

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

**Milena Libardoni**

**DESENVOLVIMENTO DE SUSPENSÕES E GRANULADOS  
NANOTECNOLÓGICOS CONTENDO O ANTIOXIDANTE  
HIDROFÍLICO PIRROLOQUINOLINA QUINONA**

**Santa Maria, RS  
2017**

**Milena Libardoni**

**DESENVOLVIMENTO DE SUSPENSÕES E GRANULADOS  
NANOTECNOLÓGICOS CONTENDO O ANTIOXIDANTE HIDROFÍLICO  
PIRROLOQUINOLINA QUINONA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Desenvolvimento e Avaliação de Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Scheila Rezende Schaffazick

Santa Maria, RS  
2017

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

Libardoni, Milena  
DESENVOLVIMENTO DE SUSPENSÕES E GRANULADOS  
NANOTECNOLÓGICOS CONTENDO O ANTIOXIDANTE HIDROFÍLICO  
PIRROLOQUINOLINA QUINONA / Milena Libardoni.- 2017.  
95 f.; 30 cm

Orientadora: Scheila Rezende Schaffazick  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2017

1. PQQ 2. Nanopartículas poliméricas 3. Atividade  
antioxidante 4. Granulação via úmida I. Schaffazick,  
Scheila Rezende II. Título.

**Milena Libardoni**

**DESENVOLVIMENTO DE SUSPENSÕES E GRANULADOS  
NANOTECNOLÓGICOS CONTENDO O ANTIOXIDANTE HIDROFÍLICO  
PIRROLOQUINOLINA QUINONA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Desenvolvimento e Avaliação de Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

**Aprovado em 25 de outubro de 2017:**

---

**Scheila Rezende Schaffazick, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)

---

**Luciane Varini Laporta, Dr<sup>a</sup>. (UNIFRA)**

---

**Andréa Inês Horn Adams, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

**Santa Maria, RS**  
**2017**

## DEDICATÓRIA

*Dedico esta dissertação à minha família, em especial aos meus pais, Cleomar e Maria Elisa, por todo incentivo, apoio, carinho e amor incondicional. Vocês são meus alicerces, agradeço por estarem sempre ao meu lado.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por me iluminar, guiar, me dar forças e proporcionar condições de realizar esta caminhada, passando por todas as dificuldades.

Aos meus pais, Maria Elisa e Cleomar, pelo amor e incentivo imensuráveis, dedicação, carinho, confiança e amparo.

Às minhas irmãs, Marlucci e Loredana, pelo carinho e incentivo em todos os momentos. Aos meus avós, pela atenção e preocupação que têm comigo.

Ao meu noivo, Marcelo, pelo amor, incentivo e suporte. Agradeço ainda, pela compreensão e paciência nos momentos de estresse.

Agradeço a toda minha família, que é minha base e estrutura, com os quais sei que sempre posso contar.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Scheila Rezende Schaffazick, por todos seus ensinamentos, pela oportunidade, amizade, disponibilidade, apoio e dedicação.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Letícia Cruz pelas colaborações, ensinamento e amizade. Ao Prof. Dr. André Gündel, da UNIPAMPA de Bagé, pelas análises de microscopia de força atômica. Ao Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora e a sua aluna Rafaela pela análise do teor de umidade. À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane de Bona da Silva pela disponibilidade do equipamento Zetasizer.

Aos colegas e amigos do LabTec, Laura, Charlene, Cristina, Estevan, Marila, Natháli, Allanna, Fernanda, Alessandra, Carina, Marcela, Taiane, Felipe, Luan, Renata, Verônica e Leonardo, pela convivência diária, amizade, momentos de descontração e experiências divididas.

Às amigas e colegas, Carolina e Maria Gilda, pela amizade construída durante este período, por toda ajuda e pelos momentos agradáveis que juntas passamos. Agradeço também às colegas Luana e Juliane pela amizade e por toda disponibilidade em me ajudar.

Agradeço, em especial, às alunas de iniciação científica Camila, Tainara, Victória e Daniela por todo auxílio durante o mestrado, para que este trabalho fosse finalizado, pela amizade, risadas e agradável convivência.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade, e à CAPES pelo suporte financeiro.

Enfim, a todas as pessoas que de alguma forma expressaram seu carinho e incentivo durante estes dois anos.

## RESUMO

### DESENVOLVIMENTO DE SUSPENSÕES E GRANULADOS NANOTECNOLÓGICOS CONTENDO O ANTIOXIDANTE HIDROFÍLICO PIRROLOQUINOLINA QUINONA

AUTORA: Milena Libardoni

ORIENTADORA: Scheila Rezende Schaffazick

A pirroloquinolina quinona (PQQ) é uma *o*-quinona, hidrossolúvel, de ocorrência natural, que tem mostrado diferentes atividades biológicas, dentre elas potente atividade antioxidante. Com o intuito de melhorar seu desempenho farmacológico e explorar seu potencial, pode-se associar esta substância ativa a sistemas nanoestruturados líquidos. Nesse trabalho, foram desenvolvidas suspensões de nanopartículas poliméricas para a veiculação de PQQ, empregando o método de dupla emulsificação- evaporação de solvente, com dois polímeros diferentes, poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) ou Eudragit<sup>®</sup> RS 100, e com duas concentrações do ativo (0,5 ou 1,0 mg/mL), otimizando uma formulação a fim de avaliar o perfil de liberação de PQQ e sua atividade antioxidante *in vitro* contra peroxidação lipídica, bem como a estabilidade durante o armazenamento. Posteriormente, com o propósito de melhorar a estabilidade, a suspensão nanoestruturada otimizada foi convertida em granulados, pela técnica de granulação via úmida, os quais foram caracterizados físico-química e tecnologicamente e, ainda, submetidos à análise da cinética de liberação de PQQ e à estabilidade durante 90 dias. Considerando os resultados, a suspensão desenvolvida com o polímero PCL apresentou partículas com diâmetro micrométrico, alto índice de polidispersão (IPd) e reduzida eficiência de encapsulamento (EE%; 6,42%). Por sua vez, as suspensões preparadas com o polímero Eudragit<sup>®</sup> RS 100 demonstraram características físico-químicas adequadas, com diâmetro médio de partículas nanométrico (343 – 384 nm; Zetasizer<sup>®</sup>) e com distribuição de tamanho aceitável, sendo a formulação preparada com PQQ na concentração de 0,5 mg/mL a selecionada para o restante do estudo, visto que apresentou EE% (52,17%) significativamente mais elevada que as demais. A microscopia de força atômica desta formulação confirmou a presença de partículas coloidais esféricas, com superfície lisa. A suspensão nanoestruturada demonstrou atividade antioxidante, *in vitro*, superior à de PQQ livre, pelo método TBARS. Foi verificado, preliminarmente, que o nanoencapsulamento protegeu PQQ contra degradação, quando comparado a uma solução de PQQ livre. Considerando que, em apenas 15 dias de armazenamento, a suspensão já se apresentou instável, foi necessário o desenvolvimento de granulados, os quais demonstraram características tecnológicas (ângulo de repouso, índice de Carr, fator de Hausner) e físico-químicas (teor, diâmetro médio de partículas, IPd) adequadas, sendo acondicionados em sachês, como forma farmacêutica final. Os granulados mantiveram-se estáveis, em todos os parâmetros avaliados, durante 90 dias de armazenamento. Através de microscopia eletrônica de varredura, foi possível observar também a presença de estruturas nanométricas esféricas nos grânulos formados. A suspensão coloidal otimizada e os granulados contendo o ativo PQQ nanoencapsulado demonstraram perfis de liberação, *in vitro*, muito semelhantes, seguindo uma cinética monoexponencial, com mecanismo de liberação do tipo transporte anômalo. Diante dos resultados obtidos, é possível concluir que a veiculação de PQQ em nanopartículas poliméricas favoreceu significativamente a atividade antioxidante desta substância, mesmo com encapsulamento parcial, bem como a sua conversão em granulados melhorou consideravelmente a estabilidade do sistema, além de promover certo controle de liberação, em comparação ao ativo livre. Sendo assim, os granulados contendo o antioxidante hidrofílico PQQ nanoencapsulado são sistemas promissores, principalmente, para explorar seus efeitos na prevenção e/ou tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo.

**Palavras-chave:** PQQ. Nanopartículas poliméricas. Dupla emulsificação- evaporação de solvente. Atividade antioxidante. Granulação via úmida.

## ABSTRACT

### DEVELOPMENT OF NANOTECHNOLOGY-BASED SUSPENSIONS/GRANULATES CONTAINING THE HYDROPHILIC ANTIOXIDANT PYRROLOQUINOLINE QUINONE

AUTHOR: Milena Libardoni  
ADVISOR: Scheila Rezende Schaffazick

Pyrrroloquinoline quinone (PQQ) is a naturally occurring hydrophilic o-quinone which has shown different biological activities, as potent antioxidant activity. In order to improve its pharmacological performance and to exploit its potential, it is possible to associate this active substance to liquid nanostructured systems. In this work, PQQ-loaded polymeric nanoparticle suspensions were developed, using double emulsification-solvent evaporation method, with two different polymers, poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) or Eudragit<sup>®</sup> RS 100, and with two concentrations of active (0,5 or 1,0 mg/mL) optimizing a formulation to evaluate the PQQ release profile and its antioxidant activity *in vitro* against lipid peroxidation, as well as stability during storage. Later, in order to improve the stability, the optimized nanostructured suspension was converted into granulates by wet granulation technique, which were both physicochemical and technologically characterized and also subjected to the analysis of the kinetics of PQQ release and to stability for 90 days. Considering the results, the suspension developed with the PCL polymer showed particles with micrometric diameter, high polydispersion index (IPd) and reduced encapsulation efficiency (EE%; 6.42%). Conversely, the suspensions prepared with the Eudragit<sup>®</sup> RS 100 polymer demonstrated adequate physicochemical characteristics, with nanometric particle size (343-384 nm; Zetasizer<sup>®</sup>) and with acceptable size distribution. The formulation prepared with PQQ in concentration of 0.5 mg/mL was selected to following the study, since it presented EE% (52.17%) significantly higher than the other ones. The atomic force microscopy of this formulation confirmed the presence of spherical colloidal particles with a smooth surface. The nanostructured suspension demonstrated antioxidant activity, *in vitro*, higher than free PQQ by the TBARS method. In preliminary study, the nanoencapsulation protected PQQ against degradation, when compared to a solution of free PQQ. Considering that the suspension was unstable in only 15 days of storage, it was necessary to develop granulates, which demonstrated adequate both technological (angle of repose, Carr index, Hausner factor) and physicochemical characteristics (average particle diameter, IPd), being packaged in sachets as the final pharmaceutical form. Granulates were stable in all evaluated parameters for 90 days of storage. By scanning electron microscopy, it was also possible to observe the presence of spherical nanometric structures in the granules formed. The optimized colloidal suspension and the granulates containing the nanoencapsulated PQQ demonstrated very similar *in vitro* release profiles following monoexponential kinetics, with anomalous transport as release mechanism. In view of the obtained results, it is possible to conclude that the use of PQQ in polymeric nanoparticles significantly improve the antioxidant activity of this substance, even with partial encapsulation, as well as its conversion into granulates considerably improved the stability of the system, besides promoting some release control, compared to the free active. Thus, the granules containing the hydrophilic antioxidant PQQ nanoencapsulated are promising systems, mainly, to explore its effects in the prevention and/or treatment of diseases related to oxidative stress.

**Keywords:** PQQ. Polymeric nanoparticles. Double emulsification-solvent evaporation Antioxidant activity. Wet granulation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química de PQQ .....	22
Figura 2 – Representação esquemática dos tipos de nanopartículas poliméricas.....	26
Figura 3 – Representação esquemática do método de preparação de suspensões de nanopartículas baseado em dupla emulsificação- evaporação de solvente.....	28
Figura 4 – Representação esquemática do método de difusão em sacos de diálise convencional (A) e reversa (B) .....	29
Figura 5 – Sobreposição dos cromatogramas das formulações contendo PQQ (NP.EUD.PQQ.0,5) e das formulações sem a substância ativa (NP.EUD) .....	51
Figura 6 – Aspecto macroscópico das suspensões de nanopartículas contendo PQQ, NP.EUD.PQQ.0,5, NP.EUD.PQQ.1 e NP.PCL.PQQ, respectivamente.....	53
Figura 7 – Distribuição de tamanho de partículas das suspensões coloidais contendo PQQ (n=3), obtida através de espectroscopia de correlação de fótons.....	54
Figura 8 – Potencial zeta das suspensões de nanopartículas contendo PQQ (n=3).....	55
Figura 9 – Distribuição de tamanho de partículas das formulações contendo PQQ (n=3), obtida por difração a laser .....	55
Figura 10 – Imagens bidimensionais (A e B) e tridimensionais (C) obtidas por microscopia de força atômica da suspensão NP.EUD.PQQ.0,5 .....	59
Figura 11 – Perfis de liberação, <i>in vitro</i> , de PQQ a partir da suspensão de nanopartículas em comparação à substância ativa livre. Resultados expressos em média e DP (n=3) .....	61
Figura 12 – Ajuste gráfico do modelo monoexponencial para os dados de liberação de PQQ a partir da suspensão de nanopartículas e da solução de PQQ livre.....	62
Figura 13 – Distribuição de tamanho de partículas dos lipossomas.....	63
Figura 14 – Atividade antioxidante (AA%) das suspensões de nanopartículas contendo ou não PQQ (NP.EUD.PQQ.0,5 e NP.EUD, respectivamente) e da solução do ativo livre (PQQ.LIVRE). *Diferença significativa entre a atividade do ativo PQQ livre (solução) e da suspensão nanoestruturada contendo PQQ. #Diferença significativa da atividade das nanopartículas contendo PQQ em relação à das nanopartículas sem PQQ.....	65
Figura 15 – Teor de PQQ na suspensão de nanopartículas e na solução de PQQ livre, armazenadas por 15 dias sem proteção contra a luz. *Diferença significativa em relação ao tempo inicial ( $p < 0,05$ ) .....	67
Figura 16 – Teor de PQQ na suspensão NP.EUD.PQQ.0,5 armazenada durante 30 dias. *Diferença significativa em relação ao tempo inicial ( $p < 0,05$ ).....	68
Figura 17 – Eficiência de encapsulamento de PQQ na suspensão nanoestruturada após 30 dias de armazenamento .....	69
Figura 18 – Valores de pH da suspensão de nanopartículas após 30 dias da preparação .....	69
Figura 19 – Diâmetro médio da suspensão de nanopartículas, empregando espectroscopia de correlação de fótons, após 30 dias de armazenamento. *Diferença significativa em relação ao tempo inicial ( $p < 0,05$ ) .....	70
Figura 20 – Distribuição de tamanho da suspensão de nanopartículas, empregando difração a laser, após armazenamento de 30 dias.....	70
Figura 21 – Índice de polidispersão das suspensões nanoestruturadas, empregando espectroscopia de correlação de fótons, após 30 dias de armazenamento. *Diferença significativa em relação ao tempo inicial ( $p < 0,05$ ).....	70

Figura 22 – Valores de span referentes às suspensões nanoestruturadas, empregando difração a laser, após armazenamento de 30 dias. *Diferença significativa em relação ao tempo inicial ( $p < 0,05$ ) .....	71
Figura 23 – Potencial zeta das suspensões de nanopartículas armazenadas durante 30 dias ...	71
Figura 24 – Aspecto macroscópico dos granulados obtidos empregando a suspensão de nanopartículas contendo PQQ .....	72
Figura 25 – Morfologia dos granulados obtida através de microscópio óptico (aumento de 40 vezes, A) e eletrônico (B e C, detector SE2, 200x/barra 200 $\mu\text{m}$ e 15.000X/barra 1 $\mu\text{m}$ , respectivamente; D,E e F, detector InLens, 20.000x/barra 2 $\mu\text{m}$ , 25.000x/barra 1 $\mu\text{m}$ e 50.000x/barra 200 nm, respectivamente) .....	73
Figura 26 – Sachês contendo granulados com o equivalente a 5,0 mg de PQQ .....	73
Figura 27 – Distribuição de tamanho dos granulados contendo o ativo PQQ associado às nanopartículas ( $n=3$ ), obtida através de espectroscopia de correlação de fótons ..	75
Figura 28 – Aspecto macroscópico dos granulados contendo PQQ livre (A), ativo PQQ nanoencapsulado (B) e com nanopartículas sem a presença de PQQ (C) .....	76
Figura 29 – Perfis de liberação <i>in vitro</i> de PQQ a partir dos granulados contendo nanopartículas (GR.NP.PQQ) ou não (GR.PQQ). Resultados expressos em média e DP ( $n=3$ ) .....	77
Figura 30 – Ajuste gráfico do modelo monoexponencial para os dados de liberação de PQQ a partir dos granulados.....	78
Figura 31 – Aspecto macroscópico dos granulados após a preparação (A) e após 90 dias de armazenamento (B).....	79
Figura 32 – Teor de PQQ nos granulados contendo nanopartículas armazenados durante 90 dias .....	80
Figura 33 – Diâmetro médio dos granulados contendo nanopartículas, após dispersão/filtração das amostras, empregando espectroscopia de correlação de fótons, após 90 dias de armazenamento .....	80
Figura 34 – Índice de polidispersão dos granulados contendo nanoestruturas, utilizando espectroscopia de correlação de fótons, após 90 dias de armazenamento.....	80

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos relativos à associação de substâncias antioxidantes com sistemas nanoestruturados (NP = nanopartículas poliméricas; NC = nanocápsulas; NS = nanoesferas) .....	31
Tabela 2 – Composição quali-quantitativa das suspensões nanoestruturadas contendo ou não PQQ.....	38
Tabela 3 – Composição quali-quantitativa dos granulados contendo ou não o ativo PQQ nanoencapsulado .....	44
Tabela 4 – Análise de precisão .....	52
Tabela 5 – Análise de exatidão .....	52
Tabela 6 – Características físico-químicas, logo após a preparação, das suspensões nanoestruturadas (n=3) contendo PQQ (0,5 ou 1,0 mg/mL) .....	54
Tabela 7 – Parâmetros calculados a partir do modelo monoexponencial e Lei da Potência para a suspensão de nanopartículas e solução de PQQ (n=3).....	61
Tabela 8 – Concentrações de MDA resultantes da peroxidação lipídica, expressas em nmol de MDA/mL de meio de reação (n=3). *Diferença significativa em relação ao controle positivo (p<0,05).....	64
Tabela 9 – Características físico-químicas e tecnológicas dos granulados contendo o ativo PQQ associado às nanopartículas poliméricas.....	74
Tabela 10 – Parâmetros calculados a partir do modelo monoexponencial e Lei da Potência para a GR.NP.PQQ e GR.PQQ (n=3) .....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA%	Atividade antioxidante
A/O	Emulsão água/óleo
A/O/A	Emulsão água/óleo/água
AR	Ângulo de repouso
CAT	Catalase
CLAE-UV	Cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção na região ultravioleta
CMC 102	Celulose microcristalina 102
D <sub>0,1</sub> ; D <sub>0,5</sub> , D <sub>0,9</sub>	Diâmetros médios de volume cumulativos
D <sub>3;2</sub>	Diâmetro médio de superfície
D <sub>4;3</sub>	Diâmetro médio de volume
db	Densidade bruta
dc	Densidade de compactação
DP	Desvio padrão
DPR%	Desvio padrão relativo
EE%	Eficiência de encapsulamento
EHL	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAE	Fase aquosa externa
FAI	Fase aquosa interna
FeSO <sub>4</sub>	Sulfato de ferro II heptahidratado
FH	Fator de Hausner
FO	Fase orgânica
GR.NP	Granulados contendo nanopartículas poliméricas sem PQQ
GR.NP.PQQ	Granulados contendo PQQ nanoencapsulada
GR.PQQ	Granulados contendo PQQ livre
GSH-Px	Glutathione peroxidase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
IC	Índice de Carr
IPd	Índice de polidispersão
MDA	Malondialdeído
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
MFA	Microscopia de força atômica
NC	Nanocápsulas
NP	Nanopartículas poliméricas
NP.EUD	Suspensão de nanopartículas poliméricas contendo Eudragit <sup>®</sup> RS 100 sem PQQ
NP.EUD.PQQ.0,5	Suspensão de nanopartículas poliméricas contendo Eudragit <sup>®</sup> RS 100 e 0,5 mg/mL de PQQ
NP.EUD.PQQ.1	Suspensão de nanopartículas poliméricas contendo Eudragit <sup>®</sup> RS 100 e 1,0 mg/mL de PQQ
NP.PCL.PQQ	Suspensão de nanopartículas poliméricas contendo PCL e 0,5 mg/mL de PQQ
NS	Nanoesferas
NS.EUD	Suspensão de nanoesferas contendo Eudragit <sup>®</sup> RS 100 sem PQQ
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Ânion superóxido
OH <sup>•</sup>	Radical hidroxila

PCL	Poli( $\epsilon$ -caprolactona)
PQQ	Pirroloquinolina quinona
PQQ.LIVRE	Solução aquosa de PQQ livre
PVP K-30	Polivinilpirrolidona
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
<i>T<sub>g</sub></i>	Temperatura de transição vítrea

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	15
<b>2 OBJETIVOS</b>	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b>	20
3.1 ESTRESSE OXIDATIVO	21
3.2 PIRROLOQUINOLINA QUINONA E SEU POTENCIAL ANTIOXIDANTE	22
3.3 SISTEMAS NANOESTRUTURADOS POLIMÉRICOS	25
3.4 GRANULADOS	32
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	35
4.1 MATERIAIS	35
<b>4.1.1 Matérias-primas e outros materiais</b>	35
<b>4.1.2 Equipamentos</b>	36
4.2 MÉTODOS	37
<b>4.2.1 Otimização da formulação</b>	37
4.2.1.1 <i>Preparação das suspensões de nanopartículas poliméricas</i>	37
4.2.1.2 <i>Validação do método analítico por CLAE-UV para a determinação do teor de PQQ nos sistemas nanoestruturados</i>	38
4.2.1.3 <i>Caracterização físico-química das formulações</i>	39
4.2.1.3.1 <i>Determinação do diâmetro médio de partículas, distribuição de tamanho e potencial zeta</i>	39
4.2.1.3.2 <i>Determinação do pH</i>	40
4.2.1.3.3 <i>Determinação do teor e da eficiência de encapsulamento de PQQ nas suspensões de nanopartículas</i>	40
<b>4.2.2 Microscopia de força atômica (MFA)</b>	40
<b>4.2.3 Estudo da cinética de liberação de PQQ a partir da suspensão nanoestruturada</b>	41
<b>4.2.4 Avaliação, <i>in vitro</i>, da atividade antioxidante contra a lipoperoxidação</b>	42
4.2.4.1 <i>Preparação dos lipossomas</i>	42
4.2.4.2 <i>Ensaio da lipoperoxidação</i>	43
<b>4.2.5 Análise de teor da suspensão nanoestruturada e da solução de PQQ após armazenamento em frascos transparentes</b>	43
<b>4.2.6 Estudo de estabilidade da suspensão coloidal</b>	44
<b>4.2.7 Granulados</b>	44
4.2.7.1 <i>Preparação dos granulados a partir da suspensão nanoestruturada</i>	44
4.2.7.2 <i>Caracterização tecnológica e físico-química dos granulados</i>	45
4.2.7.2.1 <i>Ângulo de repouso</i>	45
4.2.7.2.2 <i>Densidade bruta, densidade de compactação, índice de Carr e fator de Hausner</i>	45
4.2.7.2.3 <i>Teor de umidade dos granulados</i>	46
4.2.7.2.4 <i>Análise morfológica dos granulados por microscopia óptica e eletrônica</i>	46
4.2.7.2.5 <i>Análise do diâmetro médio e índice de polidispersão</i>	46
4.2.7.2.6 <i>Determinação do teor de PQQ nos granulados preparados</i>	47
4.2.7.3 <i>Estudo do perfil de liberação, <i>in vitro</i>, de PQQ a partir dos granulados</i>	47
4.2.7.4 <i>Estudo de estabilidade dos granulados contendo PQQ associada a nanopartículas</i>	48
<b>4.2.8 Análise estatística</b>	48
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	50
5.1 DESENVOLVIMENTO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO PQQ	50
<b>5.1.1 Preparação das suspensões de nanopartículas poliméricas</b>	50

<b>5.1.2 Validação do método analítico por CLAE-UV para a determinação do teor de PQQ nos sistemas nanoestruturados</b> .....	51
<b>5.1.3 Caracterização físico-química das suspensões e seleção da formulação otimizada</b>	53
<b>5.2 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA DA FORMULAÇÃO OTIMIZADA</b> .....	59
<b>5.3 ESTUDO DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DE PQQ A PARTIR DA SUSPENSÃO NANOESTRUTURADA</b> .....	60
<b>5.4 AVALIAÇÃO, <i>IN VITRO</i>, DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE CONTRA A LIPOPEROXIDAÇÃO</b> .....	63
<b>5.5 ANÁLISE PRELIMINAR DE TEOR DA SUSPENSÃO NANOESTRUTURADA E DA SOLUÇÃO DE PQQ APÓS ARMAZENAMENTO EM FRASCOS TRANSPARENTES</b> .....	66
<b>5.6 ESTUDO DE ESTABILIDADE DA SUSPENSÃO COLOIDAL OTIMIZADA</b> .....	68
<b>5.7 GRANULADOS</b> .....	72
<b>5.7.1 Preparação e caracterização físico-química dos granulados desenvolvidos</b> .....	72
<b>5.7.2 Estudo do perfil de liberação, <i>in vitro</i>, de PQQ a partir dos granulados</b> .....	76
<b>5.7.3 Estudo de estabilidade dos granulados contendo o ativo PQQ nanoencapsulado</b> ...	79
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	83
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	86



## 1 INTRODUÇÃO

Pirroloquinolina quinona (PQQ) é uma *o*-quinona hidrossolúvel que tem sido popularmente utilizada como suplemento nutricional, sendo naturalmente encontrada em vegetais, frutas, ovos, leite, entre outros, e a sua presença é também observada em tecidos e fluidos corporais humanos (AKAGAWA; NAKANO; IKEMOTO, 2016; KUMAZAWA et al., 1995; KUMAZAWA et al., 1992; KUMAZAWA; SENO; SUZUKI, 1993; MITCHELL et al., 1999; ZHANG; ZHANG; MENG, 2009). Esta substância tem demonstrado relevante interesse científico devido aos seus efeitos benéficos observados, sendo que estudos já evidenciaram sua acentuada atividade antioxidante na eliminação de radicais livres, principalmente contra espécies reativas de oxigênio (EROs) e na redução da peroxidação lipídica, além de atividade anti-inflamatória, hepatoprotetora, cardioprotetora, neuroprotetora, efeito protetor sobre o envelhecimento celular, entre outros (GUAN et al., 2015; HARRIS et al., 2013; HE et al., 2003; JIA et al., 2015; LIU et al., 2016; NUNOME et al., 2008; OHWADA et al., 2008; TAO et al., 2007; TAO et al., 2015; ZHU et al., 2004).

Entretanto, tem-se notado a falta de estudos referentes a formulações contendo PQQ que possam favorecer o seu desempenho farmacológico. Assim, torna-se interessante o desenvolvimento nanotecnológico de formas farmacêuticas, a fim de explorar o potencial desta molécula, uma vez que nanoestruturas têm alcançado grandes avanços na área terapêutica mediante a sua alta área superficial, maior distribuição no trato gastrointestinal, promoção de liberação controlada de substâncias ativas, prolongando a ação, funcionando como sistemas reservatórios e possibilitando a redução da frequência de administração de doses, proporcionando, também, a diminuição de toxicidade e, com isso, de efeitos adversos. Além disto, os sistemas coloidais podem aumentar o potencial terapêutico do princípio ativo, promovendo a vetorização a alvos específicos, bem como protegê-lo da degradação, melhorando sua estabilidade (COUVREUR et al., 2002; GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; GUTERRES, SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; SCHAFFAZICK et al., 2003), sendo capazes também de possibilitar o aumento da biodisponibilidade (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; ZHUANG et al., 2010) e do efeito antioxidante de substâncias associadas, como melatonina, idebenona e extratos hidrofílicos de plantas (BITENCOURT et al., 2016; 2017; PALUMBO et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2005).

Dentre os sistemas nanoestruturados, encontram-se as nanopartículas poliméricas, que possuem diâmetro inferior a 1000 nm, sendo geralmente menores que 500 nm. As nanopartículas poliméricas compreendem as nanocápsulas, que são sistemas vesiculares

(*core-shell*), e as nanoesferas, que são sistemas matriciais (DIMER et al., 2013; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SCHAFFAZICK et al., 2003). O nanoencapsulamento de substâncias hidrofílicas é bastante desafiador, e um método que tem sido comumente utilizado para isto é o método de dupla emulsificação-*evaporação de solvente* (água/óleo/água, A/O/A), o qual tem proporcionado satisfatória eficiência de encapsulamento para estes tipos de moléculas (IQBAL et al., 2015; MILADI et al., 2015; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

As suspensões nanoestruturadas demonstram limitada estabilidade em função do tempo de armazenamento devido à instabilidade microbiológica e físico-química, por se tratarem de sistemas líquidos dispersos. Nesse sentido, formas farmacêuticas sólidas, como granulados e comprimidos, têm sido desenvolvidas a partir destas suspensões, com o intuito de contornar estes problemas, melhorando a estabilidade do produto e também a futura adesão do paciente ao tratamento, devido à facilidade na administração (FRIEDRICH et al., 2010a,b; PINHEIRO, 2016). As técnicas de granulação via úmida ou via seca podem ser empregadas para o desenvolvimento de granulados, sendo que a por via úmida utiliza um líquido de granulação para a formação de uma massa úmida, ao misturá-lo com os componentes pulveréos da formulação (AULTON, 2005; COUTO; ORTEGA; PETROVICK, 2000). Friedrich e colaboradores (2010a,b) e Pinheiro (2016) empregaram suspensões de nanocápsulas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) ou de etilcelulose, contendo dexametasona ou vimopocetina, respectivamente, como líquido de granulação para a preparação de granulados, destinados à conversão em comprimidos.

A previsão da utilização de granulados nanotecnológicos como forma farmacêutica final ainda não foi explorada na literatura, o que pode trazer como vantagem a possibilidade de maior flexibilidade de dose, além de evitar problemas relativos à limitação no tamanho da unidade de dosagem, como no caso de comprimidos. Para isso, os granulados podem ser fracionados e acondicionados em sachês, com utilização dependente da dispersão em água, antes do uso.

É importante salientar que, até o momento, não foram encontrados estudos relativos à veiculação de PQQ em nanopartículas poliméricas para fins terapêuticos, que por ser uma substância hidrofílica, é de difícil nanoencapsulamento. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi desenvolver tecnologicamente uma suspensão otimizada de nanopartículas poliméricas contendo PQQ, pelo método de dupla emulsificação-*evaporação de solvente*, com a finalidade de avaliar possível proteção do princípio ativo, controle de liberação e a atividade antioxidante contra peroxidação lipídica, *in vitro*, desta formulação em comparação à

substância ativa na forma livre (solução). O estudo também propôs transformar esta suspensão nanoestruturada contendo PQQ em granulados, utilizando-a como líquido de granulação, através do método de granulação via úmida, com o intuito de melhorar a estabilidade deste sistema, além de acondicionar os mesmos em sachês de alumínio, visando a uma forma farmacêutica final, avaliando-se a estabilidade.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Preparar e caracterizar físico-quimicamente suspensões de nanopartículas poliméricas contendo a substância ativa hidrofílica PQQ e avaliar sua atividade antioxidante *in vitro*, bem como desenvolver granulados a partir desses sistemas líquidos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar suspensões de nanopartículas poliméricas contendo PQQ com os polímeros Eudragit<sup>®</sup> RS 100 ou PCL, utilizando o método de dupla emulsificação-evaporação de solvente;
- Caracterizar as formulações quanto ao diâmetro médio de partículas, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, teor total de PQQ e eficiência de encapsulamento;
- Analisar a morfologia das nanopartículas poliméricas selecionadas, empregando microscopia de força atômica;
- Determinar a cinética de liberação, *in vitro*, de PQQ a partir da formulação selecionada, através da técnica de difusão em sacos de diálise reversa;
- Avaliar a atividade antioxidante, *in vitro*, da suspensão coloidal otimizada frente à peroxidação lipídica, utilizando lipossomas como substrato;
- Verificar o teor total de PQQ na suspensão coloidal em comparação a uma solução de PQQ livre, após armazenamento em frascos de vidro transparente;
- Efetuar estudo de estabilidade da suspensão de nanopartículas selecionada durante 30 dias, em temperatura ambiente e protegida da luz;
- Preparar granulados a partir da suspensão nanoestruturada, empregando a técnica de granulação via úmida, proceder à caracterização físico-química/tecnológica e acondicioná-los em sachês de alumínio, com o equivalente a 5,0 mg de PQQ;
- Avaliar a cinética de liberação, *in vitro*, de PQQ a partir dos granulados, utilizando a técnica de diálise reversa;
- Realizar estudo de estabilidade, durante 90 dias, dos granulados contendo o ativo PQQ nanoencapsulado.



### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 ESTRESSE OXIDATIVO

Radicais livres são caracterizados por apresentarem um ou mais elétrons desemparelhados, sendo substâncias altamente reativas e com curta meia-vida e são naturalmente gerados pelo metabolismo celular, nas mitocôndrias, membrana celular e citoplasma. As espécies reativas de oxigênio (EROs) constituem a principal classe de estruturas oxidantes geradas *in vivo*, como por exemplo o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que, embora não possua elétrons desemparelhados (espécie não-radicalar), é instável e reativo. As espécies reativas participam de funções biológicas importantes, como na defesa do organismo contra agentes infecciosos, fagocitose, produção de energia pela cadeia transportadora de elétrons e sinalização intercelular (BARBOSA et al., 2010; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; BIRBEN et al., 2012; VALKO et al., 2007).

Porém, quando há uma superprodução de EROs e, portanto, um desequilíbrio em relação à capacidade do sistema biológico em neutralizá-las, caracteriza o chamado estresse oxidativo, que é prejudicial ao organismo por provocar a oxidação de biomoléculas, como lipídios, proteínas e DNA. Dentre os danos que o excesso de EROs pode causar estão o câncer, envelhecimento, aterosclerose, desordens neurodegenerativas, como Doença de Parkinson e de Alzheimer, e, ainda, doenças inflamatórias como artrite reumatoide (BARBOSA et al., 2010; BIRBEN et al., 2012; HITCHON; EL-GABALAWY, 2004; MANKE; WANG; ROJANASAKUL, 2013; VALKO et al., 2007).

A neutralização das EROs é realizada por antioxidantes, produzidos pelo organismo ou absorvidos pela dieta, que são substâncias responsáveis por reduzir, retardar e/ou impedir o dano oxidativo, inibindo a formação ou a ação destas espécies reativas ou, ainda, favorecendo a reconstituição das estruturas biológicas danificadas (BARBOSA et al., 2010; VALKO et al., 2007).

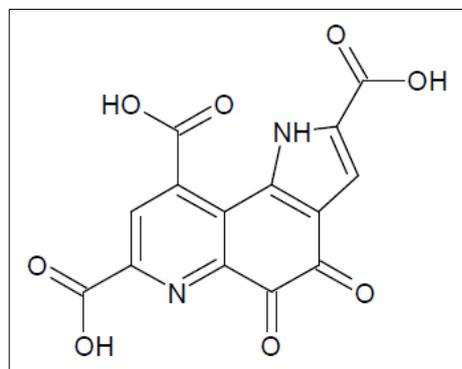
Os antioxidantes, geralmente, atuam doando elétrons às EROs e são divididos em enzimáticos e não enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos incluem a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GSH-Px); já os antioxidantes não enzimáticos compreendem a glutatona, ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno, entre outros (BARBOSA et al., 2010; BIRBEN et al., 2012; VALKO et al., 2007). Antioxidantes provenientes da dieta,

como PQQ, também merecem grande importância, evitando o acúmulo de radicais livres (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

### 3.2 PIRROLOQUINOLINA QUINONA E SEU POTENCIAL ANTIOXIDANTE

PQQ (Figura 1), 4,5-dioxo-4,5-dihidro-1H-pirrolo[2,3-f]quinolina-2,7,9-ácido tricarbóxico ou metoxantina, é uma *o*-quinona aromática tricíclica, formada a partir dos aminoácidos glutamato e tirosina, que foi descoberta em 1979, sendo identificada como um cofator redox de desidrogenases bacterianas, como álcool e açúcar desidrogenases (AKAGAWA; NAKANO; IKEMOTO, 2016; MCINTIRE, 1998; SALISBURY et al., 1979; STITES; MITCHELL; RUCKER, 2000). É uma substância que possui diferentes pKas (0,3; 1,6; 2,2; 3,3 e 10,3), apresenta coloração avermelhada, é aniônica, solúvel em água e termoestável, capaz de reagir com diversos compostos através de seus grupamentos químicos (KANO et al., 1990; MCINTIRE, 1998; MISRA; RAJPUROHIT; KHAIRNAR, 2012; RUCKER; CHOWANADISAI; NAKANO, 2009; ZHANG; ZHANG; MENG, 2009). Sua absorção ocorre no intestino (cerca de 62% em 24 horas) e sua excreção é realizada principalmente via renal (aproximadamente 81% em 24 horas) (SMIDT et al., 1991). Também é importante mencionar que, quando PQQ é administrada por via oral, não tem demonstrado toxicidade e/ou efeitos adversos até uma dose de aproximadamente 60 mg por dia em humanos e mais de 100 mg/kg em animais, porém, tem apresentado nefrotoxicidade em ratos, quando administrada via intraperitoneal, em doses maiores que 10 mg/kg (RUCKER; CHOWANADISAI; NAKANO, 2009; WATANABE et al., 1989).

Figura 1 – Estrutura química de PQQ



Fonte: Própria autora

Esse composto tem ocorrência natural, sendo principalmente encontrado em sementes de soja fermentadas (natto), mas também ocorre em pequenas quantidades (na faixa de ng/g ou ng/mL) em vegetais, frutas, ovos, chá verde, leite, vinho, entre outros (KUMAZAWA et al., 1995; KUMAZAWA; SENO; SUZUKI, 1993; STITES; MITCHELL; RUCKER, 2000). Pesquisadores também têm demonstrado a presença de PQQ no leite, em tecidos e fluidos corporais humanos e em tecidos de ratos (KUMAZAWA et al., 1992; MITCHELL et al., 1999; SMIDT et al., 1991). Killgore e colaboradores (1989) sugeriram que PQQ possui importância nutricional como vitamina ou fator de crescimento, visto que camundongos que tiveram uma dieta privada de PQQ demonstraram retardo no crescimento e não conseguiram se reproduzir.

Diversas atividades biológicas têm sido atribuídas à PQQ, como cardioprotetora (ZHU et al., 2004), hepatoprotetora (JIA et al., 2015), anti-inflamatória (HARRIS et al., 2013), incluindo prevenção e tratamento da osteoartrite (TAO et al., 2015) e artrite reumatoide (LIU et al., 2016), anticonvulsivante (SANCHEZ et al., 2000), neuroprotetora (GUAN et al., 2015; HARA; HIRAMATSU, ADACHI, 2007; NUNOME et al., 2008; OHWADA et al., 2008; ZHANG et al., 2014) e, principalmente, atividade antioxidante (GUAN et al., 2015; HARA; HIRAMATSU, ADACHI, 2007; HE et al., 2003; KUMAR; KAR, 2013; KUMAR; KAR, 2015; KUMAR; KAR; PANDA, 2014; NUNOME et al., 2008; TAO et al., 2007; WU et al., 2017; ZHANG; ROSENBERG, 2002). Estudos também têm evidenciado que PQQ atenua a neurotoxicidade induzida por agregados  $\beta$ -amiloide, impede a formação de fibrilas amiloides e inibe a citotoxicidade de variantes de  $\alpha$ -sinucleína, sendo promissora para o tratamento da Doença de Alzheimer e de Parkinson (KIM et al., 2010; KOBAYASHI et al., 2006; ZHANG; ZHANG; MENG, 2009).

O potencial antioxidante de PQQ na eliminação de radicais livres, especialmente contra EROs, tem sido evidenciado por diversos pesquisadores, tendo significativa capacidade em reduzir a peroxidação lipídica, a qual resulta da geração excessiva de radicais livres (HAMAGISHI et al., 1990; HE et al., 2003; KUMAR; KAR, 2013; KUMAR; KAR, 2015; KUMAR; KAR; PANDA, 2014; MISRA et al., 2004; NUNOME et al., 2008; TAO et al., 2007; WU et al., 2017; ZHANG; ROSENBERG, 2002; ZHU et al., 2004). Também é importante mencionar que essas funções biológicas demonstradas por esta molécula, provavelmente, estão relacionada aos grupos carboxílicos nas posições 7 e 9 e à sua estrutura *o*-quinona, sendo que o grupo -NH do anel pirrol tem se mostrado essencial para sua atividade contra peroxidação lipídica (HAMAGISHI et al., 1990).

Guan e colaboradores, em 2015, demonstraram o efeito neuroprotetor de PQQ, de maneira dose-dependente (30 a 3000 nM), em cultura de células-tronco e progenitoras neurais contra a neurotoxicidade induzida por glutamato, o que está associado à diminuição da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio, ao aumento dos níveis de glutathione, à diminuição da atividade da caspase-3 e ao aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. Outro estudo também relatou a diminuição da produção de EROs e aumento dos mecanismos de defesa intracelulares ao avaliar, *in vivo*, o efeito de PQQ (1 e 2 mM) sobre a neurotoxicidade induzida por glutamato no córtex cerebral de ratos (ZHANG et al., 2013).

Segundo Hara, Hiramatsu e Adachi (2007), PQQ (0,3 a 50  $\mu$ M) apresenta maior atividade neuroprotetora contra a neurotoxicidade induzida por 6-hidroxidopamina em células de neuroblastoma humano, quando comparada a outras vitaminas antioxidantes (50 a 150  $\mu$ M), mesmo em baixas concentrações. PQQ foi capaz de prevenir a morte celular e a fragmentação do DNA, provavelmente através da redução da produção de EROs, sendo mais eficaz na eliminação de radicais superóxido do que os antioxidantes clássicos ácido ascórbico e  $\alpha$ -tocoferol.

Recentemente, Wu e colaboradores (2017) avaliaram o efeito de PQQ sobre a osteoporose induzida pela deficiência de testosterona em camundongos orquiectomizados, já que esta patologia também pode ser causada pelo estresse oxidativo. Os animais que tiveram uma dieta suplementada com PQQ (4 mg/kg) demonstraram recuperação dos níveis de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase, e redução significativa das EROs; verificando que PQQ pode prevenir este tipo de osteoporose através da inibição do estresse oxidativo e do dano ao DNA, o que acaba estimulando a formação óssea pelos osteoblastos e inibindo a reabsorção óssea osteoclástica.

Com relação à atividade de PQQ contra peroxidação lipídica, Hamagishi e colaboradores (1990) verificaram pelo método de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), empregando homogeneizado de cérebro de ratos como substrato, que PQQ foi mais potente em inibir a lipoperoxidação do que os antioxidantes idebenona e  $\alpha$ -tocoferol.

Em um estudo realizado por Kumar e Kar (2013), camundongos foram tratados durante cinco semanas com propiltiouracil na água de beber, a fim de induzir estresse oxidativo, visto que esta substância causa redução dos hormônios tireoidianos, o que leva ao estresse oxidativo, principalmente, no fígado e coração, com consequente peroxidação lipídica. Os grupos de animais que receberam PQQ (1, 5 e 10 mg/kg), via intraperitoneal por seis dias, apresentaram redução significativa na lipoperoxidação, verificada pelo método de

TBARS, e aumento dos níveis das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase, sendo que a dose de 10 mg/kg foi mais eficaz em reduzir a peroxidação lipídica (cerca de 86% no fígado e 64% no coração).

Em outro estudo semelhante, Kumar, Kar e Panda (2014) também avaliaram o efeito de PQQ (1, 3 e 5 mg/kg) sobre a peroxidação lipídica (TBARS) e sobre antioxidantes enzimáticos em alguns órgãos de ratos, após indução de hipertireoidismo com L-tiroxina (500 µg/kg, via intramuscular), e constataram, mais uma vez, que PQQ foi capaz de reverter a lipoperoxidação e restaurar ou aumentar os níveis de antioxidantes enzimáticos (SOD, CAT, GSH-Px) em alguns tecidos analisados.

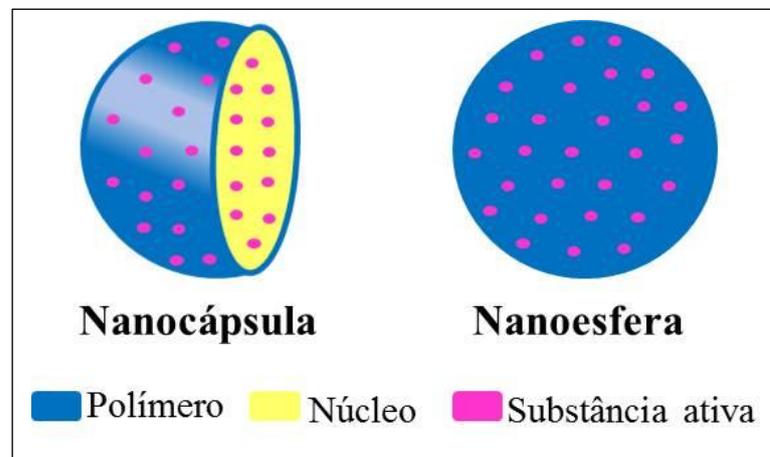
### 3.3 SISTEMAS NANOESTRUTURADOS POLIMÉRICOS

Os sistemas nanoestruturados possuem tamanho submicrométrico (<1 µm) e apresentam alta área superficial, o que os torna altamente promissores no desenvolvimento e aperfeiçoamento de produtos destinados à saúde, como na administração de fármacos e são uma alternativa para superar desvantagens que acabam restringindo o uso clínico dos mesmos. Algumas das vantagens já relatadas para estes sistemas são o aumento da biodisponibilidade da substância ativa, maior eficácia terapêutica devido à alta área superficial das nanoestruturas, permitindo maior interação entre a substância ativa e os tecidos, liberação controlada da mesma com maior tempo de circulação sistêmica, possibilitando menor frequência de administração de doses, proteção do ativo contra degradação, aumento do índice terapêutico e diminuição de efeitos tóxicos/adversos mediante vetorização do princípio ativo ao alvo terapêutico ou por evitar contato direto do mesmo com os tecidos, reduzindo, por exemplo, problemas de irritação no local de aplicação (GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010; MORA-HUERTAS; FESSI, ELAISSARI, 2010; SCHAFFAZICK et al., 2003). Além disso, os sistemas coloidais podem ser administrados por diferentes vias como oral, tópica, oftálmica, parenteral e pulmonar, sendo a via oral a mais comum para administração de medicamentos (MORA-HUERTAS; FESSI, ELAISSARI, 2010; SCHAFFAZICK et al., 2003).

As nanopartículas poliméricas (Figura 2) compreendem as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais, em geral, apresentam diâmetro médio entre 100 e 500 nm. As nanocápsulas são sistemas vesiculares formados por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo, oleoso ou aquoso, sendo que o fármaco estará dissolvido no núcleo e/ou adsorvido na parede polimérica. Já as nanoesferas, são sistemas matriciais constituídos apenas

por uma matriz polimérica, na qual o fármaco ficará retido ou adsorvido (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SCHAFFAZICK et al., 2003). A escolha do método e materiais a serem utilizados para a preparação destes sistemas é um ponto muito importante, devendo ser considerados alguns fatores como as características físico-químicas do fármaco, características de biodegradabilidade e biocompatibilidade dos materiais a serem empregados, via de administração e tamanho de partículas requeridos (DIMER et al., 2013; SCHAFFAZICK et al., 2003).

Figura 2 – Representação esquemática dos tipos de nanopartículas poliméricas



Fonte: própria autora

Diferentes polímeros podem ser utilizados para a preparação de nanopartículas, sendo que os polímeros sintéticos, como poliésteres [poli(ácido lático), poli(lactídeo-co-glicolídeo), poli( $\epsilon$ -caprolactona)] e polimetacrilatos, como o Eudragit<sup>®</sup> RS 100, são os de uso mais difundido e, geralmente, apresentam maior pureza e melhor reprodutibilidade do que polímeros naturais (quitosana, albumina e gelatina). Polímeros semissintéticos, como a etilcelulose, também têm sido empregados para o desenvolvimento de nanoestruturas (COUVREUR et al., 2002; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). As características do polímero são importantes no controle da liberação da substância ativa, portanto, para a escolha do mesmo deve-se levar em consideração a duração da liberação desejada. O polímero escolhido deve ser biocompatível e, dependendo da via de administração pretendida, também precisa ser biodegradável (GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007).

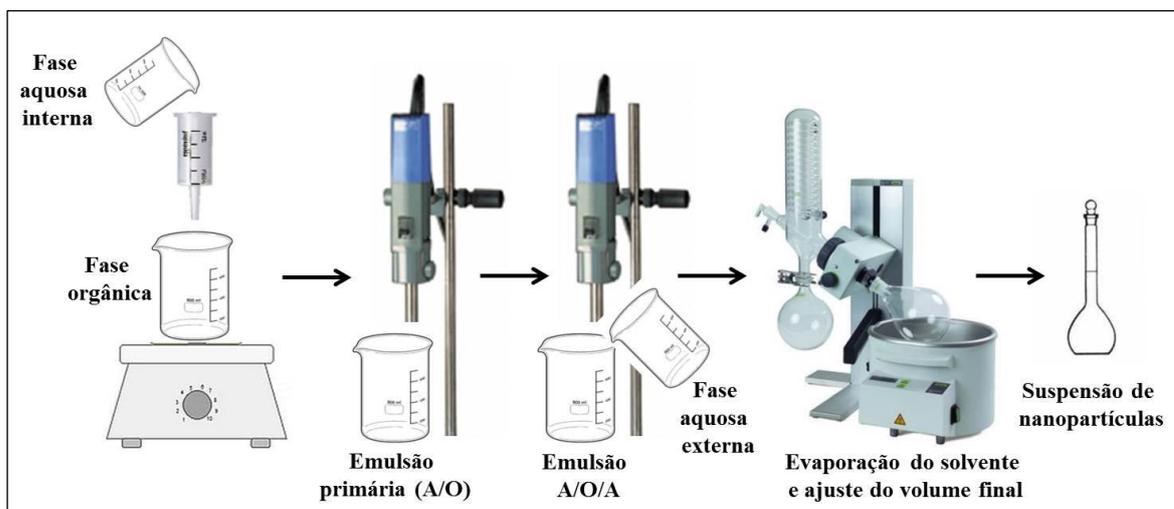
Poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) é um polímero sintético biocompatível, biodegradável e atóxico. É um poliéster alifático e semicristalino que possui lenta degradação e permeabilidade elevada para muitos fármacos, sendo adequado para quando se deseja uma liberação prolongada da substância ativa (BEHERA; BARIK; JOSHI, 2012; SINHA et al., 2004). Eudragit<sup>®</sup> RS 100, um copolímero constituído por 4 a 8% de grupamentos amônio quaternário, também é um polímero sintético capaz de promover liberação controlada do ativo; porém, não é biodegradável, é apenas biocompatível, é insolúvel em pH fisiológico e apresenta capacidade de inchamento e de mucoadesão, devido sua carga superficial positiva. Ambos os polímeros, PCL e Eudragit<sup>®</sup> RS 100, são adequados para administração por via oral (JANA et al., 2014; PIGNATELLO et al., 2002).

Quanto à escolha do método para a preparação de nanopartículas, é necessário conhecer a solubilidade da substância ativa. A metodologia pode ser baseada na polimerização *in situ* de monômeros dispersos ou na precipitação de polímeros pré-formados, sendo que o último proporciona maior rendimento e pode incluir a técnica de emulsificação-evaporação de solvente (MORA-HUERTAS; FESSI, ELAISSARI, 2010; SCHAFFAZICK et al., 2003; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012). Considerando a rápida partição de substâncias ativas hidrofílicas para a fase aquosa dispersante, ao utilizar método de emulsão simples (água/óleo; A/O), observa-se reduzida eficiência de encapsulamento. Dessa forma, o método de dupla emulsificação-evaporação de solvente (A/O/A, Figura 3) tem sido muito empregado para o nanoencapsulamento destes tipos de moléculas (IQBAL et al., 2015; MILADI et al., 2015; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Este método baseia-se em uma fase aquosa interna, composta por água e substância ativa, uma fase orgânica constituída por polímero (sintético, semissintético ou natural), tensoativo de baixo EHL (equilíbrio hidrófilo-lipófilo) e um solvente orgânico totalmente imiscível ou parcialmente miscível em água, como acetato de etila, e uma fase aquosa externa composta por água e tensoativo de alto EHL. A fase aquosa interna é vertida sobre a fase orgânica, formando uma emulsão primária (A/O), com o auxílio de homogeneizador de alta velocidade, e, posteriormente, a fase aquosa externa é vertida sobre esta emulsão, originando uma emulsão A/O/A que é, então, levada ao evaporador rotatório para a eliminação do solvente orgânico e excesso de água, sob pressão reduzida (COUVREUR et al., 2002; IQBAL et al., 2015; MILADI et al., 2015; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Quanto à caracterização destes sistemas, vários parâmetros podem ser analisados, como o diâmetro médio das partículas, polidispersidade, pH, potencial zeta, teor, eficiência de encapsulamento e perfil de liberação do fármaco, sendo importantes para se estimar o seu

comportamento no organismo (COUVREUR et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003). O tamanho das partículas, polidispersidade, pH e potencial zeta são características que têm muita influência sobre a estabilidade das formulações. Quanto maior a diferença entre o tamanho das partículas, maior será o índice de polidispersão e, conseqüentemente, maior a probabilidade de formar aglomerados entre as partículas e ocorrer problemas com a estabilidade. Baixo índice de polidispersão é obtido quando as partículas se encontram em uma faixa estreita de tamanho em um sistema homogêneo. O monitoramento do pH também é importante, visto que alterações no mesmo podem, por exemplo, indicar degradação do polímero. Com relação ao potencial zeta, que reflete o potencial elétrico de superfície, quanto maior (em módulo) ele for, maior será a tendência da formulação apresentar estabilidade, pois dificultará a formação de agregados devido à repulsão entre as partículas (COUVREUR et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003).

Figura 3 – Representação esquemática do método de preparação de suspensões de nanopartículas baseado em dupla emulsificação- evaporação de solvente



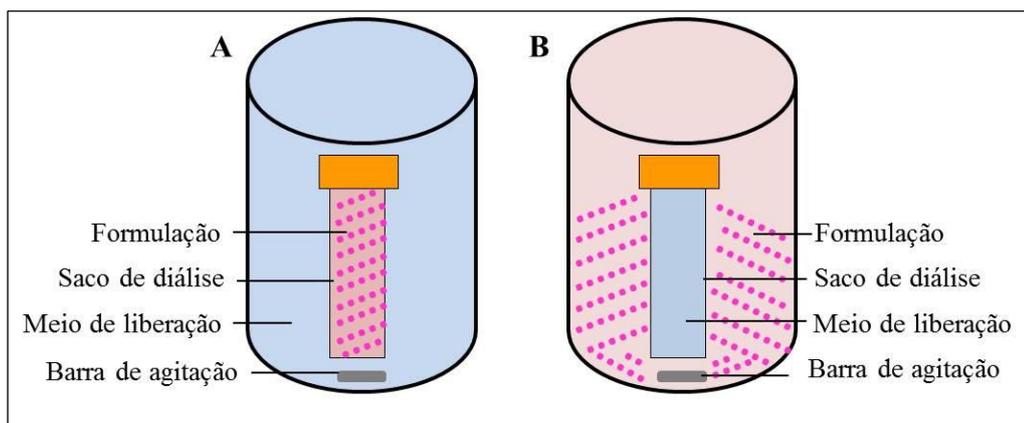
Fonte: própria autora

A concentração de princípio ativo associada ao nanocarreador preparado é estabelecida pela eficiência de encapsulamento (EE%), a qual depende das características físico-químicas do ativo, do sistema desenvolvido e do seu modo de preparação. A EE% geralmente é determinada pela técnica de ultrafiltração-centrifugação, que utiliza uma membrana para separar a fração de ativo livre, que se encontra na fase aquosa dispersante (ultrafiltrado), da fração de ativo associado às nanopartículas, sendo calculada pela diferença entre o teor total de substância ativa na suspensão e a sua concentração na forma livre

(MOHANRAJ; CHEN, 2006; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SCHAFFAZICK et al., 2003).

A liberação lenta e gradual, ou seja, controlada da substância ativa a partir de nanopartículas, é uma vantagem que vem sendo relatada por diversos estudos (CORADINI et al., 2014; PANDEY et al., 2015; PINHEIRO, 2016; ROSA, 2017; SCHAFFAZICK et al., 2003). A cinética de liberação a partir destes sistemas coloidais está condicionada às características e à concentração da substância ativa empregada, às propriedades do polímero e também às condições experimentais utilizadas, *in vitro*, como meio de liberação e pH, devendo estas, serem o mais semelhante possível ao que ocorre *in vivo*. A difusão em sacos de diálise (Figura 4A) é o método, *in vitro*, mais comumente empregado para o estudo de liberação de substâncias, onde o ativo liberado das nanopartículas difunde através da membrana de diálise para o meio de liberação contido no compartimento exterior. Porém, este método pode ser realizado de maneira reversa (Figura 4B), onde no interior do saco de diálise deve conter apenas meio de liberação e a formulação contendo as nanoestruturas é adicionada no meio de liberação do compartimento externo. Dessa maneira, a amostra estará diluída no meio e o ativo irá difundir para o interior da membrana, onde serão realizadas as coletas, simulando de maneira mais realista o que ocorreria *in vivo*, visto que na diálise convencional a amostra não estará diluída no meio e, portanto, haverá uma liberação mais lenta do ativo do que ocorreria *in vivo* (SOUZA, 2014).

Figura 4 – Representação esquemática do método de difusão em sacos de diálise convencional (A) e reversa (B)



Fonte: própria autora

Quanto à estabilidade dos sistemas nanoestruturados, por se tratarem de sistemas líquidos, apresentam maior tendência a instabilidades físico-químicas e microbiológicas em

função do tempo de armazenamento, incluindo agregação e sedimentação das partículas, degradação do polímero, da substância ativa ou dos outros componentes da formulação. Nesse sentido, a fim de minimizar e/ou evitar esses problemas, estudos têm sido desenvolvidos visando à obtenção de formas farmacêuticas sólidas a partir das suspensões de nanopartículas, empregando métodos de liofilização (*freeze-drying*) (ABDELWAHED; DEGOBERT; FESSI, 2006; SCHAFFAZICK et al., 2003), secagem por aspersão (*spray-drying*) (SCHAFFAZICK et al., 2003; SCHAFFAZICK et al., 2006) ou, ainda, convertendo-as em granulados e/ou comprimidos (FRIEDRICH et al., 2010a,b; PINHEIRO, 2016).

Considerando as vantagens já relatadas para estes sistemas, as nanopartículas poliméricas também têm se mostrado sistemas promissores para a veiculação de substâncias antioxidantes, as quais têm recebido ampla atenção em função do maior conhecimento da relação entre radicais livres/EROs com diversas patologias como distúrbios neurodegenerativos, doenças inflamatórias, cardiovasculares e câncer (BARBOSA et al., 2010; BIRBEN et al., 2012; RATNAM et al., 2006). Diversos estudos têm demonstrado que os sistemas coloidais podem proporcionar aumento da estabilidade (coenzima Q10, vitamina C), além do aumento da capacidade antioxidante de substâncias, como idebenona, vitamina E, melatonina e ácido alfa lipoico (ALISHAHI et al., 2011; KULKAMP et al., 2011; KWON et al., 2002; PALUMBO et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2005; SCHAFFAZICK et al., 2008; SHEA et al., 2005). Na tabela 1 podem ser observados, brevemente, alguns trabalhos encontrados na literatura de substâncias antioxidantes associadas a nanopartículas poliméricas.

É importante mencionar que, até o momento, apenas são encontrados trabalhos veiculando PQQ a nanopartículas poliméricas e a lipossomas com o objetivo de desenvolver modelos de biossensores, para estudos de imunoenaios/ensaio de bioafinidade que sejam sensíveis, permitindo detectar substâncias (como DNA e proteína C reativa) em baixas concentrações ou para detectar alterações na permeabilidade de membranas que podem ser ocasionadas por peptídeos ou copolímeros antimicrobianos sintéticos (SHEN; MEYERHOFF, 2009; ZIMMERMAN; LEE; MEYERHOFF, 2010; ZIMMERMAN et al., 2011).

Tabela 1 – Estudos relativos à associação de substâncias antioxidantes com sistemas nanoestruturados (NP = nanopartículas poliméricas; NC = nanocápsulas; NS = nanoesferas)

Sistema	Substância ativa	Método de preparação	Características físico-químicas	Resultados obtidos	Referências
NC, NS	Melatonina	Nanoprecipitação	126 a 236 nm; EE% 54 a 55%; -36 a -43 mV	Redução da peroxidação lipídica, <i>in vitro</i> , induzida pelo radical ascorbil	Schaffazick et al., 2005
NP	Vitamina C	Gelificação iônica	185 a 585 nm; EE% 30 a 70%; 49 a 62 mV	Aumento na estabilidade	Alishahi et al., 2011
NC	Ácido lipoico e/ou melatonina	Deposição interfacial de polímero pré-formado	191 a 349 nm; IPd 0,17 a 0,23; EE% 63 a 76%; -10,9 a -13,17 mV	Redução da peroxidação lipídica <i>in vitro</i>	Külkamp et al., 2011
NP	$\beta$ -caroteno	Deslocamento do solvente	176 nm; IPd<0,5; EE% 83%; -16 mV	Aumento na estabilidade e na atividade anticonvulsivante	Yusuf et al., 2012
NC	Resveratrol e/ou curcumina	Deposição interfacial de polímero pré-formado	198 a 209 nm; IPd 0,08 a 0,12; EE% 100%, -7,8 a -10,2 mV	Liberção controlada e aumento da atividade antioxidante	Coradini et al., 2014
NS	Quercetina	Nanoprecipitação	242 nm; EE% 73,3%; -22,5 mV	Aumento da atividade antioxidante	Sambandam et al., 2015
NC	Crisina	Deposição interfacial de polímero pré-formado	130 a 161 nm; IPd 0,09 a 0,13; EE% 100%; -10,7 a -12,2 mV	Liberção controlada, aumento da atividade antioxidante e antiproliferativa	Lorenzoni, 2015
NS	Quercetina	Nanoprecipitação	32 a 153 nm; EE% 51 a 65%	Controle na liberaçõ e melhora na atividade antitumoral	Pandey et al., 2015
NP	Extrato aquoso das sementes de <i>Syzygium cumini</i>	Dupla emulsificação-evaporação de solvente	196 nm; IPd 0,198; -15,11 mV	Aumento da atividade antifúngica <i>in vitro</i> e diminuição do estresse oxidativo relacionado a Diabetes Mellitus e/ou infecção por cãndida em ratos	Bitencourt et al., 2016;
NP	Quercetina	Nanoprecipitação	52,7 nm; IPd 0,18; -24 mV	Aumento da atividade antioxidante e hepatoproteção	2017
NP	Crisina	Emulsificação-evaporação (óleo/água)	77,15 nm; IPd 0,148; EE% 47%; -2,22 mV	Melhora na atividade antitumoral	Eftekhari et al., 2017
NP	Curcumina	Nanoprecipitação	50 nm; -14,9 mV	Melhora na atividade antioxidante, redução da lipoperoxidação	Kim et al., 2017
					Li et al., 2017

### 3.4 GRANULADOS

A via oral é a mais comum, fácil e conveniente via para administração de medicamentos, o que proporciona maior adesão ao tratamento por parte dos pacientes. Dentre as formas farmacêuticas que podem ser administradas por esta via, encontram-se os granulados, os quais podem ser preparados por dois diferentes métodos, granulação via úmida ou via seca, sendo desejável que eles obtenham forma e cor regulares, estreita faixa granulométrica, adequada fluidez e baixo teor de umidade (AULTON, 2005; COUTO; ORTEGA; PETROVICK, 2000).

A granulação é a aglomeração de partículas pulveréas primárias, formando entidades multiparticuladas maiores, os grânulos. Pode ser realizada a fim de prevenir a segregação de constituintes de uma mistura pulveréa, melhorar as propriedades de fluxo e/ou compactação de uma mistura de pós, bem como para melhorar a estabilidade de uma formulação (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007; AULTON, 2005; COUTO; ORTEGA; PETROVICK, 2000).

A técnica de granulação via úmida é empregada para substâncias ativas que sejam estáveis frente à umidade e ao calor, pois neste método é formada uma massa úmida, utilizando um líquido de granulação, atóxico e de fácil remoção após a secagem (volátil), e uma mistura de pós que, após atingir o ponto de granulação, é forçada a passar por um tamis produzindo grânulos úmidos que, posteriormente, são submetidos à secagem. O ponto de granulação é verificado pela consistência da massa úmida, que deve apresentar-se firme e não aderente quando comprimida pelas mãos (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007; AULTON, 2005). Já, a granulação via seca pode ser empregada para substâncias termolábeis e sensíveis à umidade uma vez que não utiliza líquido de granulação, porém, forma grânulos mais irregulares (AULTON, 2005).

Na literatura, é possível encontrar estudos que desenvolveram granulados contendo nanopartículas poliméricas, através do método de granulação via úmida, e demonstraram características físico-químicas e tecnológicas adequadas, além de propiciar aumento significativo na estabilidade das mesmas (FRIEDRICH et al., 2010a; PINHEIRO, 2016). Friedrich e colaboradores (2010a,b) desenvolveram granulados e comprimidos a partir de dexametasona veiculada em nanocápsulas preparadas com o polímero PCL. Ainda, Pinheiro (2016), com o objetivo de preparar comprimidos contendo vimopocetina nanoencapsulada pela técnica de granulação via úmida, desenvolveu granulados a partir da vimopocetina associada a nanocápsulas de etilcelulose. Os granulados podem ser empregados como forma farmacêutica intermediária, para, por exemplo, posterior produção de comprimidos, ou, ainda, como forma

farmacêutica final, sendo acondicionados em sachês, o que permite maior flexibilidade na dosagem, além da facilidade na administração por via oral (AULTON, 2005; KRATZ; MAYORGA; PETROVICK, 2001).



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

#### 4.1.1 Matérias-primas e outros materiais

- Ácido tiobarbitúrico – Merck (Alemanha);
- Ácido tricloroacético – Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil);
- Acetato de etila – Dinâmica (Diadema, SP, Brasil);
- Acetona – Química Moderna (Barueri, SP, Brasil);
- Água destilada;
- Água ultrapura – Mega Purity Water Purification;
- Celulose microcristalina 102 (Microcel<sup>®</sup> 102) – Blanver (Itapevi, SP, Brasil);
- Croscarmelose sódica (Solutab<sup>®</sup>) – Blanver (Itapevi, SP, Brasil);
- Dispositivo de ultrafiltração-centrifugação (Amicon<sup>®</sup> Ultra, 0,5 mL, Ultracel 10 K – membrana de celulose regenerada, 10.000 MWCO, Millipore);
- Eudragit<sup>®</sup> RS 100 – Röhm GmbH, Pharma Polymers (Alemanha);
- Fosfato de potássio monobásico – Êxodo Científica (Hortolândia, SP, Brasil);
- Hidróxido de sódio – Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- Lecitina de soja – Attivos Magistrais (Barueri, SP, Brasil);
- L-ascorbato de sódio – Sigma-Aldrich (EUA);
- Membranas hidrofílicas (nylon, 0,45 µm, diâmetro de 13 mm ou 47 mm) – Sartorius (EUA);
- Membranas de celulose para sacos de diálise (10 mm, MWCO de 12.000 a 14.000 Da) – Sigma-Aldrich (EUA);
- Metanol grau HPLC – Merck (Alemanha);
- Metanol UV/HPLC – Dinâmica (Diadema, SP, Brasil);
- Monooleato de sorbitano (Span 80<sup>®</sup>) – Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil);
- Pirroloquinolina quinona, teor ≥ 99% (teor declarado 100%) – Pharmanostra (Anápolis, GO, Brasil);
- Poli(ε-caprolactona) M<sub>n</sub> 10.000 – Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil);
- Polissorbato 80 (Tween 80<sup>®</sup>) – Delaware (Porto Alegre, RS, Brasil);
- Polivinilpirrolidona (PVP K-30) – Delaware (Porto Alegre, RS, Brasil);

- Sulfato de ferro II heptahidratado ( $\text{FeSO}_4$ ) – Neon (São Paulo, SP, Brasil)
- Tris – Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil).

#### 4.1.2 Equipamentos

- Agitador de alta velocidade – Marconi, modelo MA-102/Plus;
- Agitador magnético – Tecnal TE-0851;
- Balança analítica – Shimadzu AUY220;
- Centrífuga MTD III-Plus – Servilab;
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência – Shimadzu LC-20A (Kyoto, Japão), equipado com bomba modelo LC-20AT, detector UV/VIS SPD-M20A (arranjo de diodos – PDA) e sistema controlador com injeção automática;
- Espectrofotômetro UV-1800 – Shimadzu (Japão);
- Estufa de ar circulante – Armando Vilaro & Cia. Ltda.;
- Evaporador rotatório – Buchi Rotavapor R-3;
- Karl-Fischer – Metrohm-Tritino Plus 870;
- MasterSizer<sup>®</sup> 3000 E – Malvern Instruments;
- Microcentrífuga – Sigma 1-14;
- Microscópio de força atômica - Agilent Technologies 5500;
- Microscópio eletrônico de varredura (MEV), modelo Sigma 300 VP - Carl Zeiss, Inglaterra;
- Microscópio óptico – Olympus PM-PBK-3;
- Potenciômetro – Hanna Instruments, pH 21 pH/mV meter;
- Ultrassom – ALT Sonic Clean 3PA;
- Volúmetro de compactação – Pharma Test, modelo PT-TD;
- ZetaSizer<sup>®</sup> Nano series Nano-Zs – Malvern Instrument.

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Otimização da formulação

Inicialmente, foram preparadas diferentes suspensões de nanopartículas poliméricas a fim de se obter uma formulação otimizada, com adequada eficiência de encapsulamento, considerando a elevada solubilidade de PQQ em água.

#### 4.2.1.1 Preparação das suspensões de nanopartículas poliméricas

As suspensões foram preparadas pelo método de dupla emulsificação-evaporação de solvente descrito por Miladi e colaboradores (2015), com algumas modificações. Uma fase orgânica (FO), contendo polímero (Eudragit<sup>®</sup> RS 100 ou PCL), tensoativo de baixo EHL (Span<sup>®</sup> 80) e solvente orgânico parcialmente miscível em água (acetato de etila), foi submetida à agitação magnética, a 40°C, até completa dissolução dos componentes e, então, uma fase aquosa interna (FAI), constituída de água destilada e PQQ, foi vertida lentamente, com o auxílio de um funil, sobre a FO formando uma emulsão primária A/O, que foi levada ao agitador de alta velocidade a 7.500 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, uma fase aquosa externa (FAE), composta por água destilada e tensoativo de alto EHL (Tween<sup>®</sup> 80) foi vertida, do mesmo modo, sobre a emulsão primária, obtendo-se, assim, uma emulsão A/O/A, que também foi submetida ao mesmo agitador a 10.500 rpm por 10 minutos. Em seguida, a suspensão foi levada ao evaporador rotatório, para evaporação do solvente orgânico e ajuste final do volume para 25 mL; obtendo-se, assim, suspensões de nanopartículas (NP) contendo 0,5 ou 1,0 mg/mL de PQQ (Tabela 2).

Para fins comparativos, a formulação otimizada também foi preparada sem a substância ativa (NP.EUD; Tabela 2). Ainda com essa finalidade, o método de nanoprecipitação (FESSI et al., 1989) foi utilizado para preparar nanopartículas (nanoesferas) sem o ativo (NS.EUD; Tabela 2). Neste método, a fase orgânica, constituída de Eudragit<sup>®</sup> RS 100, Span<sup>®</sup> 80 e solvente orgânico miscível em água (acetona), foi mantida em agitação magnética, a 40°C, até dissolução de todos os componentes. Então, a FO foi vertida sobre uma fase aquosa, contendo Tween<sup>®</sup> 80 e água destilada. Essa dispersão foi mantida, sob agitação moderada, durante 10 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, levada ao rotavapor, para evaporação do solvente orgânico e ajuste do volume final (25 mL). Todas as formulações foram preparadas em triplicata.

Tabela 2 – Composição quali-quantitativa das suspensões nanoestruturadas contendo ou não PQQ

Formulação	Eudragit <sup>®</sup> RS 100 (%)* p/v	PCL (%)* p/v	Span <sup>®</sup> 80 (%)* p/v	Acetato de etila (mL)	Acetona (mL)	PQQ (%)* p/v	Água FAI (mL)	Tween <sup>®</sup> 80 (%)* p/v	Água FAE (mL)
NP.EUD.PQQ.0,5	0,5	-	0,77	45	-	0,05	5	0,77	100
NP.EUD.PQQ.1	0,5	-	0,77	45	-	0,1	5	0,77	100
NP.PCL.PQQ	-	0,5	0,77	45	-	0,05	5	0,77	100
NP.EUD	0,5	-	0,77	45	-	-	5	0,77	100
NS.EUD	0,5	-	0,77	-	50	-	-	0,77	100

\*Percentuais considerando o volume final (25 mL) de cada formulação, após a evaporação do solvente orgânico e de 76% da água empregada durante a preparação. Nanopartículas preparadas com Eudragit<sup>®</sup> RS100 contendo PQQ na concentração de 0,5 mg/mL (NP.EUD.PQQ.0,5) ou 1,0 mg/mL (NP.EUD.PQQ.1); Nanopartículas preparadas com PCL contendo PQQ a 0,5 mg/mL (NP.PCL.PQQ); Nanopartículas preparadas com Eudragit<sup>®</sup> RS100 sem PQQ (NP.EUD); Nanoesferas preparadas com Eudragit<sup>®</sup> RS100 sem PQQ (NS.EUD).

#### 4.2.1.2 Validação do método analítico por CLAE-UV para a determinação do teor de PQQ nos sistemas nanoestruturados

O método analítico desenvolvido para a quantificação de PQQ foi validado, utilizando cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE-UV) em fase reversa (cromatógrafo Shimadzu LC-20A, Kyoto, Japão, equipado com bomba modelo LC-20AT, detector UV/VIS SPD-M20A – arranjo de diodos – PDA e sistema controlador CBM-20A), de acordo com os parâmetros preconizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2017) e pela International Conference on Harmonisation (ICH, 2005): especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão. As condições cromatográficas validadas foram as seguintes: volume de injeção de 20 µL, coluna C<sub>18</sub> (Inertsil<sup>®</sup> ODS-3; 5 µm; 4,6 mm x 150 mm), pré-coluna C<sub>18</sub> (Phenomenex; 4,0 mm x 3,0 mm), metanol:água (85:15 v/v) contendo 0,1% de trietilamina e ácido acético glacial 10% (v/v) para ajuste do pH 7,0 como fase móvel, vazão de 1,0 mL/min e detecção em 275 nm.

A especificidade do método foi avaliada através da pureza do pico do ativo e os cromatogramas obtidos para as suspensões contendo PQQ foram comparados àqueles obtidos para as suspensões sem a presença do ativo.

Para a linearidade, foram preparadas três curvas analíticas (1,0 - 5,0 µg/mL), em três dias diferentes, a partir de três soluções-padrão de PQQ em fase móvel (0,25 mg/mL) e os dados foram avaliados através da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (n=3).

A precisão do método foi avaliada através da repetibilidade (intra-dia, n=6) e da precisão intermediária (entre-dias, n=12). Para isso, foram preparadas seis diluições em fase

móvel a partir de uma mesma suspensão de nanopartículas contendo PQQ, na concentração teórica de 3,0 µg/mL, sob as mesmas condições, no mesmo dia (intra-dia) e em dois dias consecutivos (entre-dias), por dois analistas diferentes. Para a extração de PQQ, 60 µL da suspensão foram adicionados em um balão volumétrico de 10 mL contendo fase móvel, sendo o mesmo levado ao ultrassom durante 30 minutos e, então, aferido o volume com fase móvel a fim de obter uma concentração teórica de 3,0 µg/mL. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante filtrado em membrana de nylon (0,45 µm) e analisado por CLAE-UV. Os resultados foram expressos em desvio padrão relativo (DPR%).

Quanto à exatidão do método, esta foi determinada através da recuperação de PQQ. Foram avaliados três níveis de concentração teóricos [baixo (2,4 µg/mL), médio (3,0 µg/mL) e alto (3,6 µg/mL)], sendo que o teste consistiu em adicionar 30 µL das suspensões de nanopartículas com PQQ e 36, 60 ou 84 µL da solução-padrão de PQQ (250 µg/mL) para cada nível, respectivamente, em balões volumétricos de 10 mL. As amostras (n=3) foram preparadas e analisadas conforme descrito no parágrafo anterior.

#### *4.2.1.3 Caracterização físico-química das formulações*

Cada lote (triplicata de formulação) foi analisado logo após a preparação, através da avaliação dos seguintes parâmetros: diâmetro médio de partículas, polidispersidade [índice de polidispersão (IPd) e span], potencial zeta, pH, teor de PQQ e eficiência de encapsulamento.

##### *4.2.1.3.1 Determinação do diâmetro médio de partículas, distribuição de tamanho e potencial zeta*

O diâmetro médio e o índice de polidispersão das partículas foram analisados por espectroscopia de correlação de fótons, após diluição (500 vezes) das amostras com água ultrapura, e o potencial zeta foi determinado por mobilidade eletroforética das partículas em suspensão após diluição (500 vezes) das amostras em solução aquosa de NaCl 10 mM, empregando o equipamento Zetasizer<sup>®</sup> Nano Series, a 25°C.

A distribuição de tamanho (span) e o diâmetro médio das partículas ( $D_{3;2}$ ;  $D_{4;3}$ ;  $D_{0,1}$ ;  $D_{0,5}$  e  $D_{0,9}$ ) também foram analisados através de difração a laser, pelo equipamento Mastersizer<sup>®</sup> 3000 E. As amostras foram diluídas em 250 mL de água destilada até atingirem

a obscuração padrão do equipamento e lidas utilizando o índice de refração do polímero [Eudragit® RS 100 (1,38) ou PCL (1,59)] (CONTRI et al., 2014; LOBATO et al., 2013).

#### 4.2.1.3.2 Determinação do pH

Os valores de pH das suspensões foram determinados, logo após a preparação, empregando potenciômetro (modelo pH 21; HANNA), previamente calibrado com solução tampão (pH 4,0 e 7,0), diretamente nas formulações.

#### 4.2.1.3.3 Determinação do teor e da eficiência de encapsulamento de PQQ nas suspensões de nanopartículas

A quantificação do princípio ativo (teor total) foi realizada empregando CLAE-UV em fase reversa, utilizando as condições cromatográficas, curva analítica e metodologia de extração de PQQ das suspensões descritas anteriormente no item 4.2.1.2.

A eficiência de encapsulamento (EE%) do ativo PQQ associado às nanopartículas foi determinada através da diferença entre o teor total presente na suspensão e a concentração de PQQ livre, de acordo com a equação 1, empregando-se o método de ultrafiltração-centrifugação. Para a obtenção do ultrafiltrado, no qual foi determinada a concentração de ativo livre via CLAE-UV, foram pipetados 300 µL das suspensões para o dispositivo Amicon® e centrifugados por 10 minutos a 3.615 xg.

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

#### 4.2.2 Microscopia de força atômica (MFA)

Uma análise morfológica da suspensão nanoestruturada otimizada (NP.EUD.PQQ.0,5) foi realizada empregando microscopia de força atômica. A suspensão foi diluída em água ultra-pura (1:100) e gotejada sobre a superfície de mica recém clivada (substrato). As imagens foram obtidas empregando sondas de alta resolução SSS-NCL (Nanosensors; força constante = 48 N/m, frequência da ressonância = 154 kHz), à temperatura ambiente, no modo não-contato, sendo capturadas e analisadas utilizando software PicoView 1.14.4 (Molecular Imaging Corporation) e PicoImage 5.1.

### 4.2.3 Estudo da cinética de liberação de PQQ a partir da suspensão nanoestruturada

O perfil de liberação, *in vitro*, de PQQ, a partir da suspensão de escolha (NP.EUD.PQQ.0,5), foi obtido pela técnica de diálise reversa (ZHUANG et al., 2010), utilizando sacos de diálise e tampão fosfato pH 6,8 como meio de liberação, simulando o local de absorção do ativo quando administrado por via oral (intestino). Uma solução de PQQ em água (PQQ.LIVRE; 0,5 mg/mL) também foi avaliada para fins comparativos, além de uma suspensão de nanopartículas sem PQQ (NP.EUD) para verificar a especificidade do método. O experimento foi realizado em triplicata de lote (n=3) e consistiu em adicionar 10 mL (equivalente à concentração teórica de 5 mg de PQQ) de amostra (suspensões com ou sem ativo e solução de PQQ) em um béquer contendo 240 mL de meio de liberação, sob agitação magnética constante (50 rpm) e temperatura de 37°C; sendo que antes de adicionar os 10 mL de amostra, foi inserido um saco de diálise (13 cm) contendo 2 mL de meio de liberação. Em intervalos de tempo pré-determinados, alíquotas de 1,0 mL foram retiradas de dentro do saco de diálise e o mesmo volume de meio fresco, a 37°C, foi repostado imediatamente. As coletas foram realizadas durante o período de 12 horas.

A porcentagem de substância ativa liberada foi analisada diretamente nas alíquotas coletadas, empregando espectrofotômetro. Para isso, foi utilizado o comprimento de onda de 250 nm (máxima absorção de PQQ) e preparada uma curva analítica constituída por sete pontos (concentrações de 0,5 a 24,5 µg/mL), a partir de uma solução-padrão de PQQ (0,5 mg/mL), usando meio de liberação como diluente. Cabe salientar que a linearidade da curva (triplicata) foi verificada através de regressão linear e a especificidade do método através da análise de amostras obtidas a partir da suspensão de nanopartículas preparada sem a presença de PQQ, que foram submetidas ao mesmo processo de diálise reversa.

Os perfis de liberação *in vitro* de PQQ obtidos foram analisados através de modelagem matemática (Scientist 2.0 software - MicroMath®, USA), utilizando a abordagem modelo-dependente (ordem zero, monoexponencial, biexponencial) e Lei da Potência/Korsmeyer-Peppas (Equação 2) para avaliar o mecanismo de liberação do ativo. O modelo mais adequado (monoexponencial; Equação 3) foi escolhido baseando-se no maior coeficiente de correlação (r), maior critério de seleção do modelo (MSC) e melhor ajuste gráfico. A meia-vida de liberação de PQQ foi calculada utilizando a equação 4.

$$f_t = a \cdot t^n \quad (\text{equação 2})$$

$$C = C_0 \cdot e^{-k \cdot t} \quad (\text{equação 3})$$

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k} \quad (\text{equação 4})$$

Onde, “ $f_t$ ” é a fração de substância ativa liberada no tempo “ $t$ ” (horas), “ $a$ ” é a constante que incorpora características estruturais e geométricas do sistema de liberação, “ $n$ ” é o expoente que indica o mecanismo de liberação do ativo, “ $C$ ” é a concentração no tempo “ $t$ ”, “ $C_0$ ” é a concentração inicial do ativo, “ $k$ ” é a constante de velocidade de liberação e “ $t_{1/2}$ ” é o tempo para liberar 50% do princípio ativo em estudo.

#### 4.2.4 Avaliação, *in vitro*, da atividade antioxidante contra a lipoperoxidação

O experimento de peroxidação lipídica foi realizado utilizando lipossomas como substrato, sendo esta determinada pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, BIRD; DRAPER, 1984), empregando um protocolo adaptado (KÜLKAMP et al., 2011; POHLMANN et al., 2010; SCHAFFAZICK et al., 2005). Neste teste, a atividade antioxidante do ativo PQQ nanoencapsulado (suspensão otimizada) foi comparada com aquela de PQQ livre (solução) e da suspensão de nanopartículas sem PQQ.

##### 4.2.4.1 Preparação dos lipossomas

Os lipossomas foram preparados pelo método de hidratação de um filme lipídico, com base em Kulkamp e colaboradores (2011), com algumas modificações. Para tanto, 1,25 g de lecitina de soja foi solubilizado em 100 mL de acetato de etila e, então, o solvente orgânico foi totalmente evaporado, em evaporador rotatório a 35°C, a fim de obter um filme fino no balão, o qual foi ressuspensão, sob agitação, com 100 mL de água (12,5 mg de lipídio/mL de suspensão) e levado ao agitador de alta velocidade a 12.000 rpm durante 10 minutos. O diâmetro médio das vesículas foi analisado por difração a laser empregando o equipamento Mastersizer® 3000 E.

#### 4.2.4.2 Ensaio da lipoperoxidação

A atividade antioxidante foi realizada empregando um meio de reação composto de substrato (3,35 mg/mL de lipossomas), 2,5 a 75,0  $\mu\text{M}$  de PQQ [solução de PQQ em água (PQQ.LIVRE) ou suspensão de nanopartículas contendo ou não PQQ (NP.EUD.PQQ.0,5 ou NP.EUD)], solução aquosa de ascorbato (500  $\mu\text{M}$ ) e de  $\text{FeSO}_4$  (250  $\mu\text{M}$ ), tampão Tris-HCl pH 7,4 (0,1 M) e água destilada (qsp 400  $\mu\text{L}$ ), que foi incubado a 37°C durante 60 minutos. Após esse período de incubação, ácido tricloroacético a 12% e ácido tiobarbitúrico a 0,73% foram adicionados ao meio de reação e mantidos a 100°C durante 30 minutos. Posteriormente, foram resfriados à temperatura ambiente e centrifugados (10.000 xg) por 5 minutos, sendo o sobrenadante analisado em 535 nm, empregando espectrofotômetro. Os controles do experimento foram compostos pelo meio de reação sem adição da formulação (controle positivo) e sem adição da formulação e do par oxidante (controle negativo). As análises foram conduzidas em triplicata e uma curva analítica ( $y = 0,2472x + 0,0202$ ;  $r = 0,9999$ ) de malondialdeído (MDA), com concentrações entre 0,75 e 6,00 nmol de MDA, foi utilizada para calcular a concentração de MDA (nmol) nas amostras avaliadas.

A proteção contra a peroxidação lipídica foi calculada a partir da equação 5, de acordo com Kùlkamp e colaboradores (2011), sendo expressa como atividade antioxidante (AA%).

$$AA\% = 1 - \left( \frac{C_{\text{amostra}}}{C_{\text{controle}}} \right) \times 100 \quad (\text{equação 5})$$

Onde,  $C_{\text{amostra}}$  é a concentração de MDA, em nmol, presente em cada amostra analisada (formulações) e  $C_{\text{controle}}$  é a concentração de MDA, em nmol, na ausência da substância antioxidante (controle positivo).

#### 4.2.5 Análise de teor da suspensão nanoestruturada e da solução de PQQ após armazenamento em frascos transparentes

A suspensão de nanopartículas (NP.EUD.PQQ.0,5) e solução de PQQ livre (triplicata) foram armazenadas em frascos de vidro transparente, durante 15 dias, à temperatura ambiente e sem proteção contra a luz. Amostras foram coletadas nos tempos 0 e 15 dias para análise do teor de PQQ.

## 4.2.6 Estudo de estabilidade da suspensão coloidal

A suspensão NP.EUD.PQQ.0,5 (triplicata) foi armazenada em frasco de vidro âmbar, durante 30 dias, à temperatura ambiente e protegida da luz; sendo coletadas amostras após o período de tempo de 0, 15 e 30 dias, que foram submetidas às análises de pH, diâmetro médio das partículas, polidispersidade, potencial zeta, teor de PQQ e EE%.

## 4.2.7 Granulados

### 4.2.7.1 Preparação dos granulados a partir da suspensão nanoestruturada

Com base em um estudo desenvolvido em nosso grupo de pesquisa (PINHEIRO, 2016), a técnica de granulação via úmida foi utilizada para a preparação dos granulados contendo o ativo PQQ nanoencapsulado (GR.NP.PQQ). Celulose microcristalina 102 (CMC 102; 11,51 g), croscarmelose sódica (0,6125 g) e polivinilpirrolidona (PVP K-30; 1,4 g) foram misturadas, por espatulação, durante 10 minutos e, então, a mistura de pós resultante (13,5225 g) foi adicionada, com auxílio de um tamis, a 35 mL da suspensão de nanopartículas contendo PQQ (NP.EUD.PQQ.0,5; equivalente a 17,5 mg do ativo) e homogeneizadas por mais 10 minutos. Para atingir o ponto de granulação, essa mistura final foi mantida a 40°C, em estufa de ar circulante, durante 6 horas e 30 minutos. Em seguida, a massa úmida formada foi forçada manualmente a passar por um tamis (ABNT 16), originando os granulados, os quais foram levados à estufa de ar circulante, a 40°C, durante 4 horas para a etapa de secagem final. Os granulados foram preparados em triplicata de lote. Granulados com PQQ livre (35 mL de solução de PQQ 0,5 mg/mL em água; GR.PQQ) ou com nanopartículas sem PQQ (GR.NP) também foram preparados para fins comparativos. A tabela 3 mostra a composição quali-quantitativa dos granulados desenvolvidos.

Tabela 3 – Composição quali-quantitativa dos granulados contendo ou não o ativo PQQ nanoencapsulado

Formulação	Suspensão de NP contendo PQQ (0,5 mg/mL) (%) p/p*	Suspensão de NP sem PQQ (%) p/p*	Solução aquosa de PQQ (0,5 mg/ml) (%) p/p*	CMC 102 (%) p/p	Croscarmelose sódica (%) p/p	PVP K-30 (%) p/p
GR.NP.PQQ	5,13	-	-	80,75	4,30	9,82
GR.NP	-	5,02	-	80,85	4,30	9,83
GR.PQQ	-	-	0,13	85,01	4,52	10,34

\*Peso dos componentes desconsiderando a água

#### 4.2.7.2 Caracterização tecnológica e físico-química dos granulados

Cada lote de granulado foi analisado logo após a preparação, através dos seguintes parâmetros: ângulo de repouso (AR), densidade bruta (db), densidade de compactação (dc), índice de Carr (IC), fator de Hausner (FH), umidade, morfologia, diâmetro médio de partículas, índice de polidispersão e teor de PQQ.

##### 4.2.7.2.1 Ângulo de repouso

A determinação do ângulo de repouso se deu através do escoamento de 10 g de granulado sobre um cilindro com 2 cm de raio (r). A altura (h) do cone formado pelo granulado foi medida e utilizada para calcular o ângulo correspondente (Equação 6), utilizando a função inversa da tangente (arc tg) (AULTON, 2005; FRIEDRICH et al., 2010a; GUO; BEDDOW; VETTER, 1985; PRISTA, 2011).

$$\operatorname{tg}\alpha = \frac{h}{r} \quad (\text{equação 6})$$

##### 4.2.7.2.2 Densidade bruta, densidade de compactação, índice de Carr e fator de Hausner

As densidades bruta e de compactação foram calculadas de acordo com a equação 7. Para a densidade bruta (db), foi medido o volume (v) ocupado por 10 g (m) de granulado em uma proveta graduada. Já, para a densidade de compactação (dc) foi utilizado um volúmetro de compactação, no qual o produto (10 g) foi submetido a quedas sucessivas de 1.250 vezes até que a variação entre duas leituras consecutivas fosse menor que 1 mL. A partir destas densidades (db e dc), o índice de Carr (IC) e o fator de Hausner (FH) foram determinados (Equações 8 e 9, respectivamente) (AULTON, 2005; FRIEDRICH et al., 2010a; GUO; BEDDOW; VETTER, 1985; PRISTA, 2011).

$$d = \frac{m}{v} \quad (\text{equação 7})$$

$$\text{IC} = \left( \frac{dc - db}{dc} \right) \quad (\text{equação 8})$$

$$FH = \frac{dc}{db} \quad (\text{equação 9})$$

#### 4.2.7.2.3 Teor de umidade dos granulados

Análise por Karl-Fischer foi empregada para determinar o teor de umidade de cada lote dos granulados, produzidos a partir de suspensões de nanopartículas contendo PQQ. Para isso, foi adicionado, no equipamento, 0,1 g de granulado e realizada a titulação com iodo e reagente de Karl-Fischer.

#### 4.2.7.2.4 Análise morfológica dos granulados por microscopia óptica e eletrônica

A morfologia dos granulados foi analisada utilizando aumento de 40 vezes em microscópio óptico, após os mesmos serem distribuídos em uma lâmina e, então, a imagem foi fotografada, através da objetiva, com auxílio de uma câmera digital.

Para as análises, empregou-se também um microscópio eletrônico de varredura (MEV) modelo Sigma 300 VP (Carl Zeiss, Inglaterra), dotado de filamento de emissão por campo (Schotky, filamento de tungstênio recoberto com óxido de zircônio), equipado com coluna Gemini (Zeiss, Inglaterra). Amostras de granulado contendo PQQ foram recobertas com carbono, empregando um metalizador (modelo Q 150R-ES Medium Quorum Technologies, Inglaterra) e fio de carbono (Nisshin EM CO LTD), para as análises realizadas em alto vácuo. Os detectores de elétrons secundários (SE) e InLens, no modo de alto vácuo, foram utilizados para a obtenção das imagens.

#### 4.2.7.2.5 Análise do diâmetro médio e índice de polidispersão

O diâmetro médio dos granulados e o IPd foram analisados empregando o equipamento Zetasizer<sup>®</sup> Nano Series, a 25°C, por espectroscopia de correlação de fótons. Uma amostra de 500 mg de granulado foi adicionada a 10 mL de água ultrapura e levada ao ultrassom durante 15 minutos e, então, uma alíquota de 20 µL foi coletada e diluída em 10 mL de água ultrapura, filtrada em membrana de nylon (0,45 µm) e analisada (FRIEDRICH et al., 2010a).

#### 4.2.7.2.6 Determinação do teor de PQQ nos granulados preparados

O teor total de PQQ foi determinado empregando CLAE-UV em fase reversa, utilizando as mesmas condições cromatográficas descritas no item 4.2.1.2. Para a extração de PQQ, 250 mg de granulado foram adicionados em balão volumétrico de 50 mL contendo fase móvel (metanol:água – 85:15 – pH 7,0) e ultrassonicado durante 50 minutos. Em seguida, foi aferido o volume do balão com fase móvel (6,14 µg/mL de ativo) e centrifugado por 20 minutos a 3.000 rpm. Uma alíquota do sobrenadante foi diluída em balão volumétrico de 10 mL contendo fase móvel e submetida ao ultrassom durante 20 minutos, após, completou-se o volume do balão com fase móvel, gerando uma concentração teórica de PQQ de 3,0 µg/mL (ponto médio da curva analítica); a amostra foi filtrada em membrana de nylon (0,45 µm) e injetada no cromatógrafo Shimadzu LC-20A. A curva analítica (1,0 a 5,0 µg/mL) foi preparada a partir de uma solução-padrão de PQQ em fase móvel (0,25 mg/mL), conforme descrito no item 4.2.1.2.

Cabe mencionar que a linearidade e especificidade do método foram avaliadas através da regressão linear a partir de três curvas analíticas e da pureza de pico do ativo PQQ, respectivamente.

#### 4.2.7.3 Estudo do perfil de liberação, *in vitro*, de PQQ a partir dos granulados

A cinética de liberação de PQQ a partir dos granulados, produzidos com a suspensão do ativo nanoencapsulado, também foi realizada pela técnica de diálise reversa (ZHUANG et al., 2010), utilizando sacos de diálise e tampão fosfato pH 6,8 como meio de liberação. Granulados com PQQ livre também foram avaliados para fins comparativos, além dos granulados preparados com a suspensão de nanopartículas sem o ativo. O experimento foi realizado utilizando como amostra a massa de granulados equivalente à concentração teórica de 5,0 mg de PQQ (cerca de 4,0 g de granulado) em um béquer contendo 250 mL de meio de liberação, sob as mesmas condições já descritas anteriormente (item 4.2.3).

A porcentagem de substância ativa liberada foi analisada diretamente nas alíquotas coletadas, empregando espectrofotômetro de acordo com o item 4.2.3. É importante mencionar que a linearidade da curva (triplicata) foi verificada através de regressão linear e a especificidade do método através da análise de amostras obtidas a partir dos granulados preparados com a suspensão de nanopartículas sem PQQ que foram submetidos ao mesmo processo de diálise reversa.

Os perfis de liberação *in vitro* de PQQ obtidos foram analisados através de modelagem matemática (Scientist 2.0 software - MicroMath<sup>®</sup>, USA), utilizando a abordagem modelo-dependente (ordem zero, monoexponencial, biexponencial) e Lei da Potência/Korsmeyer-Peppas (Equação 4) para avaliar o mecanismo de liberação do ativo. O modelo mais adequado (monoexponencial; Equação 3) foi escolhido baseando-se no maior coeficiente de correlação (r), maior critério de seleção do modelo (MSC) e melhor ajuste gráfico. A meia-vida de liberação de PQQ foi calculada utilizando a equação 4.

#### *4.2.7.4 Estudo de estabilidade dos granulados contendo PQQ associada a nanopartículas*

Os granulados foram armazenados em sachês, contendo 5 mg de PQQ, durante 90 dias, à temperatura ambiente e protegidos da luz e da umidade. Amostras destes sachês, após o período de tempo de 0, 15, 30, 45, 60 e 90 dias, foram submetidas às análises de diâmetro médio das partículas, índice de polidispersão e teor de PQQ. O estudo foi conduzido em triplicata.

#### **4.2.8 Análise estatística**

A análise estatística dos dados foi realizada através da análise de variância (ANOVA), de uma ou duas vias, e teste *t* ou Tukey, utilizando o software GraphPad Prism<sup>®</sup>, sendo considerado como significativo  $p < 0,05$ .



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 DESENVOLVIMENTO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO PQQ

#### 5.1.1 Preparação das suspensões de nanopartículas poliméricas

A preparação das formulações de nanopartículas poliméricas, contendo PQQ, foi realizada empregando o método de dupla emulsificação-evaporação do solvente com base em Miladi e colaboradores (2015), com algumas adaptações. Este método tem sido bastante utilizado para o desenvolvimento de nanopartículas contendo substâncias ativas hidrofílicas por proporcionar maior eficiência de encapsulamento das mesmas, já que o ativo é solubilizado na fase aquosa interna da formulação (IQBAL et al., 2015).

Durante o estudo de pré-formulação, foram realizados diversos testes, como a preparação de outro sistema nanoestruturado (lipossomas), modificações na metodologia de preparação (diferentes tempos e velocidades de agitação no homogeneizador de alta velocidade) e alterações na composição das suspensões (tensoativos, volume dos solventes).

Inicialmente, as suspensões nanoestruturadas foram preparadas utilizando o polímero PCL ( $M_n$  10.000) com diferentes estabilizantes (álcool polivinílico, poloxâmer 407 ou Tween<sup>®</sup> 80) em duas concentrações (0,77 ou 1,0% p/v). Tween<sup>®</sup> 80 (0,77% p/v) foi escolhido como tensoativo de alto EHL para dar continuidade ao estudo, visto que as formulações preparadas com os demais estabilizantes precipitavam logo após a preparação. Posteriormente, foram definidos o volume de água (50 a 100 mL) a ser utilizado na fase aquosa externa, optando-se pelo maior volume testado (100 mL), e também o melhor tempo de agitação (5 a 15 minutos) e velocidade (6.000 a 12.000 rpm) a serem utilizados no homogeneizador de alta velocidade para a obtenção das emulsões A/O e, na sequência, A/O/A. O tempo de 10 minutos para ambas emulsões, velocidades de agitação de 7.500 rpm para a emulsão primária (A/O) e de 10.500 rpm para a emulsão A/O/A foram selecionados, considerando que não houve precipitação visível após a preparação e proporcionaram diâmetro de partículas e índice de polidispersidade mais adequados.

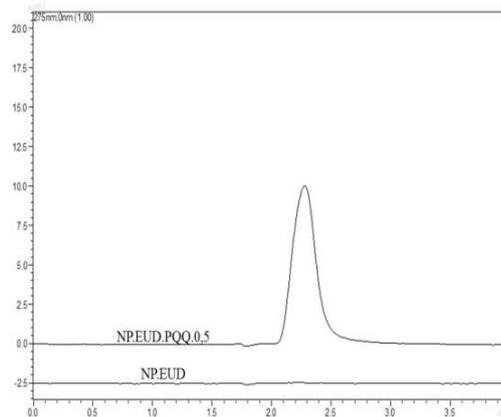
Por fim, com o intuito de aumentar a eficiência de encapsulamento e otimizar a formulação, foi proposta a utilização do polímero Eudragit<sup>®</sup> RS 100, além do PCL, originando, então, as suspensões de nanopartículas efetivamente empregadas neste estudo conforme descrito no item 4.2.1.1.

### 5.1.2 Validação do método analítico por CLAE-UV para a determinação do teor de PQQ nos sistemas nanoestruturados

O método desenvolvido para a quantificação de PQQ, presente nas formulações desenvolvidas neste trabalho, foi validado segundo os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão e exatidão (BRASIL, 2017; ICH, 2005). Para isso, foram utilizadas as suspensões NP.EUD.PQQ.0,5 e NP.EUD, considerando que a primeira foi a formulação que obteve os melhores resultados na caracterização físico-química (formulação otimizada) conforme será detalhado no decorrer deste estudo.

Quando um método é capaz de medir exatamente a substância de interesse, sem que ocorra a interferência de impurezas ou dos outros componentes da formulação, este é considerado específico (BRASIL, 2017). A partir da sobreposição dos cromatogramas referentes às suspensões contendo ou não PQQ (Figura 5), foi possível observar que o método utilizado é específico para a determinação de PQQ, visto que não houve interferência dos componentes da formulação no pico do ativo e que o índice de pureza deste pico, obtido através de um detector do tipo PDA, foi de 1,0000.

Figura 5 – Sobreposição dos cromatogramas das formulações contendo PQQ (NP.EUD.PQQ.0,5) e das formulações sem a substância ativa (NP.EUD)



Um método é considerado linear quando demonstra uma relação diretamente proporcional entre o sinal emitido pelo equipamento e a concentração de princípio ativo na amostra, empregando pelo menos cinco concentrações diferentes (BRASIL, 2017). As curvas analíticas (n=3) descritas pela equação  $y = 49.210x - 5.270$  apresentaram coeficiente de correlação (r) maior que 0,99 (0,9996) e regressão linear significativa (ANOVA,  $p < 0,05$ ),

demonstrando que o método proposto neste trabalho é linear na faixa de concentração analisada (1,0 – 5,0 µg/mL).

A precisão de um método é a avaliação da concordância entre os resultados de uma série de análises de uma mesma amostra e deve ser avaliada através da precisão intra-dia (repetibilidade) e da precisão entre-dias (precisão intermediária) (BRASIL, 2017). Os resultados destas análises estão descritos na tabela 4, confirmando que o método desenvolvido é preciso para o fim proposto, apresentando desvio padrão relativo inferior a 2%.

Tabela 4 – Análise de precisão

<b>Amostra</b>	<b>Concentração teórica (µg/mL)</b>	<b>Concentração experimental (µg/mL)</b>	<b>Teor (%)</b>	<b>DPR (%)</b>
<b>Dia 1 (n=6)</b>	3,00	2,83 ± 0,04	94,39 ± 1,43	1,51
<b>Dia 2 (n=6)</b>	3,00	2,76 ± 0,03	91,93 ± 1,02	1,11
<b>Entre-dias (n=12)</b>	3,00	2,79 ± 0,05	93,16 ± 1,75	1,88

Um método é considerado exato quando permite obter resultados próximos ao valor verdadeiro (BRASIL, 2017). Para verificar a exatidão do método desenvolvido, foram analisados três diferentes níveis de concentração de PQQ (baixo, médio e alto), sendo a recuperação média em torno de 98% (Tabela 5), indicando que o método é exato para o fim proposto.

Tabela 5 – Análise de exatidão

<b>Nível de concentração</b>	<b>Amostra conhecida (µg/mL)</b>	<b>Concentração adicionada (µg/mL)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
<b>Baixo</b>	1,50	0,90	97,58 ± 2,02
<b>Médio</b>	1,50	1,50	97,85 ± 1,00
<b>Alto</b>	1,50	2,10	98,27 ± 2,00

Portanto, a partir destes resultados, é possível concluir que o método analítico proposto é adequado para a quantificação de PQQ nas formulações nanoestruturadas desenvolvidas.

### 5.1.3 Caracterização físico-química das suspensões e seleção da formulação otimizada

Após a validação do método analítico e preparação, em triplicata de lote, das três diferentes formulações propostas (NP.EUD.PQQ.0,5, NP.EUD.PQQ.1 e NP.PCL.PQQ), utilizando dois diferentes polímeros (PCL e Eudragit<sup>®</sup> RS 100) e duas diferentes concentrações de PQQ com o polímero Eudragit<sup>®</sup> RS 100, as mesmas foram caracterizadas quanto aos aspectos macroscópico e físico-químicos.

Quanto à análise macroscópica (Figura 6), todos os sistemas desenvolvidos se apresentaram homogêneos, com coloração rosada, devido à presença de PQQ, aspecto leitoso e opalescência azulada, caracterizando o efeito *Tyndall*, como resultado da formação das nanopartículas (GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007).

Figura 6 – Aspecto macroscópico das suspensões de nanopartículas contendo PQQ, NP.EUD.PQQ.0,5, NP.EUD.PQQ.1 e NP.PCL.PQQ, respectivamente



A caracterização físico-química das suspensões coloidais desenvolvidas, realizada logo após a preparação das mesmas, envolveu avaliação do diâmetro médio de partículas, IPd, potencial zeta, pH, diâmetro médio de superfície ( $D_{3;2}$ ), diâmetro médio de volume ( $D_{4;3}$ ), diâmetros de volume cumulativos ( $D_{0,1}$ ;  $D_{0,5}$  e  $D_{0,9}$ ), span, teor de PQQ e eficiência de encapsulamento. Os resultados destes parâmetros estão apresentados na tabela 6; já, nas figuras 7, 8 e 9 podem ser visualizados os gráficos referentes à distribuição de tamanho de partículas obtida por espectroscopia de correlação de fótons, potencial zeta e distribuição de tamanho de partículas obtida através de difração a laser, respectivamente.

Tabela 6 – Características físico-químicas, logo após a preparação, das suspensões nanoestruturadas (n=3) contendo PQQ (0,5 ou 1,0 mg/mL)

PARÂMETRO	NP.EUD.PQQ.0,5	NP.EUD.PQQ.1	NP.PCL.PQQ
<b>Diâmetro médio (nm)</b>	384 ± 14	344 ± 35	231 ± 32
<b>IPd</b>	0,25 ± 0,02	0,30 ± 0,05	0,51 ± 0,05
<b>Potencial zeta (mV)</b>	-2,64 ± 0,38	-2,83 ± 0,30	-6,96 ± 0,17
<b>pH</b>	3,80 ± 0,02	3,74 ± 0,03	3,74 ± 0,01
<b>D<sub>3;2</sub> (nm)</b>	303 ± 5	313 ± 3	807 ± 18
<b>D<sub>4;3</sub> (nm)</b>	419 ± 12	465 ± 29	1157 ± 15
<b>D<sub>0,1</sub> (nm)</b>	165 ± 2	166 ± 1	496 ± 5
<b>D<sub>0,5</sub> (nm)</b>	355 ± 9	371 ± 4	833 ± 23
<b>D<sub>0,9</sub> (nm)</b>	768 ± 28	842 ± 17	1890 ± 131
<b>Span*</b>	1,70 ± 0,03	1,82 ± 0,02	1,67 ± 0,10
<b>Teor (%)</b>	94,48 ± 0,96	106,23 ± 3,56	104,11 ± 1,51
<b>EE (%)</b>	52,17 ± 0,40	33,27 ± 2,34	6,42 ± 2,96

\*Span =  $D_{0,9}-D_{0,1}/D_{0,5}$ , onde  $D_{0,9}$ ,  $D_{0,1}$  e  $D_{0,5}$  correspondem a 90%, 10% e 50% da distribuição cumulativa dos diâmetros, equivalentes a volume de esferas.

Figura 7 – Distribuição de tamanho de partículas das suspensões coloidais contendo PQQ (n=3), obtida através de espectroscopia de correlação de fótons

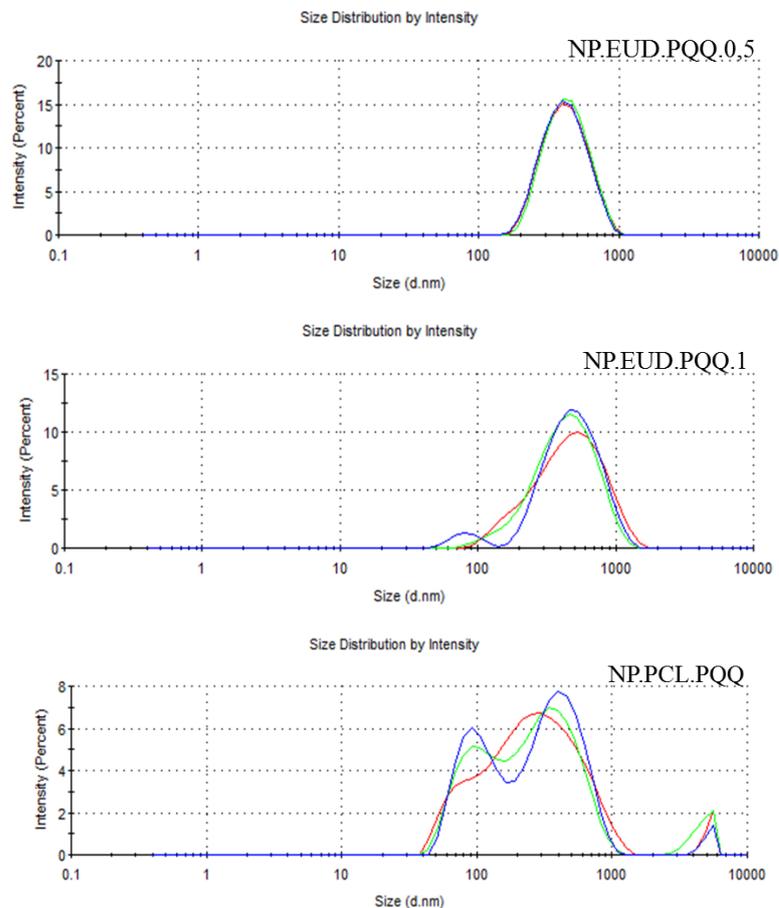


Figura 8 – Potencial zeta das suspensões de nanopartículas contendo PQQ (n=3)

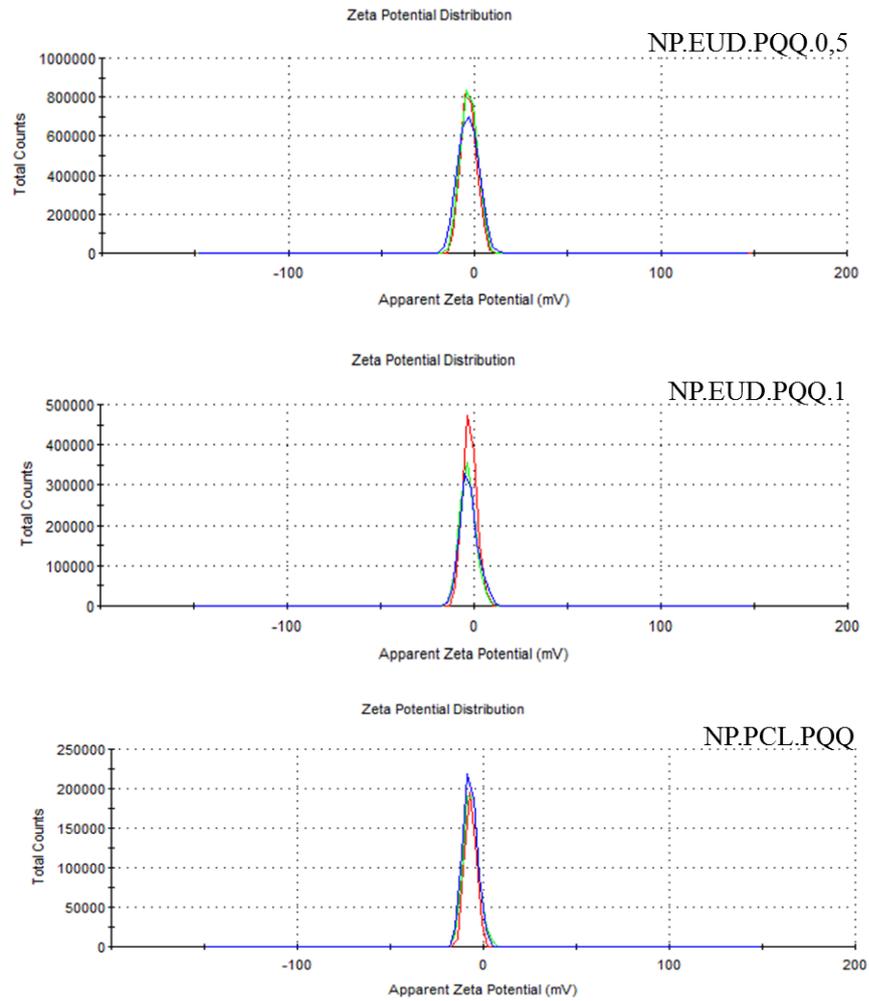
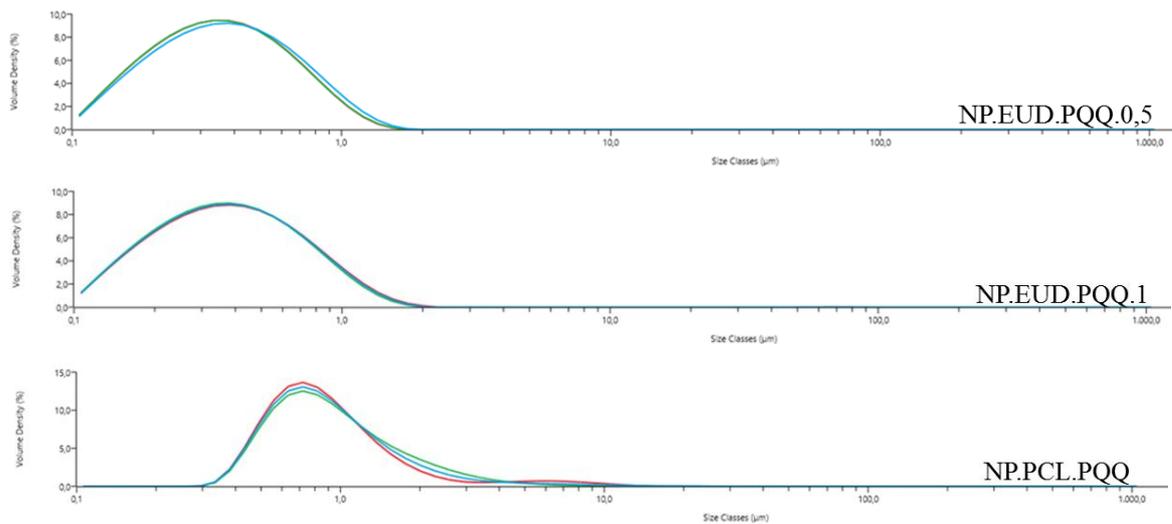


Figura 9 – Distribuição de tamanho de partículas das formulações contendo PQQ (n=3), obtida por difração a laser



No desenvolvimento de sistemas nanométricos, é de fundamental importância a análise do diâmetro médio das partículas e da polidispersidade, pois são características que podem ter grande impacto na capacidade de liberação e distribuição, *in vivo*, da substância ativa, toxicidade e também na estabilidade dos sistemas durante o armazenamento, considerando que quanto menor o diâmetro e mais homogêneo o sistema, maior será a área superficial (MOHANRAJ; CHEN, 2006). A análise destes parâmetros por difração a laser assegura uma ampla faixa de medição, possibilitando a detecção de partículas maiores que possam estar presentes nas formulações desenvolvidas, diferentemente da espectroscopia de correlação de fótons que não é capaz de detectar estas partículas, mas é muito eficaz em determinar diâmetros de partículas nanométricas, por isso uma técnica complementa a outra (KECK; MÜLLER, 2008).

Conforme demonstrado na tabela 6, quando analisadas por espectroscopia de correlação de fótons, as nanopartículas desenvolvidas com o polímero Eudragit<sup>®</sup> RS 100 apresentaram diâmetro médio na faixa de 344 a 384 nm, já as preparadas com o polímero PCL obtiveram um diâmetro inferior (cerca de 231 nm), o que condiz com a faixa de tamanho médio de 250 a 500 nm geralmente obtida para nanopartículas preparadas a partir de polímeros pré-formados e com tamanhos de nanopartículas poliméricas obtidos em outros estudos que também empregaram estes polímeros e o método de dupla emulsificação- evaporação de solvente (LOVEYMI et al., 2012; MILADI et al., 2015; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; RITU; MEENAKSHI, 2013; TSHWEU et al., 2013). Na análise através de difração a laser, as suspensões também apresentaram diâmetro médio (baseado em volume ou superfície) na faixa nanométrica, com exceção das nanoestruturas preparadas com PCL que apresentaram diâmetro médio de volume ( $D_{4,3}$  e  $D_{0,9}$ ) na ordem micrométrica.

A polidispersidade, representada neste trabalho pelo índice de polidispersão e span (Tabela 6), indica a homogeneidade de distribuição de tamanho das partículas pertencentes ao sistema desenvolvido, sendo que valores inferiores a 0,2 e 2,0, respectivamente, indicam, em geral, sistemas homogêneos e unimodais (GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; OURIQUE et al., 2014). Porém, o método de dupla emulsificação- evaporação de solvente tende a formar partículas maiores e menos uniformes, por isso o IPd muitas vezes é superior a 0,2 e, preferencialmente, inferior a 0,5, visto que índices superiores a este estão relacionados à ampla faixa de distribuição de tamanho (IQBAL et al. 2015, LOBATO et al., 2015, 2013; WU; ZHANG; WATANABE, 2011). As nanopartículas preparadas com Eudragit<sup>®</sup> RS 100 e 0,5 mg/mL de PQQ (NP.EUD.PQQ.0,5) apresentaram o menor IPd (0,25), condizente com o método de preparação utilizado neste estudo, corroborando com o

span obtido para esta formulação (1,70), indicando homogeneidade adequada do sistema. Outros estudos também observaram IPd maior que 0,2 ao empregar este método de preparação e outras substâncias ativas/polímeros (RITU; MEENAKSHI, 2013; TSHWEU et al., 2013; VARMA et al., 2015).

O potencial zeta reflete a carga superficial das partículas, sendo capaz de prever a estabilidade das suspensões desenvolvidas, uma vez que quanto maior ele for, em módulo, maior será a repulsão eletrostática entre as partículas e, conseqüentemente, menor a tendência destas em se aglomerar (COUVREUR et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003). Além disso, a estabilização estérica, devido à utilização de um tensoativo não-iônico na interface partículas/água, como polissorbato 80, também está relacionada com a estabilidade das suspensões (CORADINI et al., 2014; RIGO et al., 2015). A formulação desenvolvida utilizando o polímero PCL apresentou potencial zeta negativo (Tabela 6), o que está de acordo com a natureza deste polímero (poliéster), conforme já relatado em outros estudos (ROSA, 2017; SCHULTZE et al., 2014).

As suspensões preparadas empregando Eudragit® RS 100 também apresentaram potencial zeta negativo (Tabela 6), porém, este polímero possui natureza catiônica (CHAVES et al., 2017; JANA et al., 2014). A composição das partículas e sua dispersão no meio, o método de preparação, o pH do meio, a natureza do polímero e do agente estabilizante empregados são alguns fatores que podem influenciar no potencial zeta (GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; MOHANRAJ; CHEN, 2006; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SCHAFFAZICK et al., 2003). Nesse sentido, a fim de verificar o potencial zeta negativo apresentado pelas formulações preparadas com o polímero Eudragit® RS 100, considerando se tratar de um polímero com carga positiva devido à presença em sua estrutura química de grupamentos de amônio quaternário, foram preparadas suspensões sem o ativo e também utilizando outra metodologia de preparação, a nanoprecipitação, mantendo-se a mesma concentração final dos componentes das formulações com PQQ. Tanto as nanopartículas poliméricas sem PQQ (NP.EUD) preparadas pelo método de dupla emulsificação-*evaporação* do solvente quanto àquelas preparadas por nanoprecipitação (NS.EUD) obtiveram valores negativos para o potencial zeta,  $-4,33 \pm 0,28$  mV e  $-2,29 \pm 0,49$  mV, respectivamente. Diante disso, o valor negativo do mesmo, provavelmente, não está relacionado à presença da substância ativa, nem ao método de preparação, mas possivelmente ao método analítico empregado, o qual utiliza uma solução de NaCl para diluição das formulações. Dillen e colaboradores (2006) também desenvolveram suspensões de nanopartículas com o polímero Eudragit® RS 100 e RL 100, utilizando dupla emulsificação-

evaporação de solvente, e, ao avaliarem o potencial zeta, encontraram valores positivos ao diluir as suspensões com água e negativos ao utilizar uma solução eletrolítica como diluente, indicando que a diminuição do potencial de superfície provavelmente está relacionada à presença de sais no meio de diluição que podem neutralizar as cargas elétricas presentes na superfície das partículas. Ritu e Meenakishi (2013) também encontraram potencial zeta negativo ao desenvolver nanopartículas com Eudragit<sup>®</sup> RS 100 por este mesmo método, para encapsular cloridrato de tizanidina.

Outra análise importante é a do pH, visto que alterações significativas neste parâmetro podem indicar degradação de algum componente presente na formulação coloidal ou, até, difusão da substância ativa das nanopartículas para o meio dispersante, fornecendo informações relevantes a cerca da estabilidade dos sistemas nanoestruturados (GUTERRES et al., 1995; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SCHAFFAZICK et al., 2003). Neste estudo, as formulações desenvolvidas com o ativo apresentaram pH ácido (Tabela 6), com valores entre 3,74 e 3,80, sem diferença significativa entre as suspensões ( $p > 0,05$ ). Cabe mencionar que a suspensão nanoestruturada sem a presença de PQQ (NP.EUD) também demonstrou pH ácido ( $4,70 \pm 0,01$ ). Chaves e colaboradores (2017), ao desenvolverem nanocápsulas com os polímeros Eudragit<sup>®</sup> RS 100 e PCL, também obtiveram valores ácidos para o pH (5,8 a 6,8).

As formulações apresentaram teor total de PQQ adequado, de aproximadamente 95% para a formulação contendo a concentração teórica de 0,5 mg/mL de PQQ e o polímero Eudragit<sup>®</sup> RS 100 (NP.EUD.PQQ.0,5). Já, nas demais formulações, foi superior a 100% e com desvio padrão um pouco mais elevado (Tabela 6).

O encapsulamento de substâncias hidrofílicas é algo bastante desafiador, visto que a água é a fase dispersante da suspensão, o que, conseqüentemente, faz com que o ativo tenha uma tendência a permanecer nesta fase e/ou migrar/difundir rapidamente para a fase aquosa externa (HOFFART et al., 2002; IQBAL et al., 2015; RITU; MEENAKSHI, 2013). A eficiência de encapsulamento do ativo PQQ obtida ao empregar o polímero catiônico Eudragit<sup>®</sup> RS 100 (polimetacrilato) foi de aproximadamente 5 a 8 vezes maior em comparação ao poliéster PCL (Tabela 6), sendo, portanto, influenciada pela natureza química do polímero. Em 2002, Hoffart e colaboradores, também observaram EE% significativamente maior ao preparar nanopartículas contendo ativo hidrofílico aniônico (heparina de baixo peso molecular) com polímeros catiônicos (Eudragit<sup>®</sup> RS e RL) do que com poliésteres (PCL e PLGA), havendo influência na interação da substância ativa com o polímero.

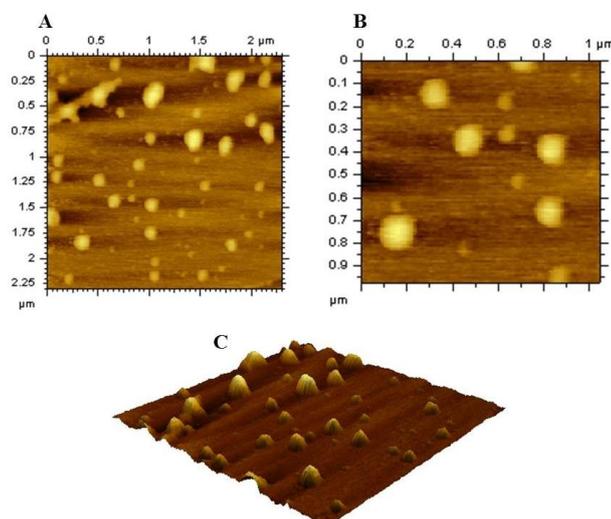
A partir destes resultados de caracterização físico-química, foi selecionada a suspensão nanoestruturada para dar continuidade ao estudo. Conforme pode ser observado na tabela 6, a suspensão de nanopartículas preparada com o polímero PCL não obteve homogeneidade adequada quando analisada empregando o equipamento Zetasizer<sup>®</sup>, nem valores adequados de diâmetro via Mastersizer<sup>®</sup>, com  $D_{4;3}$  e  $D_{0,9}$  na ordem micrométrica, além de eficiência de encapsulamento muito baixa. Por outro lado, a suspensão desenvolvida com o polímero Eudragit<sup>®</sup> RS 100 e 0,5 mg/mL de PQQ demonstrou resultados adequados nos parâmetros avaliados e eficiência de encapsulamento do ativo hidrofílico significativamente ( $p < 0,05$ ) mais elevada que as demais formulações, sendo, portanto, a formulação considerada otimizada (NC.EUD.PQQ.0,5).

## 5.2 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA DA FORMULAÇÃO OTIMIZADA

Diversos pesquisadores utilizam a técnica de microscopia de força atômica (MFA) para avaliar a morfologia da superfície de nanoestruturas, detalhando-a em nível atômico e fornecendo imagens tridimensionais em alta resolução, sendo uma das técnicas mais populares de microscopia de varredura por sonda (CHOW et al., 2015; DORDEVIC et al., 2015; GOTO; SIQUEIRA-MOURA; TEDESCO, 2017; KLAPETEK et al., 2011; LEITE et al., 2005; RONEY et al., 2005; SCHAFFAZICK et al., 2003).

A figura 10 mostra o resultado da análise por MFA da formulação otimizada, sendo que as nanopartículas obtidas apresentaram morfologia aproximadamente esférica, superfície lisa e diâmetro coloidal.

Figura 10 – Imagens bidimensionais (A e B) e tridimensional (C) obtidas por microscopia de força atômica da suspensão NP.EUD.PQQ.0,5



### 5.3 ESTUDO DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DE PQQ A PARTIR DA SUSPENSÃO NANOESTRUTURADA

A cinética de liberação, *in vitro*, de PQQ foi realizada pelo método de diálise reversa, sendo conduzida durante 12 horas, a 37°C e agitação constante, em meio tampão fosfato pH 6,8, conforme descrito anteriormente. Os perfis de liberação (Figura 11) foram obtidos a partir da suspensão nanoestruturada (NP.EUD.PQQ.0,5) em comparação a uma solução aquosa de PQQ (PQQ.LIVRE) na concentração teórica de 0,5 mg/mL. Cabe salientar que o método analítico empregado apresentou-se linear na faixa de concentração de 0,5 a 24,5 µg/mL (ANOVA,  $p < 0,05$ ), com coeficiente de correlação maior que 0,99 ( $r = 0,9995$ ), equação  $y = 0,05868x + 0,0064$  (obtida a partir de três curvas analíticas) e específico, visto que o meio de liberação, bem como a suspensão de nanopartículas sem o ativo, não interferiram na quantificação de PQQ.

De acordo com a figura 11, é possível notar que a suspensão de nanopartículas foi capaz de modificar a liberação do ativo hidrofílico, apresentando uma liberação de PQQ relativamente mais lenta quando comparada com a solução de PQQ livre. Após 12 horas de experimento, a suspensão otimizada liberou  $82,70 \pm 1,02\%$  da substância ativa, enquanto que a solução aquosa difundiu  $94,32 \pm 0,87\%$  do ativo ( $p < 0,05$ ). Diante disso é importante mencionar que, considerando a suspensão, mais de 40 % de PQQ não se encontra encapsulado e que um dos fatores que pode interferir na liberação de substâncias ativas, a partir de nanoestruturas, é a solubilidade do ativo, além de outros, como a concentração utilizada de polímero, método de preparação e condições do experimento, como o meio de liberação utilizado (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SINGH; LILLARD, 2009).

O modelo que melhor descreveu o comportamento de liberação de PQQ, a partir da modelagem matemática dos dados obtidos (Scientist 2.0 software - MicroMath®), foi o monoexponencial (Equação 3, página 42), demonstrando adequado coeficiente de correlação ( $r$ ), alto critério de seleção de modelo (MSC) e ajuste gráfico satisfatório (Tabela 7 e Figura 12). O modelo monoexponencial (cinética de primeira ordem) indica que a liberação foi dependente da concentração da substância ativa, ocorrendo em uma etapa, sem efeito *burst*. Apesar de uma fração do ativo estar livre e outra encapsulada, o perfil de liberação apresentou adequado ajuste a este modelo. A partir da constante de velocidade de liberação ( $k$ ) foi possível obter a meia-vida de liberação de PQQ (Tabela 7), sendo de 4,50 horas para a suspensão de nanopartículas e de 3,06 horas para a solução de PQQ livre, evidenciando que as nanoestruturas proporcionaram um aumento de aproximadamente 1,5 vezes na meia-vida de

liberação do ativo PQQ. Também é importante mencionar que em ambos os parâmetros,  $k$  e  $t_{1/2}$ , houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as formulações (NP.EUD.PQQ.0,5 e PQQ.LIVRE), evidenciando a capacidade das nanoestruturas poliméricas em promover controle de liberação do ativo hidrofílico, o qual está parcialmente encapsulado.

Figura 11 – Perfis de liberação, *in vitro*, de PQQ a partir da suspensão de nanopartículas em comparação à substância ativa livre. Resultados expressos em média e DP (n=3)

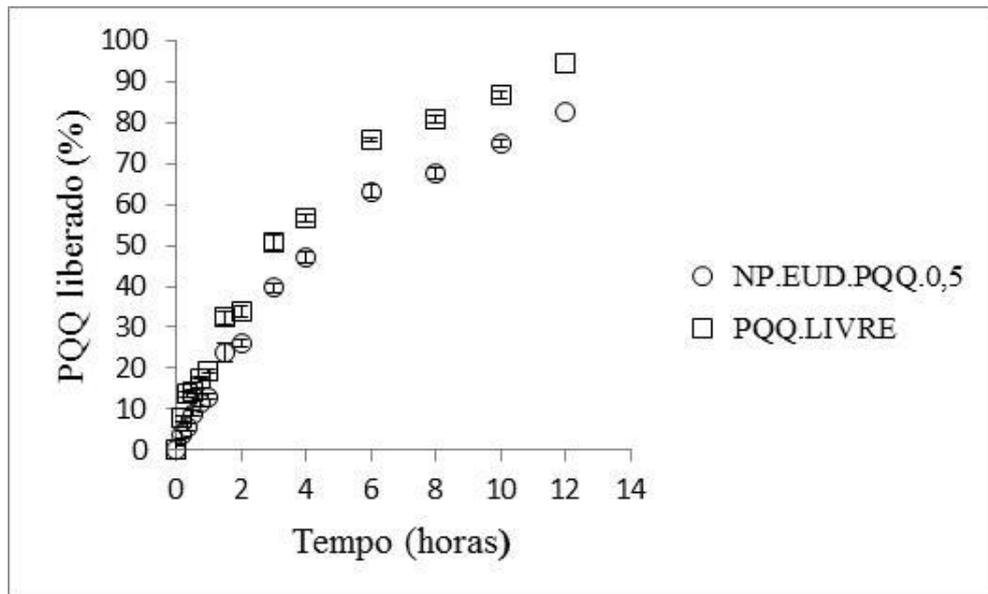
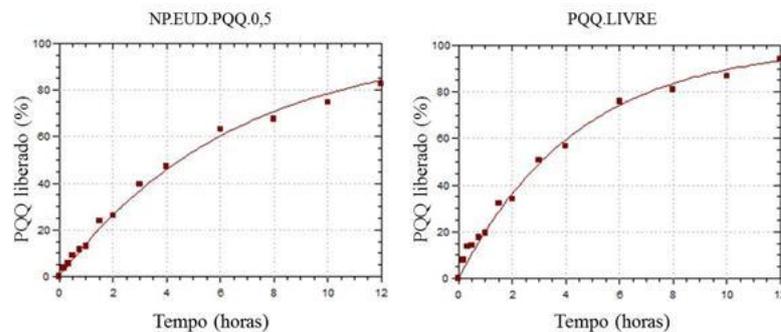


Tabela 7 – Parâmetros calculados a partir do modelo monoexponencial e Lei da Potência para a suspensão de nanopartículas e solução de PQQ (n=3)

	NP.EUD.PQQ.0,5	PQQ.LIVRE
<b>Monoexponencial</b>		
r	0,9975 ± 0,0009	0,9968 ± 0,0016
MSC	4,8562 ± 0,1864	4,3549 ± 0,2777
k (h <sup>-1</sup> )	0,1541 ± 0,0057	0,2263 ± 0,0019
t <sub>1/2</sub> (h)	4,5013 ± 0,1697	3,0620 ± 0,0260
<b>Lei da Potência</b>		
r	0,9918 ± 0,0009	—
a	0,2162 ± 0,0064	—
n	0,6354 ± 0,0105	—

Figura 12 – Ajuste gráfico do modelo monoexponencial para os dados de liberação de PQQ a partir da suspensão de nanopartículas e da solução de PQQ livre



O mecanismo de liberação de PQQ a partir das nanopartículas desenvolvidas (Tabela 7) foi avaliado empregando um modelo simples, que relaciona exponencialmente a liberação da substância ativa com o tempo, a Lei da Potência (Korsmeyer-Peppas). Este é um modelo muito utilizado para formas farmacêuticas poliméricas quando seu mecanismo de liberação não é conhecido, ou então, quando pode ocorrer mais de um tipo de mecanismo de liberação. O comportamento pode ser Fickiano (caso I) ou não Fickiano (transporte anômalo e caso II) de acordo com o expoente de liberação que caracteriza o mecanismo ( $n$ ); para sistemas de liberação esféricos o mecanismo de difusão Fickiana ocorre quando  $n = 0,43$ , para valores de  $n$  entre 0,43 e 0,85 o mecanismo de liberação do ativo é por transporte anômalo e para  $n \geq 0,85$  é transporte caso II (LOBO; COSTA, 2001; MANADAS; PINA; VEIGA, 2002; RITGER; PEPPAS, 1987).

Conforme pode ser observado na tabela 7, o modelo apresentou adequado ajuste aos dados experimentais ( $r > 0,99$ ) e o valor de  $n$  foi de 0,63, indicando que o mecanismo é do tipo transporte anômalo, apresentando comportamento não Fickiano, sendo a liberação de PQQ, a partir das nanopartículas, dependente do relaxamento das cadeias poliméricas e difusão da substância ativa para o meio. Esse tipo de mecanismo geralmente é observado quando a temperatura do sistema é inferior à temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) do polímero, como em sistemas compostos por polímeros vítreos, o que corrobora com o resultado encontrado neste trabalho, visto que a temperatura de 37°C empregada no experimento é inferior à  $T_g$  do polímero Eudragit® RS 100 ( $T_g$  de 65°C) utilizado neste estudo (AGNES; GONZÁLEZ-ORTEGA, 2003; GUPTA; KUMAR; SACHAN, 2015).

Ritu e Meenakshi (2013) avaliaram o mecanismo de liberação do fármaco solúvel em água, cloridrato de tizanidina, a partir de nanopartículas desenvolvidas empregando o método de dupla emulsificação- evaporação de solvente e os polímeros Eudragit® RS 100 e E 100

(proporção 7:2), com EE% de 56,6%. Neste estudo, também verificaram se tratar de transporte anômalo, não Fickiano, com liberação sustentada do fármaco. O mesmo foi observado por Miladi e colaboradores (2015), após a preparação de nanopartículas de PCL, por este mesmo método, contendo o fármaco alendronato de sódio, com EE% de 23 a 34%.

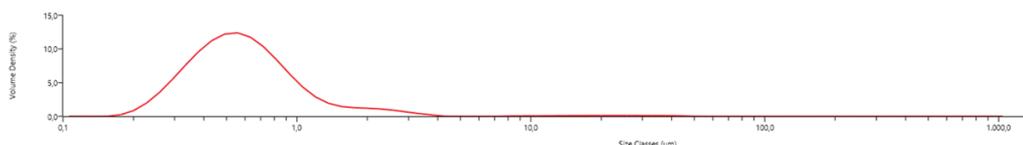
Em outro estudo, Dillen e colaboradores (2006) desenvolveram nanopartículas utilizando os polímeros PLGA [poli(ácido lático-co-ácido glicólico)], Eudragit® RS 100 e/ou Eudragit RL® 100 para veicular o fármaco cloridrato de ciprofloxacino. As nanopartículas poliméricas preparadas demonstraram EE% entre 60 e 70% e liberação prolongada da substância ativa, sem efeito *burst*.

#### 5.4 AVALIAÇÃO, *IN VITRO*, DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE CONTRA A LIPOPEROXIDAÇÃO

O TBARS é um método, *in vitro*, que tem como finalidade verificar a capacidade de um composto em reduzir a peroxidação lipídica de um substrato através da determinação da quantidade de malondialdeído (MDA) formado, que é o principal produto obtido na lipoperoxidação, o qual ao reagir, sob aquecimento e em meio ácido, com o ácido tiobarbitúrico forma um complexo de coloração rosada que possui absorvância ideal entre 532 e 535 nm (BIRD; DRAPER, 1984; KÜLKAMP et al., 2011; POHLMANN et al., 2010; SCHAFFAZICK et al., 2005). Neste experimento, lipossomas, preparados pelo método de hidratação de um filme lipídico, foram utilizados como substrato (modelo de membrana lipídica) para a peroxidação lipídica.

A figura 13 mostra a representação gráfica, obtida por difração a laser, da análise do tamanho de partículas dos lipossomas desenvolvidos empregando lecitina de soja. Os mesmos apresentaram homogeneidade adequada, com span de 1,572, e tamanho submicrométrico, com  $D_{3;2}$  de aproximadamente 500 nm e  $D_{4;3}$  cerca de 900 nm.

Figura 13 – Distribuição de tamanho de partículas dos lipossomas



No método utilizado neste trabalho, o  $Fe^{2+}$ , ao se oxidar a  $Fe^{3+}$ , reage com o ascorbato originando o radical livre ascorbil que, por sua vez, induz a peroxidação lipídica do substrato

utilizado levando à formação de MDA. A concentração de MDA formada neste processo (nmol de MDA/mL de meio de reação) foi calculada a partir da absorvância de cada amostra, empregando a equação da reta ( $y = 0,2472x + 0,0202$ ;  $r > 0,99$ ) obtida através da curva analítica preparada. Por sua vez, a atividade antioxidante (AA%) de PQQ foi determinada utilizando a concentração de MDA formada em cada amostra em relação ao controle positivo (amostra com oxidação máxima).

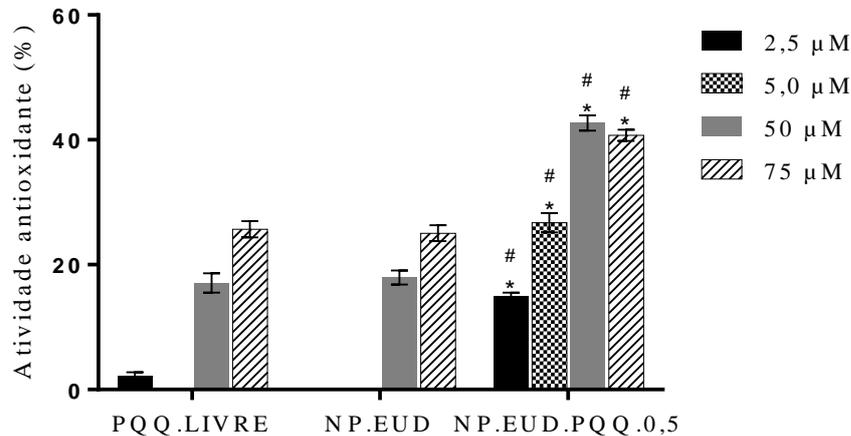
Neste estudo, foram empregados diferentes volumes das amostras (solução ou suspensão nanoestruturada) a fim de se obter diferentes concentrações de PQQ (2,5 a 75  $\mu\text{M}$ ) no meio reacional. A tabela 8 mostra a lipoperoxidação, induzida pelo radical ascorbil em lipossomas, expressa em nmol de MDA/mL de meio de reação. A concentração de MDA obtida para o controle positivo foi  $6,23 \pm 0,25$  nmol/mL e para a suspensão de nanopartículas contendo PQQ foi de  $3,57 \pm 0,08$  a  $5,30 \pm 0,04$  nmol/mL.

Tabela 8 – Concentrações de MDA resultantes da peroxidação lipídica, expressas em nmol de MDA/mL de meio de reação (n=3). \*Diferença significativa em relação ao controle positivo ( $p < 0,05$ )

<b>Amostra</b>	<b>Peroxidação lipídica (nmol MDA/mL)</b>
<b>PQQ.LIVRE 2,5 <math>\mu\text{M}</math></b>	$6,10 \pm 0,04$
<b>PQQ.LIVRE 5,0 <math>\mu\text{M}</math></b>	$6,53 \pm 0,07$
<b>PQQ.LIVRE 50 <math>\mu\text{M}</math></b>	$5,17 \pm 0,10^*$
<b>PQQ.LIVRE 75 <math>\mu\text{M}</math></b>	$4,63 \pm 0,08^*$
<b>NP.EUD 2,5 <math>\mu\text{M}</math></b>	$6,63 \pm 0,27$
<b>NP.EUD 5,0 <math>\mu\text{M}</math></b>	$6,90 \pm 0,11$
<b>NP.EUD 50 <math>\mu\text{M}</math></b>	$5,11 \pm 0,07^*$
<b>NP.EUD 75 <math>\mu\text{M}</math></b>	$4,67 \pm 0,08^*$
<b>NP.EUD.PQQ.0,5 2,5 <math>\mu\text{M}</math></b>	$5,30 \pm 0,04^*$
<b>NP.EUD.PQQ.0,5 5,0 <math>\mu\text{M}</math></b>	$4,57 \pm 0,10^*$
<b>NP.EUD.PQQ.0,5 50 <math>\mu\text{M}</math></b>	$3,57 \pm 0,08^*$
<b>NP.EUD.PQQ.0,5 75 <math>\mu\text{M}</math></b>	$3,69 \pm 0,06^*$

Na figura 14, é possível observar a atividade antioxidante apresentada pela solução de PQQ livre e pelas suspensões de nanopartículas poliméricas contendo ou não PQQ. Em todas as concentrações avaliadas neste estudo, a formulação nanoestruturada contendo PQQ demonstrou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na atividade antioxidante em relação à solução do ativo e à suspensão sem a presença de PQQ.

Figura 14 – Atividade antioxidante (AA%) das suspensões de nanopartículas contendo ou não PQQ (NP.EUD.PQQ.0,5 e NP.EUD, respectivamente) e da solução do ativo livre (PQQ.LIVRE). \*Diferença significativa entre a atividade do ativo PQQ livre (solução) e da suspensão nanoestruturada contendo PQQ. #Diferença significativa da atividade das nanopartículas contendo PQQ em relação à das nanopartículas sem PQQ



Para a solução de PQQ livre e para a suspensão de nanopartículas sem a presença de PQQ houve diferença significativa entre as concentrações maiores. Tanto para a solução de PQQ quanto para as nanopartículas sem o ativo, a maior atividade antioxidante foi demonstrada pela concentração correspondente a 75 µM, sendo de aproximadamente 25%. Já para as nanopartículas contendo PQQ, as concentrações de 50 e 75 µM apresentaram a maior AA% ( $42,71 \pm 1,22\%$  e  $40,71 \pm 0,89\%$ , respectivamente), não diferindo significativamente ( $p > 0,05$ ). Entre as concentrações de 2,5 a 50 µM houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Conforme observado neste trabalho, nanopartículas sem a presença da substância ativa podem apresentar atividade antioxidante, assim como já relatado em outros estudos que propõem que a mesma não depende apenas do ativo empregado, mas também das características físicas do sistema coloidal desenvolvido, bem como pela liberação mais prolongada do ativo (KUMAR et al., 2015; LINDNER et al., 2015; ROSA, 2017).

Bitencourt e colaboradores (2017) desenvolveram nanopartículas poliméricas contendo extrato aquoso de *Syzygium cumini*, utilizando o método de dupla emulsificação-evaporação de solvente, e verificaram que o nanoencapsulamento proporcionou aumento na atividade antioxidante do extrato sobre o estresse oxidativo em ratos diabéticos infectados por *Candida albicans*. Eftekhari e colaboradores (2017) prepararam nanopartículas contendo quercetina, pelo método de nanoprecipitação, e também observaram que a quercetina nanoencapsulada demonstrou maior atividade antioxidante do que na forma livre, sendo mais

eficiente em reduzir os níveis de MDA (TBARS) induzidos pela aflatoxina B1 em hepatócitos de ratos.

É importante salientar que estudos também já relataram a expressiva capacidade de PQQ, na forma livre, em reduzir a peroxidação lipídica (HAMAGISHI et al., 1990; HE et al., 2003; KUMAR; KAR, 2015; TAO et al., 2007; ZHU et al., 2004). Corroborando com estes resultados encontrados, He e colaboradores (2003), empregando o método de TBARS e soluções aquosas de PQQ em diferentes concentrações (2,5 a 50  $\mu\text{M}$ ), demonstraram que PQQ também diminuiu significativamente a peroxidação lipídica de maneira dose-dependente em mitocôndrias (substrato) expostas ao estresse oxidativo induzido pelo par oxidante ferro/ascorbato, sendo que na concentração de 50  $\mu\text{M}$  inibiu completamente a lipoperoxidação.

A potente atividade antioxidante de PQQ também foi demonstrada por Kumar e Kar, em 2015. Neste trabalho, foi induzida diabetes mellitus, por estreptozotocina, em camundongos, os quais foram tratados durante 15 dias com PQQ (5, 10 ou 20 mg/kg) ou vitamina C (50 mg/kg), via intraperitoneal. Considerando que a estreptozotocina leva à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, após o tratamento, um dos estudos realizados no fígado, rim e músculo dos animais foi quanto ao estresse oxidativo, através da avaliação dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) e de antioxidantes celulares como catalase, superóxido dismutase, glutatona, entre outros. PQQ, em todas as doses testadas, foi capaz de reduzir significativamente a lipoperoxidação tecidual e aumentar os níveis dos antioxidantes, sendo 20 mg/kg a dose mais efetiva. Também é importante mencionar que PQQ apresentou atividade antioxidante mais efetiva quando comparada à vitamina C.

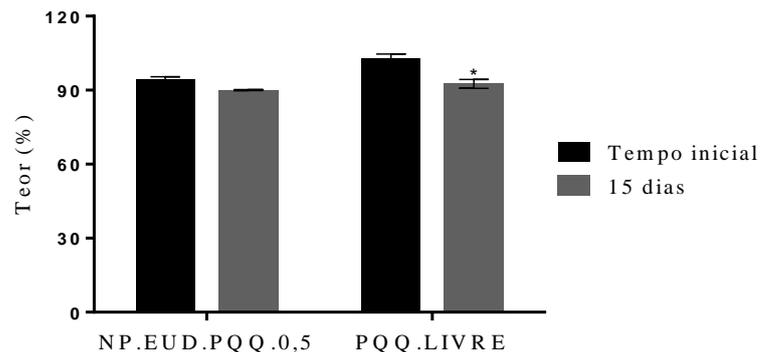
## 5.5 ANÁLISE PRELIMINAR DE TEOR DA SUSPENSÃO NANOESTRUTURADA E DA SOLUÇÃO DE PQQ APÓS ARMAZENAMENTO EM FRASCOS TRANSPARENTES

Uma das vantagens dos sistemas nanoestruturados como carreadores de ativos é a possibilidade de proteção do princípio ativo, como por exemplo, contra degradação (AMORIM et al., 2010; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SCHAFFAZICK et al., 2003; SINGH; LILLARD, 2009). A fim de verificar, de maneira preliminar, uma possível proteção proporcionada pelas nanopartículas em relação ao teor total de PQQ, a suspensão de nanopartículas otimizada e a solução de PQQ livre (0,5 mg/mL) foram armazenadas durante 15 dias, à temperatura ambiente, em frascos de vidro transparente, permitindo que as

formulações entrassem em contato com a claridade, visto que não foram protegidas contra a luz.

Conforme pode ser observado na figura 15, após 15 dias de armazenamento, o teor de PQQ da solução do ativo livre (PQQ.LIVRE) foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao tempo inicial, com uma queda de 10,47% no teor da substância ativa (de  $103,03 \pm 1,58\%$  para  $92,56 \pm 1,81\%$ ), o que não ocorreu com a suspensão nanoestruturada (NP.EUD.PQQ.0,5), a qual apresentou maior estabilidade com redução de 4,41% no teor ( $94,48 \pm 0,96\%$  para  $90,08 \pm 0,20\%$ ,  $p > 0,05$ ), indicando que o nanoencapsulamento parcial de PQQ foi capaz de conferir certa proteção química em função do tempo. O estudo não prosseguiu devido à precipitação do sistema, após 30 dias de armazenamento.

Figura 15 – Teor de PQQ na suspensão de nanopartículas e na solução de PQQ livre, armazenadas por 15 dias sem proteção contra a luz. \*Diferença significativa em relação ao tempo inicial ( $p < 0,05$ )



Amorim e colaboradores (2010) desenvolveram nanopartículas contendo o antioxidante lipofílico idebenona, empregando como polímero a quitosana ou a *N*-carboximetilquitosana, e avaliaram a estabilidade das nanopartículas em comparação à idebenona livre. Após 45 dias de armazenamento, a 40°C e 75% de umidade relativa, as nanoestruturas proporcionaram uma proteção 10 vezes maior à idebenona do que esta na forma livre, considerando o teor de idebenona residual.

Em outro estudo, Alishahi e colaboradores (2011) nanoencapsularam o antioxidante hidrofílico vitamina C, utilizando quitosana como polímero, e avaliaram sua vida útil. Para isso, vitamina C encapsulada ou não foi adicionada na alimentação de peixes e armazenada durante 20 dias à temperatura ambiente, sendo o teor do antioxidante analisado em intervalos de tempo pré-determinados. O nanoencapsulamento possibilitou aumento na estabilidade da

vitamina C, visto que o teor da mesma permaneceu em aproximadamente 90% após os 20 dias de armazenamento, enquanto que o teor da forma livre reduziu para cerca de 30%.

## 5.6 ESTUDO DE ESTABILIDADE DA SUSPENSÃO COLOIDAL OTIMIZADA

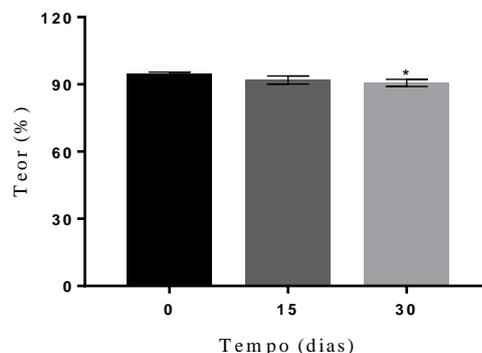
Um fator muito importante a ser avaliado é a estabilidade das suspensões coloidais, através da reanálise, após certo período de tempo, das características físico-químicas dos sistemas nanoestruturados, pois pode haver a ocorrência de aglomeração das partículas com consequente sedimentação, instabilidade do ativo, do polímero ou dos demais componentes da formulação (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SCHAFFAZICK et al., 2003; WU; ZHANG; WATANABE, 2011).

Nesse sentido, a suspensão NP.EUD.PQQ.0,5 foi armazenada durante 30 dias, à temperatura ambiente e protegida da luz para a reavaliação do aspecto macroscópico, tamanho médio de partículas, polidispersidade, potencial zeta, pH, teor de PQQ e eficiência de encapsulamento.

Quanto ao aspecto macroscópico, a suspensão manteve-se com coloração rosada, aspecto leitoso e opalescência azulada. A homogeneidade do sistema foi verificada durante 15 dias de armazenamento e, em 30 dias, ocorreu sedimentação das partículas, mas foi possível ressuspendê-las.

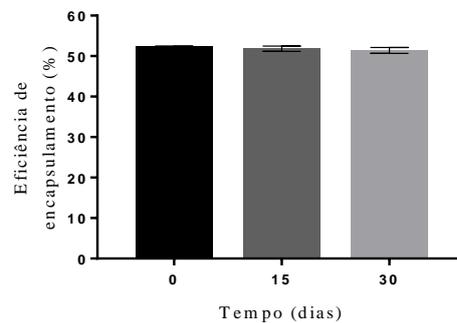
O teor de PQQ na formulação (Figura 16) não demonstrou redução significativa após 15 dias de armazenamento ( $p > 0,05$ ), o que aconteceu após 30 dias da preparação ( $p < 0,05$ ). Porém, manteve-se acima de 90%.

Figura 16 – Teor de PQQ na suspensão NP.EUD.PQQ.0,5 armazenada durante 30 dias. \*Diferença significativa em relação ao tempo inicial ( $p < 0,05$ )



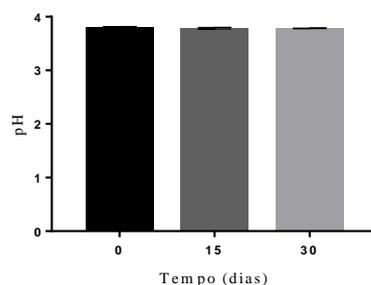
A eficiência de encapsulamento também foi um parâmetro avaliado durante a estabilidade, já que substâncias hidrofílicas tendem a difundir para a fase aquosa externa (HOFFART et al., 2002; IQBAL et al., 2015), fato que poderia alterar esse parâmetro. Para o ativo hidrofílico PQQ, após 30 dias de armazenamento, a EE% (Figura 17) demonstrou-se estável, sem alteração significativa ( $p>0,05$ ).

Figura 17 – Eficiência de encapsulamento de PQQ na suspensão nanoestruturada após 30 dias de armazenamento



Alterações nos valores de pH podem indicar degradação dos componentes da formulação, como, por exemplo, do polímero, sendo capaz de impactar diretamente na estabilidade da suspensão (COUVREUR et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003). O pH (Figura 18) da suspensão desenvolvida neste estudo, após 30 dias de armazenamento, permaneceu em torno de 3,78, mantendo-se estável, sem alteração significativa ( $p>0,05$ ).

Figura 18 – Valores de pH da suspensão de nanopartículas após 30 dias da preparação



Outro parâmetro relevante para as suspensões nanoestruturadas é o diâmetro médio de partículas, pois a agregação das mesmas acarreta em alterações neste parâmetro impactando no desempenho destes sistemas (GUTERRES et al., 1995). Tanto na análise por espectroscopia de correlação de fótons (Figura 19) quanto por difração a laser (Figura 20), ocorreu alteração significativa ( $p<0,05$ ) no diâmetro médio das partículas, com presença de

estruturas na ordem micrométrica, mesmo após 15 dias de armazenamento. Após 30 dias da preparação, os valores obtidos por difração a laser (Figura 20) foram:  $D_{3,2}$  de  $400 \pm 43$  nm,  $D_{4,3}$  de  $5 \pm 2$   $\mu\text{m}$ ;  $D_{0,1}$  de  $177 \pm 7$  nm;  $D_{0,5}$  de  $474 \pm 61$  nm e  $D_{0,9}$  de  $16 \pm 8$   $\mu\text{m}$ .

Figura 19 – Diâmetro médio da suspensão de nanopartículas, empregando espectroscopia de correlação de fótons, após 30 dias de armazenamento. \*Diferença significativa em relação ao tempo inicial ( $p < 0,05$ )

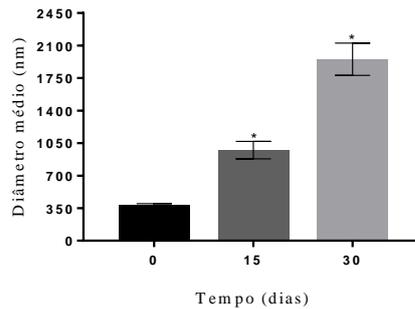
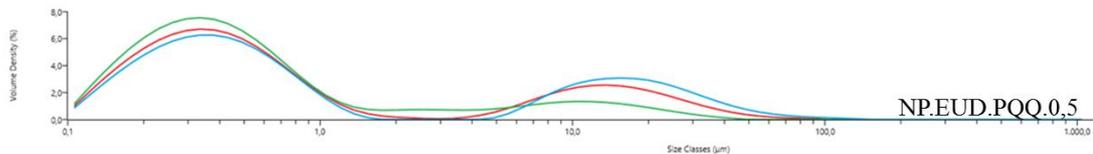


Figura 20 – Distribuição de tamanho da suspensão de nanopartículas, empregando difração a laser, após armazenamento de 30 dias



Quanto à polidispersidade do sistema, logo após 15 dias de armazenamento houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no IPd (Figura 21) e após 30 dias também foi observado span (Figura 22) significativamente maior ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao tempo inicial, indicando falta de homogeneidade no sistema, considerando, ainda, as populações micrométricas detectadas.

Figura 21 – Índice de polidispersão das suspensões nanoestruturadas, empregando espectroscopia de correlação de fótons, após 30 dias de armazenamento. \*Diferença significativa em relação ao tempo inicial ( $p < 0,05$ )

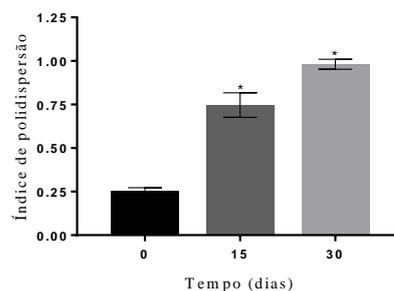
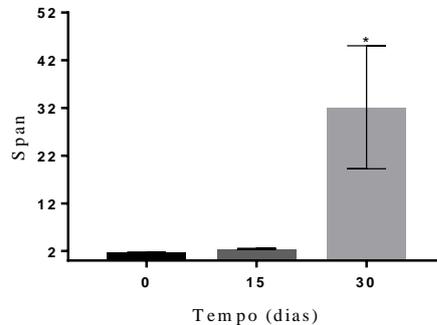
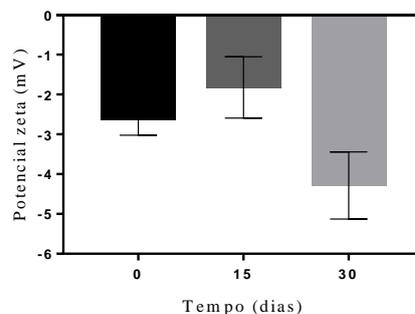


Figura 22 – Valores de span referentes às suspensões nanoestruturadas, empregando difração a laser, após armazenamento de 30 dias. \*Diferença significativa em relação ao tempo inicial ( $p < 0,05$ )



O potencial zeta também é um fator que necessita ser avaliado, pois pode ter relação direta com a estabilidade de formulações coloidais, uma vez que quanto menor, em módulo, pode favorecer a agregação das partículas (COUVREUR et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003). Conforme pode ser observado na figura 23, o potencial zeta tendeu à alteração, sobretudo após 30 dias, mas não de maneira significativa ( $p > 0,05$ ), apresentando elevada variação entre lotes.

Figura 23 – Potencial zeta das suspensões de nanopartículas armazenadas durante 30 dias



Com este estudo de estabilidade foi possível verificar que alguns parâmetros, como teor e eficiência de encapsulamento, permaneceram adequados mesmo após 30 dias de armazenamento. Porém, outros, como diâmetro médio e polidispersidade sofreram modificações significativas. Diante disso, com o intuito de contornar estes problemas e melhorar a estabilidade das nanopartículas poliméricas contendo PQQ, considerando que suspensões nanoestruturadas, por serem sistemas líquidos aquosos, tendem a uma estabilidade limitada em função do tempo de armazenamento e com isso baixa aplicabilidade industrial, formas farmacêuticas sólidas, como granulados, contendo nanoestruturas têm sido

desenvolvidas e recebido crescente interesse (FRIEDRICH et al., 2010a; PINHEIRO, 2016; SCHAFFAZICK et al., 2003).

## 5.7 GRANULADOS

### 5.7.1 Preparação e caracterização físico-química dos granulados desenvolvidos

Os granulados (GR.NP.PQQ) foram preparados, em triplicata, pelo método de granulação via úmida, empregando a suspensão otimizada de nanopartículas contendo 0,5 mg/mL de PQQ (NP.EUD.PQQ.0,5) e excipientes em concentrações preconizadas pelo Handbook of Pharmaceutical Excipients (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Conforme descrito anteriormente, PVP K-30 (aglutinante), CMC 102 (diluente) e croscarmelose sódica (desintegrante) foram utilizados como excipientes.

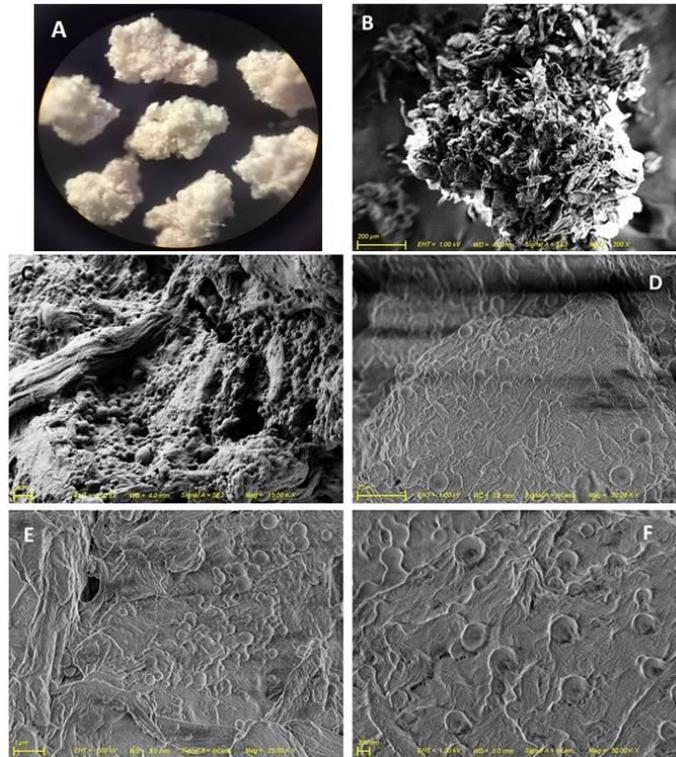
Assim como a suspensão nanoestruturada, os granulados apresentaram coloração rosada e o aspecto macroscópico dos mesmos, após secagem em estufa, pode ser observado na figura 24.

Figura 24 – Aspecto macroscópico dos granulados obtidos empregando a suspensão de nanopartículas contendo PQQ



Já na figura 25, é possível verificar a imagem dos granulados, obtida através de microscópio óptico (A) e eletrônico (B), indicando homogeneidade de tamanho e aglomeração das partículas pulveréas, respectivamente. Em aumentos maiores, através de MEV, é possível identificar a presença de estruturas nanométricas distribuídas nos grânulos, em conformidade com a suspensão de origem, utilizada como líquido de granulação.

Figura 25 – Morfologia dos granulados obtida através de microscópio óptico (A, aumento de 40 vezes) e eletrônico (B e C, detector SE2, 200x/barra 200  $\mu\text{m}$  e 15.000X/barra 1  $\mu\text{m}$ , respectivamente; D, E e F, detector InLens, 20.000x/barra 2  $\mu\text{m}$ , 25.000x/barra 1  $\mu\text{m}$  e 50.000x/barra 200 nm, respectivamente)



Como forma farmacêutica final, os granulados desenvolvidos foram acondicionados em sachês de alumínio (Figura 26), contendo o equivalente a 5,0 mg de PQQ.

Figura 26 – Sachês contendo granulados com o equivalente a 5,0 mg de PQQ



Após a preparação, a fim de verificar a capacidade de fluxo dos granulados contendo o ativo PQQ nanoencapsulado, foram analisados o ângulo de repouso (AR), densidade bruta,

densidade de compactação, índice de Carr (IC) e fator de Hausner (FH). Os granulados também foram caracterizados quanto ao teor de umidade, diâmetro médio de partículas e IPd após dispersão em água, e quanto ao teor de PQQ. Essas análises foram realizadas em triplicata de lote e os resultados obtidos estão descritos na tabela 9.

Tabela 9 – Características físico-químicas e tecnológicas dos granulados contendo o ativo PQQ associado às nanopartículas poliméricas

<b>Parâmetro</b>	<b>GR.NP.PQQ</b>
<b>Ângulo de repouso (°)</b>	27,79 ± 0,76
<b>Densidade bruta (g/mL)</b>	0,22 ± 0,01
<b>Densidade de compactação (g/mL)</b>	0,26 ± 0,01
<b>Índice de Carr (%)</b>	12,97 ± 2,10
<b>Fator de Hausner</b>	1,15 ± 0,03
<b>Umidade (%)</b>	5,95 ± 0,12
<b>Diâmetro médio de partículas (nm), após dispersão em água/filtração</b>	188,37 ± 6,40
<b>Índice de polidispersão</b>	0,448 ± 0,03
<b>Teor (%)</b>	98,21 ± 1,48
<b>Teor (mg/g de granulado)</b>	1,20 ± 0,04

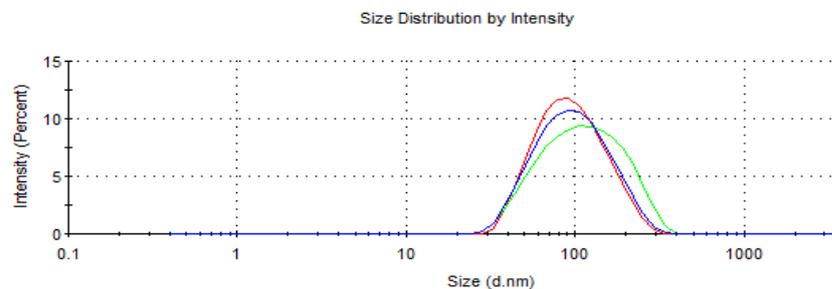
O ângulo de repouso, o índice de Carr e o fator de Hausner são parâmetros muito importantes a serem avaliados para estimar as propriedades de fluxo de granulados (AULTON, 2005; FRIEDRICH et al., 2010a,b), a fim de verificar a viabilidade da produção industrial dessa forma farmacêutica, considerando reprodutibilidade de enchimento, por exemplo, garantindo fluxo de alimentação regular/uniforme para acondicionamento em sachês. Os granulados desenvolvidos apresentaram propriedades de fluxo adequadas (Tabela 9), não sendo necessária a adição de substâncias promotoras de fluxo, como agentes deslizantes, tendo em vista que AR entre 20 e 30°, IC de 12 a 18% e FH menor que 1,25 são indicativos de bom fluxo (AULTON, 2005).

O teor de umidade pode influenciar nas características físico-químicas/tecnológicas e na estabilidade dos granulados, sendo de extrema importância a avaliação do mesmo. Os granulados demonstraram teor de umidade próximo a 6,0% (Tabela 9), superior ao preconizado na literatura (entre 1,0 a 3,0%); porém, não foi observada interferência negativa da umidade sobre os parâmetros tecnológicos da forma farmacêutica final. Outros trabalhos obtiveram granulados com umidade superior à encontrada neste estudo e, mesmo assim,

também conseguiram características tecnológicas adequadas (FRIEDRICH et al., 2010a; PINHEIRO, 2016).

O diâmetro médio de partículas (Tabela 9, Figura 27), obtido após dispersão dos granulados em água, seguida de filtração, permaneceu na faixa nanométrica, apresentando-se inferior ao da suspensão de origem, após processamentos da formulação e da amostra para a análise. O índice de polidispersão também foi aceitável, considerando a conversão para o estado sólido da formulação e possível interferência dos demais componentes da mesma.

Figura 27 – Distribuição de tamanho dos granulados contendo o ativo PQQ associado às nanopartículas (n=3), obtida através de espectroscopia de correlação de fótons

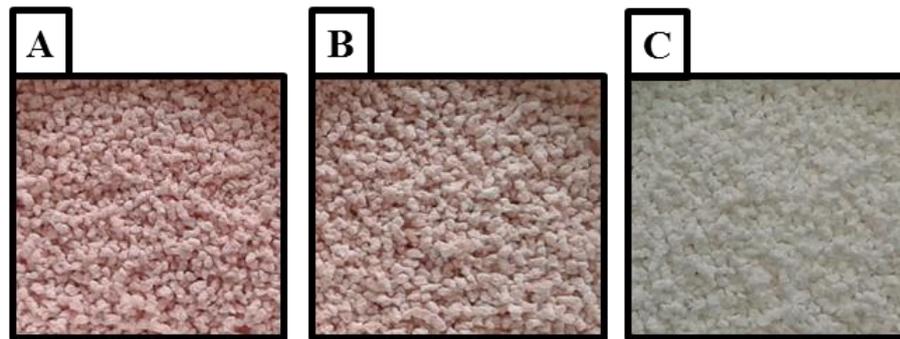


Os granulados apresentaram teor total de PQQ (Tabela 9) de aproximadamente 98%, semelhante ao encontrado para a suspensão de nanopartículas contendo PQQ, indicando que o método empregado para a preparação dos granulados foi adequado. Esse teor foi correspondente a  $1,20 \pm 0,04$  mg de PQQ/g de granulado. Cabe mencionar que o método analítico utilizado para a análise de teor apresentou-se linear na faixa de concentração de 1,0 a 5,0  $\mu\text{g/mL}$  (ANOVA,  $p < 0,05$ ), com coeficiente de correlação maior que 0,99 ( $r = 0,9993$ ), equação  $y = 40,871x - 1,357$  (obtida a partir de três curvas analíticas) e específico, visto que não houve interferência dos componentes da forma farmacêutica no pico de PQQ.

Em nosso grupo de pesquisa, Pinheiro (2016) desenvolveu granulados contendo vimpocentina nanoencapsulada. Os granulados apresentaram resultados semelhantes aos encontrados neste estudo, com teor de aproximadamente 92%, diâmetro médio de partículas cerca de 130 nm, IPd em torno de 0,30 e adequadas características de fluxo (AR de 30°; IC por volta de 16% e FH menor que 1,25). Friedrich e colaboradores (2010a) também desenvolveram granulados com nanocápsulas contendo dexametasona, os quais demonstraram teor de fármaco entre 84 e 94%, umidade de 7,83%, diâmetro de partículas de 188 nm, IPd igual a 0,25 e fluxo considerado razoável (IC de 24,34%; FH maior que 1,25 e AR maior que 35°).

Para fins comparativos, além dos granulados preparados a partir da suspensão de nanopartículas contendo PQQ, também foram produzidos granulados a partir de uma solução de PQQ livre e de uma suspensão nanoestruturada sem PQQ, conforme pode ser observado na figura 28.

Figura 28 – Aspecto macroscópico dos granulados contendo PQQ livre (A), ativo PQQ nanoencapsulado (B) e com nanopartículas sem a presença de PQQ (C)



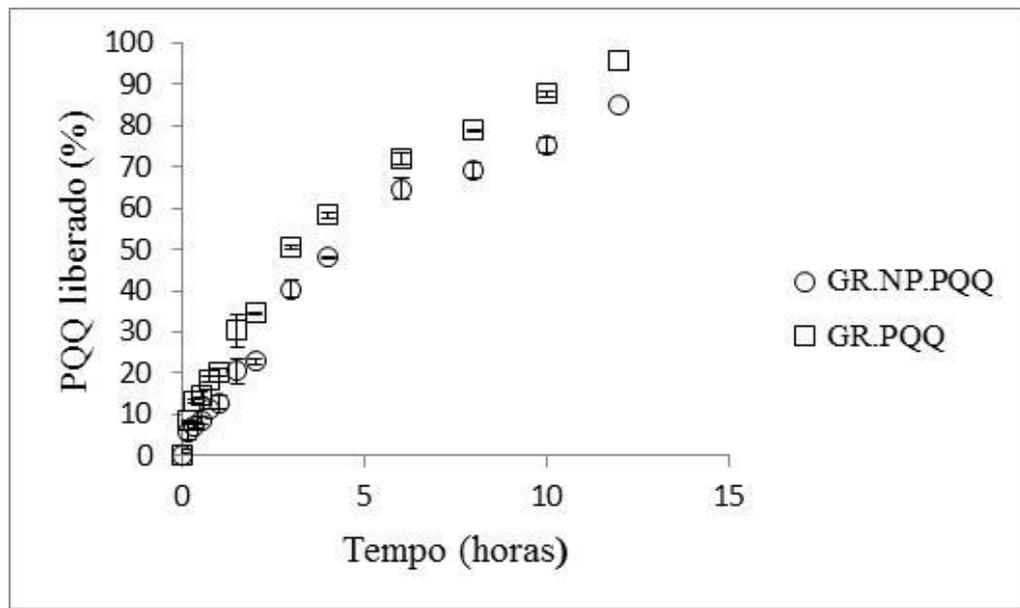
### 5.7.2 Estudo do perfil de liberação, *in vitro*, de PQQ a partir dos granulados

A cinética de liberação, *in vitro*, de PQQ a partir dos granulados também foi realizada, em triplicata, pelo método de diálise reversa, durante 12 horas, conforme descrito anteriormente. O método analítico empregado apresentou-se específico, visto que o meio de liberação, bem como os granulados preparados com a suspensão de nanopartículas sem o ativo (GR.NP), não interferiram na quantificação de PQQ, além de linear na faixa de concentração de 0,5 a 24,5  $\mu\text{g/mL}$  (ANOVA,  $p < 0,05$ ), com coeficiente de correlação maior que 0,99 ( $r = 0,9997$ ) e equação  $y = 0,05718x + 0,0155$  (obtida a partir de três curvas analíticas).

Na figura 29, é possível observar os perfis de liberação de PQQ a partir dos granulados contendo nanopartículas com PQQ (GR.NP.PQQ) em comparação aos granulados preparados com solução aquosa de PQQ (GR.PQQ), sendo utilizada a massa de granulado equivalente à concentração teórica de 5,0 mg de PQQ. Em 10 horas de experimento, GR.NP.PQQ liberou aproximadamente 75% de PQQ, enquanto que GR.PQQ liberou cerca de 88% e ao final do experimento (após 12 horas) liberaram  $84,88 \pm 1,80\%$  e  $95,70 \pm 0,64\%$ , respectivamente, evidenciando uma liberação/difusão mais lenta para GR.NP.PQQ, assim como evidenciado para a suspensão de nanopartículas de origem (NP.EUD.PQQ.0,5). Diferença significativa

( $p < 0,05$ ) em todos os tempos de coleta foi observada entre os granulados contendo nanopartículas e aqueles contendo PQQ livre, excetuando-se os primeiros 10 minutos.

Figura 29 – Perfis de liberação *in vitro* de PQQ a partir dos granulados contendo nanopartículas (GR.NP.PQQ) ou não (GR.PQQ). Resultados expressos em média e DP (n=3)

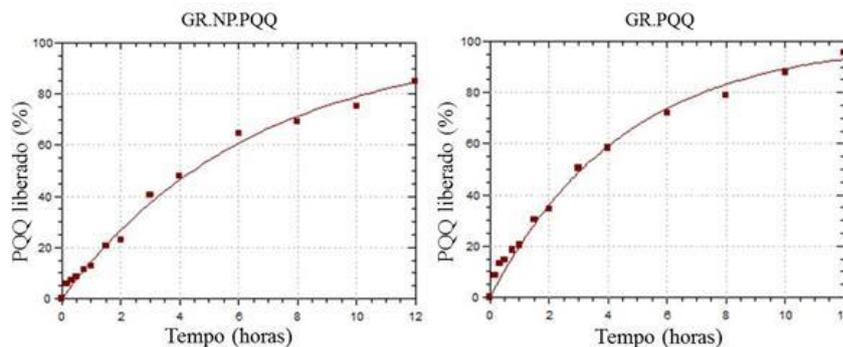


Assim como para a suspensão de nanopartículas, o modelo que melhor descreveu o comportamento da liberação de PQQ para os granulados, a partir da modelagem matemática dos dados obtidos (Scientist 2.0 software - MicroMath<sup>®</sup>), foi o monoexponencial (Equação 3, página 42), com adequado coeficiente de correlação (r), alto critério de seleção de modelo (MSC) e ajuste gráfico coerente (Tabela 10 e Figura 30), sendo a liberação dependente da concentração do princípio ativo. A meia-vida de liberação de PQQ (Tabela 10) obtida para os granulados contendo nanopartículas foi de 4,44 horas, enquanto que para os granulados com PQQ livre foi de 3,10 horas, apresentando diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na meia-vida e na constante de velocidade de liberação, entre os granulados desenvolvidos. Essas análises evidenciam a influência da barreira polimérica à liberação do ativo PQQ, parcialmente encapsulado na formulação, corroborando com a eficiência de encapsulamento determinada na suspensão de origem.

Tabela 10 – Parâmetros calculados a partir do modelo monoexponencial e Lei da Potência para a GR.NP.PQQ e GR.PQQ (n=3)

	GR.NP.PQQ	GR.PQQ
<b>Monoexponencial</b>		
r	0,9959 ± 0,0008	0,9971 ± 0,0012
MSC	4,5596 ± 0,1203	4,2758 ± 0,1828
k (h <sup>-1</sup> )	0,1562 ± 0,0081	0,2235 ± 0,0058
t <sub>1/2</sub> (h)	4,4443 ± 0,2225	3,1016 ± 0,0807
<b>Lei da Potência</b>		
r	0,9912 ± 0,0002	–
a	0,2052 ± 0,0089	–
n	0,6546 ± 0,0196	–

Figura 30 – Ajuste gráfico do modelo monoexponencial para os dados de liberação de PQQ a partir dos granulados



A partir da Lei da Potência (Korsmeyer-Peppas), foi obtido o mecanismo de liberação de PQQ a partir dos granulados nanotecnológicos (Tabela 10), sendo que o modelo apresentou adequado ajuste aos dados experimentais ( $r > 0,99$ ) e o valor de  $n$  foi de 0,65, indicando que o mecanismo também é do tipo transporte anômalo, sendo a liberação de PQQ dependente do relaxamento das cadeias poliméricas e difusão da substância ativa para o meio, equivalente ao encontrado para a suspensão nanoestruturada.

A partir destes resultados é possível verificar que tanto a suspensão quanto os granulados contendo nanopartículas, bem como a solução de PQQ e os granulados com PQQ não encapsulado, demonstraram uma cinética de liberação muito semelhante, além de não apresentarem diferença significativa ( $p > 0,05$ ) na constante de velocidade e na meia-vida de liberação entre as formas farmacêuticas, indicando que a conversão da suspensão nanoestruturada em uma forma farmacêutica sólida não afetou as características de liberação da substância ativa.

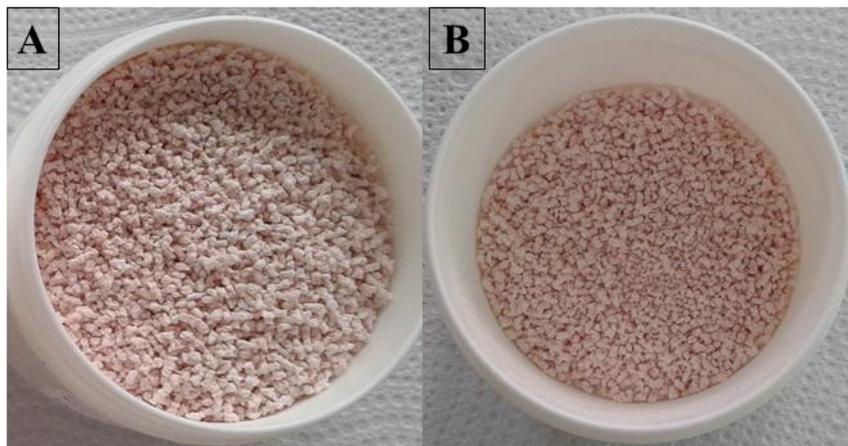
### 5.7.3 Estudo de estabilidade dos granulados contendo o ativo PQQ nanoencapsulado

Conforme o estudo de estabilidade descrito anteriormente, a suspensão de nanopartículas contendo PQQ desenvolvida neste trabalho (NP.EUD.PQQ.0,5) demonstrou-se instável, principalmente quanto ao diâmetro médio de partículas e índice de polidispersão, que em apenas 15 dias de armazenamento já sofreram alterações significativas. Diante disso, essa suspensão nanoestruturada foi transformada em uma forma farmacêutica sólida, ou seja, em granulados contendo nanopartículas, a fim de verificar o potencial em melhorar a estabilidade da mesma e, conseqüentemente, viabilizar sua possível produção/utilização futura.

Assim, os granulados desenvolvidos (GR.NP.PQQ), a partir da suspensão coloidal, foram armazenados em sachês de alumínio, como um produto final, durante 90 dias, à temperatura ambiente e protegidos da luz e da umidade para reavaliação (triplicata) do diâmetro médio das partículas, índice de polidispersão e teor total de PQQ, nos tempos 0, 15, 30, 45, 60 e 90 dias de armazenamento.

Na figura 31, é possível observar que, durante todo o período de armazenamento, os granulados não apresentaram alterações no aspecto macroscópico, ressaltando que a coloração permaneceu inalterada após os 90 dias.

Figura 31 – Aspecto macroscópico dos granulados após a preparação (A) e após 90 dias de armazenamento (B)



De acordo com as figuras 32, 33 e 34, o teor de PQQ, o diâmetro médio de partículas e o IPd, respectivamente, mantiveram-se estáveis após os 90 dias de armazenamento, sem diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

Figura 32 – Teor de PQQ nos granulados contendo nanopartículas armazenados durante 90 dias

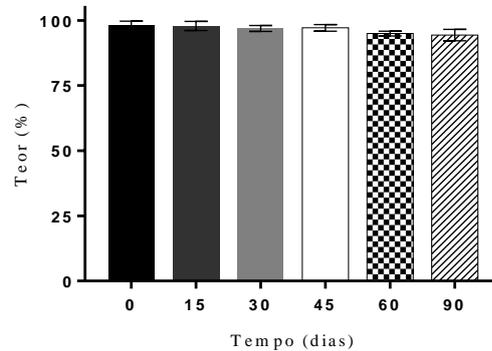


Figura 33 – Diâmetro médio dos granulados contendo nanopartículas, após dispersão/filtração das amostras, empregando espectroscopia de correlação de fótons, após 90 dias de armazenamento

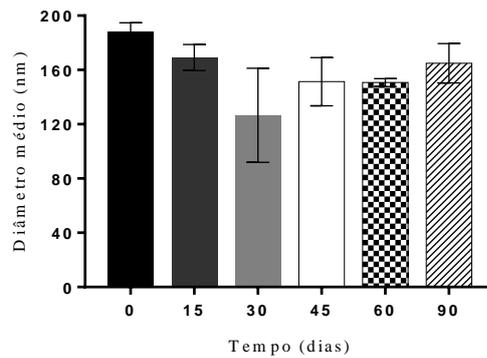
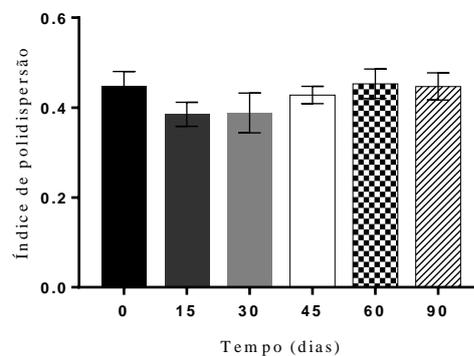


Figura 34 – Índice de polidispersão dos granulados contendo nanoestruturas, utilizando espectroscopia de correlação de fótons, após 90 dias de armazenamento



O presente estudo evidenciou que a transformação da suspensão nanoestruturada em uma forma farmacêutica sólida favoreceu a estabilidade das nanopartículas, aumentando o

potencial para a aplicação industrial das mesmas, bem como apresentou uma formulação promissora para explorar os possíveis efeitos terapêuticos do antioxidante PQQ.

Destaca-se também que este trabalho constitui uma plataforma tecnológica para a preparação de formulações com vistas à associação de PQQ a outras substâncias ativas antioxidantes/neuroprotetoras, uma vez que granulados poderiam ser preparados a partir de duas suspensões nanoestruturadas, como líquido de granulação, almejando a diferentes objetivos terapêuticos, gerando novas perspectivas de continuação desta dissertação.



## 6 CONCLUSÃO

O desenvolvimento das suspensões de nanopartículas poliméricas, empregando o método de dupla emulsificação-evaporação de solvente, para a veiculação de PQQ, mostrou-se viável, em especial àquelas preparadas utilizando o polímero Eudragit<sup>®</sup> RS 100. A suspensão coloidal desenvolvida com o polímero PCL não obteve características físico-químicas satisfatórias, considerando o alto índice de polidispersão, a baixa eficiência de encapsulamento e a presença de partículas com diâmetro na ordem micrométrica. Já as suspensões preparadas com o polímero Eudragit<sup>®</sup> RS 100 apresentaram características físico-químicas adequadas, sendo que a suspensão que continha PQQ na concentração de 0,5 mg/mL demonstrou eficiência de encapsulamento significativamente maior que as demais, e, portanto, foi a formulação selecionada para dar seguimento ao estudo.

A análise da formulação escolhida, realizada por microscopia de força atômica, possibilitou verificar a morfologia esférica e superfície lisa das nanopartículas poliméricas desenvolvidas, além de confirmar a presença de partículas com diâmetro na ordem nanométrica.

A suspensão coloidal contendo 0,5 mg/mL de PQQ apresentou atividade antioxidante, *in vitro*, contra peroxidação lipídica, significativamente superior à da substância ativa livre e à suspensão de nanopartículas sem PQQ, evidenciando uma atividade concentração-dependente até a concentração de 50  $\mu$ M.

Foi possível verificar, de maneira preliminar, uma provável proteção conferida pelo nanoencapsulamento parcial de PQQ contra sua degradação e, conseqüente, queda no teor da suspensão, após armazená-la durante 15 dias em frascos de vidro transparentes (sem proteção contra a luz), quando comparada a uma solução de PQQ livre submetida às mesmas condições. Em outro estudo, a suspensão nanoestruturada, armazenada durante 30 dias em frascos de vidro âmbar, protegidas da luz e em temperatura ambiente, demonstrou alterações significativas, principalmente no diâmetro médio e polidispersidade das partículas, revelando a instabilidade da mesma e reforçando a necessidade de convertê-la em uma forma farmacêutica sólida, como os granulados.

Os granulados desenvolvidos, a partir da suspensão de nanopartículas contendo PQQ, empregando a técnica de granulação via úmida, obtiveram características físico-químicas e tecnológicas adequadas, sendo, então, acondicionados em sachês, como forma farmacêutica final, contendo o equivalente a 5,0 mg de PQQ. Os granulados mantiveram-se estáveis durante 90 dias de armazenamento, sem alterações macroscópicas, bem como no teor de

PQQ, diâmetro médio de partículas e índice de polidispersão, favorecendo a estabilidade das nanopartículas poliméricas desenvolvidas.

A suspensão coloidal otimizada e os granulados contendo o antioxidante PQQ nanoencapsulado demonstraram perfis de liberação, *in vitro*, muito semelhantes, sendo estes moderadamente mais lentos em comparação à solução e aos granulados contendo PQQ na forma livre, respectivamente. A meia-vida de liberação encontrada para as formas farmacêuticas contendo o ativo encapsulado foi significativamente mais elevada do que para PQQ na forma livre. A cinética de liberação foi monoexponencial, com apenas uma fase de liberação, apesar de parte da substância ativa estar livre e parte encapsulada no sistema, e o mecanismo de liberação foi estimado como sendo do tipo transporte anômalo.

O conjunto de resultados obtidos, até o momento, demonstra o potencial antioxidante de PQQ veiculado na suspensão de nanopartículas, além de evidenciar um aumento significativo na estabilidade deste sistema coloidal ao transformá-lo em uma forma farmacêutica sólida de base nanotecnológica. Frente ao exposto, é possível verificar que os granulados contendo a substância ativa hidrofílica PQQ nanoencapsulada são sistemas promissores para prevenção e tratamento das diversas patologias associadas a suas atividades terapêuticas já relatadas, em especial àquelas relacionadas a sua potente atividade antioxidante.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, n. 2, p. 87–94, 2006.
- AGNES, E. J.; GONZÁLEZ-ORTEGA, G. Modelos matemáticos e físico-química da difusão. **Caderno de Farmácia**, v. 19, p. 9–19, 2003.
- AKAGAWA, M.; NAKANO, M.; IKEMOTO, K. Recent progress in studies on the health benefits of pyrroloquinoline quinone. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 80, n. 1, p. 13–22, 2016.
- ALISHAHI, A. et al. Shelf life and delivery enhancement of vitamin C using chitosan nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 126, p. 935–940, 2011.
- ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 8ª ed. São Paulo: Artmed, 2007.
- AMORIM, C. M. et al. Antioxidant idebenone-loaded nanoparticles based on chitosan and N-carboxymethylchitosan. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, p. 745-752, 2010.
- AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2ª ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2005.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BEHERA, A.K.; BARIK, B.B.; JOSHI, S. Poli – $\epsilon$ -caprolactone based microspheres and nanospheres: a review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 1, n. 2, p. 38-45, 2012.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.
- BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **WAO Journal**, v. 5, p. 9-19, 2012.
- BIRD, R. P.; DRAPER, H. H. Comparative Studies on Different Methods of Malonaldehyde Determination. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 299-305, 1984.
- BITENCOURT, P. E. R. A new biodegradable polymeric nanoparticle formulation containing *Syzygium cumini*: Phytochemical profile, antioxidant and antifungal activity and in vivo toxicity. **Industrial Crops and Products**, 2016.

BITENCOURT, P. E. R. Nanoparticle formulation increases *Syzygium cumini* antioxidant activity in *Candida albicans* infected diabetic rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1082-1088, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017: Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2017.

CHAVES, P. S. Carvedilol-loaded nanocapsules: Mucoadhesive properties and permeability across the sublingual mucosa **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 114, p. 88-95, 2017.

CHOW, S. F. et al. Development of highly stabilized curcumin nanoparticles by flash nanoprecipitation and lyophilization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 94, p. 436-449, 2015.

CONTRI, R. V. et al. The use of nanoencapsulation to decrease human skin irritation caused by capsaicinoids. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 951-962, 2014.

CORADINI, K. et al. Co-encapsulation of resveratrol and curcumin in lipid-core nanocapsules improves their in vitro antioxidant effect. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, p. 178-185, 2014.

COUTO, A. G.; ORTEGA, G.; PETROVICK, P. R. Granulação. **Caderno de Farmácia**, v. 16, n. 1, p. 13-20, 2000.

COUVREUR, P. et al. Nanocapsule Technology: A Review. **Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 19, n. 2, p. 99-134, 2002.

DILLEN, K. et al. Evaluation of ciprofloxacin-loaded Eudragit® RS100 or RL100/PLGA nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 314, p. 72-82, 2006.

DIMER, F. A. et al. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1520-1526, 2013.

DORDEVIC, S. M. et al. Parenteral nanoemulsions as promising carriers for brain delivery of risperidone: Design, characterization and in vivo pharmacokinetic evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 493, p. 40-54, 2015.

EFTEKHARI, A. et al. Hepatoprotective and free radical scavenging actions of quercetin nanoparticles on aflatoxin B1-induced liver damage: in vitro/in vivo studies. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, 2017.

FESSSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. R1-R4, 1989.

FRIEDRICH, R. B. et al. Drying polymeric drug-loaded nanocapsules: the wet granulation process as a promising approach. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, n. 1, p. 616-621, 2010a.

FRIEDRICH, R. B. et al. Tablets containing drug-loaded polymeric nanocapsules: an innovative platform. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, n. 9, p. 5885–5888, 2010b.

GOTO, P. L.; SIQUEIRA-MOURA, M. P.; TEDESCO, A. C. Application of aluminum chloride phthalocyanine-loaded solid lipid nanoparticles for photodynamic inactivation of melanoma cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 518, p. 228-241, 2017.

GUAN, S. et al. Pyrroloquinoline quinone against glutamate-induced neurotoxicity in cultured neural stem and progenitor cells. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 42, p. 37–45, 2015.

GUO, A.; BEDDOW, J. K.; VETTER, A. F. A simple relationship between particle shape effects and density, flow rate and Hausner Ratio. **Powder Technology**, v. 43, n. 3, p. 279–284, 1985.

GUPTA, P.; KUMAR, M.; SACHAN, N. An Overview on Polymethacrylate Polymers in Gastroretentive Dosage Forms. **Open Pharmaceutical Sciences Journal**, v. 2, p. 31-42, 2015.

GUTERRES, S. S. et al. Poly(DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v.113, p.57-63, 1995.

GUTERRES; S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 1-11, 2007.

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**. Cap. 17, p. 247-264. São Paulo: Atheneu, 2007.

HAMAGISHI, Y. et al. New Biological Properties of Pyrroloquinoline Quinone and its Related Compounds: Inhibition of Chemiluminescence, Lipid Peroxidation and Rat Paw Edema. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 255, n.3, p. 980–985, 1990.

HARA, H.; HIRAMATSU, H., ADACHI, T. Pyrroloquinoline Quinone is a Potent Neuroprotective Nutrient Against 6-Hydroxydopamine-Induced Neurotoxicity. **Neurochem. Res.**, v. 32, p. 489–495, 2007.

HARRIS, C. B. et al. Dietary pyrroloquinoline quinone (PQQ) alters indicators of inflammation and mitochondrial-related metabolism in human subjects. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, p. 2076–2084, 2013.

HE, K. et al. Antioxidant and pro-oxidant properties of pyrroloquinoline quinone (PQQ): implications for its function in biological systems. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p. 67–74, 2003.

HITCHON, C. A.; EL-GABALAWY, H. S. Oxidation in rheumatoid arthritis, **Arthritis Research Therapy**, v. 6, p. 265-278, 2004.

HOFFART, V. Low Molecular Weight Heparin-Loaded Polymeric Nanoparticles: Formulation, Characterization, and Release Characteristics. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 28, n. 9, p. 1091–1099, 2002.

ICH. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology** International Conference on Harmonization (ICH), 2005.

IQBAL, M. Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 496, p. 173–190, 2015.

JANA, U. et al. Preparation and characterization of nebivolol nanoparticles using Eudragit<sup>®</sup> RS100. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p. 269-275, 2014.

JIA, D. Pyrroloquinoline-Quinone Suppresses Liver Fibrogenesis in Mice. **Plos One**, v. 10, n. 3, p. 1-18, 2015.

KANO, K. et al. Voltammetric determination of acid dissociation constants of pyrroloquinoline quinone and its reduced form under acidic conditions. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 299, n. 24, p. 193-201, 1990.

KECK, C. M.; MÜLLER, R. H. Size analysis of submicron particles by laser diffractometry-90% of the published measurements are false. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 355, n. 1-2, p. 150–63, 2008.

KILLGORE, J. et al. Nutritional importance of Pyrroloquinoline quinone. **Science**, v. 245, p. 850-852, 1989.

KIM, J. et al. The inhibitory effect of pyrroloquinoline quinone on the amyloid formation and cytotoxicity of truncated alpha-synuclein. **Molecular Neurodegeneration**, v. 5, n. 20, p. 1-11, 2010.

KIM, K. M. et al. Improved chemotherapeutic efficacy of injectable chrysin encapsulated by copolymer nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 1917-1925, 2017.

KLAPETEK, P. et al. Atomic force microscopy analysis of nanoparticles in non-ideal conditions. **Nanoscale Research Letters**, v. 6, p. 1-9, 2011.

KOBAYASHI, M. et al. Pyrroloquinoline quinone (PQQ) prevents fibril formation of  $\alpha$ -synuclein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 349, p. 1139–1144, 2006.

KRATZ, C. P.; MAYORGA, P. E.; PETROVICK, P. R. Formas farmacêuticas monolíticas como sistemas multiparticulados. **Caderno de Farmácia**, v. 17, n. 1, p. 19-26, 2001.

KÜLKAMP, I.C. et al. Nanoencapsulation Improves the In Vitro Antioxidant Activity of Lipoic Acid. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 7, p. 1-10, 2011.

KUMAR, S. P. et al. Antioxidant studies of chitosan nanoparticles containing narigenin and their cytotoxicity effects in lung cancer cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 78, p. 87-95, 2015.

KUMAR, N.; KAR, A. Regulation of oxidative stress and lipid peroxidation in PTU induced mice, treated with Pyrroloquinoline quinone (PQQ). **Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 8, n. 5, p. 23-31, 2013.

KUMAR, N.; KAR, A. Pyrroloquinoline Quinone (PQQ) has potential to ameliorate streptozotocin-induced diabetes mellitus and oxidative stress in mice: a histopathological and biochemical study. **Chemico-Biological Interactions**, 2015.

KUMAR, N.; KAR, A.; PANDA, S. Pyrroloquinoline quinone ameliorates L-thyroxine-induced hyperthyroidism and associated problems in rats. **Cell Biochem Funct**, v. 32, p. 538-546, 2014.

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

KUMAZAWA, T. et al. Trace levels of pyrroloquinoline quinone in human and rat samples detected by gas chromatography/mass spectrometry. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1156, p. 62-66, 1992.

KUMAZAWA, T. et al. Levels of pyrroloquinoline quinone in various foods. **Research Communication**, v. 307, p. 331-333, 1995.

KUMAZAWA, T.; SENO, H.; SUZUKI, O. Failure to verify high levels of pyrroloquinoline quinone in eggs and skim milk. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 193, n. 1, p. 1-5, 1993.

KWON, S.S. et al. Preparation and characterization of coenzyme Q<sub>10</sub>-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.

LEITE, E. A. et al. Poly-caprolactone nanocapsules morphological features by atomic force microscopy. **Microscopy and Microanalysis**, v. 11, p. 48-51, 2005.

LI, J. et al. Relief of oxidative stress and cardiomyocyte apoptosis by using curcumin nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 153, p. 174-182, 2017.

LINDNER, G. R. et al. Improved neuroprotective effects of resveratrol-loaded polysorbate 80-coated poly(lactide) nanoparticles in MPTP-induced Parkinson. **Nanomedicine**, v. 10, p. 1127-1138, 2015.

LIU, Z. et al. Pyrroloquinoline Quinone Decelerates Rheumatoid Arthritis Progression by Inhibiting Inflammatory Responses and Joint Destruction via Modulating NF- $\kappa$ B and MAPK Pathways. **Inflammation**, v. 39, n. 1, p. 248-256, 2016.

LOBATO, K. B. D. S. et al. Characterisation and stability evaluation of bixin nanocapsules. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 3906-3912, 2013.

LOBATO, K. B. D. S. et al. Evaluation of stability of bixin in nanocapsules in model systems of photosensitization and heating. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 8–14, 2015.

LOBO, M. S.; COSTA, P. Modeling and comparison of dissolution profiles. **Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p. 123–133, 2001.

LORENZONI, A. S. **Desenvolvimento de Nanocápsulas para a Liberação Controlada de Crisina: Avaliação da Atividade Antioxidante e da Citotoxicidade *in vitro***. 2015. 152 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.

LOVEYMI, B. D. et al. Design of vancomycin RS-100 nanoparticles in order to increase the intestinal permeability. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 2, n. 1, p. 43-56, 2012.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na prevenção da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 375-399, 2002.

MANKE, A.; WANG, L.; ROJANASAKUL, Y. Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-15, 2013.

MCINTIRE, W. S. Newly discovered redox cofactors: possible nutritional, medical, and pharmacological relevance to higher animals. **Annual Review of Nutrition**, v. 18, p. 145–177, 1998.

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

MISRA, H. S et al. Pyrroloquinoline-quinone: a reactive oxygen species scavenger in bactéria. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 578, p. 26-30, 2004.

MISRA, H. S.; RAJPUROHIT, Y. S.; KHAIRNAR, N. P. Pyrroloquinoline-quinone and its versatile roles in biological processes. **Journal of Biosciences**, v. 37, p. 313-325, 2012.

MITCHELL, A. E. et al. Characterization of Pyrroloquinoline Quinone Amino Acid Derivatives by Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Detection in Human Milk. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 317–325, 1999.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, p. 561–573, 2006.

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

NUNOME, K. et al. Pyrroloquinoline quinone prevents oxidative stress-induced neuronal death probably through changes in oxidative status of DJ-1. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 7, p. 1321–1326, 2008.

OHWADA, K. et al. Pyrroloquinoline Quinone (PQQ) Prevents Cognitive Deficit Caused by Oxidative Stress in Rats. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 42, p. 29–34, 2008.

OURIQUE, A. F. et al. Redispersible liposomal-N-acetylcysteine powder for pulmonary administration: Development, in vitro characterization and antioxidant activity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 65, p. 174–182, 2014.

PALUMBO, M. et al. Improved antioxidant effect of idebenone-loaded polyethyl-2-cyanoacrylate nanocapsules tested on human fibroblast. **Pharm. Res.**, v. 19, p. 71-78, 2002.

PANDEY, S. K. et al. Anti-cancer evaluation of quercetin embedded PLA nanoparticles synthesized by emulsified nanoprecipitation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 521-529, 2015.

PIGNATELLO, R. et al. Eudragit RS 100 nanosuspensions for the ophthalmic controlled delivery of ibuprofen. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, p. 53-61, 2002.

PINHEIRO, P. G. **Desenvolvimento de comprimidos de vimpocetina associada a nanocápsulas poliméricas**. 2016. 114 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

POHLMANN, A. R. et al. Preparation of Drug-Loaded Polymeric Nanoparticles and Evaluation of the Antioxidant Activity Against Lipid Peroxidation. In: Rao M. Uppi; William A Pryor; S. N. Murthy. (Org.). **Free Radicals and Antioxidant Protocols**. 2 ed. Totowa: The Humana Press Inc., 2010.

PRISTA, L. N. **Tecnologia Farmacêutica**. 8a edição ed. Lisboa: F. C. Gulbenkian, 2011.

RATNAM, D. V. et al. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 113, p.189-207, 2006.

RIGO, L. A. et al. Nanoencapsulation of rice brain oil increase its protective effects against UVB radiation-induced skin injury in mice. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 93, p. 11-17, 2015.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. **Journal of Controlled Release**, v. 5, p. 23-36, 1987.

RITU, G.; MEENAKSHI, B. Influence of formulation parameters on tizanidine hydrochloride nanoparticles. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 4, n. 2, p. 1056-1078, 2013.

RONEY, C. et al. Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood-brain barrier for Alzheimer's disease. **Journal of Controlled Release**, v. 108, p. 193-214, 2005.

ROSA, C. P. **Nanocápsulas de poli(ε-caprolactona) contendo vimpocetina: desenvolvimento e avaliação da atividade anticonvulsivante**. 2017. 110 p. Dissertação

(Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6th ed., London: Pharmaceutical Press, 2009.

RUCKER, R.; CHOWANADISAI, W.; NAKANO, M. Potential Physiological Importance of Pyrroloquinoline Quinone. **Alternative Medicine Review**, v. 14, n. 3, p. 268-277, 2009.

SALISBURY, S. A. et al. A novel coenzyme from bacterial primary alcohol dehydrogenases. **Nature**, v. 280, p. 843-844, 1979.

SAMBANDAM, B. et al. Synthesis and characterization of poly-D-L lactide (PLA) nanoparticles for the delivery of quercetin. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 5, p. 44-49, 2015.

SANCHEZ, R. M. et al. Novel Role for the NMDA Receptor Redox Modulatory Site in the Pathophysiology of Seizures. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 6, p. 2409–2417, 2000.

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

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 289, p. 209-213, 2005.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, p. 562-569, 2006.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Incorporation in polymeric nanocapsules improves the antioxidant effect of melatonin against lipid peroxidation in mice brain and liver. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 64-71, 2008.

SCHULTZE, E. et al. Encapsulation in lipid-core nanocapsules overcomes lung cancer cell resistance to tretinoin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 87, p. 55-63, 2014.

SHEA, T.B. et al. Nanosphere-mediated delivery of vitamin E increases its efficacy against oxidative stress resulting from exposure to amyloid beta. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 7, p. 297-301, 2005.

SHEN, D.; MEYERHOFF, M. E. Pyrroloquinoline Quinone-Doped Polymeric Nanospheres as Sensitive Tracer for Binding Assays. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 4, p. 1564-1569, 2009.

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

SINHA, V. R. et al. Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview.

**International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 1–23, 2004.

SMIDT, C. R. et al. Intestinal Absorption and Tissue Distribution of [<sup>14</sup>C]Pyrroloquinoline Quinone in Mice. **Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 197, p. 27–31, 1991.

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

SOUZA, S. D. A Review of In Vitro Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms. **Advances in Pharmaceutics**, p. 1-12, 2014.

STITES, T. E.; MITCHELL, A. E.; RUCKER, R. B. Physiological Importance of Quinoenzymes and the *O*-Quinone Family of Cofactors. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 719-727, 2000.

TAO, R. et al. Pyrroloquinoline quinone preserves mitochondrial function and prevents oxidative injury in adult rat cardiac myocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 363, p. 257–262, 2007.

TAO, R. et al. Pyrroloquinoline Quinone Slows Down the Progression of Osteoarthritis by Inhibiting Nitric Oxide Production and Metalloproteinase Synthesis. **Inflammation**, v. 38, n. 4, p. 1546-1555, 2015.

TSHWEU, L. et al. Nanoencapsulation of water-soluble drug, lamivudine, using a double emulsion spray-drying technique for improving HIV treatment. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, p. 1-11, 2013.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VARMA, J. N. R et al. Formulation and Characterization of Pyrazinamide Polymeric Nanoparticles for Pulmonary Tuberculosis: Efficiency for Alveolar Macrophage Targeting **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 77, n. 3, p. 258-266, 2015.

WATANABE, A. et al. Nephrotoxicity of Pyrroloquinoline Quinone in Rats. **Hiroshima Journal of Medical Sciences**, v. 38, n. 1, p. 49-51, 1989.

WU, X. et al. Pyrroloquinoline quinone prevents testosterone deficiency-induced osteoporosis by stimulating osteoblastic bone formation and inhibiting osteoclastic bone resorption. **American Journal of Translational Research**, v. 9, n. 3, p. 1230-1242, 2017.

WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 456–469, 2011.

YUSUF, M. et al. Plausible antioxidant biomechanics and anticonvulsant pharmacological activity of brain-targeted  $\beta$ -carotene nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 4311-4322, 2012.

ZIMMERMAN, L. B. et al. Absorbance-based assay for membrane disruption by antimicrobial peptides and synthetic copolymers using pyrroloquinoline quinone-loaded liposomes. **Analytical Biochemistry**, v. 411, p. 194–199, 2011.

ZIMMERMAN, L. B.; LEE, K.; MEYERHOFF, M. E. Visual detection of single-stranded target DNA using pyrroloquinoline-quinone-loaded liposomes as a tracer. **Analytical Biochemistry**, v. 401, p. 182–187, 2010.

ZHANG, J. J.; ZHANG, R. F.; MENG, X. K. Protective effect of pyrroloquinoline quinone against A $\beta$ -induced neurotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Neuroscience Letters**, v. 464, n. 3, p. 165–169, 2009.

ZHANG, Q. et al. Pyrroloquinoline Quinone Protects Rat Brain Cortex Against Acute Glutamate-Induced Neurotoxicity. **Neurochemical Research**, v. 38, p. 1661–1671, 2013.

ZHANG, Q. et al. Involvement of ERK1/2 pathway in neuroprotective effects of pyrroloquinoline quinone against rotenone-induced SH-SY5Y cell injury. **Neuroscience**, v. 270, p. 183–191, 2014.

ZHANG, Y.; ROSENBERG, P. A. The essential nutrient pyrroloquinoline quinone may act as a neuroprotectant by suppressing peroxynitrite formation. **European Journal of Neuroscience**, v. 16, p. 1015-1024, 2002.

ZHU, B. et al. Pyrroloquinoline Quinone (PQQ) Decreases Myocardial Infarct Size and Improves Cardiac Function in Rat Models of Ischemia and Ischemia/Reperfusion. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 18, p. 421–431, 2004.

ZHUANG, C. Y. et al. Preparation and characterization of vinpocetine loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for improved oral bioavailability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 394, p. 179–185, 2010.