

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

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS
NANOESTRUTURADOS À BASE DE ÓLEO DE
PRACAXI CONTENDO UBIQUINONA E AVALIAÇÃO
DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Juliane Mattiazzi

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS
NANOESTRUTURADOS À BASE DE ÓLEO DE PRACAXI
CONTENDO UBIQUINONA E AVALIAÇÃO DA
CITOTOXICIDADE *IN VITRO***

Juliane Mattiazzi

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Leticia Cruz

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

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

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

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS À
BASE DE ÓLEO DE PRACAXI CONTENDO UBIQUINONA E
AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO***

elaborada por
Juliane Mattiazzi

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Andrea Inês Horn Adams, Dr.^a (UFSM)

Sandra Elisa Haas, Dr.^a (UNIPAMPA)

Santa Maria, 27 de março de 2014.

*Dedico esta realização aos meus pais,
Jaime e Teresinha e à minha avó, Ilse,
pelo incentivo, amor e fé transmitidos.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, a Deus, por guiar e iluminar meus passos nesta caminhada.

Agradeço também à minha família, em especial aos meus pais, irmãos e à minha avó, por sempre apoiarem minhas decisões, pela dedicação, amor e carinho que sempre fizeram presentes, mesmo estando longe.

Agradeço à minha orientadora, Prof.^a Letícia Cruz, por todos os ensinamentos transmitidos, pelo auxílio nas dificuldades, pela confiança em mim depositada e por ter me ensinado lições muito além do conhecimento científico.

Agradeço à Prof.^a Scheila Schaffazick, que com sua sabedoria e amizade também contribuiu para a realização deste trabalho.

Agradeço às minhas amigas do coração, às colegas de apartamento, e ao Éverton, pelo companheirismo, incentivo, carinho e compreensão.

Agradeço à Natháli, que além de ser uma colega de laboratório tão querida e de ter me ajudado nos experimentos durante estes 2 anos, foi minha amiga e confidente, sempre muito disposta e solícita, tornando o trabalho mais agradável.

Aos demais colegas de laboratório, Sara, Janaíne, Aline, Daniele, Martina, Luana, Mônica, Alessandra, Juliana, Flávio, Mailine, Verônica, Sabrina, Maíra, Caroline, Felipe, Camila, Luan, Allana, Gabriele, Luiz Eduardo e Daniela, também deixo meu agradecimento pelo convívio, pela colaboração, trocas de aprendizado e momentos de descontração. Agradeço também à Sara e à Luana pelas análises no ZetaSizer.

Às colegas dos laboratórios de Farmacotécnica e Controle de Qualidade, pelo coleguismo e boas conversas. À Prof.^a Cristiane De Bona da Silva, por disponibilizar o ZetaSizer para as análises.

Agradeço à Prof.^a Maria Beatriz Moretto e à sua aluna Gabriela Bonfanti, pelo auxílio na execução do teste de hemólise. À Prof.^a Elizandra Braganhol, da UFPEL, e às alunas Elita da Silveira e Juliana Azambuja pela parceria na realização do teste de citototoxicidade.

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

RESUMO

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

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS À BASE DE ÓLEO DE PRACAXI CONTENDO UBIQUINONA

AUTORA: JULIANE MATTIAZZI

ORIENTADORA: LETÍCIA CRUZ

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 27 de março de 2014.

Este trabalho objetivou a preparação inédita de nanocápsulas e nanoemulsões à base de óleo de pracaxi contendo ubiquinona. Para as nanocápsulas, a poli(ϵ -caprolactona) (PCL) ou o Eudragit[®] EPO foram usados na preparação. Comparativamente, nanoesferas contendo ubiquinona foram preparadas com ambos os polímeros. Como método de preparo utilizou-se a emulsificação espontânea (nanoemulsões), a nanoprecipitação (nanoesferas) e a deposição interfacial de polímero pré-formado (nanocápsulas). A metodologia analítica para quantificação da ubiquinona nos sistemas foi validada, sendo o método considerado seletivo, linear, preciso e exato. Após a preparação, os sistemas nanoestruturados foram caracterizados quanto ao diâmetro médio de gotícula/partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH, bem como teor e eficiência de encapsulamento da ubiquinona. As nanocápsulas de PCL apresentaram os maiores diâmetros (261 nm), demonstrando a influência da presença do óleo e do polímero na formulação, sendo que índices de polidispersão mais adequados foram obtidos nas dispersões contendo menor concentração de óleo de pracaxi (0,15g). Os valores de potencial zeta tanto das nanoemulsões (-18 mV) quanto das nanopartículas (-12 a -21 mV) de PCL foram negativos, devido à presença de ácidos graxos no óleo de pracaxi e pela densidade de carga negativa da PCL, respectivamente. As nanocápsulas e nanoesferas de Eudragit[®] EPO apresentaram potencial zeta positivo (+25 a +45 mV), pois este polímero é catiônico. Tanto para as nanoemulsões quanto para as nanoestruturas à base de PCL os valores de pH foram levemente ácidos, enquanto que para as formulações de Eudragit[®] EPO as médias foram mais próximas da neutralidade, em torno de 7,5. O teor de ubiquinona nos sistemas nanoestruturados foi próximo ao teórico, 1,0 mg/mL (com exceção das nanoesferas de Eudragit[®] EPO) e a eficiência de encapsulamento do fármaco nos sistemas foi de aproximadamente 100%. Estudos de fotodegradação demonstraram que as nanoestruturas foram capazes de promover proteção à ubiquinona encapsulada em comparação ao fármaco livre (solução etanólica) após 4h de exposição à radiação UVC, sendo esta proteção mais acentuada nas nanocápsulas com ambos os polímeros e na nanoemulsão. A cinética de degradação do fármaco em todos os sistemas nanoestruturados estudados foi de primeira ordem, enquanto que para a solução etanólica de ubiquinona a reação de segunda ordem foi a que proporcionou o melhor ajuste. O estudo de estabilidade das formulações por 90 dias demonstrou que os sistemas foram instáveis quando armazenados a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e UR $75 \pm 5\%$, em especial a nanocápsula de Eudragit[®] EPO. Entretanto, quando armazenados à temperatura ambiente, as formulações foram estáveis, conservando as características físico-químicas iniciais. Através de um teste de hemólise semi-quantitativo preliminar, foi demonstrada a compatibilidade das nanocápsulas de PCL com os eritrócitos humanos. Utilizando-se o método do MTT para avaliação da citotoxicidade, verificou-se que a ubiquinona livre e o óleo de pracaxi diminuíram o número de células viáveis das linhagens C6 e MCF-7, em comparação ao controle, sendo este potencial citotóxico ainda mais pronunciado quando se utilizou as nanocápsulas de PCL. Desta forma, os nanocarreadores desenvolvidos são sistemas promissores para a veiculação, estabilização e para se explorar as potencialidades terapêuticas da ubiquinona.

Palavras-chave: Nanocápsulas. Óleo de pracaxi. Ubiquinona. Fotodegradação. Estabilidade. Teste de hemólise. Citotoxicidade.

ABSTRACT

Master Dissertation

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Universidade Federal de Santa Maria

**DEVELOPMENT OF NANOSTRUCTURED SYSTEMS BASED ON
PRACAXY OIL LOADED WITH UBIQUINONE**

AUTHOR: JULIANE MATTIAZZI

ADVISOR: LETÍCIA CRUZ

Place and Date of Defense: Santa Maria, March 27th, 2014.

This work aimed the preparation of novel nanocapsules and nanoemulsions based on pracaxy oil loaded with ubiquinone. For nanocapsules, poly(ϵ -caprolactone) (PCL) or Eudragit[®] EPO were employed in the preparation. For comparison purposes, nanospheres containing ubiquinone were prepared with both polymers. The methods employed to prepare these formulations were spontaneous emulsification (nanoemulsions), nanoprecipitation (nanospheres) and interfacial deposition of pre-formed polymer (nanocapsules). An analytical method was validated to the assay of ubiquinone-loaded systems and it was considered specific, linear, precise and accurate. After preparation, the nanostructured systems were characterized regarding particle size, polydispersity index, zeta potential, pH, as well as ubiquinone content and encapsulation efficiency. PCL-nanocapsules presented larger diameters (261 nm), which demonstrates the influence of both oil and polymer in the formulation. Nanocapsules containing the lowest amount of oil (0.15 g) presented polydispersity index more suitable. Zeta potential values of both nanoemulsions (-18 mV) and PCL-nanoparticles (-12 to -21 mV) were negatives, due to the presence of fatty acids in the pracaxy oil and due to the negative density of charge of PCL, respectively. Nanocapsules and nanospheres formulated with Eudragit[®] EPO showed positives values of zeta potential (+25 to +45 mV), because of the cationic nature of this polymer. The pH values were slightly acidic for both nanoemulsions and PCL-nanostructures, while the Eudragit[®] EPO formulations presented pH close to the neutrality, about 7.5. Ubiquinone content of the nanostructured systems was close to the theoretical value, 1.0 mg/mL and the encapsulation efficiency was about 100%. Photodegradation studies showed that nanostructures were able to provide protection to the encapsulated ubiquinone in relation to free-ubiquinone (ethanolic solution), after 4h of exposition to UVC radiation and this protection was more pronounced for nanocapsules and nanoemulsions. The drug degradation followed a first order kinetic for all the systems studied, while the ethanolic solution of ubiquinone fitted better to the second order equation. The stability study of the formulations demonstrated that the systems were instable when stored for 90 days at $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e UR $75 \pm 5\%$, especially Eudragit[®] EPO-nanocapsules, however, when they were stored at room temperature, the formulations appeared to be stable, keeping the initial physico-chemical characteristics. By performing a semi-quantitative hemolysis test, it was demonstrated the hemocompatibility of PCL nanocapsules. The MTT test was used to evaluate the cytotoxicity, and it was verified that free ubiquinone and pracaxi oil were capable to reduce cellular viability in rat glioma (C6) and breast cancer cells (MCF-7) after 48h of incubation, comparing to the control (DMEM). Besides, this cytotoxic potential was more pronounced when the cells were treated with PCL nanocapsules. In this way, the nanocarriers developed are promising systems for vectorization, stabilization and to study therapeutic potentials of ubiquinone.

Key-words: Nanocapsules. Pracaxy oil. Ubiquinone. Photodegradation. Stability. Hemolysis test. Cytotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática das nanoestruturas (nanocápsula, nanoemulsão e nanoesfera	21
Figura 2 - Estrutura química da poli(ϵ -caprolactona) ou PCL.....	22
Figura 3 – Estrutura química do poli(butil metacrilato-co-(2-dimetilaminoetil) metacrilato-co-metil metacrilato) 1:2:1, ou Eudragit [®] EPO	23
Figura 4 – A: Árvore de pracaxi; B: Fava; C: Sementes	27
Figura 5 – Estrutura química da ubiquinona	29
Figura 6 – Cromatogramas das nanocápsulas de PCL e Eudragit [®] EPO	48
Figura 7 – Tubo contendo solução de ubiquinona em óleo de pracaxi após homogeneização em vórtex e microcentrifugação	51
Figura 8 - Gráfico da concentração remanescente de ubiquinona nas amostras após 4 h de exposição à radiação UVC.....	60
Figura 9 – Cromatogramas das amostras de solução etanólica de ubiquinona submetidas à radiação UVC por 4 horas	62
Figura 10 – Cromatogramas das amostras de NSP-U submetidas à radiação UVC por 4 horas.....	62
Figura 11 – Cromatogramas das amostras de NE-U2 submetidas à radiação UVC por 4 horas.....	63
Figura 12 – Cromatogramas das amostras de NCP-U2 submetidas à radiação UVC por 4 horas.....	63
Figura 13 – Cromatogramas das amostras de NCE-U2 submetidas à radiação UVC por 4 horas.....	64
Figura 14 – Equações de melhor ajuste cinético observado para a solução etanólica de ubiquinona e para os sistemas nanoestruturados propostos.....	66
Figura 15 – Gráfico do diâmetro médio de partícula das formulações armazenadas a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e UR $75 \pm 5\%$ por 90 dias.....	71
Figura 16 – Gráfico do potencial zeta das formulações armazenadas a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e UR $75 \pm 5\%$ por 90 dias.....	73

Figura 17 – Gráfico do pH das formulações armazenadas a $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e UR $75 \pm 5\%$ por 90 dias	73
Figura 18 – Gráfico do teor das formulações armazenadas a $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e UR $75 \pm 5\%$ por 90 dias.	74
Figura 19 – Gráfico do diâmetro médio de partícula das formulações armazenadas à temperatura ambiente por 90 dias.....	76
Figura 20 – Gráfico do potencial zeta das formulações armazenadas à temperatura ambiente por ambiente por 90 dias.....	77
Figura 21 – Gráfico do pH das formulações armazenadas à temperatura ambiente por 90 dias.....	78
Figura 22 – Gráfico do teor de ubiquinona das formulações armazenadas à temperatura ambiente por 90 dias	79
Figura 23 – Resultado semi-quantitativo do teste de hemólise	80
Figura 24 – Citotoxicidade do óleo de pracaxi livre, da ubiquinona livre e das nanocápsulas de PCL (NCP-U2 ou NCP-B2) contra células de glioma de ratos (linhagem C6), após 48 h de exposição	82
Figura 25 – Citotoxicidade do óleo de pracaxi livre, da ubiquinona livre e das nanocápsulas de PCL (NCP-U2 ou NCP-B2) contra células de câncer de mama humano (linhagem MCF-7), após 48 h de exposição.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição de ácidos graxos do óleo de pracaxi.....	28
Tabela 2 – Composição quali-quantitativa das nanoemulsões contendo ou não ubiquinona.....	40
Tabela 3 – Composição quali-quantitativa das nanocápsulas e nanoesferas de PCL contendo ou não ubiquinona	40
Tabela 4 – Composição quali-quantitativa das nanocápsulas e nanoesferas de Eudragit® EPO contendo ou não ubiquinona.....	41
Tabela 5 – Exatidão do método analítico por CLAE para determinação da ubiquinona nas suspensões de nanocápsulas.....	49
Tabela 6 – Repetibilidade e precisão inter-dia das amostras contendo ubiquinona.	49
Tabela 7 – Peso dos filmes de PCL após 60 dias de imersão em óleo de pracaxi.....	50
Tabela 8 – Peso dos filmes de Eudragit® EPO após 60 dias de imersão em óleo de pracaxi.....	50
Tabela 9 – Características físico-químicas das nanoemulsões contendo óleo de pracaxi	53
Tabela 10 – Características físico-químicas das nanocápsulas e nanoesferas de PCL.....	53
Tabela 11 – Características físico-químicas das nanocápsulas e nanoesferas de Eudragit® EPO.....	54
Tabela 12 – Coeficientes de correlação (r), constante de fotodegradação (k) e tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) dos sistemas nanoestruturados e solução-controlado contendo ubiquinona expostos à luz UVC por 4 horas (n=3)	65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos	17
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 Sistemas nanocarreadores de fármacos.....	20
3.2 Óleos vegetais como núcleo oleoso e o óleo de pracaxi	25
3.3 Ubiquinona.....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Material	35
4.1.1 Matérias-primas.....	35
4.1.2 Solventes.....	35
4.1.3 Equipamentos	36
4.2 Métodos.....	37
4.2.1 Validação de método analítico por CLAE para a determinação do teor de ubiquinona nas suspensões nanoestruturadas	37
4.2.2 Teste de inchamento/ dissolução de filmes poliméricos	38
4.2.3 Teste de solubilidade da ubiquinona no óleo de pracaxi	38
4.2.4 Preparação das suspensões nanoestruturadas	39
4.2.5 Caracterização físico-química dos sistemas nanoestruturados	41
4.2.5.1 Determinação do pH	41
4.2.5.2 Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta.....	41
4.2.5.3 Determinação do teor e da eficiência de encapsulamento da ubiquinona	42
4.2.6 Avaliação da fotoestabilidade da ubiquinona nos sistemas nanoestruturados	42
4.2.7 Estudo de estabilidade acelerado das formulações contendo ubiquinona	43
4.2.8 Teste de hemólise semi-quantitativo	44
4.2.9 Estudo de citotoxicidade <i>in vitro</i>	44

4.2.10 Análise estatística	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 Validação do método analítico de CLAE para a determinação do teor de ubiquinona nas suspensões nanoestruturadas.....	47
5.2 Teste de inchamento/dissolução de filmes poliméricos.....	49
5.3 Teste de solubilidade da ubiquinona no óleo de pracaxi	51
5.4 Caracterização físico-química das nanoestruturas	52
5.5 Avaliação da fotoestabilidade da ubiquinona nos sistemas nanoestruturados	59
5.6 Estudo de estabilidade acelerado das formulações contendo ubiquinona	69
5.7 Teste de hemólise semi-quantitativo.....	79
5.8 Estudo de citotoxicidade <i>in vitro</i>	81
6 CONCLUSÕES.....	85
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
8 APÊNDICES	107
Apêndice A - Gráficos de distribuição de tamanho de gotículas/partículas	108
Apêndice B - Gráficos de potencial zeta dos sistemas nanoestruturados.....	112
Apêndice C - Gráficos do diâmetro médio de partículas das formulações armazenadas em câmara de estabilidade por 90 dias	116

1 INTRODUÇÃO

Carreadores nanoestruturados tais como lipossomas, microemulsões, nanoemulsões, nanopartículas poliméricas e lipídicas, entre outros, são amplamente estudados para liberação de agentes terapêuticos e diagnósticos (TORCHILIN et al., 2006; DOMB et al., 2007; THASSU; DELLERS; PATHAK, 2007). Esses sistemas de liberação de fármacos são capazes de proporcionar uma resposta mais adequada no sítio de ação envolvido, por períodos prolongados e assim oferecem numerosas vantagens quando comparados às formulações convencionais, como aumento da eficácia terapêutica e redução da toxicidade, otimizando o tratamento e melhorando a adesão do paciente ao mesmo (KUMAR, 2000; VAUTHIER et al., 2003).

Nesse contexto, nanocápsulas e nanoemulsões tem sido alvo de inúmeras pesquisas no campo da liberação controlada de fármacos por terem a capacidade de liberar princípios ativos para várias áreas do corpo de maneira sustentada (HANS; LOWMAN, 2002; COUVREUR; VAUTHIER, 2006). Esses nanocarreadores apresentam diâmetro médio usualmente na faixa de 100 a 500 nanômetros (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998; FATTAL; VAUTHIER, 2002). Quanto à organização estrutural, as nanocápsulas são dispersões sólido-líquido nas quais um invólucro polimérico circunda um núcleo geralmente oleoso (VAUTHIER-HOLTZSCHERER et al., 1991; ALLÉMANN et al., 1993; PUISIEUX et al., 1994). Por sua vez, a nanoemulsão consiste de gotículas oleosas dispersas em uma fase aquosa, estabilizadas por uma mistura de tensoativos (SCHAFFAZICK et al., 2003). Desta forma, ambas as estruturas apresentam em comum a presença de um núcleo oleoso, ideal para a incorporação de substâncias lipofílicas. Entretanto, nas nanoemulsões, este núcleo não é envolto por uma membrana polimérica. A presença do invólucro polimérico pode conferir vantagens importantes às nanocápsulas com relação ao fármaco incorporado, tais como maior controle da liberação e proteção superior contra condições que levem a sua degradação (POLETTO et al., 2008; FONTANA et al., 2009).

Seguindo uma tendência observada para outros produtos das indústrias farmacêutica e cosmética, sistemas nanoestruturados tem sido preparados com matérias-primas de origem vegetal, principalmente para a constituição do núcleo oleoso, tais como óleo de semente de girassol, óleo de semente de uva, óleo essencial de melaleuca, óleo de linhaça e óleo de coco (FRIEDRICH; FONTANA; BECK, 2008; ALMEIDA et al., 2009; FLORES et al., 2011;

ADAMCZAK et al., 2013; SANTOS et al., 2014). Uma das plantas oleaginosas que tem recentemente despertado interesse econômico é o Pracaxi - *Pentaclethra maculosa* (Willd.) Kuntze (Família Fabaceae). Esta espécie vegetal é encontrada na região Amazônica, distribuída em todo o Brasil Setentrional (PESCE, 1941). O óleo de pracaxi é extraído de forma artesanal, por cozimento da massa seca das sementes, que é macerada em pilão. É utilizado na medicina popular contra a erisipela e para tratamento capilar. Promove elasticidade à pele e, quando aplicado em manchas, pode promover o clareamento. É também empregado em produtos de maquiagem devido a sua propriedade umectante (MORAIS, 2011). Cabe ressaltar que até o momento não foram encontrados relatos na literatura sobre a preparação de sistemas nanoestruturados contendo óleo de pracaxi.

Tendo em vista que nanocápsulas e nanoemulsões são carreadores adequados para veiculação de substâncias lipofílicas, a incorporação da ubiquinona em nanocarreadores a base de óleo de pracaxi foi estudada neste trabalho. A ubiquinona é uma substância antioxidante endógena, sendo o único antioxidante sintetizado por organismos vivos (MANCINI et al., 2011). Encontra-se na cadeia respiratória das mitocôndrias de todas as células do organismo humano, onde atua como uma coenzima no transporte de elétrons. Sua forma reduzida, o ubiquinol, tem efeito protetor contra a peroxidação lipídica e previne a oxidação em proteínas e no DNA (ERNSTER; DALLNER, 1995).

Em 1961, foi evidenciado o potencial da ubiquinona no tratamento do câncer, devido ao seu papel imuno-estimulante e anticancerígeno (LOCKWOOD et al., 1995). Em conjunto com o tratamento convencional e outros nutrientes antioxidantes, seu uso tem demonstrado um aumento na taxa de sobrevivência e regressão da incidência do câncer (BOREKOVA et al., 2008). Entretanto, devido à sua estrutura contendo uma quinona ligada a uma cadeia lateral isoprenóide, apresenta alto peso molecular e grande lipofilia, além de ser relativamente fotoinstável. Portanto, sua aplicação terapêutica apresenta algumas limitações, como baixa biodisponibilidade oral (CRANE, 2001; BHAGAVAN; CHOPRA, 2006).

Frente ao exposto, o presente trabalho esteve focado no desenvolvimento de suspensões de nanocápsulas e nanoemulsões à base de óleo de pracaxi para veiculação da ubiquinona e na avaliação do potencial citotóxico *in vitro* destas formulações frente a linhagens de células de câncer de mama humano e de glioma de ratos. Para tanto, além do óleo vegetal, empregou-se dois polímeros distintos na preparação de nanocápsulas: a poli-ε-caprolactona (PCL) e o Eudragit® EPO. A fim de comprovar a originalidade do trabalho, cabe mencionar que não foram encontrados relatos até o momento sobre a utilização do óleo de

pracaxi para a preparação de tais nanoestruturas. Além disso, também não foram localizados estudos sobre a preparação de nanoesferas contendo ubiquinona com os polímeros referidos.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho visou preparar sistemas nanoestruturados à base de óleo de pracaxi contendo ubiquinona e caracterizá-los quanto à estabilidade, fotoestabilidade, hemocompatibilidade, além de avaliá-los preliminarmente quanto ao seu potencial citotóxico frente a linhagens de células tumorais.

2.2 Objetivos específicos

- Validar um método analítico por CLAE para a quantificação da ubiquinona nos sistemas nanoestruturados propostos;
- Preparar pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado (PCL ou Eudragit[®] EPO), nanocápsulas contendo ubiquinona, usando como núcleo oleoso o óleo de pracaxi;
- Preparar pelo método de emulsificação espontânea nanoemulsões contendo ubiquinona, usando como fase oleosa o óleo de pracaxi;
- Preparar pelo método de nanoprecipitação, nanoesferas contendo ubiquinona, utilizando os polímeros PCL ou Eudragit[®] EPO;
- Caracterizar as formulações quanto ao teor de fármaco, eficiência de encapsulamento, diâmetro de partícula/gotícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH;
- Avaliar a fotoestabilidade da ubiquinona incorporada aos sistemas nanoestruturados frente à radiação UVC;
- Estudar a estabilidade das formulações propostas por 90 dias à 40 °C em câmara climática e à temperatura ambiente;
- Avaliar a compatibilidade das formulações selecionadas com o sangue através do teste de hemólise;

- Avaliar o potencial citotóxico das nanocápsulas selecionadas através do método do MTT em linhagem de células de glioma de ratos (C6) e de câncer de mama humano (MCF-7).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Sistemas nanocarreadores de fármacos

Até o momento, diferentes tipos de nanodispositivos e estratégias nanotecnológicas adequadas para a liberação de fármacos tem sido propostas na literatura (IRACHE et al., 2011). Os sistemas nanoestruturados, por exemplo, são dispersões coloidais aquosas, dentre as quais se destacam os lipossomas, as nanopartículas poliméricas, as nanoemulsões, as nanopartículas lipídicas sólidas, entre outros (GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007).

O controle de liberação de agentes farmacologicamente ativos para o sítio de ação específico, através da utilização de vetores, capazes de permitir taxas terapêuticas ideais e regime de dosagem tem sido uma meta importante na concepção de tais dispositivos (SOPPIMATH et al., 2001; SCHAFFAZICK et al., 2003; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010). O seu desenvolvimento permite controlar o tamanho e as propriedades de superfície da partícula e aumentar a estabilidade do fármaco, pois se pode promover proteção deste frente à degradação (química, física ou enzimológica), aumento da absorção por facilitar a difusão do fármaco através do epitélio, alteração da farmacocinética e do perfil de distribuição do fármaco no tecido e/ou aumento da sua penetração intracelular. Desta forma, pode-se melhorar a liberação do fármaco em seu sítio de ação, otimizando-se a dose terapêutica utilizada (COUVREUR; VAUTHIER, 2006; MOHANRAJ; CHEN, 2006; OURIQUE et al., 2008).

Neste sentido, as nanopartículas poliméricas têm sido propostas como plataformas terapêuticas que utilizam polímeros em sua formulação, uma área que vem destacando-se em pesquisas após a aprovação de produtos para comercialização (DUNCAN; GASPAR, 2011). Estes nanocarreadores apresentam diâmetro inferior a 1 μm e incluem as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural, como pode ser visualizado na figura 1. Nanocápsulas são sistemas vesiculares nos quais o fármaco está confinado em uma cavidade oleosa ou aquosa rodeada por um invólucro polimérico, enquanto que as nanoesferas apresentam caráter matricial. A forma de associação da substância ativa também é diferente nas duas estruturas, sendo que nas nanocápsulas o

fármaco pode encontrar-se dissolvido no núcleo oleoso ou adsorvido à parede polimérica. Nas nanoesferas o fármaco encontra-se retido, adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica (SOPPIMATH et al., 2001; SCHAFFAZICK et al., 2003).

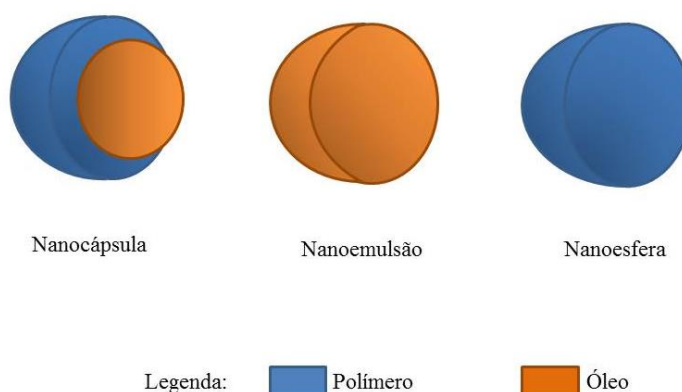


Figura 1 – Representação esquemática das nanoestruturas (nanocápsula, nanoemulsão e nanoesfera).

Existe ainda outro tipo de nanocápsula polimérica, conhecida como nanocápsula de núcleo lipídico, um novo sistema nanoestruturado proposto por Jager e colaboradores (2009), contendo uma mistura de monoestearato de sorbitano e triglicerídeos de cadeia média como núcleo oleoso e PCL como polímero, que apresenta diferentes propriedades de dispersão do núcleo se comparada às nanocápsulas convencionais.

Paralelamente ao desenvolvimento de nanopartículas poliméricas é muito recorrente a preparação de nanoemulsões (figura 1) objetivando uma comparação entre os sistemas. Diferentemente das nanocápsulas, uma nanoemulsão não apresenta o polímero em sua composição, sendo somente uma dispersão do óleo no meio aquoso em presença do sistema tensoativo-co-tensoativo. Assim, pode-se avaliar a influência do invólucro polimérico nas características das nanocápsulas (USON; GARCIA; SOLANS, 2004; PORRAS et al., 2008).

O uso de polímeros biodegradáveis em estudos envolvendo sistemas de liberação de fármacos é devido à capacidade destes de liberar o fármaco no alvo de ação e assim aumentar o benefício terapêutico, enquanto minimizam os efeitos adversos (KREUTER, 1994). Além disso, os polímeros são capazes de proteger o fármaco de condições agressivas do meio ambiente, como luz e umidade e também do próprio microambiente fisiológico, auxiliando no

processo produtivo e também modulando a liberação do fármaco (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010).

Alguns dos polímeros mais amplamente utilizados para formular nanopartículas são os polímeros biodegradáveis, que sofrem degradação macromolecular *in vivo* por ação de enzimas, micro-organismos ou células e formam produtos que são então metabolizados a dióxido de carbono e água, via ciclo de Krebs, ou são excretados na urina (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005; NAIR; LAURENCIN, 2007; KOTWAL et al., 2007).

Dentre estes estão os poliésteres, como o poli(ácido láctico) (PLA); poli(D,L-ácido glicólico) (PLG), poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e a quitosana (SOPPIMATH et al., 2001; HANS; LOWMAN, 2002; MOHANRAJ et al., 2006; KUMARI et al., 2010; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

A PCL (Figura 2), polímero empregado neste trabalho, é um poliéster alifático semicristalino, parcialmente solúvel em solventes polares, como a acetona. É degradada por hidrólise das ligações éster em condições fisiológicas, apresentando biodegradabilidade, tendo assim recebido grande atenção na liberação de fármacos, especialmente na preparação de implantes de liberação prolongada (POHLMANN et al., 2013). Além disso, é um polímero bastante versátil no preparo de nanopartículas que podem ser administradas por diferentes vias, entre elas via oral, ocular e intra-venosa (SINHA et al., 2004). Nanoesferas e nanocápsulas de PCL tem sido preparadas principalmente através dos métodos de nanoprecipitação e deslocamento de solventes seguido de evaporação de solventes (KUMARI et al., 2010; POHLMANN et al., 2013).

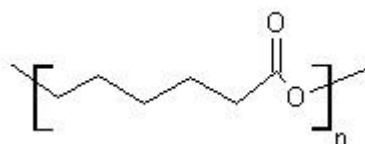


Figura 2 - Estrutura química da poli(ϵ -caprolactona) ou PCL.

Outra classe de polímeros que vem recebendo importância no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados atualmente é a dos poli(metacrilatos), polímeros derivados do ácido metacrílico com metacrilato de metila, acrilato de etila, metacrilato de butila, cloridrato de

trimetilamôniometacrilato ou dimetilaminometacrilato de etila. Estes polímeros são mais conhecidos como Eudragit[®] e exibem funções variadas: organoléptica, estabilizadora, protetora e moduladora da liberação (entérica e sustentada), sendo que algumas das vias de administração utilizadas são oftálmica, oral, tópica e vaginal (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010; NIKAM et al., 2011; SANTOS et al., 2013). O Eudragit[®] EPO (figura 3), polímero de interesse no presente trabalho, é um copolímero catiônico, baseado em metacrilato de dimetilaminoetila, butila e metila desenvolvido para liberação gástrica. É solúvel em fluido gástrico até pH 5 e expansível e permeável em pH maior que 5, tendo por isso recebido maior atenção no desenvolvimento de produtos para liberação cólon-específica (MUSTAFIN et al., 2011a; MUSTAFIN et al., 2011b; MOUSTAFINE et al., 2013). Poucos trabalhos relatam o desenvolvimento de nanopartículas utilizando este polímero (DATE et al., 2010; CHELLAMPILLAI; PAWAR, 2011; KHACHANE; DATE; NAGARSENKER, 2011), sendo que não há relato prévio do uso deste na formulação de nanocápsulas.

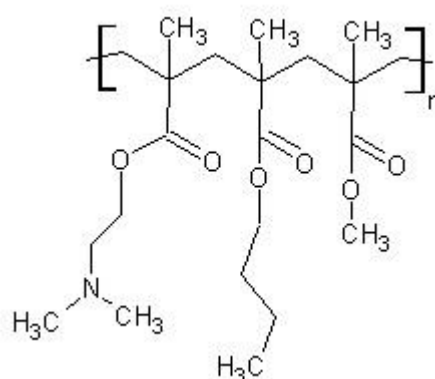


Figura 3 – Estrutura química do poli(butil metacrilato-co-(2-dimetilaminoetil) metacrilato-co-metil metacrilato) 1:2:1, ou Eudragit[®] EPO.

Quanto à preparação das nanopartículas poliméricas, existem vários métodos comumente empregados e a escolha adequada deve levar em consideração a via de administração pretendida, as matérias-primas utilizadas, os equipamentos disponíveis, entre outros. Alguns dos métodos clássicos são: emulsificação-difusão, dupla emulsificação, coacervação e nanoprecipitação (também chamada de deslocamento de solventes, no caso das nanoesferas ou deposição-interfacial, no caso das nanocápsulas) (GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). No

presente trabalho, o método de escolha foi a nanoprecipitação, a qual se baseia na emulsificação espontânea de uma fase orgânica em uma fase aquosa, formando as nanopartículas instantaneamente. O método consiste em verter a fase orgânica, contendo polímero, óleo (no caso das nanocápsulas), fármaco, tensoativo e um solvente miscível com água em uma fase aquosa contendo água e um tensoativo de alta hidrofília, sob moderada agitação. Quando o solvente difunde para a fase aquosa, ocorre precipitação do polímero, pois este deve ser insolúvel na água (e também no óleo, no caso das nanocápsulas), formando a partícula de tamanho nanométrico (GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007).

Segundo Fessi e colaboradores (1989), o uso de polímeros em baixa concentração nas formulações de nanopartículas é necessário para se obter partículas pequenas e evitar a formação de agregados. Entretanto, para estabilizar essas partículas de tamanho reduzido é preciso também empregar tensoativos na formulação, utilizando-se geralmente um tensoativo hidrofílico (alto EHL) e outro hidrofóbico (baixo EHL) quando a preparação ocorre pelo método de nanoprecipitação. O tipo e a concentração destes afeta as propriedades das nanopartículas formadas, como diâmetro, índice de polidispersão e teor de fármaco (ALVARÉZ-ROMAN et al., 2001; SCHAFFAZICK et al. 2003; BOUCHEMAL et al., 2004; FRIEDRICH; FONTANA; BECK, 2008).

Fármacos lipofílicos têm sido encapsulados em vários carreadores poliméricos na forma de nano ou micropartículas (LEROUX et al., 1995; ARANGO et al., 2001; ROGER et al., 2003). O reservatório polimérico pode ser lipofílico dependendo do método e das matérias-primas utilizadas para a preparação das nanocápsulas, sendo que taxas de encapsulamento elevadas para fármacos lipofílicos são obtidas pelo método da deposição interfacial de polímeros pré-formados (LIMAYEM et al., 2006; GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007).

Dessa forma, as nanocápsulas tem demonstrado serem sistemas adequados para a incorporação de fármacos lipofílicos, devido ao núcleo oleoso compatível com a solubilidade do fármaco e ao uso de polímeros de natureza hidrofóbica.

A caracterização dos sistemas nanoestruturados é dificultada pelo pequeno tamanho que as gotículas ou partículas apresentam. Portanto, para avaliar-se o comportamento destas entidades nanométricas, uma série de propriedades devem ser analisadas. Dentre os parâmetros mais comumente avaliados nas suspensões de nanopartículas encontram-se o diâmetro médio de partícula/gotícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH; e eficiência de encapsulamento do fármaco (LEGRAND et al., 1999; COUVREUR et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). No presente

estudo, estas análises foram utilizadas como ferramenta para a caracterização físico-química dos sistemas coloidais propostos.

3.2 Óleos vegetais como núcleo oleoso e o óleo de Pracaxi

Além da substância ativa lipofílica, o núcleo das nanocápsulas é composto por um óleo, escolhido tendo-se como critério a maior solubilidade possível do fármaco, ausência de toxicidade, baixa solubilidade do óleo no polímero e vice-versa, bem como a ausência de risco de degradação do polímero (LYMAIEM et al., 2006). Somando-se a isso, o tipo de óleo empregado na preparação de nanocápsulas poliméricas ou nanoemulsões pode também ter influência no diâmetro e na dispersidade das partículas e gotículas devido às diferentes viscosidades, características hidrofóbicas e tensão interfacial apresentadas pelos óleos (SCHAFFAZZICK et al. 2003; BOUCHEMAL et al., 2004).

Grande parte dos óleos vegetais apresenta propriedades de interesse na formulação de sistemas de liberação em produtos farmacêuticos, tais como atividades antioxidante, antibacteriana e antifúngica, assim como em cosméticos, pois os óleos são emolientes. Desta forma, os efeitos benéficos e terapêuticos pretendidos na elaboração destes sistemas poderiam ser otimizados. Neste contexto, os óleos de origem vegetal vêm ganhando importância como matérias-primas alternativas no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados e alguns estudos relatam sua utilização.

Friedrich e colaboradores (2008) desenvolveram nanocápsulas contendo dexametasona utilizando óleo de girassol como núcleo oleoso. A suspensão foi preparada pelo método de deposição interfacial de polímeros pré-formados, sendo que os resultados demonstraram pela primeira vez a viabilidade de preparação de nanopartículas poliméricas empregando óleo de girassol. Todas as formulações apresentaram tamanho de partícula similar (entre 225 e 280 nm) e dispersidade adequada abaixo de 0,25. Além disso, obteve-se formulações de pH ácido e com teor e eficiência de encapsulamento próximos a 100%.

Em outro estudo, Almeida e colaboradores (2009) formularam nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões de óleo de semente de uva ou de amêndoas doces, contendo benzofenona-3 como substância modelo. As formulações preparadas com ambos os óleos apresentaram características físico-químicas similares às apresentadas por formulações contendo triglicerídeos de cadeia média como fase oleosa, como tamanho submicrométrico de partícula, pH ácido e dispersidade em torno de 0,2, bem como teores de benzofenona-3 de

acordo com o esperado e eficiência de encapsulamento próxima a 100%. Além disso, também foi realizado um estudo de fotodegradação da benzofenona-3 nestes sistemas nanoestruturados, a fim de avaliar a estabilidade da benzofenona-3 frente à radiação UVC. Observou-se que independentemente do tipo de óleo estudado e da estrutura vesicular formada, houve proteção da benzofenona-3 contra a fotodegradação nestas formulações.

Através de outro estudo, Almeida e colaboradores (2010) também desenvolveram nanocápsulas e nanoemulsões de óleo de semente de uva contendo rutina, um fármaco antioxidante, a fim de avaliar a influência das nanoestruturas na atividade antioxidante e na fotoestabilidade deste. As nanocápsulas e nanoemulsões formuladas apresentaram diâmetro médio de 124,30 e 124,17 nm, respectivamente, além de dispersidade abaixo de 0,2, potencial zeta negativo e eficiência de encapsulamento próxima de 100%. As formulações também levaram a um aumento na fotoestabilidade da rutina durante os 30 minutos de exposição à radiação UV e demonstraram prolongar a atividade antioxidante da rutina em testes *in vitro*.

Além destes, trabalhos mais recentes também têm abordado o uso de óleos vegetais no preparo de nanoemulsões e nanocápsulas, como: óleo essencial de melaleuca, óleo de rosa mosqueta, óleo de linhaça, óleo de coco e óleo de amêndoas (FLORES et al., 2011; RIBAS, 2013; ADAMCZAK et al., 2013; SANTOS et al., 2014; CHASSOT et al., 2014).

Frente ao exposto, torna-se evidente o crescente papel dos óleos vegetais no desenvolvimento de nanocarreadores de substâncias ativas. Desta forma, a idéia do uso do óleo de pracaxi para a preparação de sistemas nanoestruturados ganha um maior respaldo científico, fato que é reforçado pelas potencialidades terapêuticas ainda pouco exploradas deste óleo.

O Pracaxi (também conhecido como paraocaxi, paranacaxi), de nome científico *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze (Família Fabaceae) é uma espécie vegetal encontrada na região Amazônica, distribuída em todo o Brasil Setentrional, Guianas, Trinidad e algumas regiões da América Central (PESCE, 1941). A árvore de pracaxi é de tamanho médio, comumente encontrada em áreas inundáveis e possui um fruto em forma de vagem, contendo de 4 a 8 sementes (figura 4) (LORENZI, 2002). Um quilo de sementes é composto por aproximadamente 35 vagens, as quais contêm cerca de 30 % de óleo, em base seca. Este óleo apresenta potencial industrial, sendo utilizado para a preparação de manteigas e sabões (ECKEY, 1954; CALZAVARA; SOUZA; CARVALHO, 1978).



Figura 4 – A: Árvore de pracaxi; B: Fava; C: Sementes. FONTE: Morais, 2011; <http://www.amazoniaorganics.com>; <http://www.premiumbeautynews.com>.

O óleo de pracaxi é utilizado na medicina popular contra a erisipela, infecção cutânea causada geralmente por bactérias. O óleo também é utilizado popularmente para tratamento capilar, facilitando o penteado, aumentando o brilho e evitando a queda de cabelo. Promove elasticidade à pele, podendo ser utilizado no tratamento de estrias em adolescentes e gestantes. Quando aplicado em manchas da pele, este óleo pode promover o clareamento. É empregado em produtos de maquiagem devido a sua propriedade umectante (MORAIS, 2011).

O óleo de pracaxi é composto por vários ácidos graxos, estando em maior quantidade o ácido oleico (53%) e o ácido behênico (16%), seguido dos ácidos linoleico e lignocérico, perfazendo 96% do total de ácidos graxos presentes neste óleo (tabela 1). Portanto, o óleo de pracaxi contém a mais alta concentração de ácido behênico conhecida, sendo seis vezes maior que a encontrada no óleo de amendoim (MORAIS, 2005; COSTA et al., 2013). Atualmente, as indústrias cosméticas têm investido em pesquisas sobre o óleo de pracaxi e o ácido behênico. Ikeda e colaboradores (2009) desenvolveram cosméticos do tipo emulsão óleo em água, como loções e cremes, contendo ácido behênico, ácido esteárico, ácido isoesteárico e trietanolamina. O conteúdo total dos ácidos na formulação foi de 0,1 a 3%. Em outro estudo, Kawada e colaboradores (2009), formularam cosméticos como lápis de olho e de sobrancelha a partir de uma mistura oleosa incluindo óleo de rícino e ácido behênico, entre outros componentes.

Tabela 1 – Composição de ácidos graxos do óleo de pracaxi. FONTE: Morais, 2005; Costa et al., 2013.

COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DE PRACAXI		
Ácido graxo	Átomos de Carbono	Porcentagem
Láurico	12:00	0,18
Mirístico	14:00	0,30
Palmítico	16:00	1,85
Estearico	18:00	2,14
Oleico	18:10	53,55
Linoleico	18:20	13,05
Linolênico	18:30	0,13
Araquídico	20:00	1,05
Behênico	22:00	16,13
Lignocérico	24:00	10,44

Além disso, alguns trabalhos relatam a atividade inseticida da semente ou do óleo de pracaxi, especificamente contra o mosquito *Aedes aegypti*, que é o vetor da febre amarela e da dengue (CHUN et al., 1994; SANTIAGO et al., 2005).

3.3 Ubiquinona

A ubiquinona (2,3-dimetoxi-5-metil-6-decaprenil-benzoquinona) ou Coenzima Q₁₀ ou ubidecarenona (figura 5), ativo de interesse deste estudo, é uma substância endógena presente em todos os tecidos do corpo humano, tendo sido relatada pela primeira vez por Festenstein em 1955 e Crane em 1957. É um importante componente da cadeia respiratória mitocondrial, pois medeia o transporte de elétrons na mesma, sendo essencial para a síntese de ATP. Esse ativo também é encontrado em outras estruturas celulares como o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi, e na circulação sanguínea ligada a lipoproteínas (ERNSTER; DALLNER,

1995). Além de ser produzida no organismo, a ubiquinona pode ser obtida a partir da dieta, pois está presente em carnes, ovos, peixes e vegetais, bem como em suplementos alimentares (BHAGAVAN; CHOPRA, 2006).

A estrutura da ubiquinona é formada por uma quinona ligada a uma cadeia lateral isoprenóide composta por 10 unidades de cinco átomos de carbono (CRANE, 2001), apresentando, portanto, alto peso molecular (863,3 g/mol) e elevada lipofilia. Isto resulta em uma absorção intestinal relativamente lenta, o que pode ser melhorado na presença de lipídios (OVERVAD et al., 1999; BHAGAVAN; CHOPRA, 2006; BOREKOVA et al., 2008). Além disso, a ubiquinona apresenta instabilidade frente à luz e limitações quanto ao controle da permeação cutânea (HOPPE et al., 1999).

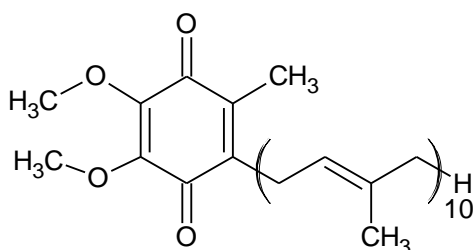


Figura 5 – Estrutura química da ubiquinona.

Quanto à farmacocinética, a ubiquinona apresenta baixa biodisponibilidade por via oral, sendo que apenas 10% da ubiquinona consumida é absorvida (OLIVEIRA, 2012). O $T_{máx}$ geralmente é observado entre 4h e 6h após a administração, demonstrando um processo absorptivo lento e limitado. Um segundo pico plasmático da ubiquinona é observado após 24h, o que pode ser devido à recirculação entero-hepática e à redistribuição do fígado para a corrente sanguínea e a sua eliminação ocorre por via biliar e excreção fecal (WEISS et al., 1994; BHAGAVAN; CHOPRA, 2006).

No organismo humano, a ubiquinona encontra-se geralmente próxima aos lipídios insaturados, pois sua forma reduzida, o ubiquinol ou hidroquinona, atua como um importante antioxidante celular, tendo efeito protetor contra a peroxidação lipídica e prevenindo a formação de radicais nos tecidos (CRANE, 2001; ERNSTER; DALLNER, 1995). No sangue, sua concentração usual varia entre 0,5 e 1,2 $\mu\text{g/mL}$ e encontra-se 95% na sua forma reduzida (OVERVAD et al., 1999; MANCINI et al., 2011), sendo que os níveis teciduais reduzem com a idade e em algumas patologias, como o câncer. Entretanto, ainda não se pode afirmar se a

diminuição observada está relacionada à causa ou ao efeito destas doenças no organismo (ERNSTER; DALLNER, 1995).

Devido a sua conhecida propriedade antioxidante e seu papel em aumentar a bioenergia celular, a ubiquinona foi aprovada para uso como suplemento dietético em alguns países, como os Estados Unidos (BHAGAVAN; CHOPRA, 2006; LITARRU; TIANO, 2010). No Brasil, a ubiquinona é vendida sob diferentes nomes comerciais (Vinocard Q₁₀[®] - Marjan Farma; CoQ10 - BIOVEA[®]; CoQ10 - Doctor's Best[®]; CoQ10 - Newton-Everett Biotech[®]), formas farmacêuticas (comprimidos revestidos, cápsulas, cápsulas de gel, solução para preparo instantâneo) e doses (10, 30, 50, 60, 100, 400, 600 mg), sendo encontrada em drogarias, farmácias de manipulação e sites de venda de suplementos alimentares.

Na literatura encontram-se algumas revisões que abordam sua aplicação como complemento terapêutico na forma de suplemento dietético, visando o tratamento de diversas enfermidades associadas a níveis baixos de ubiquinona: insuficiência cardíaca e outras doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, diabetes, infertilidade masculina, artrite reumatoide, câncer, entre outros (CHOI; RYU, SEO, 2005; DHANASEKARAN; REN, 2005; BOREKOVA et al., 2008; JEYA et al., 2010; LITARRU; TIANO, 2010).

Tendo em vista que a ubiquinona é essencial para a respiração das células, deficiências na sua disponibilidade ou biossíntese poderiam comprometer o funcionamento normal destas, levando a padrões anormais de divisão celular, o que, por sua vez, poderia induzir a uma resposta oncogênica (HODGES et al., 1999). Com base nisso, seu potencial no tratamento do câncer começou a ser melhor investigado a partir de 1961 (LOCKWOOD et al., 1995) e atualmente vários estudos tentam elucidar o papel da ubiquinona em inibir o crescimento de tumores e a formação de metástases, tanto *in vitro* (PICARDO et al., 1996; NOHL et al., 2005; RUSCIANI et al., 2006; PINTO et al., 2009; BAHAR et al., 2010; MA et al., 2011; GRASSO et al., 2013) quanto *in vivo* (LOCKWOOD et al., 1994; LOCKWOOD et al., 1995; PORTAKAL et al., 2000; ROFFE; SCHMIDT; ERNST, 2004; COBANOGLU et al., 2011). Os tipos de câncer mais estudados até o momento são o câncer de mama, câncer de cólon, câncer de pele (melanona), câncer de pulmão, linfoma e leucemias.

Em alguns estudos, Folkers e colaboradores (1991,1993) relataram diminuição nos níveis sanguíneos de ubiquinona em pacientes com câncer de mama, sugerindo que a biossíntese desta substância fica prejudicada na presença desta patologia. Entretanto Lockwood e colaboradores (1993) observaram que após o tratamento complementar das pacientes com antioxidantes como a ubiquinona por via oral, houve regressão parcial ou total do tumor, aumento dos níveis de ubiquinona na circulação e melhora na condição clínica, com

consequente aumento na sobrevida das pacientes. Há também relatos de caso de pacientes que receberam ubiquinona como suplemento oral em doses entre 90 e 390 mg por dia, ocorrendo regressão do tumor primário e das metástases em algumas pacientes (LOCKWOOD et al., 1994; LOCKWOOD et al., 1995). Os autores atribuem esta melhora à atividade imunológica apresentada pela ubiquinona, o que já foi demonstrado por Folkers e colaboradores em 1982, em um estudo no qual se verificou aumento nos níveis de IgG em pacientes com câncer após tratamento com 60 mg de ubiquinona.

Mais recentemente, outros estudos foram conduzidos a fim de se compreender o comportamento da ubiquinona no organismo na presença do câncer de mama. Portakal e colaboradores (2000) determinaram as taxas de ubiquinona, entre outros antioxidantes, no tecido tumoral e nos tecidos circundantes de pacientes sujeitas à mastectomia. Observaram-se níveis de ubiquinona mais baixos nos tecidos tumorais quando comparados ao tecido saudável, o que pode refletir o consumo desta substância contra o dano oxidativo, sugerindo que a administração de ubiquinona exógena poderia efetivamente reduzir a suscetibilidade das células ao câncer.

Pinto e colaboradores (2009) investigaram o efeito pró-apoptótico da ubiquinona no câncer de mama, empregando as linhagens de células Sk-Br3 e MCF-7. Através dos resultados obtidos os autores concluíram que houve aumento na expressão de proteínas pró-apoptóticas nestas linhagens, enquanto que nos fibroblastos mamários a ubiquinona não induziu resposta significativa em tais proteínas. Os dados sugerem, portanto, que a ubiquinona é capaz de restaurar o potencial apoptótico nas células cancerígenas sem apresentar efeitos adversos para o tecido da mama normal, sustentando o uso da ubiquinona como adjuvante na terapia do câncer de mama.

Bahar e colaboradores (2010) avaliaram a relação entre as quantidades intracelulares de um marcador tumoral (MMP-2) e de peróxido de hidrogênio presentes em linhagem celular de câncer de mama (MCF-7) após incubação destas com ubiquinona. Os resultados demonstraram que a ubiquinona reduziu a atividade pró-oxidante do marcador MMP-2 de maneira proporcional à concentração utilizada, realçando o efeito desta substância nas moléculas iniciadoras das metástases.

Devido às potencialidades terapêuticas apresentadas pela ubiquinona e levando em consideração sua lipofilia e instabilidade, alguns autores vem estudando alternativas para contornar estas limitações, principalmente através de formulações utilizando nanocarreadores como lipossomas (XIA; XU; ZHANG, 2006; ZHANG; WANG, 2009), nanoemulsões (ZÜLLI et al., 2006; HATANAKA et al., 2008, DING et al., 2009; AHN et al., 2010; DING

et al., 2010), carreadores lipídicos nanoestruturados (TEERANACHAIDEEKUL et al., 2007; JUNYAPRASERT et al., 2009; YUE et al., 2010; ZHOU et al., 2010; CHEN et al., 2013; NANJWADE; KADAM; MANVI, 2013; SCHWARZ et al., 2013; ZHOU et al., 2013), nanopartículas lipídicas sólidas (BUNJES et al., 2001; FARBOUD et al., 2011; GOKCE et al., 2012) e nanopartículas poliméricas (KWON et al., 2002; NEHILLA et al., 2008; TERROSO et al., 2009; WANG et al., 2010; SWARNAKAR et al., 2011; FELIPPI et al., 2012).

Kwon e colaboradores (2002) desenvolveram uma técnica de microfluidização para a produção de nanopartículas de Poli(metacrilato de metila) (PMMA), utilizando a ubiquinona como fármaco modelo. As nanopartículas obtidas foram avaliadas quanto à eficiência de encapsulamento, distribuição de tamanho e morfologia. A estabilidade das nanopartículas de ubiquinona frente à radiação UVA e altas temperaturas também foi avaliada. Os resultados quanto ao diâmetro e morfologia das partículas foram satisfatórios, tendo sido obtidas partículas de tamanho submicrométrico e com eficiência de encapsulamento em torno de 95%. Foi demonstrado também que a estabilidade da ubiquinona nanoencapsulada foi maior que a do fármaco em suspensão nas condições testadas.

Já Nehilla e seu grupo de estudo (2008) formularam nanopartículas poliméricas biodegradáveis de PLGA, livres de tensoativos e contendo ubiquinona, demonstrando que estas nanopartículas são uma promissora plataforma para estudos de liberação de ativos antioxidantes. As nanopartículas apresentaram estreita faixa de distribuição de tamanho, com dispersidade próxima de 0,1 e diâmetros na ordem dos nanômetros, sendo que as formulações de maior diâmetro foram as que continham maior quantidade de PLGA na composição. Quanto ao teor, as nanopartículas poliméricas formuladas com quantidade superior de ubiquinona (10 mg) apresentaram valor de 19%, bem como eficiência de encapsulamento em torno de 72%.

Em outro trabalho, Terroso e colaboradores (2009) estudaram a viabilidade de preparação de formulações semissólidas contendo nanocápsulas de ubiquinona preparadas com PCL e triglicerídeos de cadeia média (TCM), previamente secas por aspersão, bem como verificaram as alterações reológicas ocorridas neste processo. As nanocápsulas estudadas apresentaram pH levemente ácido, dispersidade em torno de 0,15 e diâmetro de partícula entre 213 e 248 nm, bem como potencial zeta próximo de -10 mV. O teor de ubiquinona obtido para as formulações foi próximo de 100% e a secagem destas por aspersão teve rendimento de cerca de 50%. Assim, o estudo mostrou que a secagem da suspensão de

nanocápsulas de ubiquinona ocorreu efetivamente e que a incorporação das nanocápsulas em hidrogéis alterou o comportamento reológico destes.

Wang e colaboradores (2010) desenvolveram nanopartículas de PLGA de superfície modificada com quitosana trimetilada, a fim de promover vetorização cerebral. A ubiquinona foi utilizada como fármaco modelo para os testes de avaliação do efeito neuroprotetor. As nanopartículas obtidas apresentaram potencial zeta de aproximadamente +20 mV e diâmetro médio de 150 nm. Foi demonstrado pelos testes *in vitro* e *in vivo* que as nanopartículas desenvolvidas são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica e, portanto, tais nanocarreadores parecem constituir uma opção viável e segura para a liberação de fármacos na região cerebral.

Swarnakar e colaboradores (2011) realizaram um estudo formulando nanopartículas poliméricas de PLGA contendo ubiquinona, submetendo-as à liofilização e vários ensaios *in vitro* e *in vivo* a fim de avaliar a biodisponibilidade oral, a eficácia terapêutica e a atividade antioxidante das mesmas. As nanopartículas resultantes apresentaram tamanho menor que 100 nm, dispersidade em torno de 0,1 e eficiência de encapsulamento de aproximadamente 90%. O estudo de cultura de células indicou que as nanopartículas de ubiquinona extinguiram as espécies reativas de oxigênio de maneira mais eficaz que o fármaco livre. Quanto às atividades hepatoprotetora e anti-inflamatória, ambas aumentaram consideravelmente no caso das nanopartículas devido à atenuação dos efeitos nocivos associados com os radicais e pela acumulação das nanoestruturas nos tecidos inflamados. Já a biodisponibilidade oral foi 4,28 vezes maior para as nanopartículas do que para a ubiquinona livre.

Felippi e colaboradores (2012) encapsularam uma mistura de ubiquinona, palmitato de retinol, acetato de tocoferol, óleo de semente de uva e óleo de linhaça em nanopartículas poliméricas. As nanopartículas obtidas apresentaram diâmetro de 140 nm e pH próximo à neutralidade. Através de testes como HET CAM e teste de citotoxicidade foi demonstrado que essas nanoestruturas não induzem efeitos irritantes à pele, nem geram estresse oxidativo ou toxicidade celular e também não causaram fototoxicidade após exposição à radiação UVA. Os autores também realizaram testes clínicos, comprovando a segurança das nanopartículas e a redução significativa das rugas na pele dos voluntários após 21 dias de aplicação do sistema desenvolvido em relação ao controle.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Matérias-primas

- Óleo de pracaxi – Mapric, São Paulo
- Ubiquinona – Mapric, São Paulo
- Poli(ϵ -caprolactona) (PCL) – (Peso médio: 70000 – 90000 Da) – Sigma Aldrich, São Paulo
- Poli(butilmetacrilato-co-(2-dimetilaminoetil)metacrilato-co-metilmetacrilato) (Eudragit EPO[®]) – Evonik Industries, Alemanha
- Monoestearato de sorbitano (Span 60[®]) – Sigma Aldrich, São Paulo
- Monooleato de sorbitano (Span 80[®]) – Sigma Aldrich, São Paulo
- Polissorbato 80 (Tween 80[®]) – Delaware, Porto Alegre
- Meio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) – Gibco BRL, Carlsbad, Estados Unidos
- Soro fetal bovino – Gibco BRL, Carlsbad, Estados Unidos
- Células C6 e MCF-7 – American Type Culture Collection, Rockville, Estados Unidos
- Solução tripsina/EDTA 0,25% – Gibco BRL, Carlsbad, Estados Unidos
- Dimetilsulfóxido (DMSO) – Sigma Chemical Co., St.Louis, Estados Unidos
- Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) – Sigma Chemical Co., St. Louis, Estados Unidos

4.1.2 Solventes

- Acetona – Proquímios, Rio de Janeiro
- Acetonitrila – Sigma Aldrich, São Paulo

- Etanol anidro grau HPLC – Tedia, Rio de Janeiro
- Metanol grau HPLC – Tedia, Rio de Janeiro
- Água ultrapura – Mega Purity Water Purification

4.1.3 Equipamentos e outros materiais

- Balança analítica – Shimadzu AUY220
- Agitador magnético – Tecnal TE-0851
- Ultrassom – ALT Sonic Clean 3PA
- Agitador Vórtex – Phoenix Luferco AP56
- Evaporador Rotatório – Fisatom 558
- Prensa hidráulica – P30000 HydraulicPress, Bovenau, Brasil
- Potenciômetro – pH21 pH/mVmeter - Hanna Instruments
- Microcentrífuga – Sigma 1-14
- ZetaSizer Nano series Nano-Zs – Malvern Instruments
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência – Shimadzu LC-10A
- Detector UV-Vis SPD-M20A
- Controlador CBM-20A
- Bomba LC-20AT
- Injetor manual Rheodyne
- Coluna cromatográfica C₁₈ 250 mm x 4,6 mm; 5 µm; 110 Å – Nanoseparation
- Pré-coluna C₁₈ 4 x 3,0 mm – Phenomenex
- Lâmpada UVC (λ= 254 nm) – Phillips TUV – 30 W
- Câmara de fotoestabilidade – dimensões: 1 x 0,25 x 0,25 m
- Câmara de Estabilidade – Mecalor EC 0,5 AR-URC
- Cubetas em plástico: caminho óptico de 10 mm; faixa: UV/VIS – Brand
- Tubos para ultrafiltração-centrifugação Amicon[®] Ultra 10,000 MW – Millipore

4.2 Métodos

4.2.1 Validação de método analítico por CLAE para a determinação do teor de ubiquinona nas suspensões nanoestruturadas

O método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizado na quantificação de ubiquinona nos sistemas nanoestruturados foi previamente validado segundo os parâmetros preconizados pelo International Conference on Harmonisation (ICH): especificidade, linearidade, precisão e exatidão. As condições cromatográficas validadas foram as seguintes: fase móvel etanol anidro/metanol (90:10); eluição isocrática; fluxo 1,0 mL/min; volume de injeção 20 µL; comprimento de onda de 275 nm; coluna cromatográfica C₁₈ (250 mm x 4,6 mm); pré-coluna C₁₈ (4,0 x 3,0 mm). Foi empregado detector com arranjo de diodos para a seleção do melhor comprimento de onda para a detecção da ubiquinona e software LC Solution na integração das áreas dos picos.

Para a avaliação da especificidade do método, foi realizada uma comparação entre os cromatogramas das formulações branca (NCP-B2 e NCE-B2) e contendo ubiquinona (NCP-U2 e NCE-U2), a fim de excluir-se a possibilidade de que os excipientes da formulação interferissem no pico do fármaco (para melhor compreensão vide explicações na página 39, item 2.1.4). Todas as amostras foram filtradas em membrana de celulose de porosidade 0,45 µm previamente à injeção no cromatógrafo.

A linearidade do método foi determinada por análise de regressão linear pelo método dos mínimos-quadrados ($n = 3$), através da construção de curvas analíticas utilizando-se soluções de ubiquinona em cinco diferentes concentrações (5, 10, 15, 20 e 25 µg/mL). Para tanto, foi preparada uma solução-estoque de ubiquinona (1 mg/mL), dissolvendo-se 100 mg de fármaco em balão volumétrico contendo 10 mL de etanol anidro, mantendo-se o mesmo em ultrassom por aproximadamente 20 minutos. Após, pipetou-se volumes adequados de solução em balões volumétricos de 10 mL e completou-se o volume destes com acetonitrila, obtendo-se assim as soluções finais da curva.

A fim de avaliar a exatidão do método, realizou-se a análise da recuperação de fármaco, a partir da adição de quantidades conhecidas de ubiquinona em formulações de nanocápsulas branca (NCP-B2 e NCE-B2), obtendo-se soluções nas concentrações teóricas de 7,5, 12,5 e 17,5 µg/mL de ubiquinona ($n = 3$).

A fim de demonstrar a repetibilidade (precisão intra-dia) e a precisão intermediária (precisão inter-dias) do método, foram preparadas e analisadas seis soluções de ubiquinona na concentração de 15 µg/mL sob as mesmas condições, no mesmo dia e em dois dias consecutivos, respectivamente. Os resultados foram expressos na forma de desvio padrão relativo (DPR%).

4.2.2 Teste de inchamento/dissolução de filmes poliméricos

Filmes de aproximadamente 20 mg foram preparados a partir de péletes da PCL com auxílio de prensa hidráulica durante 5 minutos a 5 tons. Para o preparo de filmes de Eudragit[®] EPO, pesou-se 4,0 g de polímero e solubilizou-se em 15 mL de acetona por 30 minutos em ultrassom. Verteu-se esta solução em forma de teflon e após a evaporação do solvente, o filme formado foi cortado em porções de aproximadamente 600 mg. Os filmes foram pesados exatamente, em balança analítica, e o valor apresentado anotado, sendo em seguida imersos completamente no óleo de pracaxi ($n = 3$). Após 1, 3, 5, 7, 11, 28 e 60 dias de imersão, os filmes foram retirados do contato com o óleo, com auxílio de uma pinça, e enxugados suavemente com papel absorvente. Os filmes secos foram devidamente pesados em balança analítica.

4.2.3 Teste de solubilidade da ubiquinona no óleo de pracaxi

Em um tubo Eppendorf[®], pesou-se 0,15 g de óleo de pracaxi e adicionou-se 0,010 g de ubiquinona, mantendo-se assim fármaco e óleo na mesma proporção das nanoemulsões e nanocápsulas formuladas. Em seguida, submeteu-se o tubo à agitação em vórtex por aproximadamente 30 minutos e depois o tubo foi sonicado brevemente para retirada de bolhas. Após, colocou-se o tubo em micro-centrífuga a 5400 rpm por 10 minutos, a fim de provocar a sedimentação de parte da ubiquinona que poderia não estar solubilizada no óleo e observou-se limpidez da solução formada. Pipetou-se 20 µL de solução do Eppendorf[®] para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com etanol, obtendo-se uma solução

final que foi então filtrada e injetada em CLAE para quantificação da ubiquinona, utilizando-se as mesmas condições cromatográficas validadas.

4.2.4 Preparação das suspensões nanoestruturadas

As nanoemulsões e suspensões de nanoesferas e nanocápsulas foram preparadas pelos métodos de emulsificação espontânea (MARTINI; CARVALHO; TEIXEIRA, 2007), nanoprecipitação (FESSI et al., 1988) e deposição interfacial de polímero pré-formado (FESSI; PUISIEUX; DEVISSAGUET, 1988), respectivamente.

Para o preparo das nanocápsulas, uma fase orgânica contendo acetona, óleo de pracaxi virgem, Span[®] 60 ou Span[®] 80, PCL ou Eudragit[®] EPO e ubiquinona foi submetida à agitação magnética por 60 minutos, a 40 °C. Após, essa solução foi vertida através de um funil em uma fase aquosa de Tween[®] 80. Após 10 minutos sob agitação, a suspensão foi concentrada em evaporador rotatório a 40° C para eliminação do solvente orgânico e do excesso de água e ajuste do volume final (10 mL), obtendo-se assim a suspensão de nanocápsulas na concentração de 1 mg/mL de ubiquinona.

A preparação das nanoemulsões e nanoesferas ocorreu da mesma forma como foi descrita para a formulação de nanocápsulas, mas omitindo-se o polímero ou o óleo da formulação, respectivamente. Com fins comparativos, formulações sem ubiquinona (brancas) foram preparadas. Todas as formulações foram preparadas em triplicata, sendo que as contendo ubiquinona foram preparadas protegidas da luz e armazenadas em frascos âmbar.

A influência da concentração do óleo, do tipo de tensoativo de baixo EHL e do tipo de polímero foi estudada para a otimização das dispersões coloidais. Foram testados sistemas nanoestruturados com duas concentrações de óleo de pracaxi (1,5% ou 3,0%); com dois tipos de tensoativo de baixo EHL: Span[®] 60 e Span[®] 80; e dois polímeros (PCL ou Eudragit[®]EPO). A composição final das formulações desenvolvidas encontra-se nas tabelas 2, 3 e 4. A nomenclatura das formulações deu-se da seguinte forma: “NE” para nanoemulsões; “NC” para nanocápsulas; “NS” para nanoesferas; “B” para formulações sem ubiquinona; “U” para formulações contendo ubiquinona; “1” para formulações contendo 3% de óleo de pracaxi; “2” para as formulações contendo 1,5% de óleo de pracaxi.

Tabela 2 - Composição quali-quantitativa das nanoemulsões contendo ou não ubiquinona.

Componentes	Formulação			
	NE-B1	NE-B2	NE-U1	NE-U2
Fase Aquosa				
Água (mL)	53	53	53	53
Tween 80 (g)	0,077	0,077	0,077	0,077
Fase Orgânica				
Acetona (mL)	27	27	27	27
Óleo de Pracaxi (g)	0,3	0,15	0,3	0,15
Span 60 (g)	0,077	0,077	0,077	0,077
Ubiquinona (g)	-	-	0,01	0,01

Tabela 3 - Composição quali-quantitativa das nanocápsulas e nanoesferas de PCL contendo ou não ubiquinona.

Componentes	Formulação					
	NCP-B1	NCP-B2	NCP-U1	NCP-U2	NSP-B	NSP-U
Fase Aquosa						
Água (mL)	53	53	53	53	53	53
Tween 80 (g)	0,077	0,077	0,077	0,077	0,077	0,077
Fase orgânica						
Acetona (mL)	27	27	27	27	27	27
PCL (g)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Óleo de Pracaxi (g)	0,3	0,15	0,3	0,15	-	-
Span 60 (g)	0,077	0,077	0,077	0,077	0,077	0,077
Ubiquinona (g)	-	-	0,01	0,01	-	0,01

Tabela 4 - Composição quali-quantitativa das nanocápsulas e nanoesferas de Eudragit® EPO contendo ou não ubiquinona.

Componentes	Formulação					
	NCE-B1	NCE-B2	NCE-U1	NCE-U2	NSE-B	NSE-U
Fase Aquosa						
Água (mL)	53	53	53	53	53	53
Tween 80 (g)	0,077	0,077	0,077	0,077	0,077	0,077
Fase Orgânica						
Acetona (mL)	27	27	27	27	27	27
Eudragit EPO (g)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Óleo de Pracaxi (g)	0,3	0,15	0,3	0,15	-	-
Span 80 (g)	0,077	0,077	0,077	0,077	0,077	0,077
Ubiquinona (g)	-	-	0,01	0,01	-	0,01

4.2.5 Caracterização físico-química dos sistemas nanoestruturados

As formulações preparadas foram avaliadas através da determinação das seguintes características físico-químicas: pH, diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta, teor de fármaco e eficiência de encapsulamento.

4.2.5.1 Determinação do pH

O pH foi determinado logo após a preparação dos sistemas nanoestruturados diretamente nos mesmos, mediante a utilização de potenciômetro previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,00 e 7,00.

4.2.5.2 Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta

O tamanho das partículas ou gotículas, bem como o índice de polidispersão foram avaliados por espectroscopia de correlação de fótons a 25 °C, após diluição das amostras em água ultrapura (500x) no equipamento ZetaSizer Nano Series.

Com relação ao potencial zeta, este foi determinado por mobilidade eletroforética, no mesmo equipamento, após diluição das amostras em NaCl 10 mM (500x).

4.2.5.3 Determinação do teor e da eficiência de encapsulamento da ubiquinona

O teor total de ubiquinona nas formulações foi determinado por CLAE utilizando-se o método validado anteriormente citado. As amostras foram preparadas através da diluição de 150 µL da suspensão nanoestruturada em balão volumétrico de 10 mL, sendo este completado com acetonitrila e a solução resultante filtrada em membrana de celulose de porosidade 0,45 µm previamente à injeção no cromatógrafo.

A quantidade de ubiquinona associada aos sistemas nanoestruturados (taxa de associação ou eficiência de encapsulamento) foi determinada no ultrafiltrado por CLAE, após a separação das nanoestruturas por ultrafiltração-centrifugação (Amicon® Ultra 10,000 MW). Dessa forma, 200 µL das suspensões foram pipetados para os dispositivos, que permaneceram no equipamento de ultrafiltração-centrifugação por 10 minutos a 2200 xg, para obtenção do ultrafiltrado. A eficiência de encapsulamento (%) foi calculada pela diferença entre as concentrações total e livre de ubiquinona, determinadas nas nanoestruturas e no ultrafiltrado, respectivamente, através da seguinte equação:

$$EE = \frac{\text{Teor total} - \text{Teor livre}}{\text{Teor total}} \times 100$$

4.2.6 Avaliação da fotoestabilidade da ubiquinona nos sistemas nanoestruturados

Após a preparação, 700 µL das formulações NE-U2, NCP-U2, NCE-U2 e NSP-U foram colocados em cubetas de plástico transparente fechadas e estas expostas à radiação UVC em uma câmara espelhada. Nos intervalos de 0,5, 1, 2, 3 e 4 horas de exposição, retirou-se uma alíquota de 150 µL de amostra, diluiu-se com acetonitrila em balão volumétrico de 10 mL e a concentração de ubiquinona nas formulações foi determinada por CLAE, procedendo-se à análise como descrito para a determinação do teor. Com fins comparativos, o estudo foi

realizado também com uma solução etanólica de ubiquinona (1 mg/mL). Além disso, as amostras foram avaliadas protegidas da luz (controle escuro), revestindo-se a cubeta com papel alumínio a fim de confirmar que a degradação ocorreu pela exposição à radiação e não pelas condições experimentais. As análises foram conduzidas em triplicata ($n=3$).

A fim de avaliar a cinética de degradação do fármaco, os dados foram plotados em gráficos de concentração de ubiquinona *versus* tempo (reação de ordem zero), \ln da concentração de ubiquinona *versus* tempo (reação de primeira ordem) e inverso da concentração de ubiquinona *versus* tempo (reação de segunda ordem).

As equações correspondentes a cada modelo cinético e seus respectivos tempos de meia-vida e $t_{90\%}$ estão representados a seguir:

$$\begin{array}{llll}
 C = C_o - kt & t_{1/2} = C_o/2k & t_{90\%} = 0,1 C_o/k & \text{(reação de ordem zero)} \\
 \ln C = \ln C_o - kt & t_{1/2} = 0,693/k & t_{90\%} = 0,106/k & \text{(reação de primeira ordem)} \\
 1/C = 1/C_o + kt & t_{1/2} = 1/C_o k & t_{90\%} = 1/9kC_o & \text{(reação de segunda ordem)}
 \end{array}$$

Onde C_o é a concentração inicial, C é a concentração após o tempo de retenção t e k é a constante de reação (NUDELMAN, 1975).

4.2.7 Estudo de estabilidade acelerado das formulações contendo ubiquinona

A fim de estabelecer a estabilidade físico-química das formulações propostas, as suspensões nanoestruturadas NE-U2, NCP-U2, NCE-U2 e NSP-U foram armazenadas por 90 dias nas seguintes condições:

- em câmara de estabilidade à temperatura de $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $75 \pm 5\%$ e protegidas da luz natural;
- à temperatura ambiente (meses de outubro a janeiro) e protegidas da luz natural.

Nos tempos 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias, foram coletadas amostras das suspensões nanoestruturadas, sendo estas submetidas às análises de diâmetro médio, potencial zeta, pH e teor de fármaco, procedendo-se como citado anteriormente. O experimento foi conduzido em triplicata de lote.

4.2.8 Teste de hemólise semi-quantitativo

Eritrócitos humanos foram obtidos através da coleta de sangue (4 mL) de doadores voluntários saudáveis em tubos heparinizados. Após, os eritrócitos foram isolados por centrifugação a 3400 rpm durante 10 minutos para retirada do plasma e células brancas. O pélete de células vermelhas foi lavado três vezes com solução salina, sendo ressuspendido e diluído na mesma solução a uma concentração final de 10%. As formulações NCP-B2 e NCP-U2 foram adicionadas à suspensão de eritrócitos e incubadas por 4 horas a 37°C, sob agitação constante, atingindo concentrações de 0,9, 0,5, 0,25, 0,1, 0,075, 0,05, 0,025, 0,01, 0,0075 e 0,005 mg/mL. A seguir, procedeu-se a centrifugação das amostras a 1200 rpm por 10 minutos e observou-se visualmente o grau de hemólise presente em cada tubo. A fim de obter-se hemólise completa das amostras, foi utilizada água como controle positivo, enquanto que para observar-se a hemólise espontânea foi utilizada solução salina (controle negativo). Os experimentos foram conduzidos utilizando-se três amostras de sangue e em triplicata de lote de formulação.

4.2.9 Estudo de citotoxicidade *in vitro*

O estudo de citotoxicidade das formulações propostas foi realizado em linhagem de células de glioma de ratos (C6) e de carcinoma de mama humano (MCF-7) obtidas da American Type Culture Collection (ATCC). As células de glioma (C6) e MCF-7 foram cultivadas em monocamada em meio de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino, à 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Após as células atingirem 90% de confluência, estas foram submetidas à tripsinização e contagem em câmara de Neubauer, sendo então realizada semeadura de 10.000 células por poço em placas de 96 poços. As placas foram mantidas à 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ por 48 horas. Após, as células foram tratadas com as formulações de nanocápsulas NCP-B2 e NCP-U2 em concentrações de 10, 20, 30 e 100 µM e também com o óleo de pracaxi livre (10 e 100 µM) e a ubiquinona livre (10, 20, 30 e 100 µM), solubilizados em DMSO.

Após o tratamento, a viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT, que tem como princípio a determinação da capacidade de células vivas em reduzirem o sal brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), formando cristais insolúveis de formazan de coloração violeta. Uma solução de MTT (solução-estoque estéril de 5 mg/mL) foi adicionada ao meio de incubação dos poços, a uma concentração final de 0,5 mg/mL. As células foram deixadas durante 60 minutos à 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ umidificada. O meio foi então removido e as placas foram agitadas com DMSO durante 30 minutos. Posteriormente, a densidade óptica de cada poço foi medida em Espectrofotômetro a 492 nm. A citotoxicidade de cada tratamento foi expressa pela porcentagem de viabilidade celular, calculada em relação ao controle (BRAGANHOL et al., 2009).

4.2.10 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através da Análise de Variância (ANOVA) e Tukey ou teste *t*, a um nível de significância de 5%, com auxílio do software SigmaStat® 3.0.1 (SPSS Inc.).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Validação do método analítico de CLAE para a determinação do teor de ubiquinona nas suspensões nanoestruturadas

Previamente à determinação do teor de ubiquinona nos sistemas nanoestruturados, foi realizada a validação do método analítico a ser utilizado. As formulações escolhidas para a validação foram as nanocápsulas de PCL e Eudragit[®] EPO, tendo em vista que estas contem os excipientes presentes tanto nas nanoemulsões quanto nas nanoesferas, garantindo assim que o método possa ser utilizado para a quantificação do fármaco também nestes nanocarreadores.

O método mostrou-se específico para determinar a ubiquinona nas formulações testadas, já que a comparação entre os cromatogramas das nanocápsulas com fármaco (NCP-U2 e NCE-U2) e sem fármaco (NCP-B2 e NCE-U2) não demonstra interferência dos excipientes da formulação no pico do fármaco (Figura 6). O índice de pureza de pico fornecido pelo detector com arranjo de diodos foi de 1,0000.

Com relação à linearidade, foi observada uma relação linear entre a concentração de ubiquinona e a área de pico obtida na faixa de concentração analisada (5,0 – 25,0 µg/mL). A equação da reta obtida ($n = 3$) foi $y = 21892x - 10780$, com um coeficiente de correlação de 0,9998. A análise de variância (ANOVA) indicou que a equação de regressão foi linear ($F_{\text{calculado}} = 100220,36 > F_{\text{crítico}} = 4,96$, $p < 0,05$).

A avaliação da exatidão mostrou porcentagens de recuperação entre 96 e 102% para as nanocápsulas de PCL e entre 99 e 105% para as de Eudragit[®] EPO (Tabela 5), o que indica que o método é exato na faixa de concentração estudada.

Quanto à precisão do método, ambos os ensaios intra-dia e inter-dia obtiveram valores de DPR menores que 2% na avaliação do teor de ubiquinona nas nanocápsulas, como mostra a Tabela 6, o que demonstra que o método foi preciso.

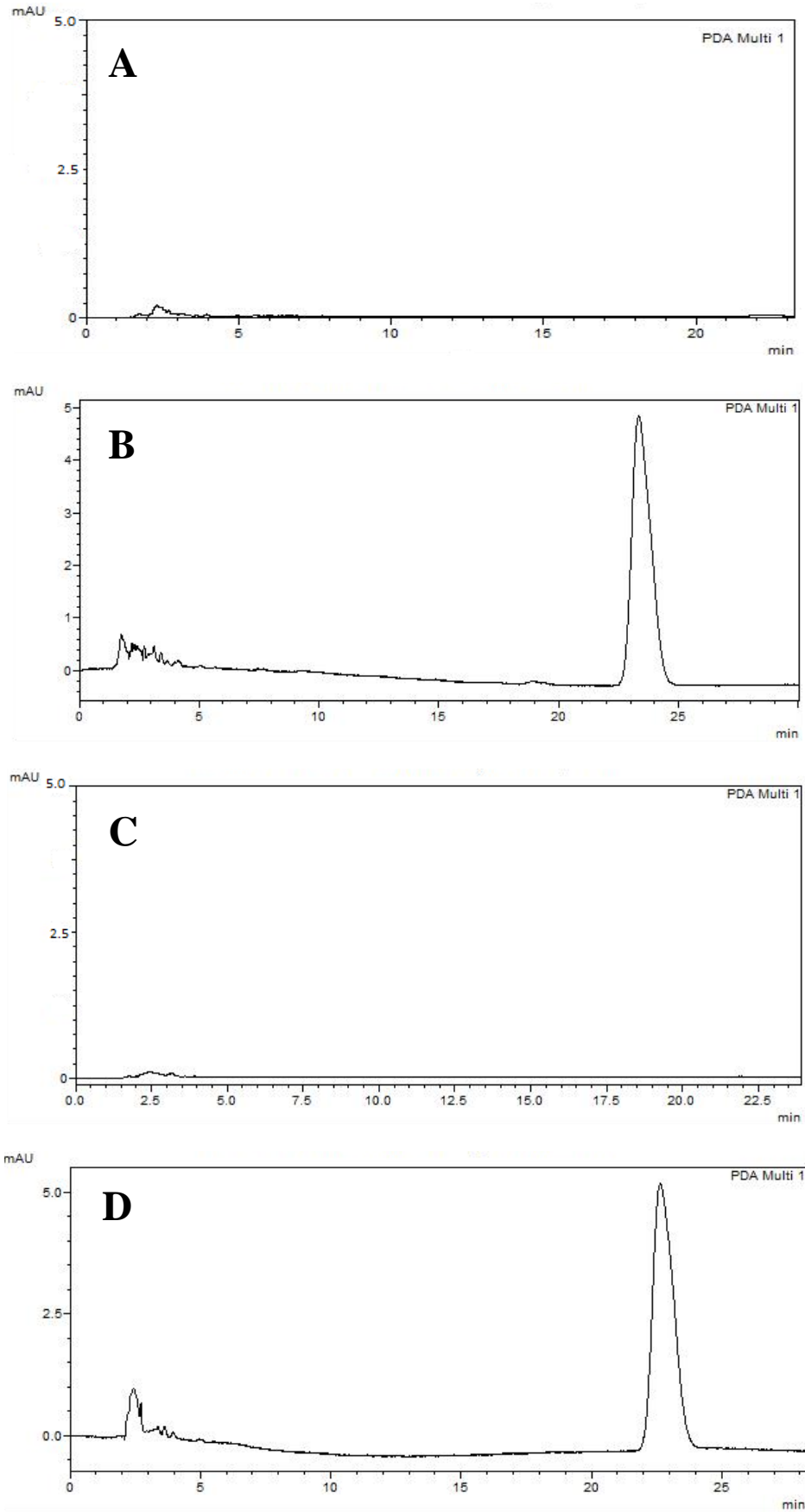


Figura 6 – Cromatogramas das nanocápsulas de PCL e Eudragit[®] EPO. **A:** NCP-B2; **B:** NCP-U2; **C:** NCE-B2; **D:** NCE-U2.

Tabela 5 – Exatidão do método analítico por CLAE para determinação da ubiquinona nas suspensões de nanocápsulas.

Formulação	Níveis de concentração	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração encontrada (µg/mL)	Recuperação (%)	DPR (%)
NCP-U2	Baixa	7,5	7,2	96,04	1,89
	Média	12,5	12,77	102,16	0,69
	Alta	17,5	17,67	100,99	1,73
NCE-U2	Baixa	7,5	7,54	100,64	0,69
	Média	12,5	12,47	99,82	0,35
	Alta	17,5	18,48	105,64	1,08

Tabela 6 - Repetibilidade e precisão inter-dia das amostras contendo ubiquinona.

	Concentração teórica (µg/ mL)	Concentração encontrada (µg/ mL)	Recuperação (%)	DPR (%)
Dia 1 (n=6)	15	15,13 ± 0,34	100,92	2,32
Dia 2 (n=6)	15	15,18 ± 0,22	101,21	1,5
Média ± DP	15	15,13 ± 0,03	101,07	0,08

5.2 Teste de inchamento/dissolução de filmes poliméricos

O teste de inchamento/dissolução de filmes poliméricos foi realizado previamente à preparação dos sistemas nanocarreadores, a fim de verificar se há interação entre o óleo de pracaxi e os polímeros PCL e Eudragit® EPO. As tabelas 7 e 8 apresentam o resultado das pesagens de três amostras dos polímeros após o contato com o óleo durante 60 dias.

Observando-se a tabela 6, pode-se verificar que após os 60 dias em contato com o óleo, a PCL não apresentou alteração de peso estatisticamente significativa ($p > 0,05$) e, portanto, não houve interação entre este polímero e o óleo de pracaxi. Para a formação do envoltório polimérico das nanocápsulas, o polímero deve ser insolúvel tanto no óleo como no meio

aquoso. Assim, a PCL mostrou-se adequada para a preparação das nanocápsulas contendo óleo de pracaxi propostas neste trabalho.

Por outro lado, como se pode observar na tabela 8, os filmes de Eudragit[®] EPO apresentaram alteração de peso durante a imersão no óleo, sendo que aos 60 dias não foi possível realizar a pesagem, pois os filmes estavam parcialmente dissolvidos no óleo de pracaxi. De forma semelhante, Guterres e colaboradores (2000), observaram a dissolução de filmes de PCL e PLA em contato com benzoato de benzila, atribuindo a isso a possível formação de uma dispersão de micelas coloidais ao invés de nanocápsulas. Dessa forma, ao associar-se Eudragit[®] EPO e óleo de pracaxi, não é viável a formação de uma estrutura casca-núcleo e, conseqüentemente, das nanocápsulas pretendidas, o que corrobora os resultados de estabilidade limitada apresentados por estes sistemas em comparação às nanocápsulas de PCL (ver seção 5.6).

Tabela 7 - Peso dos filmes de PCL após 60 dias de imersão em óleo de pracaxi.

	Dias						MD	DP	CV (%)	
	1	3	5	7	11	28				60
F 1* (g)	0,0219	0,0218	0,0215	0,0215	0,0216	0,0216	0,0220	0,0217	0,0002	0,8692
F 2* (g)	0,0239	0,0240	0,0233	0,0235	0,0240	0,0234	0,0240	0,0237	0,0003	1,2321
F 3* (g)	0,0258	0,0256	0,0254	0,0256	0,0256	0,0260	0,0259	0,0257	0,0002	0,7996

F 1: filme 1; F 2: filme 2; F 3: filme 3; MD: média dos pesos; DP: desvio padrão; CV (%): coeficiente de variação.

Tabela 8 - Peso dos filmes de Eudragit[®] EPO após 60 dias de imersão em óleo de pracaxi.

	Dias						MD	DP	CV (%)	
	1	3	5	7	11	28				60
F 1* (g)	0,0615	0,0631	0,0642	0,0615	0,0598	0,0481	-	0,0597	0,0059	9,8489
F 2* (g)	0,0577	0,0585	0,059	0,0564	0,0540	0,0421	-	0,0546	0,0064	11,6959
F 3* (g)	0,0550	0,0559	0,0560	0,0548	0,0534	0,0419	-	0,0528	0,0054	10,2925

F 1: filme 1; F 2: filme 2; F 3: filme 3; MD: média dos pesos; DP: desvio padrão; CV (%): coeficiente de variação

5.3 Teste de solubilidade da ubiquinona no óleo de pracaxi

Tendo em vista que o óleo escolhido para o preparo de nanoemulsões e nanocápsulas é o constituinte formador da gotícula/núcleo da vesícula, mostra-se relevante verificar a solubilidade do fármaco no óleo proposto, pois esta característica é indicativa de que o fármaco pode ser encapsulado adequadamente no sistema.

Como pode ser observado na figura 7, a ubiquinona formou uma solução homogênea quando adicionada ao óleo de pracaxi na proporção testada. Este resultado encontra-se de acordo com o esperado, já que a ubiquinona é uma substância de caráter lipofílico. Além disso, após injeção da solução para quantificação do fármaco em CLAE, foi constatado que a solubilidade da ubiquinona no óleo de pracaxi é de 46,6 mg/mL.

Dessa maneira, demonstrou-se a solubilidade da ubiquinona neste óleo vegetal, resultado considerado positivo, na medida em que indica provável localização do fármaco dissolvido na gotícula (no caso das nanoemulsões) ou no núcleo oleoso da nanopartícula em suspensão, estando associado adequadamente ao sistema.



Figura 7 – Tubo contendo solução de ubiquinona em óleo de pracaxi após homogeneização em vórtex e microcentrifugação.

5.4 Caracterização físico-química das nanoestruturas

Na etapa de otimização da composição das formulações nanoestruturadas, primeiramente foram preparadas nanocápsulas contendo óleo de pracaxi (3% m/v), PCL (1% m/v) e Span[®] 80 (0,77% m/v) na fase orgânica. Entretanto, esta formulação pareceu precipitar logo após a remoção do excesso de solvente e ajuste do volume final no evaporador rotatório. Isso sugere que pode haver alguma interação entre estas três matérias-primas, nestas concentrações, que inviabilizou o preparo desta formulação. Cabe ressaltar que outros autores relataram o uso do mesmo polímero com Span[®] 80, porém com outros óleos na formulação de nanocápsulas (FRIEDRICH et al., 2008; OURIQUE et al., 2008; FLORES et al., 2011). A partir deste resultado negativo, verificou-se a viabilidade de preparação destas nanocápsulas utilizando-se Span[®] 60, mantendo-se a mesma proporção dos constituintes. Com esta modificação, observou-se que as suspensões obtidas apresentaram o aspecto macroscópico desejado, mas após as análises de tamanho e índice de polidispersão verificou-se que estes parâmetros deveriam ser melhorados, pois as partículas apresentaram diâmetro elevado e sua distribuição de tamanho não estava homogênea. Tendo em vista que a quantidade de óleo utilizada na composição de nanocápsulas interfere no diâmetro obtido pelas partículas, prosseguiu-se a preparação das nanocápsulas de PCL com metade da concentração usual de óleo de pracaxi (1,5 % m/v), no intuito de diminuir o tamanho final das partículas e melhorar a homogeneidade das mesmas. Foram preparadas também nanoesferas de PCL e nanoemulsões de óleo de pracaxi, todas contendo Span[®] 60 como tensoativo de baixo EHL.

Quanto às nanocápsulas de Eudragit[®] EPO, estas foram preparadas inicialmente utilizando-se o polímero na concentração de 1%, óleo de pracaxi a 3% e Span[®] 60 a 0,77%, porém o uso deste tensoativo não se demonstrou adequado, visto que também ocorreu precipitação da formulação após evaporação do solvente. Portanto, testou-se a mesma formulação, porém o Span[®] 80 foi utilizado como tensoativo de baixo EHL. Com esta modificação foi verificada a viabilidade de preparo desta formulação. Foram preparadas também nanoesferas de Eudragit[®] EPO utilizando-se Span[®] 80.

Após a preparação, a análise macroscópica das suspensões nanoestruturadas revelou que todas as formulações sem ubiquinona em sua composição apresentaram-se como um líquido leitoso e opalescente com reflexo azulado, relacionado ao movimento browniano das estruturas coloidais (Efeito Tyndall), enquanto que as formulações contendo o fármaco apresentaram-se como um líquido leitoso levemente amarelado, o que pode ser atribuído à cor

amarelo-alaranjada característica da ubiquinona. Além disso, é importante salientar que nenhuma das formulações apresentou precipitação visível.

Os resultados das avaliações físico-químicas desenvolvidas neste trabalho podem ser visualizados nas Tabelas 9, 10 e 11. Os gráficos de distribuição de tamanho e de potencial zeta encontram-se nos apêndices A e B deste manuscrito.

Tabela 9 - Características físico-químicas das nanoemulsões contendo óleo de praxaxi ($n = 3$; resultados expressos como média \pm desvio padrão).

Formulação	Diâmetro médio (nm)	IPD*	Pot. Zeta (mV)	pH	Teor (mg/mL)	EE* (%)
NE-B1	283 \pm 22	0,260 \pm 0,04	-22,17 \pm 13,10	5,8 \pm 0,4	-	-
NE-B2	209 \pm 24	0,172 \pm 0,05	-16,98 \pm 7,21	6,4 \pm 0,2	-	-
NE-U1	417 \pm 102	0,393 \pm 0,01	-22,04 \pm 6,06	6,1 \pm 0,1	0,94 \pm 0,06	100
NE-U2	270 \pm 20	0,194 \pm 0,01	-18,02 \pm 0,16	6,2 \pm 0,2	0,99 \pm 0,05	100

*IPD: Índice de Poldispersão; EE: Eficiência de encapsulamento.

Tabela 10 - Características físico-químicas das nanocápsulas e nanoesferas de PCL ($n = 3$; resultados expressos como média \pm desvio padrão).

Formulação	Diâmetro médio (nm)	IPD*	Pot. Zeta (mV)	pH	Teor (mg/mL)	EE* (%)
NCP-B1	313 \pm 8	0,301 \pm 0,04	-19,46 \pm 3,85	6,1 \pm 0,0	-	-
NCP-B2	288 \pm 13	0,277 \pm 0,01	-14,83 \pm 3,27	5,9 \pm 0,6	-	-
NCP-U1	386 \pm 57	0,357 \pm 0,06	-21,87 \pm 7,44	6,0 \pm 0,0	0,97 \pm 0,04	99
NCP-U2	261 \pm 55	0,225 \pm 0,01	-15,37 \pm 2,33	6,1 \pm 0,1	0,99 \pm 0,07	100
NSP-B	204 \pm 09	0,202 \pm 0,02	-12,62 \pm 2,37	7,8 \pm 0,2	-	-
NSP-U	175 \pm 16	0,126 \pm 0,03	-19,24 \pm 5,09	6,8 \pm 0,4	0,98 \pm 0,05	99

*IPD: Índice de Poldispersão; EE: Eficiência de encapsulamento.

Tabela 11 - Características físico-químicas das nanocápsulas e nanoesferas de Eudragit® EPO ($n = 3$; resultados expressos como média \pm desvio padrão).

Formulação	Diâmetro médio (nm)	IPD*	Pot. Zeta (mV)	pH	Teor (mg/mL)	EE* (%)
NCE-B1	212 \pm 25	0,257 \pm 0,07	41,89 \pm 0,27	7,2 \pm 0,2	-	-
NCE-B2	234 \pm 69	0,253 \pm 0,10	42,82 \pm 2,17	7,5 \pm 0,0	-	-
NCE-U1	199 \pm 08	0,205 \pm 0,03	45,95 \pm 1,78	7,1 \pm 0,2	0,98 \pm 0,05	97
NCE-U2	169 \pm 09	0,145 \pm 0,02	44,05 \pm 0,65	7,2 \pm 0,1	0,99 \pm 0,02	99
NSE-B	97 \pm 18	0,228 \pm 0,03	25,12 \pm 9,21	7,7 \pm 0,0	-	-
NSE-U	111 \pm 13	0,242 \pm 0,01	25,59 \pm 8,88	7,1 \pm 0,4	0,36 \pm 0,02	-

*IPD: Índice de Polidispersão; EE: Eficiência de encapsulamento.

O diâmetro das partículas e sua distribuição são as características mais importantes dos sistemas nanoparticulados, pois influenciam a distribuição *in vivo*, a toxicidade e a capacidade de liberação do fármaco no sítio desejado, podendo ainda influenciar no encapsulamento do fármaco e na estabilidade das nanopartículas (MOHANRAJ et al., 2006). Todos os sistemas nanoestruturados estudados apresentaram diâmetro médio submicrométrico, independente de apresentarem ou não ubiquinona em suas composições.

Geralmente, o diâmetro médio de nanocápsulas preparadas a partir de polímeros pré-formados é de 250 a 500 nm (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Como pode ser observado na tabela 10, as médias dos diâmetros das nanocápsulas de PCL variaram entre 261 e 386 nm. As formulações NCP-B2 e NCP-U2 apresentaram os menores tamanhos, sendo que esta última diferiu significativamente da formulação NCP-U1 ($p < 0,05$). Isso pode ser explicado pelo fato de que no processo de formação das nanocápsulas ocorre rápida difusão da fase orgânica na fase aquosa, gerando uma turbulência interfacial durante o deslocamento do solvente, a qual é responsável pela formação das vesículas em suspensão. Assim, o aumento da concentração de algum dos componentes da fase orgânica, como o polímero, ou nesse caso, o óleo, tornaria essa fase mais viscosa e proporcionaria maior resistência à transferência de massa e conseqüente difusão mais lenta entre as fases, levando à formação de nanopartículas com diâmetro maior (GALINDO-RODRIGUEZ et al., 2004). O contrário também é válido e, portanto, como foi utilizada uma menor quantidade de óleo (0,15 g) na preparação da formulação NCP-U2, a fase orgânica apresentou-se menos viscosa, formando-

se partículas em suspensão com um pequeno núcleo oleoso e menor diâmetro final do que a NCP-U1.

Quanto às nanoemulsões, os diâmetros médios das gotículas variaram entre 209 e 417 nm (Tabela 9), corroborando a faixa de tamanho esperada para estas formulações, que é de 20 a 600 nm (BOUCHEMAL et al., 2004; TADROS et al., 2004). Além disso, os resultados estão de acordo com nanoemulsões obtidas através do procedimento de emulsificação espontânea em estudos prévios (TRIMAILLE et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2003). Assim como para as nanocápsulas de PCL, as nanoemulsões preparadas com maior quantidade de óleo (NE-B1 e NE-U1) apresentaram diâmetros maiores, sendo que esta última diferiu significativamente da respectiva formulação com menor concentração de óleo de pracaxi ($p < 0,05$).

Segundo Tadros e colaboradores (2004), o diâmetro das gotículas é uma característica de grande importância nas nanoemulsões, tendo em vista que seu tamanho reduzido gera uma diminuição na força de gravidade e o movimento browniano pode ser suficiente para superá-la, prevenindo assim os fenômenos de sedimentação ou cremagem durante o armazenamento. O pequeno tamanho da gotícula previne também a floculação, permitindo ao sistema permanecer disperso, sem separação de fases. O fenômeno de coalescência também pode ser evitado, já que essas gotículas não são deformáveis e, portanto, as flutuações de superfície são impedidas. Além disso, a espessa película de tensoativo (em relação ao raio da gotícula) impede o rompimento do filme líquido entre as gotículas. Estas propriedades das nanoemulsões são de especial interesse para aplicações práticas e dessa forma, a estabilidade cinética acentuada destes sistemas em solução aquosa pode consistir em uma estratégia adequada para melhorar a solubilidade da ubiquinona (USON; GARCIA; SOLANS, 2004; HATANAKA et al., 2008).

A fim de avaliar a influência da presença do núcleo oleoso no diâmetro das nanopartículas poliméricas, foram desenvolvidas nanoesferas de PCL, preparadas da mesma maneira que as nanocápsulas de PCL, porém omitindo-se o óleo da composição. Os diâmetros obtidos encontram-se na faixa de 175 a 204 nm (Tabela 10), sendo que a presença do fármaco na matriz polimérica não influenciou significativamente o tamanho da partícula ($p > 0,05$). Estes valores estão de acordo com o esperado para nanoesferas preparadas pelo método de nanoprecipitação (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009). Entretanto, a nanoesfera contendo ubiquinona apresentou tamanho significativamente menor do que a nanoemulsão de óleo de pracaxi e a nanocápsula de óleo de pracaxi e PCL ($p < 0,05$), o que demonstra o papel do óleo na formação do núcleo e, por conseguinte, no diâmetro final obtido pela partícula.

Quanto às nanocápsulas e nanoesferas de Eudragit[®] EPO, estas foram preparadas a fim de comparar-se a influência de dois diferentes polímeros nas características do sistema. Pode-se observar que as nanocápsulas contendo este polímero apresentaram diâmetros de partículas menores que as NCs de PCL e que as NEs, sendo que houve diferença significativa entre a formulação NCE-U2 (Tabela 11) e as formulações NCP-U2 (Tabela 10) e NE-U2 (Tabela 9) ($p < 0,05$). Com relação às nanoesferas de Eudragit[®] EPO, estas apresentaram média de diâmetros entre 97 e 111 nm (Tabela 11). A NSE-U apresentou diâmetro estatisticamente menor que a NCE-U2 e que a NSP-U ($p < 0,05$). Além disso, o diâmetro das nanoesferas foi menor que o encontrado por outros autores que prepararam nanopartículas de Eudragit[®] EPO anteriormente, por um método de nanoprecipitação adaptado, utilizando Pluronic[®] F-68 como estabilizante (CHELLAMPILLAI; PAWAR, 2010).

Observou-se também que tanto a suspensão de nanoesferas de PCL quanto a de Eudragit[®] EPO apresentaram aspecto mais translúcido que as suspensões de nanocápsulas de ambos os polímeros e que as nanoemulsões, o que pode ser devido ao menor diâmetro de partícula formado no caso das nanoesferas (Tabela 9).

Quanto ao índice de polidispersão, todas as formulações contendo a menor concentração de óleo (1,5%) apresentaram valores mais satisfatórios. De uma forma geral, as nanoestruturas obtidas através de diferentes métodos de preparação apresentam uma distribuição unimodal, com baixo índice de polidispersão (CALVO; VILA-JATO; ALONSO, 1996; GOVENDER et al., 2000; AVGOUSTAKIS et al., 2002). Valores próximos a 0,2 indicam que há uma estreita distribuição de tamanho e, conseqüentemente, uma homogeneidade adequada destes sistemas. Portanto, as formulações NE-U2, NCP-U2 e NCE-U2 apresentaram população de partículas/gotículas monodispersa, resultado que está de acordo com outros estudos envolvendo nanopartículas e nanoemulsões formuladas com óleos vegetais (ALMEIDA et al., 2009; FRIEDRICH et al., 2008, SAKKEENA et al., 2011).

Com relação à caracterização da superfície das nanopartículas, um método muito empregado envolve a medida do potencial zeta, o qual reflete o potencial da superfície da partícula. Este potencial é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (MAGENHEIM; BENITA, 1991; MOSQUEIRA et al., 2000). As nanopartículas usualmente apresentam um potencial zeta diferente de zero, o que conduz a sistemas relativamente estáveis, devido à alta barreira energética entre as partículas (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Observando-se a Tabela 10, verifica-se que todas as formulações contendo PCL em sua composição apresentaram valores de potencial zeta negativos, independentemente do tipo de sistema nanoestruturado e da presença de ubiquinona. Segundo Mora-Huertas e colaboradores (2010), o potencial zeta das nanopartículas depende principalmente da natureza química do polímero, dos estabilizantes e do pH do meio. Portanto, quando as NCs são preparadas a partir de poliésteres e utilizando-se estabilizantes não-iônicos, como no presente estudo, são obtidos valores negativos de potencial zeta devido à presença de grupos terminais carboxílicos na estrutura do polímero, o que confere característica aniônica à partícula.

Além disso, o potencial zeta apresentado pelas NCs (Tabela 10) foi similar ao das NEs (Tabela 9), não havendo diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$), o que já foi relatado previamente na literatura (CRUZ et al., 2006; OURIQUE et al., 2008; FONTANA et al., 2009). Outros autores concluíram que essa similaridade sugere que a camada polimérica ao redor das gotículas de óleo poderia não ser contínua (LOSA et AL., 1993; CALVO; VILA-JATO; ALONSO, 1996).

Outro fator que pode influenciar os valores de potencial zeta obtidos é a presença da ubiquinona, pois as formulações brancas, de modo geral, apresentaram menor potencial zeta em módulo. Esta relação entre a presença de ubiquinona nas nanopartículas e um aumento no potencial zeta das mesmas foi previamente relatada no trabalho de Zhou e colaboradores (2010). Neste trabalho, foram preparados carreadores lipídicos nanoestruturados com e sem ubiquinona, sendo que as formulações contendo fármaco apresentaram valores de potencial zeta maiores que aquelas sem a presença do mesmo. Os autores atribuíram esse achado ao fato de a ubiquinona possuir grupos carbonila e duplas ligações carbono-carbono com cargas negativas em sua estrutura.

Quanto às nanocápsulas contendo Eudragit[®] EPO, todas as formulações apresentaram potencial zeta positivo (em torno de +42 mV), sendo o mesmo observado no caso das nanoesferas preparadas com este polímero. Isso pode ser atribuído à estrutura do polímero, que contém vários grupamentos amônio responsáveis pela característica catiônica do mesmo. Os valores encontrados para as nanocápsulas não diferiram significativamente entre si ($p > 0,05$), entretanto o potencial zeta destas foi maior, em módulo, do que o obtido para as nanoestruturas contendo PCL ($p < 0,05$). Além disso, as nanoesferas de Eudragit[®] EPO apresentaram potencial zeta significativamente menor que as nanocápsulas contendo o mesmo polímero ($p < 0,05$), mas não diferiu (em módulo) das nanoesferas de PCL. Os valores encontrados estão de acordo com a literatura (CHELLAMPILLAI; PAWAR, 2010).

Geralmente, os valores de pH das dispersões de nanopartículas preparadas pelo

método de nanoprecipitação encontram-se na faixa de 3,0 a 7,5. Informações relevantes sobre a estabilidade das formulações podem ser obtidas mediante o monitoramento do pH, em função do tempo. Além disso, o pH também parece ser um fator importante na sua biodistribuição (SCHAFFAZICK et al., 2003; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

A determinação do pH das formulações foi realizada logo após a preparação das mesmas. As nanoemulsões apresentaram valores médios entre 5,8 e 6,4, enquanto que as nanocápsulas de PCL entre 5,9 a 6,1. Os valores de pH levemente ácidos das NEs e NCs podem ser explicados devido à presença do óleo de pracaxi, em função da sua composição rica em ácidos graxos. Por outro lado, as nanoesferas de PCL apresentaram pH de 6,8 e 7,8 para as formulações com e sem ubiquinona, respectivamente, demonstrando diferença significativa ($p < 0,05$). Além disso, os nanocarreadores contendo Eudragit[®] EPO apresentaram pH entre 7,1 e 7,7, valores significativamente maiores que as nanoemulsões e que as nanocápsulas de PCL ($p < 0,05$).

Após o método analítico estar validado, procedeu-se a quantificação da ubiquinona nas suspensões nanoestruturadas. Observando-se as tabelas 9, 10 e 11, pode-se verificar que todas as formulações apresentaram teores próximos da concentração teórica de 1 mg/mL, exceto a NSE-U, que apresentou teores de cerca de 36%, demonstrando a fragilidade desta formulação e a inviabilidade de encapsulamento do fármaco de maneira adequada neste sistema.

A determinação da eficiência de encapsulamento do fármaco nos sistemas nanoestruturados é de extrema importância na avaliação destes, visto que o conteúdo de fármaco associado às partículas ou gotículas pode influenciar nas características do sistema, assim como o inverso também é válido, e diversos fatores são capazes de influenciar a quantidade de fármaco associada. Dentre os fatores destacam-se as características físico-químicas do fármaco, o pH do meio, as características da superfície das partículas ou a natureza do polímero, a quantidade de fármaco adicionada à formulação, a natureza do óleo e o tipo de tensoativo adsorvido à superfície polimérica (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Devido às nanoestruturas serem sistemas coloidais, é difícil determinar precisamente o conteúdo de fármaco encapsulado. Portanto, uma maneira confiável para separar o fármaco livre das nanoestruturas é através da técnica de ultrafiltração-centrifugação (KUMARI et al., 2010), método utilizado neste estudo. A eficiência de encapsulamento (%) das nanoestruturas foi calculada pela diferença entre o teor total de ubiquinona e a ubiquinona livre, sendo que os valores obtidos para todas as formulações estudadas foram próximos de 100%, resultado similar à eficiência de encapsulamento de outros sistemas nanoestruturados contendo

ubiquinona previamente estudados (KWON et al., 2002; XIA et al., 2006; NEHILLA et al., 2008; WANG et al., 2010; FARBOUD et al., 2011, SWARNAKAR et al., 2011).

Como mencionado anteriormente, a natureza química da substância ativa é um dos fatores que determina a eficiência de encapsulamento, sendo que em geral a lipofilia do fármaco é a característica mais importante na partição deste entre as fases da dispersão coloidal (SHENOY; AMIJI, 2005; STELLA et al., 2007). Recentemente, Oliveira e colaboradores (2013), desenvolveram experimentalmente um algoritmo utilizando diferentes fármacos encapsulados em nanocápsulas de núcleo-lipídico, a fim de prever os mecanismos de distribuição dos fármacos neste sistema modelo. Os autores atribuem maior probabilidade de o fármaco localizar-se no núcleo das nanocápsulas estudadas quanto maior for sua lipofilia, que foi calculada utilizando-se o $\log D$.

Levando-se em consideração que a ubiquinona é uma substância extremamente lipofílica e que seu $\log D$ é de 20,93, altas taxas de encapsulamento da ubiquinona nos sistemas propostos no presente trabalho eram esperadas. Além disso, esse resultado indica que a ubiquinona está totalmente associada às nanopartículas, podendo estar, no caso das nanocápsulas, tanto adsorvida na parede polimérica como localizada no núcleo oleoso, na forma dissolvida ou dispersa molecularmente (SCHAFFAZICK et al., 2003). Considerando-se o teste de solubilidade da ubiquinona no óleo de pracaxi, há maior probabilidade de o fármaco estar associado ao núcleo oleoso, tendo em vista sua elevada solubilidade no óleo, pois 10 partes de ubiquinona foram solúveis em menos de 1 parte de óleo de pracaxi.

A partir das avaliações acima citadas, os estudos subseqüentes foram realizados utilizando-se as formulações contendo menor quantidade de óleo (NCP-U2, NCE-U2 e NE-U2) e a NSP-U, cujos resultados apresentados na avaliação físico-química foram mais satisfatórios.

5.5 Avaliação da fotoestabilidade da ubiquinona nos sistemas nanoestruturados

A fim de verificar o papel dos diferentes sistemas nanoestruturados em promover proteção ao fármaco encapsulado, foi realizado um estudo de fotodegradação das formulações contendo ubiquinona, expondo-se estas à luz. Utilizou-se radiação UVC, pois, apesar de não atingir a superfície terrestre, apresenta maior conteúdo energético e causa rápida degradação fotoquímica (MOORE, 2004), o que permite redução do tempo experimental para verificar as alterações.

Como pode ser observado na figura 8, todos os nanocarreadores estudados protegeram a ubiquinona da degradação pela radiação UVC quando comparados a uma solução etanólica de mesma concentração (1 mg/mL). As amostras protegidas da luz (controles escuros) não apresentaram diminuição no teor de ubiquinona, demonstrando que não houve interferência da temperatura durante o experimento.

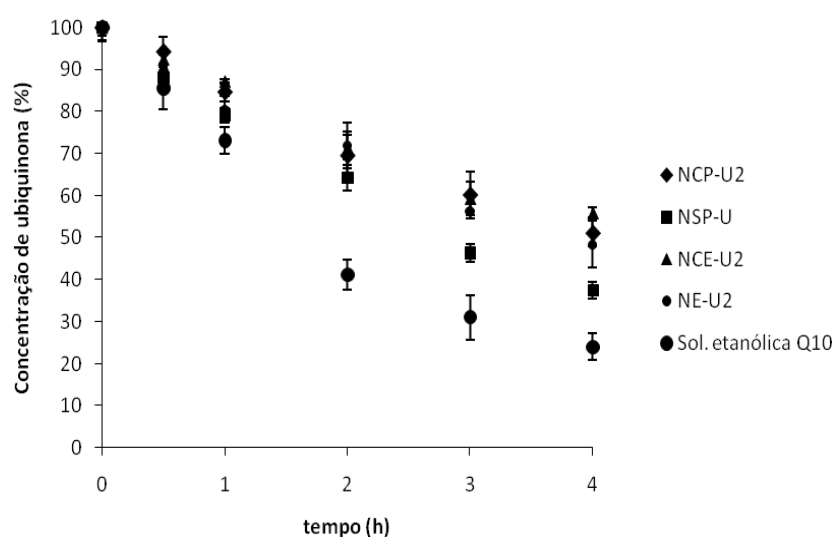


Figura 8 - Gráfico da concentração remanescente de ubiquinona nas amostras após 4 h de exposição à radiação UVC.

Após a primeira hora de exposição das amostras à luz UVC, já foi observada diferença estatística ($p < 0,05$) entre a concentração remanescente de fármaco na solução etanólica e nos sistemas nanoestruturados. Ao término do experimento, a solução de ubiquinona e a NSP-U diferiram entre si e com relação às outras amostras, enquanto que as nanocápsulas (independente do polímero constituinte) e a nanoemulsão não tiveram teores de fármaco estatisticamente diferentes ($p > 0,05$). Os teores finais de ubiquinona foram de aproximadamente 24% para a solução etanólica, 37% para a NSP-U, 48% para a NE-U2, 51% para a NCP-U2 e 56% para a NCE-U2.

O aumento na fotoestabilidade promovido pelas nanoestruturas pode ser atribuído a um bloqueio da radiação UVC pelo polímero presente nas nanocápsulas e nanoesferas, pois estes são capazes de refletir e espalhar a luz UV incidente (PERUGINI et al., 2002; JIMENEZ et al., 2004). Além disso, a presença do óleo também mostrou-se essencial na manutenção do

teor de ubiquinona, o que foi evidenciado pelo fato de o teor final de fármaco ter sido significativamente maior ($p < 0,05$) para ambos os tipos de nanocápsulas e para a nanoemulsão, em comparação com a quantidade de fármaco remanescente na nanoesfera.

O resultado sugere também que a ubiquinona encontra-se em maior proporção dissolvida na fase oleosa das partículas do que adsorvida na superfície das nanopartículas, o que corrobora a solubilização adequada do fármaco no óleo e a elevada eficiência de encapsulamento encontrada.

As figuras 9, 10, 11, 12 e 13 mostram os cromatogramas obtidos para as amostras submetidas à radiação.

Como pode ser observado, houve a formação de picos adicionais aos da ubiquinona durante a fotodegradação, sendo possível verificar um aumento da área destes picos concomitantemente à diminuição do pico do fármaco. Isto sugere que estão sendo formados produtos de degradação, possivelmente do fármaco, que são detectados no mesmo comprimento de onda utilizado para detectar a ubiquinona ($\lambda=275$ nm).

Sabe-se que a capacidade de uma molécula de absorver radiação é indicativa de que esta pode participar de reações fotoquímicas, levando à sua própria decomposição ou a de outros componentes da formulação (ALBINI; FASANI, 2004), sendo que os fármacos com grupos cromóforos como nitro, nitroso, sulfonas, cetonas e ligações duplas conjugadas carbono-carbono, são mais sensíveis à luz (NUDELMAN, 1875). Entretanto, elucidar o mecanismo e os produtos das reações de fotodegradação é extremamente difícil, pois a maioria dos fármacos apresenta rotas de degradação complexas. No caso da ubiquinona, por tratar-se de uma benzoquinona com uma longa cadeia lateral isoprenóide, sua molécula estaria sujeita a reações com oxigênio (oxidação-redução), alfa-clivagem de cetonas, reações de adição, isomerização e rearranjo (ALBINI; FASANI, 2004).

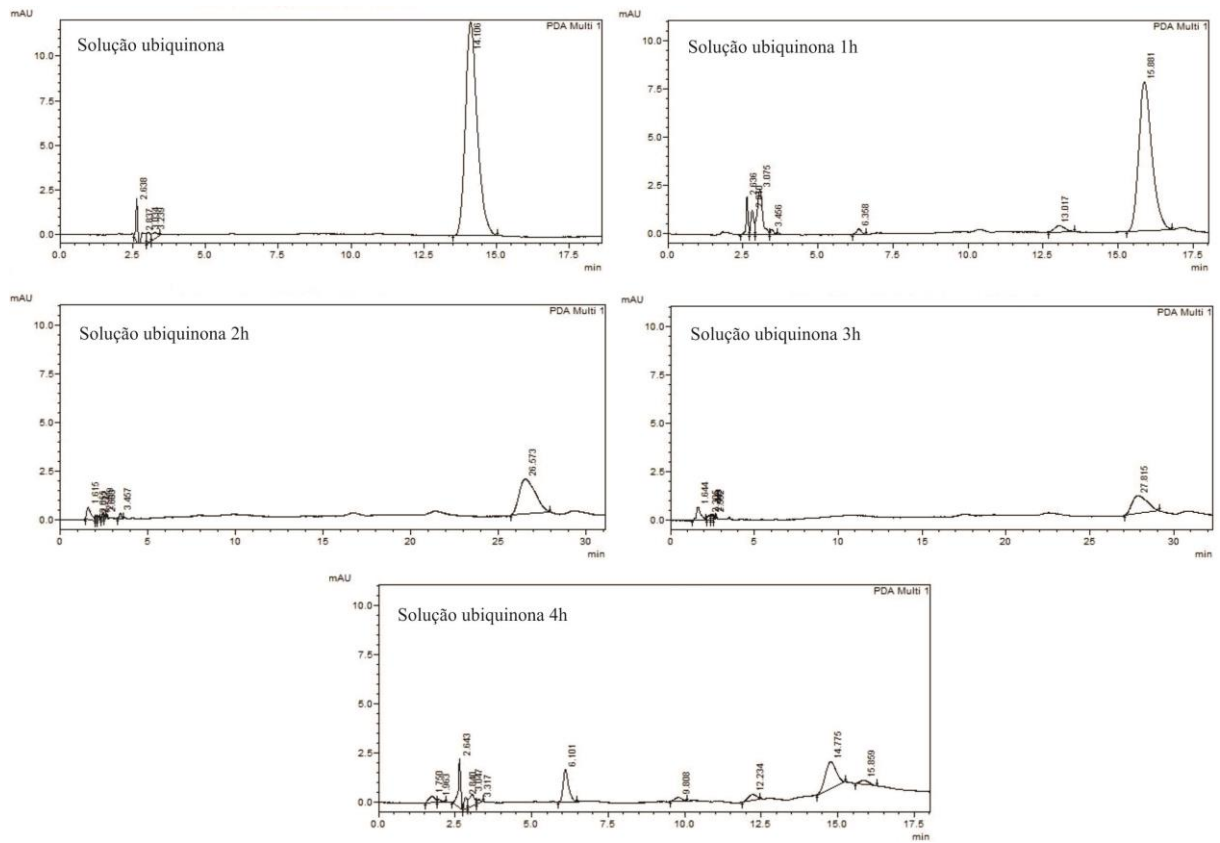


Figura 9 – Cromatogramas das amostras de solução etanólica de ubiquinona submetidas à radiação UVC por 4 horas.

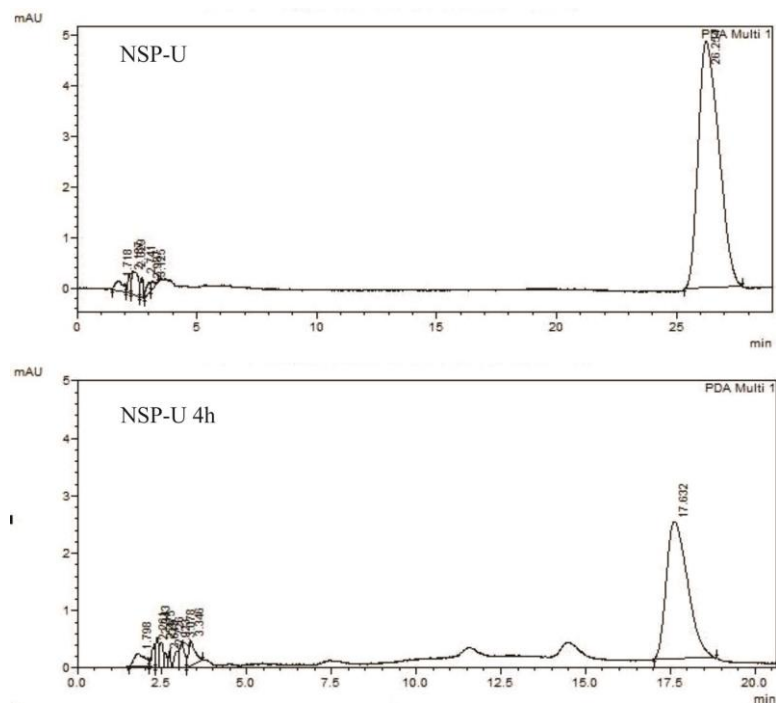


Figura 10 – Cromatogramas das amostras de NSP-U submetidas à radiação UVC por 4 horas.

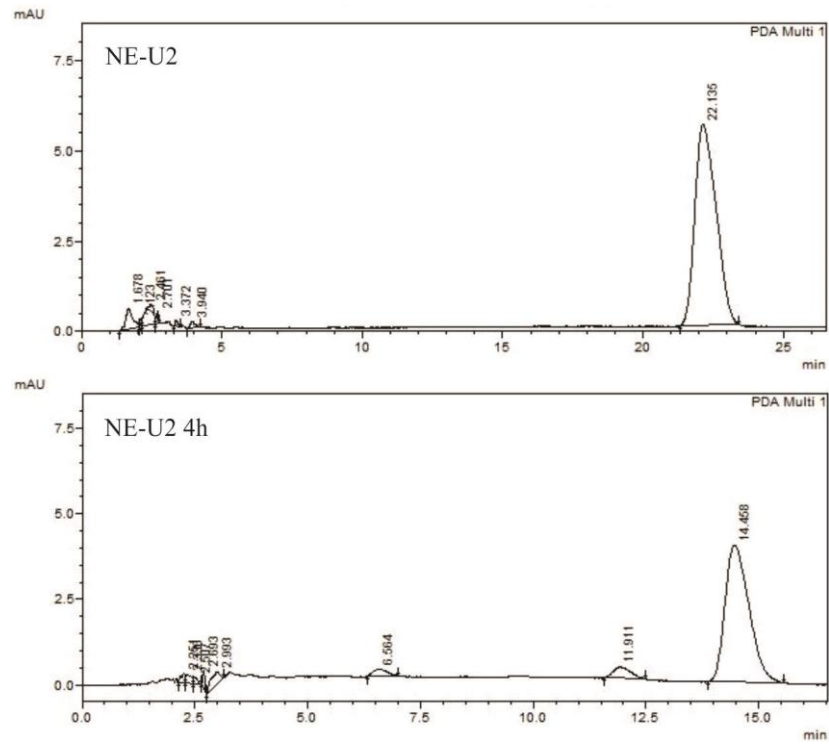


Figura 11 – Cromatogramas das amostras de NE-U2 submetidas à radiação UVC por 4 horas.

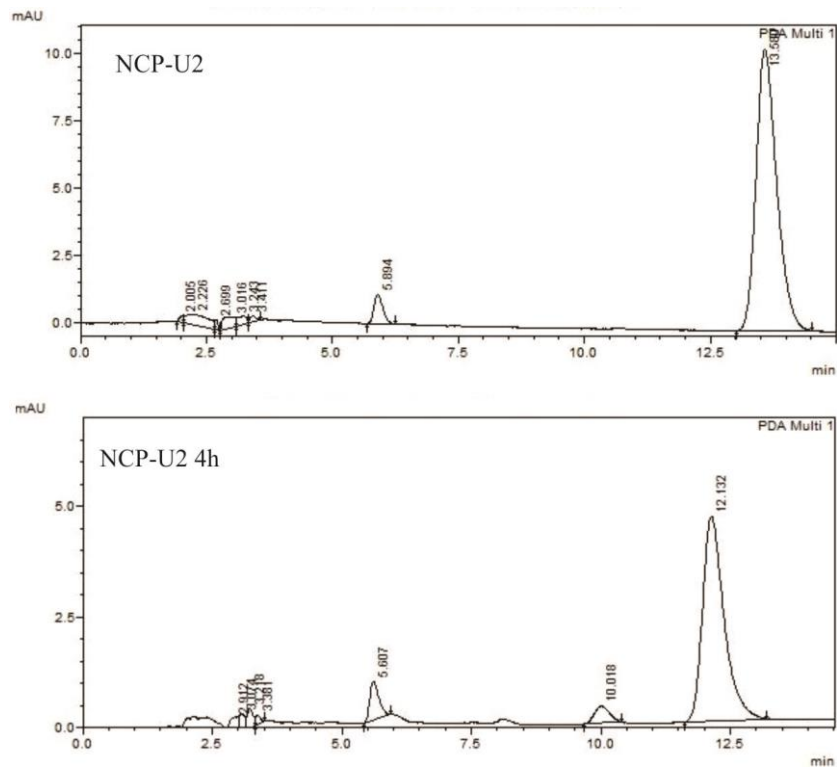


Figura 12 – Cromatogramas das amostras de NCP-U2 submetidas à radiação UVC por 4 horas.

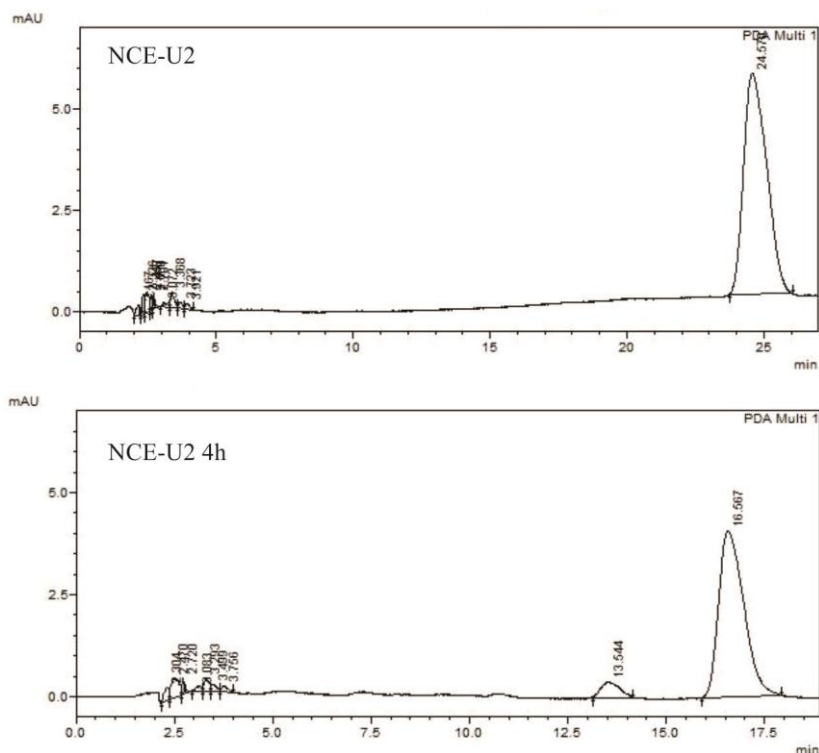


Figura 13 – Cromatogramas das amostras de NCE-U2 submetidas à radiação UVC por 4 horas.

Além de determinar a porcentagem de fotodegradação das formulações propostas, é importante elucidar a cinética de degradação destas (TØNNESSEN, 1991), estabelecendo a taxa de reação e assim sua dependência com relação à concentração de fármaco. Além disso, o uso das constantes de reação é útil na comparação de diferentes misturas sob as mesmas condições de irradiação (MOORE, 2004).

Visando-se obter mais informações sobre o comportamento da ubiquinona nos diferentes sistemas propostos foi analisado o perfil de degradação do fármaco. Os resultados obtidos podem ser visualizados na tabela 12. Os dados foram ajustados às equações de ordem zero, primeira ordem e segunda ordem. A cinética de reação foi escolhida para cada amostra de acordo com o melhor ajuste gráfico e valor do coeficiente de correlação (r). A figura 14 mostra os gráficos obtidos para os melhores ajustes observados.

Ambas as formulações de PCL (NCP-U2 e NSP-U) e a nanoemulsão (NE-U2) apresentaram melhor ajuste à equação de primeira ordem, visto que esta proporcionou os valores de r mais próximos de 1,0. No caso da nanocápsula de Eudragit EPO[®] (NCE-U2), os valores de r para as equações de primeira e segunda ordem ficaram muito próximos. Segundo Nudelman (1975), em caso de dúvida, sempre que possível deve-se trabalhar com a

possibilidade de reação de primeira ordem, já que os erros são menores e o tratamento de uma reação de primeira ordem é mais sensível que o de uma reação de segunda ordem. Portanto, para a NCE-U2, escolheu-se a equação de primeira ordem, tendo em vista que, na prática, deve-se optar pela cinética que explica de maneira mais simples os resultados encontrados, minimizando-se possíveis equívocos de interpretação.

Tabela 12 - Coeficientes de correlação (r), constante de fotodegradação (k) e tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) dos sistemas nanoestruturados e solução-controle contendo ubiquinona expostos à luz UVC por 4 horas ($n=3$).

Amostra	Ordem de Reação	R	K	$t_{1/2}$ (h) *	$t_{90\%}$ (h) *
Sol. etanólica de ubiquinona	Zero	0,7578			
	Primeira	0,8582	0,0065	1,52	0,16
	Segunda	0,9424			
NCP-U2	Zero	0,9918			
	Primeira	0,9982	0,156	4,17	0,63
	Segunda	0,9971			
NSP-U	Zero	0,9933			
	Primeira	0,9977	0,2452	2,82	0,43
	Segunda	0,9871			
NCE-U2	Zero	0,9849			
	Primeira	0,9904	0,145	4,77	0,73
	Segunda	0,9919			
NE-U2	Zero	0,9905			
	Primeira	0,9958	0,18	3,83	0,58
	Segunda	0,9914			

*Valores de $t_{1/2}$ e $t_{90\%}$ calculados de acordo com a ordem de reação escolhida.

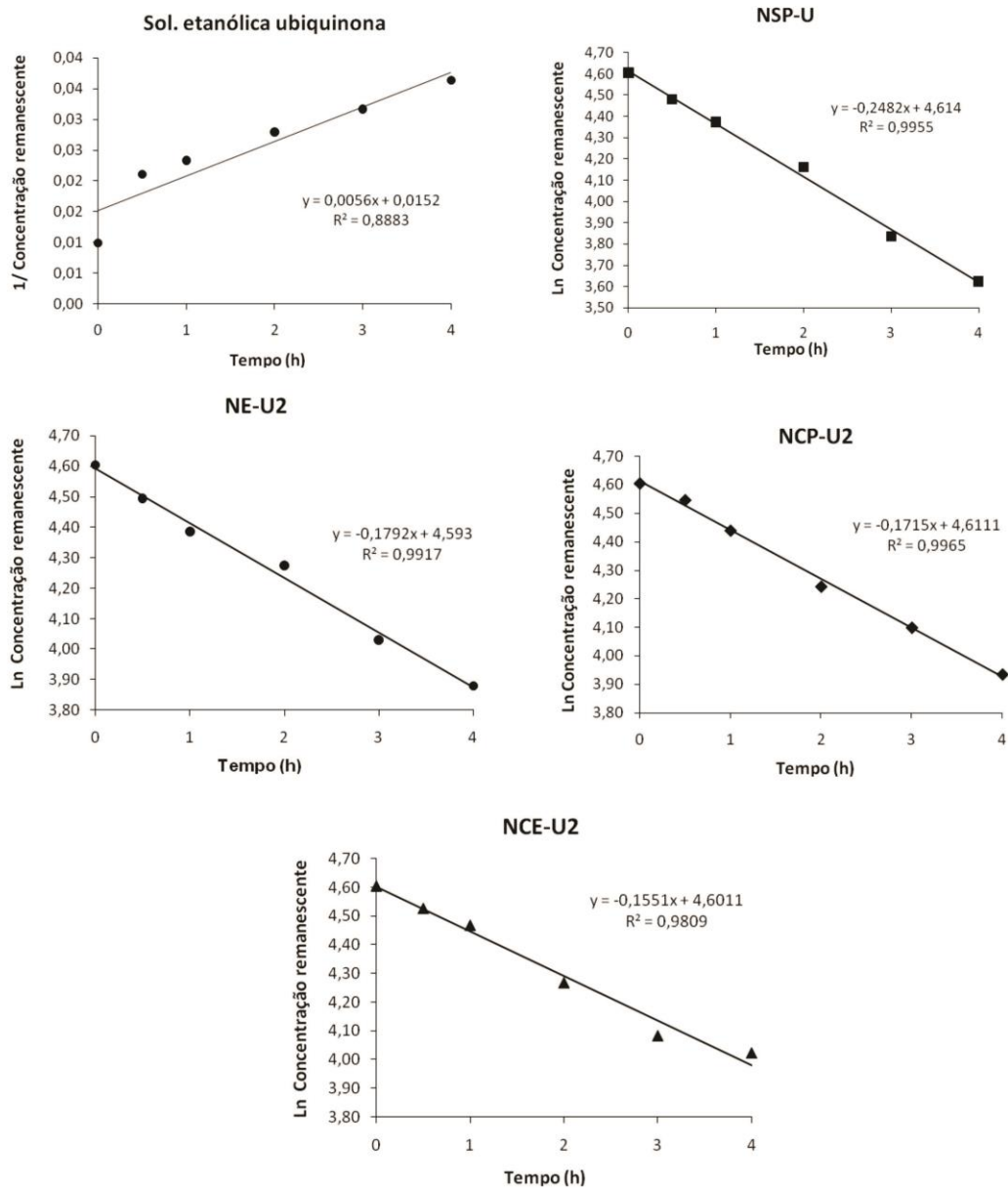


Figura 14 – Equações de melhor ajuste cinético observado para a solução etanólica de ubiquinona e para os sistemas nanoestruturados propostos.

Além disso, de maneira ideal, deve-se conduzir o estudo de cinética de degradação até que haja uma porcentagem avançada de degradação, ou seja, pelo menos 50% da concentração inicial de fármaco, para que se consiga garantir um delineamento inequívoco e se decida claramente qual ordem cinética é aplicável. Caso contrário, mesmo que se tenha dados de boa qualidade analítica, pode se obter valores de velocidade de reação pouco precisos e geralmente maiores que o valor real (NUDELMAN, 1975; MOORE, 2004). Isso

pode explicar a dificuldade de se estabelecer a cinética de degradação da formulação NCE-U2, visto que o experimento foi conduzido até a concentração remanescente de 56% de ubiquinona. Entretanto, levando-se em consideração que o objetivo do presente trabalho, de demonstrar a capacidade dos diferentes sistemas nanoestruturados em fotoprotoger o fármaco encapsulado foi contemplado, este fato não diminui a relevância do resultado obtido. Vale mencionar também que há outros trabalhos na literatura em que foram realizados estudos de perfil de degradação, apesar de o fármaco não ter sido degradado até concentração menor que 50% da inicial (OURIQUE et al., 2008; FONTANA et al., 2009).

Dessa forma, todas as formulações de nanocarreadores apresentaram cinética de degradação de primeira ordem, demonstrando que a velocidade de reação é dependente da concentração de fármaco remanescente. Por outro lado, a solução etanólica de ubiquinona ajustou-se melhor à equação de segunda ordem. Isso significa que, nesse caso, a velocidade de reação depende possivelmente da concentração dos produtos e subprodutos de degradação que são formados ao longo da exposição à radiação, como demonstrado nos cromatogramas (figura 9). Somando-se a isso, os dados da Tabela 12 mostram que os tempos de meia-vida da ubiquinona quando encapsulada nas nanoestruturas foram de 2,8 a 4,7 horas, enquanto que para a solução de fármaco livre foi de 1,5 horas. Ou seja, os sistemas propostos foram capazes de aumentar em pelo menos 1,8 vezes o tempo necessário para reduzir a concentração de ubiquinona à metade da inicial.

Os resultados obtidos neste estudo estão em consonância com outros estudos encontrados na literatura envolvendo a fotodegradação de substâncias ativas encapsuladas em nanoemulsões, nanocápsulas de PCL, entre outros sistemas.

Ourique e colaboradores (2008) verificaram uma menor fotodegradação da tretinoína após exposição à luz UVC quando encapsulada em nanocápsulas de PCL ou nanoemulsões (contendo óleo de semente de girassol ou triglicerídeos de cadeia média), em comparação com uma solução metanólica do fármaco. Ao avaliarem os perfis de fotodegradação, todos os nanocarreadores testados apresentaram cinética de reação de ordem zero, enquanto que a solução metanólica mostrou adequar-se melhor à reação de primeira ordem. Os autores constataram que os tempos de meia-vida da tretinoína foram de 40 minutos para a solução, de 69 a 82 minutos para as NEs e 85 a 100 minutos para as NCs, demonstrando o importante papel do polímero em promover proteção ao fármaco.

Fontana e colaboradores (2009) avaliaram a fotoestabilidade de vários sistemas nanoestruturados (NCs, NSs e NEs) contendo clobetasol, utilizando PCL e triglicerídeos de cadeia média na formulação dos mesmos. O estudo de fotoestabilidade foi realizado

utilizando-se radiação UVA por 24 horas. Os resultados foram semelhantes aos obtidos no presente trabalho: os perfis de degradação tanto das soluções controle quanto dos sistemas nanoestruturados ajustaram-se à cinética de primeira ordem, sendo que os tempos de meia-vida do clobetasol foram aproximadamente 2 vezes maiores para os nanocarreadores. Quanto aos diferentes sistemas, o aumento da estabilidade foi maior para NCs, seguido das NEs e NSs, demonstrando a importância de ambos, o óleo e o polímero na fotoproteção do fármaco.

Almeida e colaboradores (2009) observaram um retardamento da fotodegradação da benzofenona-3 quando exposta à radiação UVC por 7 dias, ao incorporarem esta substância em nanocápsulas de PCL e nanoemulsões formuladas com óleo de semente de uva e óleo de amêndoas. Foi observado que 80% da solução metanólica (controle) foi degradada ao término do experimento, enquanto que para as formulações nanoestruturadas, o teor decaiu apenas em torno de 10-30%.

Mais recentemente, Almeida e colaboradores (2010) estudaram a fotoestabilidade da rutina em nanocápsulas de PCL e nanoemulsões de óleo de semente de uva, verificando que essas formulações prolongaram o tempo necessário para a diminuição de teor do fármaco quando exposto à luz UV. Assim como no presente estudo, os perfis de degradação para ambos os sistemas nanoestruturados estudados foram de primeira ordem, demonstrando aumento de 5,3 (NCs) a 6,9 (NEs) vezes na fotoestabilidade da rutina comparada à solução etanólica do fármaco, após os 30 minutos de exposição.

Marchiori e colaboradores (2012) avaliaram a fotoestabilidade de suspensões de nanocápsulas de PCL contendo tretinoína, bem como a do pó (redisperso) obtido por *spray-drying* contendo as respectivas nanocápsulas, após 60 minutos de irradiação por lâmpada UVA. A porcentagem de degradação da tretinoína foi aproximadamente 2,5 vezes maior para a solução metanólica (controle) quando comparada à tretinoína nanoencapsulada (como suspensão original ou como pó reconstituído).

De forma semelhante ao presente estudo, Detoni e colaboradores (2012) desenvolveram diferentes tipos de nanocarreadores (nanoesferas de PCL, nanocápsulas de núcleo lipídico, lipossomas e carreadores lipídicos nanoestruturados) contendo uma substância antioxidante, o resveratrol, e estudaram sua fotoestabilidade. Após 4 horas de exposição à luz UVA, a solução etanólica (controle) teve seu teor diminuído em 90%, enquanto que nos nanocarreadores o teor de resveratrol decaiu menos: 29% para os lipossomas, 67% para as nanocápsulas, 70% para os carreadores lipídicos nanoestruturados e 77% para as nanoesferas. Tanto a solução controle quanto os sistemas nanoestruturados estudados ajustaram-se melhor à cinética de degradação de primeira ordem, entretanto, assim

como os dados apresentados neste trabalho, a nanocápsula teve maior capacidade de proteger o fármaco encapsulado do que a nanoesfera, reiterando o papel do óleo na fotoproteção promovida por estes sistemas.

Na literatura existe também um relato prévio de aumento na fotoestabilidade da ubiquinona quando nanoencapsulada em nanoesferas de poli(metacrilato de metila). Kwon e colaboradores (2002) demonstraram que esta substância teve seu teor mantido em aproximadamente 78% após exposição à radiação UVA por 144 minutos quando presente na nanopartícula, enquanto que em dispersão de dodecil sulfato de sódio o teor foi de 48% e em solução de triglicerídeos de cadeia média foi de 35%. Os autores atribuíram esse resultado à interferência do polímero na chegada da luz UVA nas nanoesferas e também à matriz polimérica hidrofóbica destas, que pode contribuir no aumento da estabilidade por isolar a ubiquinona do meio aquoso.

5.6 Estudo de estabilidade das formulações contendo ubiquinona

Um dos principais fatores que devem ser avaliados no desenvolvimento de formulações é a estabilidade, pois esta auxilia na garantia da eficácia e segurança dos produtos farmacêuticos. No Brasil, as normas para os estudos de estabilidade estão dispostas na Resolução nº 1 de 2005 e segundo esta resolução a estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2005).

Além disso, no caso dos sistemas nanoestruturados, por se tratarem de partículas/gotículas dispersas em meio aquoso, problemas de estabilidade físico-química podem surgir durante a preparação, transporte e armazenamento por períodos prolongados, como aglomeração e sedimentação das partículas; formação de cristais; limitações quanto à estabilidade química do polímero, do fármaco ou de outras matérias-primas e, ainda, a liberação prematura da substância ativa (SCHAFFAZICK et al., 2003; WU; ZHANG; WATANABE, 2011).

Dessa forma, a fim de complementar os estudos de fotoestabilidade das formulações propostas neste trabalho, procedeu-se também um estudo de estabilidade acelerado adaptado, projetado para acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto

farmacêutico, em condições forçadas de armazenamento. Este estudo foi realizado por 90 dias em câmara climática qualificada de acordo com normas internacionais, proporcionando o controle de temperatura e umidade em seu interior, considerando-se a zona climática em que se encontra o Brasil (zona IV) e o tipo de forma farmacêutica testada, neste caso, líquidos. Portanto, as condições de teste foram temperatura de $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar $75 \pm 5\%$. Após a coleta das amostras das formulações NE-U2, NCP-U2, NCE-U2 e NSP-U nos tempos pré-estabelecidos, foram realizadas análises de diâmetro médio, potencial zeta, pH e teor de fármaco. Os resultados encontram-se nas figuras 15, 16, 17 e 18.

Quanto ao aspecto macroscópico, ambas as formulações contendo PCL e a nanoemulsão não apresentaram formação de precipitado nos 90 dias de experimento. Em contraste, a nanocápsula de Eudragit[®] EPO apresentou sinais de precipitação em um dos lotes já após 15 dias de estudo na câmara, sendo visível o acúmulo da formulação nas paredes do frasco. Após 45 dias, os outros dois lotes de formulação também precipitaram, inviabilizando a realização das análises físico-químicas das amostras após esse período e demonstrando uma maior fragilidade e instabilidade desse sistema comparado aos outros nanocarreadores estudados.

Segundo Wu e colaboradores (2011), a análise do diâmetro de partícula e sua distribuição são os parâmetros chave na avaliação da estabilidade física das nanopartículas, sendo que a técnica de espectroscopia de correlação de fótons (ou espalhamento dinâmico de luz) é bastante utilizada para determinar o tamanho de pequenas partículas suspensas em meio líquido. Como pode ser observado na figura 15, tanto a nanoemulsão quanto as formulações contendo PCL não apresentaram alterações estatisticamente significativas ($p > 0,05$) no diâmetro de partícula ao longo do experimento. As médias de diâmetros variaram entre 231-211 nm para a NE-U2, 318-270 nm para a NCP-U2 e 214-180 nm para a NSP-U, sendo que estas alterações podem ser devidas à própria limitação e sensibilidade da técnica utilizada. Por outro lado, para a nanocápsula de Eudragit[®] EPO observou-se formação de partículas de tamanho micrométrico (3456 nm) em um dos lotes analisados após 15 dias e em mais um lote após 45 dias de armazenamento a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e UR $75 \pm 5\%$ (o gráfico contendo os dados destes lotes encontra-se no Apêndice C deste manuscrito). O aparecimento de partículas micrométricas sugere que esteja ocorrendo aglomeração das nanopartículas, pois estas apresentam grande área superficial e assim alta energia de superfície, o que é termodinamicamente desfavorável. Por conseguinte, elas tendem a aglomerar-se para minimizar essa energia, podendo causar uma série de problemas nas suspensões nanoestruturadas, incluindo rápida sedimentação ou cremagem, formação de cristais e

dosagem inconsistente (WU; ZHANG; WATANABE, 2011). Isso demonstra a instabilidade física desta suspensão de nanocápsulas, corroborando a precipitação observada macroscopicamente.

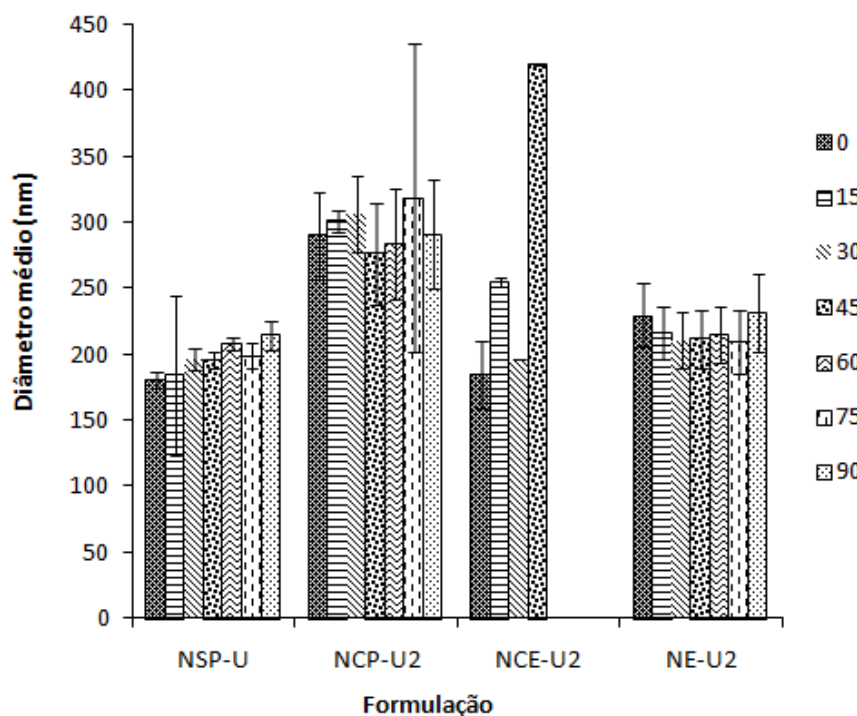


Figura 15 - Gráfico do diâmetro médio de partícula das formulações armazenadas a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e UR $75 \pm 5\%$ por 90 dias.

Outros parâmetros que podem fornecer informações relevantes sobre a estabilidade dos sistemas nanoestruturados quando monitorados ao longo do tempo são o potencial zeta e o pH.

Quanto ao potencial zeta, este deve ser alto, em módulo, para garantir uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes (SCHAFFAZICK et al., 2003). Uma técnica comumente utilizada para estabelecer o valor de potencial zeta é a avaliação da mobilidade eletroforética das partículas suspensas no meio. Geralmente, quando ocorre somente estabilização eletrostática ou em combinação com o uso de tensoativos de baixo peso molecular, valores absolutos de potencial zeta acima de 60 mV

predizem excelente estabilidade, enquanto que valores de 30, 20 ou menos que 5 mV podem resultar em estabilidades boa, aceitável e em agregação rápida das partículas, respectivamente (WU; ZHANG; WATANABE, 2011). No caso da nanoemulsão e das suspensões nanoestruturadas contendo PCL, não observou-se variação significativa no valor do potencial zeta ao longo dos 90 dias. Diferentemente, a formulação NCE-U2 apresentou diminuição do valor de potencial zeta durante o armazenamento a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e UR $75 \pm 5\%$, variando de +50 mV a +35 mV, o que explicaria o comportamento instável deste sistema e a formação de aglomerados de partículas. Somando-se a isso, todas as formulações avaliadas apresentaram decaimento significativo ($p < 0,05$) no valor de pH ao longo do estudo de estabilidade (figura 17). Tanto as alterações observadas para os valores de potencial zeta quanto a diminuição no pH das formulações podem ser indicativos de degradação do polímero. No caso das nanoesferas e nanocápsulas de PCL, as alterações podem ser devidas ao fato do polímero ser um poliéster, que estaria sujeito tanto à ionização dos grupos carboxílicos quanto a reações de hidrólise. Também pode haver relaxamento das cadeias poliméricas e assim exposição de maior número de grupos ácidos terminais (SCHAFFAZICK et al., 2002), acidificando a suspensão e tornando o potencial zeta mais negativo. Além disso, pode ocorrer hidrólise dos ácidos graxos presentes no óleo, o que explicaria também as alterações de pH e potencial zeta observadas para as nanoemulsões.

A estabilidade química dos sistemas nanoestruturados é fármaco-específica, dependendo dos grupos funcionais da molécula e dos mecanismos de reação da mesma, sendo que a análise por CLAE é a técnica mais comumente utilizada para avaliar este parâmetro (WU; ZHANG; WATANABE, 2011). No presente trabalho, a estabilidade química dos sistemas nanoestruturados foi avaliada pelo acompanhamento do teor de ubiquinona, através da quantificação por CLAE. Os resultados obtidos encontram-se na figura 18. Todas as formulações estudadas apresentaram teor final de ubiquinona significativamente menor que o inicial ($p < 0,05$). A formulação que pareceu ser mais estável foi a nanoesfera de PCL, visto que foi a nanoestrutura com menor decaimento no teor de ubiquinona (de 0,98 mg/mL para 0,59 mg/mL) após 90 dias de armazenamento a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e UR $75 \pm 5\%$. A NCE-U2, por outro lado, foi a formulação mais instável, apresentando teor de 30% já nos primeiros 15 dias de experimento e atingindo 17% da concentração inicial de ubiquinona após 45 dias.

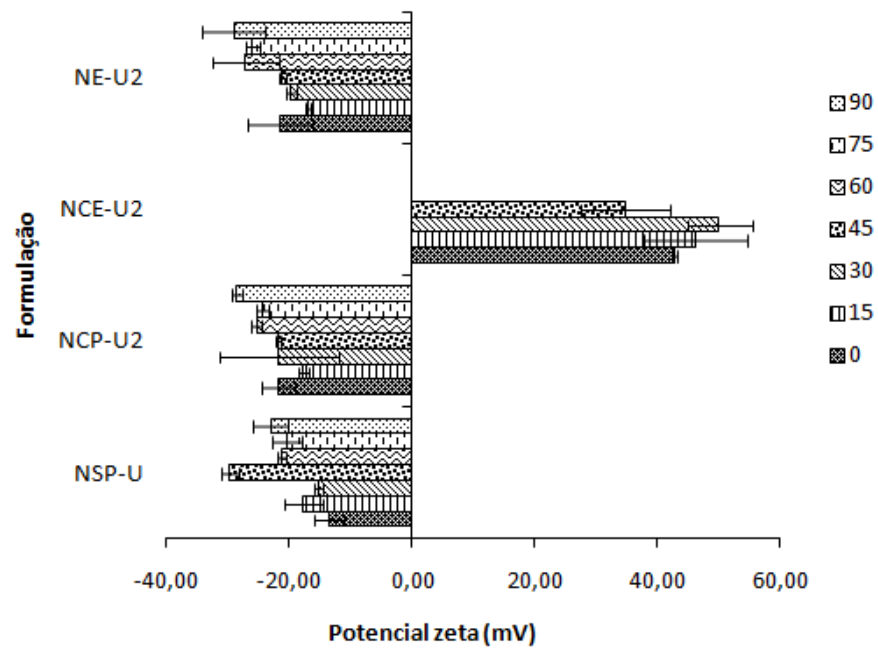


Figura 16 - Gráfico do potencial zeta das formulações armazenadas a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e UR $75 \pm 5\%$ por 90 dias.

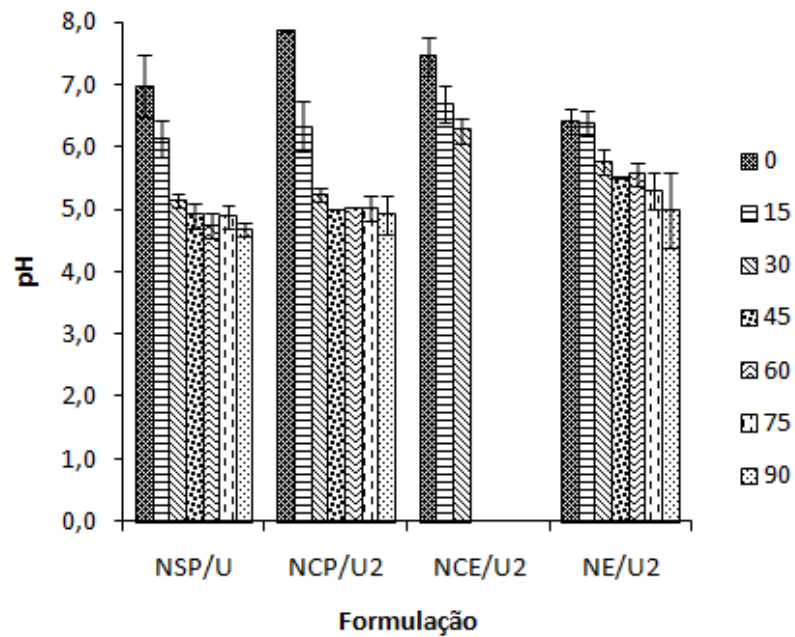


Figura 17. Gráfico do pH das formulações armazenadas a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e UR $75 \pm 5\%$ por 90 dias.

Schaffazick e colaboradores (2002) também relataram diminuição no teor de um antioxidante, a melatonina, quando encapsulada em nanocápsulas de Eudragit[®] RS 100, S100 ou PCL, ao longo de 3 meses de estudo de estabilidade e observaram que a luz natural e o aumento na temperatura (50°C) aceleraram levemente esta diminuição. De maneira semelhante ao presente trabalho, os autores também relataram que a nanoemulsão e a nanodispersão (preparadas com fins comparativos) apresentaram maior decaimento no conteúdo de melatonina ao longo do experimento e que as nanopartículas preparadas com PCL foram capazes de retardar por mais tempo (2 meses) a degradação do ativo em comparação com os outros nanocarreadores.

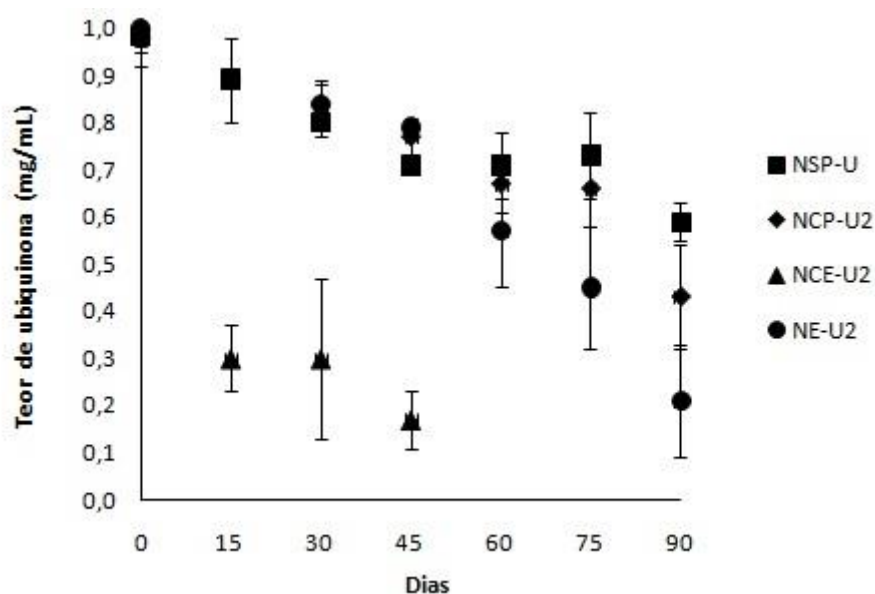


Figura 18- Gráfico do teor das formulações armazenadas a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e UR $75 \pm 5\%$ por 90 dias.

No estudo realizado por Cho (2012), também foi investigada a estabilidade térmica de um antioxidante, o resveratrol, em nanopartículas formuladas com diferentes poliésteres, incluindo a PCL, durante 4 semanas. O autor relatou que a concentração de resveratrol decaiu de maneira mais abrupta quando as formulações foram submetidas a 40°C do que a 25°C , atribuindo esta diminuição a uma influência da degradação ou hidrólise dos polímeros, o que poderia desestruturar as nanopartículas e, assim, acarretar em perda de teor de fármaco. No geral, foi constatado que as nanopartículas formuladas com poli(1,6 hexametileno adipato) e

PCL mostraram melhor estabilidade térmica que os outros poliésteres testados em ambas as temperaturas.

Em outro estudo, Junyaprasert e colaboradores (2009), prepararam nanoemulsões e carreadores lipídicos nanoestruturados contendo ubiquinona e realizaram um estudo de estabilidade expondo as formulações a diferentes condições (por 12 meses a 4, 25 ou 40°C ou, ainda, por 28 dias expostas à luz natural). Foi observado que os teores resultantes foram altamente influenciados pela temperatura de armazenamento, ocorrendo maior diminuição do teor de ubiquinona nas formulações expostas a 40°C. Além disso, a porcentagem de ubiquinona remanescente após a exposição à luz natural foi significativamente maior para os carreadores lipídicos nanoestruturados do que para as nanoemulsões, apresentando valores de 48-75% e 46%, respectivamente.

Dessa maneira, sugere-se influencia da temperatura e da presença do polímero, em especial a PCL, no intento de se prolongar a estabilidade do ativo nestes sistemas. Assim, considerando-se os resultados obtidos no presente estudo, aliado aos dados encontrados na literatura, realizou-se um estudo de estabilidade dos sistemas propostos (NE-U2, NCP-U2 e NSP-U) à temperatura ambiente (meses de outubro a dezembro), por 90 dias, a fim de se elucidar a influência destes parâmetros nas características finais das formulações.

O diâmetro médio das gotículas/partículas ao longo da exposição das amostras à temperatura ambiente encontra-se na figura 19. Pode-se observar que este não foi modificado pelas condições de armazenamento, tendo em vista que os valores foram semelhantes aos encontrados para os nanocarreadores armazenados na câmara. As médias de diâmetros foram de 218 nm para a NE-U2, 330 nm para a NCP-U2 e 186 nm para a NSP-U.

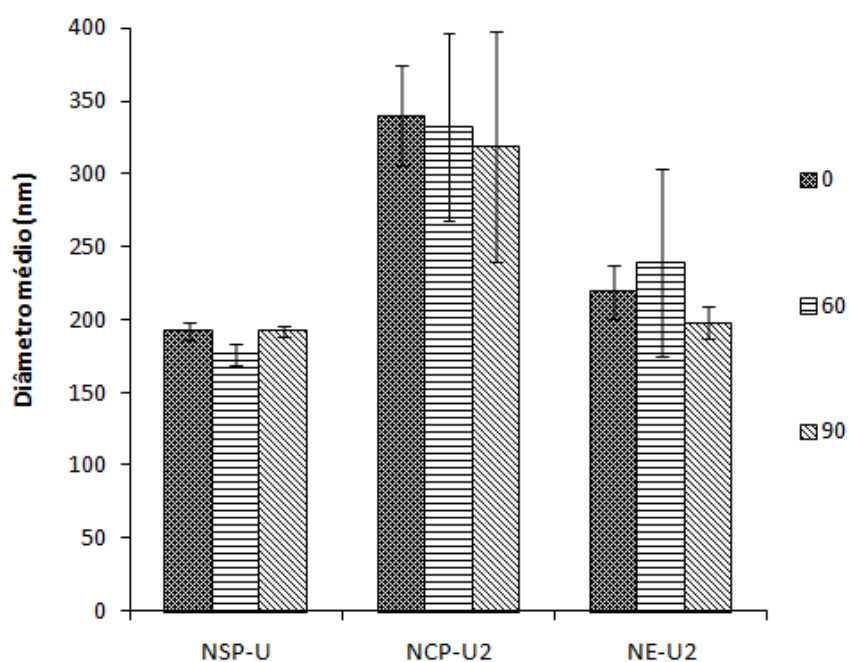


Figura 19 - Gráfico do diâmetro médio de partícula das formulações armazenadas à temperatura ambiente por 90 dias.

Quanto ao potencial zeta (figura 20), os valores foram um pouco menores (em módulo) para as amostras expostas à temperatura ambiente, apresentando médias de -13,1 mV para a NSP-U, -17,2 mV para a NCP-U2 e -16,7 mV para a NE-U2. É importante lembrar que existem dois mecanismos responsáveis pela estabilização dos sistemas coloidais: a repulsão eletrostática, quando se utiliza tensoativos iônicos e a estabilização estérica, quando emprega-se tensoativos não iônicos (WU; ZHANG; WATANABE, 2011), sendo que o potencial zeta é um preditor apenas do primeiro. Segundo Rabinow (2004) para se garantir estabilidade ao sistema deve-se prevenir que as partículas fiquem muito próximas umas das outras, o que requer a disposição de uma barreira com energia suficientemente alta a longas distâncias de separação, no intuito de evitar a aglomeração das partículas. Com isso surge a necessidade de se empregar tensoativos poliméricos não-iônicos (como os utilizados no presente trabalho), pois estes revestem a superfície da partícula com uma cadeia hidrofóbica e projetam a porção hidrofílica em direção à água. Somando-se a isso, interações estéricas são inerentemente mais sensíveis a flutuações na temperatura do que a repulsão eletrostática, o que poderia ocasionar a ruptura do sistema coloidal estabilizado apenas por tensoativos não-iônicos. Isso explicaria o fato de que apesar dos valores de potencial zeta serem mais elevados nas formulações submetidas ao calor e umidade, estas seriam mais instáveis do que as amostras armazenadas à

temperatura ambiente, já que a medida do potencial zeta não considera as interações estéricas. Corroborando com estes resultados, os valores de pH (figura 21) também apresentaram menor acidificação ao longo do tempo nas amostras armazenadas fora da câmara de estabilidade, demonstrando a maior estabilidade destes sistemas. Os valores finais de pH foram de 5,5 (NSP-U), 5,7 (NCP-U2) e 5,9 (NE-U2), todos significativamente maiores ($p < 0,05$) que as respectivas formulações quando submetidas ao calor e umidade da câmara.

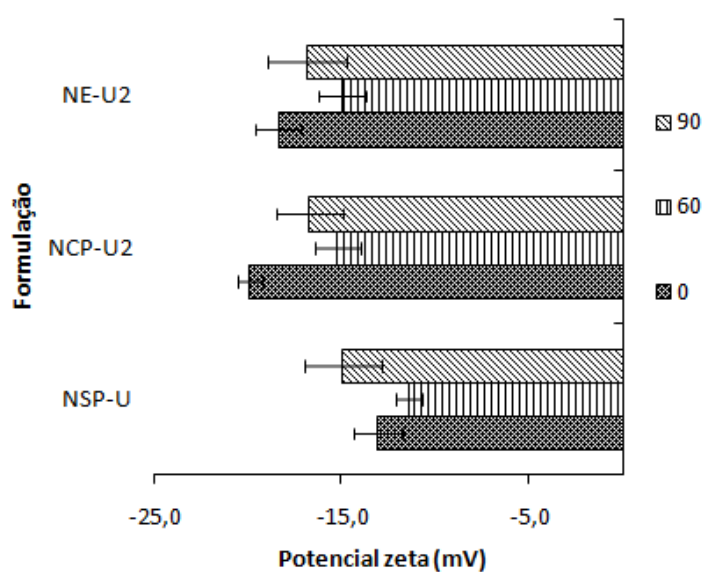


Figura 20 - Gráfico do potencial zeta das formulações armazenadas à temperatura ambiente por 90 dias.

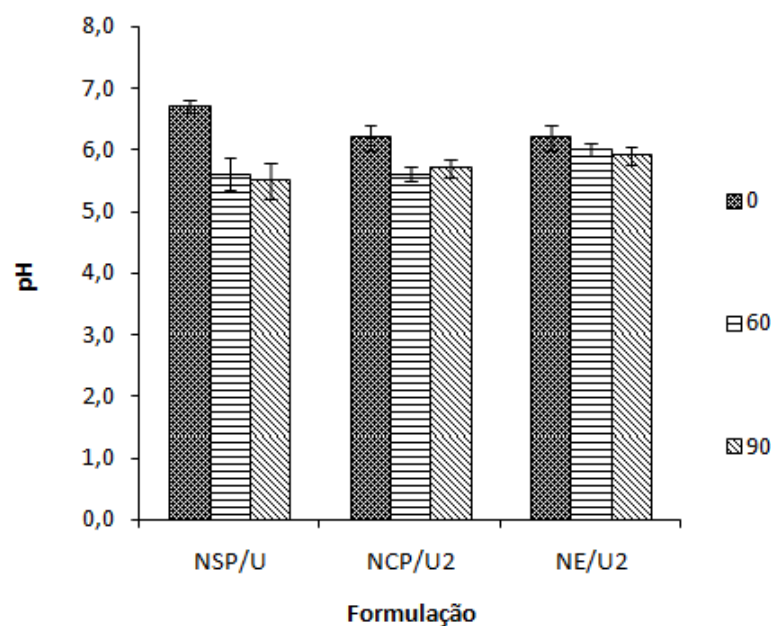


Figura 21 - Gráfico do pH das formulações armazenadas à temperatura ambiente por 90 dias.

Quanto ao teor, visualizando-se a figura 22 pode-se verificar que as concentrações remanescentes de ubiquinona em todas os sistemas nanoestruturados estudados permaneceram maiores ($p < 0,05$) nas amostras expostas à temperatura ambiente, apresentando teores após 90 dias de 90%, 81% e 77% para NCP-U2, NSP-U e NE-U2, respectivamente. Estes valores foram significativamente maiores quando comparados com os teores das amostras armazenadas na câmara já nos primeiros 45 dias de exposição. Isto demonstra que, assim como nos estudos citados anteriormente, no presente trabalho o grande decaimento de teor de fármaco foi devido às condições drásticas de temperatura (e umidade) as quais as formulações foram submetidas. Estas condições são úteis para minimizar o tempo necessário para se observar modificações nas características das amostras (MOORE, 2004). Em indústrias farmacêuticas, testes de estabilidade acelerada tem sido usados para avaliar efeitos químicos e físicos prolongados em condições mais brandas, bem como na avaliação do impacto de curtas exposições a condições fora daquelas estabelecidas no rótulo do produto, que podem ocorrer durante o transporte, por exemplo (SILVA et al., 2009). Além disso, neste estudo foi demonstrado novamente o papel do polímero (principalmente a PCL) em retardar a diminuição da concentração de fármaco nos sistemas coloidais propostos, visto que, para ambas as condições de teste, as nanocápsulas e nanoesferas formuladas com este polímero apresentaram teores significativamente maiores de ubiquinona que a nanoemulsão, o que reafirma a importância do mesmo na estabilidade destes sistemas.

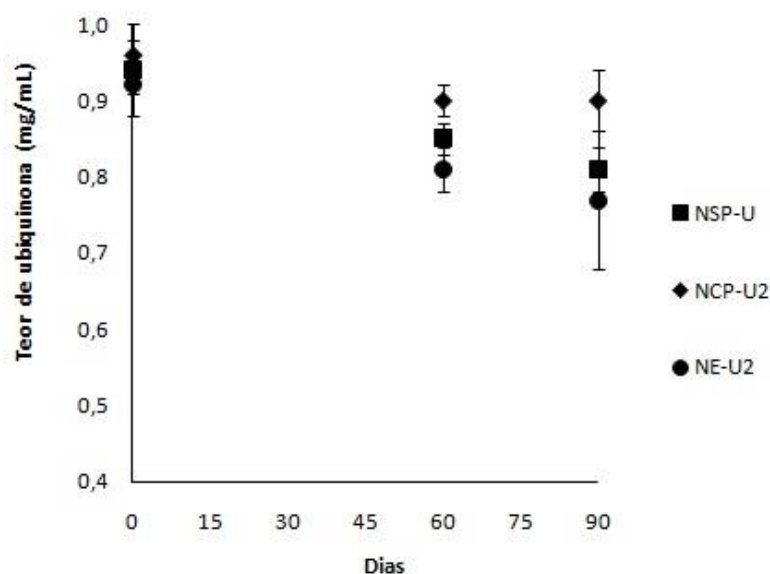


Figura 22 - Gráfico do teor de ubiquinona das formulações armazenadas à temperatura ambiente por 90 dias.

5.7 Teste de hemólise semi-quantitativo

A hemólise caracteriza-se como um processo de ruptura da membrana celular das hemácias, com conseqüente extravasamento da hemoglobina para o exterior da célula. Sistemas baseados em nanotecnologia e biomateriais devem ser submetidos a testes de hemólise para que se possa estimar a compatibilidade destes com o sangue, tendo em vista que a hemólise *in vitro* pode refletir adequadamente alguns efeitos biológicos das nanopartículas. Assim, quanto menor a hemólise observada, melhor é a biocompatibilidade do material.

A figura 23 mostra os resultados do teste de hemólise qualitativo realizado com as formulações NCP-B2 e NCP-U2, após 4 horas de incubação com a suspensão de eritrócitos. As concentrações de formulação testadas foram de 0,9, 0,5, 0,25, 0,1, 0,075, 0,05, 0,025, 0,01, 0,0075 e 0,005 mg/mL.

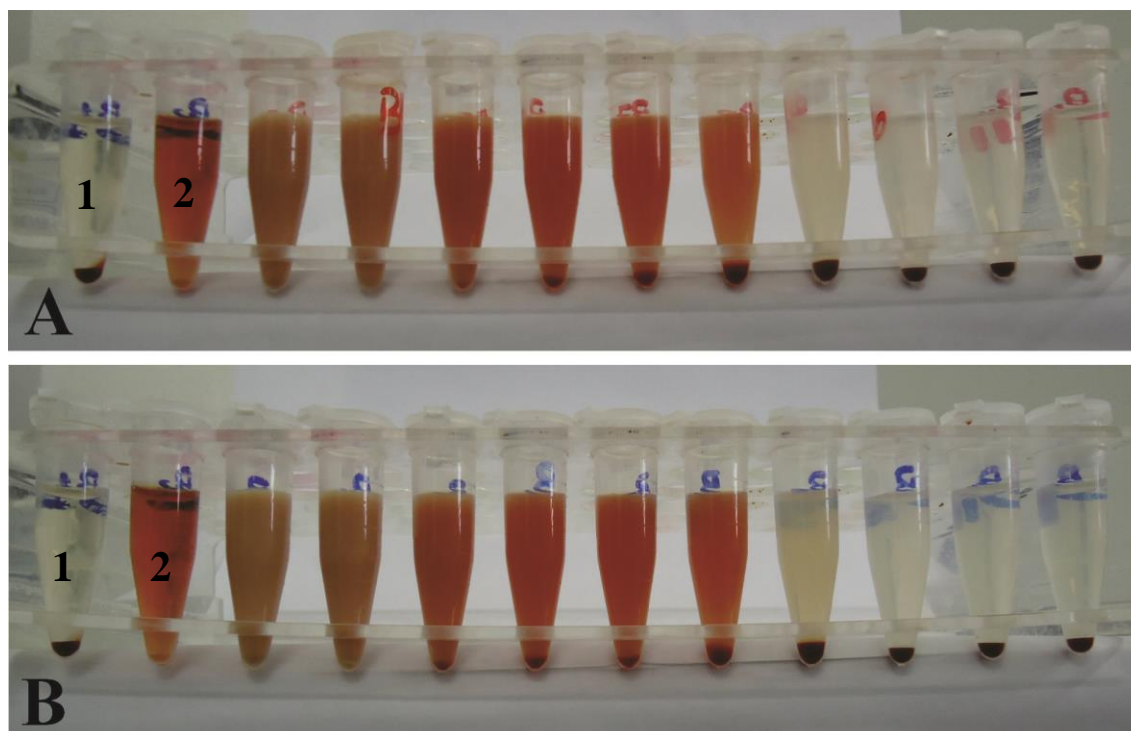


Figura 23 - Resultado semi-quantitativo do teste de hemólise. A: NCP-B2; B: NCP-U2; 1: Controle negativo; 2: Controle positivo.

Como pode ser observado, nas condições testadas foi verificada hemólise até a concentração de 0,05 mg/mL (tubo número 8) de formulação, tanto para as nanocápsulas brancas quanto para as contendo ubiquinona, o que indica que a presença de fármaco não aumenta a ocorrência de ruptura das hemácias. A partir de 0,025 mg/mL até 0,005 mg/mL, o processo de hemólise não ocorreu, pois pode-se observar a presença do pélete de hemácias no fundo do tubo, indicando a integridade das mesmas. Uma hipótese para a hemólise observada nas soluções mais concentradas é de que o próprio tensoativo utilizado na preparação das nanocápsulas, o polisorbato 80, tenha se deslocado das partículas em direção às células, tendo em vista que as moléculas de tensoativo poderiam penetrar na célula e saturar a membrana, causando solubilização de lipídeos e proteínas (JONES, 1999; LETCHFORD et al., 2009; BENDER et al., 2012).

Uma maneira mais confiável e sensível para a avaliação da hemólise *in vitro* é o teste de hemólise quantitativo, pelo qual a porcentagem de hemólise é calculada a partir da absorbância da amostra no espectrofotômetro. Entretanto, apesar de haver vários trabalhos com sistemas nanoestruturados utilizando esta técnica (CENNI et al., 2008; MORRAL-RUÍZ et al., 2012; KUNTWORBE; AL-KASSAS, 2012; ARCHANA; DUTTA; DUTTA, 2013), no presente estudo não foi possível realizar a avaliação do índice de hemólise desta maneira,

devido a turbidez observada nas soluções finais. Esta turbidez é causada pela própria suspensão de nanocápsulas, que apresenta aspecto leitoso devido ao tamanho das partículas em suspensão. Assim, ao ser adicionada à suspensão de eritrócitos, a suspensão de nanocápsulas turva a amostra, impedindo a leitura correta da absorbância no espectrofotômetro. Por esta razão, optou-se por um teste semi-quantitativo de hemólise, a fim de obter-se informações preliminares sobre a biocompatibilidade das nanocápsulas propostas.

Dessa forma, faz-se necessário realizar testes complementares a este, para que se consiga prever de maneira mais confiável o comportamento das nanocápsulas ao entrarem em contato com a circulação sanguínea.

5.8 Estudo de citotoxicidade *in vitro*

O uso de antioxidantes como a ubiquinona tem sido considerado importante na terapia do câncer. Há múltiplas ações comprovadas da ubiquinona a nível celular, como melhora bioenergética e ação antioxidante intra e extracelular, sugerindo que o uso desta como coadjuvante no tratamento do câncer deva ser melhor investigado (HODGES et al., 1999).

No presente trabalho, a toxicidade das nanocápsulas contendo ubiquinona (NCP-U2) ou sem o fármaco (NCP-B2) foi avaliada frente a células de glioma (C6) e de câncer de mama (MCF-7) pela medida da função mitocondrial destas, através da redução do corante tetrazólio (MTT) em formazan nas células viáveis. Este teste foi realizado somente com as nanocápsulas de PCL, pois estas foram consideradas as formulações mais promissoras levando-se em conta as avaliações anteriormente relatadas neste trabalho, como o estudo de estabilidade. As concentrações de formulação testadas foram de 10, 20, 30 e 100 μM . Além disso, as células também foram tratadas com o óleo de pracaxi livre (10 e 100 μM) e a ubiquinona livre (10, 20, 30 e 100 μM). O tempo de incubação foi de 48 horas.

No caso das células C6, outros estudos encontrados na literatura também utilizam o teste do MTT para avaliar a citotoxicidade de compostos frente às células de glioma (ÇİFTÇİ et al., 2014; SILVEIRA et al., 2013), inclusive em sistemas nanostruturados (WANG et al., 2012; JAIN et al., 2013). Como ilustrado na figura 24, o óleo de pracaxi livre foi capaz de diminuir a viabilidade celular ($p < 0,05$) em comparação ao controle (DMEM), na concentração de 100 μM (36%) o que demonstra que este óleo apresenta potencial citotóxico frente a esta linhagem celular. A ubiquinona livre também diminuiu o número de células vivas

($p < 0,05$) quando estas foram tratadas com 20 μM ou mais, sendo este efeito mais pronunciado com 100 μM (68 %).

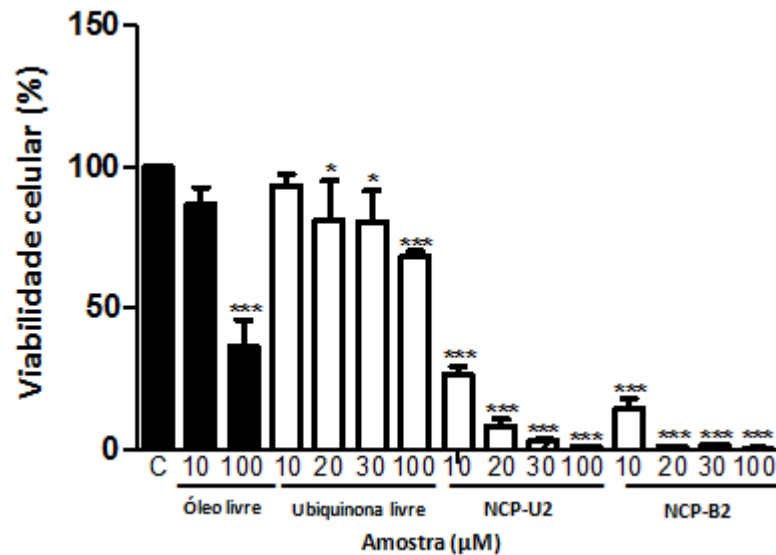


Figura 24 – Citotoxicidade do óleo de pracaxi livre, da ubiquinona livre e das nanocápsulas de PCL (NCP-U2 e NCP-B2) contra células de glioma de ratos (linhagem C6), após 48 horas de exposição.

Entretanto, o efeito citotóxico foi significativamente mais pronunciado no caso das células tratadas com as formulações de nanocápsulas, sendo a porcentagem de viabilidade celular de aproximadamente 1 % para as amostras tratadas com 100 μM de NCP-U2 ou NCP-B2, o que indica que a citotoxicidade do óleo e do fármaco é potencializada quando ambos estão encapsulados.

Além disso, ambas as formulações branca e com ubiquinona foram capazes de diminuir o número de células de glioma viáveis em comparação ao controle, sendo que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na porcentagem de viabilidade celular entre as amostras tratadas com a NCP-U2 e a NCP-B2, o que demonstra o papel do óleo de pracaxi, além da presença da ubiquinona, na citotoxicidade observada para estas formulações.

Pode-se observar também que a citotoxicidade não foi dose-dependente no caso da NCP-B2 e da NCP-U2 (a partir de 20 μM), pois o aumento na concentração de formulação não promoveu alterações na inibição do crescimento celular.

No caso das células MCF-7, há vários estudos recentes que utilizam o método do MTT para avaliar a citotoxicidade de compostos frente a esta linhagem de células (PAL et al., 2014;

SALIMI et al., 2014), inclusive para sistemas coloidais (HU; WANG, PENG, 2014; FOROOTANFAR et al., 2014; LIU et al., 2014; WANG et al., 2014). No presente trabalho, pode-se observar (Figura 25) que, assim como o que foi constatado para as células C6, o óleo de pracaxi livre foi capaz de diminuir o número de células MCF-7 viáveis em comparação com o controle ($p < 0,05$). Entretanto, este foi mais citotóxico frente à linhagem MCF-7 do que frente às células de glioma, sendo o mesmo observado para o fármaco livre. As porcentagens de viabilidade celular foram de 59% e 2% para 10 μM e 100 μM de óleo livre, respectivamente, e de 39 % para 100 μM de ubiquinona livre.

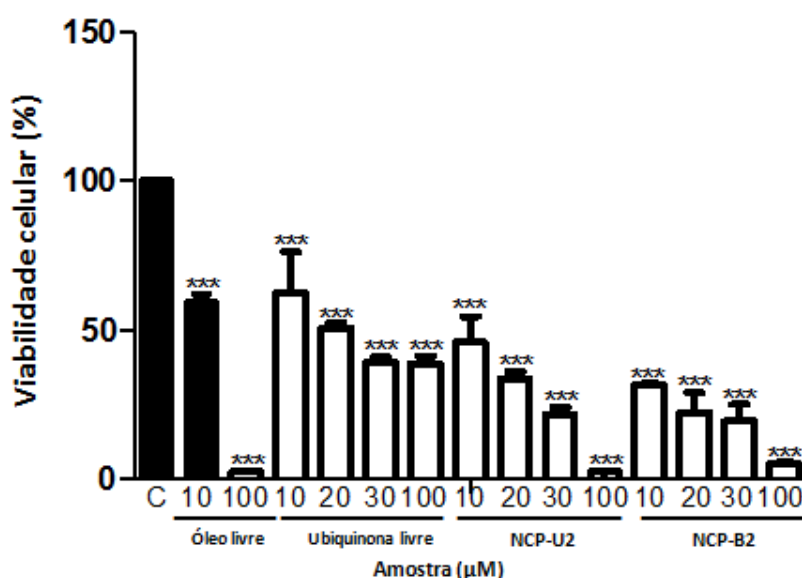


Figura 25 – Citotoxicidade do óleo de pracaxi livre, da ubiquinona livre e das nanocápsulas de PCL (NCP-U2 e NCP-B2) contra células de câncer de mama humano (linhagem MCF-7), após 48 horas de exposição.

Embora para a linhagem de células de câncer de mama também não tenha sido verificada diferença significativa ($p > 0,05$) na inibição do crescimento celular promovido pelas nanocápsulas contendo (NCP-U2) ou não ubiquinona (NCP-B2), neste caso é possível observar que, de maneira geral, a citotoxicidade foi dose-dependente, pois à medida que se aumentou a concentração de formulação com que as células foram tratadas houve uma diminuição na viabilidade destas, sendo que os valores variaram entre 46 - 3 % para a NCP-U2 e 31 - 5% para a NCP-B2.

É importante ressaltar que, enquanto o potencial citotóxico da ubiquinona frente a linhagens de células tumorais *in vitro* já está bem documentado na literatura (PICARDO et al., 1996; NOHL et al., 2005; RUSCIANI et al., 2006; PINTO et al., 2009; BAHAR et al., 2010; MA et al, 2011; GRASSO et al., 2013), não há tais informações quanto ao óleo de pracaxi, sendo este o primeiro relato científico de que este óleo vegetal apresenta a capacidade de reduzir o número de células tumorais viáveis em testes *in vitro*, o que reforça a relevância e ineditismo do presente trabalho.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- O método analítico validado por CLAE para a quantificação da ubiquinona nos sistemas nanoestruturados mostrou-se específico, linear, preciso e exato;
- Foi demonstrada a viabilidade de preparação de diferentes sistemas nanoestruturados (nanoemulsões, nanocápsulas e nanoesferas) contendo ubiquinona, óleo de pracaxi e dois polímeros com diferentes características, PCL e Eudragit[®] EPO;
- No preparo das suspensões de nanocápsulas de óleo de pracaxi, foi evidenciada a influência da quantidade de óleo utilizada na formulação, sendo que as formulações contendo menor concentração de óleo (0,15g) apresentaram as características físico-químicas mais adequadas;
- Todos os sistemas nanoestruturados promoveram uma menor degradação da ubiquinona frente à radiação UVC comparada ao fármaco não-encapsulado, sendo esta proteção mais pronunciada na nanoemulsão e nas nanocápsulas;
- Os sistemas nanoestruturados demonstraram ser estáveis quando armazenados por 90 dias à temperatura ambiente, tendo suas características físico-químicas alteradas significativamente apenas quando submetidos ao calor e umidade;
- As suspensões de nanocápsulas de PCL e óleo de pracaxi contendo ou não ubiquinona (NCP-U2 e NCP-B2) foram consideradas relativamente hemocompatíveis em um teste de hemólise qualitativo preliminar;
- Verificou-se que, tanto a ubiquinona livre quanto o óleo de pracaxi livre foram capazes de reduzir o número de células viáveis de glioma (C6) e câncer de mama (MCF-7), em comparação ao controle, sendo este o primeiro relato científico de que este óleo vegetal apresenta atividade citotóxica frente a células tumorais em testes *in vitro*. O potencial citotóxico foi mais pronunciado nas formulações NCP-U2 e NCP-B2, o que sugere que o encapsulamento dos constituintes (óleo e fármaco) contribui para um maior efeito anticancerígeno. Desta forma, os resultados indicam que as nanoestruturas preparadas com óleo de pracaxi podem ser consideradas carreadores promissores para explorar as potencialidades terapêuticas da ubiquinona.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMCZAK, M.; KROK, M.; PAMUŁA, E.; POSADOWSKA, U.; SZCZEPANOWICZ, K.; BARBASZ, J.; WARSZYNSKI, P. Linseed oil based nanocapsules as delivery system for hydrophobic quantum dots. **Colloids and Surfaces B**, v. 110, p.1, 2013.

ALBINI, A.; FASANI, E. Rationalizing the photochemistry of drugs. In: TØNNESSEN, H.H. **Photostability of drugs and drug formulations**. 2. ed. Flórida: CRC Press, cap.4, p. 67, 2004.

ALLÉMANN, E.; GURNY, R.; DOELKER, E. Drug loaded nanoparticles - preparation methods and in vivo studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 39, p. 173-191, 1993.

ALMEIDA, J.S.; JEZUR, L.; FONTANA, M.C.; PAESE, K.; SILVA, C.B.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; BECK, R.C.R. Oil-Based Nanoparticles Containing Alternative Vegetable Oils (Grape Seed Oil and Almond Kernel Oil): Preparation and Characterization. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, p.165-172, 2009.

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

ÁLVAREZ-ROMÁN, R.; BARRÉ, G.; GUY, R.H.; FESSI, H. Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, p.191-195, 2001.

AMAZONIA ORGANICS. Disponível em:
<<http://www.amazoniaorganics.com/index.php?cPath=10>>. Acesso em: 10 jun. 2012.

ARANGO, M. A.; CAMPANERO, M. A.; RENEDO, M. J.; PONCHEL, G.; IRACHE, J. M.. Gliadin nanoparticles as carriers for the oral administration of lipophilic drugs. Relationships between bio adhesion and pharmacokinetics. **Pharmaceutical Research**, v. 18, p. 1521-1527, 2001.

ARCHANA, D.; DUTTA, J.; DUTTA, P.K. Evaluation of chitosan nano dressing for wound healing: Characterization, *in vitro* and *in vivo* studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.57, p. 193, 2013.

AVGOUSTAKIS, K.; BELETSI, A.; PANAGI, Z.; KLEPETSANIS, P.; KARYDAS, A. G.; ITHAKISSIOS, D. S.; J. PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties. **Journal of Controlled Release**, v. 79, p. 123, 2002.

BAHAR, M.; KHAGHANI, S.; PASALAR, P.; PAKNEJAD, M.; KHORRAMIZADEH, M. R.; MIRMIRANPOUR, H.; NEJAD, S. G. Exogenous coenzyme Q₁₀ modulates MMP-2 activity in MCF-7 cell line as a breast cancer cellular model. **Nutrition Journal**, v. 9, p. 62, 2010.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, p.13, 2005.

BENDER, E.A.; ADORNE, M.D.; COLOMÉ, L.L.; ABDALLA, D.S.P.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Hemocompatibility of poly(ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 426, p. 271, 2012.

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

BRAGANHOL, E.; MORRONE, F.B.; BERNARDI, A.; HUPPES, D.; MEURER, L.; EDELWEISS, M.I.; LENZ, G.; WINK, M.R.; ROBSON, S.C.; BATTASTINI, A.M. Selective NTPDase2 expression modulates in vivo rat glioma growth. **Cancer Science**, v.100, p. 1434, 2009.

BRASIL. Resolução nº 01, de 29 de julho de 2005. **Guia para a realização de estudos de estabilidade**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF, Diário Oficial da União, 01 ago. 2005. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/.../01_05_re_comentada.pdf>. Acesso em: 20 ago, 2012.

BOREKOVÁ, M.; HOJEROVÁ, J.; KOPRDA, V.; BAUEROVÁ, K. Nourishing and Health Benefits of Coenzyme Q₁₀ – a Review. *Czech Journal of Food Sciences*, v. 26, p. 229–241, 2008.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H.; BONNET, I.; ZYDOWICZ, N. Synthesis and characterization of polyurethane and poly(etherurethane) nanocapsules using a new technique of interfacial polycondensation combined to spontaneous emulsification. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, p. 89-100, 2004.

BUNJES, H.; DRECHSLER, M.; KOCH, M. H. J.; WESTESEN, K. Incorporation of the Model Drug Ubidecarenone into Solid Lipid Nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 18, 2001.

CALVO, P.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO., M.J. Comparative in Vitro Evaluation of Several Colloidal Systems, Nanoparticles, Nanocapsules, and Nanoemulsions, as Ocular Drug Carriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, 1996.

CALZAVARA, B. B. G.; SOUSA, J. M. S.; CARVALHO, A. C. F. Estudos sobre produtos potenciais da Amazônia (1ª fase). Belém, Sistema Nacional de Planejamento Agrícola, Universidade Regional de Supervisão Norte, p. 100, 1978.

CENNI, E.; GRANCHI, D.; AVNET, S.; FOTIA, C.; SALERNO, M.; MICIELI, D.; SARPIETRO, M.G.; PIGNATELLO, R.; CASTELLI, F.; BALDINI, N. Biocompatibility of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles conjugated with alendronate. **Biomaterials**, v. 29, p. 1400, 2008.

CHASSOT, J. M.; RIBAS, D. A.; SILVEIRA, E. F.; GRUSPAN, L.; PIRES, C. C.; FARAGO, P. V.; BRAGANHOL, E.; TASSO, LEANDRO; CRUZ, L. Beclomethasone dipropionate-loaded polymeric nanocapsules: development, in vitro cytotoxicity, and in vivo evaluation of acute lung injury. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology** (Print), 2014.

CHELLAMPILLAI, B.; PAWAR, A.P. Improved bioavailability of orally administered andrographolide from pH-sensitive nanoparticles. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 35, p. 123, 2011.

CHEN, S.; LIU, W.; WAN, J.; CHENG, X.; GU, C.; ZHOU, H.; CHEN, S.; ZHAO, X.; TANG, Y.; YANG, X. Preparation of Coenzyme Q10 nanostructured lipid carriers for epidermal targeting with high-pressure microfluidics technique. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 39, p.20, 2013.

CHO, E.C. Effect of polymer characteristics on the thermal stability of retinol encapsulated in aliphatic polyester nanoparticles. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 33, p. 2560, 2012.

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

CHUN, J.; GOODMAN, C. L.; RICE, W. C.; MCINTHOSI, A.H.; CHIPPENDALE, G. M.; SCHUBERT, K. R. *Pentaclethra macroloba* seed effect on larval growth cell viability and

midgut enzyme activity of *Helicoverpa zea*. **Journal of Economic Entomology**, v. 87, p. 1754-1760, 1994.

COBANOGLU, U.; DEMIR, H.; CEBI, A.; SAYIR, F.; ALP, H.H.; AKAN, Z.; GUR, T.; BAKAN, E. Lipid Peroxidation, DNA Damage and CoenzymeQ10 in Lung Cancer Patients - Markers for Risk Assessment? **Asian pacific journal of cancer prevention**, v. 12, p. 1399, 2011.

COSTA, M.N.F.S.; MUNIZ, M.A.P.; NEGRÃO, C.A.B.; COSTA, C.E.F.; LAMARÃO, M.L.N.; MORAIS, L.; SILVA JÚNIOR, J.O.C.; COSTA, R.M.R. Characterization of *Pentaclethra macroloba* oil. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, p. 1, 2013.

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

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

CRANE, F.L.; HATE, Y.; LESTER, R.L.; WIDMER, C. Isolation of quinone from beef heart and beef mitochondria. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 25, p. 220 - 221, 1957.

CRANE, F. L. Biochemical Functions of Coenzyme Q10. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 20,p. 591–598, 2001.

CRUZ, L.; SOARES, L.U.; DALLA COSTA, T.; MEZZALIRA, G.; SILVEIRA N.P.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 313, p. 198, 2006.

ÇİFTÇİ, G. A.; YILDIRIM S., U.; ALTINTOP, M. D.; KAPLANCIKLI, Z. A. Induction of apoptosis in lung adenocarcinoma and glioma cells by some oxadiazole derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, 2014.

DATE, A.A.; JAIN, A.; KHACHANE, P.; NAGARSENKER, M.S. Organic solvent-free approach to single step fabrication of Eudragit nanoparticles using Labrasol. **Pharmazie**, v. 65, p.733, 2010.

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

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

Ding, K; Ding, Y.; Dong, P.; Yang, Y., Zhu, X. New passive targeting nanoemulsion for night and day use for skin whitening, contains isopropyl myristate, caprylocaproyl macrogolglycerides, cetearyl glucoside, asiaticoside, coenzyme Q₁₀, baicalin, citric acid and sodium hydroxide. CN101401775-A. 8 abril 2009, China.

Ding Y., C.N; Yang Y., C.N; Zhu X., C.N; Ding, K. C.N; Dong P., C.N; Zuo X., C.N. Nanoemulsion transdermal agent used for removing senile plaque on face, contains clausenamide, superoxide dismutase, vitamin E, gingerol, seabuckthorn oil, coenzyme Q₁₀, citric acid, sodium citrate and polyglyceryl fatty acid ester. CN101791285-A. 4 agosto 2010, China.

DOMB A.J.; TABATA, Y.; RAVI KUMAR M.N.V.; FARBER, S. (Eds.). Nanoparticles for Pharmaceutical Applications. **American Scientific Publishers**, 2007.

DUNCAN, R; GASPAR, R. Polymer therapeutics as nanomedicines: new perspectives. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 492–501, 2011.

ECKEY, E. W. Vegetable fats and oils. New York, **Reinhold Publ.**, p. 836 , 1954.

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

EYELESS CO LTD. Ahn, J. Cosmetic composition useful for providing whitening effect and antioxidant effect, moisturizing skin and for masking wrinkles, comprises nanoemulsion particle obtained by using lecithin and coenzyme Q₁₀. KR2010036296-A. 7 abril 2010, Coréa.

FARBOUD, E.S.; NASROLLAHI, S. A.; TABBAKHI, Z. Novel formulation and evaluation of a Q₁₀-loaded solid lipid nanoparticle cream: in vitro and in vivo studies. **International Journal of Nanomedicine** v. 6, p. 611-617, 2011.

FATTAL, E., VAUTHIER, C. Nanoparticles as drug delivery systems. **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**, v. 2, p. 811-833, 2002.

FELIPPI, C.C.; OLIVEIRA, D.; STRÖHER, A.; CARVALHO, A.R.; AQUINO VAN ETTEN, E.A.M.; BRUSCHI, M.; RAFFIN, R. Safety and efficacy of antioxidants-loaded nanoparticles for an anti-aging application. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 8, p. 316, 2012.

FENG, S. S. Nanoparticles of biodegradable polymers for new-concept chemotherapy. **Expert Review of Medical Devices**, v. 1, p. 115-125, 2004.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.P. Procédé de préparation des systèmes colloïdaux d'une substance, sous forme de nanocapsules. European Patent 0274961 A1 (1988).

FESSI, H.; DEVISSAGUET, J.P.; PUISIEUX, F.; THIES, C. Procédé de préparation des systèmes colloïdaux d'une substance sous forme du nanoparticules. European Patent 0275796 A1 (1988).

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. Ph. ; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, R1-R4, 1989.

FESTENSTEIN, G. N.; HEATON, R. W.; LOWE, J.S.; MORTON, R.A. A constituent of the unsaponifiable portion of animal tissue lipid (1max 272mm). **Biochemical Journal**, v. 59, p. 558 - 566, 1955.

FLORES, F.C.; RIBEIRO, R.F.; OURIQUE, A.F.; ROLIM, C.M.B.; SILVA, C.B.; POHLMANN, A.R.; BECK, R.C.R.; GUTERRES, S.S. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Química Nova**, v. 34, 2011.

FOLKERS, K.; ELLIS, J.M.; YANG, O.; TAMAGAWA, H.; NARA, Y.; YE, C.; SHEN, A. In: **Vitamins and Cancer Prevention** , Wiley-Liss, p. 103-110, 1991.

FOLKERS, K.; BROWN, R.; HANIOKA, T.; WILLIAMS, M.; QUILLIN P.; IAFELICE, R. **Submitted to Proceedings of the National Academy of Sciences**, Estados Unidos, 1993.

FONTANA, M.C.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R.; BECK, R.C.R. Nanoencapsulation as a Way to Control the Release and to Increase the Photostability of Clobetasol Propionate: Influence of the Nanostructured System. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 1, 2009.

FOROOTANFAR, H.; ADELI-SARDOU, M.; NIKKHOO, M.; MEHRABANI, M.; AMIR-HEIDARI, B.; SHAHVERDI, A.R.; SHAKIBAIE, M. Antioxidant and cytotoxic effect of biologically synthesized selenium nanoparticles in comparison to selenium dioxide. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 28, p. 75, 2014.

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

GALINDO-RODRIGUEZ, S.; ALLÉMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. **Pharmaceutical Research**, v. 21, p.1428, 2004.

GOKCE, E.H.; KORKMAZ, E.; TUNCAY-TANRIVERDI, S.; DELLERA, E.; SANDRI, G.; CRISTINA BONFERONI, M.; OZER, O. A comparative evaluation of coenzyme Q10-loaded liposomes and solid lipid nanoparticles as dermal antioxidant carriers. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 5109, 2012.

GOVENDER, T.; RILEY, T.; EHTEZAZI, T.; GARNETT, M. C.; STOLNIK, S.; ILLUM, L.; DAVIS, S. S. Defining the drug incorporation properties of PLA-PEG nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v.199, p. 95, 2000.

GRASSO, C.; LARSEN, L.; McCONNELL, M.; SMITH, R.A.J.; BERRIDGE, M.V. Anti-leukemic activity of ubiquinone-based compounds targeting trans-plasma membrane electron transport. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, p.3168, 2013.

GUTERRES, S.S.; WEISS, V.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R. Influence of benzyl benzoate as oil core on the physicochemical properties of spray-dried powders from polymeric nanocapsules containing indomethacin. **Drug delivery**, v. 7, p. 195, 2000.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M .P.; POHLMANN, A. R. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.

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

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

HATANAKA, J.; KIMURA, Y.; LAI-FU, Z.; ONOUE, S.; YAMADA, S. Physicochemical and pharmacokinetic characterization of water-soluble Coenzyme Q₁₀ formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, p. 112-17, 2008.

HODGES, S.; HERTZ, N.; LOCKWOOD, K.; LISTER, R. CoQ₁₀: could it have a role in cancer management? **BioFactors**, v. 9, p. 365, 1999.

HOPPE, U.; BERGEMANN, J.; DIEMBECK, W.; ENNEN, J.; GOHLA, S.; HARRIS, I.; JACOB, J.; KIELHOLZ, J.; MEI, W.; POLLET, D.; SCHACHTSCHABEL, D.; SAUERMAN, G.; SCHREINER, V.; STÄB, F.; STECKEL, F. Coenzyme Q₁₀, a cutaneous antioxidant and energizer. **Biofactors**, v. 9, p. 371-78, 1999.

HU, X.; WANG, Y.; PENG, B. Chitosan-capped mesoporous silica nanoparticles as pH-responsive nanocarriers for controlled drug release. **Chemistry - An Asian Journal**, v. 9, p.319, 2014.

ICH. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (2005). **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**, ICH Steering Committee: Geneva.

IRACHE, J. M.; ESPARZA, I.; GAMAZO, C.; AGÜEROS, M.; ESPUELAS, S. Nanomedicine: Novel approaches in human and veterinary Therapeutics. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 47-71, 2011.

JÄGER, E.; VENTURINI, C.G.; POLETTO, F.S.; COLOMÉ, L.M.; POHLMANN, J.P.U.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A.M.O.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Sustained Release from Lipid-Core Nanocapsules by Varying the Core Viscosity and the Particle Surface Area. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.5, p. 130, 2009.

JAIN, D.S.; ATHAWALEA, R.B.; BAJAJB, A.N.; SHRIKHANDEA, S.S.; GOELC, P.N.; NIKAMC, Y.; GUDEC, R.P. Poly lactic acid (PLA) nanoparticles sustain the cytotoxic action of temozolomide in C6 Glioma cells. **Biomedicine & Aging Pathology**, v.3, p. 201, 2013.

JEYA, M.; MOON, H. J.; LEE, J. L.; KIM, I. W.; LEE, J. K. Current state of coenzyme Q₁₀ production and its applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 1653–1663, 2010.

JIMENEZ, M.M., PELLETIER, J.; BOBIN M.F.; MARTINI, M.C. Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate. **International Journal of Pharmaceutis**, v. 272, p.45, 2004.

JONES, M.N. Surfactants in membrane solubilisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 177, p. 137, 1999.

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

KHACHANE; P.; DATE, A.A.; NAGARSENKER, M.S. Eudragit EPO nanoparticles: application in improving therapeutic efficacy and reducing ulcerogenicity of meloxicam on oral administration. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.7, p. 590, 2011.

KOTWAL, V. B.; SAIFEE, M.; INAMDAR, N.; BHISE, K. Biodegradable polymers: Which, when and why? **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 69, p. 616, 2007.

KREUTER, J. Nanoparticles, in: J. Kreuter (Ed.). **Colloidal Drug Delivery Systems**, p. 219-342, 1994.

KUMAR, R. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 234-258, 2000.

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

KUNTWORBE, N.; AL-KASSAS, R. Design and *in vitro* haemolytic evaluation of cryptolepine hydrochloride-loaded gelatine nanoparticles as a novel approach for the treatment of malaria. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, 2012.

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

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

LEROUX, J.C.; COZENS, R.; ROESEL, J.L.; GALLI, B.; KUBEL, F.; DOELKER, E.; GURNY, R.. Pharmacokinetics of a novel HIV-1 protease inhibitor incorporated into

biodegradable or enteric nanoparticles following intravenous and oral administration to mice. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 84, p. 1387-1391, 1995.

LETCHFORD, K.; LIGGINS, R.; WASAN, K.M.; BURT, H. In vitro human plasma distribution of nanoparticulate paclitaxel is dependent on the physicochemical properties of poly(ethylene glycol)-block-poly(caprolactone) nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 196, 2009.

LIMAYEM, I., CHARCOSSET, C., SFAR, S., FESSI, H. Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 325, p. 124-131, 2006.

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

LIU, D.; CHEN, Y.; FENG, X.; DENG, M.; XIE, G.; WANG, J.; ZHANG, L.; LIU, Q.; YUAN, P. Micellar nanoparticles loaded with gemcitabine and doxorubicin showed synergistic effect. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p. 158, 2014.

LOCKWOOD, K.; MOESGAARD, S.; FOLKERS, K. Partial and complete regression of breast cancer in patients in relation to dosage of coenzyme Q₁₀. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.199, p. 1504-1598, 1994.

LOCKWOOD, K.; MOESGAARD, S.; YAMAMOTO, T.; FOLKERS, K. Progress on breast cancer with vitamin q10 and the regression of metastases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.212, p. 172-177, 1995.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**, v.2, p.386, 2002.

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

MA, W.; ZHOU, H.; YING, Y.; LI, D.; CHEN, G.; LONG Y.; CHEN, H. *In situ* spectroelectrochemistry and cytotoxic activities of natural ubiquinone analogues. **Tetrahedron**, v. 67, p. 5990, 2011.

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

MANCINI, A.; FESTA, R.; RAIMONDO, S.; PONTECORVI, A.; LITTARRU, G. P. Hormonal Influence on Coenzyme Q₁₀ Levels in Blood Plasma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 9216-9225, 2011.

MARCHIORI, M.C.L.; OURIQUE, A.F.; SILVA, C.B.; RAFFIN, R.P.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; BECK, R.C.R. Spray-dried powders containing tretinoin-loaded engineered lipid-core nanocapsules: development and photostability study. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 11, p. 1, 2012.

MARTINI, E. ; CARVALHO, E., TEIXEIRA, H. Adsorção de oligonucleotídeos em nanoemulsões obtidas por emulsificação espontânea. **Química Nova**, v. 30, p. 930-934, 2007.

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

MOORE, D.E. Rationalizing the photochemistry of drugs. In: TØNNESEN, H.H. **Photostability of drugs and drug formulations**. 2. ed. Flórida: CRC Press, Cap.4, p. 67, 2004.

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

MORAIS, L.R. **Produção de óleo de duas espécies amazônicas por prensagem: Bacuri *Platonia insignis* (Mart.) e Pracachy *Pentaclethra macroloba* (Willd)**. Dissertação (Mestrado Em Química Orgânica) - Universidade Federal do Pará, 2005.

MORAIS, L. R. **Banco de Dados Sobre Espécies Oleaginosas da Amazônia**, não-publicado. Disponível em: <portal.mda.gov.br/o/4070820>. Acesso em: 4 agosto 2012.

MORRAL-RUÍZ, G.; MELGAR-LESMES, P.; GARCÍA, M.L.; SOLANS, C.; GARCÍA-CELMA, M.J. Design of biocompatible surface-modified polyurethane and polyurea Nanoparticles. **Polymer**, v. 53, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55, 1983.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F; BARRAT, G . Poly(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process:

influence of the composition on physico-chemical and structural properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.89, p. 614-626, 2000.

MOUSTAFINE, R.I.; BUKHOVETS, A.V.; SITENKOV, A.Y.; KEMENOVA, V.A.; ROMBAUT, P.; VAN DEN MOOTER, G. Eudragit E PO as a complementary material for designing oral drugdelivery systems with controlled release properties: comparative evaluation of new interpolyelectrolyte complexes with countercharged eudragit L100 copolymers. **Molecular Pharmaceutics**, v.10, p. 2630, 2013.

MUSTAFIN, R.I.; KABANOVA, T.V.; SEMINA, I.I.; BUKHOVETS, A.V.; GARİPOVA, V.R.; SHILOVSKAYA, E.V.; NASIBULLIN, S.F.; SITENKOV, A.Y.; KAZAKOVA, R.R.; KEMENOVA, V.A. Biopharmaceutical assessment of a polycomplex matrix system based on Carbomer 940 and Eudragit® EPO for colon-specific drug delivery. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 45, p. 41, 2011a.

MUSTAFIN, R. I.; BUKHOVETS, A.V.; SITENKOV, A.Y.; GARİPOVA, V.R.; KEMENOVA, V.A.; ROMBAUT, P.; VAN DEN MOOTER, G. Synthesis and characterization of a new carrier basedon Eudragit® EPO/S100 interpolyelectrolyte complex for controlled colon-specific drug delivery. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 45, p. 45, 2011b.

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

NANJWADE, B.K.; KADAM, V.T.; MANVI, F.V. Formulation and characterization of nanostructured lipid carrier of ubiquinone (Coenzyme Q10). **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 9, p. 450, 2013.

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

NIKAM V.K.; KOTADE, K.B.; GAWARE, V.M.; DOLAS, R.T.; DHAMAK, K.B.; SOMWANSHI, S.B.; KHADSE, A.N.; KASHID, V.A. Eudragit, a versatile polymer : a Review. **Pharmacology Online**, v. 1, p. 152, 2011.

NOHL, H.; ROHR-UDILOVA, N.; GILLE, L.; BIEBERSCHULTE, W.; JUREK, D.; MARIAN, B.; SCHULTE-HERMAN, R. Suppression of tumour-promoting factors in fat-induced colon carcinogenesis by the antioxidants caroverine and ubiquinone. **Anticancer Research**, v. 25, p. 2793, 2005.

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

OLIVEIRA, C.I.A. **Aspectos farmacológicos da Coenzima Q10**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal, 2012.

OLIVEIRA, C.P.; VENTURINI, C.G.; DONIDA, B.; POLETTO, F.S.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. **Soft Matter**, v. 9, p. 1141, 2013.

OURIQUE, A.F.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; BECK, R.C.R. Tretionoin-loaded nanocapsules: preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, p. 1-4, 2008.

OVERVAD, K.; DIAMANT, B.; HOLM, L.; HÜLMER, G.; MORTENSEN, S. A.; STENDER, S. Coenzyme Q10 in health and disease. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, p., 764-770, 1999.

PAL, A.; TOPPO, F.A.; CHAURASIYA, P.K.; SINGOUR, P.K.; PAWAR, R.S. In-vitro cytotoxicity study of methanolic fraction from *Ajuga Bracteosa* wall ex. benth on MCF-7 breast adenocarcinoma and hep-2 larynx carcinoma cell lines. **Pharmacognosy Research**, v. 6, p. 87, 2014.

PESCE, C. Oleaginosas da Amazônia. **Oficinas Gráficas da Revista Veterinária**, 1941.

PERUGINI, P.; SIMEONI, S.; SCALIA, S. Effect of nanoparticle encapsulation on the photostability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate. **International Journal of Pharmaceutis**, v. 246, p. 37, 2002.

PICARDO, M.; GRAMMATICO, P.; ROCCELLA, F.; ROCCELLA, M.; GRANDINETTI, M.; DEL PORTO, G.; PASSI, S. Imbalance in the antioxidant pool in melanoma cells and normal melanocytes from patients with melanoma. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 107, p. 322, 1996.

PINTO, L.; SLOAN, A.; PERSAUD, I.; NARAIN, N. R. Normalization of BCL-2 family members in breast cancer by coenzyme Q₁₀. **Ethnicity & Disease**, v. 19, p. S17-S18, 2009.

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

POLETTO, F.S.; JÄGER, E.; CRUZ, L.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. The effect of polymeric wall on the permeability of drug-loaded nanocapsules. **Materials Science and Engineering: C**, v. 28, p. 472, 2008.

PORRAS, M.; SOLANS, C.; GONZÁLEZ, C.; GUTIÉRREZ, J.M. Properties of water-in-oil nanoemulsions prepared by a low energy emulsification method. **Colloids & surfaces A: Physicochemical and engineering aspects**, v. 324, p. 181-188, 2008.

PORTAKAL, O.; OZKAYA, O.; INAL, M. E; BOZAN, B.; KOSAN, M.; SAYEK, I. Coenzyme Q₁₀ Concentrations and Antioxidant Status in Tissues of Breast Cancer Patients. **Clinical Biochemistry**, v. 33, p. 279–284, 2000.

PUISIEUX, F.; BARRATT, G.; COUARRAZE, G.; COUVREUR, P.; DEVISSAGUET, J.P.; DUBERNET, C.; FATTAL, E.; FESSI, H.; VAUTHIER, C.; BENITA, S. Polymeric micro- and nanoparticles as drug carriers. In: S. DUMITRIU. **Polymeric Biomaterials**. Nova Iorque: Marcel Dekker Inc., p. 749, 1994.

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

RABINOW, B.E. Nanosuspensions in drug delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 787, 2004.

RIBAS, D.A. **Desenvolvimento de nanocápsulas contendo cetoprofeno e avaliação in vitro da citotoxicidade**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

ROFFE, L.; SCHMIDT, K.; ERNST, E. Efficacy of coenzyme q10 for improved tolerability of cancer treatments: A Systematic Review. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, p. 4418, 2004.

ROGER, T. L; NELSEN, A. C.; SARKARI, M.; YOUNG, T. J.; JOHNSTON, K. P.; WILLIAMS, R.O. Enhanced aqueous dissolution of a poorly water soluble drug by novel particle engineering technology: spray-freezing into liquid with atmosphere freeze-drying. **Pharmaceutical Research**, v. 20, p. 485-493, 2003.

RUSCIANI, L.; PROIETTI, I.; RUSCIANI, A.; PARADISI, A.; SBORDONI, G.; ALFANO, C.; PANUNZI, S.; GAETANO, A.; LIPPA, S. Low plasma coenzyme Q10 levels as an

independent prognostic factor for melanoma progression. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 54, p. 234, 2006.

SAKEENA, M .H. F.; ELRASHID, S.M.; MUNAVVAR, A.S; AZMIN, M.N. Formulation and in vitro Evaluation of Ketoprofen in Palm Oil Esters Nanoemulsion for Topical Delivery. **Journal of Oleo Science**, v. 59, p. 223-228, 2011.

SALIMI, M.; ARDESTANIYAN, M.H.; KANDELOUS, H.M.; SAEIDNIA, S.; GOHARI, A.R.; AMANZADEH A.; SANATI, H.; SEPAHDAR, Z.; GHORBANI, S.; SALIMI, M. Anti-proliferative and apoptotic activities of constituents of chloroform extract of *Juglans regia* leaves. **Cell Proliferation**, 2014.

SANTIAGO, G. M. P.; VIANA, F. A.; PESSOA, O. D. L.; SANTOS, R.P.; POULIQUEN, Y. B. M.; ARRIAGA, A. M. C.; ANDRADE- NETO, M.; BRAZ-FILHO, R. Avaliação da atividade larvicida de saponinas triterpênicas isoladas de *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze (Fabaceae) e *Cordia piauhiensis* Fresen (Boraginaceae) sobre *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 15, P. 187, 2005.

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

SANTOS, S.S.; LORENZONI, A.; PEGORARO, N.S.; DENARDI, L.B.; ALVES, S.H.; SCHAFFAZICK, S.R.; CRUZ, L. Formulation and in vitro evaluation of coconut oil-core cationicnanocapsules intended for vaginal delivery of clotrimazole. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 116, p. 270, 2014.

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

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A.R . Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHWARZ, J.C.; BAISAENG, N.; HOPPEL, M.; LÖW, M.; KECK, C.M.; VALENTA, C. Ultra-small NLC for improved dermal delivery of coenzyme Q10. **International Journal of Pharmaceutics**, v.447, p. 213, 2013.

SHENOY, D. B.; AMIJI, M. M. Poly(ethylene oxide)-modified poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 293, p. 261-270, 2005.

SHISEIDO CO LTD(SHIS-C). Ikeda M., JP; Matsuo A., JP; Kihara K, JP. Oil-in-water emulsion type cosmetics e.g. milky lotion and cream, contain behenic acid, stearic acid, isostearic acid, triethanolamine, and specified amount of water. JP2010222317-A. 25 mar 2009, Japão.

SHISEIDO CO LTD(SHIS-C). Kawada K., JP; Minami T., JP; Ogura Y., JP. Pencil-like cosmetics e.g. eyebrow pencil prepared by blending mixed oil component including hydrogenated castor oil, behenic acid and Japan tallow, and semi-solid oil component e.g. bis-diglyceryl polyacyladipate-2. JP2010209009-A. 11 mar 2009, Japão.

SILVA, K.E.R.; ALVES, L.D.S.; SOARES, M.F.R.; PASSOS, R.C.S.; FARIA, A.R.; ROLIM NETO, P.J. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, p. 129-135, 2009.

SILVEIRA, E.F.; CHASSOT, J.M.; TEIXEIRA F.C.; AZAMBUJA, J.H.; DEBOM, G.; BEIRA, F.T.; DEL PINO, F.A.B.; LOURENÇO, A; HORN, A.P.; CRUZ, L.; SPANEVELLO, R.M.; BRAGANHOL, E. Ketoprofen-loaded polymeric nanocapsules selectively inhibit cancer cell growth in vitro and in preclinical model of glioblastoma multiforme. **Investigational New Drugs**, v. 31, p. 1424, 2013.

SINHA, V.R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; TREHAN, A. Poly-epsilon-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 1, 2004.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T.M.; KULKARNI, A.R.; RUDIZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of controlled release**, v. 70, p. 1-20, 2001.

STELLA, B.; ARPICCO, S.; ROCCO, F.; MARSAUD, V.; RENOIR, J.M.; CATTEL, L.; COUVREUR, P. Encapsulation of gemcitabine lipophilic derivatives into polycyanoacrylate nanospheres and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 71, p. 344, 2007.

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

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nanoemulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108, p. 303, 2004.

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

TEIXEIRA, H.; ROSILIO, V.; LAIGLE, A.; LEPAULT, J.; ERK, I.; SCHERMAN, D.; BENITA, S.; COUVREUR, P. DUBERNET, C. Characterization of oligonucleotide/lipid interactions in submicron cationic emulsions: influence of the cationic lipid structure and the presence of PEG-lipids. **Biophysical Chemistry**, v. 92, p. 169, 2001.

TEIXEIRA, H.; DUBERNET, C.; CHACUN, H.; RABINOVICH, L.; BOUTET, B.; DEVERRE, J.R.; BENITA, S.; COUVREUR, P. Cationic emulsions improves the delivery of oligonucleotides to leukemic P388/ADR cells in ascite. **Journal of Controlled Release**, v. 89, p. 473, 2003.

TERROSO, T.; KÜLKAMP, I. C.; JORNADA, D. S.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Development of Semi-Solid Cosmetic Formulations Containing Coenzyme Q₁₀-Loaded Nanocapsules. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, p. 819-26, 2009.

THASSU, D.; DELEERS, M.; PATHAK, Y. (Eds.). Nanoparticulate drug delivery systems. **Informa Healthcare USA**, cap.1, 2007.

TØNNESEN, H.H. Photochemical degradation of components in drug formulations. I. An approach to the standardization of degradation studies. **Pharmazie**, v. 46, p. 263, 1991.

TORCHILIN V.P.(Ed.). Nanoparticles as Pharmaceutical carriers. **Imperial College Press**, Londres, 2006.

TRIMAILLE, T.; CHAIX, C.; DELAIR, T.; PICHOT, C.; TEIXEIRA, H.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Interfacial deposition of functionalized copolymers onto nanoemulsions produced by the solvent displacement method. **Colloid and Polymer Science**, v. 279, p. 784, 2001.

USON, N.; GARCIA, M.J.; SOLANS, C. Formation of water-in-oil nanoemulsions in a water/mixed non-ionic surfactant/oil systems prepared by a low energy emulsification method. **Colloids & surfaces A: Physicochemical and engineering aspects**, v. 250 p. 415-421, 2004.

VAUTHIER, C.; DUBERNET C.; FATTAL, E.; PINTO-ALPHANDARY, H.; COUVREUR, P. Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 519-48, 2003.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 26, 2009.

VAUTHIER-HOLTZSCHERER, C.; BENABBOU, S.; SPENLEHAUER, G.; VEILLARD, M.; COUVREUR, P. Methodology for the preparation of ultra-dispersed polymer systems. **S.T.P. Pharma Sciences**, v. 1, p. 109-116, 1991.

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

XIA, S.; XU, S.; ZHANG, X.. Optimization in the preparation of coenzyme Q(10) nanoliposomes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 6358-66, 2006.

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

WANG, Y.; WANG, C.; GONG, C.; WANG, Y.; GUO, G.; LUO, F.; QIAN, Z. Polysorbate 80 coated poly (-caprolactone)–poly (ethylene glycol)–poly(-caprolactone) micelles for paclitaxel delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 434, p. 1, 2012.

WANG, Y.; LIU, Y.; LIU, Y.; WANG, Y.; WU, J.; LI, R.; YANG, J.; ZHANG, N. pH-sensitive pullulan-based nanoparticles for intracellular drug delivery. **Polymer Chemistry**, v.5, p. 423, 2014.

WEISS, M.; MORTENSEN, S.A.; RASSING, M.R.; MOLLER-SONNERGAARD, J.; POULSEN, G.; RASMUSSEN, S.N. Bioavailability of four oral coenzyme Q10 formulations in healthy volunteers. **Molecular Aspects of Medicine**, v.15, p. 273, 1994.

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

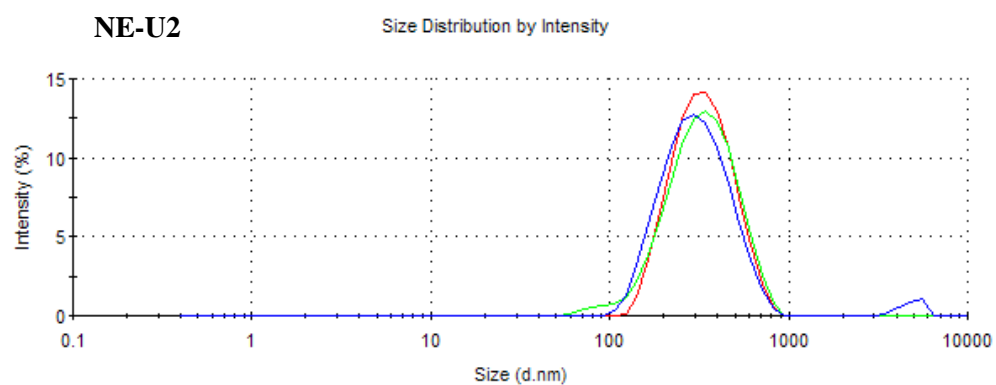
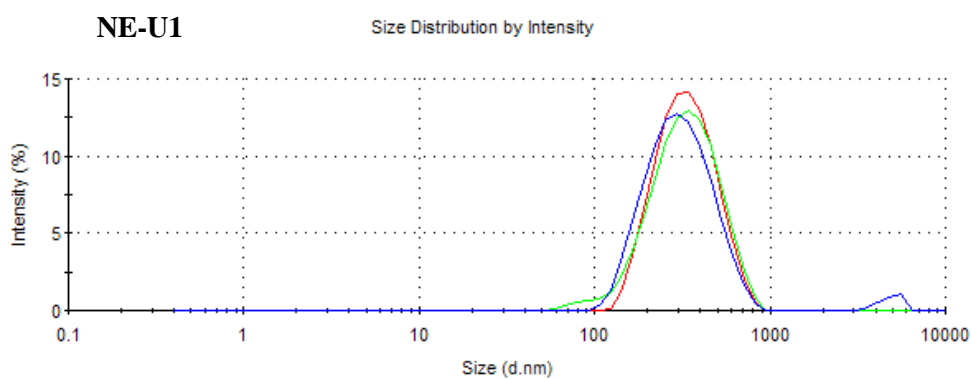
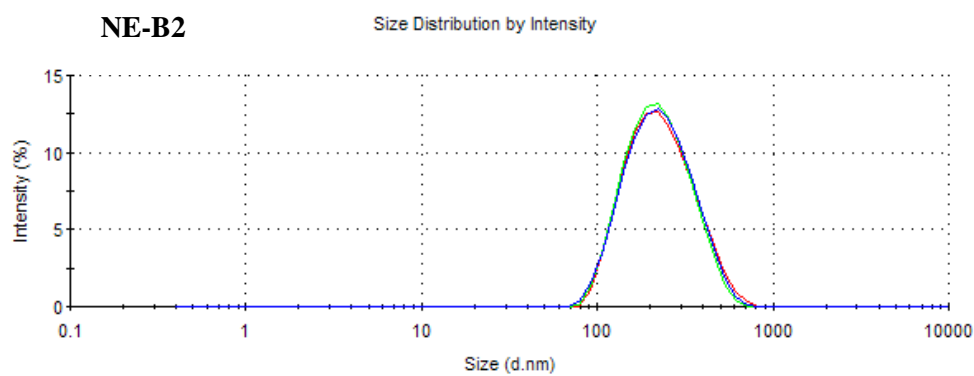
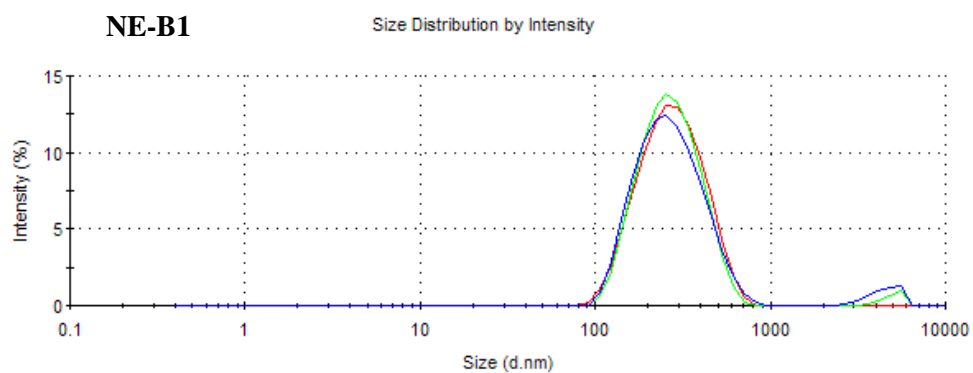
YUE, Y.; ZHOU, H.; LIU, G.; LI, Y.; YAN, Z.; DUAN, M. The advantages of a novel CoQ₁₀ delivery system in skin photo-protection. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 392, p. 57-63, 2010.

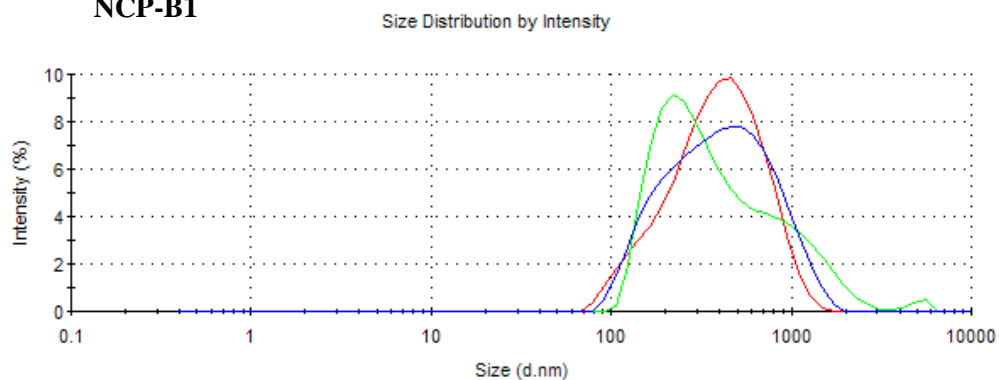
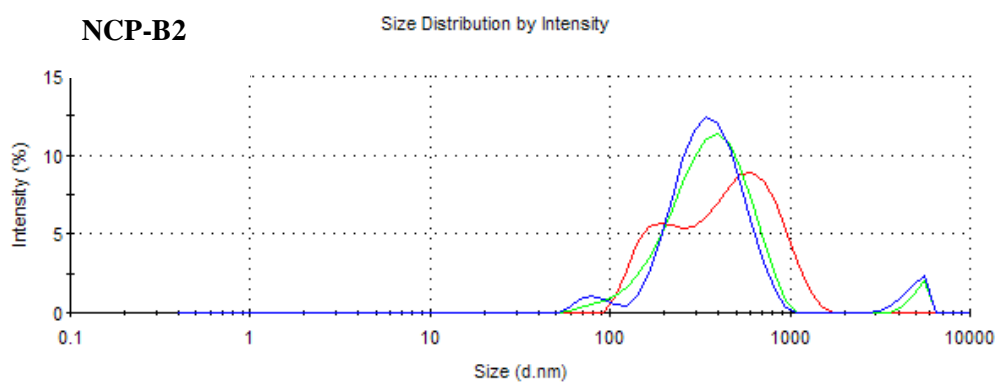
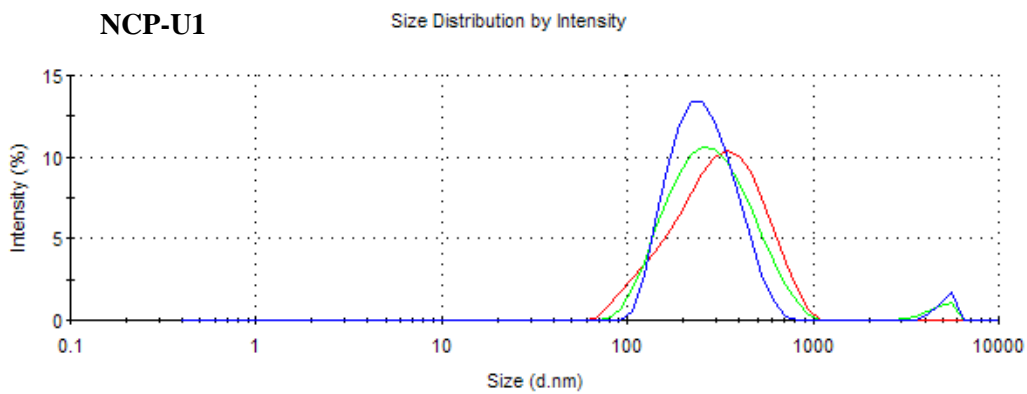
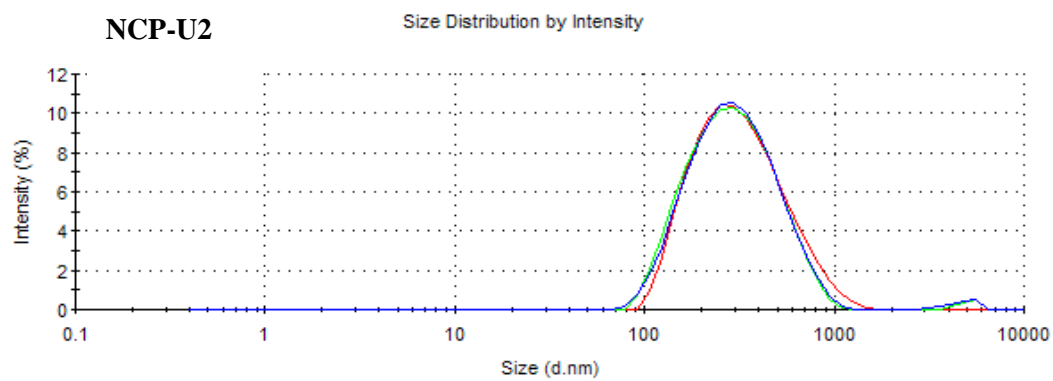
ZHANG, J.; WANG, S. Topical use of Coenzyme Q₁₀-loaded liposomes coated with trimethyl chitosan: Tolerance, precorneal retention and anti-cataract effect. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 372, p.66–75, 2009.

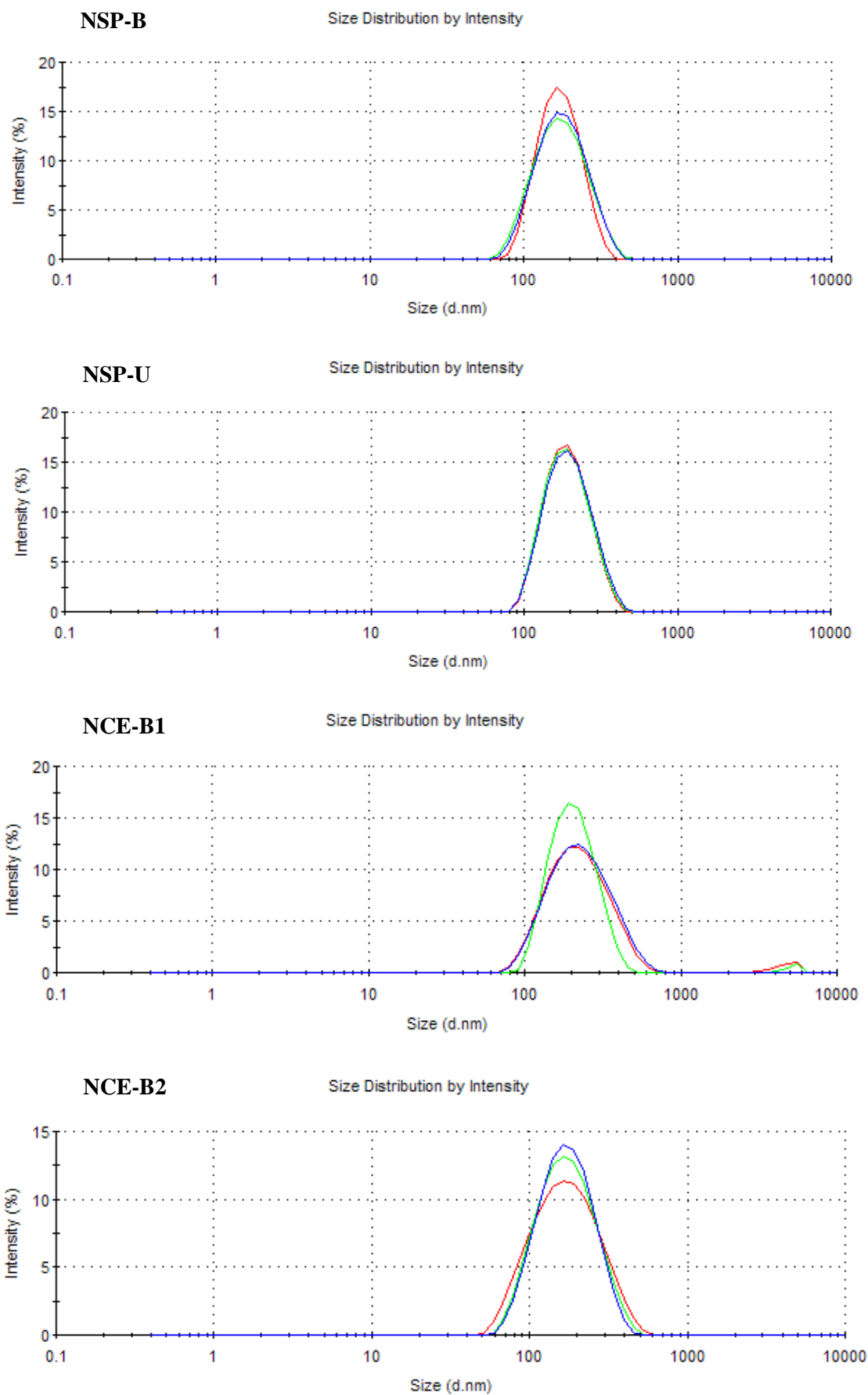
ZHOU, H.; YUE, Y.; GUANLAN, L.; LI, Y.; ZHANG, J.; YAN, Z.; DUAN, M. Characterisation and Skin Distribution of Lecithin-Based Coenzyme Q₁₀-Loaded Lipid Nanocapsules. **Nanoscale Research Letters**, v. 5, p. 1561-1569, 2010.

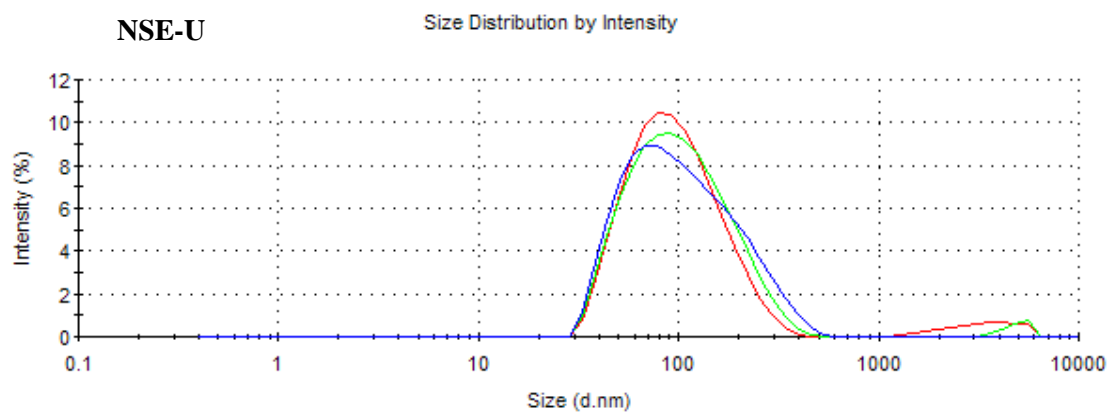
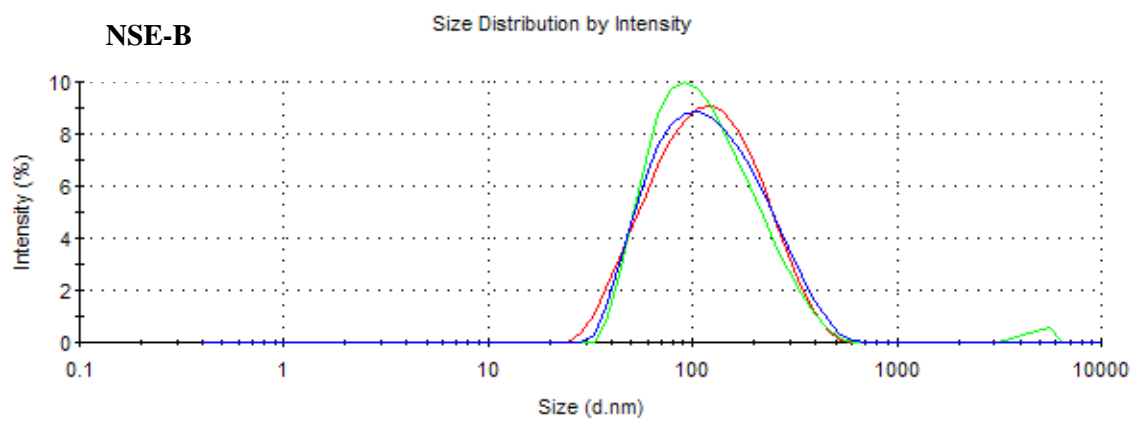
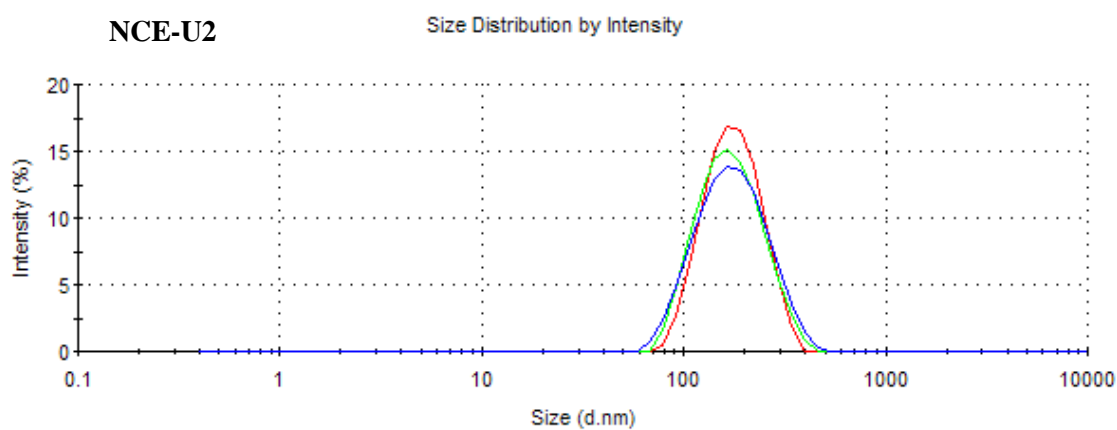
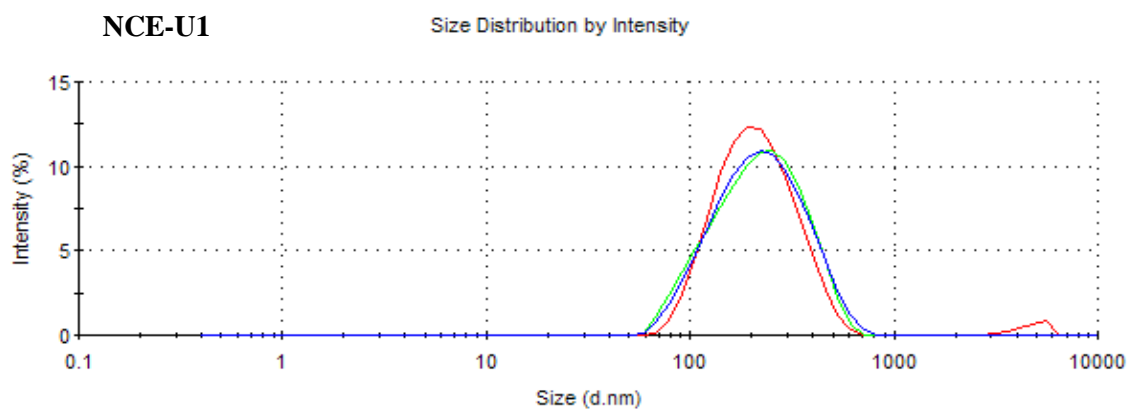
ZHOU, H.; ZHANG, J.; LONG, Y.; LIU, G.; DUAN, M.; XIA, Q. Improvement of the oral bioavailability of coenzyme Q₁₀ with lecithin nanocapsules. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.13, p. 706, 2013.

ZÜLLI, F.; BELSER, E.; SCHMID, D.; LIECHTI, C.; SUTER, F.; MIBELLE, A. G. Preparation and Properties of Coenzyme Q₁₀ Nanoemulsions. **Cosmetic Science Technology**, 2006.

Apêndice A - Gráficos de distribuição de tamanho de gotículas/partículas

NCP-B1**NCP-B2****NCP-U1****NCP-U2**





Apêndice B – Gráficos de potencial zeta dos sistemas nanoestruturados