analisar as nanoemulsões contendo óleo de argan e de linhaça (NE-ARQ-B e NE-LIQ-B), foi observado que o tipo de óleo não influenciou nos parâmetros físico-químicos avaliados, sendo que não existiu diferença significativa entre as formulações (Teste t, $p > 0,05$). Em contrapartida, um estudo comparativo entre nanoemulsões contendo óleos diferentes (TCM e óleo de soja) foi desenvolvido por Santos-Magalhães (2000) para incorporação da penicilina G benzatina, onde os autores observaram alteração no diâmetro médio de gotícula devido à composição diferente dos óleos.

Com relação às nanocápsulas de PCL (NC-PARQ-B e NC-PLIQ-B), a mesma constatação foi atribuída em relação às nanoemulsões de óleo de argan e de linhaça. Em contrapartida, os resultados obtidos por Mora-Huertas e colaboradores (2012) apresentaram resultados diferentes. Os autores detectaram que o tipo de óleo empregado para incorporação do diclofenaco em nanocápsulas de PCL exerceu influência no tamanho de partícula. Os valores maiores de diâmetro foram encontrados para nanocápsulas preparadas a partir dos óleos de amêndoas doce e óleo de milho, fato que os autores atribuíram à composição destes óleos (8% a 13% de ácidos graxos saturados em relação à proporção de 85% a 95% de ácidos graxos insaturados) em comparação aos triglicerídeos de cadeia média.

No entanto, na comparação entre as nanocápsulas de EUD (NC-EARQ-B e NC-ELIQ-B), foi observada uma diferença significativa tanto no diâmetro de partícula (208 ± 5 nm e 173 ± 9 nm), como no índice de polidispersão ($0,21 \pm 0,04$ e $0,14 \pm 0,02$), sendo que a nanocápsula de EUD e óleo de linhaça apresentou valores menores para estes parâmetros (Teste t, $p < 0,05$). Além disso, o tipo de óleo não foi capaz de alterar significativamente o pH e o potencial zeta das formulações (Teste t, $p < 0,05$).

5.6 Avaliação da fotoestabilidade da ubiquinona associada aos sistemas nanoestruturados

De modo a analisar o perfil de fotodegradação das nanoemulsões e das nanocápsulas de óleo de argan e de linhaça, foram selecionadas as formulações com 1,5% de óleo, por possuírem características físico-químicas mais adequadas, devido aos índices de polidispersão menores em relação às formulações com o dobro da concentração de óleo. Além disso, uma solução contendo ubiquinona em etanol também foi submetida à exposição de radiação como perfil comparativo. As amostras foram submetidas a uma fonte de radiação UVC, por possuir conteúdo energético maior em relação à radiação UVA, além de permitir redução do tempo de análise do experimento. Após períodos pré-determinados, as amostras foram coletadas, o fármaco foi extraído com acetonitrila e os teores remanescentes de ubiquinona foram quantificados em cromatógrafo. Os resultados podem ser visualizados na figura 17.

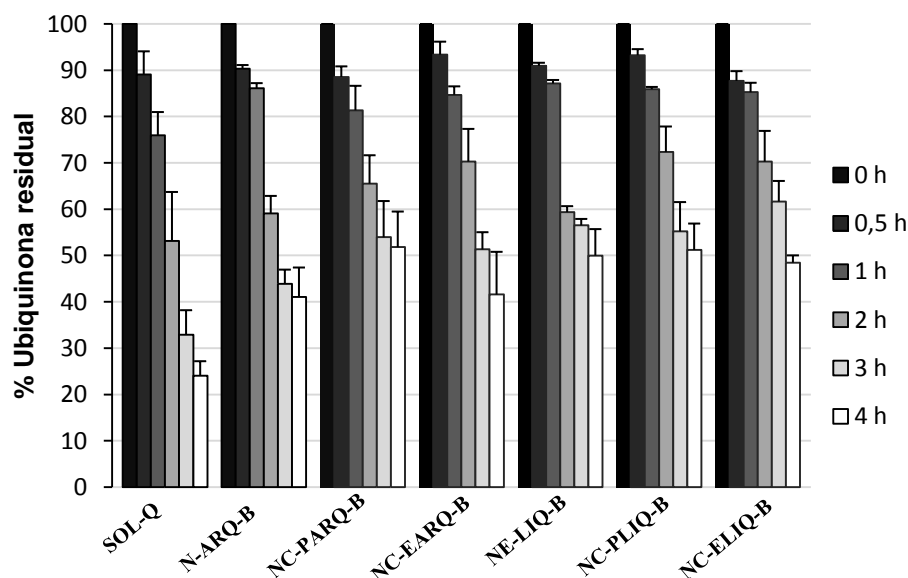


Figura 17 - Decaimento da concentração de ubiquinona das formulações ao longo de 4 horas de exposição à radiação UVC ($n=3$)

Todas as formulações foram capazes de aumentar a estabilidade do fármaco quando expostas à radiação UVC em comparação com a solução contendo o fármaco. Inicialmente, a partir de 30 minutos de exposição à radiação, os teores das

formulações NC-EARQ-B e NC-PLIQ-B foram significativamente diferentes do teor da solução SOL-Q ($90,33 \pm 0,78\%$, $93,22 \pm 1,32\%$ e $85,66 \pm 5,00\%$, respectivamente) (ANOVA, 1 via, $p < 0,05$). Neste período de tempo, houve influência do tipo de polímero para as nanocápsulas de óleo de linhaça, sendo que NC-PLIQ-B conservou melhor o teor de ubiquinona que NC-ELIQ-B (Teste t, $p < 0,05$). Além disso, o óleo influenciou na conservação do teor das nanocápsulas, sendo que para as formulações contendo EUD (NC-EARQ-B X NC-ELIQ-B), a presença do óleo de argan promoveu maior teor em relação à nanocápsula contendo óleo de linhaça. O contrário pode ser observado para as nanocápsulas de PCL (NC-PARQ-B E NC-PLIQ-B). No entanto, após 2 horas de experimento, foi observada uma modificação no perfil das formulações, onde todas as nanocápsulas NC-PARQ-B, NC-EARQ-B, NC-PLIQ-B e NC-ELIQ-B apresentaram teores significativamente diferentes da solução SOL-Q ($65,51 \pm 6,12\%$, $70,26 \pm 7,06\%$, $72,33 \pm 5,51\%$, $70,82 \pm 6,63\%$ e $42,13 \pm 10,54\%$, respectivamente) (ANOVA, 1 via, $p < 0,05$). Neste caso, as nanocápsulas de óleo de linhaça foram capazes de conservar melhor os teores que a nanoemulsão. Por fim, a partir de 3 horas de experimento, todas as formulações seguiram comportamento semelhante, sendo significativamente diferentes da solução (ANOVA, 1 via, $p < 0,05$). No período de 3 horas houve influência do óleo para as nanoemulsões e nanocápsulas de EUD, onde a presença do óleo de argan proporcionou maiores teores em relação às respectivas formulações contendo óleo de linhaça. Os teores remanescentes de ubiquinona para as formulações no tempo de 4 horas foram: NE-ARQ-B ($41,07 \pm 6,34\%$), NC-PARQ-B ($51,81 \pm 7,07\%$), NC-EARQ-B ($41,57 \pm 9,22\%$), NE-LIQ-B ($49,97 \pm 5,73\%$), NC-PLIQ-B ($51,20 \pm 5,69\%$), NC-ELIQ-B ($48,45 \pm 1,58\%$) e SOL-Q ($24,02 \pm 3,16\%$). Neste caso, não houve influência do tipo de óleo ou do tipo de polímero na conservação do teor das formulações.

Além disso, as formulações envoltas com papel alumínio como controle escuro não apresentaram alterações nos teores de ubiquinona, mantendo-se próximos de 100%, indicando que não houve interferência da temperatura ou da presença de luz na análise.

Com o intuito de elucidar a cinética de degradação, os dados foram plotados em gráficos de concentração x tempo (ordem zero), \ln concentração x tempo (primeira ordem) e $1/\text{concentração} \times \text{tempo}$ (segunda ordem). Estes gráficos encontram-se no Apêndice B. De acordo com os coeficientes de correlação, todas

as amostras demonstraram um bom ajuste à equação de primeira ordem. A tabela 9 mostra que com exceção da formulação NE-LIQ-B, em todos os casos, o coeficiente de correlação foi acima de 0,98.

Tabela 9 - Equações da reta e respectivos coeficientes de correlação (r) de acordo com a ordem de reação para a solução do fármaco, nanoemulsões e nanocápsulas de óleo de argan e de linhaça após 4 horas de exposição à radiação UVC

Amostra	Ordem da reação	Equação da reta	r
SOL-Q	zero	$y = -19,498x + 93,035$	0,9915
	primeira	$y = -0,373 x + 4,5977$	0,9934
	segunda	$y = 0,0082 x + 0,0079$	0,9881
NE-ARQ-B	zero	$y = -16,042x + 98,136$	0,9752
	primeira	$y = -0,2463x + 4,6208$	0,9825
	segunda	$y = 0,004x + 0,0091$	0,9833
NC-PARQ-B	zero	$y = -12,321x + 95,089$	0,9722
	primeira	$y = -0,1726x + 4,5696$	0,9837
	segunda	$y = 0,0025 x + 0,0101$	0,9889
NC-EARQ-B	zero	$y = -15,155x + 100,05$	0,9969
	primeira	$y = -0,2262x + 4,6456$	0,9946
	segunda	$y = 0,0036 x + 0,0088$	0,9817
NE-LIQ-B	zero	$y = -13,145x + 96,993$	0,9588
	primeira	$y = -0,1838x + 4,5904$	0,9685
	segunda	$y = 0,0027x + 0,0099$	0,9760
NC-PLIQ-B	zero	$y = -12,938x + 98,950$	0,9894
	primeira	$y = -0,1792x + 4,6171$	0,9911
	segunda	$y = 0,0026 x + 0,0095$	0,9875
NC-ELIQ-B	zero	$y = -12,204x + 96,900$	0,9925
	primeira	$y = -0,1718x + 4,5970$	0,9939
	segunda	$y = 0,0025 x + 0,0097$	0,9832

Além disso, a tabela 10 apresenta as constantes de degradação (k) e o tempo necessário para degradação de 10% do fármaco ($t_{90\%}$). Os resultados foram expressos sob a forma de média \pm desvio padrão.

Foi possível constatar que as constantes de degradação de todas as formulações apresentaram valores semelhantes, porém inferiores em relação à solução etanólica do fármaco. Este fato reforça a influência da incorporação de ubiquinona nos sistemas nanoestruturados (NE e NC) que foi capaz de retardar a degradação do fármaco em relação à forma livre do fármaco presente na solução etanólica.

Tabela 10 - Constantes de degradação (k) e tempo para degradação de 10% do fármaco ($t_{90\%}$) para a solução de ubiquinona, nanoemulsões e nanocápsulas de óleo de argan e de linhaça após 4 horas de exposição à radiação UVC ($n=3$)

Amostra	k (h^{-1})	$t_{90\%}$ (h)
SOL-Q	$0,3579 \pm 0,0327$	$0,29 \pm 0,02$
NE-ARQ-B	$0,2246 \pm 0,0406$	$0,50 \pm 0,03$
NC-PARQ-B	$0,1662 \pm 0,0370$	$0,66 \pm 0,15$
NC-EARQ-B	$0,2232 \pm 0,0527$	$0,49 \pm 0,13$
NE-LIQ-B	$0,1745 \pm 0,0293$	$0,61 \pm 0,09$
NC-PLIQ-B	$0,1683 \pm 0,0274$	$0,64 \pm 0,11$
NC-ELIQ-B	$0,1812 \pm 0,0081$	$0,58 \pm 0,02$

Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com outros estudos relatados na literatura que mostram um aumento da fotoestabilidade de fármacos incorporados em nanocarreadores. Em um estudo comparativo de fotodegradação entre nanoemulsão e nanocápsula contendo rutina, os autores observaram que os sistemas nanoestruturados seguiram cinética de primeira ordem, onde as constantes de degradação não diferiram significativamente entre si ($k = 6,1 \pm 0,6 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ para nanocápsula e $5,1 \pm 0,4 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ para a nanoemulsão). Além disso, as formulações apresentaram uma degradação menos rápida em comparação à solução contendo o fármaco ($k = 35 \pm 3,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) (ALMEIDA *et al.*, 2010).

Além disso, a fotoestabilidade da tretinoína mediante radiação UVA ($\lambda = 366 \text{ nm}$) foi analisada após a incorporação do fármaco em nanoemulsão e nanocápsula de lecitina de soja em comparação com a solução metanólica do fármaco. Foi observado que todas as formulações seguiram cinética de ordem zero (LAI *et al.*, 2013).

Em outro estudo que aborda a comparação entre sistemas nanoestruturados, foi avaliada a fotoestabilidade através da radiação UVA do propionato de clobetasol quando incorporado em nanoemulsão, nanocápsula e nanoesfera de PCL em comparação com soluções contendo o fármaco. Os autores observaram que todas as formulações seguiram cinética de primeira ordem, onde as constantes de degradação da nanoemulsão e nanocápsula ($k = 0,0413 \pm 0,0013 \text{ min}^{-1}$ e $0,0382 \pm$

$0,0006 \text{ min}^{-1}$) não apresentaram diferença significativa entre si, mas diferiram quanto à nanoesfera e às soluções contendo o fármaco: etanólica e comercial ($k = 0,0477 \pm 0,0017 \text{ min}^{-1}$; $0,0633 \pm 0,0052 \text{ min}^{-1}$ e $0,0744 \pm 0,0013 \text{ min}^{-1}$, respectivamente) (FONTANA *et al.*, 2009).

Em outro trabalho, foi realizada uma comparação entre nanocápsulas contendo acetato de retinol empregando dois polímeros diferentes como etilcelulose (EC) e um derivado peguilado da quitosana (PCPLC). Foi verificado um aumento da estabilidade do fármaco quando incorporado em nanocápsula contendo EC, enquanto que a nanocápsula de PCPLC não foi capaz de aumentar a estabilidade do acetato de retinol após exposição à radiação UVA (ARAYACHUKEAT *et al.*, 2011).

O aumento da proteção da ubiquinona contra a degradação conferida às formulações após a exposição à radiação UVC pode estar relacionado aos componentes da formulação. Foi observada uma influência do óleo ou do polímero nos diferentes tempos de exposição à radiação. No caso das nanoemulsões, a presença do óleo conferiu proteção ao fármaco, o que pode ser atribuído à capacidade deste componente de absorção da radiação UVC, como foi observado na varredura dos óleos de argan e de linhaça em espectrofotômetro (Figuras 7 e 12). As diferenças existentes entre as formulações contendo óleo de argan ou óleo de linhaça pode ser devido à composição diferenciada dos óleos, no que diz respeito à presença de ácidos graxos, compostos antioxidantes e outros constituintes. Quanto às suspensões de nanocápsulas, o efeito protetor do fármaco mediante a fotodegradação pode estar relacionado à presença do polímero, promovendo reflexão da luz, assim como observado em outros trabalhos (RAD, 2010; FONTANA *et al.*, 2009; ARAYACHUKEAT, *et al.*, 2011; FONTANA *et al.*, 2011). Além disso, estudos demonstram que a associação do óleo e do polímero pode conferir maior proteção do fármaco em relação a uma formulação que não contém o óleo (nanoesfera) (FONTANA *et al.*, 2009).

5.7 Avaliação da estabilidade das formulações após um período de 60 dias

Para a realização do estudo de estabilidade, foram selecionadas as formulações com menor concentração de óleo devido às características físico-

químicas mais satisfatórias destes sistemas nanoestruturados. Para tanto, foram monitorados os seguintes parâmetros: tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH e teor de fármaco ao longo de 60 dias de ensaio.

Quanto ao aspecto macroscópico, as formulações mantiveram suas características de fluido opalescente, sem a presença de precipitação visível, exceto pela coloração, que a partir dos 15 dias de experimento apresentou sinais de perda de cor, podendo ser um indício de diminuição do teor do fármaco. Este fato pode ser confirmado pelo gráfico apresentado na figura 18.

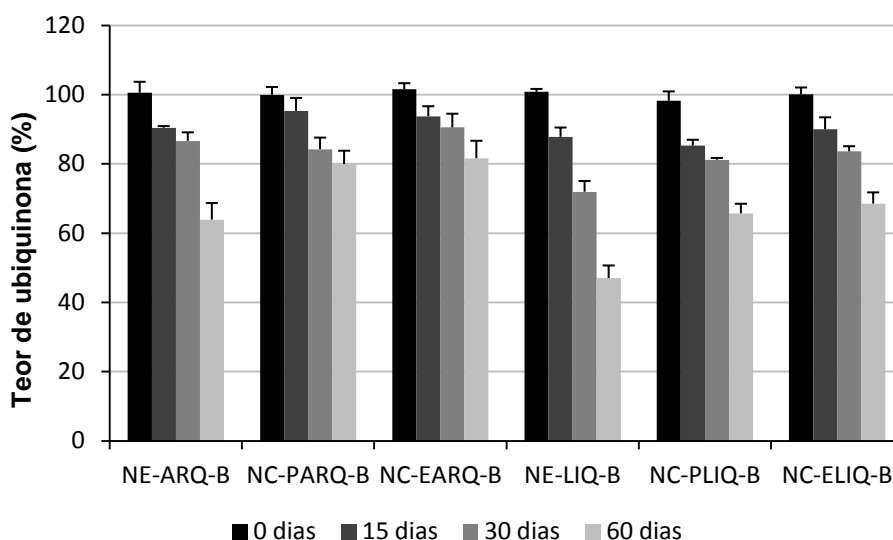


Figura 18 - Concentração de ubiquinona das formulações NE-ARQ-B, NC-PARQ-B, NC-EARQ-B, NE-LIQ-B, NC-PLIQ-B e NC-ELIQ-B após 0, 15, 30 e 60 dias de armazenamento

Foi possível observar que todas as formulações apresentaram uma redução significativa no teor de ubiquinona em relação ao tempo inicial, exceto pela formulação NC-PARQ-B, na qual a perda de teor foi significativa somente a partir de 30 dias de armazenamento (Teste t, $p < 0,05$). Além disso, o tipo de óleo influenciou na conservação do teor das formulações, onde foram observados valores significativamente maiores com relação a este parâmetro para as formulações contendo óleo de argan ($63,86 \pm 4,79\%$ para NE-ARQ-B, $79,91 \pm 3,85\%$ para NC-PARQ-B e $81,59 \pm 5,03\%$ para NC-EARQ-B) em relação às formulações contendo óleo de linhaça ($46,99 \pm 3,64\%$ para NE-LIQ-B, $65,68 \pm 2,75\%$ e $68,50 \pm 3,22\%$ para NC-ELIQ-B) após 60 dias de experimento (Teste t, $p < 0,05$). Por outro lado, ao compararmos nanoemulsão e nanocápsulas, foi constatada uma diferença

significativa com relação ao teor para estes sistemas, onde a presença do polímero foi capaz de conferir teores remanescentes do fármaco significativamente superiores aos da nanoemulsão, tanto para as formulações contendo óleo de argan, quanto para aquelas contendo óleo de linhaça (ANOVA, 1 via, $p < 0,05$).

A diminuição do teor também foi verificada para sistemas nanoestruturados contendo diclofenaco preparados com os polímeros PCL e Eudragit[®] S90 e os óleos TCM e benzoato de benzila após 3,5 meses de armazenamento e à temperatura ambiente. Os autores observaram diferença significativa entre as nanocápsulas preparadas com PCL, que apresentaram teores superiores às nanocápsulas preparadas com Eudragit[®] S90. Quanto à redução do teor do fármaco durante o armazenamento, os autores atribuíram à formação de nanocristais de diclofenaco que estariam estabilizados pelo tensoativo polissorbato 80 e durante o aumento do tempo de armazenamento poderiam aumentar de tamanho e precipitar, tornando o sistema heterogêneo e reduzindo o teor da amostra (SCHAFFAZICK *et al.*, 2002).

Em um trabalho posterior, foi observada uma diminuição no teor de melatonina em nanoemulsão e nanocápsulas preparadas com PCL, Eudragit[®] RS100 e S100 sob as condições de temperatura ambiente, 50 °C ou luz natural após dois meses de armazenamento dos sistemas. Além disso, os autores verificaram uma influência da presença dos polímeros metacrilatos em retardar em um mês a diminuição do teor das nanocápsulas em comparação com a nanoemulsão e a dispersão do fármaco para as formulações expostas à 50 °C ou à luz natural. Por fim, a nanocápsula de PCL acondicionada à temperatura ambiente e luz natural foi capaz de retardar a degradação do fármaco em dois meses em relação aos outros sistemas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2007).

Com relação ao pH, os resultados podem ser visualizados na figura 19.

Para as nanocápsulas de PCL (NC-PARQ-B e NC-PLIQ-B), houve uma redução significativa no pH destas formulações a partir de 15 dias de armazenamento (de $6,15 \pm 0,18$ para $5,52 \pm 0,07$ e de $6,77 \pm 0,07$ para $5,74 \pm 0,20$, respectivamente), ao passo que para as nanocápsulas de EUD (NC-EARQ-B e NC-ELIQ-B), estas apresentaram uma redução significativa (de $5,35 \pm 0,16$ para $5,08 \pm 0,17$ e de $5,25 \pm 0,20$ para $5,02 \pm 0,18$) a partir de 30 dias de exposição à temperatura ambiente (Teste t, $p < 0,05$). No entanto, as nanoemulsões apresentaram comportamentos diferentes. A nanoestrutura preparada com óleo de linhaça (NE-LIQ-B) mostrou redução no pH somente a partir de 60 dias de armazenamento (de

6,18 ± 0,14 para 4,87 ± 0,05) (Teste t, $p < 0,05$), enquanto que a nanoemulsão contendo óleo de argan (NE-ARQ-B) não apresentou alteração significativa com relação a este parâmetro ao longo de todo o tempo de experimento (Teste t, $p > 0,05$). Além disso, os sistemas nanoemulsão e nanocápsulas diferiram significativamente entre si com relação ao pH (ANOVA, 1 via, $p < 0,05$). Esta diferença mostrou-se semelhante tanto para as formulações contendo óleo de argan como para aquelas contendo óleo de linhaça em todos os tempos de análise.

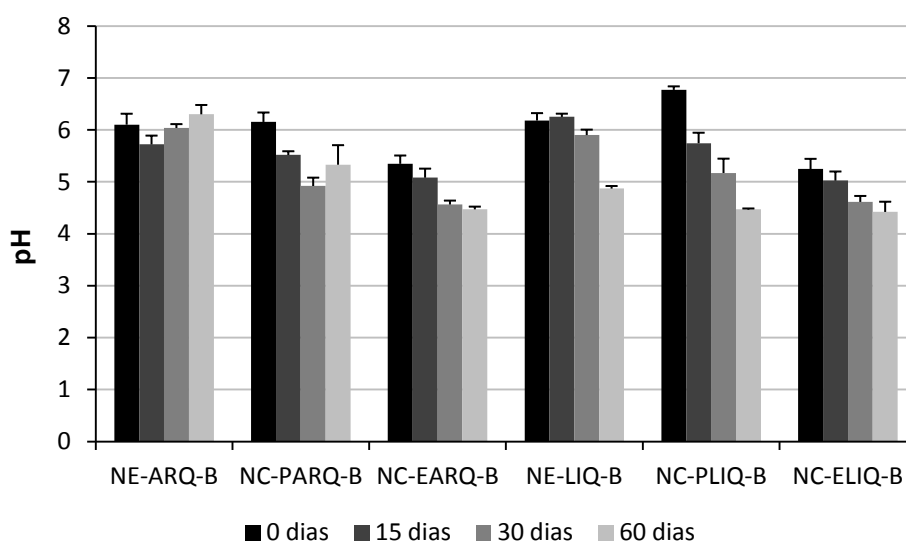


Figura 19 - Valores de pH das formulações NE-ARQ-B, NC-PARQ-B, NC-EARQ-B, NE-LIQ-B, NC-PLIQ-B e NC-ELIQ-B após 0, 15, 30 e 60 dias de armazenamento

Em um estudo desenvolvido por Lobato e colaboradores (2013), os autores observaram um decréscimo nos valores de pH da nanoemulsão e nanocápsulas contendo bixina após 119 dias de armazenamento (de $5,89 \pm 0,70$ para $4,48 \pm 0,32$). Em outro trabalho, Schaffazick e colaboradores (2002) observaram redução significativa do pH de nanocápsulas preparadas com PCL ou Eudragit® S90 e contendo diclofenaco após 3,5 meses de armazenamento. Em um trabalho posterior, Schaffazick e colaboradores (2007) observaram um decréscimo no pH da nanoemulsão e de nanocápsulas de PCL e Eudragit® RS100 contendo melatonina após 30 dias de experimento, ao passo que para a nanocápsula de Eudragit® S100 não foi observada diferença significativa ao longo de 90 dias de armazenamento. Os autores justificaram o fato salientando que a diminuição do pH é um processo normal quando a formulação é preparada a partir de um poliéster como PCL devido à hidrólise da cadeia polimérica. Outra explicação que pode estar relacionada com a

redução do pH das formulações é a hidrólise do polissorbato 80, que pode levar à formação de diferentes compostos tais como os ácidos acético, fórmico, octanóico e nonanóico, onde a auto-oxidação do polissorbato pode ser catalisada por traços residuais de peróxidos, metais em meio aquoso, além da incidência de luz (KISHORE *et al.*, 2011) .

Quanto ao diâmetro médio, a figura 20 apresenta os resultados obtidos. Foi possível constatar que nenhuma alteração significativa no diâmetro médio das nanoestruturas foi observada (Teste t, $p > 0,05$), exceto pela nanocápsula contendo óleo de argan e PCL (NC-PARQ-B), a qual apresentou um aumento significativo somente aos 15 dias em relação ao tempo inicial, de $340,5 \pm 48,6$ nm para $255,3 \pm 11,8$ nm (Teste t, $p < 0,05$). No entanto, esta alteração não se manteve após 30 e 60 dias de armazenamento (Teste t, $p > 0,05$). Além disso, a nanocápsula contendo óleo de argan e PCL (NC-PARQ-B) apresentou tamanho significativamente superior à nanocápsula de óleo de linhaça e PCL (NC-PLIQ-B) somente aos 15 dias de experimento ($340,5 \pm 48,6$ nm e $237,4 \pm 25,5$ nm) (Teste t, $p < 0,05$). Com relação à presença dos polímeros, foi constatada diferença significativa entre nanocápsula de PCL e EUD (NC-PARQ-B e NC-EARQ-B) no primeiro dia ($255,3 \pm 11,8$ nm e $168,6 \pm 5,5$ nm) e aos 15 dias de experimento ($340,5 \pm 48,6$ nm e $198,2 \pm 48,9$ nm) (Teste t, $p < 0,05$).

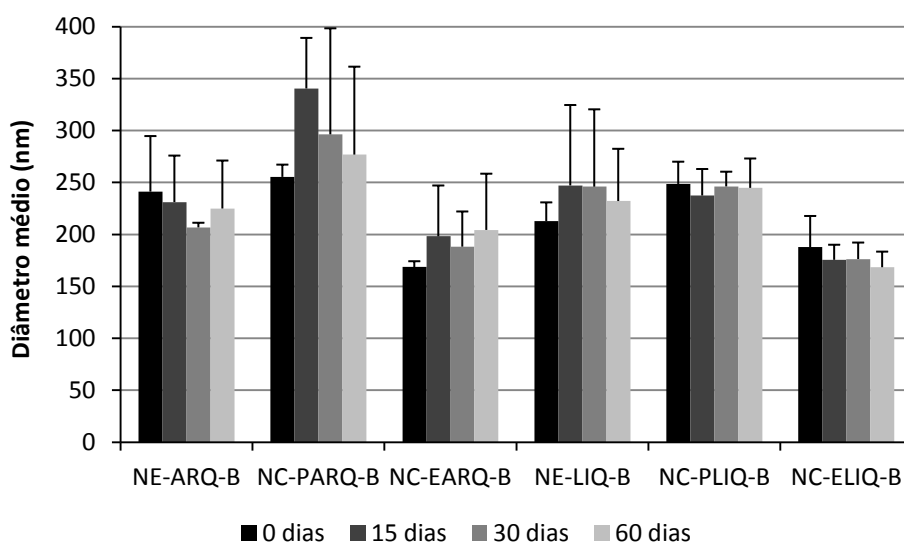


Figura 20 - Diâmetro médio de gotícula/partícula para as formulações NE-ARQ-B, NC-PARQ-B, NC-EARQ-B, NE-LIQ-B, NC-PLIQ-B e NC-ELIQ-B após 0, 15, 30 e 60 dias de armazenamento

Alguns trabalhos abordam alterações no tamanho de nanoestruturas após serem submetidas ao ensaio de estabilidade. Em um destes estudos, Ganta e Amiji (2009) observaram um aumento no tamanho de gotícula das nanoemulsões contendo óleo de linhaça e curcumina ou paclitaxel durante um período de armazenamento de 3 meses. Em outro trabalho, Fontana e colaboradores (2009) observaram alterações no tamanho e índice de polidispersão da nanoemulsão e nanoesfera em comparação com nanocápsulas de clobetasol preparadas com PCL e TCM após 6 e 9 meses.

Por outro lado, outros estudos demonstram que nenhuma alteração no tamanho foi detectada em nanocápsulas durante estudo de estabilidade. Grillo e colaboradores (2012) não observaram alterações nas nanocápsulas preparadas com PCL, TCM e herbicidas triazenos pelo método da deposição interfacial de polímero pré-formado, em um período de 270 dias. Lobato e colaboradores (2013) não observaram diferenças no tamanho das nanopartículas de PCL contendo bixina, o que foi relacionado à presença do polissorbato 80, o qual promoveu um efeito estérico e preveniu, desta forma, a agregação das partículas. Além disso, Schaffazick e colaboradores (2007) não detectaram alterações no diâmetro médio de nanoemulsão e nanocápsulas de PCL e Eudragit[®] RS100 e S100 contendo melatonina após 90 dias de armazenamento. Em um estudo desenvolvido por Belhaj e colaboradores (2012), os pesquisadores avaliaram a estabilidade de nanoemulsões com e sem ubiquinona preparadas pelo método da homogeneização à alta pressão. Os parâmetros avaliados como tamanho de partícula (de 164 nm a 170 nm), potencial zeta (de -3,73 mV a -4,27 mV) e índice de polidispersão (abaixo de 0,2) foram considerados adequados e não sofreram alteração significativa, sem sinais de precipitação ao longo de 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente (25 °C).

Quanto ao Índice de polidispersão, os resultados encontram-se na figura 21. De forma semelhante ao que ocorreu em relação ao tamanho das partículas, a formulação NC-PARQ-B somente apresentou alteração significativa no índice de polidispersão no tempo de 15 dias em relação ao tempo inicial (de $0,337 \pm 0,04$ para $0,220 \pm 0,04$), além de apresentar valores superiores em relação à nanocápsula de óleo de linhaça e PCL (NC-PLIQ-B, $0,169 \pm 0,03$) (Teste t, $p < 0,05$). A formulação NC-PARQ-B apresentou os maiores índices de polidispersão e desvio padrão em relação às outras formulações, indicando uma alteração na estabilidade do sistema.

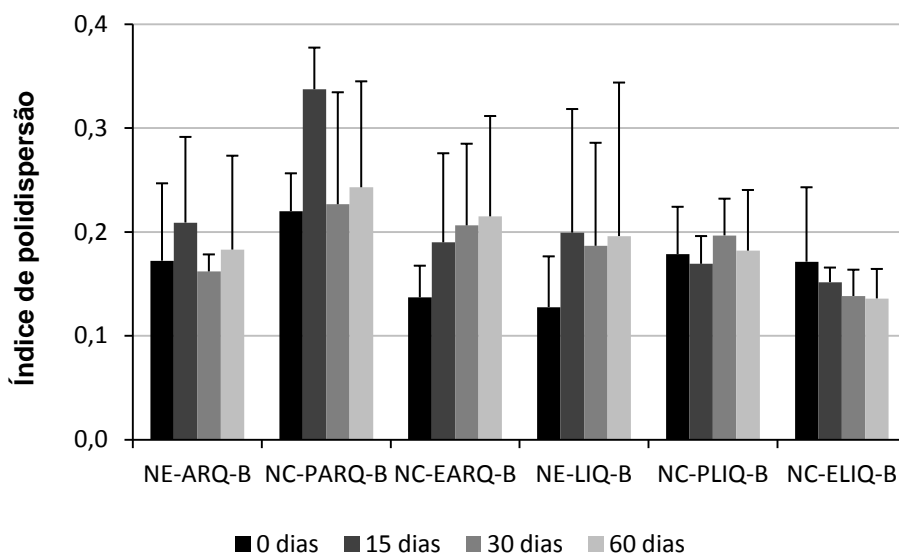


Figura 21 - Índice de polidispersão para as formulações NE-ARQ-B, NC-PARQ-B, NC-EARQ-B, NE-LIQ-B, NC-PLIQ-B e NC-ELIQ-B após 0, 15, 30 e 60 dias de armazenamento

Com relação ao potencial zeta, os resultados obtidos podem ser visualizados na figura 22.

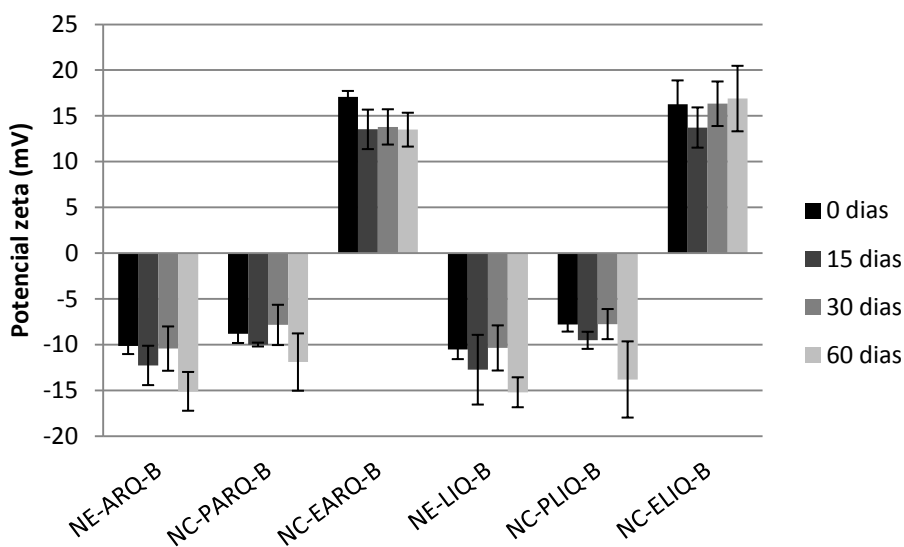


Figura 22 - Potencial zeta das formulações NE-ARQ-B, NC-PARQ-B, NC-EARQ-B, NE-LIQ-B, NC-PLIQ-B e NC-ELIQ-B após 0, 15, 30 e 60 dias de armazenamento

No que diz respeito ao potencial zeta, as nanoemulsões de óleo de argan e de linhaça (NE-ARQ-B e NE-LIQ-B) apresentaram aumento significativo em módulo neste parâmetro (de $-10,15 \pm 0,87$ mV para $-15,1 \pm 2,12$ mV e de $-10,51 \pm 1,07$ mV

para $-15,2 \pm 1,54$ mV, respectivamente), ao passo que a nanocápsula de óleo de argan e EUD (NC-EARQ-B) mostrou uma redução significativa (de $17,07 \pm 0,67$ mV para $13,5 \pm 1,85$ mV) no tempo de 60 dias em relação ao tempo inicial (Teste t, $p < 0,05$). Além disso, a presença do polímero EUD conferiu valores de potencial zeta significativamente maiores para as formulações NC-EARQ-B e NC-ELIQ-B em relação às nanoemulsões (NE-ARQ-B e NE-LIQ-B) e nanocápsulas de PCL (NC-PARQ-B e NC-PLIQ-B) nos tempos inicial e após 30 dias de armazenamento (ANOVA, 1 via, $p < 0,05$).

6 CONCLUSÕES

- A metodologia analítica desenvolvida para a quantificação dos sistemas nanoestruturados contendo ubiquinona foi validada, apresentando-se específica, linear, precisa e exata. Desta forma, esta metodologia foi utilizada para o estudo da cinética de fotodegradação e estabilidade dos sistemas nanoestruturados;
- Foi viável a preparação de nanoemulsões de óleo de argan e de óleo de linhaça, além do desenvolvimento de nanocápsulas preparadas pela deposição interfacial da poli(ϵ -caprolactona) ou do Eudragit[®] RL 100;
- Os sistemas nanoestruturados apresentaram características físico-químicas compatíveis com outras nanoestruturas, apresentando teores próximos de 1mg/mL e eficiências de encapsulamento próximas de 100%, sendo que as formulações com menor quantidade de óleo (1,5%) apresentaram índices de polidispersão mais adequados ($<0,2$). Além disso, a diminuição da concentração de óleo na formulação causou influência em alguns parâmetros. A diminuição do tamanho de gotícula/partícula e do índice de polidispersão foram verificados para as nanocápsulas de óleo de argan e PCL e para as nanoemulsões e nanocápsulas de EUD e óleo de linhaça. Além disso, a adição de ubiquinona foi capaz de alterar o potencial zeta destas mesmas formulações;
- O estudo comparativo das nanoemulsões e nanocápsulas contendo ubiquinona mostrou que a presença do polímero Eudragit[®] RL 100 proporcionou valores menores de pH para as nanocápsulas de óleo de argan ou de óleo de linhaça em comparação com as respectivas nanoemulsões e nanocápsulas de PCL. Além disso, a presença do polímero catiônico no caso das nanocápsulas de óleo de argan foi capaz de proporcionar maior estabilidade ao sistema devido ao maior valor em módulo do potencial zeta em comparação com as nanoestruturas contendo óleo de argan (nanoemulsão e nanocápsula de PCL);
- Com relação a diferença entre os sistemas preparados com óleo de argan ou óleo de linhaça, os parâmetros físico-químicos influenciados foram o tamanho de

partícula e o índice de polidispersão para as nanocápsulas contendo Eudragit® RL 100, sendo que valores menores foram encontrados para as formulações preparadas a partir do óleo de linhaça;

- Todas as formulações foram capazes de aumentar a proteção do fármaco perante a radiação UVC em comparação com o fármaco não encapsulado, sendo que houve influência do óleo ou do polímero nos diferentes tempos de análise;
- Quanto à estabilidade, todas as formulações tiveram o teor de fármaco reduzido em relação ao tempo inicial. O tipo de óleo influenciou neste parâmetro, visto que as nanoestruturas contendo óleo de argan apresentaram concentrações maiores do fármaco. Além disso, as nanocápsulas foram capazes de conservar melhor os teores em relação às respectivas nanoemulsões. A redução do pH foi significativa aos 15 dias para as nanocápsulas de PCL, aos 30 dias para as nanocápsulas de EUD e aos 60 dias para as nanoemulsões de óleo de linhaça. O aumento no tamanho de partícula só foi significativo para a nanocápsula de óleo de argan e PCL aos 15 dias em relação ao tempo inicial, onde apresentou diâmetro maior em relação às nanocápsulas de PCL e óleo de linhaça e de EUD e óleo de argan. Um aumento no potencial zeta foi detectado para as nanoemulsões aos 60 dias em relação ao tempo inicial, enquanto que a nanocápsula de EUD e óleo de argan apresentou decréscimo neste parâmetro. O potencial zeta ainda apresentou-se maior em módulo para as nanocápsulas contendo EUD em relação às respectivas nanoemulsões;
- Desta forma, os resultados sugerem que a combinação adequada dos polímeros e óleos estudados neste trabalho pode conduzir à formação de um sistema de liberação promissor para a ubiquinona.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOLMAALI, S. S.; TAMADDON, A. M.; DINARVAND, R. Nano-hydrogels of methoxy polyethylene glycol-grafted branched polyethyleneimine via biodegradable cross-linking of Zn²⁺-ionomer micelle template. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, 1-21, 2013.

ALMEIDA, J. S.; JEZUR, L.; FONTANA, M. C.; PAESE, K.; SILVA, C. B.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Oil-based nanoparticles containing alternative vegetable oils (grape seed oil and almond kernel oil): preparation and characterization. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, p. 165-172, 2009.

ALMEIDA, J. S.; LIMA, F.; ROS, S.; BULHÕES, L. O S.; CARVALHO, L. M.; BECK, R. C. R. Nanostructured systems containing rutin: *in vitro* antioxidant activity and photostability studies. **Nanoscale Research Letters**, v. 5, p. 1603-1610, 2010.

ANKOLA, D. D.; DURBIN, E. W.; BUXTON, G. A.; SCHAFER, J.; BAKOWSKY, U.; KUMAR, M. N. V. R. Preparation, characterization and *in silico* modeling of biodegradable nanoparticles containing cyclosporine A and coenzyme Q10. **Nanotechnology**, v. 21, p. 1-11, 2010.

ARAYACHUKEAT, S.; WANICHWECHARUNGRUANG, S. P.; TREE-UDOM, T. Retinyl acetate-loaded nanoparticles: Dermal penetration and release of the retinyl acetate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 404, p. 281–288, 2011.

BALAKRISHNAN, P.; LEE, B-J.; OH, D. H.; KIM, J. O.; LEE, Y-I.; KIM, D. D.; JEE, J. P.; LEE, Y-B.; WOO, J. S.; YONG, C. S.; CHOI, H-G. Enhanced oral bioavailability of coenzyme Q₁₀ by self-emulsifying drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 374, p. 66–72, 2009.

BARTSCH, H.; NAIR, J.; OWEN, R. W. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. **Carcinogenesis**, v. 20, p. 2209-2218, 1999.

BELARBI-BENMAHDI, M.; KHALDI, D.; BEGHADAD, C.; GOUZI, H.; BENDIMERAD, N.; HAMMOUTI, B. Physicochemical and nutritional study of argan oil (*Argania spinosa* L.) in south-western Algeria. **Pigment and Resin Technology**, v. 38, p. 96–99, 2009.

BELHAJ, N.; DUPUIS, F.; ARAB-TEHRANY, E.; DENIS, F. M.; PARIS, C.; LARTAUD, I.; LINDER, M. Formulation, characterization and pharmacokinetic studies of coenzyme Q10 PUFA's nanoemulsions. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, p. 305–312, 2012.

BELLAHCEN, S.; MEKHFI, H.; ZIYYAT, A.; LEGSSYER, A.; HAKKOU, A.; AZIZ, M.; BNOUHAM, M. Prevention of chemically induced diabetes mellitus in experimental animals by virgin argan oil. **Phytotherapy Research**, v. 26, p. 180–185, 2012.

BENNANI, H.; DRISSI, A.; GITON, F.; KHEUANG, L.; FIET, J.; ADLOUNI, A. Antiproliferative effect of polyphenols and sterols of virgin argan oil on human prostate cancer cell lines. **Cancer Detection and Prevention**, v. 31, p. 64–69, 2007.

BERROUGUI, H.; ETTAIB, A.; GONZALEZ, H.; SOTOMAYOR, M. A.; BENNANI-KABCHI, N.; HMAMOUCHE, M. Hypolipidemic and hypocholesterolemic effect of argan oil (*Argania spinosa* L.) in Meriones shawi rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p.15–18, 2003.

BERROUGUI, H.; SOTOMAYOR, M. A.; PE´REZ-GUERRERO, C.; ETTAIB, A.; HMAMOUCHE, M.; MARHUENDA, E.; HERRERA, M. D. British Argan (*Argania spinosa*) oil lowers blood pressure and improves endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Nutrition**, v. 92, p. 921–929, 2004.

BHAGAVAN, H. N.; CHOPRA, R. K. Coenzyme Q10: absorption, tissue uptake, metabolism and pharmacokinetics. **Free Radical Research**, v. 40, p. 445–453, 2006.

BHATT, P.; MADHAV, S. A detailed review on nanoemulsion drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, p. 2482-2489, 2011.

BLOEDON, L.T.; SZAPARY, M. O. Flaxseed and cardiovascular risk. **Nutrition Reviews**, v. 62, p. 18-27, 2004.

BOREKOVÁ, M.; HOJEROVÁ, J.; KOPRDA, V.; BAUEROVÁ, K. Nourishing and health benefits of coenzyme Q10 – a review. **Czech Journal of Food Science**. v. 26, 229–24, 2008.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, 241–251, 2004.

BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 jun. 2003. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 25 jan. 2013.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas R. Ecotoxicol e Meio Ambiente**. v. 13, p. 129-146, 2003.

BULE, M. V.; SINGHAL, R. S.; KENNEDY, J. F. Microencapsulation of ubiquinone-10 in carbohydrate matrices for improved stability. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 1290–1296, 2010.

CASSIANO, N. M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análise de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

CHARROUF, Z.; GUILLAUME, D. Ethnoeconomical, ethnomedical, and phytochemical study of *Argania spinosa* (L.) Skeels. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 7–14, 1999.

CHARROUF, Z.; GUILLAUME, D. Secondary metabolites from *Argania spinosa* (L.) Skeels. **Phytochemistry Reviews**, v. 1, p. 345–354, 2002.

CHARROUF, Z.; GUILLAUME, D. Phenols and polyphenols from *argania spinosa*. **American Journal of Food and Technology**, v. 2, p. 679-683, 2007.

CHERKI, M.; DEROUICHE, A.; DRISSI, A.; MESSAL, M.; BAMOU, Y.; IDRISSE-OUADGHIRI, A.; KHALIL, A.; ADLOUNI, A. Consumption of argan oil may have an antiatherogenic effect by improving paraoxonase activities and antioxidant status: Intervention study in healthy men. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 15, p. 352-360, 2005.

CHERKI, M.; BERROUGUI, H.; DRISSI, A.; ADLOUNI, A.; KHALIL, A. Argan oil: Which benefits on cardiovascular diseases? **Pharmacological Research**, v. xxx, p. 1-5, 2006.

CHOI, J-H.; RYU, Y-W.; SEO, J-H. Biotechnological production and applications of coenzyme Q10. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, p. 9–15, 2005.

CISMARU, L.; POPA, M. Polymeric nanoparticles with biomedical applications.

Revue Roumaine de Chimie, v. 55, p. 433-442, 2010.

COLLINS, S. A.; SHAND, P. J.; DREW, M. D. Stabilization of linseed oil with vitamin E, butylated hydroxytoluene and lipid encapsulation affects fillet lipid composition and sensory characteristics when fed to rainbow trout. **Animal Feed Science and Technology**, v. 170, p. 53– 62, 2011.

CONTRI, R. V.; RIBEIRO, K. L. F. FIEL, L. A.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Vegetable oils as core of cationic polymeric nanocapsules: influence on the physicochemical properties. **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 1, p. 1–12, 2012.

CORDEIRO, R.; FERNANDES, P. L.; BARBOSA, L. A. Semente de linhaça e o efeito de seus compostos sobre as células mamárias. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, p. 727-732, 2009.

COUVREUR, P.; DUBERNET, C.; PUISIEUX, F. Controlled Drug Delivery with Nanoparticles: Current Possibilities and Future Trends. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 41, 2-13, 1995.

COUVREUR, P.; BARRATT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Delivery Systems*, v. 19, p. 99-134, 2002.

CRANE, F. L. Biochemical functions of coenzyme Q10 – Review. **Journal of the american college of nutrition**, v. 20, p. 591–598, 2001.

DAS, S.; SURESH, P. K.; DESMUKH, R. Design of Eudragit RL 100 nanoparticles by nanoprecipitation method for ocular drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, p. 318–323, 2010.

DASH, T. K.; KONKIMALLA, V. B. Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. **Journal of Controlled Release**, v. 158, p. 15–33, 2012.

DESAI, N. Challenges in development of nanoparticle-based therapeutics. **The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal**, v. 14, p. 282-295, 2012.

DETONI, C. S.; SOUTO, G. D.; SILVA, A. I. M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Photostability and skin penetration of different e-resveratrol-loaded supramolecular structures. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, p. 913–921, 2012.

DHANASEKARAN, M.; REN, J. The emerging role of coenzyme Q10 in aging, neurodegeneration, cardiovascular disease, cancer and diabetes mellitus. **Current Neurovascular Research**, v. 2, p. 1-13, 2005.

DRISSI, A.; GIRONA, J.; CHERKI, M.; GODÁS, G.; DEROUCHE, A.; MESSAL, M.; SAILE, R.; KETTANI, A.; SOLÁ, R.; MASANA, L.; ADLOUNI, A. Evidence of hypolipemiant and antioxidant properties of argan oil derived from the argan tree (*Argania spinosa*). **Clinical Nutrition**, v. 23, p. 1159–1166, 2004.

ERNSTER, L.; DALLNER, G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1271, p. 195-204, 1995.

FANCHIOTTI, F. E.; MORAES, J. H. K.; BARBOSA, A. E.; ALBINO, L. F. T.; CECON, P. R.; MOURA, A. M. A. Avaliação de óleos, carvão vegetal e vitamina E no desempenho e nas concentrações lipídicas do sangue e dos ovos de poedeiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p. 2676-2682, 2010.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-P; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by Interfacial Polymer Deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55 p. 1-4, 1989.

FIR, M. M SMIDOVNIK, A.; MILIVOJEVIC, L.; ZMITEK, J.; PROSEK, M. Studies of CoQ10 and cyclodextrin complexes: solubility, thermo- and photo-stability. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 64, p. 225–232, 2009.

FLORES, F. C.; RIBEIRO, R. F.; OURIQUE, A. F.; ROLIM, C. M. B.; SILVA, C. B. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Química. Nova**, v. 34, p, 968-972, 2011.

FONTANA, M. C.; CORADINI, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. R. Nanoencapsulation as a way to control the release and to increase the photostability of clobetasol propionate: influence of the nanostructured system. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. .5, p. 1–10, 2009.

FONTANA, M. C.; CORADINI, K.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Nanocapsules prepared from amorphous polyesters: effect on the

physicochemical characteristics, drug release, and photostability. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, p. 3091–3099, 2010.

FONTANA, M. C.; REZER, J. F. P.; CORADINI, K.; LEAL, D. B. R.; BECK, R. C. R. Improved efficacy in the treatment of contact dermatitis in rats by a dermatological nanomedicine containing clobetasol propionate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 241–249, 2011.

FRIEDRICH, R. B.; FONTANA, M. C.; BECK, R. C. R. Development and physicochemical characterization of dexamethasone-loaded polymeric nanocapsule suspensions. **Química Nova**, v. 31, p. 1131-1136, 2008.

GANTA, S.; AMIJI, M. Coadministration of paclitaxel and curcumin in nanoemulsion formulations to overcome multidrug resistance in tumor cells. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, p. 928–939, 2009.

GEROMEL, V.; DARIN, N.; CHRÉTIEN, D.; BÉNIT, P.; DELONLAY, P.; RÖTIG, A.; MUNNICH, A.; RUSTIN, P. Coenzyme Q10 and idebenone in the therapy of respiratory chain diseases: rationale and comparative benefits.- Minireview. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 77, 21–30, 2002.

GLEIZE, B.; STEIB, M.; ANDRÉ, M.; REBOUL, E. Simple and fast HPLC method for simultaneous determination of retinol, tocopherols, coenzyme Q₁₀ and carotenoids in complex samples. **Food Chemistry**, v. 134, p. 2560-2564, 2012.

GUINDA, A.; RADA, M.; DELGADO, T.; CASTELLANO, J. M. Pentacyclic triterpenic acids from *Argania spinosa*. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.113, p. 231–237, 2011.

GUO, K.; CHU, C. C. Synthesis and characterization of poly(ϵ -caprolactone) containing amino acid-based poly(ether ester amide)s. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 125, p. 812-819, 2012.

GUTERRES, S. S.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R. Preparação e aplicações de nanopartículas para liberação controlada de fármacos. In: MORALES, M. M. **Terapias Avançadas - Células-tronco, Terapia Gênica e Nanotecnologia Aplicada à Saúde**. São Paulo: Atheneu, Cap. 17, p. 247-264, 2007.

HANNO, I.; ANSELMINI, C.; BOUCHEMAL, K. Polyamide nanocapsules and nano-emulsions containing parsol[®] mcx and parsol[®] 1789: in vitro release, ex vivo skin

penetration and photo-stability studies. **Pharmaceutical Research**, v. 29, p. 559–573, 2012.

HARHAR, H.; GHARBY, S.; GUILLAUME, D.; CHARROUF, Z. Research article effect of argan kernel storage conditions on argan oil quality. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, p. 915–920, 2010.

HASANZADEH, M.; SHADJOU, M.; ESKANDANI, M.; SOLEYMANI, J.; JAFARI, F.; GUARDIA, M. Dendrimer encapsulated and cored metal nanoparticles for electrochemical nanobiosensing. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 53, p. 137-149, 2014.

HATANAKA, J.; KIMURA, Y.; LAI-FU, Z.; ONOUE, S.; YAMADA, S. Physicochemical and pharmacokinetic characterization of water-soluble Coenzyme Q10 formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, p. 112–117, 2008.

HERCHI, W.; SAWALHA, S.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; BOUKHCHINA, S.; SEGURA-CARRETERO, A.; KALELL, H.; FERNÁNDEZ-GUTIERREZ, A. Determination of phenolic and other polar compounds in flaxseed oil using liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 126, p. 332–338, 2011.

HERCHI, W.; BOUALI, I.; BAHASHWAN, S.; ROCHUT, S.; BOUKHCHINA, S.; KALLEL, H.; PEPE, C. Changes in phospholipid composition, protein content and chemical properties of flaxseed oil during development. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 54, p.1-5, 2012.

HILALI, M.; CHARROUF, Z.; SOULHI, A. E. A.; HACHIMI, L. GUILLAUME, D. Influence of origin and extraction method on argan oil physico-chemical characteristics and composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2081-2087, 2005.

HILALI, M.; CHARROUF, Z.; SOULHI, A. E. A.; HACHIMI, L. GUILLAUME, D. Detection of argan oil adulteration using quantitative campesterol GC-analysis. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 84, p. 761–764, 2007.

IBRAHIM, H. K.; EL-LEITHY, I. S.; MAKKY, A. A. Mucoadhesive nanoparticles as carrier systems for prolonged ocular delivery of gatifloxacin/prednisolone biotherapy. **Molecular pharmaceutics**, v. 7, p. 576-585, 2010.

JAMES, A. M.; SMITH, R. A. J.; MURPHY, M. P. Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial Coenzyme Q. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 423, p. 47–56, 2004.

JELVEHGARI, M.; MAGHSOODI, M.; NEMATI, H. Development of theophylline floating microballoons using cellulose acetate butyrate and/or Eudragit RL 100 polymers with different permeability characteristics. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 5, p. 29–39, 2010.

JUITA; DLUGOGORSKI, B. Z.; KENNEDY, E. M.; MACKIE, J. C. Identification and quantitation of volatile organic compounds from oxidation of linseed oil. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 51, p. 5645–5652, 2012.

JUNYAPRASERT, V. B.; TEERANACHAIDEEKUL, V.; SOUTO, E. B.; BOONME, P.; MÜLLER, R. H. Q10-loaded NLC versus nanoemulsions: Stability, rheology and *in vitro* skin permeation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 377, p. 207–214, 2009.

KALLINTERI, P.; HIGGINS, S.; HUTCHEON, G. A.; POURÇAIN, C. B. S.; GARNETT, M. C. Novel functionalized biodegradable polymers for nanoparticle drug delivery systems. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 1885-1894, 2005.

KATARA, R.; MAJUMDAR, D.; K. Eudragit RL 100-based nanoparticulate system of aceclofenac for ocular delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 103, p. 455-462, 2013.

KHALLOUKI, F.; YOUNOS, C.; SOULIMANI, R.; OSTER, T.; CHARROUF, Z.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H.; OWEN, R. W. Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects. **European Journal of Cancer Prevention**, v.12, p. 67-75, 2003.

KHALLOUKI, F.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H.; OWEN, R. W. Secondary metabolites of the argan tree (Morocco) may have disease prevention properties. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 381-388, 2005.

KIM, D. K.; DOBSON, J. Nanomedicine for targeted drug delivery. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, p. 6294–6307, 2009.

KIM, J.; SHIM, J.; KIM, Y.-J.; CHAR, K.; SUH, K. D.; KIM, J. W. The design of polymer-based nanocarriers for effective transdermal delivery. **Macromolecular Bioscience**, v. 10, p. 1171–1176, 2010.

KISHORE, R. S. K.; KIESE, S.; FISCHER, S.; PAPPENBERGER, A.; GRAUSCHOPF, U.; MAHLER, H.-C. The degradation of polysorbates 20 and 80 and its potential impact on the stability of biotherapeutics. **Pharmaceutical Research**, v. 28, p. 1194–1210, 2011.

KWON, S. S.; NAM, Y. S.; LEE, J. S.; KU, B. S.; HAN, S. H.; LEE, J. Y.; CHANG, I. S. Preparation and characterization of coenzyme Q₁₀-loaded PMMA nanoparticles by a new emulsification process based on microfluidization. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 210, p. 95-104, 2002.

LABET, M.; THIELEMANS, W. Synthesis of polycaprolactone: a review. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 3484-3504, 2009.

LAI, F.; PIREDDU, R.; CORRIAS, F.; FADDA, A. M.; VALENTI, D.; PINI, E.; SINICO, C. Nanosuspension improves tretinoin photostability and delivery to the skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 458, p. 104–109, 2013.

LERTSUTT, P.; NOOMUN, K.; JONGAROONNGAMSANG, N.; ROJSITTHISAK, P.; NIMMANNIT, U. Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 209–214, 2008.

LITTARRU, G. P.; TIANO, L. Clinical aspects of coenzyme Q10: an update. **Nutrition**, v. 26, p. 250–254, 2010.

LOBATO, K. B. S.; PAESE, K.; FORGEARINI, J. S.; GUTERRES, S. S.; JABLONSKI, A.; RIOS, A. O. Characterization and stability evaluation of bixin nanocapsules. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3906–3912, 2013.

LOCOCO, D.; MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ZANOUN, I.; ELAISSARI, A. Argan oil nanoemulsions as new hydrophobic drug-loaded delivery system for transdermal application. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 8, p. 843-848, 2012.

MARCELINO, A. G.; ROSSAN, M. R.; SANTANA, M. H. A. Nanopartículas de sericina no tratamento cosmético de cabelos. **Cosmetics and Toiletries**, v. 20, p. 60-66, 2008.

MARIN, E.; BRICEÑO, M. I.; CABALLERO-GEORGE, C. Critical evaluation of biodegradable polymers used in nanodrugs. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 3071-3091, 2013.

MEKHFI, H.; BELMEKKI, F.; ZIYYAT, A.; LEGSSYER, A.; BNOUHAM, M.; AZIZ, M. Antithrombotic activity of argan oil: an in vivo experimental study. **Nutrition**, v. xxx, p. 1–5, 2012.

MILLAM, S.; OBERT, B.; PRET'OVÁ, A. Plant cell and biotechnology studies in *Linum usitatissimum* – a review. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 82, p.93–103, 2005.

MONFALOUTI, H. E.; CHARROUF, Z.; BELVISO, S.; GHIRARDELLO, D.; SCURSATONE, B.; GUILLAUME, D.; DENHEZ, C.; ZEPPA, G. Analysis and antioxidant capacity of the phenolic compounds from argan fruit (*Argania spinosa* (L.) Skeels). **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 114, p. 446–452, 2012.

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

MORA-HUERTAS, C. E.; GARRIGUES, O.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Nanocapsules prepared via nanoprecipitation and emulsification–diffusion methods: Comparative study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, p. 235–239, 2012.

MUNDRA, R. V.; WU, X.; SAUER, J.; DORDICK, J. S.; KANE, R. S. Nanotubes in biological applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 28, p. 25-32, 2014.

NASSAR, T.; ROM, A.; NYSKA, A.; BENITA, S. Novel double coated nanocapsules for intestinal delivery and enhanced oral bioavailability of tacrolimus, a P-gp substrate drug. **Journal of Controlled Release**, v. 133, p. 77–84, 2009.

NEHILLA, B. J.; BERGKVIST, M.; POPAT, K. C.; DESAI, T. A. Purified and surfactant-free coenzyme Q10-loaded biodegradable nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 348, p. 107–114, 2008.

NERD, A.; ETESHOLA, E.; N. BOROWY, N.; MIZRAH, Y. Growth and oil production of argan in the Negev desert of Israel. **Industrial Crops and Products**, v. 2, p. 89-95, 1994.

NGWULUKA, N. Application of *in situ* polymerization for design and development of oral drug delivery systems. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, p. 1603-1611, 2010.

NUDELMAN, N. E. S. **Estabilidad de medicamentos**. Buenos Aires: El Ateneo, 1975.

NYKTER, M.; KIMÄLÄINEN, H-R. Quality characteristics of edible linseed oil. **Agricultural and Food Science**, v. 15, p. 402-413, 2006.

ONOUÉ, S.; UCHIDA, A.; KURIYAMA, K.; NAKAMURA, T.; SETO, Y.; KATO, M.; HATANAKA, J.; TANAKA, T.; MIYOSHI, H.; YAMADA, S. Novel solid self-emulsifying drug delivery system of coenzyme Q10 with improved photochemical and pharmacokinetic behaviors. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, p. 492–499, 2012.

OURIQUE, A. F.; MELERO, A.; SILVA, C. B.; SCHAEFER, U. F.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; LEHR, C-M.; KOSTKA, K-H.; BECK, R. C. R. Improved photostability and reduced skin permeation of tretinoin: Development of a semisolid nanomedicine. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 95–101, 2011.

PAPLIED, L. DUHEM, N.; RIEUX, A.; PRÉAT, V. Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 16, p. 228-237, 2011.

PATRAVALE V. B; MANDAWGADE S. D. Novel cosmetic delivery systems: an application Update. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 30, p. 19–33, 2008.

PEPE, S.; MARASCO, S. F.; HAAS, S. J.; SHEERAN, F. L.; KRUM, H.; ROSENFELDT, F. L. Coenzyme Q10 in cardiovascular disease. **Mitochondrion**, v. 7, p. 154–S167, 2007.

POHLMANN, A. R.; FONSECA, F. N.; PAESE, K.; DETONI, C. B.; CORADINI, K.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S. Poly(ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. **Expert Opinion in Drug Delivery**, v. 10, p. 623-638, 2013.

RABETAFIKA, H. N.; REMOORTEL, V. V.; DANTHINE, S.; PAQUOT, N.; BLECKER, C. Flaxseed proteins: food uses and health benefits. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, p. 221–228, 2011.

RAD, A. S.; Study on preparation and some properties of panretin-loaded nanocápsulas. **Biotechnology**, v. 9, p. 234-237, 2010.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C.S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIEUX, A.; FIEVEZ, V.; GARINOT, M.; SCHNEIDER, Y. J.; PRÉAT, V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. **Journal of Controlled Release**, v. 116, p. 1–27, 2006.

ROZET, E.; MARINI, R. D.; ZIEMONS, E.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, p. 848–858, 2011.

RUBILAR, M.; MORALES, E.; CONTRERAS, K.; CEBALLOS, C.; ACEVEDO, F.; VILARROEL, M.; SHENE, C. Development of a soup powder enriched with microencapsulated linseed oil as a source of omega-3 fatty acids. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 114, p. 423–433, 2012.

SAKEENA, M. H. F.; MUTHANNA, F. A.; GHASSAN, Z. A.; KANAKAL, M. M.; ELRASHID, S. M.; MUNAVVAR, A. S.; AZMIN, M. N. Formulation and *in vitro* evaluation of ketoprofen in palm oil esters nanoemulsion for topical delivery. **Journal of Oleo Science**, v. 59, p. 223-228, 2010.

SALAMANCA, C. H.; BARRAZA, R. G.; ACEVEDO, B.; OLEA, A. F. Hydrophobically modified polyelectrolytes as potential drugs reservoirs of n-alkyl-nitroimidazoles. **Journal of the Chilean Chemical Society**. v. 52, 2007.

SALIM, E. I.; ABOU-SHAFFEY, A. E.; MASOUD, A. E.; ELGENDY, S. A. Cancer chemopreventive potential of the Egyptian flaxseed oil in a rat colon carcinogenesis bioassay - implications for its mechanism of action. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 12, p. 2385-2392, 2011.

SAMANE, S.; NOE, J.; CHARROUF, Z.; AMAROUCH, H.; HADDAD, P. S. Insulin-sensitizing and anti-proliferative effects of *Argania spinosa* seed extracts. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, p. 317–327, 2006.

SANTOS, S. S. **Desenvolvimento de formulações nanotecnológicas para o tratamento da candidíase vulvovaginal**. 2012. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

SANTOS, S. S.; LORENZONI, A.; FERREIRA, L. M.; MATTIAZZI, J.; ADAMS, A. I.; DENARDI, L. B.; ALVES, S. H.; SCHAFFAZICK, S. R.; CRUZ, L. Clotrimazole-loaded Eudragit® RS100 nanocapsules: preparation, characterization and in vitro evaluation of antifungal activity against *Candida* species. **Materials Science & Engineering C, Materials for biological applications**, v, 33, p. 1389-1394, 2013.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; PONTES, A.; PEREIRA, V. M. W.; CAETANO, M. N. P. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 208, p. 71–80, 2000.

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

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

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Nanocapsules, nanoemulsion and nanodispersion containing melatonin: preparation, characterization and stability evaluation. **Pharmazie**, v. 62, p. 354-360, 2007.

SCHWARZ, J. C.; WEIXELBAUM, A.; PAGITSCH, E.; LÖW, M.; RESCH, G. P.; VALENTA, C. Nanocarriers for dermal drug delivery: Influence of preparation method, carrier type and rheological properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 437, p. 83-88, 2012.

SHAH, P.; BHALODIA, D.; SHELAT, P. Nanoemulsion: a pharmaceutical review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 1, p. 24-32, 2010.

SHAJI, J.; BHATIA, V. Novel lipid carriers for oral delivery of lipophilic drugs. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 15, p, 47-53, 2012.

SILVA, A. P.; ALVES, M. C. C. Como iniciar a validação de métodos analíticos? ENQUALAB-2006 - **Congresso e Feira da Qualidade em Metrologia**, Rede Metrológica do Estado de São Paulo - REMESP2006, São Paulo, Brasil. p. 8-15, 2006.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVIA, T. M.; KULKARNIA, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1–20, 2001.

SOUR, S.; BELARBI, M.; KHALDI, D.; BENMANSOUR, N.; SARI, N.; NANI, A.; CHEMAT, F.; VISIOLI, F. British argan oil improves surrogate markers of CVD in humans. **Journal of Nutrition**, v. 107, p. 1800–1805, 2012.

STRÖHER, A.; ARMIJO, C. J. V.; RAFFIN, R. P. Nanocosméticos: conceitos, vantagens e aplicações. **Cosmetics and Toiletries**, v. 22, p. 54-60, 2010.

SWARNAKAR, N. K.; JAIN, A. K.; SINGH, R. P.; GODUGU, C.; DAS, M. JAIN, S. Oral bioavailability, therapeutic efficacy and reactive oxygen species scavenging properties of coenzyme Q10-loaded polymeric nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, p. 6860-6874, 2011.

SZTERK, A.; ROSZKO, M.; SOSINSKA, E.; DEREWIKA, D.; LEWICKI, P. P. Chemical composition and oxidative stability of selected plant oils. **Journal of The American Oil Chemists' Society**, v. 87, p. 637–645, 2010.

TEERANACHAIDEEKUL, V.; SOUTO, E. B.; JUNYAPRASERT, V. B.; MÜLLER, R. H.; Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of coenzyme Q10 – development, physicochemical characterization and *in vitro* release studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, p. 141-148, 2007.

TEIXEIRA, Z.; DREISS, C. A.; LAWRENCE, M. J.; HEENAN, R. K.; MACHADO, D.; JUSTO, G. Z.; GUTERRES, S. S.; DURÁN, N. Retinyl palmitate polymeric nanocapsules as carriers of bioactives. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 382, p. 36–47, 2012.

TERROSO, T.; KÜLKAMP, I. C.; JORNADA, D. S.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Development of semi-solid cosmetic formulations containing coenzyme Q10-loaded nanocápsulas. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, p. 819-826, 2009.

TINWORTH, K. D.; HARRIS, P. A.; SILLENCE, M. N.; NOBLE, G. K. Potential treatments for insulin resistance in the horse: A comparative multi-species review. **The Veterinary Journal**, v. 186, p. 282–291, 2010.

TZANG, B-S.; YANG, S-F.; FU, S-G.; YANG, H-C.; SUN, H-L.; CHEN, Y-C. Effects of dietary flaxseed oil on cholesterol metabolism of hamsters. **Food Chemistry**, v. 114, p. 1450–1455, 2009.

UNESCO. Biosphere reserve information – Arganeraie. Disponível em: <
<http://www.unesco.org/mabdb/br/brdir/directory/biores.asp?mode=all&code=MOR+01>
>. Acesso em: 12 jun. 2012.

VENEGAS, C.; CABRERA-VIQUE, C.; GARCÍA-CORZO, L.; ESCAMES, G.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; LOPEZ, L. C. Determination of coenzyme q10, coenzyme q9, and melatonin contents in virgin argan oils: comparison with other edible vegetable oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, 12102–12108, 2011.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, p. 51-64, 2010.

VYAS, T. K.; SHAHIWALA, A.; AMIJI, M. M. Improved oral bioavailability and brain transport of Saquinavir upon administration in novel nanoemulsion formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 347, p. 93–101, 2008.

WANG, Z. H.; WANG, Z. Y.; SUN, C. S.; WANG, C. Y.; JIANG, T. Y.; WANG, S. L. Trimethylated chitosan-conjugated PLGA nanoparticles for the delivery of drugs to the brain. **Biomaterials**, v. 31, p. 908–915, 2010.

YAGHMUR, A.; ASERIN, A.; MIZRAHI, Y.; NERD, A.; GARTIA, N. Argan oil-in-water emulsions: preparation and stabilization. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, p. 15-18, 1999.

ZHANG, Z-S.; WANG, L-J.; LI, D.; LI, S-J.; ÖZKAN, N. Characteristics of flaxseed oil from two different flax plants. **International Journal of Food Properties**, v. 14, p. 1286–1296, 2011.

ZOUGAGH, M.; SALGHI, R.; DHAIR, S.; RIOS, A. Nanoparticle-based assay for the detection of virgin argan oil adulteration and its rapid quality evaluation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, p. 2395–2405, 2011.

ZULLI, F.; BELSER, E.; SCHMID, D.; LIECHTI, C.; SUTER, F. Preparation and properties of coenzyme q10 nanoemulsions. **Cosmetic Science Technology**, p. a-g, 2006.

Apêndice A – Composição quali-quantitativa das formulações

Fase	Componentes	Quantidade	NE-AR-A	NE-AR-B	NE-ARQ-A	NE-ARQ-B
FA	Água destilada	53 mL	X	X	X	X
	Tween 80	0,077 g	X	X	X	X
	Span 80	0,077 g	X	X	X	X
FO	Acetona	27 mL	X	X	X	X
	Óleo de argan	*	X	X	X	X
	Ubiquinona	0,010 g	-	-	X	X

*A=0,3g e B=0,15g

Fase	Componentes	Quantidade	NC-PAR-A	NC-PAR-B	NC-PARQ-A	NC-PARQ-B
FA	Água destilada	53 mL	X	X	X	X
	Tween 80	0,077 g	X	X	X	X
	Span 80	0,077 g	X	X	X	X
FO	Acetona	27 mL	X	X	X	X
	Óleo de argan	*	X	X	X	X
	PCL	0,100 g	X	X	X	X
	Ubiquinona	0,010 g	-	-	X	X

Fase	Componentes	Quantidade	NC-EAR-A	NC-EAR-B	NC-EARQ-A	NC-EARQ-B
FA	Água destilada	53 mL	X	X	X	X
	Tween 80	0,077 g	X	X	X	X
	Span 80	0,077 g	X	X	X	X
FO	Acetona	27 mL	X	X	X	X
	Óleo de argan	*	X	X	X	X
	EUD RL 100	0,100 g	X	X	X	X
	Ubiquinona	0,010 g	-	-	X	X

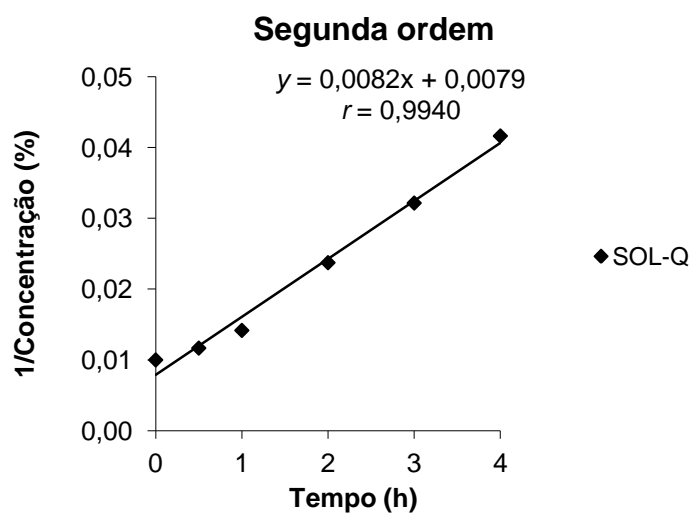
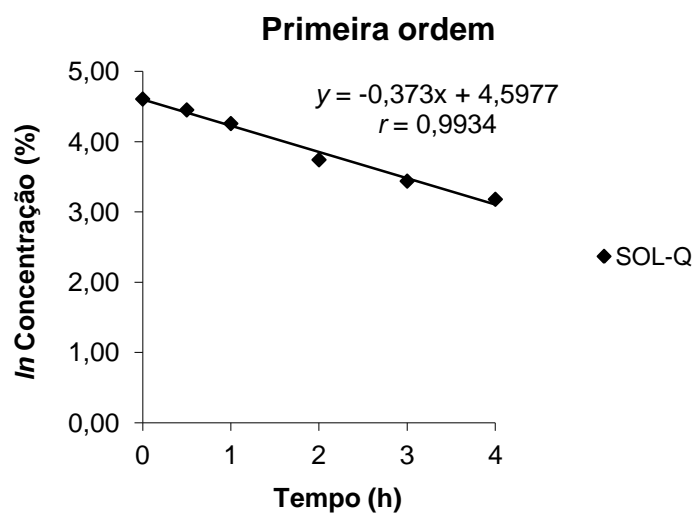
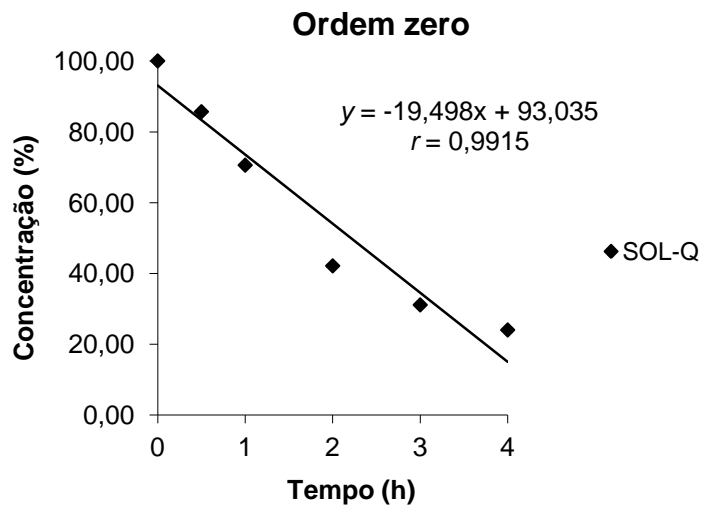
Fase	Componentes	Quantidade	NE-LI-A	NE-LI-B	NE-LIQ-A	NE-LIQ-B
FA	Água destilada	53 mL	X	X	X	X
	Tween 80	0,077 g	X	X	X	X
	Span 80	0,077 g	X	X	X	X
FO	Acetona	27 mL	X	X	X	X
	Óleo de argan	*	X	X	X	X
	Ubiquinona	0,010 g	-	-	X	X

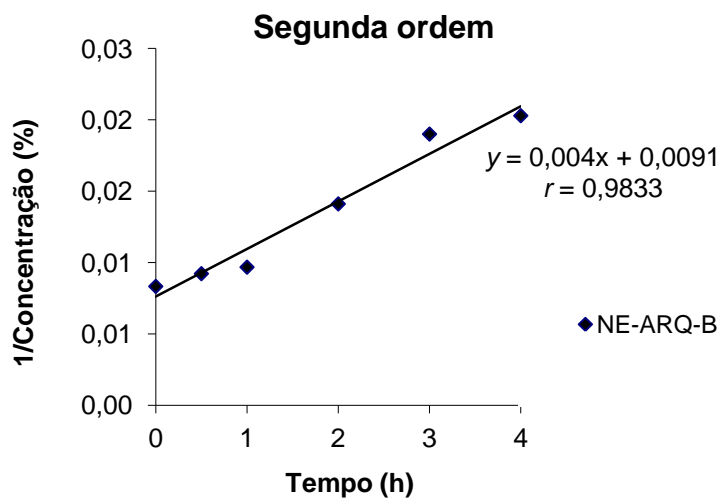
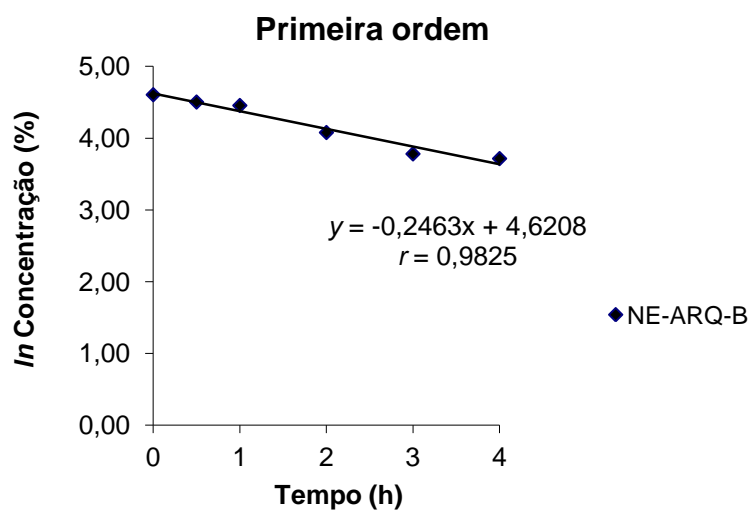
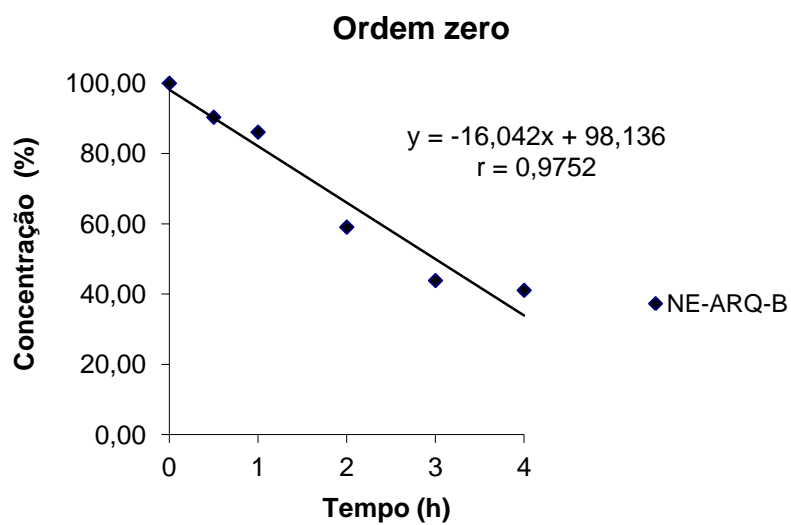
Fase	Componentes	Quantidade	NC-PLI-A	NC-PLI-B	NC-PLIQ-A	NC-PLIQ-B
FA	Água destilada	53 mL	X	X	X	X
	Tween 80	0,077 g	X	X	X	X
	Span 80	0,077 g	X	X	X	X
FO	Acetona	27 mL	X	X	X	X
	Óleo de argan	*	X	X	X	X
	PCL	0,100 g	X	X	X	X
	Ubiquinona	0,010 g	-	-	X	X

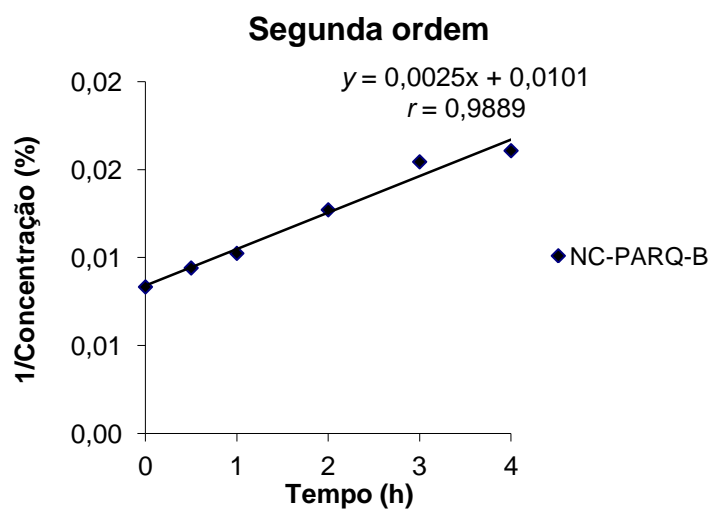
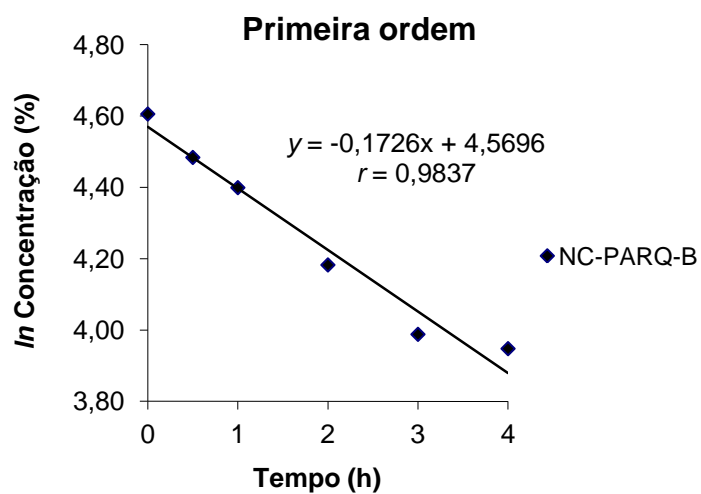
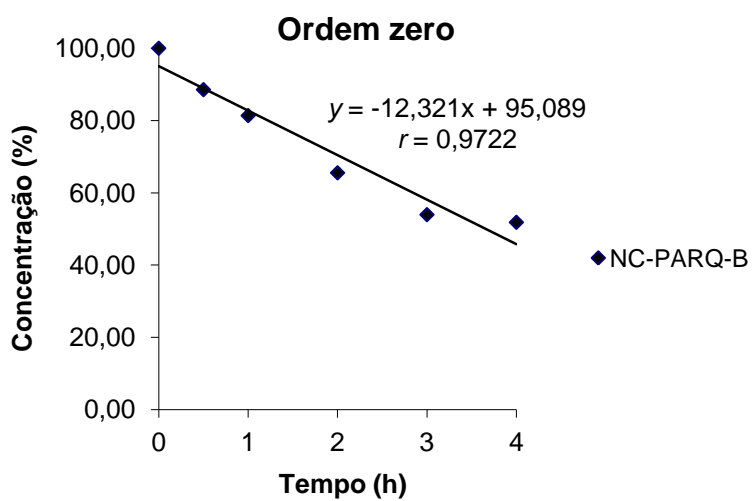
Fase	Componentes	Quantidade	NC-ELI-A	NC-ELI-B	NC-ELIQ-A	NC-ELIQ-B
FA	Água destilada	53 mL	X	X	X	X
	Tween 80	0,077 g	X	X	X	X
	Span 80	0,077 g	X	X	X	X
FO	Acetona	27 mL	X	X	X	X
	Óleo de argan	*	X	X	X	X
	EUD RL 100	0,100 g	X	X	X	X
	Ubiquinona	0,010 g	-	-	X	X

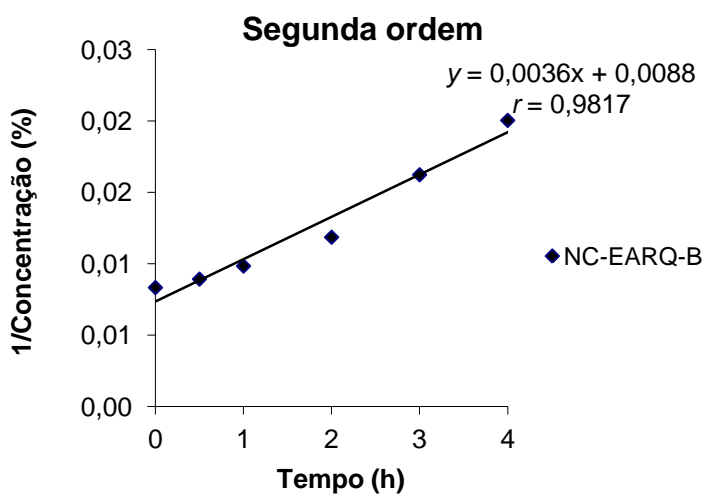
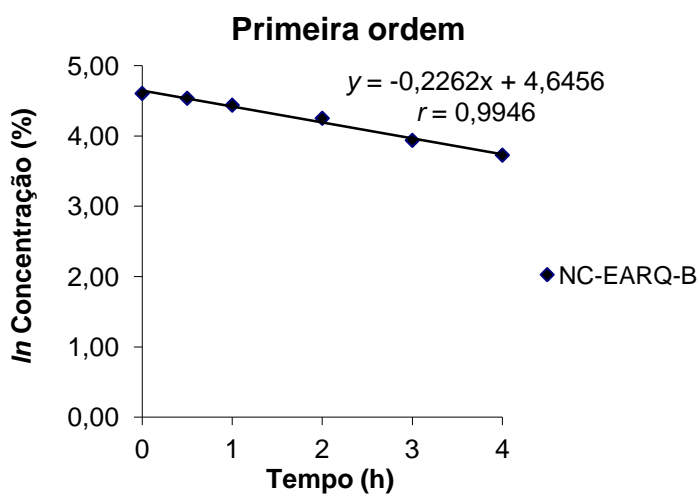
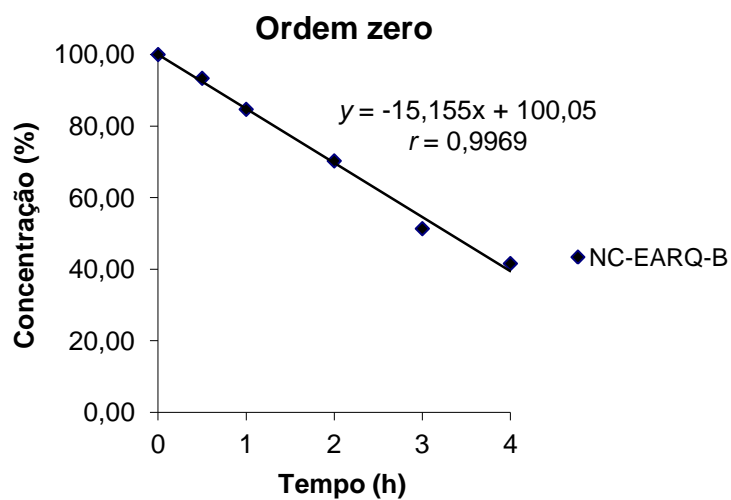
*A = 0,3 g e B = 0,15 g

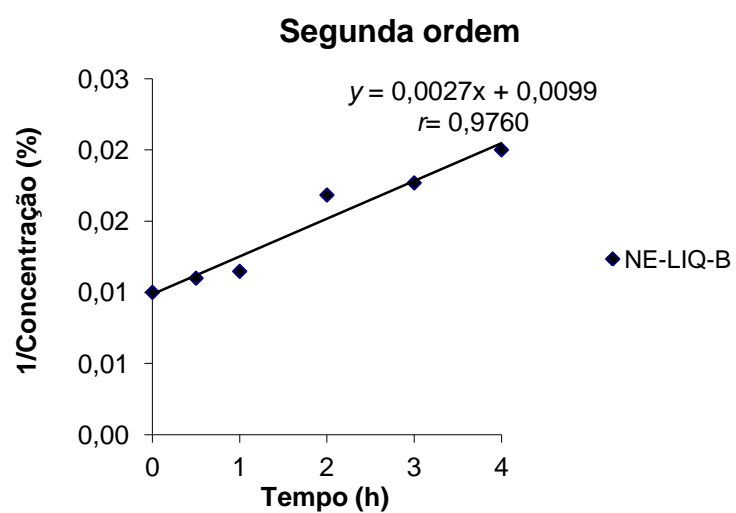
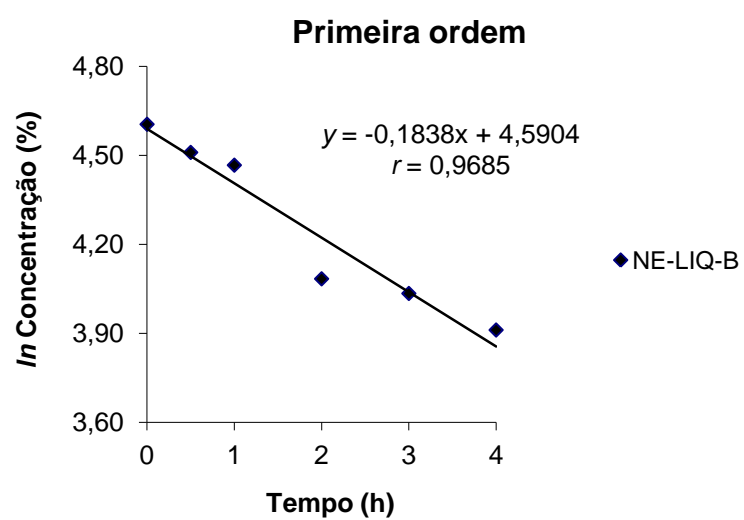
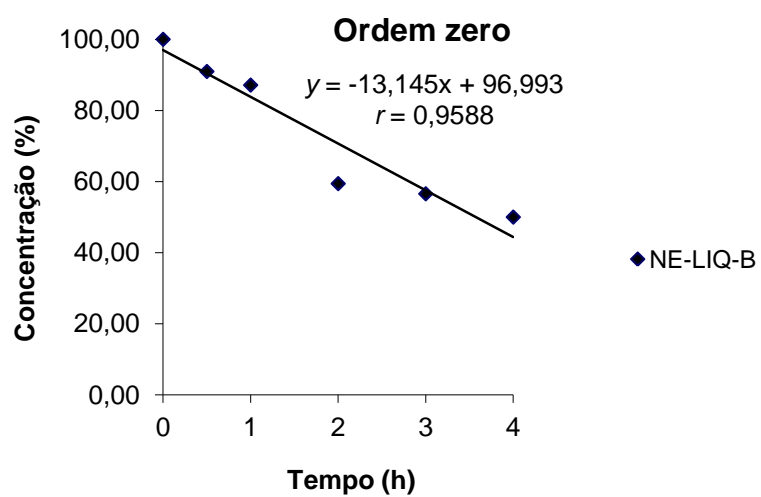
Apêndice B – Gráficos da cinética de reação das formulações

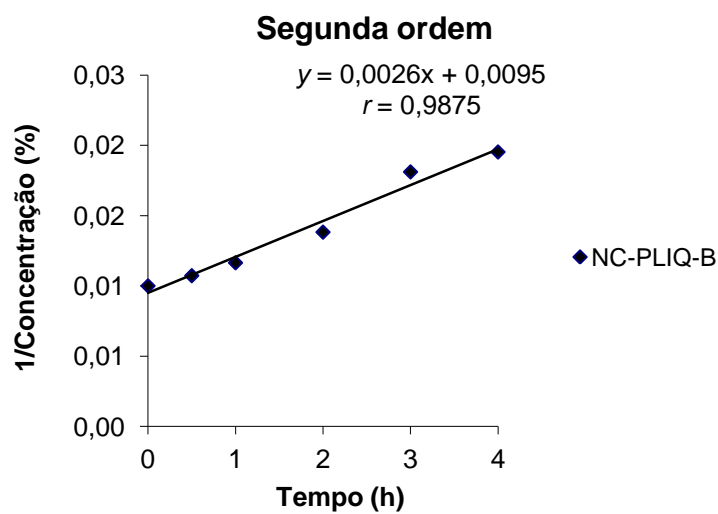
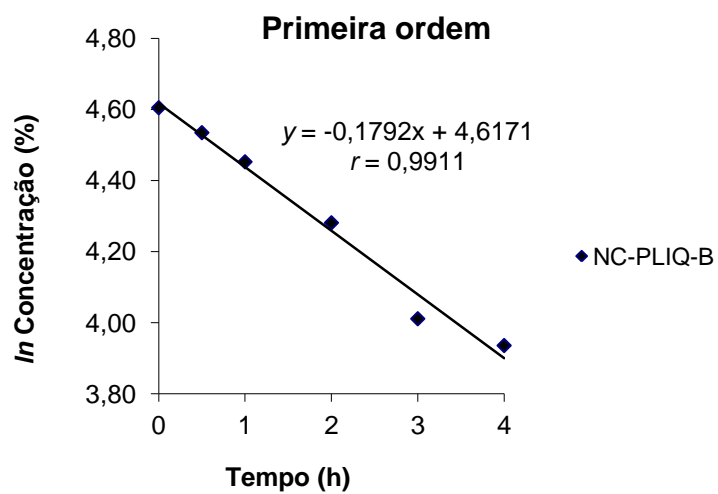
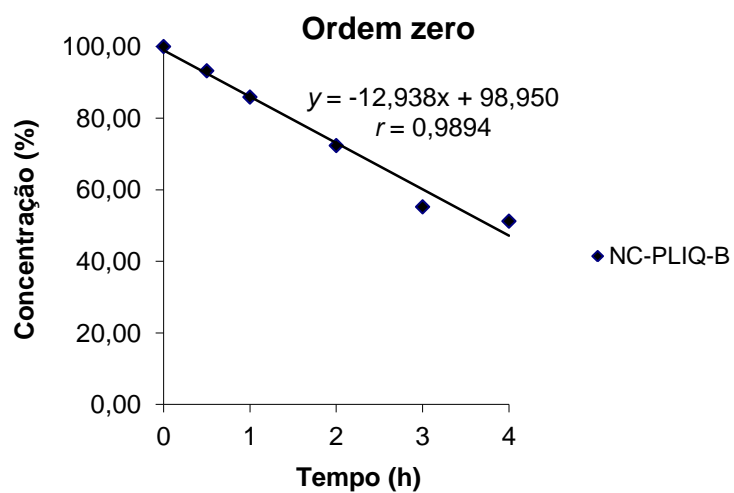


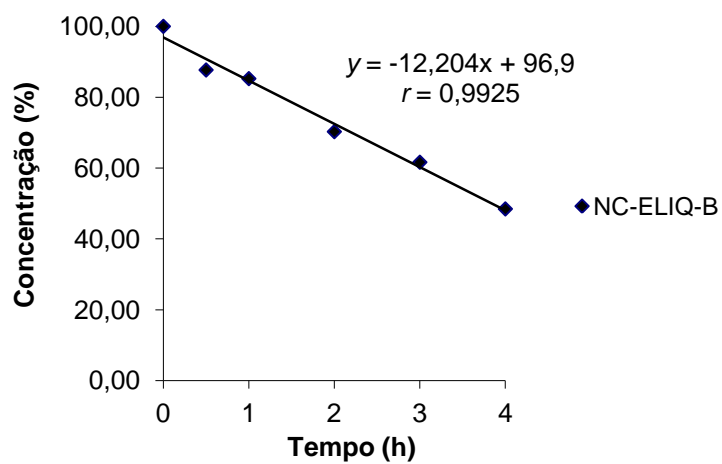
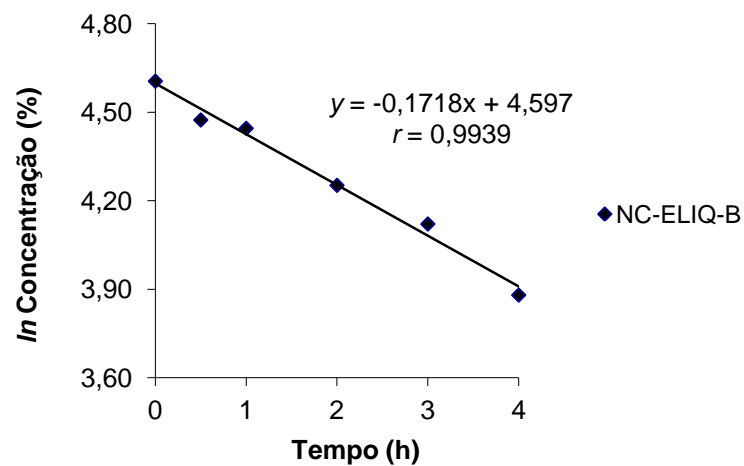










Ordem zero**Primeira ordem****Segunda ordem**