

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

Aline Colling Schneider

**DESENVOLVIMENTO DE MICROPARTÍCULAS E COMPRIMIDOS  
MICROPARTICULADOS CONTENDO PIPERINA**

Santa Maria, RS  
2019

**Aline Colling Schneider**

**DESENVOLVIMENTO DE MICROPARTÍCULAS E COMPRIMIDOS  
MICROPARTICULADOS CONTENDO PIPERINA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane de Bona da Silva  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Letícia Cruz

Santa Maria, RS  
2019

Schneider, Aline Colling

Desenvolvimento de micropartículas e comprimidos  
microparticulados contendo piperina / Aline Colling  
Schneider.- 2019.

69 p.; 30 cm

Orientadora: Cristiane de Bona da Silva

Coorientadora: Letícia Cruz

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2019


1. Comprimido multiparticulado 2. Micropartículas  
poliméricas 3. Bioativo I. Silva, Cristiane de Bona da  
II. Cruz, Letícia III. Título.


**Aline Colling Schneider**

**DESENVOLVIMENTO DE MICROPARTÍCULAS E COMPRIMIDOS  
MICROPARTICULADOS CONTENDO PIPERINA**

Dissertação apresentada ao  
Curso de Pós-Graduação em  
Ciências Farmacêuticas da  
Universidade Federal de Santa  
Maria (UFSM, RS), como  
requisito parcial para obtenção  
do título de **Mestre em Ciências  
Farmacêuticas**.

**Aprovado em 30 de agosto de 2019:**

  
\_\_\_\_\_  
**Cristiane de Bona da Silva, Dra. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
**Leticia Cruz, Dra. (UFSM)**  
(Co-orientador)

  
\_\_\_\_\_  
**Ruy Carlos Ruver Beck, Dr. (UFRGS)**

  
\_\_\_\_\_  
**Scheila Rezende Schaffazick, Dra. (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2019

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, e não poderia ser diferente, agradeço aos meus pais, Lizete e Geraldo, que nunca mediram esforços para que eu pudesse ter a melhor educação possível e me ensinaram a importância e o valor de buscar conhecimento, sendo os melhores exemplos que eu poderia ter;

Ao meu irmão Pedro, por ser meu companheiro pra tudo e, apesar de ser meu eterno bebê, por ter me ensinado tantas coisas;

Ao Matheus, por ter me ajudado a resolver os empecilhos que surgiam, principalmente depois que saí de Santa Maria. Por toda força e conforto quando parecia que nada iria dar certo. Tu é meu porto seguro!;

À prof. Cris, pela confiança que depositou em mim para realizar este trabalho, pelas oportunidades e ensinamentos desde a iniciação científica. Tu é um grande exemplo de profissional correta e dedicada em tudo o que faz!;

À prof. Letícia, que aceitou o convite para a co-orientação, me ensinou muito sobre o assunto e sempre se mostrou disposta a sanar minhas dúvidas;

À minha eterna mestre Mari, por ter despertado meu gosto pelos inúmeros desafios da pesquisa. Com certeza, teu exemplo de esforço e determinação tiveram muita influência na minha escolha em seguir na pós-graduação. Obrigada por todos os ensinamentos e, principalmente, a grande amizade!;

Às minhas outras “RBDs” do Lab, Nadi, Ju, Thami, Dida: vocês fizeram muita falta nessa jornada e ainda fazem! Não esqueço os espetinhos, as champas pra assistir os jogos do Grêmio e as jantas;

Aos meus amigos Lebas, Ve, Vini, Ju, Su, Vini, Fran, Iorhann, Matheus e Marcel. Que falta que me faz esbarrar com vocês pelo corredor do CCS, ir nas vizinhas atrás de cia pro RU, as jantas e esquentas no QG do Jaguaredo. E agora estamos cada um pra um lado, mas as lembranças ficam e a amizade com certeza é pra sempre (e a convocação para eventos especiais como esse também). Vocês são os melhores, minha segunda família!;

Ao meu IC, Kadu, por toda a ajuda, interesse no trabalho e persistência, porque não foram poucas as vezes em que as coisas não foram como esperado;

À Rose, a mãezona de todos do lab, obrigada por todas as conversas, mates e almoços, e a todos do Lab Mais Mara, Camila, Jéssica, Roberta, Vanessa, Vivi, Lara, Gabriel. Pelas trocas de ideias, rodas de mate, conversas à toa e ajudas na realização deste trabalho;

À prof. Dra. Natália de Freitas Daudt, pelas análises no MEV;

À Universidade Federal de Santa Maria, em especial Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, aos professores e funcionários, pela acolhida tanto da graduação quanto na Pós e por ter me proporcionado muitos aprendizados e crescimento pessoal e profissional;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

### DESENVOLVIMENTO DE MICROPARTÍCULAS E COMPRIMIDOS MICROPARTICULADOS CONTENDO PIPERINA

AUTORA: Aline Colling Schneider

ORIENTADORA: Cristiane de Bona da Silva

CO-ORIENTADORA: Leticia Cruz

A piperina é um alcaloide extraído de plantas do gênero *Piper*, entre as quais a espécie *Piper nigrum*, a pimenta do reino, muito empregada na culinária e na medicina tradicional indiana. Além disso, a piperina apresenta atividades farmacológicas importantes, como antioxidante, antitumoral e neuroprotetora, além de promover aumento na biodisponibilidade de outros fármacos quando a ela associados. Porém, quando administrada por via oral, apresenta como inconveniente a irritação do trato gastrointestinal, além de ser insolúvel em meio aquoso. A microencapsulação empregando a etilcelulose é uma alternativa para contornar estas características, uma vez que este polímero é capaz de mascarar sabores desagradáveis, além de promover o controle da liberação de substâncias ativas microencapsuladas. Portanto, neste trabalho, sistemas microparticulados a partir do polímero etilcelulose contendo piperina foram preparados pela técnica de emulsificação-evaporação do solvente O/A. As micropartículas desenvolvidas foram caracterizadas quanto ao rendimento do processo, tamanho médio e distribuição do tamanho de partículas, teor de piperina, eficiência de encapsulamento, morfologia, densidade bruta e de compactação, avaliação das propriedades de fluxo e liberação *in vitro* do bioativo. Posteriormente, para viabilizar a administração das micropartículas, estas foram convertidas em comprimidos, acrescidas de polacrilina potássica e Pullulan®, e preparados por compressão direta. Os comprimidos microparticulados foram caracterizados de acordo com o peso médio, dureza, espessura, teor de piperina, uniformidade de conteúdo, morfologia e liberação da piperina. O processo de obtenção das micropartículas apresentou rendimento de  $97,6 \pm 0,3\%$  e estas mostraram-se esféricas, com tamanho de  $190 \pm 13 \mu\text{m}$  e Span de  $1,698 \pm 0,180$ . A eficiência de encapsulação foi  $90,0 \pm 0,9\%$ , um teor de piperina de  $298,3 \pm 2,9 \text{ mg/g}$ . O ensaio de liberação *in vitro* demonstrou o controle da liberação da piperina a partir dos sistemas microparticulados: em 24 h, foram liberados  $34,8 \pm 1,6\%$ , enquanto que  $80,9 \pm 1,5\%$  da piperina pura foi dissolvida. A avaliação da densidade bruta e de compactação e a determinação do índice de Carr e do fator de Hausner revelaram que as micropartículas possuem um excelente fluxo. Desta forma, para preparar os comprimidos microparticulados foram utilizados como excipientes apenas um promotor de dissolução, Kyron® T-314, e o diluente, Pullulan®. Os comprimidos apresentaram um peso médio de  $99,1 \pm 0,9 \text{ mg}$ ; espessura de  $3,38 \pm 0,03 \text{ mm}$ ; dureza de  $3,0 \pm 0,2 \text{ kgf}$  e friabilidade de  $0,4\%$ . O teor de piperina foi de  $19,7 \pm 0,4 \text{ mg}$ , próximo ao teórico. A liberação do bioativo a partir dos comprimidos foi controlada, liberando  $49,4 \pm 2,4\%$  em 24 h, e o perfil de liberação se mostrou semelhante ao perfil de liberação da piperina a partir das micropartículas. Com este resultado e a microscopia eletrônica de varredura, pode-se afirmar que as micropartículas se mantiveram intactas após a compressão. Sendo assim, neste trabalho foram desenvolvidos micropartículas e comprimidos microparticulados contendo piperina, os quais apresentaram características físico-químicas e perfis de liberação adequados para contornar os obstáculos apresentados pela piperina para sua administração por via oral e, portanto, os comprimidos microparticulados são uma promissora forma farmacêutica para tal fim.

**Palavras-chave:** Bioativo. *Piper nigrum*. Etilcelulose. Emulsificação-evaporação do solvente. Compressão.

## ABSTRACT

### DEVELOPMENT OF MICROPARTICLES AND MICROPARTICULATED TABLETS CONTAINING PIPERINE

AUTHOR: Aline Colling Schneider  
ADVISOR: Cristiane de Bona da Silva  
CO-ADVISOR: Letícia Cruz

Piperine is an alkaloid extracted from plants of the *Piper* genus, among which is the *Piper nigrum* species, the black pepper, widely employed in Indian cooking and traditional medicine. Moreover, piperine exhibits important pharmacological activities, as antioxidant, antitumoral and neuroprotector, as well as improving other drugs bioavailability when associated to it. However, when orally administered, presents as an inconvenience an irritation of the gastrointestinal tract and it's insoluble in aqueous media. Microencapsulation using ethylcellulose is an alternative to overcome this issues, since this polymer is capable of masking unpleasant tastes and control the release of the microencapsulated active ingredients. Thus, in this study, microparticulated systems containing piperine were prepared with the ethylcellulose polymer employing emulsification-evaporation of solvent O/W method. To quantify piperine, an analytical methodology by spectroscopy in UV region was validated. The developed microparticles were characterized regarding process yield, mean particle size and particle size distribution, piperine content, encapsulation efficiency, morphology, bulk and tapped densities, evaluation of flow properties and *in vitro* release of the active. After, to enable microparticles administration, they were converted into tablets, with the addition of polacrillin potassium and Pullulan®, and prepared by direct compression. The microparticulated tablets were characterized regarding weight, hardness, thickness, piperine content, uniformity of content, morphology and piperine *in vitro* release. The microparticles obtaining process presented  $97.6 \pm 0.3\%$  yield and were spherical, with  $190 \pm 13 \mu\text{m}$  size and Span of  $1.698 \pm 0.180$ . Encapsulation efficiency was  $90.0 \pm 0.9\%$ , a piperine content of  $298.3 \pm 2.9 \text{ mg/g}$ . The *in vitro* release demonstrated a controlled release of piperine from the microparticulated systems: in 24 h,  $34.8 \pm 1.6\%$  of piperine were release, while  $80.9 \pm 1.5\%$  of bulk piperine was dissolved. Bulk and tapped density, Carr's index and Hausner ratio revealed the microparticles have excellent flow properties. Thus, to prepare the microparticulated tablets, the excipients employed were only a dissolution promotor (Kyron® T-314) and the diluent (Pullulan®). The tablets presented  $99.1 \pm 0.9 \text{ mg}$  weight; thickness of  $3.38 \pm 0.03 \text{ mm}$ ; hardness of  $3.0 \pm 0.2 \text{ kgf}$  and friability 0.4%. Piperine content was  $19.7 \pm 0.4 \text{ mg}$ , close to the theoretical value. The active release from the tablets was controlled, presenting  $49.4 \pm 2.4 \%$  release in 24 h and the release profile was similar to the profile release of piperine from the microparticles. With this result and the scanning electron spectroscopy, it can be seen that the microparticles remained intact after the compression. Therefore, in this study microparticles and microparticulated tablets containing piperine were developed, which presented adequate physical-chemical characteristics and release profiles in order to overcome the issues presented by piperine in its oral administration and, so, the microparticulated tablets are a promising dosage unit for this purpose.

**Keywords:** Bioactive. *Piper nigrum*. Ethylcellulose. Emulsification-evaporation of solvent. Compression.



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>16</b>
3.1 PIPERINA .....	16
3.2 MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS .....	19
3.3 MICROENCAPSULAÇÃO COM ÊNFASE NA EMULSIFICAÇÃO-EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE .....	21
3.4 COMPRIMIDOS MULTIPARTICULADOS COMO FORMA FARMACÊUTICA FINAL .....	23
<b>4 ARTIGO: DEVELOPMENT OF MICROPARTICLES AND MICROPARTICULATED TABLETS CONTAINING PIPERINE</b> .....	<b>27</b>
<b>5 DISCUSSÃO GERAL</b> .....	<b>49</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>61</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>63</b>

## **APRESENTAÇÃO**

O presente trabalho foi organizado em INTRODUÇÃO, OBJETIVOS e REVISÃO BIBLIOGRÁFICA; parte experimental e resultados, apresentados na forma de ARTIGO. Os itens finais correspondem à DISCUSSÃO GERAL, na qual estão mencionados resultados obtidos na realização deste trabalho que não foram contemplados no artigo, bem como uma compilação das informações relevantes, e CONCLUSÃO.



## 1 INTRODUÇÃO

A piperina (1-piperoilpiperidina) é um alcaloide extraído de plantas do gênero *Piper*, dentre as quais pode-se citar a pimenta preta ou pimenta do reino (*Piper nigrum* Linnaeus), como é conhecida no Brasil (BUTT et al., 2013; RAVINDRAN; KALLUPURACKAL, 2001).

A pimenta do reino possui grande importância na culinária, sendo amplamente empregada como tempero dado seu sabor característico, sua pungência e seu aroma (RAVINDRAN; KALLUPURACKAL, 2001). Além disso, tem valor na medicina popular por estimular a digestão, sendo usada em quadros como indigestão e diarreia (AHMAD et al., 2012; SRINIVASAN, 2007).

A piperina é uma amida insolúvel em água, se comportando, assim, como uma base fraca (BUTT et al., 2013; RAVINDRAN; KALLUPURACKAL, 2001). Além disso, devido a sua característica pungente, pode causar irritação na sua passagem pelo trato gastrointestinal (DESSIRIER et al., 1999; RENTMEISTER-BRYANT; GREEN, 1997).

Algumas importantes atividades farmacológicas vêm sendo atribuídas a este bioativo. Dentre estas, pode-se destacar atividade anti-inflamatória (SABINA; NAGAR; RASOOL, 2011), antioxidante (SABINA; NAGAR; RASOOL, 2011; UMAR et al., 2013), antitumoral (DOUCETTE et al., 2013; GREENSHIELDS et al., 2015; SAMYKUTTY et al., 2013; YAFFE et al., 2015) e neuroprotetora (CHONPATHOMPIKUNLERT; WATTANATHORN; MUCHIMAPURA, 2010). Além disso, outros estudos atribuem à piperina a propriedade de aumentar a biodisponibilidade de fármacos (BANO et al., 1991; BI et al., 2018; DI; WANG; LIU, 2015; JOHNSON et al., 2011; SHOBA et al., 1998).

Uma alternativa para controlar a liberação da piperina, diminuindo sua irritação e podendo facilitar sua dissolução nos fluidos corporais, é a incorporação destas em micropartículas. Estes sistemas são definidos como partículas com tamanho na ordem de micrômetros, podendo variar de 1-1000  $\mu\text{m}$  (BROWN, 2004; KUMAR, 2000). Assim, dependendo das características do polímero empregado na sua preparação, algumas vantagens estão associadas como a proteção do fármaco do contato direto com o ambiente, mascaramento de suas propriedades indesejáveis como gosto, odor ou cor, e controle de sua liberação ou direcionamento a um local de ação específico (BANSODE et al., 2010; GHOSH, 2006; LAM; GAMBARI, 2014).

Porém, a administração de partículas na terapêutica não é comum. Portanto, a conversão dos sistemas microparticulados em outras formas farmacêuticas como os comprimidos facilitam a administração dos mesmos. Assim, excipientes se fazem necessários para a compressão de micropartículas, visando à manutenção deste sistema intacto mesmo após a compressão (HENG et al., 2000).

Diante do exposto, este estudo visou à microencapsulação da piperina, empregando como polímero a etilcelulose, de forma a controlar a liberação do bioativo. Após, o estudo objetivou a conversão destas em comprimidos microparticulados, visando uma forma farmacêutica final para administração oral e mantendo as características associadas à micropartícula.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho consistiu no desenvolvimento de comprimidos multiparticulados contendo piperina a partir da compressão direta de micropartículas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar micropartículas poliméricas de etilcelulose contendo piperina empregando a técnica de emulsificação-evaporação do solvente O/A;
- Validar metodologia analítica por espectroscopia na região do ultravioleta para quantificar a piperina;
- Caracterizar os sistemas multiparticulados de acordo com o rendimento, tamanho médio e distribuição do tamanho de partículas, teor de piperina, eficiência de encapsulamento, morfologia, densidade bruta e de compactação e avaliação das propriedades de fluxo;
- Preparar comprimidos a partir das micropartículas por compressão direta;
- Caracterizar os comprimidos multiparticulados de acordo com o peso médio, dureza, espessura, friabilidade, teor de piperina e uniformidade de conteúdo;
- Avaliar a integridade das micropartículas após a compressão a partir da morfologia;
- Avaliar a liberação da piperina a partir das micropartículas e dos comprimidos multiparticulados.





### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 PIPERINA

A piperina é um alcaloide extraído de várias plantas do gênero *Piper*, dentre as quais pode-se citar a pimenta preta (*Piper nigrum* Linnaeus) (BUTT et al., 2013). O cultivo desta planta tem origem na Índia, porém, atualmente se estende pelo mundo, inclusive no Brasil, onde é popularmente conhecida como pimenta do reino (BUTT et al., 2013; RAVINDRAN; KALLUPURACKAL, 2001).

Seus grãos são amplamente empregados como tempero, devido ao sabor característico, pungência e aroma, valores estes conferidos, respectivamente, pelas oleoresinas, pelas chamadas piperamidas (principalmente a piperina) e pelos óleos voláteis, alguns de seus componentes (FRIEDMAN et al., 2008; RAVINDRAN; KALLUPURACKAL, 2001; ZACHARIAH et al., 2010).

A ingestão da pimenta preta estimula o trânsito gastrintestinal por aumentar a produção de saliva e ativar algumas enzimas intestinais e pancreáticas, além da secreção da bile, podendo contribuir na indigestão e diarreia (AHMAD et al., 2012; SRINIVASAN, 2007).

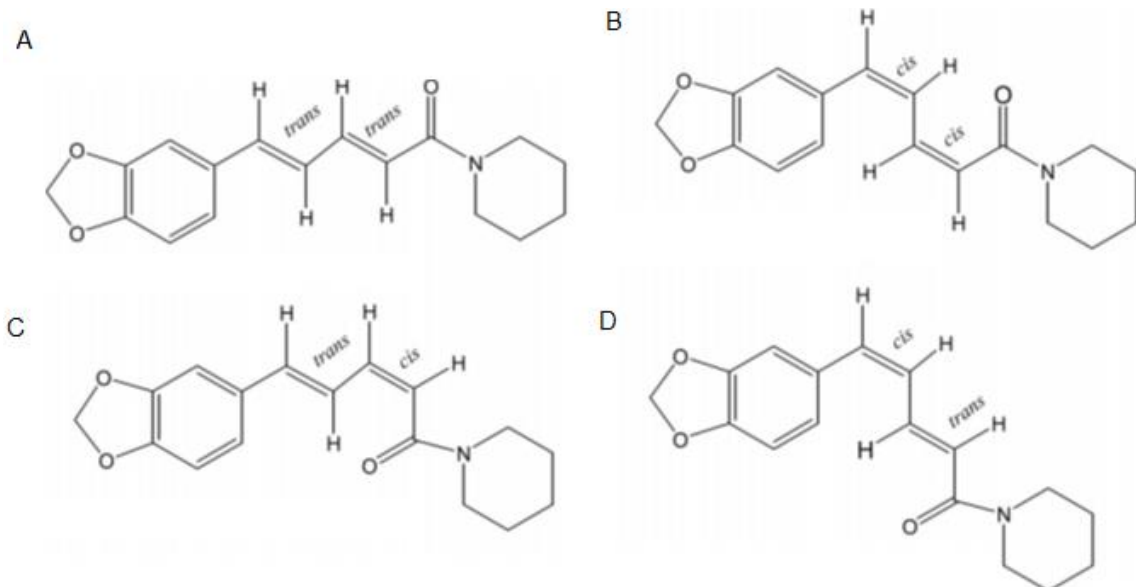
Além das oleoresinas, da piperina e dos óleos voláteis já citados, a pimenta preta possui outras piperamidas como chavicina, piperidina e piperetina; diversos tipos de polifenóis, terpenos, esteroides, lignanas, neolignanas, flavonas, dentre outros compostos como, por exemplo, ácido cafeico e acetilcolina (FRIEDMAN et al., 2008; MURTHY; BHATTACHARYA, 2008; MUSENGA et al., 2007; PARMAR et al., 1997; SHAIKH; BHOSALE; SINGHAL, 2006).

Dentre a grande variedade de constituintes da pimenta preta, a piperina (1-piperoilpiperidina) é o alcaloide mais prevalente e, desta forma, o mais estudado (FRIEDMAN et al., 2008).

A piperina foi isolada pela primeira vez pelo químico Hans Christian Oersted, em 1819, como uma amida, de fórmula molecular  $C_{17}H_{19}O_3N$  (RAVINDRAN; KALLUPURACKAL, 2001). Ela se comporta com uma base fraca, possuindo um pKa de 12,22; é insolúvel em água e apresenta coloração amarelada (BUTT et al., 2013; O'NEIL, 2006; PARMAR et al., 1997; RAVINDRAN; KALLUPURACKAL, 2001). Além disso, possui quatro isômeros: a isopiperina (Z,E-(cis-trans)-piperina), a isochavicina (E,Z-(trans-cis)-piperina), a chavicina (Z,Z-(cis-cis)-piperina) e a própria piperina (E,E-

(trans-trans)-piperina) (figura 1). É sensível à luz, podendo, com este estímulo, ser convertida aos seus isômeros (KOZUKUE et al., 2007).

Figura 1 – Estrutura química da piperina (A), chavicina (B), isoperina (C) e isochavicina (D).



Fonte: (KOZUKUE et al., 2007)

Alguns estudos foram realizados em ratos para avaliar o metabolismo da piperina após a administração oral ou intraperitoneal. Independente da via, 97% do bioativo foi absorvido e 3% foi eliminado intacto nas fezes, além de ocorrer um aumento na eliminação de glicouronídeos conjugados, sulfatos e fenóis na urina até o quarto dia após a administração. Além disso, não é biotransformada durante a absorção (BHAT; CHANDRASEKHARA, 1986). Outro estudo demonstrou uma absorção de 96 %; não foi detectada na urina, porém, 3,6% foi eliminada nas fezes (SURESH; SRINIVASAN, 2010).

Por outro lado, a piperina, sendo uma substância lipossolúvel, pode ter sua aplicação direta na terapêutica limitada. Como sua dissolução é restrita, seriam necessárias altas doses de piperina para se alcançar o efeito terapêutico desejável (SHITYAKOV et al., 2019).

A respeito da segurança do consumo de piperina, foi realizado um estudo patrocinado pela Organização Internacional das Indústrias de Aromas (IOFI), a fim de

avaliar sua segurança quando usada como aromatizante (BASTAKI et al., 2018). Em um estudo preliminar de 14 dias, foram testadas as doses equivalentes a 50, 75 e 300 mg/kg/dia em ratos Sprague-Dawley de ambos os sexos. A partir deste, verificou-se que os animais que receberam a maior dose apresentavam postura encurvada moderada, aparência magra e desidratação moderada e, portanto, foi excluída por causar toxicidade significativa. Já na dose intermediária, somente foi observado volume fecal diminuído e, na menor dose, nenhum sinal clínico.

Para o estudo toxicológico de 90 dias, foram selecionadas as doses de 5, 15 e 50 mg/kg/dia. Verificou-se ganho de peso diminuído em ratos machos que receberam a maior dose, o que os pesquisadores atribuíram à menor palatabilidade da dieta com altas concentrações de piperina, porém, não foram observados sinais clínicos significativos de toxicidade em nenhuma das dosagens testadas. Como conclusão do estudo, foi determinado que o Nível Sem Efeitos Adversos Observáveis (NOAEL) da piperina é de 50 mg/kg/dia.

Diversas atividades farmacológicas observadas na medicina popular indiana através do consumo da pimenta preta são atribuídas à piperina. Dentre estas, pode-se destacar atividade antioxidante, antitumoral e neuroprotetora (AHMAD et al., 2012; BUTT et al., 2013; SRINIVASAN, 2007).

Outros estudos também relatam a atividade antioxidante da piperina. Esta pode ser explicada por seu caráter lipofílico, que permite que ela interaja com radicais livres, levando à formação de espécies estáveis, impedindo a peroxidação lipídica promovida pelos mesmos (KHAJURIA; ZUTSHI; BEDI, 1998; KRISHNAKANTHA; LOKESH, 1993). Umar e colaboradores (2013) também demonstraram um aumento na atividade de enzimas antioxidantes relacionado ao tratamento com piperina.

Apesar das várias atividades farmacológicas apresentadas pela piperina, um dos maiores apelos é a atividade antitumoral demonstrada pela mesma. Doucette e colaboradores (2013), realizando estudos *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*, comprovaram que a piperina inibe vários aspectos da angiogênese, processo intimamente relacionado com a progressão tumoral, nas três condições estudadas.

Também, foi demonstrada sua ação na inibição na progressão tumoral por impedir a proliferação celular através da indução de apoptose nas células de câncer de mama triplo negativo (GREENSHIELDS et al., 2015), câncer prostático andrógeno-dependente e independente (SAMUKUTTY et al., 2013) e de câncer de cólon (YAFFE et al., 2015).

Chonpathompikunlert e colaboradores (2010) avaliaram a capacidade neuroprotetora da piperina frente a um modelo de doença de Alzheimer. Seus resultados mostram uma melhora no quadro de perda de memória e neurodegeneração, o que pode ser associado a um aumento na densidade de neurônios e inibição na atividade da enzima acetilcolinesterase no hipocampo.

Além disso, a piperina foi relacionada a aumento na biodisponibilidade de vários outros fármacos e bioativos, tais como curcumina (SHOBA et al., 1998), resveratrol (JOHNSON et al., 2011), propranolol e teofilina (BANO et al., 1991) e emodina (DI; WANG; LIU, 2015). Isto se dá pelo efeito inibitório das enzimas hepáticas responsáveis pelo metabolismo de fármacos, principalmente o complexo citocromo P-450, promovida pela piperina (ATAL; DUBEY; SINGH, 1985; DALVI; DALVI, 1991). Recentemente, demonstrou-se que a piperina aumentou a biodisponibilidade da silibina por outro mecanismo, atuando na inibição de transportadores de efluxo e inibindo a excreção biliar desta substância e de seus metabólitos conjugados (BI et al., 2019).

### 3.2 MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

O desenvolvimento de microcápsulas empregando polímeros como material de revestimento foi introduzido pelo pesquisador canadense Thomas Chang, em 1964, com a microencapsulação de um hemolisado de eritrócitos empregando como membrana polimérica o nylon (CHANG, 1964).

As micropartículas poliméricas são definidas como partículas com tamanho na ordem de micrômetros, podendo variar de 1 a 1000  $\mu\text{m}$  (BROWN, 2004; KUMAR, 2000). A morfologia destas partículas pode variar dependendo das propriedades de seus componentes, bem como a técnica empregada na sua preparação (GHARSALLAOUI et al., 2007; GHOSH, 2006).

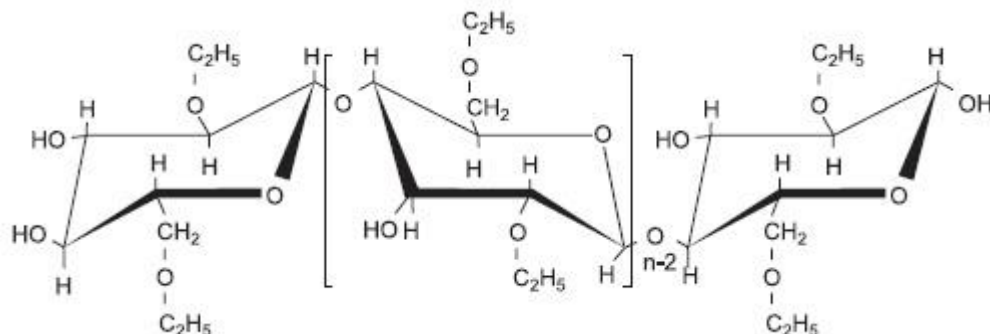
Elas podem ser divididas, morfologicamente, em microesferas, que são micropartículas esféricas nas quais a substância encapsulada está distribuída homogeneamente no polímero, ou seja, são sistemas matriciais. Já o termo “microcápsulas” se refere a micropartículas que possuem um núcleo líquido ou sólido, circundado por um material de revestimento (BROWN, 2004). Apesar desta distinção morfológica, normalmente estes termos são usados como sinônimos (BROWN, 2004; KUMAR, 2000).

Além destes, Kawashima e colaboradores (1992) desenvolveram um novo tipo de sistema microparticulado flutuante: os microbalões ou microesferas ocas. Este sistema é caracterizado por possuir uma cavidade e não ter poros em sua superfície. Ademais, apresenta boa flutuabilidade, o que prolonga o tempo de residência da formulação no trato gastrointestinal.

Os sistemas microparticulados contornam alguns obstáculos frequentes na terapia convencional, podendo aumentar a eficácia terapêutica e a biodisponibilidade dos fármacos (LAM; GAMBARI, 2014). Desta forma, alguns inconvenientes que podem ser minimizados pela microencapsulação são: proteção de substâncias do contato direto com o ambiente, protegendo-as da luz, pH, calor ou oxidação; mascaramento de propriedades indesejáveis como gosto, odor ou cor, e controle da liberação ou direcionamento a um local de ação específico. Além disso, a microencapsulação tende a facilitar o processamento, por melhorar a solubilidade, a dispersibilidade e as características de fluxo das partículas (BANSODE et al., 2010; GHOSH, 2006; LAM; GAMBARI, 2014).

Muitas destas vantagens são conferidas pelo revestimento empregado na preparação das micropartículas poliméricas, ou seja, pelos polímeros. Dentre estes materiais, se encontra a etilcelulose, composta pela polimerização de moléculas de anidro-glicose, unidas por ligações acetal (figura 2) (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

Figura 2 – Estrutura molecular da etilcelulose



Fonte: (MURTAZA, 2012)

A etilcelulose é capaz de conferir propriedades de fluxo plásticas às partículas e de absorver pressão, sendo, por isto, amplamente utilizado para preparar micropartículas que serão posteriormente comprimidas (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009, MURTAZA, 2012). Além disso, a microencapsulação de fármacos e ativos com este polímero pode ser empregada para aumentar a estabilidade dos mesmos frente à hidrólise e oxidação, mascarar sabor desagradável e, a maior de suas aplicações, modificar a liberação das substâncias ativas associadas, atuando como uma barreira através da qual o fármaco pode ser liberado de forma controlada (MURTAZA, 2012; ROGERS; WALLICK, 2011; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

Existem diferentes tipos de etilcelulose com viscosidades variando de 3 a 105 mPa.s. Maiores viscosidades correspondem a maiores massas moleculares e foram associadas à maior resistência à ruptura provocada pela compressão e maior eficiência de encapsulação (ROGERS; WALLICK, 2011).

Este polímero é relatado como atóxico, antialérgico e não irritante, sendo muito empregado em formulações farmacêuticas tópicas, orais e em produtos alimentícios, sendo que a maior quantidade de etilcelulose administrada oralmente em um comprimido de liberação sustentada foi de 308,8 mg (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

### 3.3 MICROENCAPSULAÇÃO COM ÊNFASE NA EMULSIFICAÇÃO-EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE

Vários métodos são descritos na literatura para a preparação de micropartículas, divididos em processos físico-químicos, como coacervação simples ou complexa, e emulsão-evaporação do solvente; processos químicos, como polimerização interfacial e inclusão molecular; e processos físico-mecânicos, como secagem por aspersão e extrusão (GHOSH, 2006; JYOTHI et al., 2010).

Assim, a escolha do método mais adequado é baseada nas propriedades físico-químicas da substância a ser encapsulada, do material de revestimento, do tamanho médio das partículas e dos mecanismos de liberação desejados, além de um custo compatível (GHOSH, 2006).

A técnica de emulsificação-evaporação do solvente é um método simples e um dos mais explorados para a preparação de micropartículas (CHOWDARY; SRINIVASA, 2004; MURTAZA, 2012). Este método possui basicamente duas etapas:

a formação de uma emulsão entre dois líquidos imiscíveis na presença de um tensoativo e a evaporação do solvente orgânico (MURTAZA, 2012; O'DONNELL; MCGINITY, 1997).

Para tanto, a solubilidade do fármaco ou ativo a ser encapsulado deve ser considerada. Na preparação de micropartículas com fármacos ou ativos solúveis em água deve-se empregar um sistema anidro, como emulsificação O/O ou sistemas de múltipla emulsificação, uma vez que, se a água fosse a fase contínua, o ativo hidrofílico tenderia a particionar, resultando em micropartículas com baixa eficiência de encapsulação. Já para microencapsular fármacos e bioativos insolúveis ou pouco solúveis em água, a formação de uma emulsão simples O/A pode ser empregada (O'DONNELL; MCGINITY, 1997).

Para tal, o material de revestimento deve ser disperso em um solvente orgânico imiscível em água, geralmente diclorometano, acetato de etila ou clorofórmio e nesta dispersão o fármaco deve ser disperso ou dissolvido. Esta fase orgânica é então emulsificada sob agitação em uma fase aquosa externa contendo tensoativo. Esta agitação pode ser promovida por ultra-sonicação, agitação mecânica, microfluidização, entre outros, e deve ser vigorosa para facilitar a eliminação do solvente. Conforme este difunde através da fase contínua e evapora, o ativo e o polímero precipitam em gotas, formando as micropartículas sólidas. Após a evaporação do solvente orgânico, as micropartículas devem ser lavadas, para eliminar resíduos de tensoativos, filtradas e secas (CHOWDARY; SRINIVASA, 2004; FREITAS; MERKLE; GANDER, 2005; O'DONNELL; MCGINITY, 1997).

De posse das informações descritas, a microencapsulação da piperina empregando a etilcelulose como material de revestimento é uma alternativa para a proteção do bioativo frente à luz, contornar o sabor pungente apresentado pela piperina e, ainda, possibilitar sua liberação controlada, contribuindo na proteção do trato gastrointestinal, visto que a piperina pode ser irritante para as mucosas. Além disso, possibilita a incorporação das micropartículas em uma forma farmacêutica final de uso oral.

Alguns estudos apresentados na literatura relatam o desenvolvimento de micropartículas contendo piperina, porém, o polímero e o método empregados não foram os mesmos descritos neste trabalho.

Bonepally e colaboradores (2008) desenvolveram microesferas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) contendo piperina a partir do método de emulsificação-evaporação do

solvente e difusão-emulsificação-evaporação do solvente. Foram preparados lotes, contendo ou não tensoativo, e com diferentes proporções de piperina e polímero. Para tanto, estes foram dissolvidos em diclorometano sob agitação e, então, esta solução foi gotejada sob uma fase aquosa com ou sem tensoativo. A agitação foi mantida até evaporação do solvente e, conseqüente, ocorreu a formação das microesferas. Estas se apresentaram esféricas, com rendimento de 51 a 75 %; eficiência de encapsulamento de 8 a 50 % e tamanho médio de partículas de 16 a 100 µm.

Sahu e colaboradores (2012) desenvolveram microesferas de quitosana contendo piperina pelo método de evaporação do solvente. O polímero foi dissolvido em ácido acético e a esta solução foi adicionada a piperina. A solução resultante foi gotejada em parafina líquida contendo Span® 80 e, então, foi adicionada uma solução de glutaraldeído como reticulante. Após, as microesferas foram lavadas com éter etílico e acetona e secas a temperatura ambiente. As micropartículas preparadas se mostraram esféricas, sem cristais em sua superfície ou agregação das partículas.

### 3.4 COMPRIMIDOS MULTIPARTICULADOS COMO FORMA FARMACÊUTICA FINAL

Apesar dos benefícios que a microencapsulação de fármacos agrega a uma formulação, os pós normalmente não são empregados diretamente na terapêutica, o que demanda a conversão das micropartículas em uma forma farmacêutica que viabilize sua administração.

A via oral é considerada simples, segura, não invasiva e é a mais conveniente, comum e econômica via de administração, sendo usualmente considerada para a administração de fármacos (GUPTA; BHANDARI; SHARMA, 2009; KRISHNAIAH, 2010; PINTO, 2010). Desta forma, traz vantagens, como a aceitabilidade do paciente, bom custo-benefício, menor preocupação em relação à esterilidade e flexibilidade na prescrição de doses (KRISHNAIAH, 2010).

Recentemente, vem-se desenvolvendo novas formas de otimizar a administração oral de fármacos, dentre as quais, a liberação modificada de fármacos. Neste grupo, se encontram os sistemas multiparticulados. Estes são formas farmacêuticas orais que apresentam uma divisão em subunidades menores, normalmente na forma de *pellets*, grânulos, micropartículas ou nanopartículas que,



então, são associadas em cápsulas ou comprimidos para viabilizar sua administração (AL-HASHIMI et al., 2018; DEY; MAJUMDAR; RAO, 2008; ISSA et al., 2017).

A liberação modificada promovida por estes sistemas apresenta como vantagens um menor risco de *dose dumping*, melhor distribuição e menor variabilidade na absorção; menor irritação da mucosa, menor probabilidade de causar reações locais ou sistêmicas, facilitar a desintegração (DEY; MAJUMDAR; RAO, 2008; HASNAIN et al., 2019; ISSA et al., 2017). Nestes sistemas, o perfil de dissolução do fármaco é determinado primeiramente pela desintegração do comprimido ou cápsulas e, posteriormente, pelas propriedades de dissolução de suas subunidades (JØRGENSEN; CHRISTENSEN; JACOBSEN, 1997). A liberação dos fármacos a partir desta forma farmacêutica pode ocorrer por osmose, erosão ou difusão. (HASNAIN et al., 2019). Em relação à forma farmacêutica final, os comprimidos apresentam vantagens sobre as cápsulas, como por exemplo, menor custo, maior facilidade de produção, além de um menor risco de adulteração (AL-HASHIMI et al., 2018).

Assim, os comprimidos se apresentam como uma alternativa para a administração oral de micropartículas. Os comprimidos são formas farmacêuticas sólidas preparadas com adjuvantes farmacêuticos e normalmente usadas na administração oral de fármacos (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013). Além disso, são as formas farmacêuticas mais bem aceitas e de menor custo (WENING; BREITKREUTZ, 2011).

A necessidade do emprego dos excipientes está muito relacionada às características do pó a ser comprimido e também ao processo de compressão empregado para a obtenção dos mesmos (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013; KOO, 2017). Para tanto, pode-se empregar o método de compressão direta ou granulação prévia por via seca ou via úmida. A compressão direta é um método mais rápido e prático, consistindo na mistura dos pós seguida de compressão desta mistura. Por isso, esta deve possuir um bom fluxo e propriedades coesivas, normalmente obtidas com o uso de excipientes como diluente, deslizante, desintegrante e lubrificante (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013).

Para a compactação de micropartículas, devem-se empregar excipientes buscando a proteção das mesmas, de modo a evitar a ruptura e perda das características a elas atribuídas com o processo de microencapsulação (HENG et al., 2000).

Ferreira e colaboradores (2015) prepararam comprimidos pela compressão direta de micropartículas de Eudragit® S100 e hidroxipropilmetilcelulose, empregando como excipientes o estearato de magnésio (lubrificante) e três diluentes diferentes: o Pullulan®, a celulose microcristalina e a lactose. O peso médio e a espessura dos comprimidos foi semelhante, porém, os comprimidos preparados com Pullulan® foram considerados mais coesos e compactos que os outros que empregaram diluentes já estabelecidos e amplamente usados na indústria farmacêutica. Além disso, a análise por microscopia eletrônica de varredura dos comprimidos demonstrou a integridade das micropartículas após o processo de compressão.

Arend (2017) preparou comprimidos por compressão direta de micropartículas de Eudragit® L100 e goma gelana, empregando como excipientes o estearato de magnésio (lubrificante), a polivinilpirrolidona (aglutinante), dióxido de silício coloidal (deslizante) e como diluente a celulose microcristalina. Os ensaios de liberação *in vitro* das micropartículas e dos comprimidos foram semelhantes, podendo-se sugerir que as micropartículas não foram rompidas com a compressão.

Com base neste referencial teórico, serão retomados alguns aspectos específicos da literatura, bem como a parte experimental e os resultados obtidos, os quais serão abordados no artigo a seguir, a ser submetido.

**ARTIGO: Development of microparticles and microparticulated tablets  
containing piperine**

---

## DEVELOPMENT OF MICROPARTICLES AND MICROPARTICULATED TABLETS CONTAINING PIPERINE

### Abstract:

*Piper nigrum*, known as black pepper, is used in Indian traditional medicine for years. Piperine is its main alkaloid and it's responsible for several pharmacological activities, such as antioxidant, antitumoral and neuroprotective. This substance is insoluble in aqueous media and can irritate the gastrointestinal tract. In order to circumvent these inconvenient characteristics and enable the oral administration of piperine, considering its important pharmaceutical activities, this study proposed the microencapsulation of piperine by the emulsion-solvent evaporation method, and also the preparation of microparticulated tablets by direct compression. Both formulations were prepared and characterized and a UV-spectroscopy method was validated to quantify piperine. Microparticles were obtained with a  $97.6 \pm 0.3$  % yield, had  $190 \pm 13$   $\mu\text{m}$  size and Span  $1.698 \pm 0.180$ ; encapsulation efficiency was  $90.0 \pm 0.9$  %, corresponding to a drug loading of  $298.3 \pm 2.9$  mg/g. Carr index and Hausner factor were  $11 \pm 2$  and  $1.13 \pm 0.02$ , respectively, and so, the microparticles presented excellent flow. The microparticulated tablets had  $99.1 \pm 0.9$  mg weight,  $3.38 \pm 0.03$  mm thickness,  $3.0 \pm 0.2$  kgf hardness and  $19.7 \pm 0.4$  mg of drug loading. Also, the scanning electron microscopy images show piperine-microparticles remained intact after the compression. The *in vitro* release demonstrated a controlled release of piperine from microparticles ( $34.8 \pm 1.6\%$  in 24 h) and MP-PIP-containing tablets ( $49.4 \pm 2.4\%$  in 24 h), in comparison to piperine ( $80.9 \pm 1.5\%$  in 24 h) and piperine-tablets ( $86.0 \pm 1.0$  in 24 h). The release profiles of piperine-microparticles and the microparticulated tablets were similar, suggesting the compression did not affect the characteristics assigned by the microencapsulation of piperine. Therefore, the tablets containing piperine-microparticles are promising multiparticulated dosage forms, once the tablet enables the microparticles administration and, also, as the microparticles are intact, they promote a controlled release of piperine, decreasing its potential of irritating the mucosa.

**Keywords:** Ethylcellulose. *Piper nigrum*. Compression. Microencapsulation.

## 1 INTRODUCTION

Piperine (PIP) is found in plants of the *Piper* genus, mainly *Piper nigrum* L., the black pepper. Aside from its known use as a spice, its seeds are also used for gastric and respiratory disorders, fevers and obesity (AHMAD et al., 2012). Being the major alkaloid of this species, PIP has been the object of many researches, which assigned to this compound several pharmacological activities, such as antioxidant (UMAR et al., 2013), antitumoral (GREENSHIELDS et al., 2015; SAMYKUTTY et al., 2013; YAFFE et al., 2015) and neuroprotective (CHONPATHOMPIKUNLERT et al., 2010). In addition, PIP has the ability to increase bioavailability of other drugs when associated to them (BI et al., 2019; DI; WANG; LIU, 2015).

A recent study, sponsored by the International Organization of the Flavor Industry, was conducted aiming to evaluate piperine safety when used as a flavoring (BASTAKI et al., 2018). A 90-day toxicological study was performed in Sprague-Dawley rats employing doses of 5, 15 e 50 mg/kg/day. No significant toxicity clinical signs were observed in any of the doses tested and, in conclusion, the NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) of PIP was determined: 50 mg/kg/day. However, this bioactive is insoluble in water and when orally administered, causes irritation throughout its gastrointestinal pass due to its pungency (BUTT et al., 2013; DESSIRIER et al., 1999; RENTMEISTER-BRYANT; GREEN, 1997).

Controlled release systems are able to favor the administration of irritant and low water soluble agents, such as PIP. In this sense, polymeric microparticles are drug release systems presenting size ranging from 1 to 1000  $\mu\text{m}$  and prepared from synthetic or natural polymers. From morphological point of view, they can be distinguished in vesicular and matricial systems, in which the drug can be molecularly dispersed or physically retained (BROWN, 2004; KUMAR, 2000). Such drug carriers are able to provide important advantages to the encapsulated drugs, such as: taste masking, control of the drug release and enhance powder flow properties (GHOSH, 2006; LAM; GAMBARI, 2014).

There are some piperine microparticles described in the literature. Bonepally (2008) developed PCL microparticles containing piperine by the O/W emulsion evaporation method. Different batches were prepared, with different drug:polymer proportions and with or without polysorbate 80 in the aqueous phase. Pengpong (2014)

developed used modified chitosans as polymers to prepare piperine-microparticles with 1 to 5% piperine by electrospray ionization.

This way, the aim of this study was to develop ethylcellulose microparticles containing PIP. Ethylcellulose is a nontoxic, nonallergenic, and nonirritating long chain polymer, obtained from cellulose ethoxylation, widely used in oral formulations (MURTAZA, 2012; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Its coatings are commonly used to modify the release of the associated active and mask unpleasant tastes (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Despite their potential, microparticles are rarely employed as dosage forms and for this reason the compression of microparticles into tablets was also a goal of this study. This dosage form is the most used for oral administration, presenting some advantages such as: good patient acceptability and cost-effectiveness and less concern about sterility (KRISHNAIAH, 2010).

## **2 MATERIAL AND METHODS**

### **2.1 MATERIAL**

Piperine (95.98% w/w, from China; production batch: CMHHJ-A-709913; CAS number 94-62-2) was acquired from A & F Farmácia e Manipulação Ltda (Fagron – Anápolis, Goiás, Brazil); Tween<sup>®</sup> 80 (Polysorbate 80) from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil); Ethocel<sup>®</sup> 10 (Ethylcellulose) was kindly donated from Colorcon (São Paulo, Brazil), Kyron<sup>®</sup> T-314 (Polacrillin potassium) was kindly donated by Almapal (São Paulo, Brazil); Pullulan<sup>®</sup> was kindly donated by Corn Products (São Paulo, Brazil). Absolute ethanol and methanol were purchased from Dinâmica (São Paulo, Brazil), dichloromethane from Neon (São Paulo, Brazil); Ultrapure water was purified by the Synergy UV Millipore apparatus (Porto Alegre, Brazil).

### **2.2 PREPARATION OF PIPERINE-LOADED MICROPARTICLES**

Ethylcellulose microparticles containing piperine (PIP-MP) were prepared in triplicate, by the O/W emulsion and solvent evaporation method. An organic phase (Ethocel<sup>®</sup> 10 – 1 g, ethanol – 12 mL, dichloromethane – 8 mL and PIP – 0.5084 g), in which PIP was dissolved, was injected under mechanical stirring (IKA, Germany) into an aqueous phase (Tween<sup>®</sup> 80 – 0.4 g and ultrapure water – 80 mL). This emulsion

remained under stirring for two hours to evaporate the solvents, was filtered (8  $\mu\text{m}$ ) and washed with purified water for surfactant removal. Then, the powder was left in oven at 30  $^{\circ}\text{C}$  for 15 hours and after the microparticles were collected and kept in desiccator to further characterization. Blank microparticles (B-MP), without PIP, were also prepared for comparison purposes.

### 2.3 ANALYTICAL METHOD VALIDATION

For samples preparation, methanol was the solvent chosen. Analyses were performed at 343 nm in a UV Spectrophotometer (UV 1800, Shimadzu Corporation), using methanol as blank. The method was tested for its specificity, linearity, precision (repeatability and intermediate precision), accuracy (spike recovery method) and robustness (varying wavelength and methanol supplier), according to ICH Guidelines.

Before analysis of the samples, 15.1 mg of PIP-MP, equivalent to 5 mg of PIP, were diluted in 25 mL of methanol and stirred at 1,100 rpm for 10 minutes. After, an aliquot of 1 mL of this solution was diluted in 20 mL of methanol, obtaining a concentration of 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### 2.4 MICROPARTICLES CHARACTERIZATION

The microparticles were evaluated in relation to organoleptic characteristics, process yield, particle size distribution, encapsulation efficiency, drug loading, bulked and tapped densities, Carr index, Hausner factor, SEM microphotographs.

The process yield was calculated by the ratio between the weight of microparticles obtained and the sum of weight of PIP and EC used in the preparation. The particle size distribution was determined by laser diffraction (Mastersizer 3000E, Malvern Instruments, UK) after previous dispersion in water with polysorbate 80. The encapsulation efficiency (EE) of PIP in the microparticles was determined, in triplicate, by UV Spectrophotometry with the validated method. Drug loading (DL) was determined from the EE obtained and the theoretical drug loading (331.5 mg PIP/g MP) (equation 3):

$$\text{DL} = \frac{\text{EE} \times 331.5}{100} \quad (3)$$

The bulk volume is the volume occupied by approximately 1 g of PIP-MP in a 10 mL graduated cylinder. The bulk density is the ratio between the exact weight and the bulk volume (equation 4):

$$d_B = \frac{\text{PIP-MP weight}}{\text{bulk volume}} \quad (4)$$

The tapped volume was the volume occupied by PIP-MP after 1250 taps (PharmaTest, Brazil) and the tapped density is determined by the ratio between the weight of the microparticles and the tapped volume (equation 5):

$$d_T = \frac{\text{PIP-MP weight}}{\text{tapped volume}} \quad (5)$$

Carr's index and Hausner ratio were calculated by equations 6 and 7, respectively:

$$CI = \frac{d_T - d_B}{d_T} \times 100 \quad (6)$$

$$HR = \frac{d_T}{d_B} \quad (7)$$

For the scanning electron microscopy analysis (SEM), the microparticles were previously gold sputtered (Desk II Gold Sputter, Denton Vacuum, USA) and analyzed with an accelerating voltage of 10 kV (Scanning microscope JSM-6360, Jeol, Japan).

Process yield, mean particle size and size distribution, bulk density, tapped density, Carr's index and Hausner ratio, as well as SEM microphotographs were also performed for B-MP for comparison purposes.

## 2.5 *IN VITRO* RELEASE OF PIPERINE FROM THE MICROPARTICLES

*In vitro* release of the bioactive was performed in a dissolution test equipment (PharmaTest, Brazil) with apparatus 1 (basket) and using as dissolution medium hydrochloric acid 0.1M containing 2% sodium dodecyl sulfate (SDS). An amount of PIP microparticles (equivalent to 20 mg PIP, n=3) were weighed inside the baskets, which



were put in 900mL of the selected dissolution medium, under 37 °C and 100 rpm. The equipment was protected from the light. The assay was carried out for 24 hours and at predetermined times 5 mL of the medium were collected, and the same volume was replaced with fresh medium kept at 37 °C. The sample was filtered through a 28 µm filter and PIP content was quantified by the UV-spectroscopy method validated. The test was performed with free PIP (20 mg, n=3) under the same conditions for comparison.

## 2.6 PREPARATION OF TABLETS CONTAINING PIPERINE-LOADED MICROPARTICLES

Piperine-loaded microparticles (equivalent to 20 mg PIP) were mixed in a glass mortar with dissolution improver Kyron<sup>®</sup> T-314 (6%, w/w) and the diluent Pullulan<sup>®</sup> in a quantity sufficient to produce tablets with theoretical mean weight of 100 mg. After, this mixture was compressed by direct compression in a single punch machine (Farmacista Equipamentos Farmaceuticos Ltda, Porto Alegre, Brazil), in manual mode.

## 2.7 CHARACTERIZATION OF TABLETS CONTAINING PIPERINE-LOADED MICROPARTICLES

The tablets were characterized according to assays described in Brazilian Pharmacopoeia (2010). Weight determination was performed by weighing of 20 tablets (Metler-Toledo, Brazil); hardness assay of 10 tablets using a portable hardness tester (Ethik Technology, Brazil); friability of 20 tablets submitted to 100 rpm (25 rpm for 4 minutes) in a friabilometer (Ethik Technology, Brazil); thickness of 10 tablets using a caliper (Mitutoyo, Brazil).

For the uniformity of dosage units, the uniformity of content was performed as follows: the tablets (n=10) were triturated, individually, in a glass mortar with a pestle, transferred to a 25 mL volumetric flask and agitated at 1100 rpm for 10 minutes. Then, the volume was completed with methanol to obtain a theoretical concentration of 10 µg/mL. The actual PIP content was determined by the UV method validated and the acceptance value (AV) was calculated, according to equation 8. AV calculated should be below 15.

$$AV = |M - X| + k.s \quad (8)$$

in which: X = mean of individual contents (n=10), s = standard deviation, k = acceptability constant (if n = 10, k = 2.4; if n = 30, k = 2.0), M = reference value (if  $98.5 \leq X \leq 101.5$ , M=X; if  $X \leq 98.5$ , M=98.5; if  $X > 101.5$ , M=101.5)

To determine drug loading of a batch, 3 tablets were triturated and 25 mg of the powder were transferred to a 25 mL volumetric flask, extracted, diluted and quantified as described for uniformity of content (n=3).

## 2.8 IN VITRO RELEASE OF PIPERINE FROM THE TABLETS

*In vitro* release of the bioactive from the tablets was performed as described for the microparticles, in section 2.5. The tablets (n=3) were previously weighed for further adjusting PIP content and tablets containing free PIP, Pullulan® and Kyron® T-314 (6%, w/w; n=3) were assayed for comparison purposes under the same conditions.

## 3 RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 ANALYTICAL METHOD VALIDATION

The analytical method proposed was linear in the range of 0.5 to 20 µg/mL, with a correlation coefficient close to the unit ( $r = 0.9999$ ;  $y = 0.12381x - 0.00975$ ); significant linear regression ( $F_{\text{calculated}} = 82902.04 > F_{\text{tabulated}} = 4.75$ ) and no significant linearity deviation ( $F_{\text{calculated}} = 2.67 < F_{\text{tabulated}} = 3.26$ ). The limit of detection and quantification were 0.05 and 0.16 µg/mL, respectively.

It was also precise, with RSD 0.55% for repeatability and 0.64% for intermediate precision, and accurate, with mean recovery  $99.28 \pm 1.00$  %. Furthermore, the method was robust, since small variations in wavelength and the solvent from a different supplier did not affect PIP quantification in the microparticles.

Also, the developed method compared to a HPLC method to quantify PIP (MOTTA et al., 2018). The specificity performed in HPLC showed no interference of

the formulation excipients in the quantification of PIP, and the encapsulation efficiency obtained was  $90.4 \pm 0.55$  %, close to that found with UV method.

### 3.2 MICROPARTICLES CHARACTERIZATION

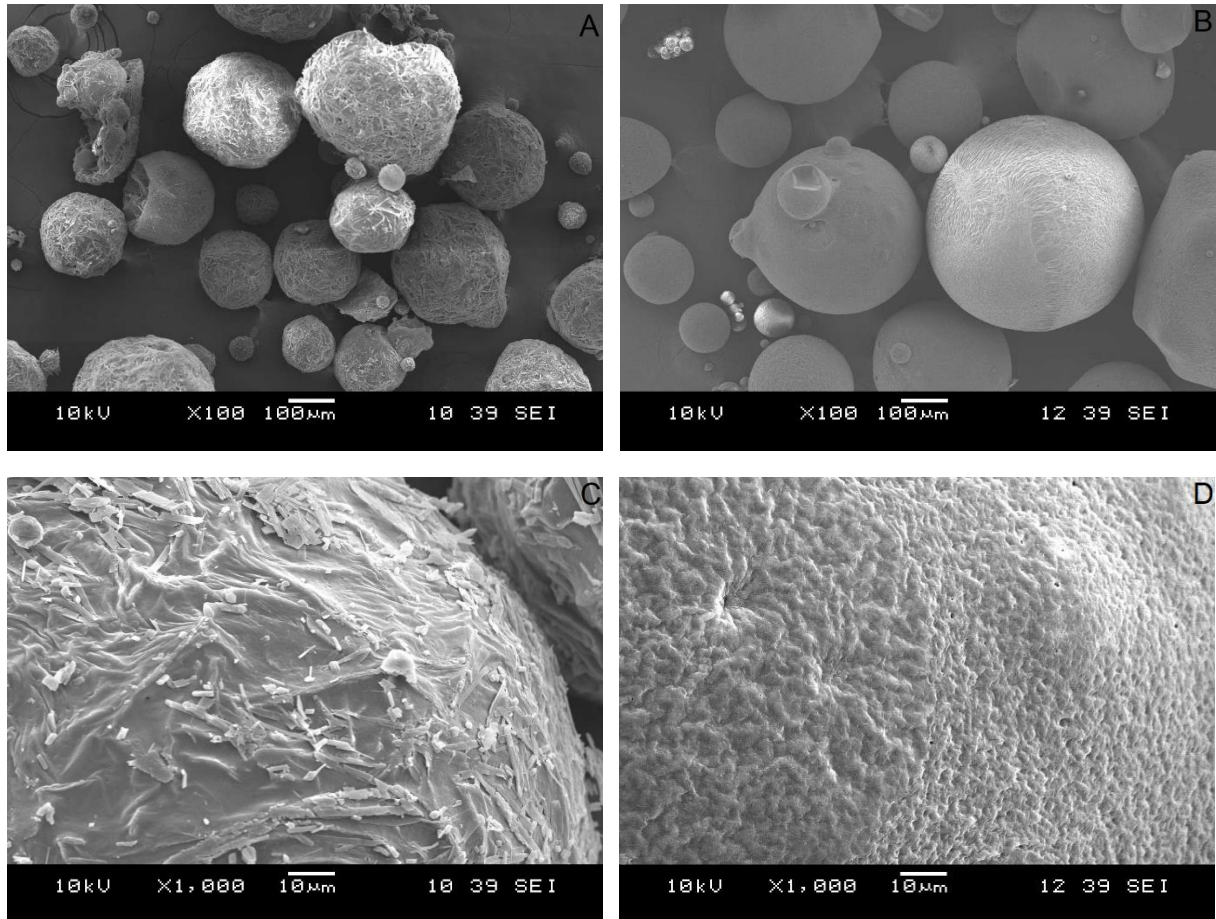
PIP microparticles (PIP-MP) were prepared by O/W emulsion and solvent evaporation method. The powder appeared to be free flowing and presented light-yellow color and weak odor, both characteristic of PIP. Microparticles prepared without the bioactive were also free flowing, however the powder was white and presented ethylcellulose odor characteristics.

SEM images of the microparticles show a spherical and slightly rough surface, more evident for B-MP. Additionally, B-MP exhibits a porous surface, not so noticeable in PIP-MP. This porosity is expected for the emulsion evaporation method because of the solvent evaporation step (MORALES et al., 2010). The micrographs also suggest the presence of PIP modified the surface of the microparticles.

Regarding the process yield, the preparation of PIP-MP presented 97.6% yield, higher than the preparation of the microparticles without PIP ( $p < 0.05$ ). PIP encapsulation efficiency was 90%, corresponding to a drug loading of approximately 300 mg PIP/g. Bonepally and coworkers (2008) prepared PCL microparticles containing piperine and had encapsulation efficiencies of 50% at maximum and Pengpong and coworkers (2014) prepared chitosan microparticles with piperine using electrospray ionization and obtained 84% encapsulation efficiency. So, employing a relatively simple preparation method, in this work it was possible to obtain a good encapsulation efficiency, which can be due to the low aqueous solubility of PIP in water, which provides a suitable entrapment of the substance in microparticles.

The PIP-containing microparticles presented lower size than those without the bioactive ( $p < 0.05$ ). Both PIP-MP and B-MP presented span close to 2 ( $p > 0.05$ ), indicating a slightly polydispersion in terms of particle size, which can be corroborated by the SEM images. Bonepally and coworkers (2008), using the same preparation method with different polymer, obtained smaller particles than those obtained in this work, which can result in worse flow, once the size of the microparticles influence in powder flow properties.

Figure 1 – Scanning electron micrographs of PIP-MP (A) and B-MP (B) with magnification of 100x and PIP-MP (C) and B-MP (D) with 1000x.



Source: Author.

Analyzing the particles size and the SEM images of PIP-MP and B-MP, it's possible to suggest that PIP exerts a surface activity, once its existence in the microparticles not only reduces substantially their size but also improves the size distribution. Therefore, in the emulsion step of the preparation method, PIP could be located in the droplets interface, reducing the system energy, which reduces the size of the droplets. Also, as the solvents evaporate and the small droplets generate the microparticles, consolidating them, PIP acts modifying the particles surface.

Table 1 – Process yield, encapsulation efficiency, drug loading, mean particle size and span of the microparticles containing PIP (PIP-MP) and without PIP (B-MP) (n=3; mean  $\pm$  standard deviation)

<b>Formulation</b>	<b>Yield (%)</b>	<b>Encapsulation Efficiency (%)</b>	<b>Drug loading (mg/g)</b>
PIP-MP	97.6 $\pm$ 0.3	90.0 $\pm$ 0.9	298.3 $\pm$ 2.9
B-MP	94.3 $\pm$ 0.2	--	--

Source: Author.

Table 2 – Particle sizes and span of the microparticles containing PIP (PIP-MP) and without PIP (B-MP) (n=3; mean  $\pm$  standard deviation)

<b>Formulation</b>	<b>Dv (10) (<math>\mu</math>m)</b>	<b>Dv (50) (<math>\mu</math>m)</b>	<b>Dv (90) (<math>\mu</math>m)</b>	<b>D [4,3] (<math>\mu</math>m)</b>	<b>Span</b>
PIP-MP	53 $\pm$ 18	171 $\pm$ 15	344 $\pm$ 27	190 $\pm$ 13	1.698 $\pm$ 0.180
B-MP	77 $\pm$ 1	329 $\pm$ 28	763 $\pm$ 24	376 $\pm$ 17	2.085 $\pm$ 0.110

Source: Author.

The microparticles flow properties study is fundamental to define which excipients are required to compress that powder, mainly when using direct compression (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013; KOO, 2017). Furthermore, in the case of compressing microparticles, as they will be put under stress, it's very important to prevent them from rupturing, and so the excipients have to be able to provide mechanical protection (HENG et al., 2000).

Bulk density and tapped density values are listed in table 3. Bulk density value of PIP-MP are higher than those obtained for B-MP, implicating in lower volume occupied by the powder, which is interesting for storage purposes. Also, as the preparation of tablets is a goal of this study, this enables the obtention of smaller tablets, which facilitates swallowing.

Table 3 – Densities and flow properties of the microparticles containing PIP (PIP-MP) and without PIP (B-MP) (n = 3; mean  $\pm$  standard deviation)

Formulation	Bulk density (g/cm <sup>3</sup> )	Tapped density (g/cm <sup>3</sup> )	Carr Index (%)	Hausner ratio
PIP-MP	0.25 $\pm$ 0.05	0.28 $\pm$ 0.05	11 $\pm$ 2	1.13 $\pm$ 0.02
B-MP	0.15 $\pm$ 0.03	0.16 $\pm$ 0.03	5 $\pm$ 1	1.06 $\pm$ 0.03

Source: Author.

The tapped density of PIP-MP was  $0.28 \pm 0.05$  g/cm<sup>3</sup> and for B-MP,  $0.16 \pm 0.03$  g/cm<sup>3</sup>. The reason for this difference is the size of them: B-MP is almost twice the size of PIP-MP and so, as compactation of PIP-MP occurs, the particles settle among each other, occupying a smaller volume.

Besides, bulk density and tapped density of MP-PIP and B-MP were used to calculate Carr Index and Hausner ratio (table 3). According to Leturia and coworkers (2014), values of Carr Index below 15 and Hausner ratio below 1.25 indicate an excellent flow, and as so, both PIP-MP and B-MP present this behavior. Even though the presence of PIP increased the Carr index and Hausner ratio ( $p < 0.05$ ), they were still in the same range.

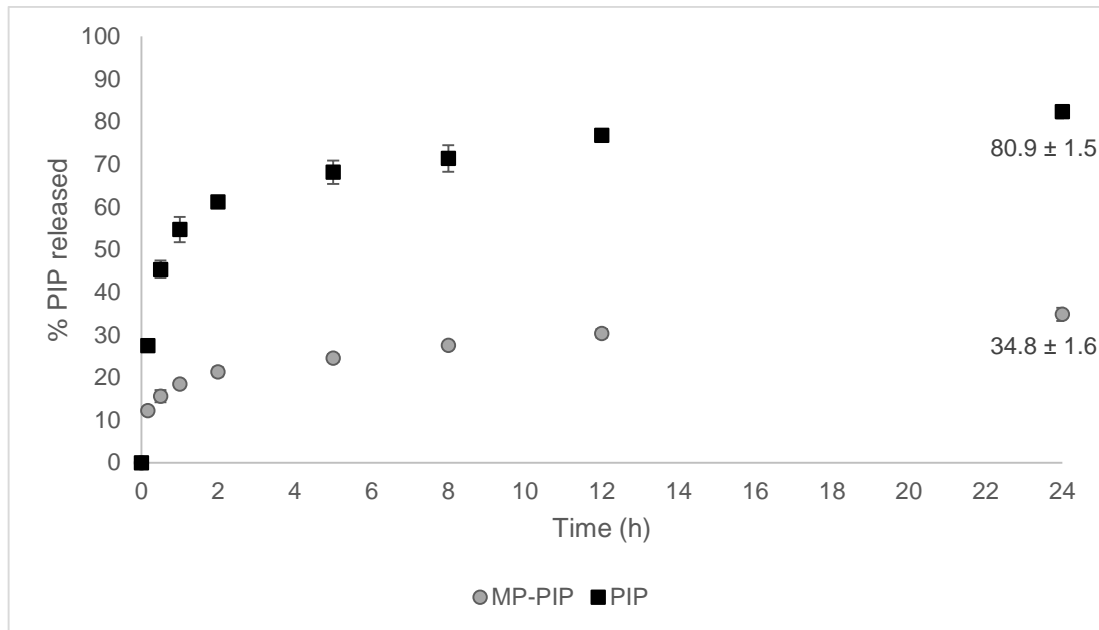
### 3.3 *IN VITRO* RELEASE OF PIP FROM THE MICROPARTICLES

The microencapsulation of drugs using ethylcellulose as a polymer is mostly explored by its ability to control the release of the drug associated (MURTAZA, 2012; ROGERS; WALLICK, 2011). So, the *in vitro* release of PIP from the ethylcellulose microparticles was assayed and compared to bulk PIP. The test was performed for 24 hours in a dissolution tester with hydrochloric acid 0.1 M containing 2% SDS as a dissolution medium, maintaining *sink* conditions.

In the first 10 minutes, pure PIP release was  $27.4 \pm 0.6\%$ . On the other hand, the release of PIP from the microparticles, within the same time, was  $12.2 \pm 0.9\%$ . This results and the release profile demonstrate the microparticles were able to control the

release of piperine until the end of the experiment, in which approximately 81% of PIP and 35% of PIP from the microparticles were released.

Figure 2 – *In vitro* release of PIP from the microparticles (MP-PIP) and pure PIP.



Source: Author.

Babay and coworkers, in 1998, developed indomethacin microparticles using ethylcellulose as polymer. The *in vitro* release was performed in phosphate buffer solution containing 0.02% polysorbate 20. In 24 h, 21% of the drug was released and, the maximum released in 4 weeks was 53%, also demonstrating the ability of ethylcellulose in modifying the release of drugs (BABAY; HOFFMAN; BENITA, 1998).

Bonepally and coworkers, in 2008, also developed piperine microparticles, however using poli- $\epsilon$ -caprolactone (PCL) as polymer. The *in vitro* release was performed in distilled water. In 24 h, approximately 50% of the drug was released and, 100% of piperine was released in 16 days (BONEPALLY et al., 2008).

Pi and coworkers, in 2018, evaluated the release of curcumin from ethylcellulose microparticles using as dissolution medium simulate gastric fluid containing 0.1 mol/L HCl and 0.25% SDS. 96% of curcumin was released in 24h (PI et al., 2018).

### 3.5 CHARACTERIZATION OF TABLETS CONTAINING PIP-LOADED MICROPARTICLES

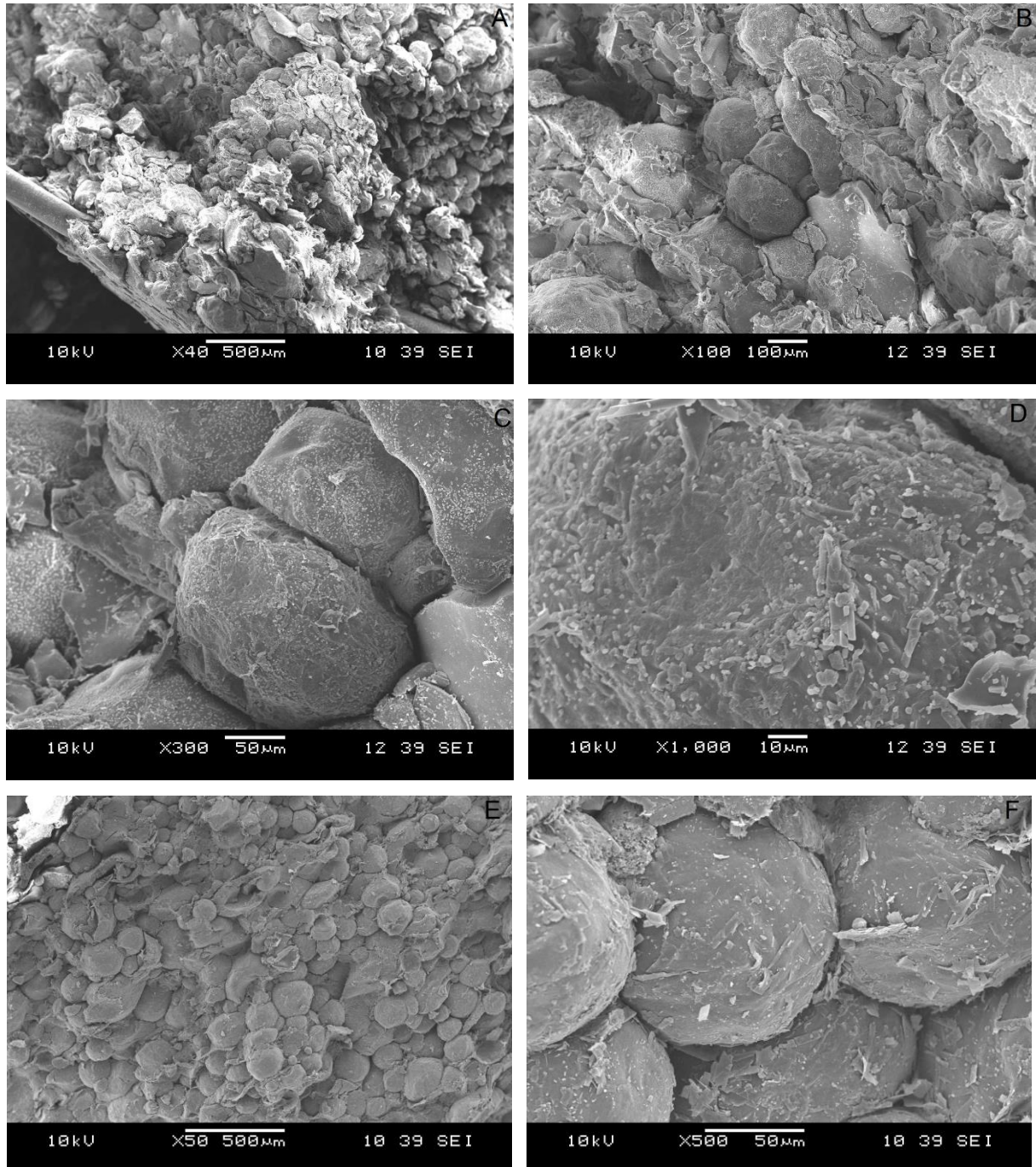
Considering the good flow properties exhibited by PIP-MP, it was not necessary to use excipients to improve this characteristic. At first, 100mg of PIP-MP were tableted, with no diluent. The tablets produced presented adequate macroscopical characteristics and the microparticles remained intact after the compression (figure X), demonstrating the importance of the flow properties presented by the microparticles. However, the tablet hardness was not adequate. So, Pullulan<sup>®</sup> was chosen to be the diluent, since it has cohesive properties which provides suitable hardness to tablets and was proven to protect microparticles from rupturing due to the compression force, even more than usual diluents such as microcrystalline cellulose and lactose (FERREIRA et al., 2015). Furthermore, ethylcellulose is reported to produce tablets with poor dissolution (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009) and also, the first *in vitro* release tests indicated the need of a dissolution improver. So, Kyron<sup>®</sup> T-314 (6.0%, w/w) was used in the formulation. This polymer is obtained by the crosslinking of polycarboxylic acids and is used as a disintegrating agent from 0.5% to 4.0% and as a dissolution improver from 2.0% to 6.0%, due to its ability to break the tablets into smaller particules, which increases the surface area and thus, increases dissolution of the active ingredient (COREL PHARMA CHEM, 2010).

It is important to highlight that it's the first time that piperine multiparticulated tablets are developed and, up to now, there are no papers which focused on producing piperine-based tablets.

Therefore, the tablets were produced with PIP-MP in amount equivalent to 20 mg PIP, 6% Kyron<sup>®</sup> T-314 and Pullulan<sup>®</sup> q.s 100 mg. SEM images of tablets cross-section show many spherical particles, similar to those shown by SEM of PIP microparticles, suggesting the microstructures resisted to the compression force. This can be attributed to the diluent employed, as reported by Ferreira (2015), but also ethylcellulose, the polymer used in microparticles preparation, since similar SEM images were obtained for the compression of the microparticles alone (figure 3).



Figure 3 – Scanning electron micrographs of T-PIP-MP magnification of 40x (A), 100x (B), 300x (C) and 1000x (D) and of tablets made only with PIP-MP with magnification of 50x (E) and 500x (F).



Source: Author.

The tablets containing piperine-loaded microparticles exhibit low variations regarding mean weight, thickness and hardness, demonstrating the consistency of the compression process employed. Mean weight was  $99.1 \pm 0.9$  mg, thickness was 3.38

$\pm 0.03$  mm and hardness  $3.0 \pm 0.2$  kgf. and friability was 0.4%, below 1.5%, demonstrating the resistance of the tablets to abrasion.

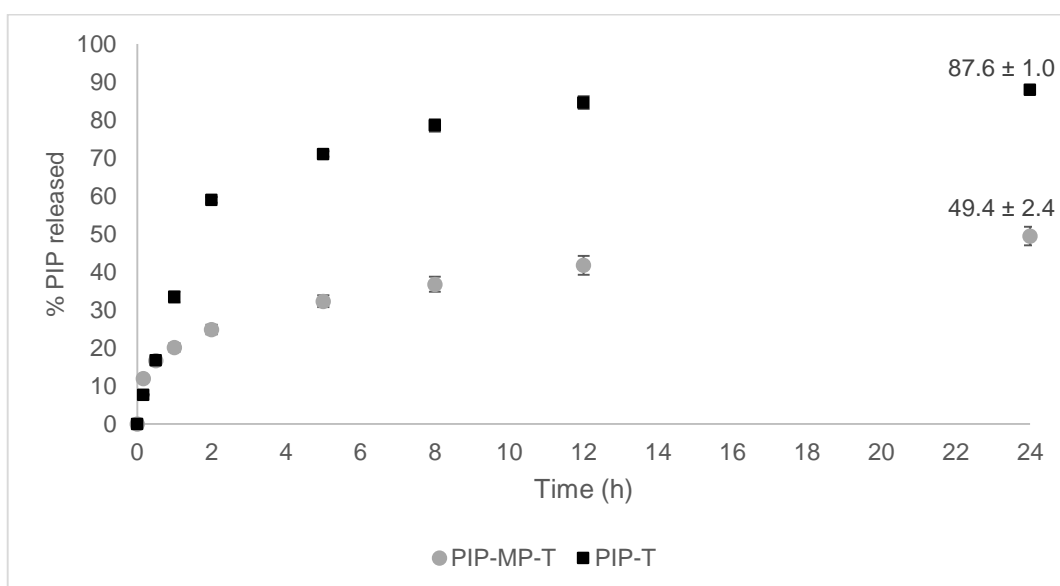
Uniformity of content was performed as described in the Brazilian Pharmacopoeia, with  $97.0 \pm 2.0$  %, RSD 2.11, resulting in an acceptance value of 6.4, below the 15 value limit, and so the batch was considered uniform in terms of piperine content. The drug loading of a batch was  $19.7 \pm 0.4$  mg of PIP, close to the theoretical 20 mg.

### 3.6 *IN VITRO* RELEASE OF PIP FROM THE TABLETS

Polacrillin potassium was used as dissolution improver at a dose of 6% in the preparation of PIP-MP tablets (PIP-MP-T) and also PIP tablets (PIP-T). The *in vitro* release was performed under the same conditions as PIP-MP and pure PIP, also for 24 hours.

In 10 minutes,  $11.9 \pm 0.6$ % of PIP was released from the tablets, while  $7.6 \pm 0.2$ % of PIP associated to microparticles was released. Comparing PIP-MP and PIP release in the same time, it represents a slower release from the tablets, which is expected, once the compact has to disintegrate first to favor the drug dissolution.

Figure 4 – *In vitro* release of PIP from the microparticles tableted (MP-PIP-T) and from the tablets (PIP-T).

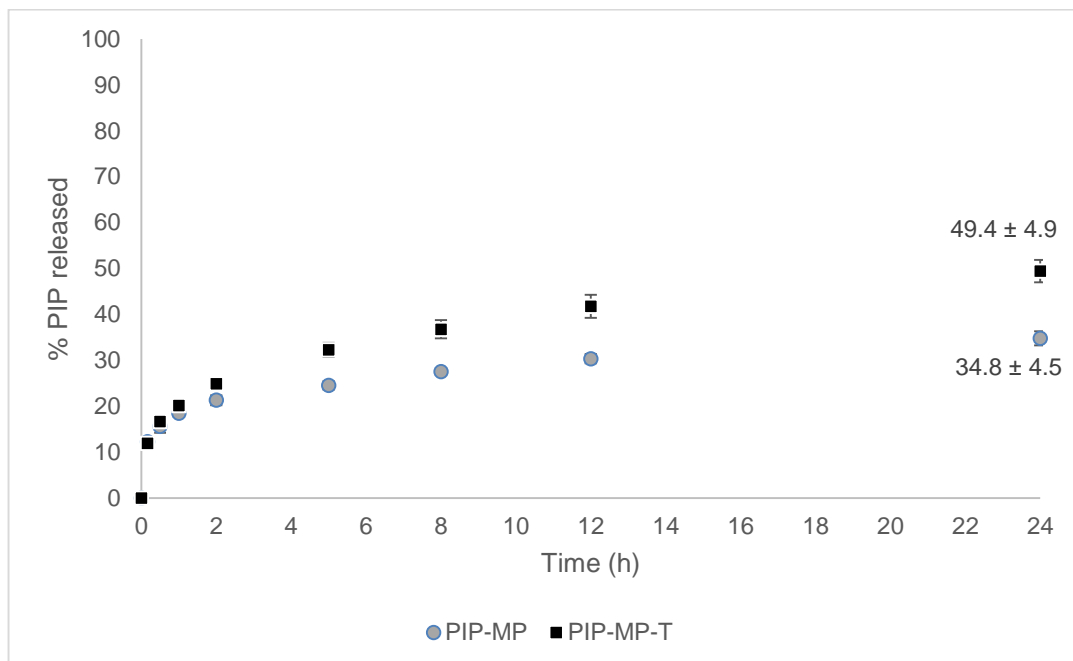


Source: Author.

At the end of 24 hours, 88% of PIP was released from the PIP-T and almost 50% of the PIP-MP-T, more than the concentration of PIP found at the end of MP-PIP and PIP release. This can be due to the influence of polacrillin potassium. The higher dissolution of the drugs associated with it is explained by its ability to promote disintegration, which results in disaggregation and wetting of the drug (ABD-EL BARY; LOUIS; SAYED, 2014).

Besides, the release profile of PIP-MP-T is similar to PIP-MP, as shown by figure 5. It's possible to see even an overlapping of the first data points and after, piperine release from the tablets is higher, possibly because of the dissolution improver influence. These results corroborate with the hypothesis that the microparticles remain intact after the compression, which is very important, once when the tablets disintegrate, they release the microparticles individually and so they can provide the benefits associated with the microencapsulation process.

Figure 5 – *In vitro* release of PIP from the microparticles tableted (MP-PIP-T) and from microparticles (PIP-MP).



Source: Author.

## 4 CONCLUSION

In this study, microparticles containing PIP were successfully developed. The microparticles controlled the PIP release and presented good flow properties, which facilitated the incorporation of the microparticles in tablets. The microparticulated tablets containing PIP were developed for the first time. The SEM images and the release profile of PIP from the microparticles and the tablets containing piperine-microparticles suggested the microparticles were intact after the compression. Therefore, the microparticulated tablet enables the administration of the piperine microparticles and, more important, when the tablets disintegrate, they release the microparticles individually, maintaining the benefits related to the microencapsulation. Since many pharmaceutical activities were already attributed to PIP, the microparticulated tablets developed might be a promising dosage form to deliver piperine.

## REFERENCES

- ABD-EL BARY, A.; LOUIS D.; SAYED, S. Olmesartan medoxomil surface solid dispersion-based orodispersible tablets: formulation and *in vitro* characterization. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 24, p. 665-672, 2014.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**, 5ª ed. Brasília, 2010.
- AHMAD, N; FAZAL, H.; ABBASI, B. H.; FAROOQ, S.; ALI M.; KHAN, M. A. Biological role of *Piper nigrum* L. (Black pepper): A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.2, p.1945-1953, 2012.
- ALLEN, L. V. Jr.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 9 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 716p.
- AMERICAN SPICE TRADE ASSOCIATION. **Piperine Content of Black and White Pepper, Their Oleoresins and Soluble Pepper Seasonings**. 2018.
- BABAY, D.; HOFFMAN, A.; BENITA, S. Design and release kinetic pattern evaluation of indomethacin microspheres intended for oral administration. **Biomaterials**, v. 9, p.482-488, 1988.
- BASTAKI, M.; AUBANEL, M.; BAUTER, M.; CACHET, T.; DEMYTTENAERE, J.; DIOP, M. M.; HARMAN, C. L.; HAYASHI, S. M.; KRAMMER, G.; LI, X.; LLEWELLYN, C.; MENDES, O.; RENSKERS, K. J.; SCHNABEL, J.; SMITH, B. P. C.; TAYLOR, S. V. Absence of adverse effects following administration of piperine in the diet of Sprague-Dawley rats for 90 days. **Food and Chemical Toxicology**, v. 120 p. 213-221, 2018.
- BI, X.; YUAN, Z.; QU, B.; ZHOU, H.; LIU, Z.; XIE, Y. Piperine enhances the bioavailability of silybin via inhibition of efflux transporters BCRP and MRP2. **Phytomedicine**, v. 54, p. 98-108, 2019.
- BONEPALLY, C.R.; AUKUNURU, J.; YELLU, N. R.; VANGA, M. R. Fabrication and investigations on hepatoprotective activity of sustained release biodegradable piperine microspheres. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology** v.1, p. 87-96, 2008.
- BROWN, D. M. **Drug delivery systems in cancer therapy**. Totowa: Humana Press Inc., 2004. 390 p.
- BUTT, M.S.; PASHA, I.; SULTAN, M.T.; RANDHAWA, M.A.; SAEED, F.; AHMED, W. Black pepper and health claims: a comprehensive treatise black pepper and health claims. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 9, p. 37-41, 2013.
- CHAUHAN, S. K.; KIMOTHI, G. P.; SINGH, B. P. AGRAWAL, S. A spectrophotometric method to estimate piperine in piper species. **Ancient Science of Life**, v. 18, p. 84-87, 1998.

CHONPATHOMPIKUNLERT, P.; WATTANATHORN, J.; MUCHIMAPURA, S., Piperine, the main alkaloid of Thai black pepper, protects against neurodegeneration and cognitive impairment in animal model of cognitive deficit like condition of Alzheimer's disease. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p. 798–802, 2010.

CHOWDARY, K. P. R.; SRINIVASA, Y. Mucoadhesive Microspheres for Controlled Drug Delivery. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, p.1717-1724, 2004.

DESSIRIER, J. NGUYEN, N.; SIEFFERMANN, J.; CARSTENS, E.; O'MAHONY, M. Oral irritant properties of piperine and nicotine: psychophysical evidence for asymmetrical desensitization effects. **Chemical Senses**, v. 24, p. 405-413, 1999.

DI, X.; WANG, X.; DI, X.; LIU Y. Effect of piperine on the bioavailability and pharmacokinetics of emodin in rats. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.115, p.144–149, 2015.

FERREIRA, L. M.; VELASQUEZ, A. A.; SCHAFFAZICK, S. R.; CRUZ L. Pullulan: an advantageous natural polysaccharide excipient to formulate tablets of alendronate-loaded microparticles. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 1, jan./mar., 2015.

GHOSH, S. K. **Functional coatings**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 2006. 357p.

GREENSHIELDS, A. L.; DOUCETTE, C. D.; SUTTON, K. M.; MADERA, L.; ANNAN, H.; YAFFE, P. B.; KNICKLE, A. F.; DONG, Z.; HOSKIN, D. W. Piperine inhibits the growth and motility of triple-negative breast cancer cells. **Cancer Letters**, v.357, p.129-140, 2015.

HENG, P. W. S.; CHAN, L. W.; LIEW, C. V.; NG, T. Y. Effect of tableting compaction pressure on alginate microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 17, n. 5, p. 553-564, 2000.

JANSZ, E. R.; PATHIRANA, I. C.; PACKIYASOTHY, E. V. Determination of piperine in pepper (*Piper nigrum* L.) **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**, v. 11, p. 129-138, 1983.

KOO, O. M. Y. **Pharmaceutical excipients: properties, functionality, and applications in research and industry**. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc, 2017. 352p.

KRISHNAIAH, Y. S. R. Pharmaceutical Technologies for Enhancing Oral Bioavailability of Poorly Soluble Drugs. **Journal of Bioequivalence & Bioavailability**, v. 2, n. 2, p. 28-36, 2010.

KUMAR, M. N. V. R. Nano and Microparticles as Controlled Drug Delivery Devices. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n.2, p. 234-258, 2000.

LAM, P. L.; GAMBARI, R. Advanced progress of microencapsulation technologies: in vivo and *in vitro* models for studying oral and transdermal drug deliveries. **Journal of Controlled Release**, v.178 v.25-45, 2014.

LETURIA, M.; BENALI, M.; LAGARDE, S.; RONGA, I.; SALEHA, K. Characterization of flow properties of cohesive powders: A comparative study of traditional and new testing methods. **Powder Technology**, v. 253 p. 406-423, 2014.

MORALES, M. E.; RUIZ, M. A.; LÓPEZ, G.; GALLARDO, V. Development of oral suspensions of microparticles of ethylcellulose with tramadol. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 36, p. 885-892, 2010.

MOTTA, M. H.; SCHNEIDER, A. C.; CODEVILLA, C. F.; MENEZES, C. R.; SILVA, C. B. Analytical method by liquid chromatography to assay piperine associated in nanoemulsions. **Drug Analytical Research**, v.2, p. 1-7, 2018.

MURTAZA, G. Ethylcellulose microparticles: a review. **Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research**, v. 69, p. 11-22, 2012.

PENGPONG, T.; SANGVANICH, P.; SIRILERTMUKUL, K.; MUANGSIN, N. Design, synthesis and *in vitro* evaluation of mucoadhesive p-coumarate-thiolated-chitosan as a hydrophobic drug carriers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, p. 487-497, 2014.

PI, C.; YUAN, J.; LIU, H.; ZUO, Y.; FENG, T.; ZHAN, C.; WU, J.; YE, Y.; ZHAO, L.; WEI, Y. *In vitro* and *in vivo* evaluation of curcumin loaded hollow microspheres prepared with ethyl cellulose and citric acid. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 15, p. 1046-1054, 2018.

RENTMEISTER-BRYANT, H.; GREEN, B. G. Perceived Irritation during Ingestion of Capsaicin or Piperine: Comparison of Trigeminal and Non-trigeminal Areas, **Chemical Senses**, v. 22, p. 257-266, 1997.

ROGERS, T. L.; WALLICK, D. Reviewing the use of ethylcellulose, methylcellulose and hypromellose in microencapsulation. Part 1: materials used to formulate microcapsules. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 38 p. 129-157, 2012.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. Handbook of pharmaceutical excipients. **Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association**, 6 ed., 2009.

SAMYKUTTY A.; SHETTY A. V.; DAKSHINAMOORTHY G.; BARTIK M. M.; JOHNSON G. L.; WEBB B.; ZHENG G.; CHEN A.; KALYANASUNDARAM R.; MUNIRATHINAM G. Piperine, a Bioactive Component of Pepper Spice Exerts Therapeutic Effects on Androgen Dependent and Androgen Independent Prostate Cancer Cells. **PloS One**, v. 8, n. 6, e65889, 2013.

UMAR S.; SARWAR A. H. M. G.; UMAR K.; AHMAD N.; SAJAD M.; AHMAD S.; KATIYAR C. K.; KHAN H.A. Piperine ameliorates oxidative stress, inflammation and histological outcome in collagen induced arthritis. **Cellular Immunology**, v. 284, p. 51-59, 2013.

YAFFE, P. B.; COOMBS, M. R. P.; DOUCETTE, C. D. WALSH, M.; HOSKIN, D. W. Piperine, an alkaloid from black pepper, inhibits growth of human colon cancer cells via G1 arrest and apoptosis triggered by endoplasmic reticulum stress. **Molecular Carcinogenesis**, v. 54, p. 1070-1085, 2015.





## 5 DISCUSSÃO GERAL

A discussão geral foi realizada visando uma discussão mais ampla do tema do trabalho, retomando aspectos importantes e, ainda, outros experimentos realizados previamente ou em adição aos resultados apresentados no artigo.

A piperina, alcaloide extraído dos grãos da pimenta preta, apresenta diversas atividades já relatadas na literatura. Apesar de seu promissor uso na terapêutica, há alguns obstáculos a serem superados, como sua baixa solubilidade em água e, quando administrada por via oral, sabor pungente e irritação do trato gastrointestinal (DESSIRIER et al., 1999; SHITYAKOV et al., 2019).

Assim sendo, nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo sistemas nanoestruturados contendo piperina para aumentar sua biodisponibilidade. Motta (2016) associou a piperina em nanocápsulas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) – PCL e em nanoemulsões. Foi avaliada a citotoxicidade das formulações em células tumorais colorretais e hepáticas, além de linhagens não tumorais. As nanoestruturas promoveram um aumento na atividade citotóxica frente a ambas as linhagens tumorais e uma maior viabilidade celular em células de fibroblastos, que foram relacionadas ao controle da liberação da piperina exercido pelas formulações nanoestruturadas. Ademais, foram realizados ensaios *in vivo* em *Caenorhabditis elegans* que demonstraram uma diminuição na taxa de mortalidade promovida pela nanoemulsão e pela piperina livre, promovendo uma proteção frente a danos oxidativos causados pela juglone, relacionada a atividade antioxidante do bioativo.

Weber (2018) associou a piperina em nanocápsulas de Eudragit RL<sup>®</sup> 100 e também em nanoemulsões revestidas com quitosana. Na avaliação do potencial de irritação por HET-CAM, a piperina foi caracterizada como substância irritante e sua associação em nanocápsulas foi capaz de diminuir esta irritação. Além disso, a formulação nanoestruturada foi capaz de aumentar a viabilidade de células colorretais cancerígenas, avaliada pelo ensaio de MTT em 48 horas de incubação, demonstrando a atividade antitumoral *in vitro* da formulação frente a este tipo celular relacionada à liberação controlada do bioativo pelos nanocarreadores.

Considerando o exposto e continuando a linha de pesquisa, neste trabalho foi proposta a incorporação da piperina em um carreador diferente e que propiciasse a administração por via oral: as micropartículas poliméricas. Estes sistemas podem promover a proteção do fármaco associado frente ao ambiente, mascarar sabor, cor,

odor indesejáveis e, de acordo com o material de revestimento empregado, controlar sua liberação (BANSODE et al., 2010, LAM; GAMBARI, 2014).

Bonepally (2008) preparou diversos lotes de micropartículas de PCL contendo piperina pelo método de emulsificação evaporação do solvente O/A, com e sem polissorbato 80 na fase contínua, com diferentes proporções de fármaco e polímero. Boddupalli (2012) empregou o método de emulsificação evaporação do solvente O/O, com parafina como fase contínua da emulsão. Foram empregados como polímeros a etilcelulose, uma mistura de etilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose – HPMC e carbonato de sódio e outra mistura de etilcelulose, HPMC e Carbopol®. Pengpong (2014) empregou o método de ionização por eletrospray para obter micropartículas de diferentes modificações de quitosana.

Tendo em vista os trabalhos relatados na literatura, o projeto inicial contemplava a preparação de micropartículas contendo piperina empregando o método de secagem por aspersão. Assim, o polímero escolhido foi o Eudragit® L100, por ser facilmente dispersível em meio aquoso e devido à possibilidade de controle de liberação do bioativo, o que poderia facilitar a dissolução da PIP e, ainda, proteger o trato gastrointestinal da irritação provocada (DESSIRIER et al., 1999; RENTMEISTER-BRYANT; GREEN, 1997). Para tal, o polímero a 1% foi disperso em hidróxido de sódio 0,05 M e, após, a piperina foi dispersa nesta mistura, procedendo-se, então, a secagem. O rendimento do processo foi adequado (35-38%), porém, o teor de bioativo foi inferior a 56%, considerado insatisfatório. Além disso, observou-se que, devido à alta lipofilia da piperina, a dispersão não era totalmente homogênea e, ao final da secagem, parte do ativo ficava aderido às paredes do recipiente empregado para a mistura dos componentes. Ademais, foi verificada a presença de pó amarelo, semelhante à piperina, no frasco localizado abaixo da câmara de secagem.

Assim, foram testadas diversas combinações de fluxo e temperatura, respeitando o máximo de 120 °C, uma vez que a temperatura de fusão da piperina é 130 °C (BUTT et al., 2013). Também, foram realizadas tentativas de melhorar a dispersão da piperina, empregando tensoativos, outras formas de agitação, temperatura e, em último caso, a adição de etanol. Porém, o máximo de eficiência de encapsulação que foi possível obter foi 80%.

Desta forma, optou-se pela microencapsulação da piperina pelo método de emulsificação evaporação do solvente O/A, conforme descrito por Mattiazzi (2019), utilizando os polímeros Eudragit® RL100 e L100, na proporção 1:5 (piperina:polímero),

variando a concentração da solução de polissorbato 80 de 0,25 a 1% e o volume de fase orgânica empregada. Porém, em nenhuma das condições testadas houve a formação de partículas.

Empregando etilcelulose como polímero, as micropartículas se formaram. Com a proporção de 1:5 (piperina:etilcelulose), as micropartículas apresentaram uma concentração de piperina 163,9 mg/g. Visando à posterior preparação de comprimidos microparticulados, foram preparadas micropartículas com proporções de 1:4 e 1:2. Em ambas condições, a eficiência de encapsulação foi próxima a 90% e o rendimento de, aproximadamente, 95%. Desta forma, deu-se seguimento no trabalho com a terceira condição (relação de 1:2 piperina e etilcelulose), cuja concentração teórica foi de 331,5 mg/g.

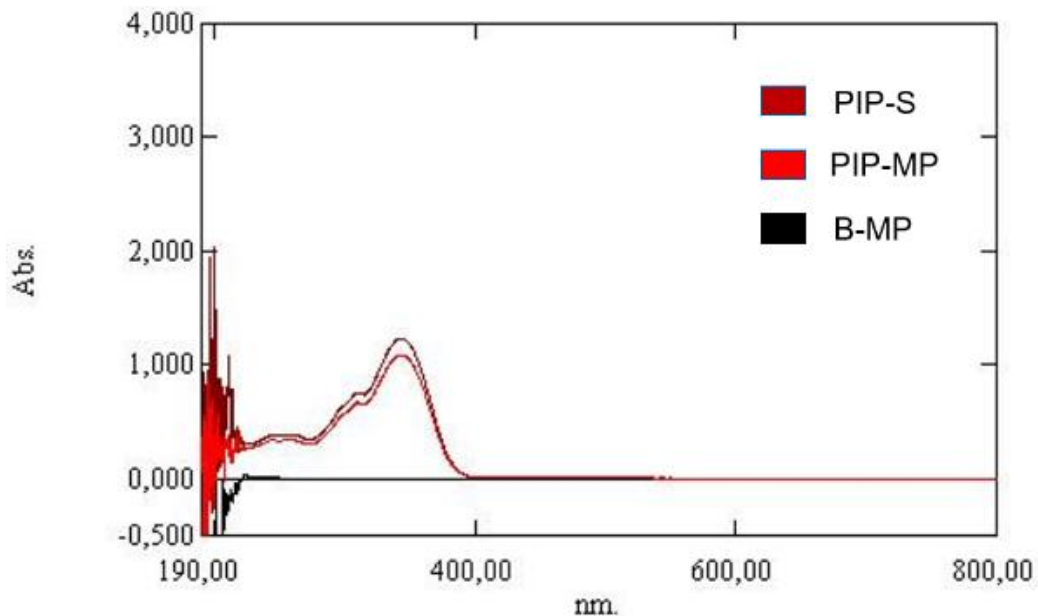
As micropartículas foram caracterizadas e se mostraram esféricas, com tamanho médio de partículas de  $171 \pm 15 \mu\text{m}$  e valor de Span de  $1,698 \pm 0,180$ ; rendimento de 98% e eficiência de encapsulação de 90%. Os trabalhos relatados na literatura retratam eficiências de encapsulação abaixo dos obtidos neste estudo: Bonepally (2008) preparando micropartículas de PCL, obteve eficiências de encapsulação que não passaram dos 50%. Bodupalli (2012) obteve valores semelhantes, de 75 a 79%, para as três composições de polímeros empregadas (etilcelulose; etilcelulose, HPMC e carbonato de sódio; e etilcelulose, HPMC e Carbopol®). Em outro estudo, Pengpong (2014), que empregou o método de ionização por eletrospray, obteve o máximo de 84% de encapsulação. Portanto, com um método de preparação relativamente simples, foi possível obter uma boa eficiência de encapsulação e um rendimento de quase 100%.

Em relação ao tamanho das partículas, Bonepally obteve micropartículas menores do que as deste estudo, em torno de 16 a 100  $\mu\text{m}$ , o que pode acarretar um fluxo mais escasso para as micropartículas, uma vez que o tamanho influencia nas propriedades de fluxo dos pós. As micropartículas preparadas por Bodupalli (2012) somente com etilcelulose apresentaram tamanho de 222  $\mu\text{m}$ ; com etilcelulose, HPMC e carbonato de sódio, 114  $\mu\text{m}$  e com etilcelulose, HPMC e Carbopol®, 354  $\mu\text{m}$ .

Para a quantificação de piperina nas micropartículas, foi validado um método analítico por espectroscopia na região do ultravioleta. Para determinar o comprimento de onda de máxima absorbância da piperina, foi realizado o espectro de varredura de 190 a 800 nm para a solução metanólica de PIP (PIP-S – 10  $\mu\text{g/mL}$ ), solução com a amostra (MP-PIP) e as micropartículas sem piperina (MP-B). Como demonstrado na

figura 1, o pico máximo de absorção é de 343 nm e as amostras sem o bioativo não absorvem no neste comprimento de onda, portanto, o método é específico.

Figura 1 – Espectro de varredura da solução metanólica de PIP (PIP-S, 10 µg/mL), MP-PIP (10 µg/mL) e micropartículas sem piperina (MP-B).



Fonte: Autor.

O método analítico proposto se mostrou linear na faixa de 0,5 a 20 µg/mL, com um coeficiente de correlação próximo a unidade ( $r = 0,9999$ ;  $y = 0,12381 - 0,00975x$ ); regressão linear significativa ( $F_{\text{calculado}} = 82902,04 > F_{\text{tabelado}} = 4,75$ ) e sem desvio de linearidade significativo ( $F_{\text{calculado}} = 2,67 < F_{\text{tabelado}} = 3,26$ ). Os limites de detecção e quantificação foram 0,05 e 0,16 µg/mL, respectivamente.

O método também foi preciso, com DPR 0,55% para repetibilidade e 0,64% para precisão intermediária (tabela 1) e exato, com recuperação média de  $99,28 \pm 1,00\%$  (tabela 2). Além disso, o método foi robusto, uma vez que pequenas variações no método não afetaram a quantificação da PIP nas micropartículas, como demonstrado na tabela 3.

Tabela 1 – Precisão do método analítico por espectroscopia na região do ultravioleta para quantificação da PIP em micropartículas (n=6 para repetibilidade; n=9 para precisão intermediária)

		<b>Concentração teórica (µg/mL)</b>	<b>Concentração experimental (µg/mL)</b>	<b>Eficiência de encapsulamento (%)</b>	<b>DPR (%)</b>
Repetibilidade (n = 6)		10,00	9,06 ± 0,05	90,61 ± 0,50	<b>0,55</b>
Dia 1 (n = 3)	(n	10,00	9,02 ± 0,03	90,20 ± 0,27	0,30
Dia 2 (n = 3)	(n	10,00	8,91 ± 0,06	89,07 ± 0,60	0,67
Dia 3 (n = 3)	(n	10,00	8,95 ± 0,05	89,46 ± 0,52	0,58
Precisão Intermediária (n = 9)		10,00	8,96 ± 0,06	89,58 ± 0,58	<b>0,64</b>

Fonte: Autor.

Tabela 2 – Exatidão do método analítico por espectroscopia na região do ultravioleta para quantificar PIP em micropartículas (n=3)

<b>Amostra</b>	<b>Concentração de solução de PIP adicionada (µg/mL)</b>	<b>Concentração recuperada (µg/mL)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
80 %	3,01 ± 0,04	7,41 ± 0,04	100,43 ± 1,34
100 %	4,93 ± 0,00	9,33 ± 0,00	98,64 ± 0,08
120 %	6,91 ± 0,06	11,31 ± 0,06	98,77 ± 0,92
		Recuperação media	<b>99,28 ± 1,00</b>
		DPR	1,01

Fonte: Autor.

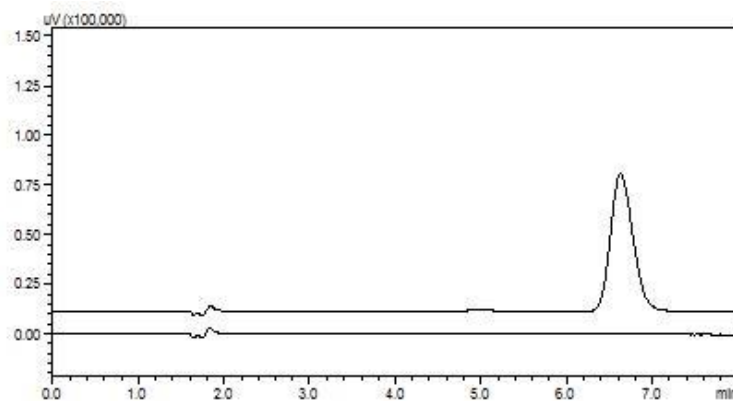
Tabela 3 – Análise da robustez do método analítico por espectroscopia na região do ultravioleta para quantificação da PIP em micropartículas (n=3)

	<b>Eficiência de Encapsulamento (%)</b>	<b>DPR (%)</b>
Condições usuais	89,07 ± 0,60	0,67
341 nm	89,68 ± 0,82	0,91
345 nm	89,86 ± 0,64	0,71
Diferente fornecedor de metanol	88,70 ± 0,58	0,66

Fonte: Autor.

Para corroborar a metodologia validada, este foi comparado por um método por cromatografia a líquido de alta eficiência (MOTTA et al., 2018). A especificidade feita por HPLC mostrou que não há influência dos excipientes da formulação na quantificação da PIP, como mostra a figura 2, e a eficiência de encapsulação obtida com este método foi  $90,4 \pm 0,55\%$ , próxima daquela obtida com o método de espectroscopia na região do ultravioleta.

Figura 2 – Cromatogramas obtidos por HPLC para as micropartículas sem PIP (MP-B) e com PIP (MP-PIP, 10 µg/mL).

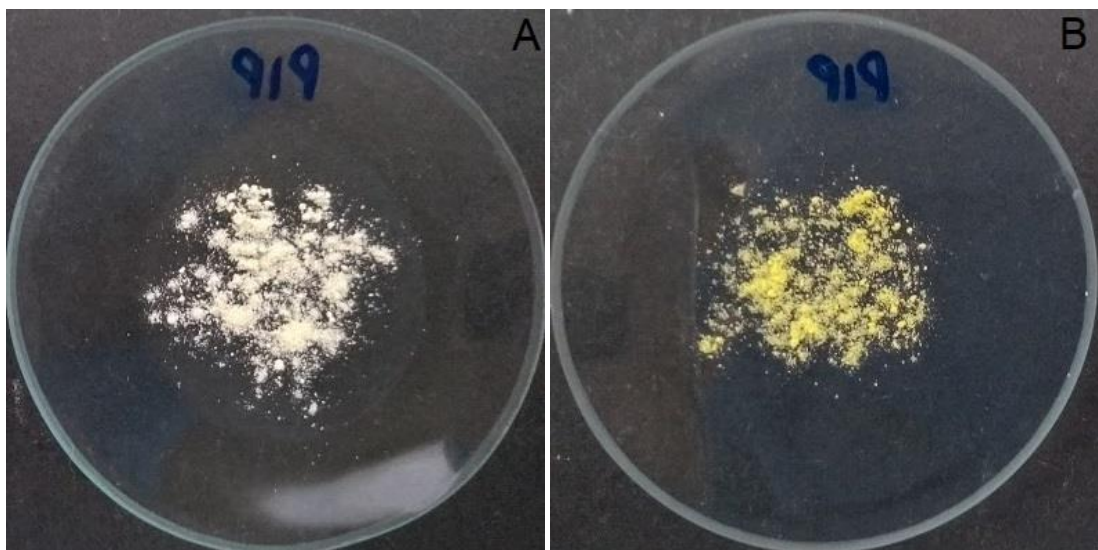


Fonte: Autor.

Uma instabilidade muito relatada na literatura para a piperina e, portanto, um dos obstáculos a serem contornados no início deste estudo com a microencapsulação, é sua instabilidade frente à luz (BUTT et al., 2013). Os sistemas nanoestruturados propostos por Motta (2016) e Weber (2018) promoveram uma proteção do bioativo frente à ação da luz artificial em câmaras UVA em relação a uma solução metanólica de piperina.

Portanto, neste estudo, a piperina em sua forma pura e as micropartículas foram colocadas em vidros de relógio e submetidas à fotodegradação em câmara com luz UVC. Visualmente, foi possível constatar a mudança de coloração da piperina para amarelo mais escuro, como mostra a figura 3.

Figura 3 – PIP antes (A) e após (B) exposição à luz UVC, por 48 h



Fonte: Autor.

Porém, em termos de teor de piperina, como mostra a tabela 4, ocorreu uma degradação extremamente lenta, com menos de 30% do bioativo degradado em 48 h de exposição à luz UVC. Pelo contrário, ao final de 48 h, a piperina presente nas micropartículas havia degradado mais de 50%.

A piperina é uma substância cristalina e, portanto, mais estável (BUTT et al., 2013; MCNAMARA; RANDALL; GUNTHORPE, 2005). O resultado do ensaio de fotodegradação sugere que o processo de microencapsulação da piperina pode tê-la



amorfizado, gerando uma desorganização das suas moléculas e, portanto, deixando a piperina mais instável e suscetível à degradação pela ação da luz.

Tabela 4 – Teores remanescentes de piperina pura (PIP) e nas micropartículas (MP-PIP) após a exposição à radiação UVC (média  $\pm$  DPR, n=2)

<b>Formulação</b>	<b>Teor de piperina após 12h (%)</b>	<b>Teor de piperina após 24h (%)</b>	<b>Teor de piperina após 48h (%)</b>
PIP	89,60 $\pm$ 0,06	81,32 $\pm$ 0,13	71,58 $\pm$ 0,24
MP-MP	74,40 $\pm$ 0,23	60,94 $\pm$ 2,33	50,36 $\pm$ 1,75

Fonte: Autor.

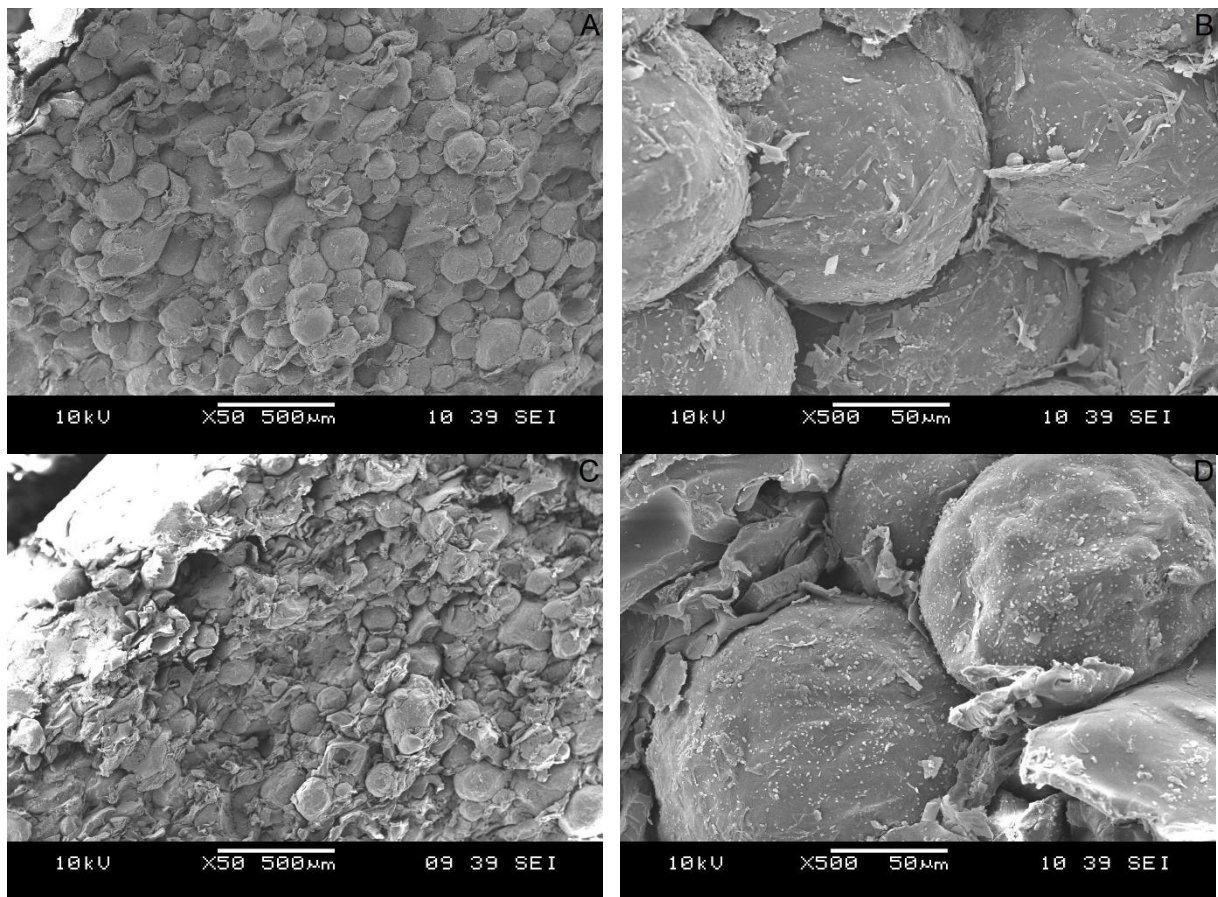
As micropartículas preparadas neste estudo apresentaram boas características de fluxo, o que é de extrema importância quando se objetiva a compressão destas. Devido a esta característica, primeiramente foram preparados comprimidos de 100 mg somente com as micropartículas, com uma concentração teórica de 33 mg e real de 29 mg, e comprimidos com Pullulan<sup>®</sup> como diluente a fim de obter 15 mg de piperina/comprimido. Ambos os comprimidos se apresentaram adequados macroscopicamente, não se apresentando friáveis. Além disso, as micropartículas permaneceram intactas em ambos os comprimidos (figura 4), demonstrando a importância das propriedades de fluxo apresentadas pelas micropartículas e corroborando com o estudo de Ferreira e colaboradores (2015), em que o Pullulan<sup>®</sup> se mostrou superior a outros diluentes comumente empregados na compressão de pós em termos de manutenção da estrutura das micropartículas.

Apesar das características macro e microscópicas do comprimido contendo as micropartículas sem diluente serem adequadas, verificou-se que a dureza dos comprimidos era baixa, em torno de 1 kgf. Portanto, escolheu-se continuar com os comprimidos contendo Pullulan<sup>®</sup>, porém, a dose foi aumentada para 20 mg.

Para o estudo de liberação, diferentes condições foram testadas. A fim de verificar a solubilidade da piperina em tampão PBS pH 7,4 e HCl 0,1 M, com e sem laurilsulfato de sódio (LSS) como tensoativo, uma quantidade em excesso do bioativo foi adicionada em balões com os diferentes meios de dissolução e agitado por 24 h.

Após, a mistura foi centrifugada e foi determinada a concentração de piperina no sobrenadante por cromatografia líquida (MOTTA et al., 2018). Em tampão PBS, a solubilidade da piperina foi de 15  $\mu\text{g/mL}$ ; em tampão contendo 0,25% de LSS, de 38  $\mu\text{g/mL}$  e com 1% de LSS, 100  $\mu\text{g/mL}$ . Em solução de HCl 0,1 M, a solubilidade aumentou para 19  $\mu\text{g/mL}$ ; com 0,25% de LSS, 44  $\mu\text{g/mL}$  e 1% de LSS, 130  $\mu\text{g/mL}$ . Ambos os meios contendo 1% de LSS atenderam à condição *sink*.

Figura 4 – Imagens por microscopia eletrônica de varredura dos comprimidos somente com as micropartículas (MP-PIP) a 50x (A) e 500x (B) e com as micropartículas e Pullulan® a 50x (C) e 500x (D).



Fonte: Autor.

Assim, o meio HCl 0,1 M + 1% LSS foi escolhido para os primeiros testes de liberação por apresentar maior solubilização da piperina. Porém, ao iniciar os ensaios, percebeu-se que o teor de piperina foi diminuindo com o passar do tempo e, portanto,

investigou-se a ação da luz sobre a piperina e as micropartículas. Recipientes contendo o meio de liberação e as amostras foram deixados protegidos da luz e sob a ação da luz. O teor de piperina foi quantificado no início do experimento, após 6, 12 e 24 h. Para a piperina livre e as micropartículas protegidas da luz, o teor de piperina ao final de 24 h foi próximo a 98%. Entretanto, para as amostras expostas à luz, o teor caiu quase que 50%.

Portanto, os ensaios foram realizados com o mínimo de exposição à luz. Um primeiro teste de liberação da piperina a partir do comprimido microparticulado demonstrou um alto controle da liberação. Em 24 h, a liberação de piperina a partir do comprimido sem o promotor de dissolução foi de 4%; com 2% e 4% de polacrilina, os valores obtidos foram 6% e 10%, respectivamente.

A partir deste teste, aumentou-se a concentração de tensoativo no meio de liberação para 2% e o promotor de dissolução, polacrilina potássica, para 6% na preparação dos comprimidos. Como esperado, a condição *sink* continuou sendo mantida e a solubilidade da piperina aumentou ainda mais, para 356 µg/mL. Este estudo preliminar demonstrou uma liberação de 44% de piperina a partir dos comprimidos, após 24 h de estudo.

Desta forma, estabeleceu-se a composição final dos comprimidos: micropartículas em quantidade equivalente a 20 mg de piperina, 6% de polacrilina potássica e q.s.p 100 mg de Pullulan® como diluente. Os comprimidos preparados mostraram-se homogêneos, com peso médio próximo ao teórico; dureza em torno de 3 kgf e teor de 98,4% de piperina.

Observando as imagens de microscopia e comparando os perfis de liberação das micropartículas, foi possível verificar que as micropartículas permaneceram íntegras no comprimido após a compressão. Ao final de 24 h, a liberação de piperina a partir do comprimido microparticulado foi de quase 50%, enquanto que a partir das micropartículas foi de 35%. Este aumento na liberação pode ser devido a polacrilina potássica presente no comprimido, a qual facilita a desintegração do mesmo, promovendo uma melhor molhabilidade da piperina e aumentando sua dissolução no meio (ABD-EL BARY; LOUIS; SAYED, 2014).

Desta forma, este trabalho focou no desenvolvimento tecnológico de micropartículas contendo piperina e, de forma inédita, comprimidos microparticulados contendo tal bioativo. Estes comprimidos constituem um interessante carreador de fármacos, uma vez que o comprimido facilita a administração das micropartículas e,

além disso, quando este se desintegra, as micropartículas íntegras são liberadas, agregando benefícios, como o controle da liberação da piperina. Assim, os comprimidos microparticulados consistem em uma potencial forma farmacêutica de administração da piperina na terapêutica.



## 6 CONCLUSÃO

No presente estudo, primeiramente, foi validada uma metodologia analítica por espectroscopia na região do ultravioleta para quantificar a piperina. Este se mostrou específico, linear, preciso, exato e robusto, sendo de fácil e rápida execução.

Também foram desenvolvidos sistemas microparticulados contendo piperina pelo método de emulsificação-evaporação do solvente O/A a partir do polímero etilcelulose. As micropartículas se mostraram adequadas quanto ao rendimento, tamanho médio e distribuição do tamanho de partículas, eficiência de encapsulamento bem como excelentes propriedades de fluxo. A liberação *in vitro* da piperina a partir das micropartículas demonstrou o controle da liberação da mesma em relação a piperina pura.

A partir das micropartículas, foram preparados comprimidos microparticulados por compressão direta, os quais apresentaram peso médio e teor de piperina próximos aos teóricos, e dureza, espessura e friabilidade adequados. A avaliação da liberação da piperina a partir dos comprimidos revelou a manutenção do controle da liberação do bioativo atribuído às micropartículas e, portanto, com este resultado, juntamente com as imagens de microscopia, foi possível verificar que as micropartículas se mantiveram íntegras após a compressão direta dos pós.



## REFERÊNCIAS

- ABD-EL BARY, A.; LOUIS D.; SAYED, S. Olmesartan medoxomil surface solid dispersion-based orodispersible tablets: formulation and *in vitro* characterization. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 24, p. 665-672, 2014.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**, 5ª ed. Brasília, 2010.
- AHMAD, N; FAZAL, H.; ABBASI, B. H.; FAROOQ, S.; ALI M.; KHAN, M. A. Biological role of *Piper nigrum* L. (Black pepper): A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.2, p.1945-1953, 2012.
- AL-HASHIMI, N.; BEGG, N.; ALANY, R. G.; HASSANIN, H.; ELSHAER, A. Oral Modified Release Multiple-Unit Particulate Systems: Compressed Pellets, Microparticles and Nanoparticles. **Pharmaceutics**, v. 10, p. 176-189, 2018.
- ALLEN, L. V. Jr.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 9 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 716p.
- AREND, T. M. **Desenvolvimento de sistemas microparticulados a partir da blenda Eudragit® L100 e goma gelana para liberação oral do cetoprofeno**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.
- ATAL, C.K.; DUBEY, R.K.; SINGH, J. Biochemical basis of enhanced drug bioavailability by piperine: evidence that piperine is a potent inhibitor of drug metabolism. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.232, n. 1, p.258–262, 1985.
- BABAY, D.; HOFFMAN, A.; BENITA, S. Design and release kinetic pattern evaluation of indomethacin microspheres intended for oral administration. **Biomaterials**, v. 9, p.482-488, 1988.
- BANO, G.; RAINA, R.K.; ZUTSHI U.; BEDI, K.L.; JOHRI, R.K.; SHARMA, S.C. Effect of piperine on bioavailability and pharmacokinetics of propranolol and theophylline in healthy volunteers. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v.41, p.615-617, 1991.
- BANSODE, S. S.; BANARJEE, S. K.; GAIKWAD, D. D.; JADHAV, S. L.; THORAT, R. M. Microencapsulation: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v.1, p.38-43, 2010.
- BASTAKI, M.; AUBANEL, M.; BAUTER, M.; CACHET, T.; DEMYTTENAERE, J.; DIOP, M. M.; HARMAN, C. L.; HAYASHI, S. M.; KRAMMER, G.; LI, X.; LLEWELLYN, C.; MENDES, O.; RENSKERS, K. J.; SCHNABEL, J.; SMITH, B. P. C.; TAYLOR, S. V. Absence of adverse effects following administration of piperine in the diet of Sprague-Dawley rats for 90 days. **Food and Chemical Toxicology**, v. 120 p. 213-221, 2018.



BHAT, B. G.; CHANDRASEKHARA N. Studies on the metabolism of piperine: absorption, tissue distribution and excretion of urinary conjugates in rats. **Toxicology**, v. 40, p.83-92, 1986.

BI, X.; YUAN, Z.; QU, B.; ZHOU, H.; LIU, Z.; XIE, Y. Piperine enhances the bioavailability of silybin via inhibition of efflux transporters BCRP and MRP2. **Phytomedicine**, v. 54, p. 98-108, 2019.

BODDUPALLI, B. M.; RAMANI, R.; SUBRAMANIAM, B.; ANISETTI, R. N. *In vitro* and *in vivo* evaluation of hepato protection and antiulcer activities of piperine gastro retentive microspheres. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p.1237-1240, 2012.

BONEPALLY, C.R.; AUKUNURU, J.; YELLU, N. R.; VANGA, M. R. Fabrication and investigations on hepatoprotective activity of sustained release biodegradable piperine microspheres. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology** v.1, p. 87-96, 2008.

BROWN, D. M. **Drug delivery systems in cancer therapy**. Totowa: Humana Press Inc., 2004. 390 p.

BUTT, M.S.; PASHA, I.; SULTAN, M.T.; RANDHAWA, M.A.; SAEED, F.; AHMED, W. Black pepper and health claims: a comprehensive treatise black pepper and health claims. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 9, p. 37-41, 2013.

CHANG, T. M. S. Semipermeable Microcapsules. **Science**, v. 146, p. 525-526, 1964.

CHONPATHOMPIKUNLERT, P.; WATTANATHORN, J.; MUCHIMAPURA, S., Piperine, the main alkaloid of Thai black pepper, protects against neurodegeneration and cognitive impairment in animal model of cognitive deficit like condition of Alzheimer's disease. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p. 798–802, 2010.

CHOWDARY, K. P. R.; SRINIVASA, Y. Mucoadhesive Microspheres for Controlled Drug Delivery. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, p.1717-1724, 2004.

DALVI, R. R.; DALVI P. S. Differences in the effects of piperine and piperonylbutoxide on hepatic drug-metabolizing enzyme system in rats. **Drug and Chemical Toxicology**, v.14, p.219-229, 1991.

DESSIRIER, J. NGUYEN, N.; SIEFFERMANN, J.; CARSTENS, E.; O'MAHONY, M. Oral irritant properties of piperine and nicotine: psychophysical evidence for asymmetrical desensitization effects. **Chemical Senses**, v. 24, p. 405-413, 1999.

DEY, N. S.; MAJUMDAR, S.; RAO, M. E. B. Multiparticulate Drug Delivery Systems for Controlled Release. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, p. 1067-1075, 2008.

DI, X.; WANG, X.; DI, X.; LIU Y. Effect of piperine on the bioavailability and pharmacokinetics of emodin in rats. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.115, p.144–149, 2015.

DOUCETTE, C. D.; HILCHIE, A. L.; LIWSKI, R.; HOSKIN D. W. Piperine, a dietary phytochemical, inhibits angiogenesis. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.24 p.231-239, 2013.

FERREIRA, L. M.; VELASQUEZ, A. A.; SCHAFFAZICK, S. R.; CRUZ L. Pullulan: an advantageous natural polysaccharide excipient to formulate tablets of alendronate-loaded microparticles. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 1, jan./mar., 2015.

FREITAS, S.; MERKLE, H. P.; GANDER, B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. **Journal of Controlled Release**, v. 102, p. 313-332, 2005.

FRIEDMAN, M.; LEVIN, C. E.; LEE, S. U.; LEE, J. S.; OHNISI-KAMEYAMA, M.; KOZUKUE, N. Analysis by HPLC and LC/MS of pungent piperamides in commercial black, white, green, and red whole and ground peppercorns. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 56, n.9, p. 3028-3036, 2008.

GAD, S. C. **Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes**. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc, 2008. 1384p.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. **Food Research International**, v.40, p.1107–1121, 2007.

GHOSH, S. K. **Functional coatings**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 2006. 357p.

GREENSHIELDS, A. L.; DOUCETTE, C. D.; SUTTON, K. M.; MADERA, L.; ANNAN, H.; YAFFE, P. B.; KNICKLE, A. F.; DONG, Z.; HOSKIN, D. W. Piperine inhibits the growth and motility of triple-negative breast cancer cells. **Cancer Letters**, v.357, p.129-140, 2015.

GUPTA, H.; BHANDARI, D.; SHARMA, A. Recent Trends in Oral Drug Delivery: a Review. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 3, p.162-173, 2009.

HASNAIN, M. S.; AHMED, S. A.; BEG, S.; ANSARI, M. T.; NAYAK, A. K. 'Quality by Design' Approach for Development of Multiparticulate Drug Delivery Systems. **Pharmaceutical Quality by Design**, 2019.

HENG, P. W. S.; CHAN, L. W.; LIEW, C. V.; NG, T. Y. Effect of tableting compaction pressure on alginate microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 17, n. 5, p. 553-564, 2000.

ISSA, M. G.; SOUZA, N. V.; DUQUE, M. D. FERRAZ, H. G. Physical characterization of multiparticulate systems. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 53, p.1-19, 2017.

JOHNSON, J. J.; NIHAL, M.; SIDDIQUI, I. A.; SCARLETT, C. O.; BAILEY, H. H.; MUKHTAR H.; AHMAD, N. Enhancing the bioavailability of resveratrol by combining it with piperine. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.55, p.1169–1176, 2011.

JØRGENSEN, K.; CHRISTENSEN, F. N.; JACOBSEN, L. Dissolution stability of multiparticulate controlled release tablets. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 153, p. 1-11, 1997.

JYOTHI, N. V. N.; PRASANNA, P. M.; SAKARKAR, S. N.; PRABHA, K. S.; RAMAIAH, P. S.; SRAWAN, G. Y. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. **Journal of Microencapsulation**, v. 27, n. 3, p. 187–197, 2010.

KAWASHIMA, Y.; NIWA, T.; TAKEUCHI, H.; HINO, T.; ITOH, Y. Hollow Microspheres for Use as a Floating Controlled Drug Delivery System in the Stomach. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 81, n. 2, p. 135-140, 1992.

KHAJURIA, A.; ZUTSHI, U.; BEDI, K.L. Permeability characteristics of piperine on oral absorption - an active alkaloid from peppers & a bioavailability enhancer. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.36, p.46–50, 1998.

KOO, O. M. Y. **Pharmaceutical excipients**: properties, functionality, and applications in research and industry. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc, 2017. 352p.

KOZUKUE, N.; PARK, M.; CHOI, S.; LEE, S.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; LEVIN, C. E.; FRIEDMAN, M. Kinetics of Light-Induced Cis-Trans Isomerization of Four Piperines and Their Levels in Ground Black Peppers as Determined by HPLC and LC/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 7131-7139, 2007.

KRISHNAIAH, Y. S. R. Pharmaceutical Technologies for Enhancing Oral Bioavailability of Poorly Soluble Drugs. **Journal of Bioequivalence & Bioavailability**, v. 2, n. 2, p. 28-36, 2010.

KRISHNAKANTHA, T. P.; LOKESH, B. R. Scavenging of superoxide anions by spice principles. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 30, p.133-134, 1993.

KUMAR, M. N. V. R. Nano and Microparticles as Controlled Drug Delivery Devices. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n.2, p. 234-258, 2000.

LAM, P. L.; GAMBARI, R. Advanced progress of microencapsulation technologies: in vivo and *in vitro* models for studying oral and transdermal drug deliveries. **Journal of Controlled Release**, v.178 v.25-45, 2014.

LETURIA, M.; BENALI, M.; LAGARDE, S.; RONGA, I.; SALEHA, K. Characterization of flow properties of cohesive powders: A comparative study of traditional and new testing methods. **Powder Technology**, v. 253 p. 406-423, 2014.

MATTIAZZI, J. **Desenvolvimento e avaliação biológica de sistemas nano- e microparticulados contendo 3,3'-diindolmetano**. 2019. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2019.

MCNAMARA, F. N.; RANDALL, A.; GUNTHORPE, M. J. Effects of piperine, the pungent component of black pepper, at the human vanilloid receptor (TRPV1). **British Journal of Pharmacology**, v. 144, p. 781-790, 2005.

MORALES, M. E.; RUIZ, M. A.; LÓPEZ, G.; GALLARDO, V. Development of oral suspensions of microparticles of ethylcellulose with tramadol. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 36, p. 885-892, 2010.

MOTTA, M. H. **Desenvolvimento de formulações nanotecnológicas baseadas na associação de piperina a carreadores nanoestruturados**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

MOTTA, M. H.; SCHNEIDER, A. C.; CODEVILLA, C. F.; MENEZES, C. R.; SILVA, C. B. Analytical method by liquid chromatography to assay piperine associated in nanoemulsions. **Drug Analytical Research**, v.2, p. 1-7, 2018.

MURTAZA, G. Ethylcellulose microparticles: a review. **Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research**, v. 69, p. 11-22, 2012.

MURTHY, C.T.; BHATTACHARYA, S. Cryogenic grinding of black pepper. **Journal of Food Engineering**, v. 85, n. 1, p. 18-28, 2008.

MUSENGA, A.; MANDRIOLI, R.; FERRANTI, A.; D'ORAZIO, G.; FANALI, S.; RAGGI, M.A. Analysis of aromatic and terpenic constituents of pepper extracts by capillary electrochromatography. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 4, p. 612-619, 2007.

O'DONNELL, P. B.; MCGINITY, J. W. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 28, p. 25-42, 1997.

O'NEIL, M. J. The Merck Index. 14 ed. Nova Jérsei: Merck & Co., Inc, 2006.  
PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. M. D.; PRASAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E.; BOLL, P. M. Phytochemistry of the genus piper. **Phytochemistry**, v.46, p.591-673, 1997.

PENGPONG, T.; SANGVANICH, P.; SIRILERTMUKUL, K.; MUANGSIN, N. Design, synthesis and *in vitro* evaluation of mucoadhesive p-coumarate-thiolated-chitosan as a hydrophobic drug carriers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, p. 487-497, 2014.

PI, C.; YUAN, J.; LIU, H.; ZUO, Y.; FENG, T.; ZHAN, C.; WU, J.; YE, Y.; ZHAO, L.; WEI, Y. *In vitro* and *in vivo* evaluation of curcumin loaded hollow microspheres prepared with ethyl cellulose and citric acid. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 15, p. 1046-1054, 2018.

PINTO, J. F. Site-specific drug delivery systems within the gastro-intestinal tract: from the mouth to the colon. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, p. 44-52, 2010.

RAVINDRAN, P. N.; KALLUPURACKAL, J. A. Black pepper. **Handbook of Herbs and Spices**, p. 62-110, 2001.

RENTMEISTER-BRYANT, H.; GREEN, B. G. Perceived Irritation during Ingestion of Capsaicin or Piperine: Comparison of Trigeminal and Non-trigeminal Areas, **Chemical Senses**, v. 22, p. 257-266, 1997.

ROGERS, T. L.; WALLICK, D. Reviewing the use of ethylcellulose, methylcellulose and hypromellose in microencapsulation. Part 1: materials used to formulate microcapsules. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 38 p. 129-157, 2012.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. Handbook of pharmaceutical excipients. **Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association**, 6 ed., 2009.

SABINA, E. P.; NAGAR, S.; RASOOL, M.. A role of piperine on monosodium urate crystal-induced inflammation - An experimental model of gouty arthritis. **Inflammation**, v. 34, p. 184-192, 2011.

SAHU, P.; BHATT, A.; CHAURASIA, A.; GAJBHIYE, V. Enhanced Hepatoprotective activity of Piperine Loaded Chitosan Microspheres. **International Journal of Drug Development & Research**, v. 4, n. 4, p. 229-233, 2012.

SAMYKUTTY A.; SHETTY A. V.; DAKSHINAMOORTHY G.; BARTIK M. M.; JOHNSON G. L.; WEBB B.; ZHENG G.; CHEN A.; KALYANASUNDARAM R.; MUNIRATHINAM G. Piperine, a Bioactive Component of Pepper Spice Exerts Therapeutic Effects on Androgen Dependent and Androgen Independent Prostate Cancer Cells. **PloS One**, v. 8, n. 6, e65889, 2013.

SHAIKH, J.; BHOSALE, R.; SINGHAL R. Microencapsulation of black pepper oleoresin. **Food Chemistry**, v. 94, v. 105–110, 2006.

SHITYAKOV, S.; BIGDELIAN, E.; HUSSEIN, A. A.; HUSSAIN, M. B.; TRIPATHI, Y.C.; KHAN, M. U; SHARIATI, M.A. Phytochemical and pharmacological attributes of piperine: A bioactive ingredient of black pepper. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 176, p. 149-161, 2019.

SHOBA, G.; JOY, D.; JOSEPH, T.; MAJEED, M.; RAJENDRAN, R., SRINIVAS, P. S. S. R. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. **Planta Medica**, v.64, p. 353-356, 1998.

SRINIVASAN K. Black pepper and its pungent principle-piperine: A review of diverse physiological effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.47, p.735-748, 2007.

SURESH, D.; SRINIVASAN, K. Tissue distribution & elimination of capsaicin, piperine & curcumin following oral intake in rats. **Indian Journal of Medical Research**, v. 131, p. 682-691, 2010.

UMAR S.; SARWAR A. H. M. G.; UMAR K.; AHMAD N.; SAJAD M.; AHMAD S.; KATIYAR C. K.; KHAN H.A. Piperine ameliorates oxidative stress, inflammation and histological outcome in collagen induced arthritis. **Cellular Immunology**, v. 284, p. 51–59, 2013.

WENING, K. BREITKREUTZ, J. Oral drug delivery in personalized medicine: Unmet needs and novel approaches. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 404, p. 1-9, 2011.

YAFFE, P. B.; COOMBS, M. R. P.; DOUCETTE, C. D. WALSH, M.; HOSKIN, D. W. Piperine, an alkaloid from black pepper, inhibits growth of human colon cancer cells via G1 arrest and apoptosis triggered by endoplasmic reticulum stress. **Molecular Carcinogenesis**, v. 54, p. 1070-1085, 2015.

ZACHARIAH, T. J.; SAFEER, A. L.; JAYARAJAN, K.; LEELA, N. K.; VIPIN, T. M.; SAJI, K. V.; SHIVA, K. N.; PARTHASARATHY, V. A.; MAMMOOTTY, K. P. Correlation of metabolites in the leaf and berries of selected black pepper varieties. **Scientia Horticulturae**, v. 123, p. 418-422, 2010.