



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM FÁRMACOS – FARMANGUINHOS

Gabrielle Pereira das Neves

**Obtenção, purificação e estudos de viabilidade tecnológica de frações de
oleorresinas de espécies da família Burseraceae contendo triterpenos
pentacíclicos**

Rio de Janeiro

2018

Gabrielle Pereira das Neves

Obtenção, purificação e estudos de viabilidade tecnológica de frações de oleorresinas de espécies da família Burseraceae contendo triterpenos pentacíclicos

Dissertação submetida ao corpo docente do Curso de Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, de Farmanguinhos da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Siani

2^a Orientadora: Prof.^a Dr.^a Mônica F. de S. Ramos

Rio de Janeiro

2018

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Medicamentos e Fitoterápicos/ Farmanguinhos / FIOCRUZ - RJ

N 511o Neves, Gabrielle Pereira das

Obtenção, purificação e estudos de viabilidade tecnológica de frações de oleorresinas de espécies da família Burseraceae contendo triterpenos pentacíclicos. / Gabrielle Pereira das Neves. – Rio de Janeiro, 2018.

xxiii, 108 f. : il. ; 30 cm.

Orientadores: Antonio Carlos Siani e Mônica F. de S. Ramos

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Fármacos - Farmanguinhos, Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, 2018.

Bibliografia: f. 98-108

1. Protium. 2. Separação. 3. Amirina. 4. Solubilidade. 5. Carreador Lipídico Nanoestruturado. I. Título.

CDD 615.1

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese/dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Gabrielle Pereira das Neves

Obtenção, purificação e estudos de viabilidade tecnológica de frações de oleorresinas de espécies da família Burseraceae contendo triterpenos pentacíclicos

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos – Fundação Oswaldo Cruz.

Aprovada em 26 de Fevereiro de 2018.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Antonio Carlos Siani
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ (orientador)

Prof^a. Dr^a. Mônica Freiman de Souza Ramos
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ (2^o orientador)

Prof. Dr. Helvécio Vinícius Antunes Rocha
(Instituto de Tecnologia em Fármacos– FIOCRUZ)

Prof. Dr. Marcelo Raul Romero Tappin
(Instituto de Tecnologia em Fármacos– FIOCRUZ)

Prof^a. Dr^a. Naomi Kato Simas
(Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ)

Rio de Janeiro

2018

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Wagner e Eliane, que são a minha base, pelo incentivo e apoio em todas as horas. Desejo poder ter sido merecedora do esforço dedicado por vocês em todos os aspectos, especialmente quanto à minha formação profissional.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me iluminar nas horas difíceis e por toda a proteção durante essa jornada.

Aos meus pais, Eliane e Wagner, pelo exemplo, amor, paciência e apoio em todos os momentos até aqui. Sendo minhas inspirações e motivações para continuar a jornada.

À minha família, pelo apoio incondicional e pela compreensão de minha ausência em muitas comemorações e reuniões.

Aos meus orientadores, Dr. Antonio Carlos Siani e Dr^a. Mônica F. de S. Ramos, pela confiança, apoio, dedicação, aprendizado e orientação para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. José Luiz Mazzei pela ajuda inestimável na realização das análises e discussão de resultados.

Aos amigos Marcos Jun, Elizete Lima, João Tostes e Ariane Vaucher pelas horas de dedicação; sem a ajuda de vocês esse trabalho não seria possível.

Ao Serviço de Métodos Analíticos (SMA), ao Laboratório de Micro e Nanotecnologia (LMN) e ao Laboratório de Estudos do Estado Sólido (LEES) de Farmanguinhos/FIOCRUZ pela disponibilidade de utilização de equipamentos e colaboração na realização de análises.

À minha turma de mestrado. Foi um prazer conhecê-los e poder dividir este período com vocês. Em especial, ao Victor e Paula, pelo companheirismo e amizade nestes dois anos.

Aos Funcionários do Departamento de Pesquisa em Produtos Naturais de Farmanguinhos/FIOCRUZ por toda a ajuda na realização deste trabalho.

“Sempre faço o que não consigo fazer
para aprender o que não sei.”

(PABLO PICASSO)

RESUMO

NEVES, Gabrielle Pereira. *Obtenção, purificação e estudos de viabilidade tecnológica de frações de oleorresinas de espécies da família Burseraceae contendo triterpenos pentacíclicos*. 2018. 132f. Dissertação Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017.

A oleorresina extraída do tronco de espécies de *Protium* (Burseraceae), gênero com grande concentração na região Amazônica, é constituída por percentuais variáveis de monoterpenos (fração volátil) e triterpenos pentacíclicos (fração não volátil). Dentre os triterpenos, destacam-se os isômeros α -amirina e β -amirina, principais responsáveis pelas atividades farmacológicas relevantes descritas para este gênero. Estas substâncias apresentam baixa solubilidade em meio aquoso e solventes polares, sendo esta propriedade um desafio para o desenvolvimento de produtos medicamentosos com base naquelas. Neste contexto, a incorporação dos mesmos em carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) é uma alternativa para incrementar a solubilidade e facilitar a veiculação dessas moléculas em sistemas fisiológicos. No presente trabalho, primeiramente, realizou-se a pulverização da oleorresina, sendo obtido um pó homogêneo com granulometria inferior a 32 mesh (OBP, faixa de fusão 100-120 °C, umidade 1,75% e teores de 16,8% em α -amirina e 8,14% em β -amirina). OBP foi submetida à purificação em coluna cromatográfica aberta, empregando-se independentemente duas fases estacionárias, sendo o processo monitorado por cromatografia em camada delgada (CCD) e densitometria quanto à presença dos isômeros de amirinas. Nove experimentos utilizando gel de sílica e eluídos com misturas de *n*-hexano e AcOEt foram realizados para otimizar as condições visando uma transposição de escala e acúmulo de material. Com o mesmo objetivo a coluna em Sephadex LH-20 foi eluída com EtOH, num total de 12 experimentos. As frações similares em CCD, contendo os triterpenos-alvo, foram reunidas para gerar os lotes únicos, então codificados, respectivamente, como LTU-Si (57,60 g, faixa de fusão 150-155 °C, umidade 2,8% e teores de 41,37% em α -amirina e 22,73% em β -amirina) e LTU-Se (60,60 g, faixa de fusão 85-114 °C, umidade 1,75% e teores de 16,46% em α -amirina e 8,74% em β -amirina). LTU-Si apresentou faixa de fusão estreita e maiores teores dos isômeros de amirina, sendo destinado aos estudos de avaliação da viabilidade de incorporação em CLN. Daí, as solubilidades de LTU-Si nos lipídios líquidos (miristato de isopropila, MI; ácido oleico, AO) e lipídios sólidos (monoestearato de glicerila, MG; Compritol, COMP) foram estimadas tanto *in silico*, pelos parâmetros de solubilidade de Hansen (PSH), quanto experimentalmente, por CCD e densitometria. Os PSH a 25 °C para os isômeros de amirina e lipídios resultaram na seguinte ordem de solubilidade: MG >> AO > COMP > MI. Os ensaios experimentais de solubilidade, por densitometria, resultaram a 80°C em: MG = MI > AO > COMP. Os CLN contendo LTU-Si e controles-branco foram obtidos por microemulsificação a quente com a fase lipídica, constituída pelas combinações dos lipídios MI:MG, MI:COMP e AO:MG nas proporções 2:3, 1:1 e 3:2; e a fase aquosa contendo pares de tensoativos em concentrações baseadas nos valores de equilíbrio hidrófilo-lipófilo requerido pelas fases lipídicas. Estes foram caracterizados quanto à estabilidade do aspecto macroscópico, pH, tamanho de partícula (TP), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ). O CLN₃ (MI:COMP 3:2) foi o que apresentou maior estabilidade físico-química, quanto ao aspecto macroscópico, faixa de pH 7,0-7,65, TP de 250 nm, PDI de 0,3 e PZ de -30 mV, durante o período de avaliação.

Palavras-chave: *Protium*. Separação. Amirina. Solubilidade. Carreador lipídico nanoestruturado.

ABSTRACT

The oleoresin extracted from the trunk of *Protium* species (Burseraceae), a genus with great concentration in the Amazon region, consists of variable percentages of monoterpenes (volatile fraction) and pentacyclic triterpenes (non-volatile fraction). Among the triterpenes, the α -amyrin and β -amyrin isomers are the main responsible for the relevant pharmacological activities described for this genus. These substances have low solubility in aqueous media and polar solvents, being this property a challenge for the development of pharmaceutical products based on them. In this context, their incorporation in nanostructured lipid carriers (NLC) is an alternative to increase the solubility and facilitate the transport in physiological systems. In the present study, the oleoresin was powdered to particle size below 32 mesh (OBP, melting range 100-120 °C, 1.75% humidity, containing 16.8% α -amyrin and 8.14% β -amyrin). OBP was independently purified by open-column chromatography using two stationary phases and the process was monitored by thin layer chromatography (TLC) and densitometry for the presence of amyirin isomers. Nine experiments using silica gel and eluted with mixtures of *n*-hexane and AcOEt were performed to optimize the conditions for scaling up the process and accumulating material. For the same purpose, the Sephadex LH-20 column was eluted with EtOH, in a total of 12 experiments. TLC-similar fractions containing the target triterpenes were pooled to generate the single batches, then labeled as LTU-Si (57.60 g, melting range 150-155 °C, 2.8% humidity, containing 41.37% α -amyrin and 22.73% β -amyrin) and LTU-Se (60.60 g, melting range 85-114 °C, 1.75% humidity, containing 16.46% α -amyrin and 8.74% β -amyrin), respectively. LTU-Si showed a narrow melting range and higher levels of amyirin isomers, and was chosen to perform studies on their viability to be incorporated into NLC. Thus, solubility of LTU-Si in liquid lipids (isopropyl myristate, MI; oleic acid, AO) and solid lipids (glyceryl monostearate, MG; Compritol, COMP) were estimated *in silico* by the Hansen solubility parameters (HSP) as well as experimentally, by TLC and densitometry. The HSP at 25 °C for amyirin isomers in lipid resulted in the following order of solubility: MG >> AO > COMP > MI. Experimental solubility tests, by densitometry, resulted at 80°C in: MG = MI > AO > COMP. The NLC containing LTU-Si or blanks were obtained by hot microemulsification, in which the lipid phase consisted of the mixed lipids: MI:MG, MI:COMP and AO:MG at proportions of 2:3, 1:1 and 3:2, whereas and the aqueous phase contained pairs of surfactants at concentrations based on the hydrophilic-lipophilic balance required by the lipid phases. These NLC stability was characterize33d macroscopically and by measuring pH, particle size (PS), polydispersity index (PDI) and zeta potential (ZP). The CLN₃ (MI:COMP 3:2) showed the highest physicochemical stability without changing the macroscopic feature, and presented pH range 7.0-7.65, TP 250 nm, PDI 0.3 and ZP -30 mV in the span of 28 days.

Key-words: *Protium*. Separation. Amyrin. Solubility. Nanostructured Lipid Carrier.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Árvores de <i>Protium heptaphyllum</i> em restinga da Mata Atlântica (RJ).....	5
Figura 2: Folhas de árvores de <i>Protium heptaphyllum</i> em restinga da Mata Atlântica (RJ).	5
Figura 3: Esquema metodológico das principais etapas envolvidas no presente estudo.....	27
Figura 4: Coluna Cromatográfica com Vácuo (CCV) (“coluna filtrante”) para fracionar e purificar OBP.	29
Figura 5: Oleorresina bruta (breu).....	42
Figura 6: (a) Oleorresina bruta (breu) após fragmentação inicial. (b) Fragmentos amarelo-palha evidenciados (círculo à esquerda) e impurezas provenientes de galhos e tronco do vegetal (círculo à direita).	42
Figura 7: Oleorresina breu pré-processada (pulverizada) (OBP).....	43
Figura 8: CCD das frações recolhidas do experimento de fracionamento e purificação em coluna com gel de sílica Si-I (F1-F8); A= amirinas-referência; OBP= oleorresina de breu processada. Placas de gel de sílica de fase normal. Eluente: 2% de metanol em clorofórmio. Revelador: solução metanólica de anisaldeído sulfúrico, luz visível.....	46
Figura 9: CCD das frações recolhidas do experimento de fracionamento e purificação em coluna com gel de sílica Si-II (F9-F17); A= amirinas-referência; OBP= oleorresina de breu processada. Placas de gel de sílica de fase normal. Eluente: 2% de metanol em clorofórmio. Revelador: solução metanólica de anisaldeído sulfúrico, luz visível.....	47
Figura 10: CCD das frações recolhidas do experimento de fracionamento e purificação em coluna com gel de sílica Si-III (F18-F27); A= amirinas-referência; OBP= oleorresina de breu processada. Placas de gel de sílica de fase normal. Eluente: 2% de metanol em clorofórmio. Revelador: solução metanólica de anisaldeído sulfúrico, luz visível.....	48
Figura 11: CCD das frações recolhidas do experimento de fracionamento e purificação em coluna com gel de sílica Si-III (F28-F37); A= amirinas-referência; OBP= oleorresina de breu processada. Placas de gel de sílica de fase normal. Eluente: 2% de metanol em clorofórmio. Revelador: solução metanólica de anisaldeído sulfúrico, luz visível.....	50
Figura 12: Cromatografia em Camada Delgada em gel de sílica de fase normal das frações recolhidas do experimento de fracionamento e purificação em Sephadex Se-I (F38-F43); OBP = oleorresina de breu processada; A= amirinas-referência. Eluição: 2% de metanol em clorofórmio. Revelação: solução metanólica de anisaldeído sulfúrico, em luz visível.	51
Figura 13: Cromatografia em Camada Delgada em gel de sílica de fase normal das frações recolhidas do experimento de fracionamento e purificação em Sephadex Se-III (F51-F61);	

OBP = oleorresina de breu processada; A= amirinas-referência. Eluição: 2% de metanol em clorofórmio. Revelação: solução metanólica de anisaldeído sulfúrico, em luz visível.	52
Figura 14: Cromatografia em camada delgada em gel de sílica de fase normal das frações de interesse recolhidas dos 10 experimentos realizados de fracionamento e purificação em coluna de sílica (Si-II a Si-X); A = amirinas-referência; OBP = oleorresina de breu processada. Eluição: 2% de metanol em clorofórmio. Revelação: solução metanólica de anisaldeído, em luz visível.....	53
Figura 15: Cromatografia em camada delgada em gel de sílica de fase normal das frações de interesse recolhidas dos 12 experimentos realizados de fracionamento e purificação em coluna de Sephadex (Se-I a Se-XII); A = amirinas-referência; A = amirinas-referência; OBP = oleorresina de breu processada. Eluição: 2% de metanol em clorofórmio. Revelação: solução metanólica de anisaldeído sulfúrico, em luz visível.....	53
Figura 16: Ampliação do cromatograma da literatura obtido da análise de breu comercial em CG-DIC utilizando a coluna HP-5.	55
Figura 17: Ampliação do cromatograma da amostra OBP na coluna HP-5 obtido por CG-DIC nas condições de Siani et al., 2012.	55
Figura 18: Ampliações dos cromatogramas da amostra OBP nas colunas (A) HP-35 (35% de difenilpolisiloxano), (B) HP-1701 (14% cianopropilfenilmetilpolisiloxano), (C) HP-17HT (50% fenil; 50% metilpolisiloxano) e (D) HP-INNOWAX (polietilenoglicol).....	56
Figura 19: Aspecto macroscópico obtido para o (a) LTU-Si e (b) LTU-Se.	60
Figura 20: Espectro de infravermelho de OBP, LTU-Si, LTU-Se e Amirina (A).	61
Figura 21: Ampliação do cromatograma obtido por CG-EM (70 eV) da amostra OBP, analisado em coluna HP-17 HT. Numeração de acordo com ordem de eluição.....	62
Figura 22: Ampliações dos espectros de massas (70 eV) para os sinais (1) = β -amirenona, (2) = β -amirina, (3) = α -amirenona, (4) = α -amirina e (5) = lupeol.....	64
Figura 23: Cromatograma do LTU-Si obtido por CG-EM em coluna DB-17HT.....	67
Figura 24: Cromatograma do LTU-Se obtido por CG-EM em coluna DB-17HT.	67
Figura 25: Cromatografia em camada delgada em gel de sílica de fase normal dos lipídios MG, COMP, AO e MI separadamente (0,1- 0,7 mg/mL) e destes a 1 mg/mL adicionados de solução de “A” (0,4 mg/ mL). Eluição: 2% de metanol em clorofórmio. Revelação: solução metanólica de anisaldeído sulfúrico, em luz visível.	75
Figura 26: Aspecto do (a) CLN1_BCO e (b) CLN1 recém-preparados, estáveis.....	79
Figura 27: Exemplo de alterações macroscópicas observadas nos CLN (CLN4).....	80

Figura 28: Acompanhamento do tamanho de partícula (nm) e índice de polidispersão (PDI) médios dos CLN preparados com a fase lipídica MI:MG em diferentes proporções durante 28 dias (CLN1- CLN4).	83
Figura 29: Acompanhamento do Tamanho de Partícula (nm) e Índice de Polidispersão (PDI) médios dos CLN preparados com a fase lipídica MI:COMP em diferentes proporções ao longo de 28 dias (CLN5- CLN6).....	86
Figura 30: Acompanhamento do Tamanho de Partícula (nm) e Índice de Polidispersão (PDI) médios dos CLN preparados com a fase lipídica AO:MG em diferentes proporções ao longo de 28 dias (CLN7- CLN9).....	88
Figura 31: Curvas de DSC do lote único gel de sílica (LTU-Si) e lote único Sephadex (LTU-Se).....	90
Figura 32: Curvas de TGA do lote único gel de sílica (LTU-Si) e lote único Sephadex (LTU-Se).....	91
Figura 33: Curvas de DSC dos lipídios monoestearato de glicerila (MG) e Compritol (COMP).....	92
Figura 34: Curvas de TGA dos lipídios monoestearato de glicerila (MG) e Compritol (COMP).....	92
Figura 35: Curvas de DSC das misturas físicas dos excipientes no preparo dos CLN ₃ e CLN ₃ _BCO.	93
Figura 36: Curvas de DSC das misturas físicas dos excipientes empregados no preparo dos CLN ₃ e CLN ₃ _BCO.	93

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Curva analítica obtida pela análise em triplicata de soluções com 8 concentrações diferentes de colesterol em CG-DIC (coluna DB-17HT).....	58
Gráfico 2: Gráfico de resíduos obtido pela análise em quadruplicata de diferentes concentrações do colesterol em CG-DIC.	58
Gráfico 3: Curva analítica obtida pela análise de concentrações diferentes de LTU-Si em densitometria pelo <i>software</i> ImageJ.	73
Gráfico 4: Valores médios de pH obtidos das triplicatas de CLN com LTU-Si e controles-branco nos tempos de 1º e no 28º dia após preparo, exceto para os CLN4 a CLN6 que foram estáveis até 7º dia.....	81

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Estruturas básicas dos três grandes grupos de triterpenos pentacíclicos.....	7
Quadro 2: Principais triterpenos encontrados na fração de breu não volátil e suas respectivas variações quantitativas no perfil químico.....	8
Quadro 3: Proposta de fragmentação da α -amirina, β -amirina, α -amirenona e β -amirenona ressaltando os fragmentos derivados da reação Retro-Diels-Alder.....	65
Quadro 4: Proposta de fragmentação do lupeol, ressaltando os fragmentos derivados principais.....	66
Quadro 5: Estrutura molecular dos lipídios e tensoativos utilizados no desenvolvimento dos CLN contendo amirina	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Técnicas empregadas na extração e separação de triterpenos de resinas de espécies de Burseraceae (continua)	12
Tabela 1: Técnicas empregadas na extração e separação de triterpenos de resina de espécies de Burseraceae (continuação)	13
Tabela 1: Técnicas empregadas na extração e separação de triterpenos de resina de espécies de Burseraceae (conclusão).....	14
Tabela 2: Experimentos realizados e seus respectivos sistemas de eluição para o fracionamento e purificação de OBP em gel de sílica.....	30
Tabela 3: Experimentos realizados e seus respectivos sistemas de eluição para o fracionamento e purificação de OBP em Sephadex LH-20.....	31
Tabela 4: Colunas cromatográficas com as respectivas dimensões, composições químicas e programações de temperaturas do forno empregadas para a otimização da metodologia em CG-DIC.	32
Tabela 5: Matriz combinatória contendo a proporção de lipídios e tensoativos testadas para a obtenção de CLN controles-branco e com LTU-Si (continua).....	39
Tabela 5: Matriz combinatória contendo a proporção de lipídios e tensoativos testadas para a obtenção de CLN controles-branco e com LTU-Si (conclusão).	40
Tabela 6: Rendimentos das frações após coluna em gel de sílica e teor relativo de amirinas determinado por análise densitométrica (continua).....	44
Tabela 6: Rendimentos das frações após coluna em gel de sílica e teor relativo de amirinas determinado por análise densitométrica (conclusão).	45
Tabela 7: Parâmetros utilizados no escalonamento da CCV em gel de sílica.	49
Tabela 8: Avaliação de precisão intrradia do método de CG-DIC.....	59
Rep = Replicatas realizadas; CV = Coeficiente de variação.	59
Tabela 9: Principais constituintes de OBP, LTU-Si, LTU-Se e amirina referência (A) com respectivos teores quantificados em CG-DIC usando padrão externo.	69
Tabela 10: Parâmetros de solubilidade de Hansen parciais, totais e estimativa da diferença mínima entre os solventes, lipídios, tensoativos e da amirina $((\Delta\delta T)^2)$	71
Tabela 11: Avaliação de precisão em nível de repetibilidade do método de CCD acoplada à análise densitométrica digital (<i>software</i> ImageJ).	74
Tabela 12: Avaliação de exatidão do método de CCD acoplada à análise densitométrica digital (<i>software</i> ImageJ).....	76

Tabela 13: Estimativa de solubilidade dos isômeros de amirina nosm lipídios pelo método de CCD acoplada à análise densitométrica (<i>software</i> ImageJ).	76
Tabela 14: Acompanhamento do aspecto macroscópico dos CNL controles-branco e com LTU-Si.....	79
Tabela 15: Coeficientes angulares da regressão e significância relacionados às variáveis estudadas para a combinação lipídica MI:MG.	84
Tabela 16: Coeficientes angulares da regressão e significância relacionados às variáveis estudadas para a combinação lipídica MI:COMP.	87
Tabela 17: Coeficientes angulares da regressão e significância relacionados às variáveis estudadas para a combinação lipídica AO:MG.	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	- Acetato de etila
AcOH	- Ácido acético
A	- Amirina
ANOVA	- Análise de variância
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AO	- Ácido oleico
ATR	- Acessório de reflectância atenuada
AVIVE	- Associação vida verde da Amazônia
BCO	- Amostra branco
C ₁₈	- 18 Carbonos
C-19	- Posição no carbono 19
C-20	- Posição no carbono 20
C-30	- Posição no carbono 30
CC	- Cromatografia em coluna
CCD	- Cromatografia em camada delgada (em inglês, <i>Thin Layer Chromatography</i> - TLC)
CG	- Cromatografia de fase gasosa (em inglês, <i>Gas Chromatography</i> - GC)
CG-DIC	- Cromatografia de fase gasosa acoplado ao detector de ionização em chama (em inglês, <i>Gas Chromatography coupled to Flame Ionization Detector</i> - GC-FID)
CG-EM	- Cromatografia de fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (em inglês, <i>Gas chromatography coupled to mass detector</i> - GC-MS)
CH ₂ Cl ₂	- Diclorometano
CHCl ₃	- Clorofórmio
Cis ou trans	- Estereoquímica
CL ₅₀	- Concentração letal média
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência (em inglês, <i>High performance liquid chromatography</i> - HPLC)
CLF	- Conjugado Lipídio-Fármaco
CLN(s)	- Carreador(es) Lipídico(s) Nanoestruturado(s) (em inglês, <i>nanostructured lipid carrier</i> - NLC)
CLN_BCO	- Controles - brancos preparados dos CLN _{1 a 9}

CLN _{1 a 9}	- Carreadores lipídicos nanoestruturados preparados de 1 a 9
COMP	- Comprimido 888 ATO
CONAMA	- Conselho Nacional do Meio Ambiente.
CV	- Coeficiente de variação
D/E ou E/D	- Classificação dos anéis de carbono na cadeia carbônica
DPR	- Desvio padrão relativo
DSC	- Calorimetria diferencial exploratória
EHL	- Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
EtOH	- Etanol
Et ₂ O	- Éter etílico
F1 a F37	- Frações obtidas nos experimentos em gel de sílica 1 a 37
F38 a F82	- Frações obtidas nos experimentos em gel de sílica 38 ate 82
FA	- Fase móvel A
FAR	- Farmanguinhos
FB	- Fase móvel B
FDA	- <i>Food and Drugs Administration</i>
FE	- Fase estacionária
FIOCRUZ	- Fundação Oswaldo Cruz
FM	- Fase móvel
Fr.	- Fração
Grad.	- Gradiente
GRS	- <i>Generally Recognized as Safe</i>
h	- Altura
HCl	- Ácido clorídrico
HDL	- Lipoproteína de densidade alta (em inglês, <i>High density lipoprotein</i>)
HFD	- Dieta com alto teor de gordura (em inglês, <i>High fat diet</i>)
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICH	- <i>International Conference on the Harmonization of Technical Requirements</i>
IFA(s)	- Insumo(s) farmacêutico(s) ativo(s)
IMS	- <i>International Medical Statistics</i>
IV	- Espectrômetro de infravermelho
KCl	- Cloreto de potássio
KOH	- Hidróxido de potássio
LASER	- <i>Light amplification by stimulated emission of radiation</i>

LD	- Limite de detecção
LDL	- Lipoproteína de densidade baixa (<i>Low density lipoprotein</i>)
LEES	- Laboratório de Estudo do Estado Sólido
LQ	- Limite de quantificação
LTU-Se	- Lote único Sephadex
LTU-Si	- Lote único Sílica
Me ₂ CO	- Acetona
MeOH	- Metanol
MG	- Monoestearato de glicerila
MI	- Miristato de isopropila
N ₂	- Nitrogênio
NL	- Nanopartícula lipídica
NLP	- Nanopartícula híbrida lipídio-polímero
NLS	- Nanopartícula lipídica sólida
OBP	- Oleorresina de Breu processada
p/p	- Concentração peso por peso
p/v	- Concentração peso por volume
PA	- Para análise
PDI	- Índice de polidispersão
PFM	- Produto florestal madeireiro
PFNM	- Produto florestal não madeireiro
pH	- Potencial hidrogeniônico
pK _A	- Constante de dissociação ácida
PN4	- Laboratório de Produtos Naturais 4
Prep.	- Preparativa
PS	- Parâmetros de solubilidade
PSH	- Parâmetros de Solubilidade de Hansen
PZ	- Potencial zeta
r	- Coeficiente de correlação de Pearson
RPM	- Rotações por minuto
RDA	- Reação Retro-Diels-Alder
RDC	- Resolução da diretoria colegiada
R _f	- Fator de retenção
RMN	- Ressonância magnética nuclear

S	- Desvio padrão
Se-I ate -XII	- Experimentos em Sephadex LH-20 de 1 a 12
SIBI	- Sistema integrado de bibliotecas
Si-I a -X	- Experimento em gel de sílica de 1 a 10
SP	- Span 60
STZ	- Estreptozotocina
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
SUS	- Sistema Único de Saúde
TGA	- Análise de termogravimetria
TP	- Tamanho partícula
TPA	- 12-O-tetradecanoilforbol
t_R	- Tempo de retenção
Trad.	- Tradutor
TW	- Tween 80
UFRJ	- Universidade Federal do Rio de Janeiro
UV	- Espectrometria de ultravioleta
v/v	- Concentração volume por volume
VISA	- Vigilância Sanitária
VLDL	- Lipoproteína de densidade muito baixa (<i>Very low density lipoprotein</i>)
WIPO	- <i>World Intellectual Property Organization</i>
φ	- Diâmetro
$[M]^+$	- Íon molecular
^{13}C -RMN	- Ressonância magnética nuclear de carbono
^1H -RMN	- Ressonância magnética nuclear de próton

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1	APROVEITAMENTO ECONÔMICO DA BIODIVERSIDADE.....	3
2.2	A FAMÍLIA BURSERACEAE E O GÊNERO <i>PROTIUM</i>	5
2.3	FARMACOLOGIA DOS ISÔMEROS TRITERPÊNICOS DE AMIRINA	9
2.4	ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE TRITERPENOS DE <i>BURSERACEAE</i>	11
2.5	ESTRATÉGIAS DE PARA VEICULAÇÃO DE FÁRMACOS DE BAIXA HIDROSOLUBILIDADE	15
2.6	A IMPORTÂNCIA DO PARÂMETRO SOLUBILIDADE NO DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO	18
2.6.1	Parâmetros de Solubilidade de Hansen e suas aplicações farmacêuticas.....	19
3	JUSTIFICATIVA	22
4	OBJETIVOS	23
4.1	OBJETIVO GERAL.....	23
5	MATERIAL E MÉTODO	24
5.1	MATERIAL	24
5.1.1	Matérias-primas, solventes, reagentes e soluções	24
5.1.2	Materiais de referência	25
5.1.3	Equipamentos e acessórios	25
5.2	MÉTODO	26
5.2.1	Obtenção e processamento da matéria-prima bruta (breu).....	28
5.2.2	Fracionamento e purificação da oleorresina de breu processado	28
5.2.2.1	Fracionamento e purificação do breu processado em coluna de gel de sílica.....	28
5.2.2.2	Fracionamento e purificação do breu processado em coluna de Sephadex LH-20....	30
5.2.3	Obtenção dos lotes escalonados das frações terpênicas concentradas em amirina	31
5.2.4	Otimização de metodologia para a caracterização dos triterpenos pentacíclicos por cromatografia de fase gasosa.....	32
5.2.5	Viabilidade da quantificação dos triterpenos pentacíclicos utilizando colesterol como padrão externo	33
5.2.5.1	Linearidade e faixa de trabalho	33
5.2.5.2	Precisão em nível de repetibilidade.....	34
5.2.5.3	Limite de detecção e limite de quantificação	34

5.2.6	Caracterização físico-química do breu processado (OBP) e dos lotes únicos (LTU-Si e LTU-Se).....	34
5.2.6.1	Determinação do teor de umidade.....	34
5.2.6.2	Determinação do ponto de fusão.....	34
5.2.6.3	Espectroscopia no infravermelho.....	35
5.2.6.4	Cromatografia em camada delgada.....	35
5.2.6.5	Análise semiquantitativa por densitometria.....	35
5.2.6.6	Cromatografia de fase gasosa.....	35
5.2.7	Avaliação da solubilidade do lote único de sílica (LTU-Si) nos excipientes.....	36
5.2.7.1	Cálculos de parâmetros de solubilidade de Hansen.....	36
5.2.7.2	Cromatografia em camada delgada e análise semiquantitativa por densitometria.....	37
5.2.8	Desenvolvimento dos carreadores lipídicos nanoestruturados.....	38
5.2.8.1	Determinação da proporção lipídica e de tensoativos.....	38
5.2.8.2	Preparo dos carreadores lipídicos nanoestruturados.....	40
5.2.9	Caracterização dos carreadores lipídicos nanoestruturados.....	40
5.2.9.1	Avaliação macroscópica e pH.....	41
5.2.9.2	Análise de tamanho de partícula e índice de polidispersão.....	41
5.2.9.3	Análise do potencial zeta.....	41
5.2.9.4	Análises térmicas.....	41
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
6.1	OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DA MATÉRIA-PRIMA BRUTA (BREU) ..	42
6.2	FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO DA OLEORRESINA (BREU) PROCESSADA.....	43
6.2.1	Fracionamento e purificação do breu processado em coluna de gel de sílica.....	43
6.2.2	Fracionamento e purificação do breu processado em coluna de Sephadex LH-20....	50
6.3	OBTENÇÃO DOS LOTES ESCALONADOS DAS FRAÇÕES TERPÊNICAS CONCENTRADAS EM AMIRINA.....	52
6.4	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA DE FASE GASOSA PARA A CARACTERIZAÇÃO DOS TRITERPENOS PENTACÍCLICOS NO BREU (OBP)	54
6.5	VIABILIDADE DA QUANTIFICAÇÃO DOS TRITERPENOS PENTACÍCLICOS UTILIZANDO COLESTEROL COMO PADRÃO EXTERNO.....	57
6.6	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO BREU PROCESSADO (OBP) E DOS LOTES ÚNICOS (LTU-SI E LTU-SE).....	60

6.7	DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DE SATURAÇÃO DO LOTE ÚNICO DE SÍLICA (LTU-SI) NOS EXCIPIENTES.....	69
6.8	DESENVOLVIMENTO DOS CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS.....	77
6.9	ANÁLISE TÉRMICA	90
7	CONCLUSÃO	94
8	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	97
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

1 INTRODUÇÃO

O Brasil constitui uma fonte de grande importância e riqueza no contexto de diversidade de recursos naturais de interesse terapêutico e comercial (MARQUES, 2000). Corrobora tal fato a constatação da entrada de produtos extrativos das florestas no mercado nacional e internacional, de forma a contribuir significativamente com o desenvolvimento das economias locais e do país (IBGE, 2010).

A biodiversidade tem se provado como uma fonte promissora de insumos farmacêuticos ativos (IFA), particularmente quanto à finalidade farmacêutica e à utilização em produtos medicinais. Neste contexto, os produtos florestais não madeireiros (PFNM), como as oleorresinas, cujas fontes vegetais são amplamente distribuídas na região Amazônica, têm-se revelado muito versáteis para aplicações farmacológicas relacionadas ao seu uso popular (IBGE, 2010).

A oleorresina obtida do tronco de espécies da família botânica Burseraceae, conhecida comumente como breu, é constituída majoritariamente por triterpenos pentacíclicos. Entre eles, os mais abundantes são os isômeros α -amirina e β -amirina (SIANI et al., 2012), que possuem atividades farmacológicas variadas, como anti-inflamatória, antinociceptiva, gastroprotetora e hepatoprotetora, antipruriginosa e outras (RÜDIGER; SIANI; VEIGA JUNIOR, 2007). Adicionalmente, as descrições na literatura sobre a baixa toxicidade destas moléculas indicam o potencial para uso humano, na forma de ingrediente ativo em produtos medicamentosos e cosméticos (OLIVEIRA et al., 2005; VILLASEÑOR et al., 2004).

Os triterpenos pentacíclicos, com destaque para os isômeros de amirina, apresentam baixa solubilidade em solventes polares (SIANI et al., 2012), sendo esta condição um desafio para o desenvolvimento de produtos medicamentosos a partir destas substâncias. Assim, os nanossistemas empregando matrizes lipídicas têm ganhado relevância e são descritos como promissores para veicular compostos dessa classe (ALMEIDA, 2013; SUN; ZHANG; LI, 2012).

Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) são considerados um tipo de nanossistema de matriz lipídica de segunda geração, constituído por lipídios sólidos e líquidos, estabilizados por tensoativos biocompatíveis. Estes são, frequentemente, empregados para liberação de substâncias lipofílicas e visam otimizar o aprisionamento do fármaco e assim gerar maior estabilidade ao sistema quando comparado a outras estratégias (MEYAGUSKU, 2014; SEYFODDIN; SHAW; AL-KASSAS, 2015). Além disso, os CLN podem ser facilmente produzidos em larga escala, possuem boa capacidade de estocagem,

podem ser esterilizados em autoclave sem alterações de sua morfologia, e permitem flexibilidade em termos de vias de administração que incluem oral, oftálmica e tópica (MARCATO, 2009).

No contexto de desenvolvimento desses CLN, destaca-se a necessidade de avaliação da solubilidade do IFA em lipídios líquidos e sólidos como uma etapa imprescindível durante os estudos de pré-formulação (DOKTOROVOVA; SOUTO; SILVA, 2018; SHAH et al., 2015). Fato este, devido à solubilidade influenciar diretamente no comportamento farmacocinético da molécula ativa em questão (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013) e relacionar-se à quantidade desta incorporada nos CLN (DOKTOROVOVA; SOUTO; SILVA, 2018).

Diante desse cenário, a presente proposta engloba o estudo químico e a avaliação de alternativas farmacotécnicas no sentido de viabilizar a exploração do potencial do breu como um IFA de origem vegetal. A etapa química foi pautada na obtenção de um material refinado e concentrado nos triterpenos majoritários (α -amirina e β -amirina) desta matéria-prima, constituído de frações purificadas e quimicamente padronizadas. A etapa da tecnologia farmacêutica envolveu estudos de viabilidade relacionados a incorporação destas frações na perspectiva de obter um CLN estável. Para tanto, estudos de solubilidade da matéria-prima nos excipientes a serem empregados no desenvolvimento farmacotécnico foram realizados com auxílio de ferramenta teórica (*in silico*) e ensaios experimentais. Durante as etapas deste estudo, foram desenvolvidos métodos de análise específicos para respaldar os processos de separação, purificação, transposição de escala e, posteriormente, a análise da viabilidade de incorporação nos CLN.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 APROVEITAMENTO ECONÔMICO DA BIODIVERSIDADE

A flora brasileira é constituída de uma expressiva diversidade de espécies, estimadas em 22% de toda a flora mundial, sendo a floresta amazônica o reservatório de aproximadamente 55 mil espécies de plantas. Isso demonstra o importante papel do Brasil como fonte de riquezas no contexto dos recursos naturais de interesse terapêutico e comercial (MARQUES, 2000). Corrobora tal fato a constatação da presença de muitos produtos extrativos das florestas no mercado nacional e internacional, o que contribui para a economia do país (IBGE, 2009).

Além dos benefícios sociais e econômicos, os produtos da biodiversidade têm sido considerados, de maneira crescente, como um instrumento de preservação de ecossistemas florestais, ao valorizá-los economicamente. Na Amazônia, pesquisas relacionadas às propriedades químico-farmacológicas que atendam às indústrias de cosméticos e de medicamentos comumente utilizam espécies arbóreas e palmeiras (CLAY; SAMPAIO; CLEMENT, 1999).

Os recursos extrativos podem ser classificados em produtos florestais madeireiros (PFM), que contemplam todo material lenhoso passível de aproveitamento para serrarias, estacas, lenha, entre outros; ou produtos florestais não madeireiros (PFNM), que compreendem aqueles não lenhosos de origem vegetal, tais como resina, óleos, sementes, plantas medicinais e alguns cipós, entre outros (IBGE, 2009).

O extrativismo de PFNM, apesar de ser uma prática antiga para comunidades tradicionais, vem despertando crescente interesse, mormente quando passa a ser uma alternativa sustentável ao uso da terra, com capacidade de conciliar estratégias de geração de renda aliada à conservação de florestas (TICKTIN, 2004).

Todavia, para extrapolar o nível de autoconsumo dos PFNM, visando à exploração em escala comercial, torna-se necessário superar uma série de obstáculos relacionados à precibilidade do material extraído, à irregularidade da produção, à carência de informações sobre o manejo (incluindo a falta de profissionais que dominem as técnicas apropriadas); assim como aprofundar o conhecimento dos efeitos da exploração intensiva e dirimir as dificuldades na integração do conhecimento tradicional às abordagens técnicas modernas. Além disso, é também fundamental solucionar as questões de logística associadas ao transporte, escoamento e sistema de comercialização (VOSTI et al., 2003). Em parte, este

panorama é responsável pelo baixo nível de investimentos e iniciativas para a transformação do enorme potencial natural presente na Amazônia em vantagens competitivas, que culminem na geração de produtos de alto valor agregado ou, até mesmo, no desenvolvimento de tecnologias e produtos patenteáveis, no mercado globalizado (VILLAS BÔAS; GADELHA, 2007).

Apesar de tamanha dificuldade frente à exploração de PFSM, é possível notar na última década esforços concentrados na utilização destes como matéria-prima para o fortalecimento da indústria de medicamentos fitoterápicos, uma vez que esta representa uma alternativa promissora para facilitar e aumentar o acesso da população a medicamentos (CLAY; SAMPAIO; CLEMENT, 1999).

A justificativa para a eleição de produtos de fontes naturais como potencial alavanca no desenvolvimento deste setor farmacêutico é reconhecida pela articulação de alguns fatores, como: (i) a extensa biodiversidade brasileira supracitada, (ii) a existência de conhecimentos tradicionais ainda pouco reconhecidos e valorizados, (iii) a atual "crise de inventividade" da indústria mundial de medicamentos sintéticos e (iv) os crescentes gastos com a importação destes últimos para o atendimento das necessidades do Sistema Único de Saúde (SUS) (HASENCLEVER et al., 2017).

Assim, entre os PFSM mais valiosos e promissores com vistas ao desenvolvimento de fitoterápicos estão as resinas, que são definidas como misturas complexas de metabólitos secundários de plantas, secretadas e armazenadas por estruturas de superfície, internas ou especializadas, localizadas em órgãos que desempenham algum papel ecológico específico (LANGENHEIM, 2003). A maior e mais conhecida categoria é compreendida na classe das resinas terpenóides. As características de lipofilicidade, fluidez e maleabilidade, resultantes da mistura de substâncias voláteis (monoterpenos) e não voláteis (diterpenos e triterpenos) as tornaram conhecidas como "oleorresinas". As espécies da família botânica Burseraceae são consideradas a principal fonte dessas oleorresinas em todo o mundo. Nesta família, o gênero *Protium* é o mais representativo, estando amplamente distribuído em toda a floresta brasileira, onde suas oleorresinas são popularmente conhecidas como breu (SIANI et al., 1999).

Neste contexto o presente estudo explora a versatilidade de aplicações tecnológicas de frações oriundas de oleorresinas de espécies da família Burseraceae, visando contribuir no estabelecimento das cadeias produtivas baseadas em PFSM. Sendo esta uma forma de induzir o desenvolvimento de produtos fitoterápicos em geral, envolvendo moléculas obtidas a partir do manancial vegetal brasileiro.

2.2 A FAMÍLIA BURSERACEAE E O GÊNERO *PROTIUM*

As árvores da família Burseraceae são constituídas por 18 gêneros que totalizam 649 espécies presentes principalmente na América do Sul e no continente africano (THE PLANT LIST, 2010). As espécies sul-americanas da família são popularmente conhecidas como breu, breu branco, breu vermelho, almecega, almesca, caraño, goma-limão, entre outros nomes, a depender de onde elas ocorrem (RÜDIGER; SIANI; VEIGA JUNIOR, 2007).

O gênero *Protium* é considerado o principal e o mais importante gênero da família Burseraceae, uma vez que em regiões neotropicais representa amplamente a família, com aproximadamente 140 espécies. No Brasil, estima-se que cerca de 80% das espécies da família Burseraceae pertencem a este gênero, sendo reconhecidas pela capacidade de exsudar, por incisão do tronco, oleorresinas aromáticas de tonalidade branco-esverdeado. As espécies de *Protium* estão distribuídas em vários biomas brasileiros: Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica (Figuras 1 e 2) (KHALID, 1983).



Figura 1: Árvores de *Protium heptaphyllum* em restinga da Mata Atlântica (RJ).
Fotografia obtida de Sérgio Monteiro, 1999.

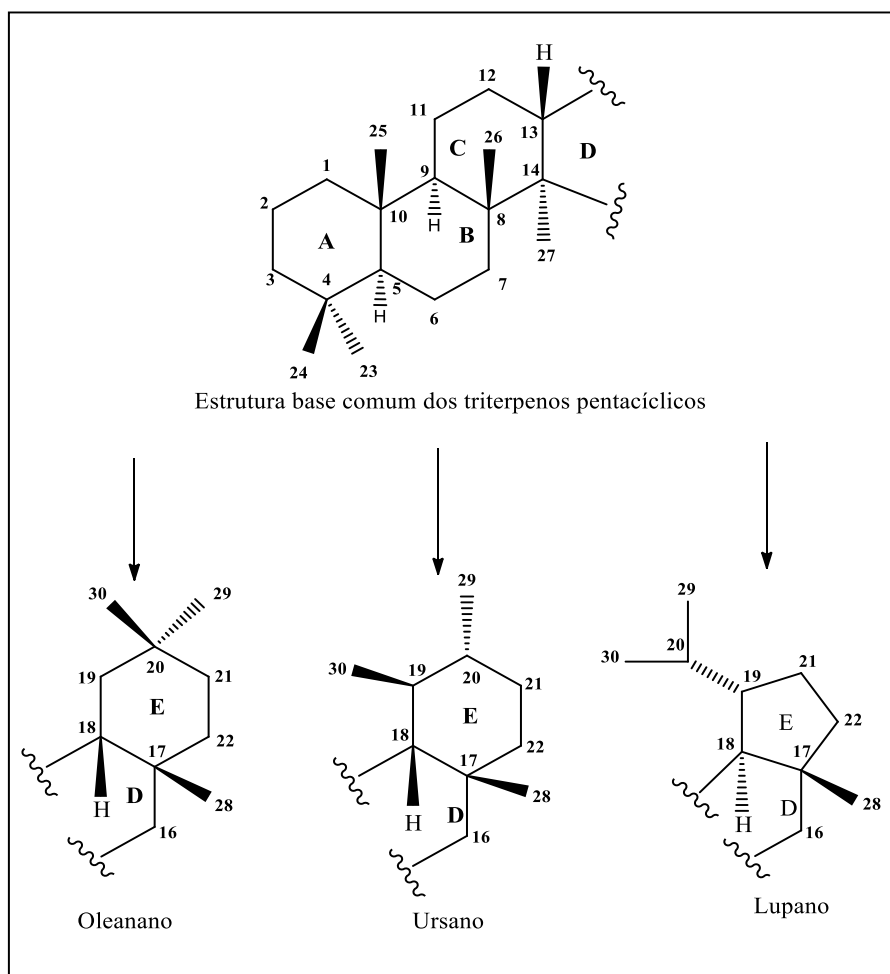


Figura 2: Folhas de árvores de *Protium heptaphyllum* em restinga da Mata Atlântica (RJ).
Fotografia obtida de Sérgio Monteiro, 1999.

Na literatura, os registros etnobotânicos indicam o uso dessas oleorresinas na calafetagem e impermeabilização de barcos e casas (LANGENHEIM, 2003). A resina manufaturada ou *in natura* é também comercializada no mercado de produtos de rituais religiosos e místicos, sendo empregada na defumação de ambientes (LANGENHEIM, 2003; VARGHESE; TICKTIN, 2008). Além disso, a fumaça produzida pelas queimas é empregada como agente repelente de insetos em casas nas florestas. Na medicina tradicional, são utilizadas devido à ação antisséptica, anti-inflamatória, antibiótica, expectorante e cicatrizante, entre outras (RÜDIGER; SIANI; VEIGA JUNIOR, 2007).

Quanto à composição química, as oleorresinas de *Protium* são constituídas de uma fração volátil (óleo essencial), em que predominam monoterpenos, com alguns exemplos descritos contendo sesquiterpenos (LIMA et al., 2004; SIANI et al., 1999); e uma fração não volátil composta por mistura de triterpenos pentacíclicos, em que, via de regra, destacam-se os isômeros α -amirina e β -amirina. Juntos, ambos perfazem 40-50% da constituição química total, e são responsáveis pela reputação das resinas deste gênero em termos de atividades etnofarmacológicas nas regiões onde ocorrem (SIANI et al., 1999; VIEIRA-JUNIOR; LEITE DE SOUZA; CHAVES, 2005).

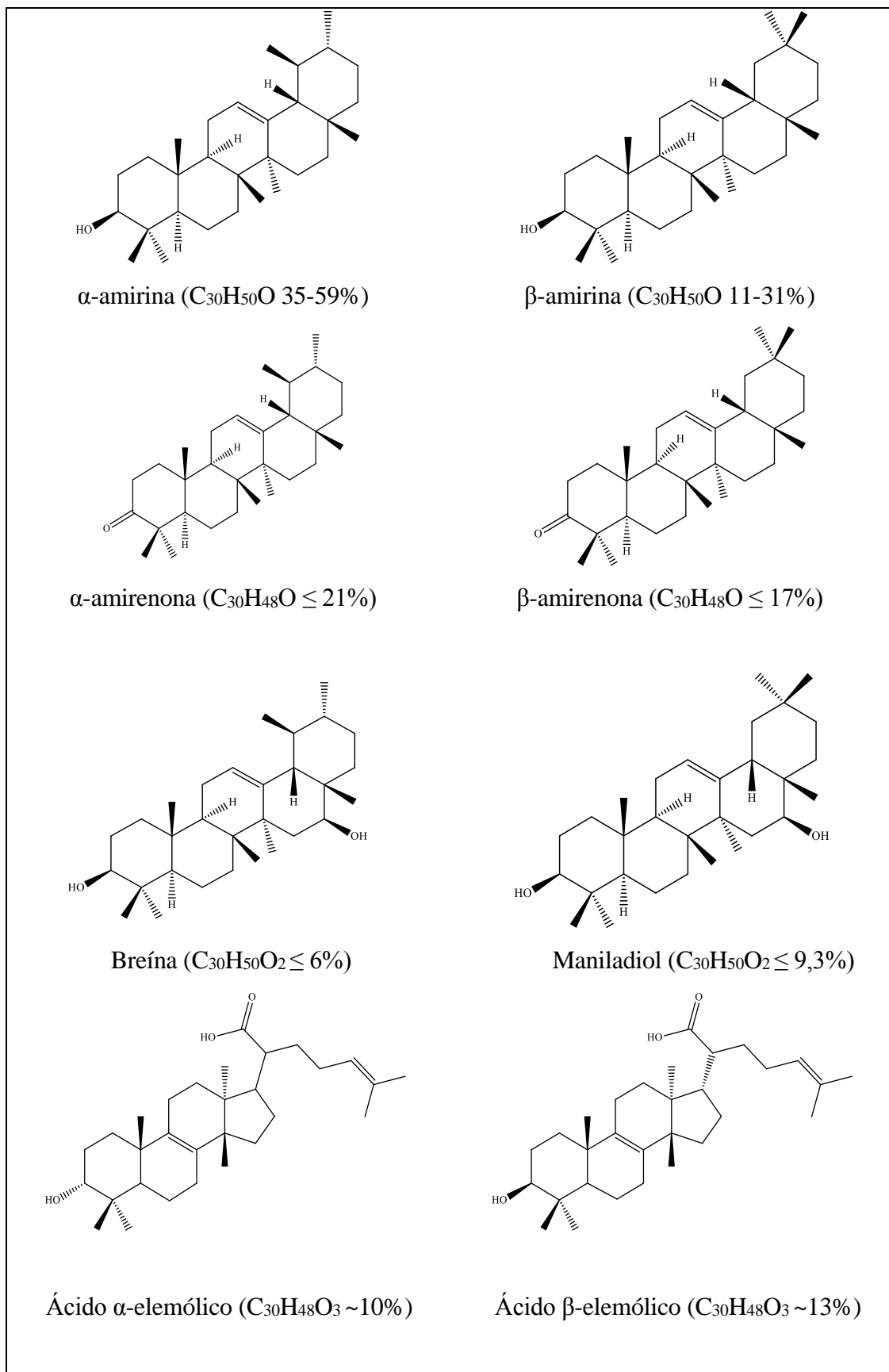
Os isômeros triterpenoides pentacíclicos α -amirina e β -amirina são biosintetizados nos vegetais a partir de seis unidades isoprênicas que formam o esqualeno como a molécula C-30 acíclica original suscetível as demais transformações biossintéticas necessárias (BREITMAIER, 2006). Assim, a depender destas transformações os triterpenos serão classificados em três grupos principais: oleanano, ursano e lupano. As estruturas do tipo oleanano (ex.: β -amirina) possuem duas metilas geminais na posição C-20, enquanto as do tipo ursano (ex.: α -amirina) apresentam duas metilas vicinais em C-19 e C-20. Ambas apresentam estereoquímica de junção *cis* dos anéis D/E. Os triterpenos do tipo lupano diferem dos demais grupos devido à estereoquímica *trans* da fusão D/E, além do anel E ser constituído por apenas 5 membros (Quadro 1).



Quadro 1: Estruturas básicas dos três grandes grupos de triterpenos pentacíclicos.
 Fonte: Elaboração própria, 2017.

Siani e colaboradores (2012) caracterizaram a presença de nove compostos triterpênicos comuns em amostras não voláteis de oleorresinas comerciais obtidas de árvores da família Burseraceae, essas amostras apresentaram a presença majoritária dos triterpenos α -amirina (35-59%) e β -amirina (11-31%), reafirmando descrições anteriores (VIEIRA-JUNIOR; LEITE DE SOUZA; CHAVES, 2005).

Em menor escala, foram caracterizados triterpenos pentacíclicos α -amirenona (2-21%) e β -amirenona (0-17%), breína (0-6%), maniladiol (0-9,3%) e friedelina (quantidades variáveis e não detectada em todas as amostras analisadas), além dos triterpenos tetracíclicos ácidos α -elemólico (~10%) e β -elemólico (~13%) (Quadro 2).



Quadro 2: Principais triterpenos encontrados na fração de breu não volátil e suas respectivas variações quantitativas no perfil químico.

Fonte: Adaptado de Siani et al., 2012.

2.3 FARMACOLOGIA DOS ISÔMEROS TRITERPÊNICOS DE AMIRINA

A literatura científica vem demonstrando que os triterpenos, em especial os isômeros pentacíclicos da amirina, são moléculas promissoras sob o ponto de vista farmacológico, dado o crescente número de artigos publicados sobre este tema com foco principal no estudo das atividades anti-inflamatória, antinociceptiva, gastroprotetora e hepatoprotetora, antipruriginosa, ansiolítica e antidepressiva, hipoglicemiante e hipolipidemiante (BISKUP et al., 2012; LIMA-JUNIOR et al., 2007; MEDEIROS et al., 2007; MELO et al., 2011; OKOYE et al., 2014; OTUKI et al., 2005b; SANTOS et al., 2012; SHIH; CHERNG, 2014). Neste contexto, faz-se necessário destacar alguns trabalhos realizados com esses compostos, em mistura ou isolados, visando corroborar esse potencial terapêutico.

A mistura de α -amirina e β -amirina, oriunda de *Protium heptaphyllum*, demonstrou possuir atividade anti-inflamatória, quando testada no modelo de inflamação epitelial induzida por acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) em ratos Wistar. Este estudo concluiu que a inibição observada da inflamação indica o potencial da mistura de amirinas, no desenvolvimento de possíveis agentes terapêuticos de uso tópico para tratar doenças inflamatórias (MEDEIROS et al., 2007). Em outros estudos realizados com a mesma mistura desses isômeros, isolados como constituinte majoritário de *Protium kleinii*, observou-se uma inibição dose-relacionada do edema induzido por TPA em orelha de ratos, equivalente à resposta obtida com dexametasona (controle positivo) (OTUKI et al., 2005a).

Ainda, a mistura de α -amirina e β -amirina, na proporção 1:2, além de derivados semissintéticos de constituintes da resina de *Protium heptaphyllum* demonstrou potente atividade inibitória da nocicepção induzida por ácido acético em camundongos masculinos Wistar, além de uma significativa atividade analgésica no teste de formalina exercida por um dos derivados (OLIVEIRA et al., 2004a).

Propriedades anti-inflamatórias e de gastroproteção foram demonstradas para a oleorresina *Protium heptaphyllum*, utilizando modelos etanol/ácido clorídrico como indutores de úlceras gástricas em ratos Wistar. Estes efeitos foram atribuídos especificamente à presença de α -amirina e β -amirina, maniladiol e breína (SOLDI, 2007).

Oliveira e colaboradores (2005) observaram o potencial hepatoprotetor da mistura de α -amirina e β -amirina, extraída de *Protium heptaphyllum*, contra a lesão hepatotóxica induzida por acetaminofeno, sugerindo como prováveis mecanismos a diminuição do estresse oxidativo e da formação de metabólitos tóxicos. Estes estudos respaldam, em parte, as

afirmações sobre o uso tradicional desta *Protium heptaphyllum* no tratamento de doenças do fígado.

A mistura de α -amirina e β -amirina obtida da oleorresina de *Protium heptaphyllum*, quando avaliada quanto à atividade antipruriginosa, no modelo de prurido induzido por Dextran T40, apresentou resultados promissores quando aplicada nas doses de 100 e 200 mg/Kg diretamente na superfície do corte. Os autores apontam o potencial de uso clínico dessa mistura em pruridos associados com alergia, dermatite e eczema (OLIVEIRA et al., 2004a).

O estudo de Aragão e colaboradores (2006) evidenciou efeitos sedativos e ansiolíticos dos isômeros de amirina, possivelmente envolvendo a participação de receptores benzodiazepínicos e um mecanismo noradrenérgico associado ao efeito antidepressivo.

Santos e colaboradores (2012) investigaram os efeitos de α -amirina e β -amirina obtida de *Protium heptaphyllum* no nível de açúcar no sangue, assim como o perfil lipídico em ratos (Wistar) normais diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ) e em ratos alimentados com uma dieta com alto teor de gordura (HFD). A mistura isomérica de amirinas foi eficiente em reduzir os níveis elevados de glicose plasmática durante o teste de tolerância oral à glicose. O nível de insulina no plasma e a análise histopatológica do pâncreas revelaram o efeito benéfico da mistura na preservação da integridade das células beta. Em ratos tratados por via oral com α -amirina e β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg) ou fenofibrato (200 mg/kg), o aumento associado a triglicerídeos no soro foi significativamente menor. O efeito hipocolesterolêmico de α -amirina e β -amirina apareceu mais proeminente com 100 mg/kg, quando foram observadas diminuições significativas das lipoproteínas VLDL e LDL, com elevação da HDL.

Estudos com ambos os isômeros de amirina, envolvendo administração de altas doses em camundongos Wistar, não evidenciaram efeitos tóxicos. Além disso, uma mistura de triterpenos contendo mais de 70% de amirina não exibiu atividade mutagênica no teste de micronúcleo ou no modelo de letalidade em *Artemia salina*, que produziu uma Concentração Letal Média (CL₅₀) de 42 μ g/mL (OLIVEIRA et al., 2004a; VILLASEÑOR et al., 2004).

Este conjunto de resultados, publicados nos últimos anos, aponta a urgência em se padronizarem extratos com base nestes triterpenos pentacíclicos, com o propósito de aplicá-los no campo medicinal, cosmético ou mesmo alimentício. Para cumprir este objetivo, é necessário estimular os estudos químico-analíticos voltados para a caracterização e quantificação de triterpenos pentacíclicos obtidos de matrizes naturais diversas, assim como ensaiar a obtenção destes compostos em maior escala (GOULAS; MANGANARIS, 2012). Neste contexto, verifica-se que os estudos químico-farmacêuticos com os triterpenos oriundos

de oleorresinas vegetais vêm se intensificando nos últimos anos, notadamente com estudos de cromatografia de fase gasosa (CG) e de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para detectar e caracterizar essas substâncias. Isso se deve ao constante avanço na farmacologia molecular envolvendo estes compostos, assim como nas técnicas de separação e identificação de substâncias de origem natural, e das mais recentes abordagens farmacotécnicas envolvendo micro- e nanoencapsulação (DIAS; HAMERSKI; PINTO, 2011).

2.4 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE TRITERPENOS DE *BURSERACEAE*

A produção industrial de ativos vegetais com aplicação farmacêutica requer que os insumos sejam cientificamente validados. Sendo assim, dependendo da finalidade do produto a ser desenvolvido, esta validação envolve uma série de intervenções tecnológicas no processo de qualificação do insumo vegetal. Tal fato demonstra a necessidade de manter fidedignidade no processo de purificação e padronização química durante as etapas de transposição de escala (*scale-up*); ou seja, os mesmos resultados otimizados na bancada do laboratório, devem se obtidos nas escalas subsequentes (pré-industrial e industrial).

A literatura descreve métodos de isolamento e purificação de triterpenos a partir de matrizes vegetais, entre as quais se incluem diversos órgãos vegetais, como folhas, cascas de caule e raiz, partes aéreas, frutos, etc., mas particularmente em oleorresinas. No caso das oleorresinas de espécies de *Burseraceae*, que não contêm pigmentos como a clorofila, a extração dos triterpenos inicia-se comumente pelo emprego de métodos que variam entre a maceração à temperatura ambiente (CARVALHO et al., 2015), partição (LIMA et al., 2004), extração em Soxhlet (VERHOFF et al., 2014); entre outros. A escolha do procedimento na extração varia de acordo com o objetivo final da separação, incluindo por vezes as partições para eliminar os detritos de madeira e outras impurezas inorgânicas remanescentes do processo de coleta das oleorresinas (SIANI et al., 2011) e extração com solventes mais polares (CARVALHO et al., 2015).

A Tabela 1 resume técnicas empregadas na extração e separação de triterpenos de resinas de espécies de *Burseraceae*. Na maioria dos casos reportados (>75%), a preparação do extrato inicial envolve um solvente clorado, ocasionalmente em mistura com metanol. Há um caso no qual a oleorresina é submetida a um tratamento com hidróxido de potássio, especificamente visando à separação de ácidos triterpênicos (VERHOFF et al., 2014).

Tabela 1: Técnicas empregadas na extração e separação de triterpenos de resinas de espécies de Burseraceae (continua)

Espécie (resina)	Extração	Técnica de Separação	Isolado/Caracterizado	Referência
<i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand	<i>n</i> -Hexano > CHCl ₃	CC filtrante, gel de sílica 60, <i>n</i> -hexano:AcOEt 95:5 (FA) > 80:20 (FB). FA: CC, gel de sílica 60, <i>n</i> -hexano:AcOEt grad > CCD. FB: gel de sílica 60, <i>n</i> -hexano:AcOEt grad > CCD	[α -amirina + β -amirina], [breína + maniladiol]	(MAIA et al., 2000)
<i>Trattinnickia áspera</i> (Standl.) Swart	CHCl ₃	CC, Sephadex LH-20 > CC, gel de sílica	[α -amirina + β -amirina]	(AREGULLIN; GOMPPER; RODRIGUEZ, 2002)
<i>Trattinnickia burserifolia</i> Mart.	CHCl ₃ > partição CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O, fr. CHCl ₃ > fr. MeOH	CC, gel de sílica > CCD > CC <i>flash</i> (<i>n</i> -hexano-CH ₂ Cl ₂ -MeOH; <i>n</i> -hexano -Me ₂ CO 8:2) > cristalização (<i>n</i> -hexano). Fr. CHCl ₃ : grad <i>n</i> -hexano:CH ₂ Cl ₂ :MeOH > grad <i>n</i> -hexano:EtOAc. Fr. MeOH: grad EtOAc-MeOH	[α - + β -amirina], [maniladiol + breína], [3 β -fenilacetoxiurs-12-en + 3 β -fenilacetoxiolean-12-en], epi- α -amirina, epi- β -amirina, ácido 3 α -hidroxitirucal-8,24-dien-21-oico, ácido 3 α -hidroxitirucal-8,24-dien-21-oico, [3-acetoxidammarenedio-II + 3 α -acetoxi-20(S)-hidroxidammarr-24-ene], 3 β ,16 β -diacetoxiurs-9(11),12-diene	(LIMA et al., 2004)
<i>Trattinnickia rhoifolia</i> Wild. <i>Dacryodes hopkinsii</i> D. C. Daly	MeOH > partição <i>n</i> -hexano > CH ₂ Cl ₂	Determinação espectrométrica (RMN) em extratos e frações (misturas)	α -amirina, β -amirina, 3-epi- α -amirina, 3-epi- β -amirina, ácido 3 α -hidroxitirucal-8,24-dien-21-oico, ácido 3 α -hidroxitirucal-7,24-dien-21-oico α -amirina, β -amirina	
<i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (4:1)	CC (h 38, ϕ 5,5 cm), gel de sílica 0,05-0,2 mm, <i>n</i> -hexano:AcOEt (grad 9,8:0,2 a 0:10)	[α -amirina + β -amirina]	(OLIVEIRA et al., 2004b)
<i>Protium kleinii</i> Cuatrec.	Et ₂ O	CC, gel de sílica, <i>n</i> -hexano:AcOEt (grad 9,8:0,2 a 1:1)	[3-oxo-11 β -hidroxi-urs-12-ene + 3-oxo-11 β -hidroxi-olean-12-ene]; [α -amirina + β -amirina], [3-oxo-11 β ,16 β -di-hidroxi-urs-12-ene + 3-oxo-11 β ,16 β -di-hidroxi-olean-12-ene], breína	(LIMA et al., 2005)
Resina de almécega L. Marchand	MeOH:CH ₂ Cl ₂ 4:1	CC, gel de sílica, <i>n</i> -hexano:AcOEt grad > CCD	[α -amirina + β -amirina], [breína + maniladiol], [α -amirenona + β -amirenona + lupenona]	(VIEIRA-JUNIOR; LEITE DE SOUZA; CHAVES, 2005)
<i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand	-	CC, gel de sílica, <i>n</i> -hexano > CHCl ₃ > AcOEt > EtOH. Fr. CHCl ₃ : CC grad <i>n</i> -hexano:AcOEt	[α -amirina + β -amirina]	(ARAGÃO et al., 2006)

Tabela 1: Técnicas empregadas na extração e separação de triterpenos de resina de espécies de Burseraceae (continuação)

Espécie (resina)	Extração	Técnica de Separação	Isolado/Caracterizado	Referência
<i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand	-	CC, gel de sílica, <i>n</i> -hexano > CHCl ₃ > AcOEt > MeOH. Fr. CHCl ₃ : CC, gel de sílica, grad <i>n</i> -hexano:AcOEt	[α-amirina + β-amirina]	(BANDEIRA et al., 2007)
<i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand	-	CC, gel de sílica 0,05-0,2 mm, <i>n</i> -hexano:AcOEt (grad 9:1 > 8:2)	[α- + β-amirina], [maniladiol + breína]	(LIMA-JUNIOR et al., 2007)
<i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand	-	CC, gel de sílica, <i>n</i> -hexano > CHCl ₃ > AcOEt > MeOH. Fr. CHCl ₃ : CC, gel de sílica, grad <i>n</i> -hexano:AcOEt	[α-amirina + β-amirina]	(ARAGÃO, 2008)
Breu comercial	Sohxlet CH ₂ Cl ₂	CC, gel de sílica, <i>n</i> -hexano:AcOEt grad 1:0 a 0:1 > CCD > CLAE preparativa (C ₁₈)	α-amirina, β-amirina	(DIAS; HAMERSKI; PINTO, 2011)
<i>Protium altsonii</i> Sandwith; <i>Protium hebetatum</i> D.C. Daly; <i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand; <i>Protium paniculatum</i> var. nova (Engl.) Daly <i>Protium paniculatum</i> var. riedelianum (Engl.) Daly; <i>Protium spruceanum</i> (Benth.) Engl.; <i>Protium strumosum</i> D.C. Daly <i>Trattinnickia rhoifolia</i> Willd.; <i>Protium icicariba</i> (DC.) Marchand; Breu comercial	Pré-destilação de voláteis. Insolúvel > CHCl ₃	Caracterização por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectroscopia de massas	[α-amirina + β-amirina + α-amirenona + β-amirenona + breína + maniladiol + friedelina + ácidos 3-α-hydroxi-8,24-dienetirucálico + 3-α-hydroxi-7,24-dienetirucálico]	(SIANI et al., 2012)
<i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand	CH ₂ Cl ₂	CC, gel de sílica, pentano-CH ₂ Cl ₂ grad 1:0 a 0:1; CH ₂ Cl ₂ :EtOAc grad 1:0 a 0:1 > CC gel de sílica, pentano-CH ₂ Cl ₂ grad 1:0 a 0:1 > CC, gel de sílica, CH ₂ Cl ₂ -EtOAc:MEOH 1,8:5:0,1 > CC, gel de sílica, grad pentano:CH ₂ Cl ₂ > grad CH ₂ Cl ₂ :CHCl ₃ > CHCl ₃ > grad CHCl ₃ :MeOH	[α-amirina + β-amirina]	(LIMA et al., 2014)

Tabela 1: Técnicas empregadas na extração e separação de triterpenos de resina de espécies de Burseraceae (conclusão).

Espécie (resina)	Extração	Técnica de Separação	Isolado/Caracterizado	Referência
<i>Boswellia serrata</i> Roxb. ex Colebr.; <i>Boswellia papyrifera</i> (Caill. Ex Delile) Hochst.; <i>Boswellia carteri</i> Birdw.; <i>Boswellia sacra</i> Flueck.; <i>Boswellia socotrana</i> Balf. f.	Soxhlet CH ₂ Cl ₂ > partição Et ₂ O/ KOH. Fr. aquosa + HCl > ext. Et ₂ O	CC <i>flash</i> /gel de sílica 40-63 µm, pentano-Et ₂ O/1% AcOH (grad 8:1 a 1:2) > CCD > CLAE preparativa (C ₁₈ - 250 x 20 mm x 5 µm)	Série de ácidos: β-boswellico, 11-ceto-β-boswellico, 3-O-acetil-β-boswellico, 3-O-acteil-11-ceto-β-boswellico, 3-α-hidroxi-8,24-dienetirucálico, 3α-acetoxi-8,24-dienetirucálico, 3-β-hidroxi-8,24-dienetirucálico, 3-oxo-8,24-dienetirucálico, 3-α-hidroxi-7,24-dienetirucálico, [3α-acetoxi-7,24-dienetirucálico + robúrico, 4,(23)-di-hidrorobúrico + 4,(23)-di-hidro-11-ceto-robúrico], 4,(23)-di-hidronictântico, lupeólico, 3-O-acetil-lupeólico, 3-O-acetil-28- hidroxilupeólico	(VERHOFF et al., 2014)
<i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand	-	CC, gel de sílica, <i>n</i> -hexano > CHCl ₃ > AcOEt > MeOH. Fr. CHCl ₃ : CC, gel de sílica, grad <i>n</i> -hexano:AcOEt	[α-amirina + β-amirina]	(ARAGÃO et al., 2015)
<i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand	MeOH:CH ₂ Cl ₂ 4:1	Caracterização de constituintes por 1H e 13C RMN e espectroscopia de massas	[α- amirina + β-amirina + maniladiol + breína + lupenona + α- + β-amirenona]	(CARVALHO et al., 2015)
<i>Bursera copallifera</i>	CH ₂ Cl ₂ 9:1	CC, gel de sílica 70-230 mesh. <i>n</i> -hexano:acetona grad 1:0 a 1:1 > Fr1, Fr2, Fr3. Fr1: CC, gel de sílica 230-400 mesh, <i>n</i> -hexano:CH ₂ Cl ₂ 9,5:0,5 > (a) CC prep. (<i>n</i> -hexano:CH ₂ Cl ₂ 9,3:0,7) > recrist. acetona; (b) CC, gel de sílica 230-400 mesh, <i>n</i> -hexano:AcOEt grad 9:1 a 1:1. Fr1b: CC, gel de sílica 230-400 mesh, <i>n</i> -hexano:CH ₂ Cl ₂ 9,5:0,5. Fr1c: > CC, gel de sílica 230-400 mesh, <i>n</i> -hexano:AcOEt 9,8:0,2.	[formiato de lup-20(29)-en-3α -ol + acetato de ursan-3β-ol], [acetato de lup-20(29)-en-3α-ol], [lup-20(29)-en-3-ona + lup-20(29)-en-3a-ol], [lup-20(29)-en-3α-ol], [lup-20(29)-en-3α -ol + α-amirina].	(ROMERO-ESTRADA et al., 2016)
Breu comercial	Precipitação seletiva	CC, gel de sílica, grad <i>n</i> -hexano:AcOEt	[α-amirina + β-amirina]	(SILVA-JUNIOR et al., 2017)

CCD = Cromatografia em camada delgada; CC = Coluna cromatográfica; > = seguinte; Fr. = fração; grad = gradiente.

Fonte: Elaboração própria (2017).

Quanto à fase de fracionamento; entre os casos descritos, acima de 70% utilizam como eluente misturas variáveis de *n*-hexano em acetato de etila e coluna cromatográfica com gel de sílica. Solventes clorados como clorofórmio e diclorometano são também utilizados durante o processo de separação dos triterpenos, conforme se constata em 40% dos estudos. Eventualmente, misturas contendo pentano, éter etílico, acetona, metanol e outros também são utilizados durante a separação. Na maioria dos casos envolvendo oleorresinas, são frequentemente purificadas misturas de álcoois triterpênicos pentacíclicos, em especial α -amirina e β -amirina. Um dos estudos (AREGULLIN; GOMPPER; RODRIGUEZ, 2002) lança mão do uso de gel exclusão utilizando a resina Sephadex LH-20 como fase estacionária, para obter frações contendo a mistura de α -amirina e β -amirina, partindo da oleorresina de *Trattinnickia aspera* extraída com clorofórmio.

Todos os dados da Tabela 1 foram gerados por procedimentos de separação de triterpenos a partir de oleorresinas (em especial dos álcoois α - amirina e β -amirina) em escalas analíticas e semipreparativas. Além disso, também corroboram que o fracionamento em gel de sílica ou outra fase estacionária tem sido utilizado tanto para (i) preparar amostras mais limpas (*clean up*) ou concentradas em triterpenos, no intuito de viabilizar a análise qualitativa e quantitativa de extratos contendo estas substâncias; quanto (ii) embasar o estudo de aumento de escala na purificação de triterpenos de oleorresinas como matrizes vegetais.

2.5 ESTRATÉGIAS DE PARA VEICULAÇÃO DE FÁRMACOS DE BAIXA HIDROS-SOLUBILIDADE

Nos últimos anos, os pesquisadores e a indústria farmacêutica vêm debatendo o tema da solubilidade de fármacos e o impacto que este parâmetro tem na viabilização de medicamentos clinicamente eficientes (VARGAS; RAFFIN; MOURA, 2012). Cerca de 70% dos novos candidatos a fármacos, bem como um número expressivo daqueles já utilizados na terapêutica (40%), apresentam baixa solubilidade em água e consequente baixa biodisponibilidade. Isso dificulta ou mesmo inviabiliza a veiculação e a liberação dessas substâncias em sistemas fisiológicos, comprometendo a efetividade das moléculas candidatas a fármacos, independentemente da via de administração (KAWABATA et al., 2011; VAN DER MOOTER, 2012).

Algumas estratégias para superar problemas relacionados com o baixo grau de dissolução dessas substâncias e seus impactos negativos na biodisponibilidade e eficácia terapêutica têm sido classicamente investigadas. Entre elas, alterações na estrutura química

e/ou cristalina (formação de sal e cocrystalis, amorfização, etc.), formação de pró-fármacos, complexação com oligômeros (ex.: ciclodextrinas), redução do tamanho da partícula e utilização de agentes solubilizantes e surfactantes (KAWABATA et al., 2011).

Além dessas abordagens, alguns autores destacam a crescente utilização de sistemas de liberação baseado em carreadores coloidais que, potencialmente, promovem a solubilização de ativos e auxiliam no direcionamento do fármaco para os tecidos-alvo, favorecem a estabilização física e química do agente terapêutico e contribuem para reduzir efeitos colaterais e toxicidade, entre outros (MEHNERT; MÄDER, 2001). O desenvolvimento desses sistemas inclui tanto a utilização de diferentes materiais, tais como polímeros, metais e lipídios, quanto variações nos métodos de obtenção (SOUTO; DOKTOROVOVA; BOONME, 2011; SOUTO; MÜLLER, 2007). Dentre os carreadores largamente empregados destacam-se os lipossomas, as nanopartículas poliméricas, as nanoemulsões e as nanopartículas lipídicas (NL), abaixo delineados em suas principais características.

- Lipossomas: oferecem a vantagem de poderem ser obtidos a partir de materiais altamente similares às membranas celulares como, por exemplo, uma ou várias bicamadas fosfolipídicas, que são capazes de carrear fármacos lipofílicos entre elas, ou fármacos hidrofílicos no seu centro (DOMINGO; SAURINA, 2012).
- Nanopartículas poliméricas: empregando-se polímeros como ácido polilático, ácido poliglicólico, policaprolactona, polianidridos, poliésteres, quitosana, albumina, colágeno ou gelatina, os sistemas são produzidos por dispersão destes, ou pela polimerização de monômeros. A depender da dispersão do ativo na estrutura formada, serão classificadas como nanocápsulas ou nanoesferas (DOMINGO; SAURINA, 2012; VRIGNAUD; BENOIT; SAULNIER, 2011).
- Nanoemulsões: são coloides dispersos multifásicos compostos por óleo, água, e um ou mais agentes surfactantes, podendo ser uma dispersão óleo em água (o/a) ou água em óleo (a/o). Esses sistemas apresentam distribuição granulométrica entre as microemulsões e macroemulsões ou emulsões clássicas (FORGIARINI et al., 2001). Além disso, podem apresentar aparência translúcida quando o tamanho do glóbulo é inferior a 200 nm, ou opaca para os tamanhos de 200 a 500 nm (CAPEK, 2004).
- Nanopartículas lipídicas: são sistemas constituídos por lipídios no estado sólido, que geram sistemas geralmente considerados vantajosos para a liberação de ativos, com relação a serem seguros, biocompatíveis e biodegradáveis. Podem ser preparadas por

uma diversidade de técnicas, as quais também influenciam diretamente em algumas características das partículas obtidas, como tamanho, morfologia e capacidade de acomodar mais homogeneamente a distribuição do fármaco. Atualmente, os métodos mais descritos na literatura para a obtenção dessas partículas compreendem o uso de homogeneizadores de alta pressão e outros que geram sistemas sólidos a partir de microemulsões (CHAUDHARI, 2012; WISSING; KAYSER; MÜLLER, 2004).

A caracterização físico-química dos carreadores mencionados é fundamental para assegurar o sucesso no desenvolvimento de sistemas de liberação neles baseados. Usualmente, passa pela determinação do tamanho e do potencial zeta (carga superficial) da partícula, avaliação de sua morfologia, determinação da eficiência de incorporação (concentração do fármaco no sistema), medida da cinética da liberação do fármaco, e avaliação da estabilidade dos sistemas em função do tempo e temperatura de armazenamento (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000).

No caso específico das NL, estas podem ser do tipo nanopartícula lipídica sólida (NLS) ou carreador lipídico nanoestruturado (CLN) que são destinados a veiculação de moléculas hidrofóbicas. As alternativas do conjugado lipídio-fármaco (CLF) ou nanopartícula híbrida lipídio-polímero (NLP) são voltadas para encapsular moléculas hidrofílicas. As NLS foram as primeiras a serem desenvolvidas; seguidas pelos CLN e pelos CFL (CHAUDHARI, 2012; WISSING; KAYSER; MÜLLER, 2004).

O tamanho nanométrico das NLS assemelham-nas às emulsões, com a principal diferença residindo no núcleo formado por lipídios sólidos em temperaturas ambiente e corporal. As principais vantagens associadas a este sistema são: (i) baixa toxicidade, (ii) possibilidade de liberação sustentada e/ou direcionada, (iii) permanência mais duradoura na corrente sanguínea, (iv) capacidade aumentada para atravessar a barreira hematoencefálica sem danificar estruturas, (v) promoção da estabilidade do fármaco, (vi) maior capacidade em adequar a tolerabilidade com incremento da biodisponibilidade, e (vii) alto grau de reprodutibilidade no aumento da escala em seu processo de obtenção (BISKUP et al., 2012).

Os CLN são NLS de segunda geração, baseados em misturas de lipídios sólidos com lipídios líquidos, cujo objetivo é aperfeiçoar o aprisionamento do fármaco e assim aumentar a estabilidade do sistema, em comparação com as NLS (GUPTA; JAIN, 2010; MEYAGUSKU, 2014). Os CLN podem apresentar três diferentes morfologias, de acordo com a variação de sua composição lipídica e processo de preparação: o tipo I, caracterizado por uma estrutura cristalina que apresenta imperfeições consequentes de pequenas quantidades do lipídio líquido

acrescido à matriz sólida; o tipo II, constituído por uma matriz amorfa obtida ao se empregar lipídios que não recristalizam; e o tipo III, conhecido como modelo múltiplo, caracterizado pela presença de pequenos compartimentos de lipídio líquido dentro da matriz sólida (SHAH et al., 2015).

2.6 A IMPORTÂNCIA DO PARÂMETRO SOLUBILIDADE NO DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO

A aplicação de carreadores coloidais como sistemas de liberação de moléculas e fitocomplexos de origem natural vem sendo extensivamente investigada por alguns grupos de pesquisa (BHARALI et al., 2011; MCCARRON et al., 2008; NARAYANAN et al., 2010; PONGJANYAKUL; PRAKONGPAN; PRIPREM, 2003; SANNA et al., 2013).

Um exemplo é o estudo de Rodrigues e colaboradores (2013), que incluiu isômeros de amirina extraídos das folhas de *Protium spruceanum* em nanoemulsões, visando potencializar a liberação e veiculação destas moléculas. Neste caso, a nanoemulsão contendo os triterpenos induziu um incremento significativo da biodisponibilidade oral, quando comparado com uma mistura não formulada. Tal fato pode ser atribuído ao aumento da solubilidade dos triterpenos, proporcionado pelo nanossistema.

Entretanto, alguns estudos relacionados ao desenvolvimento de NL para carrear IFA de origem natural, com baixa hidrossolubilidade, têm constatado que a quantidade destes incorporada nas nanoformulações ainda se apresenta aquém do nível necessário para a eficácia farmacológica (DOKTOROVOVA; SOUTO; SILVA, 2018; VAUCHER, 2017). Um exemplo recente é o estudo de Doktorovova e colaboradores (2018) que relacionou a ausência da resposta esperada na atividade citotóxica com o fato das NLS contendo curcumina resultarem em baixo percentual de incorporação desse fármaco no sistema. No intuito de aperfeiçoar essa nanoformulação, os autores destacam a importância da solubilidade da curcumina nos lipídios selecionados para o estudo.

Assim, estes resultados evidenciam que a solubilidade deve ser considerada como um parâmetro-chave durante estudos de pré-formulação farmacêutica, em especial nos casos de IFA de baixa hidrossolubilidade. Ressalta-se, ainda, como uma propriedade crítica no comportamento farmacocinético de moléculas candidatas a fármacos, sendo por isso considerada uma condição fundamental para o sucesso do desenvolvimento de novos medicamentos (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013, p.18).

No caso da produção de NLS contendo curcumina (DOKTOROVOVA; SOUTO; SILVA, 2018), os autores entenderam como crucial uma avaliação preliminar da solubilidade desta substância nos lipídios. Para tal, lançaram mão de uma abordagem teórica, envolvendo cálculos de Parâmetros de Solubilidade de Hansen (PSH) em paralelo com os experimentos laboratoriais. Os cálculos de PSH apresentaram-se bastante coerentes com os resultados experimentais de quantificação para a incorporação de curcumina, demonstrando assim, a validade desta ferramenta teórica na previsão de alguns fenômenos físico-químicos envolvidos nas etapas de pré-formulação. Dessa forma, o uso desta ferramenta apresenta uma relação custo-benefício favorável para os ensaios que envolvem solvatação molecular, além de possibilitar vantagens na racionalização, celeridade e diminuição de custos nas etapas do desenvolvimento farmacêutico (SHAH; AGRAWAL, 2013).

2.6.1 Parâmetros de Solubilidade de Hansen e suas aplicações farmacêuticas

A solubilidade pode ser definida como o grau de mistura molecular entre duas ou mais substâncias no equilíbrio termodinâmico (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013, p.18). Dessa forma, do ponto de vista físico-químico, a teoria baseada em avaliação de parâmetros de solubilidade (PS) pode fornecer subsídios importantes para a compreensão do fenômeno de solubilidade e para a escolha da melhor composição de excipientes, visando maximizar as possibilidades de obtenção de sistemas estáveis para o carregamento de fármacos.

Dentre as propostas que equacionam a solubilidade de substâncias em determinados meios (solventes), destaca-se a teoria desenvolvida por Hansen. Esta considera a solubilidade como um fenômeno para o qual contribuem três parâmetros, que correspondem às forças de interação intermoleculares; são elas: força de dispersão, força de interação polar e força de ligação de hidrogênio (HANSEN, 2007).

As forças mais comumente observadas são as forças de interação não polares, chamadas de forças de dispersão ou energia coesiva de dispersão (E_D). Estas ocorrem normalmente em hidrocarbonetos alifáticos saturados. Já as interações dipolo permanente traduzem a energia coesiva de interação polar (E_P) presente em grande parte das moléculas. O terceiro tipo de energia envolvida é aquela proveniente de ligações de hidrogênio (E_H) consequentes da atração entre as moléculas que possibilitam este tipo de interações, como álcoois, ácidos carboxílicos e outros. Dessa forma, a teoria de Hansen é orientada pela equação I, na qual a energia coesiva total é a resultante da soma das contribuições das três forças mencionadas (HANSEN, 2007).

$$E = E_D + E_P + E_H \quad (\text{Equação I})$$

Dividindo-se a equação pelo volume molar (v) tem-se a raiz quadrada do parâmetro de solubilidade total, representado nas equações II e III.

$$\frac{E}{v} = \frac{E_D}{v} + \frac{E_P}{v} + \frac{E_H}{v} \quad (\text{Equação II})$$

$$\delta_T^2 = \delta_D^2 + \delta_P^2 + \delta_H^2 \quad (\text{Equação III})$$

Sendo δ_D o parâmetro de dispersão, δ_P o parâmetro polar e δ_H o parâmetro de ligação de hidrogênio. Estes três parâmetros, quando plotados em gráfico, originam um sistema cartesiano tridimensional, no qual cada dimensão corresponde a um dos três parâmetros (BATISTA, 2010).

A utilidade mais prática e básica do PSH deriva da seguinte assertiva: “substâncias com parâmetros de solubilidade próximos são prontamente miscíveis, enquanto aquelas com parâmetros distantes são praticamente imiscíveis”.

Os PSH podem ser calculados utilizando o *software* HSPiP, produzido e disponibilizado pela equipe de Hansen, ou por fórmulas modificadas por outros autores, como por exemplo, o método de Stefanis-Panayiotou (STEFANIS; PANAYIOTOU, 2008). Este método baseia seus cálculos na contribuição de grupos funcionais presentes na estrutura das substâncias envolvidas. Estes são considerados como grupos funcionais de primeira ordem quando descrevem a estrutura molecular básica, ou de segunda ordem, quando são baseados na teoria de conjugação (STEFANIS; PANAYIOTOU, 2008). Isto posto, a equação básica que fornece os valores de cada parâmetro da estrutura molecular é dada pela Equação IV:

$$f(x) = \sum_i N_i C_i + W \sum_j M_j D_j \quad (\text{Equação IV})$$

Sendo C_i a contribuição dos grupos funcionais de primeira ordem, que ocorrem N_i vezes, D_j a contribuição dos grupos funcionais de segunda ordem, que ocorrem M_j vezes na estrutura e a constante W é igual a 1 ou a 0, dependendo de a substância apresentar ou não grupos de segunda ordem, respectivamente.

Os parâmetros: δ_D , δ_P e δ_H são calculados através das Equações V, Va, Vb, VIa e VIb, respectivamente. As Equações Vb e VIb são usadas quando os valores de δ_P e δ_H , fornecidos pelas Equações Va e VIa, respectivamente, forem menores que $3 \text{ MPa}^{(1/2)}$.

$$\delta_D = (\sum_i NiCi + W \sum_j MjDj + 17,3231) \text{ MPa}^{(1/2)} \quad (\text{Equação V})$$

$$\delta_P = (\sum_i NiCi + W \sum_j MjDj + 7,35480) \text{ MPa}^{(1/2)} \quad (\text{Equação Va})$$

$$\delta_P = (\sum_i NiCi + W \sum_j MjDj + 2,76470) \text{ MPa}^{(1/2)} \quad (\text{Equação Vb})$$

$$\delta_H = (\sum_i NiCi + W \sum_j MjDj + 7,97930) \text{ MPa}^{(1/2)} \quad (\text{Equação VIa})$$

$$\delta_H = (\sum_i NiCi + W \sum_j MjDj + 1,3720) \text{ MPa}^{(1/2)} \quad (\text{Equação VIb})$$

O modelo teórico de Hansen é uma ferramenta comumente empregada nos processos de produção de tintas, insumos agrícolas e diversas outras áreas, inclusive no desenvolvimento farmacêutico como apontado por Hancock e colaboradores (1997) que empregaram os PSH para a seleção do melhor agente aglutinante no processo de granulação por via úmida de comprimidos.

Adicionalmente, no estudo de Adamsla e Voelkel (2006), na área de cosméticos, os autores elegeram o surfactante mais adequado à estabilização da formulação desejada com base nos cálculos de PS. Nesse mesmo estudo, foram estimados os PSH para diversos excipientes, como cetiol B, Tween 80, polietilenoglicol e polivinilpirrolidona, objetivando prever possíveis interações IFA-excipiente que pudessem ser deletérias para a estabilidade do produto final.

Face ao exposto, a presente proposta explora diferentes abordagens, como os cálculos de PSH e ensaios experimentais envolvendo cromatografia em camada delgada (CCD) e análise densitométrica, para avaliação da solubilidade de frações padronizadas pelo conteúdo de triterpenos pentacíclicos em matrizes lipídicas com vistas ao desenvolvimento de CLN. Assim como pretende contribuir e agregar conhecimento para o fortalecimento e consolidação do desenvolvimento de produtos fitoterápicos a partir de moléculas da biodiversidade brasileira.

3 JUSTIFICATIVA

A escolha da oleorresina de espécies de Burseraceae foi motivada pelo alto conteúdo de triterpenos que esta matéria-prima apresenta em sua constituição, além de ser obtida de fonte e por processos sustentáveis. Destaca-se ainda o fato de ser um insumo da biodiversidade relativamente abundante na floresta tropical brasileira, cuja agregação de valor pode contribuir diretamente para o aumento de renda de comunidades envolvidas no manejo deste PFTM (Associação Vida Verde da Amazônia – AVIVE) (UNDP, 2012).

O acúmulo de dados na literatura aponta para um aumento das publicações sobre atividades farmacológicas de triterpenos. Contudo, ainda há obstáculos a serem superados para desenvolver produtos farmacêuticos com base nestas moléculas. Um dos principais deles diz respeito à baixa solubilidade dessa classe química na maioria dos solventes próticos (água, álcoois, etc.). A busca em superar este entrave motivou a presente proposta, idealizada com base na avaliação da viabilidade de incorporação de frações triterpênicas em CLN.

A escolha de CLN justifica-se pela natureza hidrofóbica dos triterpenos-alvo do estudo, além de sistemas como estes serem vantajosos devido à sua maior estabilidade frente a outros carreadores coloidais, menor toxicidade, e também facilidade de escalonamento (HU et al., 2005). Para tal desenvolvimento, os estudos de solubilidade dos triterpenos em excipientes são essenciais (SHAH; AGRAWAL, 2013; DOKTOROVOVA; SOUTO; SILVA, 2018). Entretanto, a literatura relacionada a este tema é bastante escassa.

Neste contexto, esta abordagem tem potencial para gerar tecnologias inovadoras e novos conhecimentos em uma área pouco explorada, contribuindo assim para valorizar os produtos naturais como fonte de insumos farmacêuticos inovadores.

Não menos importante, os resultados gerados no desenvolvimento desta proposta serão bastante úteis para os projetos de pesquisa do Laboratório de Produtos Naturais 4 (PN4) de Farmanguinhos-Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) que envolvem substâncias terpenóides, assim como para a cooperação científica com o Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento Farmacotécnico em Sistemas Micro- e Nanoestruturados da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver metodologias de obtenção, purificação e de caracterização físico-química de frações de oleorresinas de espécies da família Burseraceae, padronizadas quanto ao teor de triterpenos pentacíclicos, e estudar a viabilidade da incorporação destas frações em carreadores lipídicos nanoestruturados.

Os objetivos específicos do trabalho são:

- a) obter, processar e caracterizar quimicamente a matéria-prima, oleorresina terpênicaproveniente de espécies vegetais da família botânica Burseraceae (breu).
- b) Otimizar a metodologia de cromatografia de fase gasosa (CG) para caracterizar os triterpenos pentacíclicos do breu.
- c) Obter frações concentradas em α -amirina e β -amirina a partir do breu, utilizando técnicas cromatográficas de fracionamento e purificação.
- d) Caracterizar os triterpenos pentacíclicos nas frações por técnicas cromatográficas.
- e) Otimizar o processo de fracionamento considerando a seletividade do método cromatográfico e a pureza resultante para a mistura de α -amirina e β -amirina.
- f) Transpor a escala do processo selecionado para produzir até 50 g da fração concentrada em α -amirina e β -amirina (lote único).
- g) Desenvolver técnicas de quantificação dos isômeros de amirinas nas frações: cromatografia em camada delgada (CCD) e análise densitométrica e CG.
- h) Estudar a viabilidade de utilização do colesterol como padrão externo na quantificação dos triterpenos pentacíclicos das diferentes matrizes.
- i) Caracterizar físico-quimicamente o lote único.
- j) Avaliar a solubilidade do lote único em lipídios líquidos e sólidos, através de cálculos teóricos de parâmetros de solubilidade de Hansen (PSH) e experimentalmente.
- k) Desenvolver os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), contendo lote único, pelo método de microemulsificação a quente.
- l) Caracterizar os CLN quanto ao aspecto macroscópico, pH, distribuição de tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e análise térmica.

5 MATERIAL E MÉTODO

5.1 MATERIAL

5.1.1 Matérias-primas, solventes, reagentes e soluções

- Água ultrapura com resistividade 18,1 M Ω - cm (Millipore, São Paulo, Brasil).
- Acetato de etila 99,8% grau HPLC/UV (Tedia, Fairfield, EUA).
- Ácido oleico (Synth, São Paulo, Brasil).
- Álcool etílico 99,5% grau HPLC/UV (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil).
- Álcool metílico 99,8% grau HPLC/UV (Tedia, Fairfield, EUA).
- Behenato de glicerila (Compritol 888ATO) (Gattefossé, Lyon, França).
- Clorofórmio 99,8% grau HPLC/UV (Tedia, Fairfield, EUA).
- Cromatoplaça de gel de sílica 60F-254 (20 x 20 cm) (Merck, Darmstadt, Alemanha).
- Diazald 99% (Sigma Aldrich, Missouri, EUA).
- Diclorometano 99,8% grau HPLC/UV (Tedia, Fairfield, EUA).
- Éter etílico 99,8% (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil).
- Gel de sílica 60 GF-254 5-40 μ m (Merck, Darmstadt, Alemanha).
- Hidróxido de potássio 85% P.A. (Merck, Darmstadt, Alemanha).
- Metilparabeno P.A. (Nipagin) (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil).
- Miristato de isopropila (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil).
- Monoestearato de glicerila (Synth, São Paulo, Brasil).
- Monoestearato de sorbitano (Span 60) (Sigma Aldrich, Missouri, EUA).
- *n*- hexano 95% grau HPLC/UV (Tedia, Fairfield, EUA).
- Oleoresina bruta - breu (Mercado Municipal de Manaus, Amazonas, 2001).
- Polissorbato 80 (Tween 80) (Synth, São Paulo, Brasil).
- Propilparabeno P.A (Nipazol) (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil).
- Resina Sephadex LH-20 (GE Healthcare Life Science, Boston, EUA).
- Solução aquosa de cloreto de potássio 1 mM.
- Solução metanólica de anisaldeído sulfúrico 0,5% (p/v).
- Soluções salinas pH 4,0 e 7,0.

5.1.2 Materiais de referência

- Mistura de α -amirina (49,8%) e β -amirina (27,6%) obtida em estudos prévios no laboratório PN-4/FIOCRUZ, a partir da oleorresina fresca da espécie *Protium altsonii* (Sandwith) e quantificadas em cromatografia de fase gasosa com detecção por ionização de chamas (CG-DIC) conforme item 5.2.6.6 (SIANI et al., 1999). Esta foi empregada como referência nas análises de cromatografia em camada delgada (CCD) e nas análises semiquantitativas de densitometria sendo codificada como “A”.
- Colesterol (95%, Sigma Aldrich, Missouri, EUA) foi purificado por CCD - preparativa em gel de sílica 60 e eluição com mistura de 2% de acetona em clorofórmio alcançando grau de pureza de 96,3 % determinado pelo método de normalização de áreas em CG-DIC (conforme condições descritas no item 5.2.6.6). Este foi empregado como padrão externo nas análises de quantificação.

5.1.3 Equipamentos e acessórios

- Agitador mecânico 713-D (Fisatom Equipamentos Científicos, São Paulo, Brasil).
- Analisador de partículas Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra).
- Aparelho digital de ponto de fusão MQAPF-302 (Microquímica, São Paulo, Brasil).
- Balança analítica AUY220, precisão 1 mg – 220 g (Shimadzu, Kioto, Japão).
- Balança analítica de determinação de umidade ID-50, sensibilidade de 0,001 g (Marte Científica, São Paulo, Brasil).
- Banho de ultrassom USC1800A (UNIQUE, São Paulo, Brasil).
- Bomba a vácuo LR67161 / 1350-1620 rpm (Greiffenberger AG, Marktredwitz, Alemanha).
- Colunas cromatográficas capilares: HP-5 (30 m x 250 μ m x 0,25 μ m de espessura do filme), HP-35 (30 m x 250 μ m x 0,25 μ m de espessura do filme), HP-1701 (30 m x 320 μ m x 0,25 μ m de espessura do filme), HP-17HT (30 m x 250 μ m x 0,15 μ m de espessura do filme) e HP-INNOWAX (30 m x 250 μ m x 0,25 μ m de espessura do filme) (Agilent Technologies, Califórnia, EUA).
- Cromatógrafo a gás com detector de ionização em chama, modelo 6890 (Agilent Technologies, Califórnia, EUA).

- Cromatógrafo a gás modelo 6890N acoplado a espectrômetro de massas mono quadrupolar modelo 5973N (Agilent Technologies, Califórnia, EUA)
- Espectrômetro de infravermelho Nicolet 6700 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA).
- Equipamento de calorimetria diferencial exploratória - DSC-822 (Mettler Toledo, Ohio, EUA).
- Equipamento de análise termogravimétrica - TGA/SDTA-851 (Mettler Toledo, Ohio, EUA).
- Evaporador rotatório V-850 (Büchi, São Paulo, Brasil).
- Filtro de seringa Millipore 0,22 µm de celulose regenerada (Merck, Darmstadt, Alemanha).
- Filtro de seringa Millipore 0,45 µm de celulose regenerada (Merck, Darmstadt, Alemanha).
- Kit Diazald (Sigma Aldrich, Missouri, EUA).
- Medidor de pH mPA-210 (Ms Tecnocon, São Paulo, Brasil).
- Papel de filtro grau 42: 2,5 µm (Whatman, Maidstone, Inglaterra).
- Placa de aquecimento PC-320 (Corning, Rio de Janeiro, Brasil).
- *Software* Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System versão 2.71 (National Institute of Standards and Technology –NIST, EUA).
- *Software* Excel 2013 (Microsoft Corporation, Washington, EUA).
- *Software* Graphpad Prism – versão 7.0 (GraphPad *Software*- Inc., Califórnia, EUA).
- *Software* HSPiP - 5ª edição – versão 5.0.06 (Charles Hansen, Horsholm, Dinamarca).
- *Software* ImageJ – versão 1.43u (Wayne Rasband, Bethesda, EUA).
- Tamises 3,5-60 mesh de aço inox (Bertel, São Paulo, Brasil).
- Ultra-turrax T-25 digital (Biovera, Rio de Janeiro, Brasil).
- Vidrarias de uso laboratorial.

5.2 MÉTODO

A seguir, a Figura 3 apresenta um esquema metodológico contendo as principais etapas realizadas no desenvolvimento do presente estudo com o objetivo de facilitar o entendimento.

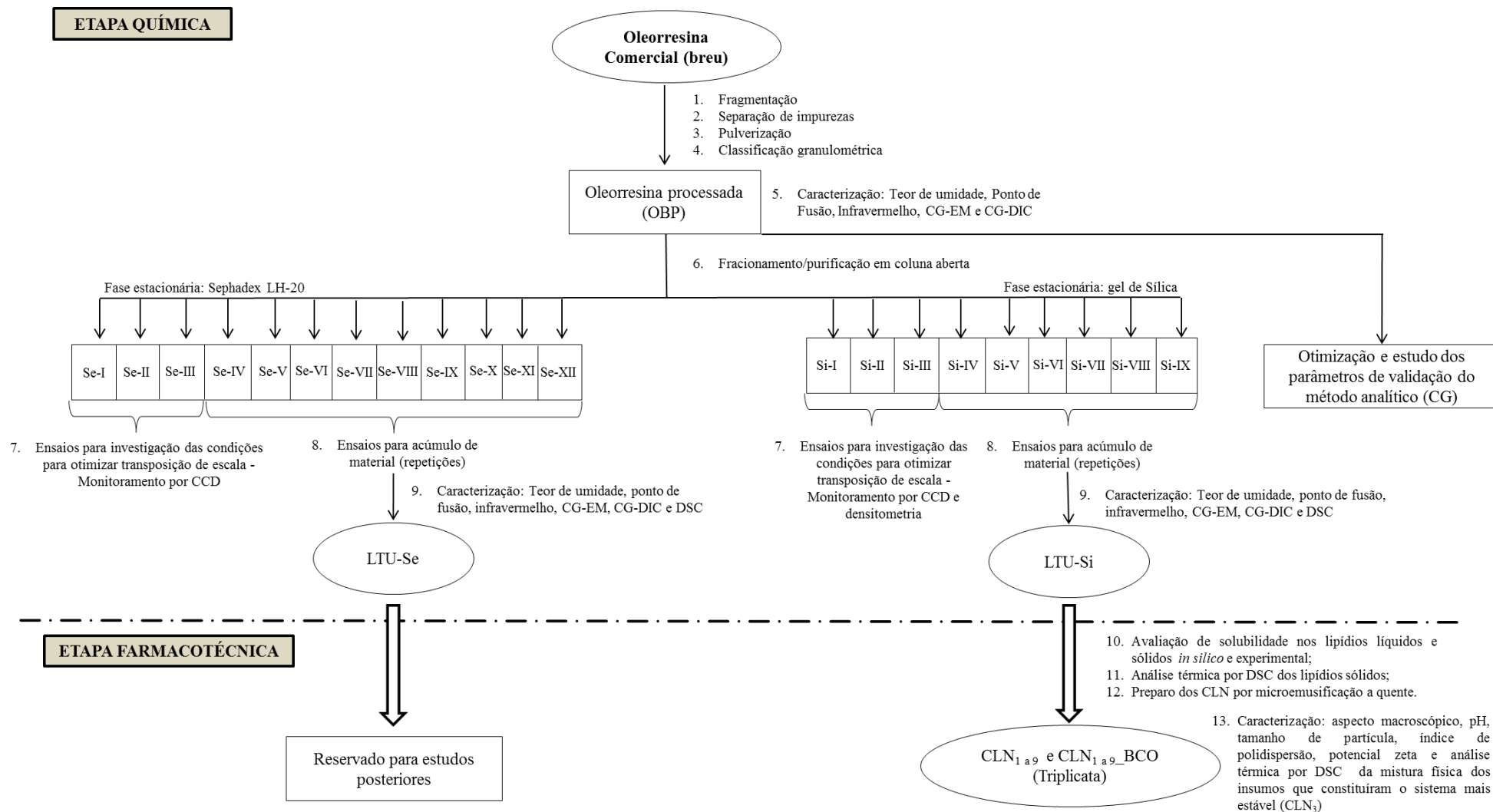


Figura 3: Esquema metodológico das principais etapas envolvidas no presente estudo.

5.2.1 Obtenção e processamento da matéria-prima bruta (breu)

Quinze quilos de oleorresina de breu foram adquiridos no Mercado Municipal de Manaus, Amazonas, no ano de 2001, e mantidos em recipientes hermeticamente fechados no laboratório de produtos naturais 4 (PN4) em Farmanguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, à temperatura ambiente.

Parte deste lote (aproximadamente 3 kg) foi fragmentada com auxílio de um martelo, seguida de pulverização com pistilo em almofariz de porcelana. O breu pulverizado foi separado através de um conjunto de tamises de aço inox com malhas variando entre 3,5-60 mesh (5,60-0,250 mm). As partículas com granulometria menor que 32 mesh (500 μm) foram selecionadas e acondicionadas separadamente à temperatura ambiente em um recipiente de vidro âmbar vedado, devidamente rotulado e identificado como oleorresina de breu processada (OBP), até o momento de sua utilização.

5.2.2 Fracionamento e purificação da oleorresina de breu processado

Para o fracionamento e purificação da OBP foram empregadas duas técnicas de separação cromatográfica em coluna, de acordo com a fase estacionária (FE), sendo estas: gel de sílica e a resina Sephadex LH-20.

5.2.2.1 Fracionamento e purificação do breu processado em coluna de gel de sílica

As pastilhas foram preparadas em almofariz de porcelana a partir da adição de gel de sílica 60 sobre uma solução de OBP em CH_2Cl_2 (0,17 – 0,45 g/mL) em quantidade suficiente para adsorção sob constante agitação até evaporação do solvente. A massa de sílica empregada nesta etapa foi determinada por diferença entre a massa do almofariz contendo a sílica impregnada por solução de OBP e este vazio (Tabela 2).

As colunas de sílica foram preparadas em funis de vidro sinterizado acoplados a um Kitasato e uma bomba a vácuo (Tabela 2 e Figura 4). Quantidades suficientes de gel de sílica foram depositadas sobre papel de filtro adaptado à placa porosa do funil. Em seguida, outro círculo de papel de filtro foi adaptado sobre a fase estacionária (FE), no qual foi acondicionada a pastilha contendo OBP. A quantidade de sílica empregada para o leito da coluna foi constante e equivalente a 102g nos experimentos iniciais (denominados: Si-I a III), calculada com base em descrições análogas da literatura (CARVALHO et al., 2010). Já no

caso do experimento de transposição de escala semi-preparativa para preparativa (Si-IV a X), utilizou-se o fator de escalonamento de 5x, sendo empregado cerca de 510 g para a confecção do leito.

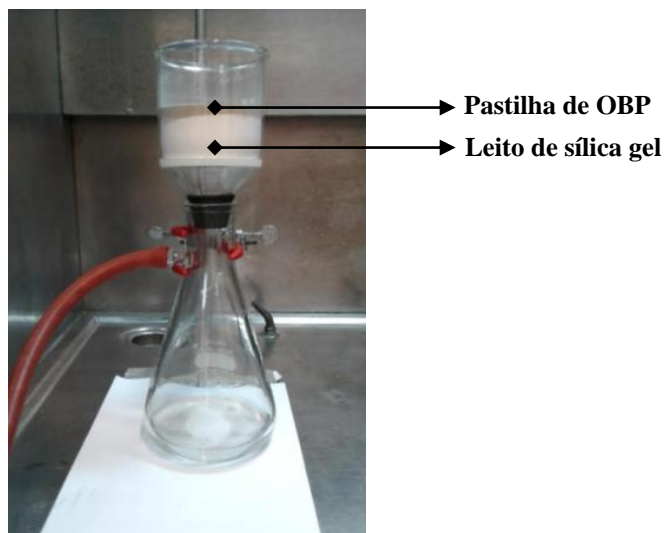


Figura 4: Coluna Cromatográfica com Vácuo (CCV) (“coluna filtrante”) para fracionar e purificar OBP.

Um total de dez experimentos foram realizados, utilizando-se como fase móvel (FM) misturas de *n*-hexano e AcOEt em eluição gradiente com polaridade crescente, e procedendo-se o esgotamento do volume da coluna a cada fração recolhida. Considerando todos os experimentos, a composição de *n*-hexano:AcOEt na FM variou entre 9,5:0,5 e 1:1, com coletas de frações de 100, 300 ou 1500 mL, as quais foram transferidas para frascos Erlenmeyer e, posteriormente, secas em evaporador rotatório (Tabela 2). Os resíduos foram armazenados em dessecador até o momento das análises de caracterização. As etapas do experimento foram monitoradas por CCD seguida de análise semiquantitativa por densitometria (item 5.2.6.4 e 5.2.6.5).

Tabela 2: Experimentos realizados e seus respectivos sistemas de eluição para o fracionamento e purificação de OBP em gel de sílica.

Experimento	Altura × diâmetro (cm) do funil*	Massa OBP pastilha (g)	Massa sílica pastilha (g)	Massa sílica leito (g)	Composição da fase móvel	Frações e volumes (mL)
Si-I	8,5 x 9,3	3,4	9,0	102	<i>n</i> -hexano	F1 (300)
					<i>n</i> -hexano:AcOEt 9:1	F2-F4 (300)
					<i>n</i> -hexano:AcOEt 8:2	F5-F6 (300)
					<i>n</i> -hexano:AcOEt 5:5	F7-F8 (300)
Si-II	8,5 x 9,3	3,4	9,0	102	<i>n</i> -hexano	F9 (300)
					<i>n</i> -hexano:AcOEt 9,5:0,5	F10-12 (100)
					<i>n</i> -hexano:AcOEt 9,5:0,5	F13-F14 (300)
					<i>n</i> -hexano:AcOEt 9:1	F15-F17 (300)
Si-III	8,5 x 9,3	9,1	12,3	102	<i>n</i> -hexano	F18 (300)
					<i>n</i> -hexano:AcOEt 9,5:0,5	F19-21 (100)
					<i>n</i> -hexano:AcOEt 9,5:0,5	F22-F24 (300)
					<i>n</i> -hexano:AcOEt 9:1	F25-F27 (300)
Si-IV a Si-X	13 x 19,2	45	52,0	510	<i>n</i> -hexano	F28 (1500)
					<i>n</i> -hexano:AcOEt 9,5:0,5	F29-31 (500)
					<i>n</i> -hexano:AcOEt 9,5:0,5	F32-F34 (1500)
					<i>n</i> -hexano:AcOEt 9:1	F35-F37 (1500)

*Funil de placa porosa fina, segundo descrição do fabricante.

5.2.2.2 Fracionamento e purificação do breu processado em coluna de Sephadex LH-20

Quantidades de resina Sephadex LH-20, equivalentes ao volume do leito (Tabela 3), foram condicionadas utilizando volumes de EtOH suficientes para seu recobrimento total. Soluções de OBP em EtOH (100 mg/mL) foram preparadas sob sonicação em banho de ultrassom (15 minutos) e filtradas em membrana de celulose regenerada de 0,22 µm, sendo imediatamente aplicadas na parte superior da coluna com auxílio de pipeta Pasteur.

Um total de doze experimentos foram realizados, utilizando colunas de vidro com diferentes dimensões ($h = 18,5-31,2$ cm x $\Phi = 2,2-6,0$ cm) e eluição isocrática com EtOH absoluto conforme condições descritas na Tabela 3.

Tabela 3: Experimentos realizados e seus respectivos sistemas de eluição para o fracionamento e purificação de OBP em Sephadex LH-20.

Experimentos	Altura × diâmetro (cm) da coluna	Massa OBP (g)	Volume de leite (mL)	Vazão da coluna (mL/min)	Frações e volumes (mL)
Se-I	21,5 × 2,2	0,5	80	1	F38-F43 (10)
Se-II	21,5 × 2,2	1,0	80	1	F44-F50 (10)
Se-III	18,5 × 4,8	5,0	275	2	F51-F61 (20)
Se-IV a Se-XII	31,2 × 6,0	20	1000	9	F62-F82 (50)

As frações coletadas foram transferidas para frascos Erlenmeyer e posteriormente secas em evaporador rotatório. Os resíduos foram armazenados em dessecador até o momento das análises de caracterização. Todos os experimentos foram monitorados por CCD seguida de análise semiquantitativa por densitometria (item 5.2.6.4 e 5.2.6.5).

5.2.3 Obtenção dos lotes escalonados das frações terpênicas concentradas em amirina

As frações contendo os triterpenos pentacíclicos α -amirina e β -amirina, que apresentaram similaridade em CCD e na resposta densitométrica, foram reunidas para compor os lotes únicos codificados como LTU-Sílica (LTU-Si) e LTU-Sephadex (LTU-Se), pelo fracionamento e purificação da OBP em gel de sílica e o pelo fracionamento e purificação da OBP em Sephadex LH-20, respectivamente.

As frações de interesse foram reunidas e homogeneizadas em almofariz de porcelana, empregando-se o método de diluição geométrica, no qual quantidades pequenas do material foram pouco a pouco homogeneizadas, de forma que as quantidades subsequentes correspondessem sempre ao volume total de homogeneizado resultante. Ambos os lotes únicos foram armazenados em dessecador até as análises de caracterização (item 5.2.6). No caso especificamente do LTU-Si foram realizados também estudos de avaliação da viabilidade de incorporação deste lote em CLN (item 5.2.8), enquanto o LTU-Se foi mantido em armazenamento visando estudos posteriores.

5.2.4 Otimização de metodologia para a caracterização dos triterpenos pentacíclicos por cromatografia de fase gasosa

Com base na metodologia de CG-DIC descrita por Siani e colaboradores (2012), procedeu-se a otimização das condições cromatográficas visando à determinação do ponto de maior eficiência na separação dos triterpenos da OBP. Para esta etapa foram testadas quatro colunas diferentes daquela empregada pelo autores, que são mencionadas na Tabela 4, juntamente com a programação de temperatura utilizada em cada análise.

Tabela 4: Colunas cromatográficas com as respectivas dimensões, composições químicas e programações de temperaturas do forno empregadas para a otimização da metodologia em CG-DIC.

Coluna capilar	Dimensões da coluna (m x μm x μm)	Constituição química do suporte da coluna	Programação de temperatura do forno	Tempo total de análise (min)
HP-5 (SIANI et al., 2012)	30 m x 250 μm e 0,25 μm de espessura do filme	5% difenil-polisiloxano e 95% dimetil-polisiloxano	$T_0 = 50\text{ }^\circ\text{C}$ (isoterma: 5 min) <u>Rampa 1:</u> 20 $^\circ\text{C}/\text{min}$ – $T_1 = 230\text{ }^\circ\text{C}$ <u>Rampa 2:</u> 5 $^\circ\text{C}/\text{min}$ – $T_2 = 290\text{ }^\circ\text{C}$ (isoterma: 15 min).	36
HP-35	30 m x 250 μm e 0,25 μm de espessura do filme	35% difenil-polisiloxano e 65% dimetil-polisiloxano	$T_0 = 50\text{ }^\circ\text{C}$ (isoterma: 5 min) <u>Rampa 1:</u> 20 $^\circ\text{C}/\text{min}$ – $T_1 = 230\text{ }^\circ\text{C}$ <u>Rampa 2:</u> 5 $^\circ\text{C}/\text{min}$ – $T_2 = 300\text{ }^\circ\text{C}$ (isoterma: 15 min).	43
HP-1701	30 m x 320 μm e 0,25 μm de espessura do filme	14% cianopropil-fenilpolisiloxano e 86% dimetil-polisiloxano	$T_0 = 50\text{ }^\circ\text{C}$ (isoterma: 5 min) <u>Rampa 1:</u> 20 $^\circ\text{C}/\text{min}$ – $T_1 = 230\text{ }^\circ\text{C}$ (isoterma: 7 min)	21
HP-17HT	30 m x 250 μm e 0,15 μm de espessura do filme	50% difenil-polisiloxano e 50% dimetil-polisiloxano	$T_0 = 50\text{ }^\circ\text{C}$ (isoterma: 5 min) <u>Rampa 1:</u> 20 $^\circ\text{C}/\text{min}$ – $T_1 = 230\text{ }^\circ\text{C}$ <u>Rampa 2:</u> 5 $^\circ\text{C}/\text{min}$ – $T_2 = 350\text{ }^\circ\text{C}$ (isoterma: 9 min).	47
HP-INNOWA X	30 m x 250 μm e 0,25 μm de espessura do filme	100% de polietilenoglicol	$T_0 = 50\text{ }^\circ\text{C}$ (isoterma: 5 min) <u>Rampa 1:</u> 20 $^\circ\text{C}/\text{min}$ – $T_1 = 230\text{ }^\circ\text{C}$ <u>Rampa 2:</u> 5 $^\circ\text{C}/\text{min}$ – $T_2 = 270\text{ }^\circ\text{C}$ (isoterma: 15 min)	37

T= temperatura em graus Celsius.

As demais condições de análise foram reproduzidas da literatura (SIANI et al., 2012) e mantidas constantes para todas as colunas testadas, sendo utilizado o injetor do tipo

split/splitless (290 °C) com divisão de vazão igual a 1:25, hidrogênio como gás de arraste com vazão constante de 1,8 mL/minuto e volume de injeção de 1,0 µL da solução de OBP a 1mg/mL em CHCl₃.

5.2.5 Viabilidade da quantificação dos triterpenos pentacíclicos utilizando colesterol como padrão externo

Para avaliar a viabilidade do uso do colesterol como padrão externo na quantificação dos triterpenos pentacíclicos nas diferentes matrizes estudadas, foram analisados alguns parâmetros relativos à resposta do método analítico em CG-DIC (condições descritas no item 5.2.4 para a coluna HP-17HT) ao colesterol: linearidade e faixa de trabalho, precisão em nível de repetitividade, limite de detecção e limite de quantificação. Os requisitos preconizados pelo Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, disponível na RDC 166/2017 (ANVISA, 2017), e pelo International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Validation of Analytical- Q2B- Procedures: Methodology (ICH, 1996) foram aplicados.

Os resultados foram apresentados como média ± desvio-padrão. Também, foram utilizadas análises de variância (ANOVA) e teste t, de *Student*, quando pertinentes, com o auxílio do *software* Excel 2013. Aos dados em que ANOVA indicou média quadrática entre grupos significativa relativamente à média quadrática dos grupos foi aplicado o teste de Turkey de comparação de médias aos pares. O limite de significância foi considerado como 5% ($p < 0,05$).

5.2.5.1 Linearidade e faixa de trabalho

As curvas analíticas para o colesterol (padrão externo) foram construídas a partir de oito níveis de concentrações, derivadas da solução estoque (1 mg/L), injetadas em quadruplicata no CG-DIC: 500, 400, 250, 100, 50, 10, 5 e 2,5 µg/mL. Para a construção da curva analítica utilizou-se o *software* Excel 2013, relacionando-se as áreas de integração com as respectivas concentrações do colesterol nas soluções injetadas. Assim, a linearidade do método para o colesterol foi avaliada através do coeficiente de determinação (r^2) e do coeficiente linear de Pearson (r) aplicado à curva obtida.

5.2.5.2 Precisão em nível de repetibilidade

A repetibilidade do método analítico foi avaliada procedendo nove determinações. Dessa forma, a partir de diluições de solução estoque de colesterol em CHCl_3 (1 mg/mL) foram preparadas em triplicatas as soluções-padrão nas concentrações de 250, 100, 50 $\mu\text{g/mL}$, que foram em seguida analisadas.

5.2.5.3 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram estimados pela relação entre o desvio-padrão da média dos interceptos e das médias das inclinações das curvas analíticas, Equações VII e VIII, respectivamente. As curvas analíticas foram construídas próximas ao limite de detecção, com as soluções de colesterol a 50, 10, 5, 2,5 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$. Estas foram preparadas a partir consecutivas diluições da solução estoque de colesterol (1mg/mL) visando alcançar a menor precisão e a exatidão aceitável (desvio padrão relativo - $\text{DPR} < 5\%$) (ICH, 1996). Foram construídas três curvas analíticas próximas aos valores de LD e LQ.

$$\text{LD} = \frac{3,3 \sigma}{S} \quad (\text{Equação VII})$$

$$\text{LQ} = \frac{10\sigma}{S} \quad (\text{Equação VII})$$

5.2.6 Caracterização físico-química do breu processado (OBP) e dos lotes únicos (LTU-Si e LTU-Se)

5.2.6.1 Determinação do teor de umidade

Aproximadamente 1 g de cada amostra foi submetido, em triplicata, à determinação da umidade por infravermelho em uma balança analítica com sensibilidade de 0,001 g.

5.2.6.2 Determinação do ponto de fusão

Aproximadamente 5 mg de cada amostra foram uniformemente distribuídos sobre uma lamínula, e esta levada a um aparelho digital para determinação do ponto de fusão com

resolução de 0,1 °C. A razão de aquecimento foi de 10 °C/min, e o experimento realizado em triplicata.

5.2.6.3 Espectroscopia no infravermelho

Em espectrômetro de infravermelho (IV) foram depositadas pequenas quantidades de amostra, em contato direto com o cristal do acessório de reflectância atenuada (ATR). Os espectros foram registrados entre 4000 a 600 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e após 32 varreduras.

5.2.6.4 Cromatografia em camada delgada

Dez microlitros de soluções amostras em CHCl_3 (1 mg/mL) foram aplicados manualmente em cromatoplaça de gel de sílica 60 e eluídos em mistura 98:2 de CHCl_3 :MeOH. A cromatoplaça foi posta sobre a bancada na capela para evaporação do solvente. Posteriormente, esta foi submetida à revelação química com solução metanólica de anisaldeído sulfúrico (0,5% v/v) seguida de aquecimento. A placa revelada foi fotografada com câmera digital de 12 megapixels, sob luz visível.

5.2.6.5 Análise semiquantitativa por densitometria

Para a análise semi-quantitativa por densitometria, as imagens obtidas em 5.2.6.4 foram analisadas usando o programa ImageJ. Em seguida, as áreas referentes aos sinais das amirinas e outros eluatos foram somadas e os percentuais relativos dos componentes foram calculados utilizando o *software* Excel 2013 (BARBOZA et al., 2015).

5.2.6.6 Cromatografia de fase gasosa

Para a caracterização por CG-EM as amostras foram previamente derivatizadas com diazometano¹, enquanto para a quantificação por CG-DIC as amostras não foram derivatizadas². Ambas as análises foram realizadas nas condições cromatográficas descritas no item 5.2.4 com a coluna capilar HP-17HT.

¹ Reagente que produz ésteres metílicos a partir de funções ácidas.

² Derivatização não foi realizada na etapa de quantificação dos triterpenos, pois foi constatada ausência de ácidos nas matrizes estudadas por CG-EM.

O diazometano foi produzido por destilação utilizando o kit Diazald, para tal foram misturados hidróxido de potássio (KOH) (5 g), água destilada (8 mL) e EtOH (30 mL) sob aquecimento entre 65-70 °C. Sobre esta solução alcalina foram lentamente adicionados 100 mL de Diazald em éter etílico (11% p/v), assim o diazometano formado foi recolhido ainda neste solvente e cuidadosamente transferido para ampolas de vidro âmbar seladas as quais foram armazenadas no freezer (-10°C) até o momento de sua utilização.

Para análise por CG-EM cada amostra a ser derivatizada foi dissolvida em CHCl₃ (1 mg/mL) e tratada com aproximadamente 1 mL de diazometano, à temperatura ambiente, mantido em frasco de vidro aberto na capela até completa evaporação do solvente. O sólido resultante desse tratamento foi dissolvido em 1 mL de CHCl₃ e devidamente acondicionado em vial de 1,5 mL para posterior análise. Os constituintes individuais das amostras foram caracterizados por comparação dos padrões de fragmentação gerados pelos espectros de massas com aqueles armazenados na biblioteca do equipamento (Wiley Library Software 7N), complementada por buscas na literatura.

Nas análises de quantificação por CG-DIC, empregou-se o método de padrão externo. Para tal, soluções amostra (1mg/mL) foram preparadas pela diluição de alíquotas de 20mg de amostra em 10 mL de CHCl₃, seguida de nova diluição desta em 1:1 neste mesmo solvente. Consideraram-se as áreas produzidas por cada componente de interesse, que foram aplicadas na curva analítica (item 5.2.5.2) sendo obtidas as concentrações dos triterpenos de interesse. As concentrações foram corrigidas considerando a massa pesada de amostras e a pureza do colesterol.

5.2.7 Avaliação da solubilidade do lote único de sílica (LTU-Si) nos excipientes

Para a avaliação e estimativa da solubilidade do LTU-Si nos excipientes destinados ao desenvolvimento dos CLN foram realizadas duas abordagens: cálculos de PSH (HANSEN, 2007) e CCD com análise semiquantitativa por densitometria (BARBOZA et al., 2015).

5.2.7.1 Cálculos de parâmetros de solubilidade de Hansen

O cálculo de PSH baseou-se no método de contribuição de grupos de Stefanis e Panayiotou, em que se fez necessária à identificação dos grupos funcionais de 1° e 2° ordem presentes na estrutura química de cada “soluto” e “solvente” envolvidos no sistema. No presente estudo, os isômeros de amirina (componentes majoritário em LTU-Si) foram empregados como “soluto”, enquanto os “solventes” compreenderam: CH₂Cl₂ (referência de

alta solubidade/miscibilidade para estes isômeros), EtOH (referência de baixa solubidade/miscibilidade para estes isômeros), lipídios líquidos: miristato de isopropila (MI) e ácido oleico (AO); lipídios sólidos: monoestearato de glicerila (MG) e Compritol (COMP-behenato de glicerila), e os tensoativos: Tween 80 (TW) e Span 60 (SP).

Os valores dos parâmetros parciais de solubidade a 25 °C relacionados aos grupos funcionais foram obtidos da literatura (HANSEN, 2007) e através das Equações V, Va e VIa e das Equações Vb e VIb, quando δ_P e/ou $\delta_H < 3 \text{ MPa}^{(1/2)}$ (item 2.6.1, página 21), calculou-se em *software* Excel 2013 os parâmetros δ_D , δ_P e δ_H equivalente a totalidade dos grupos existentes na estrutura química de cada substância avaliada.

Adicionalmente, para estimar o parâmetro total (δT) foi realizada a aplicação dos valores obtidos de δ_D , δ_P e δ_H na Equação III (item 2.6.1, página 20) e a maior ou menor solubilidade/miscibilidade dos isômeros de amirina (“soluto”) nos diferentes insumos (“solventes”) foi obtida através da diferença mínima entre eles ($(\Delta\delta T)^2$).

5.2.7.2 Cromatografia em camada delgada e análise semiquantitativa por densitometria

Inicialmente, 1 grama de lipídios líquidos (MI e AO) e sólidos (MG e COMP) foram pesados separadamente e submetidos à agitação magnética constante sob aquecimento (80 – 85 °C) em banho-maria. A cada sistema foram adicionados porções de 20 mg de amostra (LTU-Si) até observação de precipitação. As misturas foram mantidas sob agitação e aquecimento durante 4 horas. Posteriormente, com auxílio de seringa de 5 mL de vidro acoplada a um filtro Millipore 0,45 μm de celulose regenerada, cada mistura foi filtrada, diretamente e sem resfriamento, para frascos de vidro de 10 mL previamente pesados. As massas dos filtrados, correspondentes aos lipídios testados, foram determinadas por diferença.

A análise por densitometria envolveu o preparo de sucessivas diluições deste filtrado em CHCl_3 , até atingir concentrações equivalentes a 1 mg/mL. As soluções diluídas (10 μL) foram aplicadas em cromatoplaça de gel de sílica 60 e o procedimento descrito no item 5.2.6.4 foi realizado. Em seguida, as imagens das cromatoplaças obtidas foram analisadas conforme o item 5.2.6.5, com determinação das áreas referentes aos sinais das amirinas nos densitogramas das misturas e o cálculo subsequente das concentrações das mesmas, no confronto com a curva de calibração obtida na mesma placa.

A curva de calibração foi construída a partir de preparadas soluções-padrão de LTU-Si preparadas em CHCl_3 , em seis concentrações diferentes: 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,6 e 0,8 mg/mL, utilizando diluições sucessivas de uma solução-estoque de 10,0 mg/10 mL de LTU-Si no

mesmo diluente. As áreas referentes aos sinais nos densitogramas das amirinas foram determinadas e as curvas de concentração versus área foram plotadas no *software* Excel 2013, determinando-se as equações das retas e os coeficientes de determinação e correlação das mesmas.

A precisão em nível de repetibilidade do método proposto foi também verificada pela aplicação de soluções-padrão nas concentrações equivalentes a 0,3, 0,4 e 0,6 mg/mL, preparadas a partir da mesma solução-estoque, aplicadas em triplicata na mesma cromatoplaça de gel de sílica 60 utilizada na análise densitométrica das amostras. As áreas do eluato de interesse (amirina) nos densitogramas foram analisadas em *software* Excel 2013, através do cálculo de média, desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV).

A exatidão e análise de interferentes do método proposto foi verificada pela aplicação de soluções contendo cada lipídio separadamente em CHCl₃ a 1mg/mL adicionada de “A” (mistura referência dos isômeros de amirina) a 0,4mg/mL em CHCl₃ e aplicadas na mesma cromatoplaça de gel de sílica 60 utilizada na análise densitométrica das amostras. As áreas correspondentes a amirina nos respectivos densitogramas foram utilizadas para a estimativa da concentração deste analito contra a curva analítica previamente obtida, assim os CV e o respectivos intervalos de confiança por teste *t-student* em *software* Excel 2013.

5.2.8 Desenvolvimento dos carreadores lipídicos nanoestruturados

5.2.8.1 Determinação da proporção lipídica e de tensoativos

Estabeleceu-se o percentual de 5% (p/p) para fase lipídica (lipídios líquido + sólido) e de 2% (p/p) para os tensoativos na formulação total (VAUCHER, 2017). Com base nisto, foram calculados os valores de equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) requerido para as fases oleosas (Equação VII) utilizando as seguintes proporções de lipídio líquido e sólido: 1:4, 4:1, 2:3, 3:2, 3:7, 7:3 e 1:1. Posteriormente, foram calculados os percentuais de cada tensoativo (COMP, TW e SP) empregados na formulação em mistura binária através das Equações VIIIa e b. Vale ressaltar que todos os valores de EHL para os insumos individuais foram obtidos da literatura.

$$\text{EHL}_{\text{requerido}} = \% \text{ A. EHL}_A + \% \text{ B. EHL}_B \quad (\text{Equação VII})$$

Sendo $EHL_{requerido}$ o valor de EHL exigido pela fase oleosa; %A e %B os percentuais de lipídios líquidos e sólidos, respectivamente, na fase oleosa; e EHL_A e EHL_B os valores de EHL para os lipídios líquidos e sólidos, respectivamente.

$$\% T_A = \frac{(EHL_{requerido} - EHL_{T_B})}{(EHL_{T_A} - EHL_{T_B})} \times 100 \quad (\text{Equação VIIIa})$$

$$\% T_B = 100 - \% T_A \quad (\text{Equação VIIIb})$$

Sendo % T_A o percentual na fase oleosa do tensoativo de maior valor de EHL; $EHL_{requerido}$ o valor de EHL exigido pela fase oleosa calculado pela Equação VII; EHL_{T_A} o maior valor de EHL do tensoativo presente na mistura binária e EHL_{T_B} o menor valor de EHL do tensoativo presente na mistura binária.

A composição das formulações foi baseada em uma matriz combinatória contendo os lipídios e tensoativos nas proporções apresentadas na Tabela 5 em um total de 54 formulações, nestas incluídas as triplicatas das formulações controles-branco e LTU-Si. As formulações controles-branco foram codificadas como CLN_BCO_n e aquelas contendo LTU-Si como CLN_n , em que “n” representa as diferentes combinações de lipídios (líquido e sólidos) e tensoativos em uma proporção específica.

Tabela 5: Matriz combinatória contendo a proporção de lipídios e tensoativos testadas para a obtenção de CLN controles-branco e com LTU-Si (continua).

Identificação	Fase oleosa	Proporções fase oleosa	EHLrequerido	Tensoativos	Tensoativos - % (p/p)
CLN ₁		2:3	6,9		63: 37
CLN ₂	MI: MG	1:1	7,7	COMP: TW	57: 43
CLN ₃		3:2	8,4		51: 49
CLN ₄	MI:	2:3	5,8		89: 11
CLN ₅	COMP	1:1	6,8	SP: TW	80: 20
CLN ₆		3:2	7,7		71: 29

CLN₁₋₉ = Carreador lipídico nanoestruturado obtido a partir de diferentes combinações de lipídios e tensoativos em uma proporção específica; MI = miristato de isopropila; AO = ácido oleico; MG = monoestearato de glicerila; COMP = Compritol; TW= Tween e SP = Span.

Tabela 5: Matriz combinatória contendo a proporção de lipídios e tensoativos testadas para a obtenção de CLN controles-branco e com LTU-Si (conclusão).

Identificação	Fase oleosa	Proporções fase oleosa	EHL requerido	Tensoativos	Tensoativos - % (p/p)
CLN ₇		2:3	2,7		95: 5
CLN ₈	AO: MG	1:1	2,4	COMP: TW	97: 3
CLN ₉		3:2	2,1		99: 1

CLN_{1,9} = Carreador lipídico nanoestruturado obtido a partir de diferentes combinações de lipídios e tensoativos em uma proporção específica; MI = miristato de isopropila; AO = ácido oleico; MG = monoestearato de glicerila; COMP = Compritol; TW = Tween e SP = Span.

Fonte: Elaboração própria (2017).

5.2.8.2 Preparo dos carreadores lipídicos nanoestruturados

A técnica de microemulsificação a quente foi empregada para obtenção dos CLN controles-branco (sem LTU-Si) e contendo LTU-Si a 1% (p/p)³ na formulação total. As condições empregadas foram baseadas na metodologia de Vaucher (2017) com adaptações, na qual a fase aquosa (água e tensoativos) e oleosa (LTU-Si e fase lipídica) foram separadamente aquecidas até 90 °C em banho-maria sob agitação constante em agitador mecânico. Em seguida, a fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa com homogeneização constante (700 rpm) até a temperatura de 80 °C. O sistema foi submetido à alta homogeneização em dispersor Ultra-turrax com velocidade de 13600 rpm, durante 10 minutos. Após este período, este foi resfriado em banho de gelo, mantendo-se a agitação com agitador magnético, até atingir 5 °C (VAUCHER, 2017).

Nas preparações finais foram adicionados 0,15 % (p/v) de metilparabeno e 0,05 % (p/v) de propilparabeno, com o objetivo de garantir estabilidade microbiológica ao sistema e, em seguida, estas foram estocadas sob refrigeração em geladeira (6 °C) em frascos de vidro do tipo âmbar até o momento de sua caracterização.

5.2.9 Caracterização dos carreadores lipídicos nanoestruturados

Todas as preparações obtidas no item 5.2.8.2 foram avaliadas quanto à presença de alterações macroscópicas e variações de pH, tamanho de partícula (TP), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ), nos tempos de 24 horas, 7, 14, 21 e 28 dias. Análise termogravimétrica (TGA) e de calorimetria diferencial exploratória (DSC) foram realizadas

³ Concentração estimada com base nos ensaios de solubilidade realizados conforme descrições no item 5.2.7.

para LTU-Se, LTU-Si, os excipientes isolados e em mistura física na presença e ausência de LTU-Si.

5.2.9.1 Avaliação macroscópica e pH

As preparações de CLN foram acompanhadas visualmente quanto à mudança de coloração ou a formação de precipitados. O pH foi determinado diretamente nos CLN, usando-se um medidor de pH previamente calibrado sob agitação magnética constante.

5.2.9.2 Análise de tamanho de partícula e índice de polidispersão

As análises de TP e o PDI foram realizadas no Laboratório de Micro e Nanotecnologia (LMN) de Farmanguinhos/ FIOCRUZ pela técnica espalhamento dinâmico de luz, em Zetasizer Nano ZS90 com LASER de He-Ne ($\lambda = 633 \text{ nm}$) e detector de ângulo fixo em 90° . As amostras foram diluídas até uma concentração de aproximadamente 0,2 % (v/v) em água deionizada e as análises realizadas à temperatura ambiente (25°C).

5.2.9.3 Análise do potencial zeta

O PZ foi determinado em equipamento Zetasizer Nano ZS90 pertencente ao Laboratório de Micro e Nanotecnologia (LMN) de Farmanguinhos/ FIOCRUZ. Para tal, as amostras foram diluídas até uma concentração de aproximadamente 0,2 % (v/v) em solução aquosa de cloreto de potássio (KCl) 1mM e a análise realizada à temperatura ambiente (25°C).

5.2.9.4 Análises térmicas

As amostras LTU-Si, LTU-Se, MG, COMP separadas e misturas físicas de MI:MG (3:2) + COMP:TW (1:1) na presença e ausência de LTU-Si foram selecionadas para envio ao Laboratório de Estudos do Estado Sólido (LEES) de Farmanguinhos/ FIOCRUZ, onde foram realizadas as análises de TGA e de DSC.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DA MATÉRIA-PRIMA BRUTA (BREU)

O breu bruto adquirido no comércio do mercado municipal de Manaus apresentou-se como um sólido escuro e resistente (Figura 5). Após a fragmentação inicial de parte do material vegetal (3 kg), constatou-se uma população majoritária de fragmentos de coloração escura acompanhada de menor parte de fragmentos de coloração amarelo-palha, além de impurezas provenientes de galhos e do tronco do vegetal (Figuras 6a e 6b). Após uma triagem manual, foram obtidos 2,94 Kg de uma matéria-prima mais homogênea e livre de sujidades.



Figura 5: Oleorresina bruta (breu).

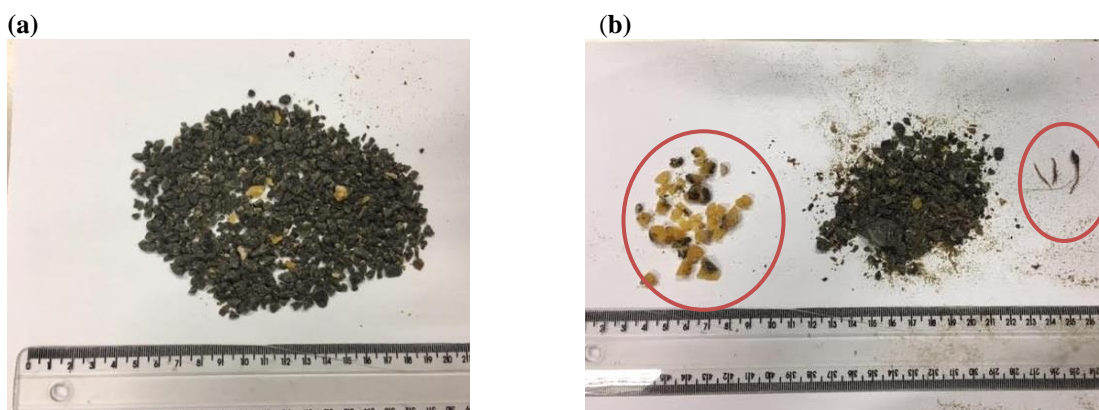


Figura 6: (a) Oleorresina bruta (breu) após fragmentação inicial. (b) Fragmentos amarelo-palha evidenciados (círculo à esquerda) e impurezas provenientes de galhos e tronco do vegetal (círculo à direita).

Este material foi então pulverizado em almofariz com auxílio de um pistilo, resultando em cerca de 2,5 Kg de OBP na forma de um pó constituído de partículas finamente divididas, com granulometria menor que 32 mesh (Figura 7).



Figura 7: Oleorresina breu pré-processada (pulverizada) (OBP).

6.2 FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO DA OLEORRESINA (BREU) PROCESSADA

6.2.1 Fracionamento e purificação do breu processado em coluna de gel de sílica

Os experimentos realizados nessa etapa foram planejados após o levantamento da literatura apresentado na Tabela 1. A maioria dos casos (> 75%) utiliza coluna com gel de sílica eluindo com misturas de AcOEt em *n*-hexano para o fracionamento de OBP, para produzir frações concentradas na mistura de amirinas isoméricas. Convém observar que a grande parte dos experimentos descritos na Tabela 1 lança mão de múltiplas etapas de fracionamento cromatográfico. No presente estudo, as condições foram otimizadas de maneira a alcançar ou mesmo superar esses resultados, executando uma única etapa cromatográfica.

Assim, o estabelecimento das condições ótimas de obtenção das referidas frações triterpenoides em escala preparativa envolveram três experimentos iniciais (Si I-III), usando-se diferentes composições de eluentes e aumento de carga da amostra. Ao final, os três experimentos resultaram, respectivamente, em 79,2%; 52,1% e 48,3% (m/m) de recuperação de massa (Tabela 6).

Tabela 6: Rendimentos das frações após coluna em gel de sílica e teor relativo de amirinas determinado por análise densitométrica (continua)

Experi- mento	Massa inicial de OBP	Volume coletado (mL)	Composição da fase móvel	Massa obtida (g)	Balço de massas (recuperação)	Teor de amirinas*
Si-I	3,4 g	F1 (300)	<i>n</i> -hexano	0,179	79,2%	48,6%
		F2 (300)	<i>n</i> -hexano:AcOEt 9:1	1,1192		75,2%
		F3 (300)	<i>n</i> -hexano:AcOEt 9:1	0,1674		51,8%
		F4 (300)	<i>n</i> -hexano:AcOEt 9:1	0,2113		3,9%
		F5 (300)	<i>n</i> -hexano:AcOEt 8:2	0,3355		4,8%
		F6 (300)	<i>n</i> -hexano:AcOEt 8:2	0,1997		-
		F7 (300)	<i>n</i> -hexano:AcOEt 5:5	0,4097		-
		F8 (300)	<i>n</i> -hexano:AcOEt 5:5	0,0724		2,4%
Si-II	3,4 g	F9 (300)	<i>n</i> -hexano	0,4930	52,1%	-
		F10 (100)	<i>n</i> -hexano:AcOEt 9,5:0,5	0,0048		-
		F11 (100)	<i>n</i> -hexano:AcOEt 9,5:0,5	0,0159		-
		F12 (100)	<i>n</i> -hexano:AcOEt 9,5:0,5	0,1370		12,9%
		F13 (300)	<i>n</i> -hexano:AcOEt 9,5:0,5	0,4514		70,7%
		F14 (300)	<i>n</i> -hexano:AcOEt 9,5:0,5	0,0767		85,7%
		F15 (300)	<i>n</i> -hexano:AcOEt 9:1	0,1034		45,9%
		F16 (300)	<i>n</i> -hexano:AcOEt 9:1	0,1010		20,8%
		F17 (300)	<i>n</i> -hexano:AcOEt 9:1	0,3877		5,10%
		Si-III	9,1	F18 (300)		<i>n</i> -hexano
F19 (100)	<i>n</i> -hexano:AcOEt 9,5:0,5			0,0396	-	
F20 (100)	<i>n</i> -hexano:AcOEt 9,5:0,5			0,0945	23,0%	
F21 (100)	<i>n</i> -hexano:AcOEt 9,5:0,5			0,7084	49,5%	
F22 (300)	<i>n</i> -hexano:AcOEt 9,5:0,5			1,5156	90,2%	
F23 (300)	<i>n</i> -hexano:AcOEt 9,5:0,5			0,8086	97,8%	
F24 (300)	<i>n</i> -hexano:AcOEt 9,5:0,5			0,1083	73,2%	
F25 (300)	<i>n</i> -hexano:AcOEt 9:1			0,2680	7,1%	
F26 (300)	<i>n</i> -hexano:AcOEt 9:1			0,4475	2,7%	
F27 (300)	<i>n</i> -hexano:AcOEt 9:1			0,2855	3,2%	

Tabela 6: Rendimentos das frações após coluna em gel de sílica e teor relativo de amirinas determinado por análise densitométrica (conclusão).

Experi- mento	Massa inicial de OBP	Volume coletado (mL)	Composição da fase móvel	Massa obtida (g)	Balço de massas (recuperação)	Teor de amirinas*
Si- IV a Si-X	45,0g	F28 (1500)	<i>n</i> -hexano	0,4652		6,9%
		F29 (500)	<i>n</i> -hexano:AcOEt 9,5:0,5	0,1847		29,4%
		F30 (500)	<i>n</i> -hexano:AcOEt 9,5:0,5	0,8067		33,6%
		F31 (500)	<i>n</i> -hexano:AcOEt 9,5:0,5	0,3301		41,7%
		F32 (1500)	<i>n</i> -hexano:AcOEt 9,5:0,5	7,2694		85,7%
		F33 (1500)	<i>n</i> -hexano:AcOEt 9,5:0,5	6,6716	48,2%	96,4%
		F34 (1500)	<i>n</i> -hexano:AcOEt 9,5:0,5	1,5508		88,2%
		F35 (1500)	<i>n</i> -hexano:AcOEt 9:1	1,2176		-
		F36 (1500)	<i>n</i> -hexano:AcOEt 9:1	1,3914		-
		F37 (1500)	<i>n</i> -hexano:AcOEt 9:1	1,8089		-

*Referência utilizada: mistura de amirinas da oleoresina fresca e purificada de *Protium altsonii* (item 5.1.2).

A Figura 8 apresenta os perfis cromatográficos das frações obtidas no experimento Si-I. É possível notar uma banda bastante intensa, com fator de retenção R_f 0,85, coincidente com da referência (A), revelando que a mistura dos isômeros α -amirina e β -amirina foi concentrada nas frações F1, F2 e F3; e como confirmado pela análise densitométrica desta cromatoplaca (Tabela 6).

Contudo, a separação não foi completamente efetiva, uma vez que F1 e F2 ainda mostram bandas menos intensas com R_f acima do sinal da referência, correspondendo a substâncias de menor polaridade do que as moléculas de interesse. Já F3 revela, além destes sinais, outros correspondentes a substâncias com R_f abaixo do sinal da referência, correspondendo, portanto a substâncias mais polares que os isômeros de amirina de interesse. É possível, inicialmente, relacioná-las à presença das cetonas α -amirenona e β -amirenona e dos dióis maniladiol e breína, que estão ausentes na referência, mas são frequentemente abundantes na matriz estudada em percentuais relevantes, conforme estudos publicados (CARVALHO et al., 2015; SIANI et al., 2012; VIEIRA-JÚNIOR; SOUZA; CHAVES, 2005).

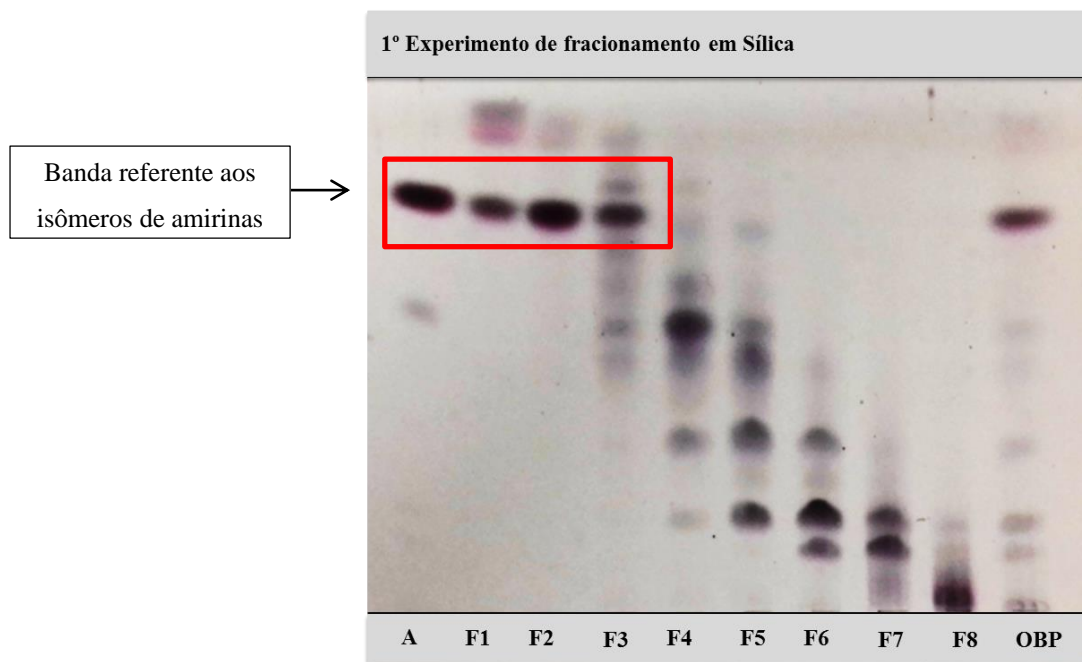


Figura 8: CCD das frações recolhidas do experimento de fracionamento e purificação em coluna com gel de sílica Si-I (F1-F8); A= amirinas-referência; OBP= oleorresina de breu processada. Placas de gel de sílica de fase normal. Eluente: 2% de metanol em clorofórmio. Revelador: solução metanólica de anisaldeído sulfúrico, luz visível.

Com o objetivo de obter frações com maior teor de α -amirina e β -amirina, o experimento Si-II foi realizado. Neste, a otimização da composição da FM se deu pela diminuição da polaridade (9,5:0,5 *n*-hexano:AcOEt,) durante as cinco frações eluídas após a fração hexânica inicial (3 x 100 mL seguida de 2 x 300 mL; F10 a F14 na Tabela 6). Esta estratégia resultou na concentração das amirinas nas frações F13 (70,7%) e F14 (85,7%), conforme apontado pela análise densitométrica da cromatoplaça após a revelação com anisaldeído sulfúrico (Tabela 6 e Figura 9).

A análise visual da CCD, conjuntamente com a análise densitométrica, demonstrou que a fração F15 ainda contém quantidade significativa (45,9%) das substâncias de interesse, além de outras bandas correspondentes a substâncias minoritárias (Figura 9; Tabela 6).

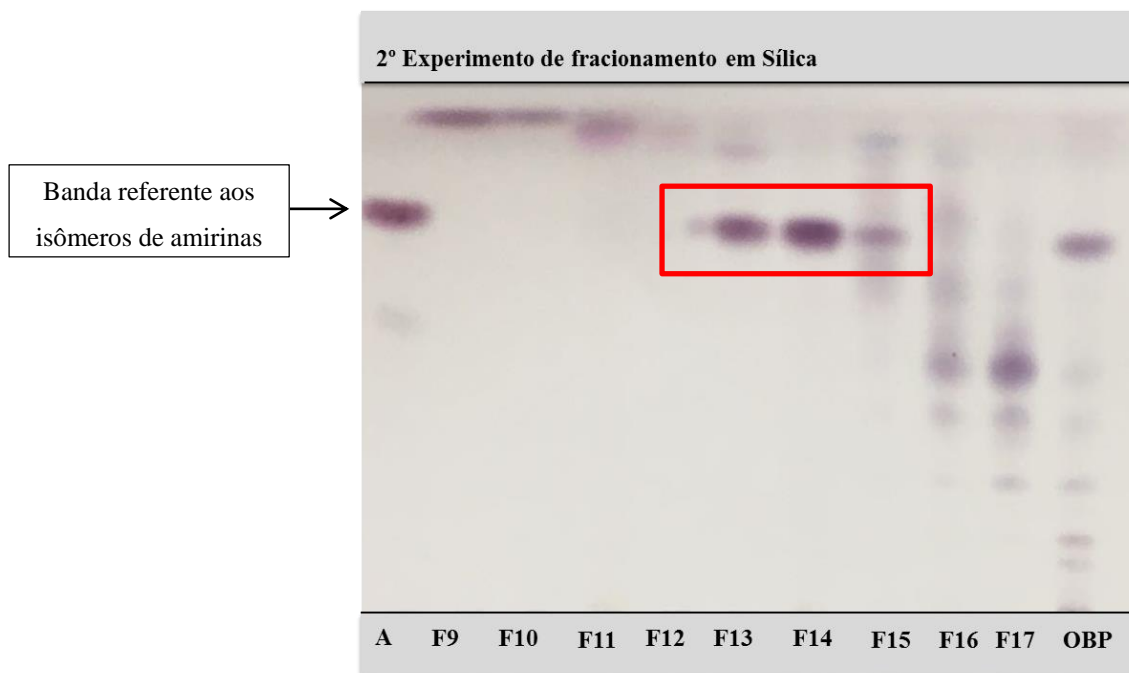


Figura 9: CCD das frações recolhidas do experimento de fracionamento e purificação em coluna com gel de sílica Si-II (F9-F17); A= amirinas-referência; OBP= oleoresina de breu processada. Placas de gel de sílica de fase normal. Eluente: 2% de metanol em clorofórmio. Revelador: solução metanólica de anisaldeído sulfúrico, luz visível.

Desta forma, objetivando a recuperação de amirinas presente na fração F15 (Figura 9), foi realizado o experimento Si-III, que incluiu a adição de mais um volume de FM equivalente a 300 mL de composição *n*-hexano:AcOEt 9,5:0,5 (F19 a F24), para suportar o aumento de massa (carga) de OBP aplicada na coluna.

Este experimento evidenciou a presença da amirina em F20, F21, F22, F23 e F24; destacadamente F22-24. Estas foram mais intensas para a concentração de amirina, além de mostrarem-se visualmente livres de outros contaminantes; fato corroborado pelas análises densitométricas (Tabela 6) da placa representada na Figura 10.

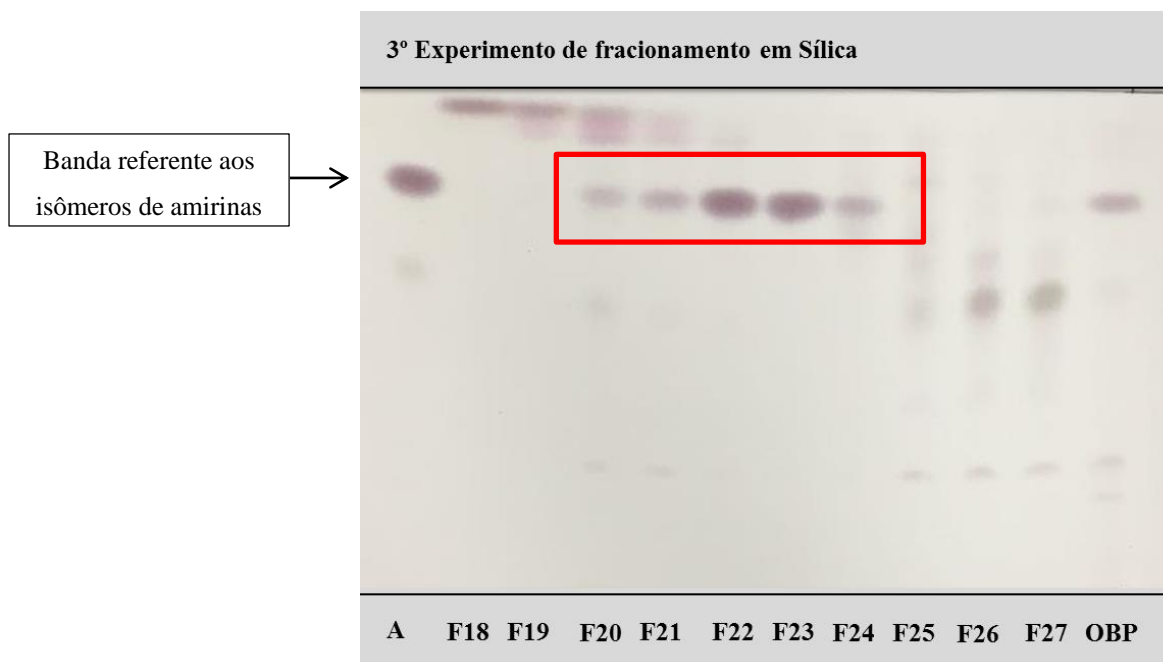


Figura 10: CCD das frações recolhidas do experimento de fracionamento e purificação em coluna com gel de sílica Si-III (F18-F27); A= amirinas-referência; OBP= oleoresina de breu processada. Placas de gel de sílica de fase normal. Eluente: 2% de metanol em clorofórmio. Revelador: solução metanólica de anisaldeído sulfúrico, luz visível.

O aumento subsequente de escala do processo cromatográfico baseou-se no experimento Si-III, uma vez que este representou a melhor resposta para os ensaios de otimização das condições de eluição em gel de sílica, pois resulta tanto na melhor separação dos triterpenos de interesse quanto, fundamentalmente, em bons rendimentos para as frações de interesse (Tabela 6).

Há raros estudos descritos na literatura relacionados ao aumento de escala na obtenção de amirinas, usualmente abordando a transposição de escala analítica para a semi-preparativa (Tabela 1) (DIAS; HAMERSKI; PINTO, 2011). O presente foi planejado para obter as frações contendo amirina em escala preparativa. Assim, a estratégia para planejar o experimento Si-IV (transposição de escala) foi baseada num fator de escalonamento de 5x, sendo limitado pelas dimensões do maior aparato cilíndrico disponível no laboratório (funil sinterizado). Para os ensaios efetuados, a fase estacionária e a altura do leito foram mantidas como parâmetros fixos, garantindo a não variação do número de pratos teóricos até esta fase (Tabela 7). Além disso, o tempo de eluição das frações recolhidas foi controlado de modo a manter a vazão constante e proporcional ao fator de transposição de escala utilizado.

Tabela 7: Parâmetros utilizados no escalonamento da CCV em gel de sílica.

Parâmetros	Experimento Si-III	Experimento Si-IV
Altura coluna (cm) (*)	3,20	3,20
Diâmetro (cm)	8,95	20,00
Área seccional (cm ²)	62,90	314,20
Volume de leite (mL)	201,00	1005,00
Massa de amostra (g)	9,00	44,90
Massa de sílica para a pastilha (g)	10,40	51,90
Massa de sílica do leite (g)	102,20	510,30
Volume de solvente (mL)	300,00	1498,00
Massa de amirinas (g)	2,30	11,00
Fator de transposição de escala	= 5x	

(*) Parâmetro fixo.

O experimento Si-IV (Tabela 6 e Figura 11) reproduziu as condições de separação em maior escala definidas para os triterpenos-alvo do experimento Si-III, permitindo observar um teor considerável de amirina nas frações F32, F33 e F34 (aproximadamente 90% m/m) e praticamente o mesmo percentual de recuperação em massa (~ 48%). A similaridade entre os perfis químicos obtidos nas cromatoplasmas de Si-IV (Figura 11) e Si-III (Figura 10) demonstra que o aumento de escala foi exitoso, e representa uma alternativa simples para a obtenção de um IFA de origem vegetal com perfil reprodutível.

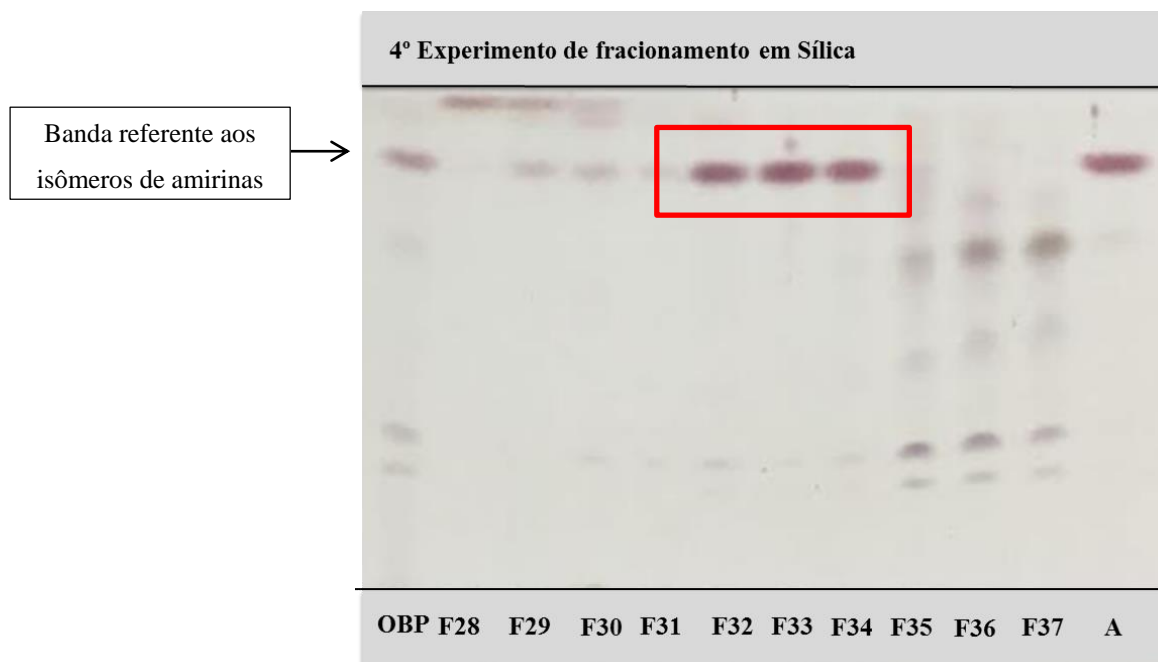


Figura 11: CCD das frações recolhidas do experimento de fracionamento e purificação em coluna com gel de sílica Si-III (F28-F37); A= amirinas-referência; OBP= oleorresina de breu processada. Placas de gel de sílica de fase normal. Eluente: 2% de metanol em clorofórmio. Revelador: solução metanólica de anisaldeído sulfúrico, luz visível.

6.2.2 Fracionamento e purificação do breu processado em coluna de Sephadex LH-20

O uso da resina Sephadex LH-20 nesta etapa foi sugerido pelo estudo de Aregullin e colaboradores (2002), que obteve frações contendo α -amirina e β -amirina com rendimentos consideráveis.

O estabelecimento das condições ótimas para transposição de escala utilizando Sephadex LH-20 requereu quatro experimentos. O primeiro (Se-I – Tabela 3, página 31) constituiu um teste inicial exploratório, em que as frações F41-F43 foram reunidas pela similaridade em CCD, resultando em 41% (p/p) de rendimento (Figura 12). Este resultado foi avaliado positivo, pois as frações apresentaram um sinal mais intenso com R_f 0,88, compatível com a referência utilizada. O experimento Se-II foi realizado nas mesmas condições, contudo empregando o dobro da carga de Se-I (Tabela 3, página 31). O perfil em CCD foi semelhante ao resultado anterior (Figura 12), indicando a reprodutibilidade do processo empregado mesmo após aumento da carga.

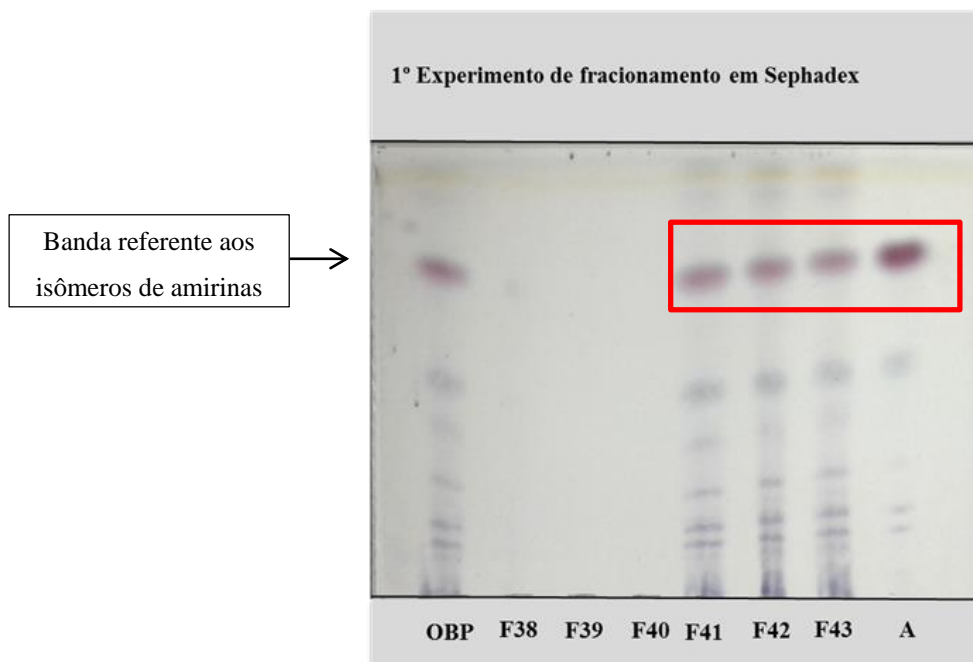


Figura 12: Cromatografia em Camada Delgada em gel de sílica de fase normal das frações recolhidas do experimento de fracionamento e purificação em Sephadex Se-I (F38-F43); OBP = oleoresina de breu processada; A= amirinas-referência. Eluição: 2% de metanol em clorofórmio. Revelação: solução metanólica de anisaldeído sulfúrico, em luz visível.

O experimento Se-III compreendeu um aumento de 3x o volume de leite e 5x a carga aplicada (Tabela 3, página 31). A Figura 13 mostra, além da banda referente à substância de interesse, outras bandas – todas de menor R_f que a amirina-referência ($R_f < 0,88$) – que podem corresponder aos constituintes complementares descritos na composição do breu, como triterpenos ácidos, dióis e cetonas. Com base nesses resultados, as frações F56-60 (contendo as amirinas) foram reunidas e passaram a representar a mistura de interesse para continuar o estudo, caracterizando o produto de interesse da coluna utilizando Sephadex LH-20.

Subsequentemente, um próximo novo aumento de 3x o volume de leite e 4x a carga aplicada constituiu o experimento Se-IV (Tabela 3, página 31), que representou a condição ótima escalonada para o leite de 1 litro na coluna, com o perfil cromatográfico resultante mantendo-se fiel ao experimento Se-III (Figura 13). O limitante para este experimento foi a coluna de vidro existente no laboratório. Na eluição de Se-IV, foram obtidas 20 frações, com F62-F82 sendo reunidas, alcançando aproximadamente 70% de rendimento (p/p). A partir do experimento Se-IV, foram reproduzidos 8 experimentos sob as mesmas condições, cujos resultados foram combinados visando compor o lote único por esta técnica, LTU-Se.

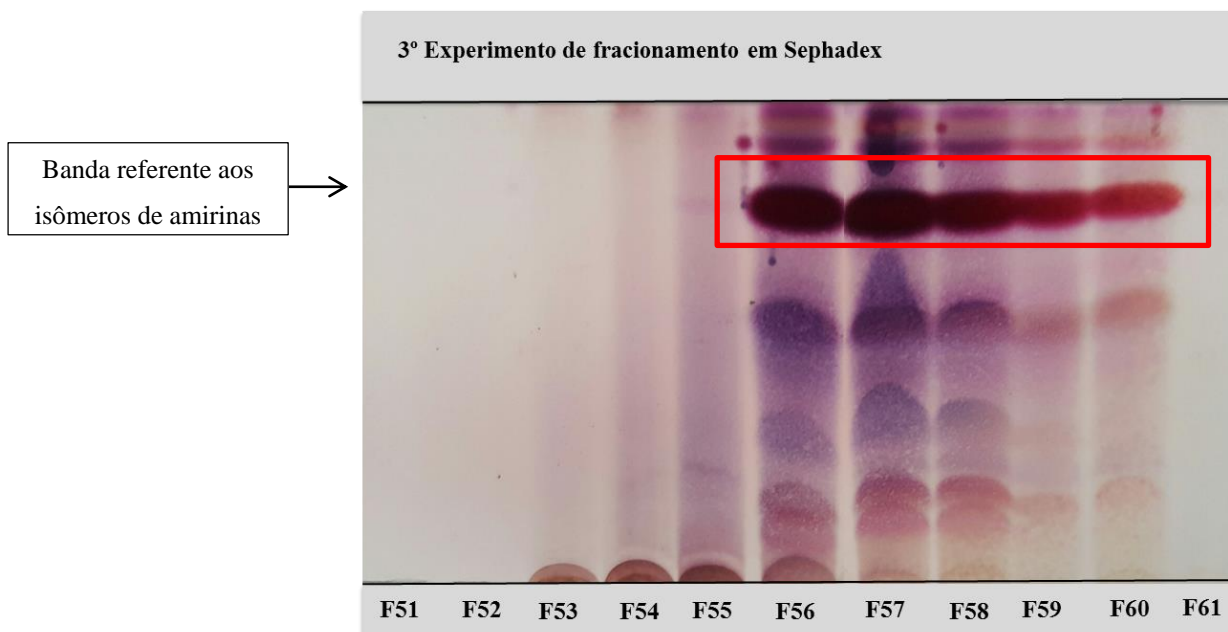


Figura 13: Cromatografia em Camada Delgada em gel de sílica de fase normal das frações recolhidas do experimento de fracionamento e purificação em Sephadex Se-III (F51-F61); OBP = oleorresina de breu processada; A= amirinas-referência. Eluição: 2% de metanol em clorofórmio. Revelação: solução metanólica de anisaldeído sulfúrico, em luz visível.

6.3 OBTENÇÃO DOS LOTES ESCALONADOS DAS FRAÇÕES TERPÊNICAS CONCENTRADAS EM AMIRINA

No processo de obtenção os lotes a serem formulados (LTU-Si e LTU-Se), as frações resultantes em cada fase estacionária foram monitoradas por CCD e análise densitométrica, observando-se como resposta a composição similar (Figuras 14 e 15) e a presença das amirinas.

As separações dos triterpenos para gerar LTU-Si e LTU-Se foram ensaiadas por abordarem dois fundamentos distintos de separação de misturas. Na coluna cromatográfica de gel de sílica (fase estacionária composta por grupamentos silanol), o mecanismo de separação das substâncias é baseado na adsorção. Já a resina Sephadex baseia a separação na cromatografia de gel exclusão (diferencia o volume molecular dos componentes, com resina constituída de ligações entre polissacarídeos de elevado peso molecular). De fato, os resultados utilizando as duas modalidades cromatográficas geraram lotes distintos quanto à composição química, como mostram as Figuras 14 e 15.

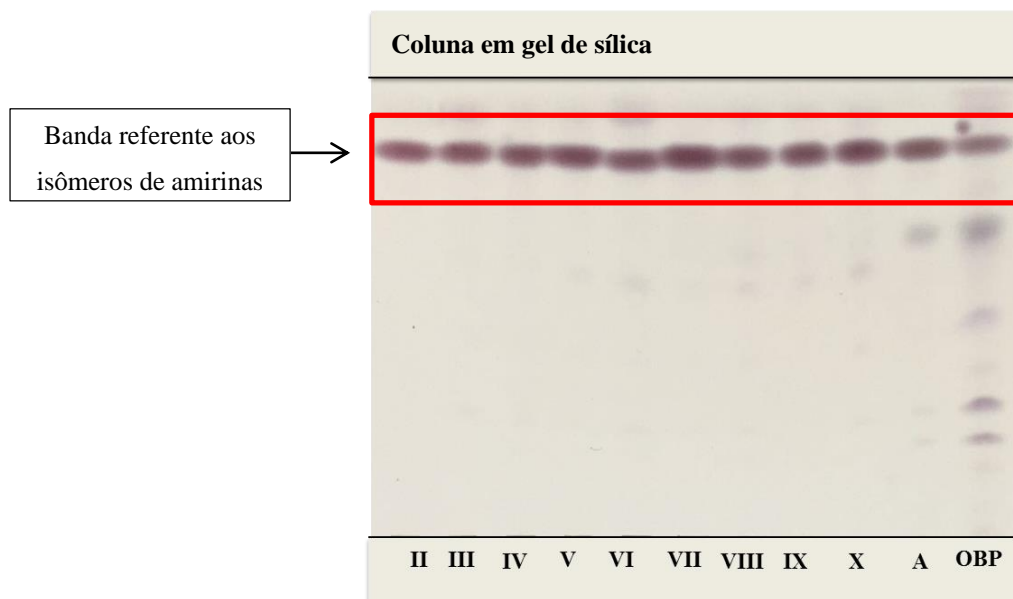


Figura 14: Cromatografia em camada delgada em gel de sílica de fase normal das frações de interesse recolhidas dos 10 experimentos realizados de fracionamento e purificação em coluna de sílica (Si-II a Si-X); A = amirinas-referência; OBP = oleorresina de breu processada. Eluição: 2% de metanol em clorofórmio. Revelação: solução metanólica de anisaldeído, em luz visível.

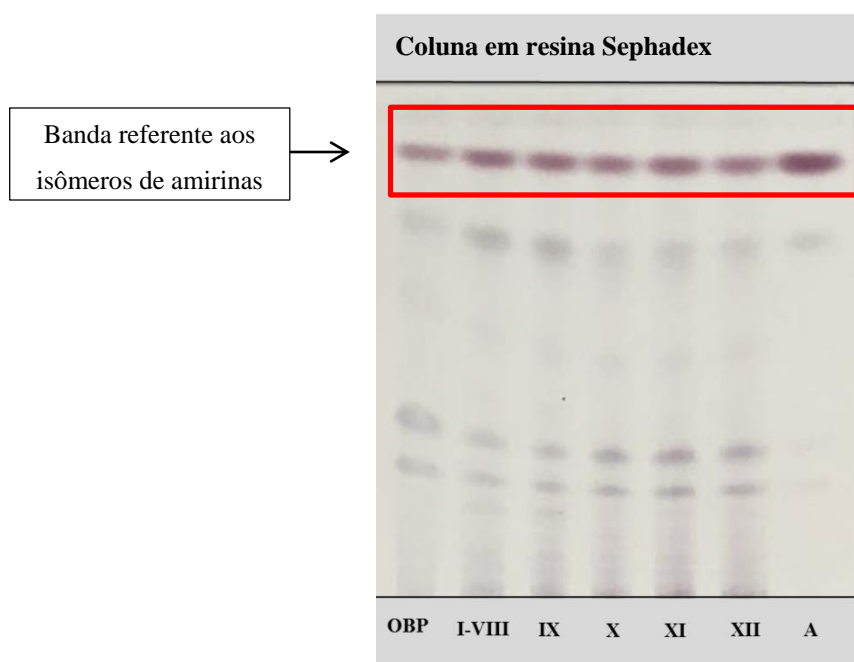


Figura 15: Cromatografia em camada delgada em gel de sílica de fase normal das frações de interesse recolhidas dos 12 experimentos realizados de fracionamento e purificação em coluna de Sephadex (Se-I a Se-XII); A = amirinas-referência; A = amirinas-referência; OBP = oleorresina de breu processada. Eluição: 2% de metanol em clorofórmio. Revelação: solução metanólica de anisaldeído sulfúrico, em luz visível.

As cromatoplasas evidenciam que os constituintes de maior polaridade são eliminados em LTU-Si, como as substâncias com Rf 0,21; 0,28; 0,43 e 0,64; os quais permanecem em LTU-Se. A densitometria confirma a presença majoritária das amirinas em LTU-Si, com teor médio estimado como $87,5\% \pm 5\%$ e rendimento médio de processo em torno de 20% medido como recuperação de massa.

O processo de obtenção de LTU-Se gerou frações contendo amirina, que assemelham ao perfil de OBP, resultando em teor médio estimado de amirina $44,76\% \pm 3\%$ e de aproximadamente 70% de recuperação de massa na fração de interesse. As vantagens de empregar Sephadex são o uso de um solvente com baixo grau de toxicidade como o EtOH, além do baixo custo (considerando-se que a resina é reutilizável). No entanto, apesar dos maiores rendimentos, gera frações menos puras do que o gel de sílica, nas condições ensaiadas.

6.4 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA DE FASE GASOSA PARA A CARACTERIZAÇÃO DOS TRITERPENOS PENTACÍCLICOS NO BREU (OBP)

Inicialmente, o método para caracterizar OBP baseou-se no estudo realizado por Siani e colaboradores (2012), em que os autores utilizam CG e coluna HP-5 (5% difenil 95% dimetilpolisiloxano – Figura 16) para avaliar o perfil geral dos triterpenos presentes em amostras de breu de diversas origens vegetais. Entretanto, ao aplicar as mesmas condições cromatográficas no presente estudo (Figura 17), a eficiência de separação para as substâncias de interesse, α -amirina e β -amirina, não foram consideradas satisfatórias, já que o método desenvolvido deverá ter resolução suficiente para ser testado posteriormente nas medidas de eficiência de incorporação dessas substâncias em CLN. Este objetivo orientou a realização de testes no sentido de verificar as melhores condições de separação dos triterpenos, considerando as respostas de quatro colunas diferentes: HP-35 (35% de difenilpolisiloxano), HP-1701 (14% cianopropilfenilmetilpolisiloxano), HP-17HT (50% fenil; 50% metilpolisiloxano) e HP-INNOWAX (polietilenoglicol).

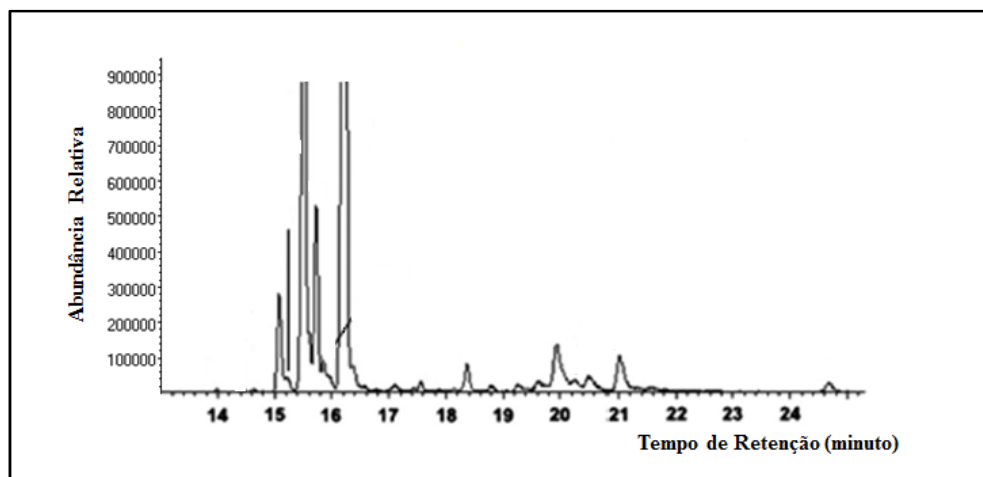


Figura 16: Ampliação do cromatograma da literatura obtido da análise de breu comercial em CG-DIC utilizando a coluna HP-5.
Fonte: Siani et al., 2012.

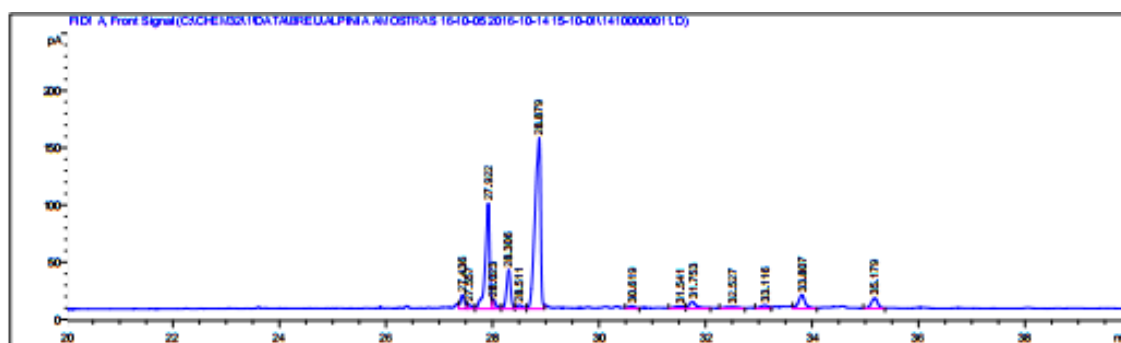


Figura 17: Ampliação do cromatograma da amostra OBP na coluna HP-5 obtido por CG-DIC nas condições de Siani et al., 2012.

A figura 18 apresenta os perfis cromatográficos obtidos nas condições mencionadas no item 5.2.4 para as quatro colunas testadas, além da HP-5.

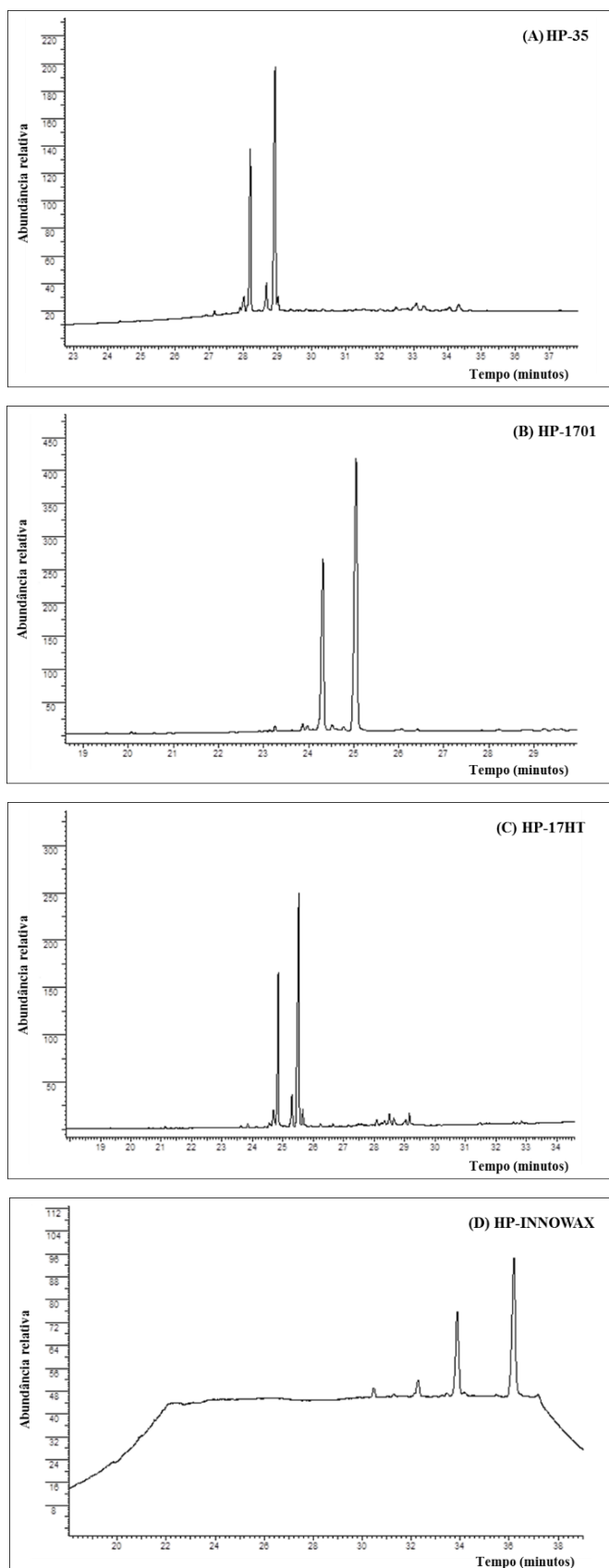


Figura 18: Ampliações dos cromatogramas da amostra OBP nas colunas (A) HP-35 (35% de difenilpolisiloxano), (B) HP-1701 (14% cianopropilfenilmetilpolisiloxano), (C) HP-17HT (50% fenil; 50% metilpolisiloxano) e (D) HP-INNOWAX (polietilenoglicol).

As colunas HP-1701 e HP-INNOWAX foram consideradas não apropriadas para separar e monitorar os triterpenos-alvo do estudo (Figuras 18); no caso específico desta segunda, nota-se a distorção da linha-base no cromatograma, como consequência do uso de alta temperatura (causando o “sangramento”). No cromatograma referente à coluna HP-1701, há evidências de que os analitos ainda permaneceram na coluna após o tempo de análise, provavelmente devido a interações fortes com a FE – o que contaminaria as análises subsequentes. Este retardo na eluição ainda é agravado pela incapacidade dessa coluna em suportar temperaturas acima de 280 °C, comumente empregadas na separação de triterpenos. HP-INNOWAX é a coluna de características mais distintas entre todas as ensaiadas, já que possui a FE com maior polaridade. Seu emprego nestes testes resultou em apenas quatro sinais relevantes no cromatograma de OBP, indicando alto grau de coeluição entre substâncias diversas. Por isso, não foi considerada satisfatória.

A HP-17HT demonstrou ser a melhor entre as colunas testadas. Os sinais gerados para os triterpenos pentacíclicos majoritários apresentam boa resolução. Todavia, ocorre o aparecimento de três outros sinais com retenções a 25,05; 25,66 e 25,74 minutos (Figura 18). A hipótese mais viável é que a FE composta de 50% fenil e 50% metilpolisiloxano é adequada para resolver a separação de sinais que coeluem nas outras colunas. De qualquer maneira, este desdobramento de sinais é positivo para a análise complementar em CG-EM.

O uso da coluna HP-35 (Figura 18) apresenta uma melhora de resolução para os triterpenos de interesse, quando comparada com a HP-5 (Figura 17). Entretanto, há um desdobramento dos sinais minoritários adicionais em menor escala do que no emprego da HP-17HT.

Assim, ainda que se necessite aprofundar – e mesmo otimizar para diferentes matrizes – estudos envolvendo as condições cromatográficas com a coluna HP-17HT, esta foi selecionada para caracterizar os lotes de triterpenos nas etapas subsequentes do projeto.

6.5 VIABILIDADE DA QUANTIFICAÇÃO DOS TRITERPENOS PENTACÍCLICOS UTILIZANDO COLESTEROL COMO PADRÃO EXTERNO

Para cálculo de linearidade e definição da faixa de trabalho, as curvas analíticas a partir de diluições seriadas da solução-estoque de colesterol (padrão externo) geraram um coeficiente de determinação (r^2) igual a 0,9992 e uma correlação linear de Pearson (r) igual a 0,9996; este último valor este em conformidade com o critério estabelecido na RDC nº 166/2017 (ANVISA, 2017) ($r > 0,990$). A equação da reta de tendência foi determinada como

$y = 0,999x - 2,695$ sendo y = área de integração do sinal de colesterol e x = concentração de colesterol em $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 1).

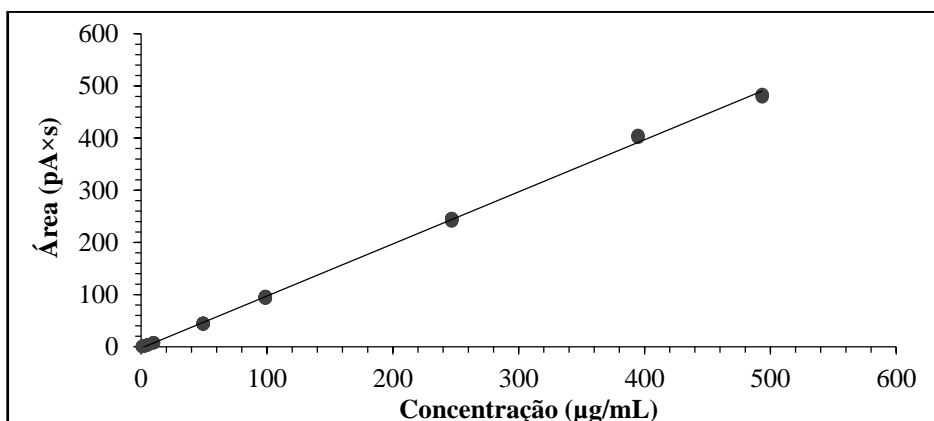


Gráfico 1: Curva analítica obtida pela análise em triplicata de soluções com 8 concentrações diferentes de colesterol em CG-DIC (coluna DB-17HT).

Ainda segundo critério exigido pela RDC nº 166/2017(ANVISA, 2017), o gráfico de resíduos foi obtido através da plotagem dos desvios calculados (diferenças entre os valores das áreas reais - obtidos nas análises em quadruplicatas para cada solução de colesterol nas concentrações da curva analítica, e os valores de áreas teórica - calculados pela equação da reta de tendência) versus as concentrações das soluções de colesterol utilizadas na curva analítica (Gráfico 2).

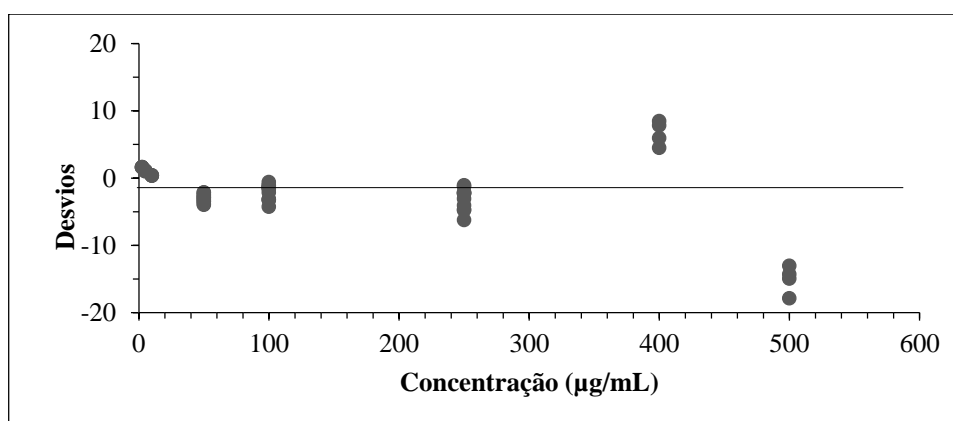


Gráfico 2: Gráfico de resíduos obtido pela análise em quadruplicata de diferentes concentrações do colesterol em CG-DIC.

Portanto, a partir da análise conjunta dos coeficientes e da distribuição dos resíduos, com pontos acima e abaixo da reta, sem tendências, é possível constatar a linearidade do método analítico para o intervalo estudado de $2,5 \mu\text{g/mL}$ - $500 \mu\text{g/mL}$, estabelecendo assim esta faixa de trabalho.

A precisão foi determinada intradia, somente em nível de repetitividade, analisando as soluções de colesterol nas concentrações de 250, 100, 50 $\mu\text{g/mL}$ em triplicata. Tais concentrações foram escolhidas por representarem os pontos centrais do intervalo especificado no item 5.2.5.2.

Na tabela 8, os dados obtidos foram resumidos, sendo possível notar que os coeficientes de variação para todas as replicadas realizadas encontram-se abaixo de 5% indicando a precisão em nível de repetibilidade do método proposto.

Tabela 8: Avaliação de precisão intradia do método de CG-DIC.

Parâmetro	Concentração de colesterol ($\mu\text{g/mL}$)								
	50 $\mu\text{g/mL}$			100 $\mu\text{g/mL}$			250 $\mu\text{g/mL}$		
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3
Áreas de integração ($\text{pA}\times\text{s}$)	43,80	44,67	44,44	96,63	95,07	94,04	244,9	244,9	240,8
	43,80	44,39	45,14	95,90	95,79	94,04	246,0	244,8	244,0
	43,43	44,23	44,85	96,11	95,58	92,95	245,8	243,0	244,8
	43,28	44,00	45,14	95,77	96,18	93,93	242,3	242,4	244,8
Média	43,58	44,32	44,89	96,10	95,70	93,70	245,0	244,0	243,0
Desvio padrão (S)	0,26	0,28	0,33	0,38	0,46	0,53	1,70	1,29	2,08
CV (%)	0,60	0,64	0,74	0,40	0,48	0,57	0,69	0,53	0,86

Rep = Replicatas realizadas; CV = Coeficiente de variação.

Conforme diretrizes do ICH, o Limite de Detecção (LD) e o Limite de Quantificação (LQ) foram determinados através das Equações VII e VIII, respectivamente. Obtiveram-se valores de LD = 0,4 $\mu\text{g/mL}$ e LQ = 1,3 $\mu\text{g/mL}$. No entanto, em uma inspeção visual, as injeções equivalentes à concentração de colesterol de 1 $\mu\text{g/mL}$ não apresentaram sinais, por isso optou-se por adotar este último critério como LD. Para tal, a curva analítica foi construída com a menor concentração equivalente a 2,5 $\mu\text{g/mL}$, sendo recomendável adotar este valor como o LQ. No futuro, uma investigação mais detalhada deste parâmetro pode incluir análises entre 1 – 2,5 $\mu\text{g/mL}$ na curva analítica.

6.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO BREU PROCESSADO (OBP) E DOS LOTES ÚNICOS (LTU-SI E LTU-SE)

A OBP apresentou 1,75% (p/p) de teor médio de umidade e faixa de fusão entre 100-120 °C. LTU-Si (Figura 19a) e LTU-Se (Figura 19b) apresentaram teores de umidade 2,08 % e 1,75 % (p/p) e pontos de fusão nas faixas 150-155 °C e 85-114 °C, respectivamente. A fusão do primeiro ocorreu bem mais próxima ao ponto da mistura de amirinas-referência (178-179 °C), sugerindo a maior pureza e concentração destas substâncias em LTU-Si.

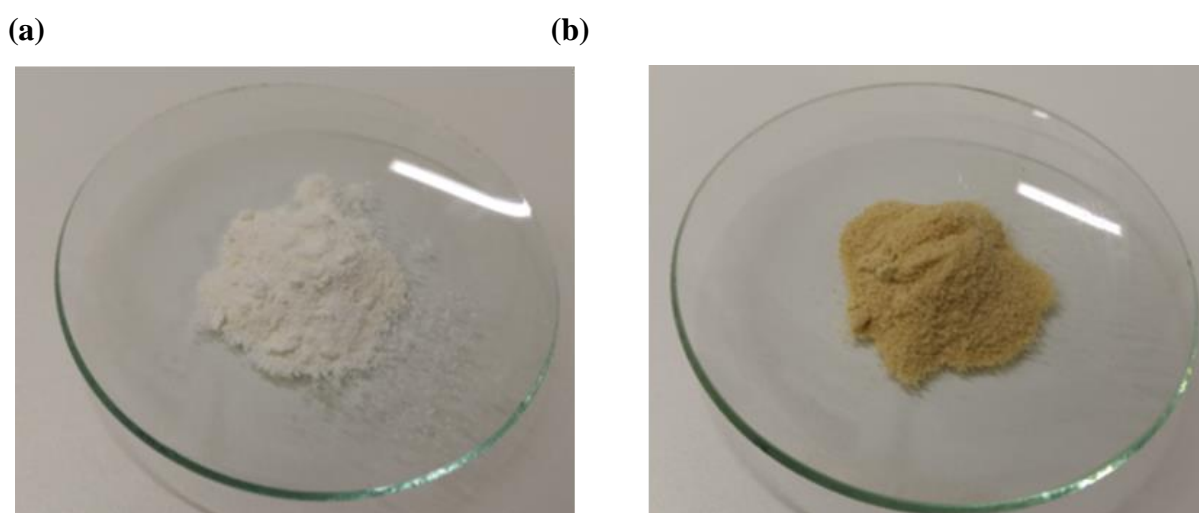


Figura 19: Aspecto macroscópico obtido para o (a) LTU-Si e (b) LTU-Se.

Através do IV, é possível identificar as bandas de absorção como a $3200-3000\text{ cm}^{-1}$ correspondente ao estiramento da ligação – OH mais acentuada para as amostras A, LTU-Si e LTU-Se, fato este que evidencia a provável concentração de álcoois (por exemplo, amirinas) nestas matrizes. Contudo, a característica mais marcante é a presença banda em $1720-1700\text{ cm}^{-1}$, correspondente ao estiramento do grupamento carbonila de cetonas, OBP e LTU-Se. Isso indica uma diferença fundamental no processo que utiliza Sephadex (LTU-Se), que mantém as cetonas (como as amirinas) após a eluição. Já o processo que utiliza gel de sílica promoveu esta separação, eliminando as cetonas da mistura de amirinas, como fica explícito na ausência dessa banda característica em LTU-Si e “A” (Figura 20). As bandas $1455 - 1380\text{ cm}^{-1}$ e $1030 - 933\text{ cm}^{-1}$ são características da deformação da ligação C=C e C–O respectivamente.

Dessa forma, a técnica de infravermelho pode ser útil para confirmar a seletividade do fracionamento e purificação do breu em Sephadex e gel de sílica, conforme apontam as diferenças nas absorções de OBP, LTU-Si e LTU-Se.

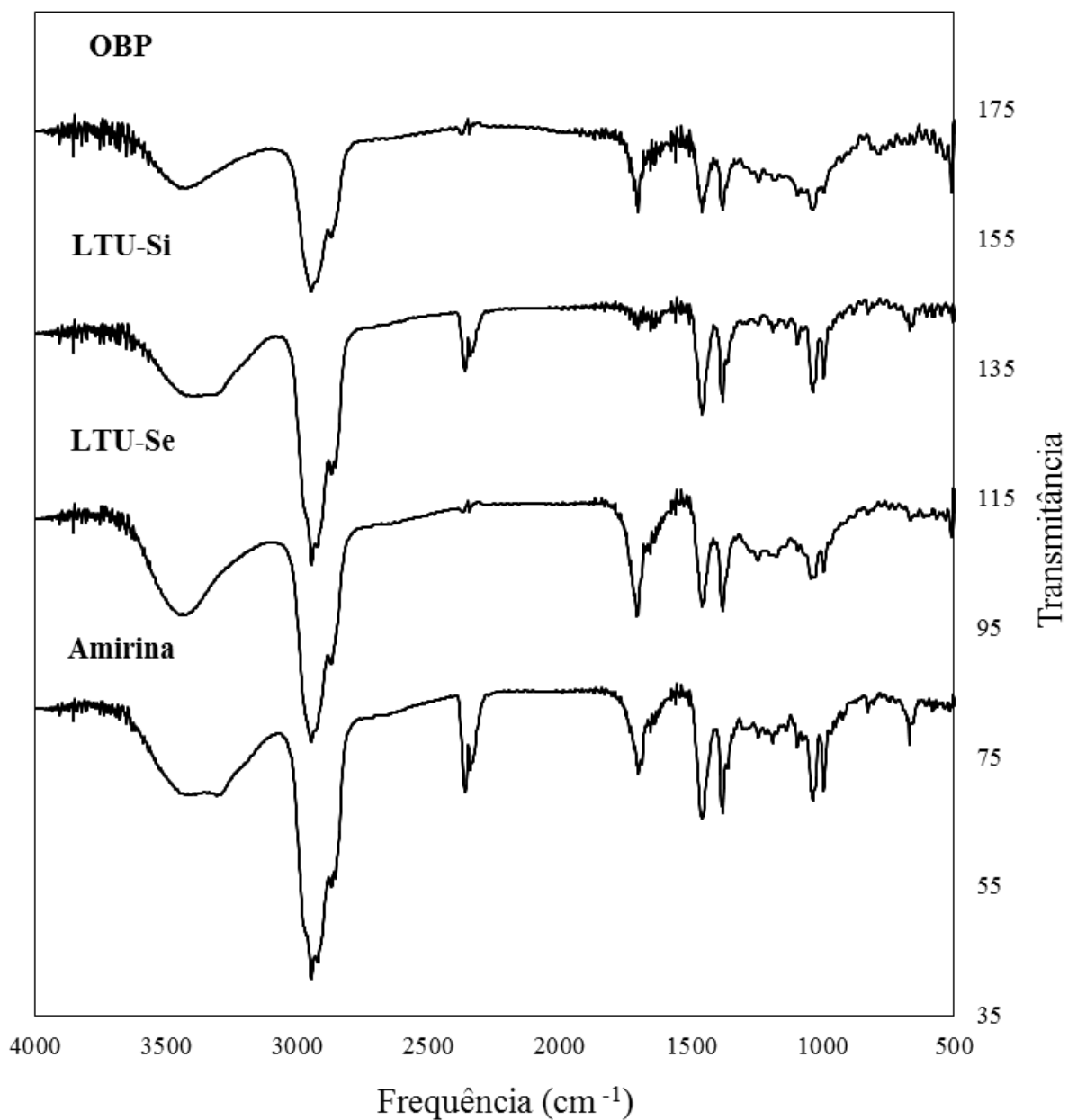


Figura 20: Espectro de infravermelho de OBP, LTU-Si, LTU-Se e Amirina (A).

Na análise por CG-EM, após tratamento de OBP com diazometano, foram identificadas 12 substâncias terpênicas: (1) β -amirenona, (2) β -amirina, (3) α -amirenona, (4)

α -amirina, (5) lupeol, (6) derivado de ácido elemólico, (7) éster metílico do ácido 3-oxo-tirucalla-8,24-dien-21-oico, (8) derivado de aldeído ursólico/ oleanólico, (9) éster metílico do ácido β - elemólico, (10) maniladiol, (11) breína e (12) éster do ácido ursólico/oleoanólico. A identificação baseou-se na comparação da biblioteca do aparelho (Wiley Library Software 7N) e em comparações com a literatura (SIANI et al., 2012) (Figura 21 e tabela 9, página 70).

É importante notar, como regra geral, que os triterpenos do tipo oleanano eluem antes dos seus isômeros ursanos, conforme observado nos tempos de retenção em colunas cromatográficas de baixa e média polaridade (MAGALHÃES MAIA et al., 2000; MARQUES, 2010; SIANI et al., 1999). Este fenômeno foi considerado, no presente estudo, para se pontuar as identidades dos triterpenos, além das respectivas fragmentações de massas. Esta assertiva é também corroborada pela usual predominância da α -amirina (e seu sinal em CG) sobre a β -amirina (e seu sinal em CG); repetindo-se a ocorrência para as cetonas correspondentes (α -amirenona e β -amirenona).

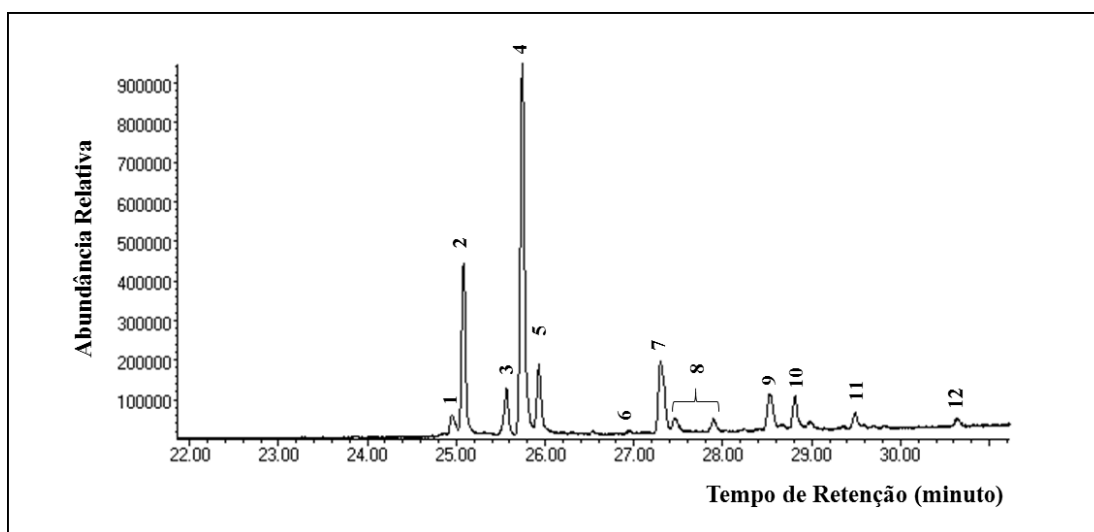


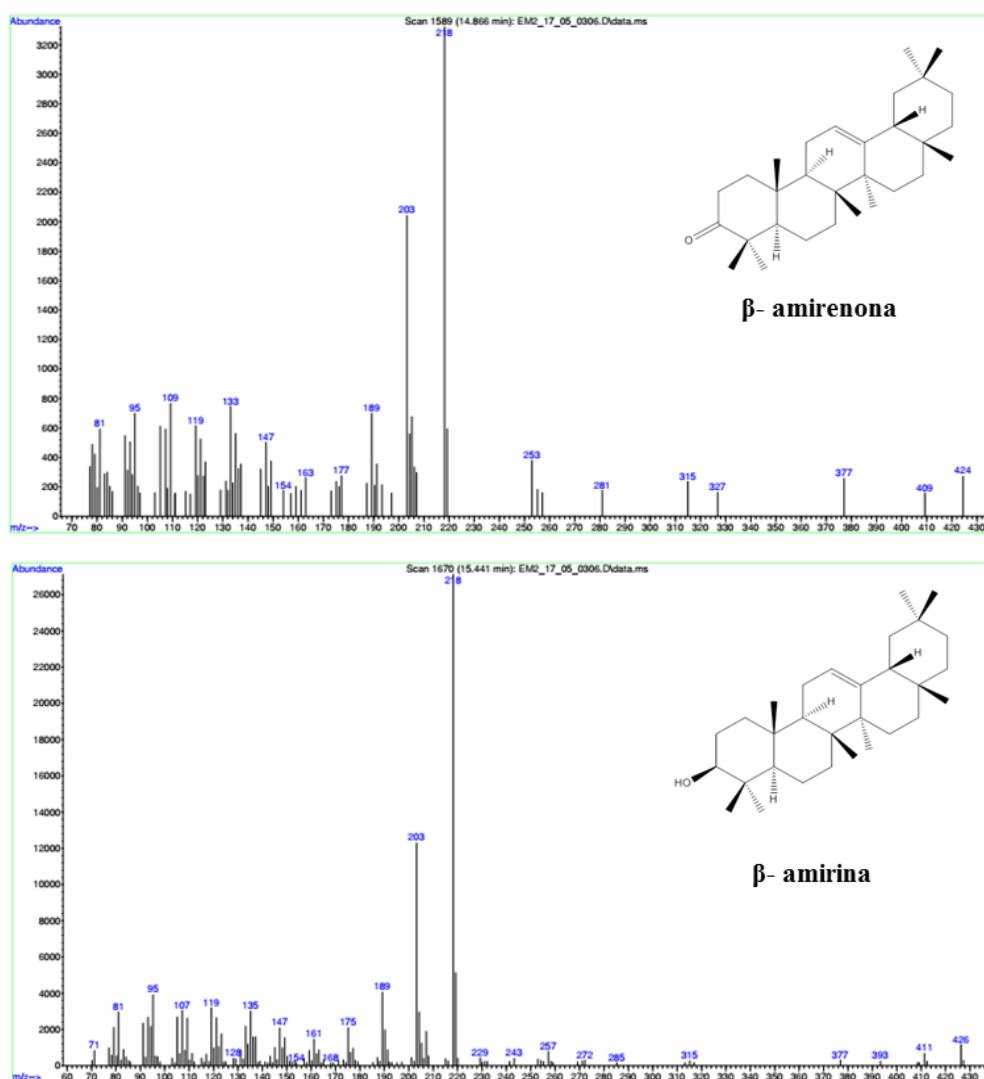
Figura 21: Ampliação do cromatograma obtido por CG-EM (70 eV) da amostra OBP, analisado em coluna HP-17 HT. Numeração de acordo com ordem de eluição.

No cromatograma da análise por CG-EM nota-se claramente a predominância dos sinais 2 ($t_R = 25,08$ minutos) e 4 ($t_R = 25,74$ minutos) (Figura 21). Os espectros de massas referentes a estes dois sinais são muito semelhantes, ambos com $[M]^+ 426$, correspondendo às massas moleculares dos isômeros α -amirina e β -amirina, ambas de fórmula $C_{30}H_{50}O$. Estes triterpenos pentacíclicos produzem fragmentos típicos de olean-12-enos e ursan-12-enos oriundos da reação de Retro-Diels-Alder (RDA) no anel C, que gera os fragmentos mais

abundantes com m/z 218 (100%), 203 e 189 (SIANI et al., 2012; SILVA, 2006) (Figuras 22 e Quadro 3).

O mesmo tipo de fragmentação ocorre no caso dos sinais 1 ($t_R = 24,95$ min) e 3 ($t_R = 25,57$ min) que correspondem, respectivamente às β -amirenona e α -amirenona. Estas cetonas possuem $[M]^+$ 424, conseqüente da fórmula molecular $C_{30}H_{48}O$. O espectro de massas é caracterizado pelos fragmentos com m/z 409, 281, 147, 133 e 95, além daqueles oriundos da RDA (NORONHA, 2001; SIANI et al., 2012) (Figura 22).

De maneira similar quanto à ocorrência da RDA em triterpenos pentacíclicos, o sinal 5 no cromatograma da figura 21 corresponde ao lupeol, que é caracterizado pelo $[M]^+$ 426 ($C_{30}H_{50}O$) e fragmentos principais com m/z 409, 393, 365, 218 (100), 189, 175, 161, 135 e 95 (NORONHA, 2001) (Figura 22 e Quadro 4).



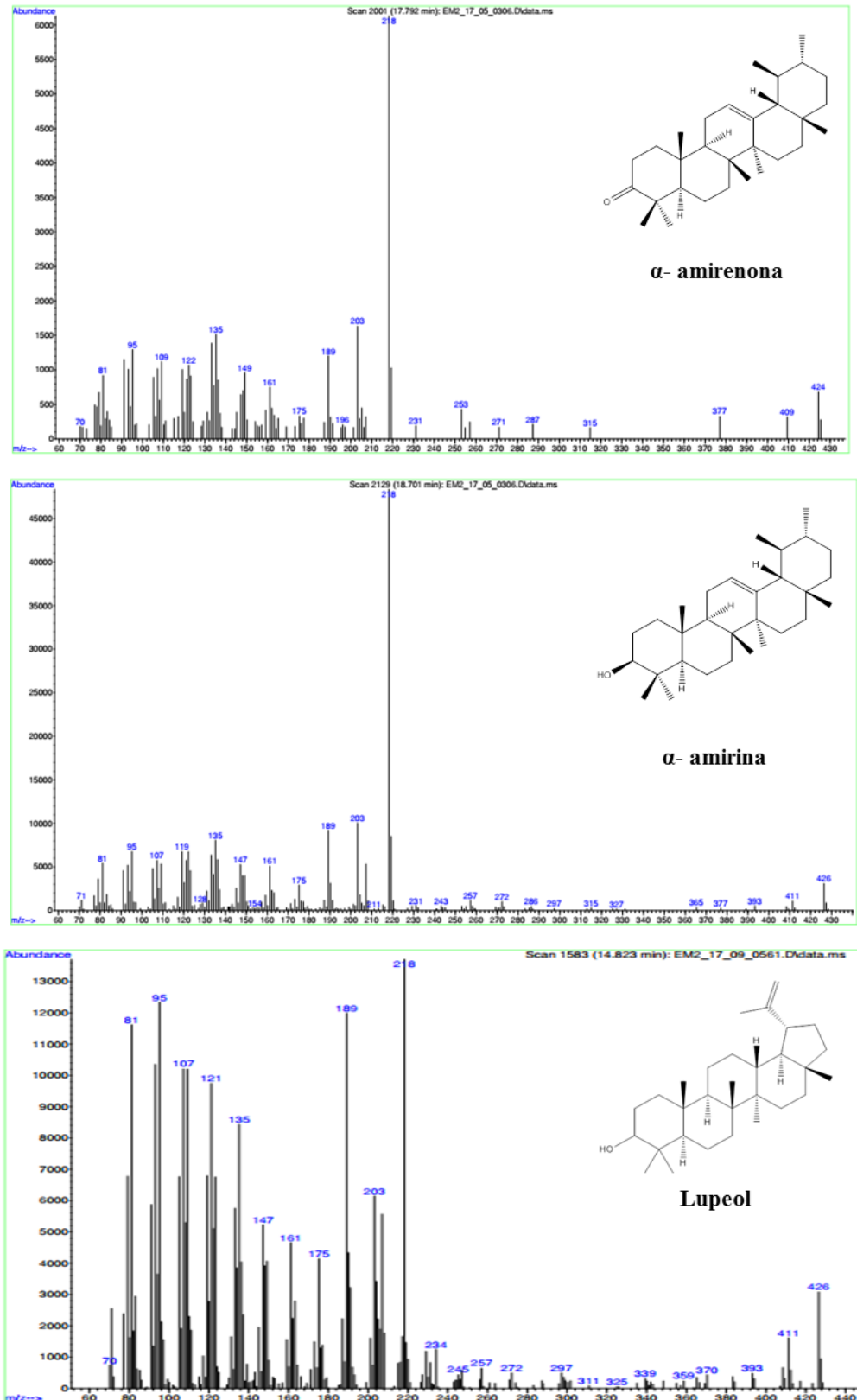
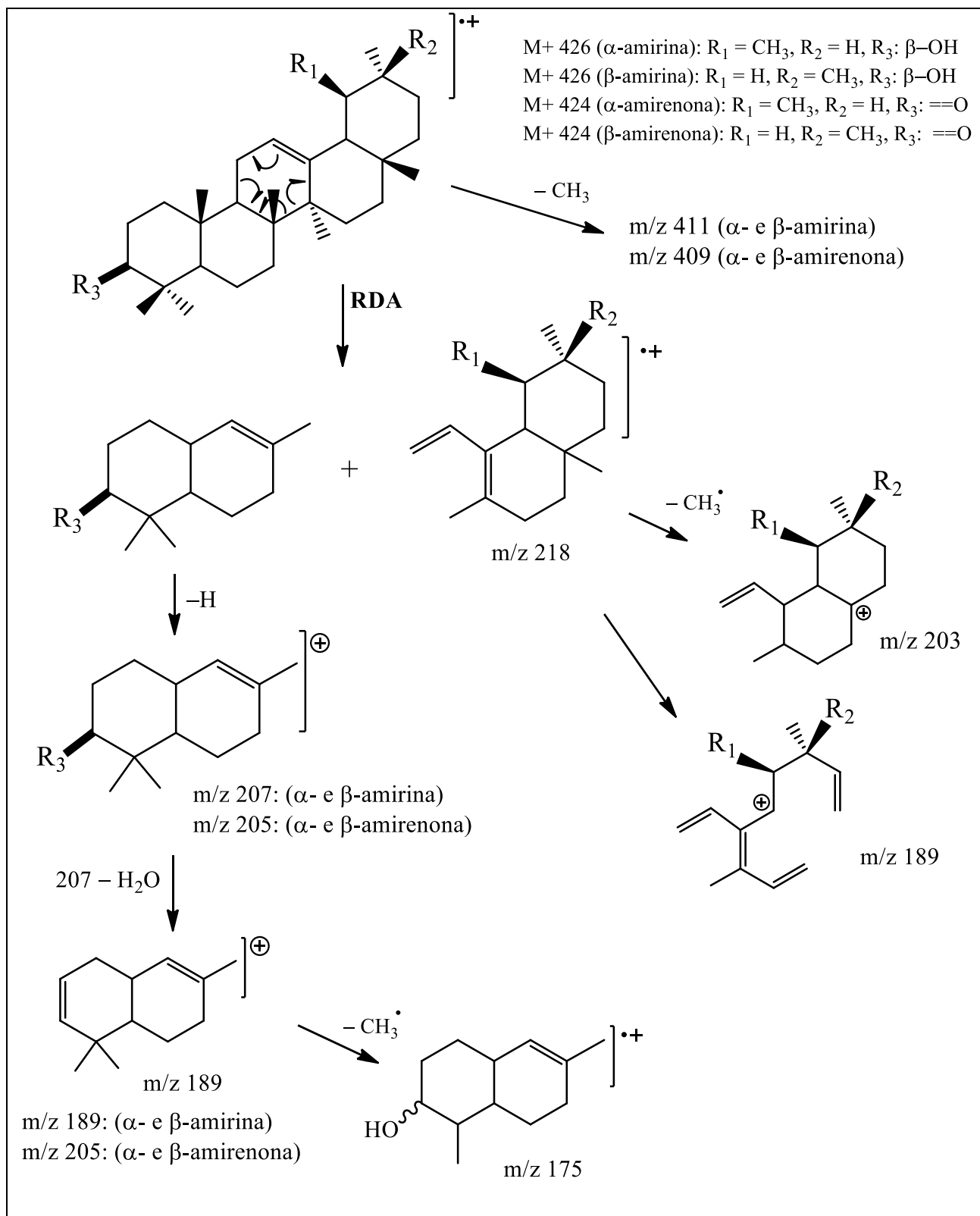
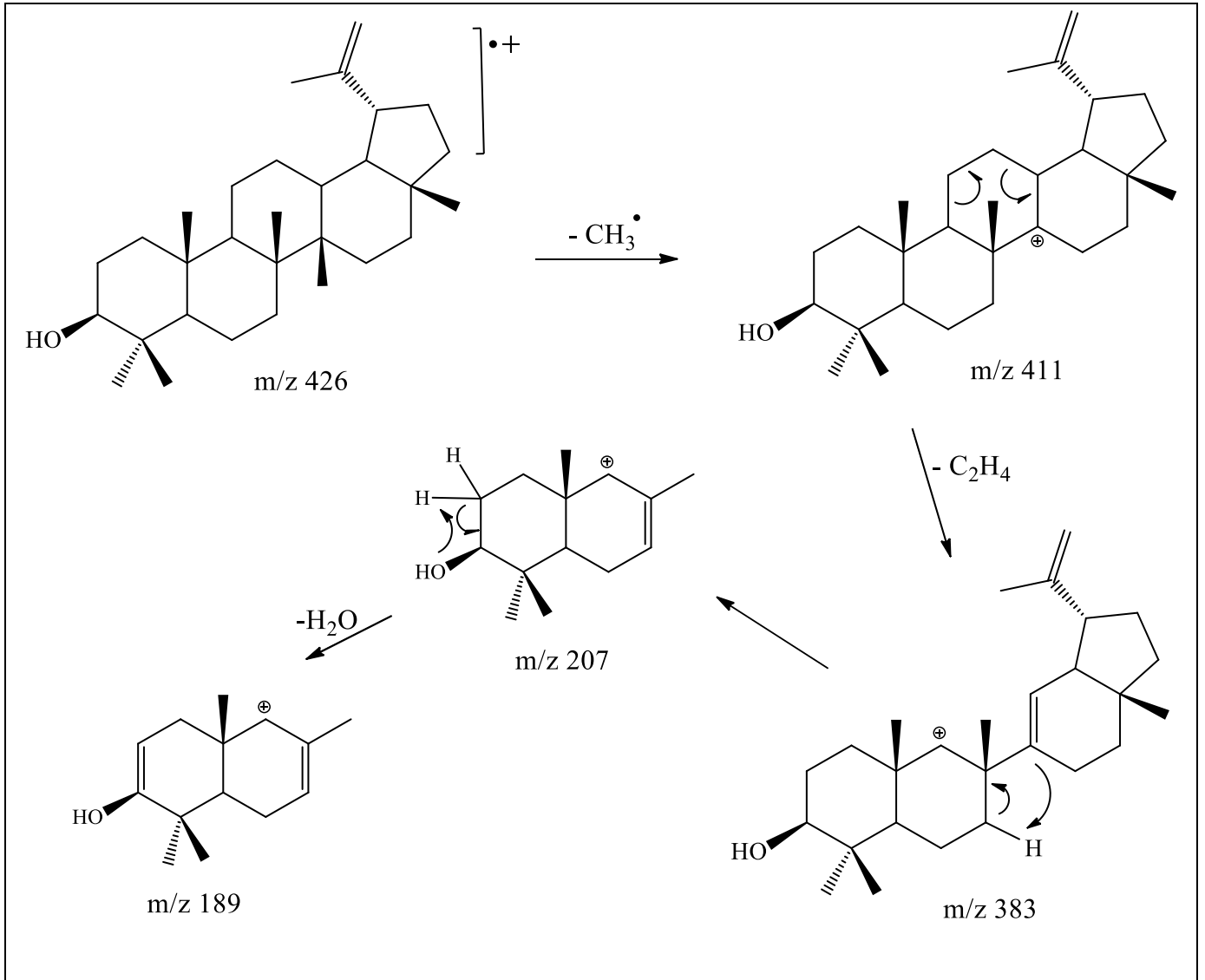


Figura 22: Ampliações dos espectros de massas (70 eV) para os sinais (1) = β -amirenona, (2) = β -amirina, (3) = α -amirenona, (4) = α -amirina e (5) = lupeol.



Quadro 3: Proposta de fragmentação da α -amirina, β -amirina, α -amirenona e β -amirenona ressaltando os fragmentos derivados da reação Retro-Diels-Alder.

Fonte: Adaptado de VILEGAS et al., 1997.



Quadro 4: Proposta de fragmentação do lupeol, ressaltando os fragmentos derivados principais.

Fonte: Adaptado de CARVALHO et al., 2010.

Tanto o LTU-Se quanto o LTU-Si produziram cromatogramas que corroboram com os resultados apontados por CCD discutidos no item 6.2 (Figura 23 e 24).

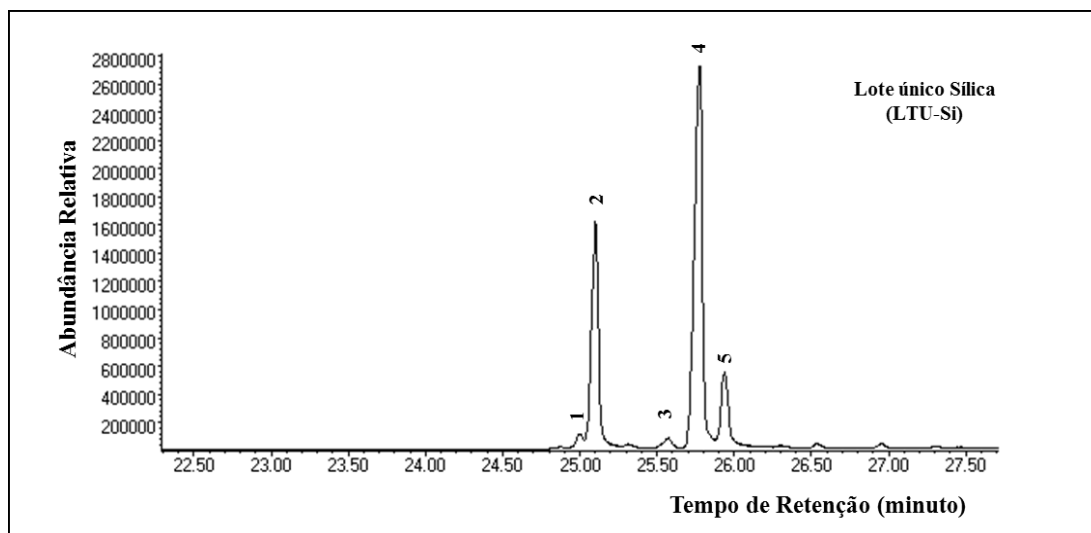


Figura 23: Cromatograma do LTU-Si obtido por CG-EM em coluna DB-17HT.

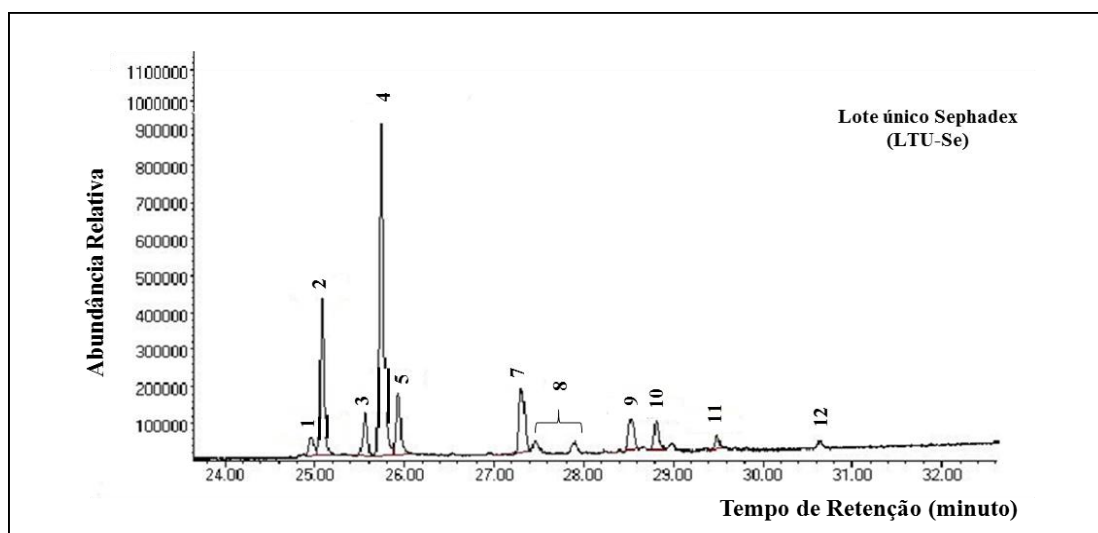


Figura 24: Cromatograma do LTU-Se obtido por CG-EM em coluna DB-17HT.

O cromatograma do LTU-Si (Figura 23) evidencia que o processo empregado na sua obtenção praticamente eliminou os triterpenos com eluição além do t_R do lupeol (sinal 5). Estes triterpenos minoritários (mais polares) passaram a ser detectados apenas como traços (abaixo de 1%) nestas condições de análise. Este resultado é corroborado pelas análises de CCD e densitometria durante o processo de obtenção de LTU-Si.

O cromatograma do LTU-Se (Figura 24), que embora qualitativamente similar ao do OBP, concentra α -amirina e β -amirina, conforme revelam os maiores valores obtidos para as abundâncias relativas dos sinais correspondentes 2 e 4. Entretanto, a proporção dessas substâncias na composição do perfil cromatográfico ocorreu em grau expressivamente menor que no caso do LTU-Si; fato este também corroborando pelos resultados de CCD e densitometria. Ao contrário do processo em gel de sílica, a eluição de OBP em Sephadex manteve os sinais das substâncias mais polares, como seria de se esperar de um mecanismo de fracionamento baseado em filtração por gel de exclusão, considerando que a matriz estudada (OBP) é majoritariamente composta por triterpenos de tamanho e pesos moleculares muito semelhantes. O resultado aponta para um eficiente *clean-up* da amostra bruta de OBP sem, todavia, produzir o mesmo ganho na separação dos triterpenos.

A estimativa do teor dos componentes de OBP, LTU-Si e LTU-Se foi realizada através da técnica de CG-DIC utilizando método de padrão externo. Para tal, o reagente colesterol foi eleito como o padrão para as análises quantitativas, numa escolha motivada pela (i) disponibilidade do material no laboratório, (ii) menor valor de mercado em relação ao padrão de amirina e (iii) semelhança estrutural com os compostos triterpênicos pentacíclicos estudados (LANÇAS, 2009).

Na tabela 9, encontram-se os teores estimados para cada uma das matrizes avaliadas. Estes resultados demonstram que o teor de α -amirina, β -amirina, α -amirenona e β -amirenona são praticamente os mesmos para OBP e LTU-Se, diferenciando-se apenas em relação ao menor teor de lupeol (OBP = 3,85; LTU-Se = 1,94) resultante da utilização de Sephadex LH-20. O teor total dos isômeros de amirina em OBP e LTU-Se se mantiveram praticamente iguais, com 24,94 % e 25,2 %, respectivamente. Por fim, o teor total dos isômeros de amirina neste caso foi 64,1%, concentrando-o em 2,5x o teor da oleorresina bruta.

Tabela 9: Principais constituintes de OBP, LTU-Si, LTU-Se e amirina referência (A) com respectivos teores quantificados em CG-DIC usando padrão externo.

Sinal	t_R (minutos)	Triterpeno	OBP	LTU-Si	LTU-Se
(1)	23,21	β -amirenona	$1,91 \pm 0,23^a$	$2,10 \pm 0,07^a$	$1,81 \pm 0,09^a$
(2)	23,33	β -amirina	$8,14 \pm 0,98^a$	$22,73 \pm 0,49^b$	$8,74 \pm 0,15^a$
(3)	23,78	α -amirenona	$2,71 \pm 0,32^a$	$1,59 \pm 0,08^b$	$2,05 \pm 0,06^b$
(4)	23,90	α -amirina	$16,8 \pm 2,06^a$	$41,37 \pm 1,00^b$	$16,46 \pm 0,29^a$
(5)	24,13	Lupeol	$3,85 \pm 0,46^a$	$8,06 \pm 0,26^b$	$1,94 \pm 0,09^c$
-	24,65	NI	< L.D.	$0,54 \pm 0,01$	< L.D.
-	25,04	NI	< L.D.	$0,51 \pm 0,01$	< L.D.
-	25,50	NI	$0,48 \pm 0,05$	< L.D.	< L.D.
-	26,67	NI	$0,46 \pm 0,02^a$	< L.D.	$0,45 \pm 0,00^a$
-	26,83	NI	$1,60 \pm 0,24^a$	< L.D.	$0,82 \pm 0,04^b$
-	26,98	NI	$0,50 \pm 0,05^a$	< L.D.	$0,61 \pm 0,01^a$
-	27,48	NI	$0,84 \pm 0,12^a$	< L.D.	$0,75 \pm 0,02^{a,b}$

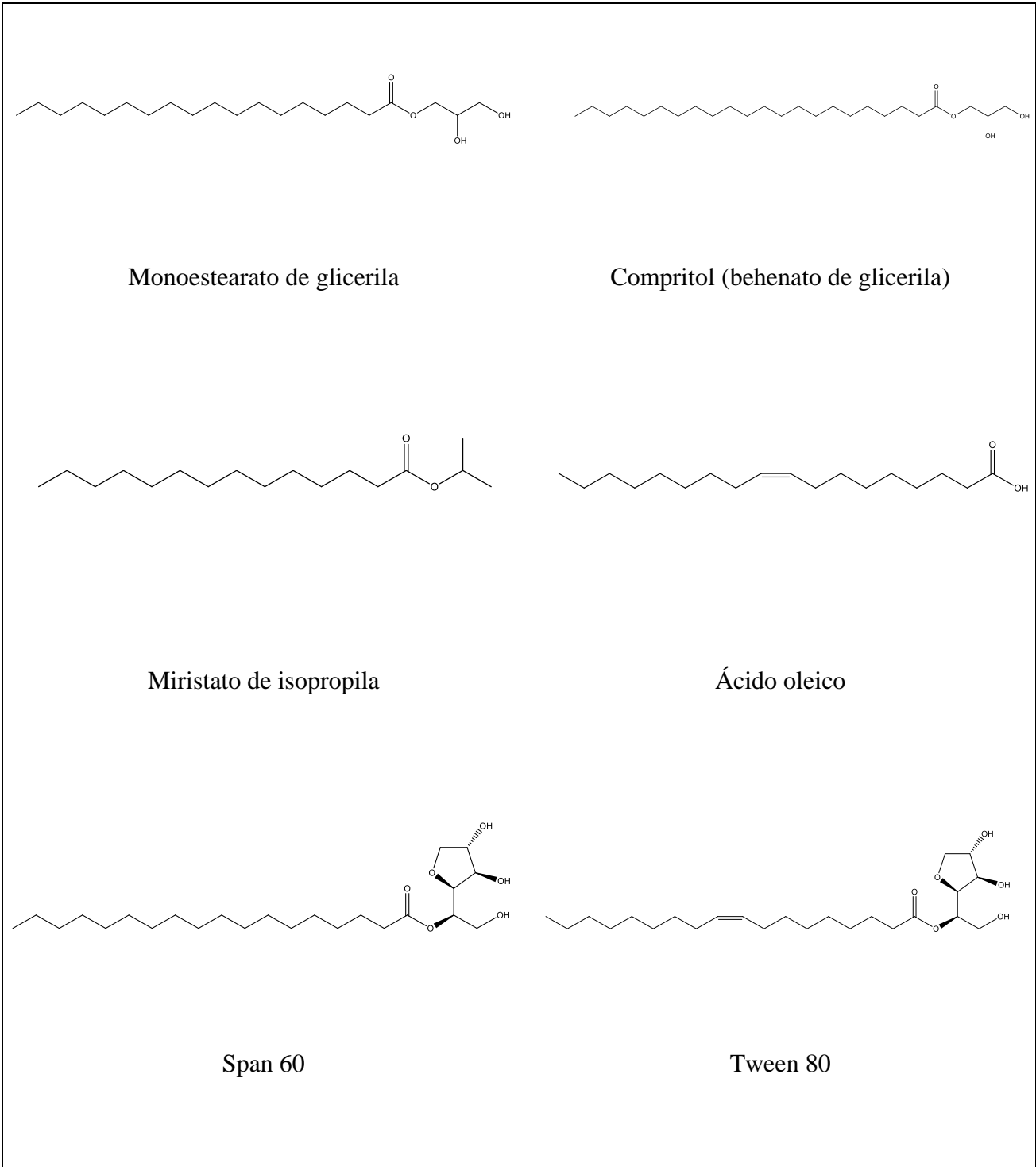
t_R = tempo de retenção em coluna DB-17 HT. NI = não identificado.

Para mesmo componente, letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$ por ANOVA, seguida de Tukey).

6.7 DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DE SATURAÇÃO DO LOTE ÚNICO DE SÍLICA (LTU-SI) NOS EXCIPIENTES

No presente estudo, inicialmente para a estimativa da maior ou menor solubilidade dos isômeros das amirinas nos lipídios e tensoativos disponíveis (MG, COMP, AO, MI, TW e SP), os PSH parciais e totais foram calculados, tomando-se como base as estruturas moleculares e os grupos funcionais que compõem estas moléculas (Quadro 5 e Tabela 10). Adicionalmente, o mesmo foi realizado para o diclorometano e a água, objetivando empregá-los como referências, respectivamente, de solventes provedores de alta solubilidade e insolubilidade para os triterpenos-alvo. Tal estratégia viabilizou o estabelecimento de uma métrica para a estimativa da solubilidade do LTU-Si nos excipientes, por meio da avaliação do quadrado da diferença dos parâmetros totais ($(\Delta\delta T)^2$) (HANSEN, 2007).

Todos os cálculos consideraram somente a avaliação dos excipientes em relação à capacidade de solubilização frente aos isômeros de amirina, uma vez que estes eram os componentes majoritariamente presentes no LTU-Si (>60%).



Quadro 5: Estrutura molecular dos lipídios e tensoativos utilizados no desenvolvimento dos CLN contendo amirina.

Tabela 10: Parâmetros de solubilidade de Hansen parciais, totais e estimativa da diferença mínima entre os solventes, lípidios, tensoativos e da amirina ($(\Delta\delta T)^2$).

Substâncias	Valores de PSH				$(\Delta\delta T)^2$ Amirina
	δ_D	δ_P	δ_H	δ_T	
IFA					
α -amirina	18,1	8,7	3,5	20,4	-
β -amirina	18,1	8,7	3,5	20,4	-
Referências – Solventes					
Etanol absoluto	15,8	8,8	19,4	26,5	37,7
Diclorometano	17,0	7,3	7,1	19,8	0,3
Lípido					
Miristato de isopropila	15,0	1,6	1,4	15,1	27,4
Ácido oleico	15,7	0,8	4,0	16,2	17,3
Monoestearato de glicerila	16,8	4,6	9,01	19,6	0,6
Lípido / tensoativo					
Compritol 888ATO	15,2	0,12	3,09	15,5	23,8
Tensoativo					
Span 60	17,1	6,1	12,3	21,9	2,4
Tween 80	16,7	6,5	9,4	20,2	0,02

δ_D = força de interações por dispersão; δ_P = força de interações polares; δ_H = força de ligação de hidrogênio; δ_T = resultante do somatório das forças (HANSEN, 2007).

A Tabela 10 revela que não há diferença entre os valores de PSH obtidos para a α -amirina e β -amirina, como já se poderia prever, uma vez que o método de Stefanis & Panayiotou empregado não distingue isômeros de posição, considerando apenas os grupos funcionais de 1° e 2° ordem presentes nas moléculas; o que, para ambos os isômeros, são exatamente iguais (HANSEN, 2007). Além disso, é notório que esta molécula apresenta um alto valor para o parâmetro parcial δ_D (18,1) relacionado às forças de interação não-polares, consequente do núcleo hidrocarbônico pentacíclico. Por outro lado, os δ_P e δ_H , relacionados às forças de interação polares e de ligação de hidrogênio, respectivamente, apresentaram valores bem mais baixos, como consequência da presença de apenas um grupo hidroxila (-OH) na estrutura deste IFA em potencial (Quadro 5).

No caso do solvente CH_2Cl_2 , o valor de $(\Delta\delta T)^2$ apresentou-se igual a 0,3; corroborando o fato de o emprego deste solvente orgânico ser uma referência adequada para representar um limite superior para valores de boa solubilidade das amirinas nos insumos testados. Em contrapartida, o solvente EtOH resultou $(\Delta\delta T)^2 = 37,7$, ou seja, significativamente maior que o valor obtido para o CH_2Cl_2 , indicando assim a baixa

solubilidade ou quase insolubilidade dos triterpenos-alvo neste solvente polar ou em substâncias com valores de $(\Delta\delta T)^2$ próximos ao do EtOH.

A partir da análise dos valores calculados para os parâmetros parciais dos lipídios, foi possível notar o predomínio das forças de interação por dispersão nestas moléculas, uma vez que foram obtidos valores elevados (15 - 16,8) para o parâmetro δ_D . Sendo tal fato relacionado à abundância de grupos $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$, $>(\text{CH})-$ e $>C<$ presentes nas respectivas estruturas moleculares. Já quanto aos parâmetros δ_P e δ_H , observam-se valores mais baixos (4 - 9), justificados pela presença de poucos grupos polares, como: $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{O}-$ e $-\text{COO}-$, nestas estruturas. A partir da análise dos $(\Delta\delta T)^2$ dos lipídios, estabeleceu-se uma ordem crescente de provável solubilidade destes para as amirinas: $\text{MG} \gg \text{AO} > \text{COMP} > \text{MI}$.

Ressalta-se que o lipídio sólido MG apresentou um valor de $(\Delta\delta T)^2$ expressivamente menor (0,6) que os demais ($\text{AO} = 17,3$; $\text{COMP} = 23,8$ e $\text{MI} = 27,4$) estando este próximo daquele valor obtido para a referência de boa solubilidade. Isso aponta o potencial deste lipídio para compor a fase oleosa dos CLN a serem desenvolvidos.

Para os tensoativos, os valores de $(\Delta\delta T)^2$ apresentaram ordem de grandeza diferentes, sendo observado menor valor para o TW ($(\Delta\delta T)^2 = 0,02$) em relação ao SP ($(\Delta\delta T)^2 = 2,4$). Isto se deve à presença de uma cadeia hidrocarbônica alifática de tamanho superior no caso do TW que favorece um maior número de sítios disponíveis para a realização de interações por dispersão com as amirinas (maior superfície de contato) e, portanto, resulta em maior solubilidade destas neste tensoativo.

Visando verificar a validade dos resultados obtidos *in silico*, a estimativa da solubilidade de saturação do LTU-Si nos lipídios líquidos e sólidos foi realizada através de ensaios de densitometria e análise semiquantitativa empregando o *software* ImageJ. Esta técnica é comumente descrita na literatura para o monitoramento de processos de fracionamento e purificação de metabólitos oriundos de produtos naturais. Ilustra este fato o estudo de Barboza e colaboradores (2015) referente ao isolamento do flavonoide kanferitrina das folhas de *Uncaria guianensis* por extração em fase sólida. As condições ótimas foram estabelecidas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a CCD acoplada à análise densitométrica por *software* para calcular os teores relativos dos componentes presentes na matriz vegetal em estudo. Os autores obtiveram um alto grau de concordância entre os valores obtidos para os analitos em cada uma das técnicas utilizadas.

No presente trabalho esta técnica foi empregada para estimar a solubilidade de saturação das amirinas em matrizes lipídicas de forma semelhante à avaliação normalmente descrita na literatura para solventes orgânicos. Tendo em vista a natureza das matrizes em

estudo, foi necessário, portanto, proceder à avaliação da linearidade, repetibilidade e exatidão do método proposto.

As curvas analíticas a partir de diluições seriadas da solução-estoque de LTU-Si permitiram calcular o coeficiente de determinação (r^2) igual a 0,994 e o correlação linear de Pearson (r), que resultou em 0,997; valor este de acordo com o limite estabelecido na RDC nº 166 (ANVISA, 2017) ($r > 0,990$). Além disso, a equação da reta de tendência foi determinada como $y = 15751102x + 360644$, sendo $y =$ área do sinal de amirina (R_f 0,85) no densitograma e $x =$ concentração de amirinas em mg/mL (Gráfico 3).

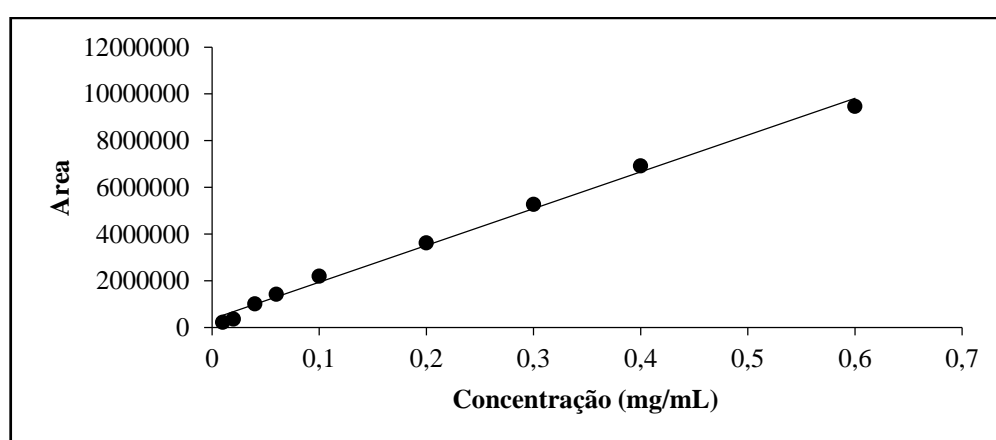


Gráfico 3: Curva analítica obtida pela análise de concentrações diferentes de LTU-Si em densitometria pelo *software* ImageJ.

A partir da análise do coeficiente de correlação foi possível demonstrar a linearidade do método analítico para o intervalo estudado de 0,01 mg/mL – 0,7 mg/mL, estabelecendo-o como faixa de trabalho.

A precisão em nível de repetibilidade foi determinada através de análises no mesmo dia, das soluções de LTU-Si nas concentrações de 0,3; 0,4 e 0,6 mg/mL em triplicata. Na tabela 11, os dados obtidos são resumidos, sendo possível notar que os coeficientes de variação para todas as replicadas realizadas encontram-se abaixo de 10% indicando assim a precisão em nível de repetibilidade do método proposto.

Tabela 11: Avaliação de precisão em nível de repetibilidade do método de CCD acoplada à análise densitométrica digital (*software* ImageJ).

Concentração (mg/mL)	Área do eluato (R_f 0,85)	Média	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação
0,3	7330447			
0,3	7127497	7515195	506031	6,7%
0,3	8087640			
0,4	9820690			
0,4	9520690	9778047	238907	2,4%
0,4	9992761			
0,6	12776832			
0,6	11790104	12292630	493619	4,0%
0,6	12310953			

As cromatoplasmas permitem deduzir que mesmo a adição “A” às soluções lipídicas não produz variações significativas no valor de R_f observado para os isômeros (0,85), quando comparado com as soluções preparadas somente com o composto-referência (Figura 25). Além disso, para todos os casos ensaiados, constatou-se apenas a presença de uma única banda correspondente ao R_f das amirinas, conforme apontado pelo revelador específico. Este fato, em conjunto com a análise dos dados da Tabela 12 certificam que não ocorreu coeluição dos lipídios com as amirinas, visto que os valores de concentração deste analito calculados contra a curva analítica (mesmo na presença dos excipientes) aproximou-se do teórico (0,4 mg/mL) e ficou dentro da faixa de intervalo de confiança método. Esses resultados demonstram a exatidão do método proposto para o analito em questão.

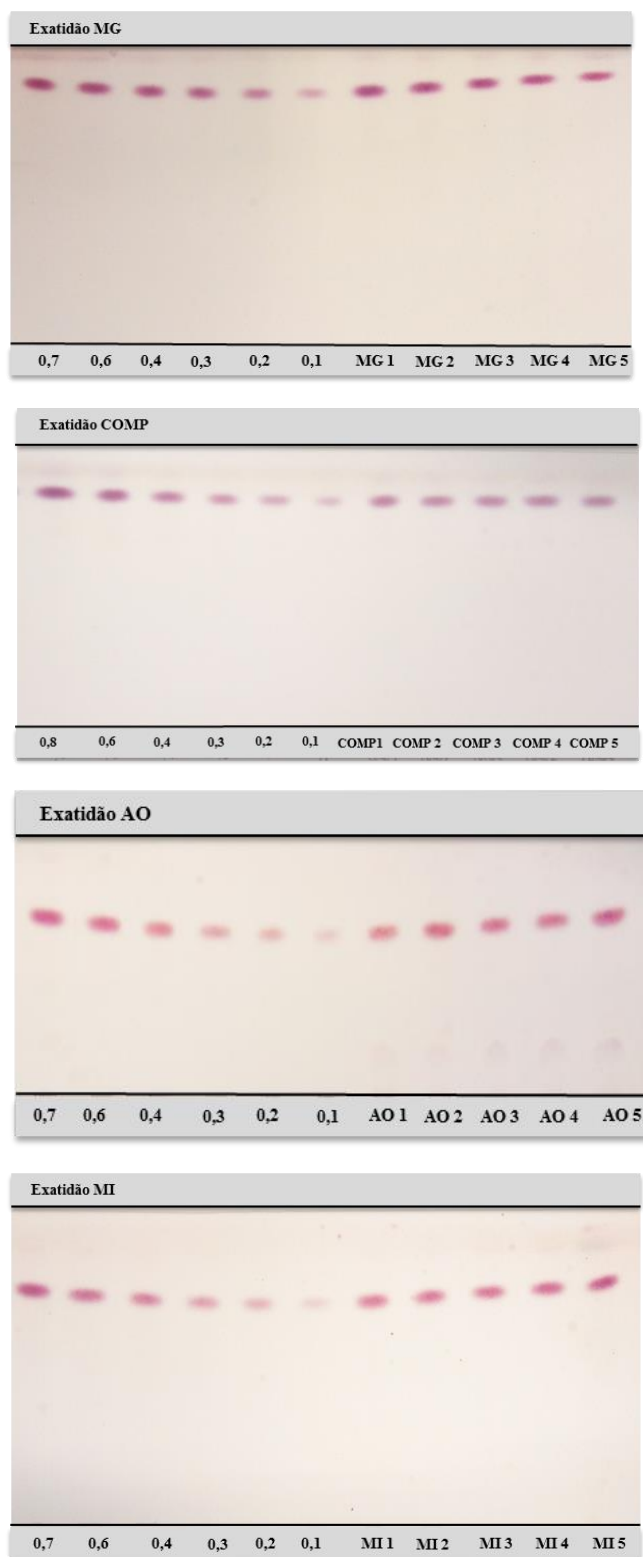


Figura 25: Cromatografia em camada delgada em gel de sílica de fase normal dos lipídios MG, COMP, AO e MI separadamente (0,1- 0,7 mg/mL) e destes a 1 mg/mL adicionados de solução de “A” (0,4 mg/ mL). Eluição: 2% de metanol em clorofórmio. Revelação: solução metanólica de anisaldeído sulfúrico, em luz visível.

Tabela 12: Avaliação de exatidão do método de CCD acoplada à análise densitométrica digital (*software ImageJ*).

Lipídio (1mg/mL) adicionado de Amirina (0,4 mg/mL)	Amirina adicionada (mg/mL)*	Intervalo de confiança** (mg/mL)
MG	0,41 ± 0,50	0,35 – 0,47
COMP	0,37 ± 0,01	0,36 – 0,39
AO	0,49 ± 0,04	0,44 – 0,55
MI	0,46 ± 0,05	0,40 – 0,51

*valores de média das quintuplicatas ± os seus desvios-padrão.

** teste T- student ($t = 2,776$) aceitável ao nível de significância de 5%.

A análise estatística dos valores obtidos para a solubilidade de LTU-Si nos lipídios empregados (Tabela 13) revelou que só houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a solubilidade deste analito e os lipídios testados para os casos do COMP e do AO. De acordo com os resultados da CCD-densitometria, a maior capacidade de solubilizar o LTU-Si coube ao MG, conforme sugerido pelo modelo PSH, e ao MI, que no modelo de PSH apresentou valor de $(\Delta\delta T)^2$ significativamente alto indicando, portanto, baixa solubilidade. Estas diferenças observadas entre o modelo PSH e o experimental são provavelmente devidas ao fato de o primeiro considerar a estimativa dos parâmetros a 25 °C, enquanto os ensaios de CCD-análise densitométrica utilizam a temperatura de 80 °C (empregada no preparo dos CLN). Portanto, de acordo com os resultados apresentados na Tabela 11, pode-se estabelecer a seguinte ordem crescente de solubilidade para o LTU-Si: MG = MI > AO > COMP.

Tendo em vista as disparidades obtidas no modelo teórico e experimental e visando entender a correlação entre a máxima solubilidade observada e a estabilidade dos CLN obtidos com o emprego desses excipientes para o carregamento das amirinas, todas as combinações de lipídios e tensoativos foram testadas.

Tabela 13: Estimativa de solubilidade dos isômeros de amirina nosm lipídios pelo método de CCD acoplada à análise densitométrica (*software ImageJ*).

Amostras	LTU-Si/ lipídio (mg/g)
MG	308 ± 52
COMP	287 ± 33 ^a
AO	369 ± 40 ^b
MI	404 ± 103

Para mesmo componente, letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) por ANOVA e teste Tukey.

6.8 DESENVOLVIMENTO DOS CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS

As composições das formulações foram baseadas nos cálculos de EHL, que orientaram para a obtenção de uma matriz combinatória dos lipídios e tensoativos composta de 54 formulações, nestas incluídas as triplicatas e as formulações controles-branco (tabela 5, página 39). Vale ressaltar que, apesar de mais proporções terem sido inicialmente sugeridas, apenas as proporções 2:3, 1:1 e 3:2 de lipídios (líquidos:sólidos) foram preparadas, já que não havia disponíveis misturas de tensoativos capazes de estabilizar as demais proporções, quando se considerava o critério de EHL por elas requerido. Pelo mesmo motivo, a combinação AO:COMP foi tampouco explorada no presente estudo.

Diferentes classes de lipídios têm sido utilizadas como excipientes farmacêuticos devido ao baixo custo e baixa toxicidade, com destaque para os glicerídeos, que são representantes muito empregados na indústria farmacêutica e de cosméticos. Este fato motivou incluir nos testes do presente estudo glicerídeos sólidos (MG e COMP), e glicerídeos líquidos (AO e MI), cujas estruturas químicas estão representadas no Quadro 5.

O MG é empregado em grande variedade de produtos cosméticos e pode atuar como agente emulsificante, coemulsionante e emoliente, entre outras aplicações (ECCLESTON, 1997). Ao contrário dos glicerídeos iônicos, o MG não induz irritações cutâneas ou causa efeitos colaterais quando administrado por via oral (MACHADO et al., 2000). Estes motivos dão suporte ao seu status GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pela FDA (Food and Drugs Administration), respaldando sua ampla utilização nas indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética (SILVA et al., 2003). Outras conveniências na escolha deste excipiente são seu baixo custo e a capacidade de formar matrizes lipídicas de lenta cristalização, devido ao tamanho de sua cadeia de ácido graxo (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002; WONG; LI; BENDAYAN; RAUTH, 2007). O MG, faixa de ponto de fusão situada entre 55 e 60 °C (MÜLLER et al., 2008), costuma compor juntamente com um lipídio líquido a fase lipídica de CLN (HU et al., 2006; XIA et al., 2008; ZHUANG et al., 2010).

O COMP (mistura de mono, di e triglicerídeos do ácido graxo behênico) (JENNING; MA; GOHLA, 2000) possui versatilidade significativa, uma vez que no desenvolvimento de matrizes de NL pode ser empregado como tensoativo ou lipídio sólido (SHAMMA; ABURAHMA, 2014). Por ser rico em triglicerídeo e ácido graxo, é conhecido por formar cristais imperfeitos com espaço suficiente para acomodar fármacos hidrofóbicos (ROHIT; PAL, 2013).

Dentre os lipídios líquidos mais utilizados pode-se citar o AO, que é constituinte de vários materiais gordurosos naturais. A semelhança deste composto com os lipídios fisiológicos é considerada um grande atrativo para sua utilização, uma vez que possui a propriedade de boa tolerabilidade pelo organismo. O AO apresenta baixa viscosidade à temperatura ambiente (25 °C) e solidifica a 4 °C (LOPEZ-HUERTAS, 2010), sendo bastante utilizado na produção de carreadores lipídicos (BOSE; MICHNIAK-KOHN, 2013; HU et al., 2005; SHARMA et al., 2009; TAN et al., 2010; XIA et al., 2008).

O MI é um óleo de ésteres de 2-propanol e de ácido mirístico usado comumente em formulações cosméticas como emoliente não gorduroso para aplicação na pele. Seu maior destaque é ser considerado um lipídio que potencializa a penetração transdérmica (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2006).

Assim, as diferenças nas estruturas desses lipídios podem favorecer a eficácia de encapsulação, viabilizando o aumento da concentração do LTU-Si nos CLN. Isto se baseia no fato de a combinação de um lipídio sólido com um lipídio líquido gerar imperfeições na matriz lipídica, possibilitando a incorporação do ativo de interesse e evitando sua expulsão (FANG et al., 2008; TEERANACHAIDEEKUL et al., 2008).

Além dos lipídios, os tensoativos são empregados nos CLN buscando a estabilização através da redução da tensão interfacial, originando nanopartículas de tamanho menores, como consequência. Além disso, a presença de tensoativos permite a emulsificação entre as fases aquosa e oleosa e formam uma barreira elétrica ou mecânica que impede a coalescência das partículas ao longo do seu armazenamento (SCHÄFER-KORTING; MEHNERT; KORTING, 2007; SOUTO; DOKTOROVOVA; BOONME, 2011). O tipo e a concentração de tensoativo influenciam diretamente no tamanho e na eficiência de incorporação. Em geral, dependendo da concentração do lipídio, utiliza-se entre 0,5 e 5% de tensoativos. A escolha do tensoativo é baseada em sua compatibilidade química com os lipídios e com o seu valor de EHL (ATTAMM; MOMOH; BUILDERS, 2012). O Quadro 5 mostra a estrutura do TW e SP, que foram os agentes tensoativos empregados para a constituição dos CLN no presente estudo.

Foram desenvolvidas preparações contendo 5% (p/p) de fase lipídica, proporção baseada no estudo de Vaucher (2017) em que as proporções de 5% e 10% foram testadas e observou-se um significativo incremento de viscosidade para 10% de fase lipídica. Este fato é considerado bastante crítico, pois alguns autores sustentam que a viscosidade em excesso tem influência direta na etapa de homogeneização destes sistemas, eventualmente favorecendo a formação de agregados de partículas e convergindo para dimensionar micropartículas

(LIPPACHER; MU, 2004; SILVA et al., 2012). Além disso, Freitas e Müller (1999) constataram que baixas proporções lipídicas podem influenciar positivamente a estabilidade de NL, no sentido de prolongá-la quando o armazenamento se faz necessário.

O acompanhamento do aspecto macroscópico das formulações (Tabela 14), evidenciou que aqueles CLN que apresentavam inicialmente um aspecto de suspensão homogênea, fluida e ligeiramente branca (Figura 26) passaram a precipitar e a revelar um aspecto gelificado em alguns casos, possivelmente como uma consequência do desequilíbrio físico-químico do sistema (Figura 27).

Tabela 14: Acompanhamento do aspecto macroscópico dos CNL controles-branco e com LTU-Si.

Fase oleosa	Proporções fase oleosa	Período de observação das primeiras alterações macroscópicas (dias)			
		Controles-branco		+ LTU-Si	
MI:MG	2:3	CLN ₁ _BCO	28	CLN ₁	14
	1:1	CLN ₂ _BCO	28	CLN ₂	14
	3:2	CLN ₃ _BCO	28	CLN ₃	28
MI:COMP	2:3	CLN ₄ _BCO	7	CLN ₄	7
	1:1	CLN ₅ _BCO	7	CLN ₅	7
	3:2	CLN ₆ _BCO	7	CLN ₆	7
AO:MG	2:3	CLN ₇ _BCO	28	CLN ₇	21
	1:1	CLN ₈ _BCO	28	CLN ₈	21
	3:2	CLN ₉ _BCO	28	CLN ₉	21

MI = miristato de isopropila; AO = ácido oleico; MG = monoestearato de glicerila; COMP = Compritol; CLN_{1 a 9}_BCO = Carreadores lipídicos nanoestruturados controles-branco; CLN_{1 a 9} = Carreadores lipídicos nanoestruturados contendo LTU-Si.

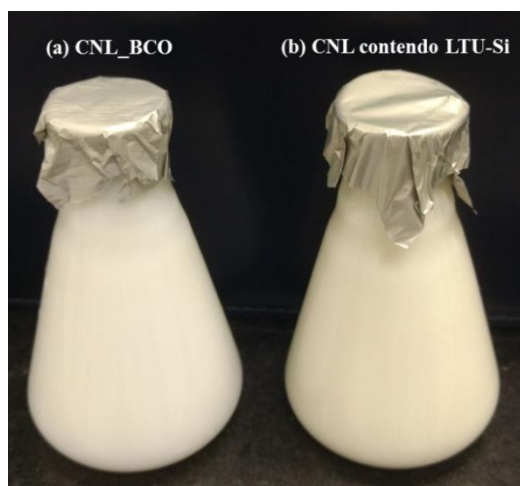


Figura 26: Aspecto do (a) CLN₁_BCO e (b) CLN₁ recém-preparados, estáveis.

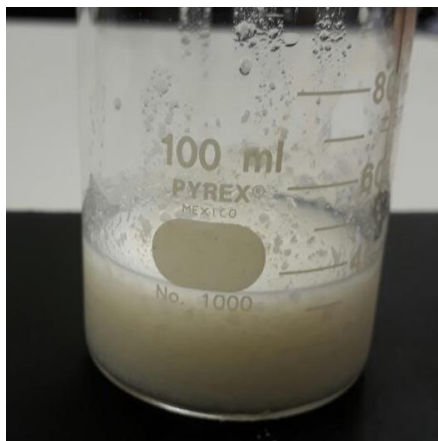


Figura 27: Exemplo de alterações macroscópicas observadas nos CLN (CLN4).

Conforme se observa na Tabela 14, as precipitações ocorreram primeiramente, após 7 dias do preparo, nas formulações contendo como fase lipídica MI:COMP, tanto na presença quanto na ausência de LTU-Si (CLN₄ a CLN₆ e CLN₄_BCO a CLN₆_BCO). Nos CLN contendo AO:MG notou-se o aparecimento de precipitações nas formulações com LTU-Si (CLN₇ a CLN₉) após o período de 21 dias, enquanto os respectivos CLN controles-branco só apresentaram esse mesmo fenômeno após 28 dias. No caso das formulações obtidas da combinação de MI:MG, as triplicatas dos CLN₁ e CLN₂ precipitaram após 14 dias, enquanto os controles-branco (CLN₁_BCO, CLN₂_BCO e CLN₃_BCO) e o CLN₃ (com LTU-Si) permaneceram sem alterações até o 28º dia de avaliação. Assim, as alterações relativas às formulações contendo LTU-Si sempre ocorreram em tempos iguais ou menores que as respectivas formulações controles-branco.

Segundo Freitas e Müller (1999) o aumento da energia cinética do sistema pode levar a quebras e danos na camada de tensoativo da NL que se desorganiza, favorecendo a agregação ou a formação de "pontes" de lipídio entre as nanopartículas, ou seja, gerando as alterações macroscópicas mencionadas anteriormente. Diante desse fato, supõe-se que a presença de LTU-Si nos CLN poderia incrementar as forças de cisalhamento que agem nas nanopartículas e ocasionar desestabilização deste sistema de maneira mais rápida na presença deste insumo.

O monitoramento do pH em função do tempo pode trazer informações relevantes no acompanhamento da estabilidade química de uma formulação (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007). Assim, este parâmetro foi investigado durante 28 dias para os CLN preparados, conforme ilustrado no Gráfico 4.

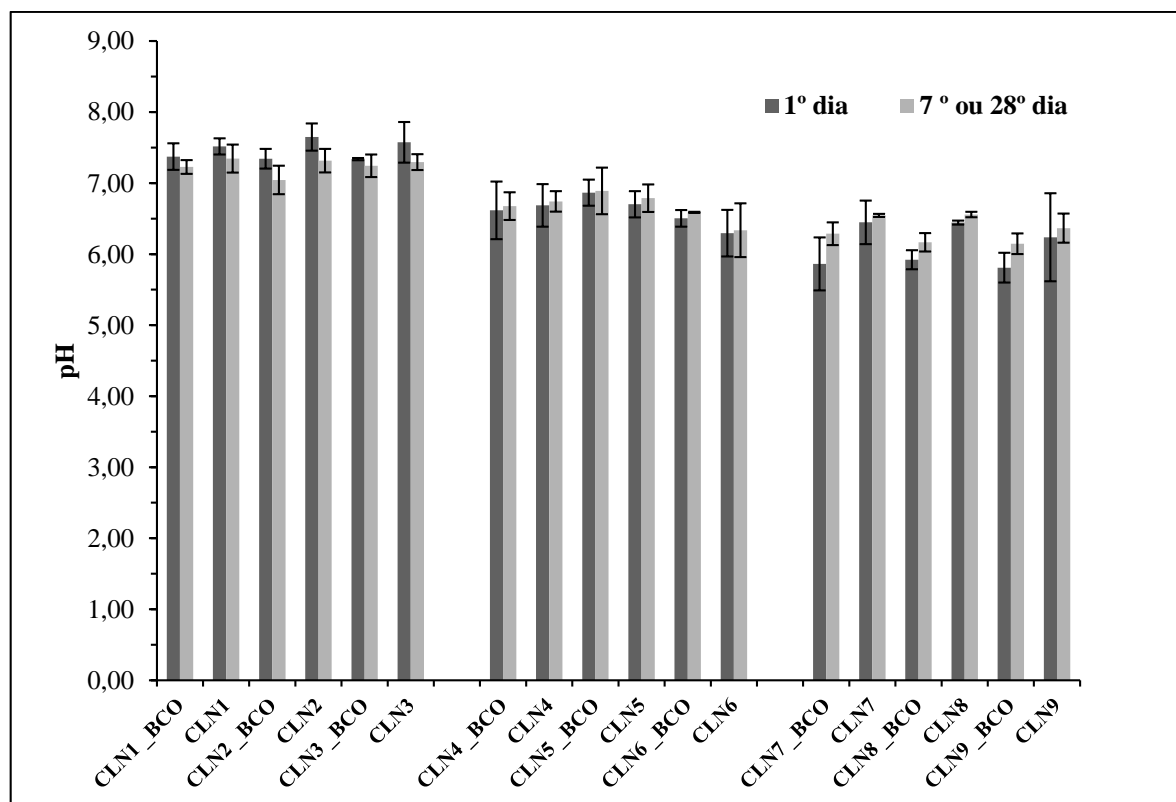


Gráfico 4: Valores médios de pH obtidos das triplicatas de CLN com LTU-Si e controles-branco nos tempos de 1º e no 28º dia após preparo, exceto para os CLN4 a CLN6 que foram estáveis até 7º dia.

O Gráfico 4 demonstra que as faixas de valores de pH foram distintas entre os pares de lipídios: CLN₁ a CLN₃ (pH 7,04 – 7,65), CLN₄ a CLN₆ (pH 6,30 – 6,79) e CLN₇ a CLN₉ (pH 5,81 – 6,56). Os valores mais baixos de pH deste último conjunto podem ser atribuídos à presença AO, uma vez que somente este ácido orgânico foi usado nas composições.

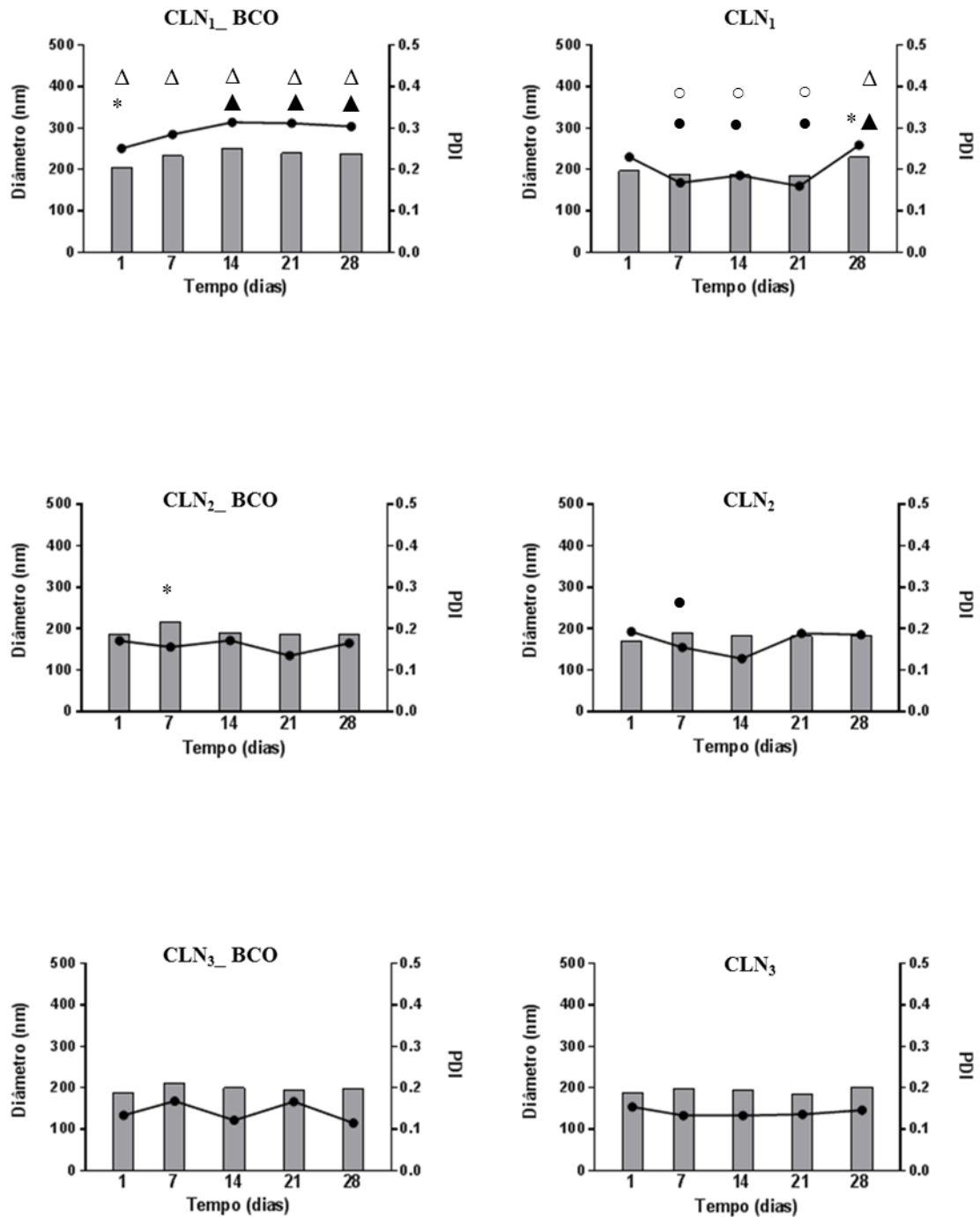
Os CLN com LTU-Si que se mantiveram estáveis durante 28 dias apresentaram pH mais alto que os respectivos controles-branco no primeiro dia de avaliação. Isso pode ser explicado pela presença do LTU-Si, que é composto majoritariamente pelos isômeros de amirina, as quais, segundo Rodrigues (2014), possuem valores estimados de pK_A próximos a 8,00 (α -amirina $8,25 \pm 1,17$ e β - amirina $8,00 \pm 1,07$).

Guterres e colaboradores (2007) associaram a diminuição de pH em nanopartículas poliméricas ao longo do tempo com a degradação de excipientes poliésteres que acaba por acidificar o meio, pela lenta formação e acumulação de ácidos carboxílicos. Em acordo com isso, o Gráfico 4 revela a ocorrência de uma ligeira diminuição de pH ao longo do tempo exclusivamente para a formulação contendo como fase lipídica os ésteres MI e MG. Assim, a diminuição de pH observada no presente estudo pode também estar relacionada a degradação de grupamentos ésteres presentes nos excipientes utilizados (lipídios líquido e sólido). Vale

ressaltar que o mesmo não foi observado na composição MI:COMP, provavelmente porque é precedido pela rápida desestabilização do sistema (7 dias).

Portanto, as avaliações de variações de pH dos CLN são importantes, pois podem indicar a liberação do ativo – a princípio encapsulado – para o meio externo ou mesmo indicar a sua degradação (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

A figura 28 apresenta os gráficos relacionados aos valores médios de TP e PDI obtidos ao longo dos 28 dias de avaliação para os CLN contendo a fase lipídica MI:MG. Nesses gráficos é possível observar que o TP encontra-se na faixa entre 186,9 e 251,4 nm, com PDI entre 0,115 e 0,314 para os CLN brancos, e na faixa entre 168,7 e 228,8 nm, com PDI entre 0,128 e 0,259 para os CLN contendo LTU-Si. Krause e colaboradores (2010) afirmaram que nanopartículas com $PDI \geq 0,4$ apresentam, em geral, distribuição heterogênea de TP, revelada por aglomerados na dispersão; por outro lado, partículas com um $PDI \leq 0,2$ são consideradas monodispersas e, portanto, mais estáveis. Entretanto, considerando a natureza das NL, comumente polidispersa, valores de PDI de cerca de 0,3 são aceitáveis (DAS; CHAUDHURY, 2011). De fato, no presente estudo, os conjuntos de preparações de MI:MG apresentaram perfil de distribuição de TP monomodal, PDI próximo a 0,3 e demonstraram ser mais promissores dentre os diferentes pares lipídicos, devido ao fato destas preparações apresentarem maior estabilidade ao longo do tempo. Isto está de acordo com constatações anteriores sobre o maior tempo de estabilidade de NL contendo MG como um dos lipídios principais (GARDOUH et al., 2013; LUO et al., 2006).



Alterações verificadas pelo teste ANOVA seguido de Tukey ($p < 0,05$): para os demais tempos de uma mesma composição em lipídios e em LTU-Si (TP, * e PDI, +); de seus respectivos controles-branco no mesmo tempo de leitura (TP, ● e PDI, ○); das demais concentrações de lipídio sólido (%) para o mesmo tempo e mesmo conteúdo de LTU-Si (TP, ▲ e PDI, Δ). Os dados de 21 e 28 dias para os CLN₁ e CLN₂ constam na figura, pois as precipitações foram discretas.

Figura 28: Acompanhamento do tamanho de partícula (nm) e índice de polidispersão (PDI) médios dos CLN preparados com a fase lipídica MI:MG em diferentes proporções durante 28 dias (CLN1- CLN4).

A Tabela 15 apresenta os coeficientes angulares da regressão e as significâncias relacionadas às variáveis estudadas: TP, PDI e PZ para a fase lipídica MI:MG. É visto que para a variação do parâmetro TP ao longo do tempo obteve-se um valor de coeficiente angular na regressão de 0,3584, porém não significativo ($p > 0,05$). Por outro lado, nota-se que o percentual de lipídio sólido na formulação tem influência positiva e significativa ($p < 0,05$) sobre este parâmetro, como evidenciado por CLN₁_BCO e CLN₁ (maior percentual de lipídio sólido = 60%). Estes apresentaram, respectivamente, os maiores valores médios de TP: 233 nm e 196 nm. A variável presença de LTU-Si demonstrou um efeito significativo, porém decrescente sobre o parâmetro TP. Este efeito pode ser melhor observado nas composições de MI:MG de 2:3 (CLN₁_BCO e CLN₁ da Figura 28), fato contrário a muitas observações da literatura em que os autores reportaram incremento de TP na presença do IFA (MÜHLEN; SCHWARZ; MEHNERT, 1998; MÜLLER et al., 1997; VAUCHER, 2017). No entanto, Puglia e colaboradores (2014) observaram que para um IFA com alto caráter hidrofóbico pode ocorrer interação deste com a fase lipídica das nanopartículas, favorecendo a redução de viscosidade desta fase, que causaria uma diminuição da tensão superficial do sistema, produzindo então, dimensões particulares menores em comparação aos controles-branco. Assim, este fenômeno é plausível de ocorrência no atual estudo, dada a natureza altamente hidrofóbica das amirinas.

Tabela 15: Coeficientes angulares da regressão e significância relacionados às variáveis estudadas para a combinação lipídica MI:MG.

Variável	Tamanho de Partícula		Índice de Polidispersão		Potencial Zeta	
	Coeficiente angular	p	Coeficiente angular	p	Coeficiente angular	p
Tempo (dias)	0,3584	0,2580	0,0003	0,6714	-0,0864	0,0188
Concentração de Lipídio Sólido (%)	0,9890	0,0118	0,0054	1,51x10 ⁻⁶	-0,1130	0,0010
LTU-Si	-18,1713	0,0050	0,0277	0,05785	1,4400	0,0394

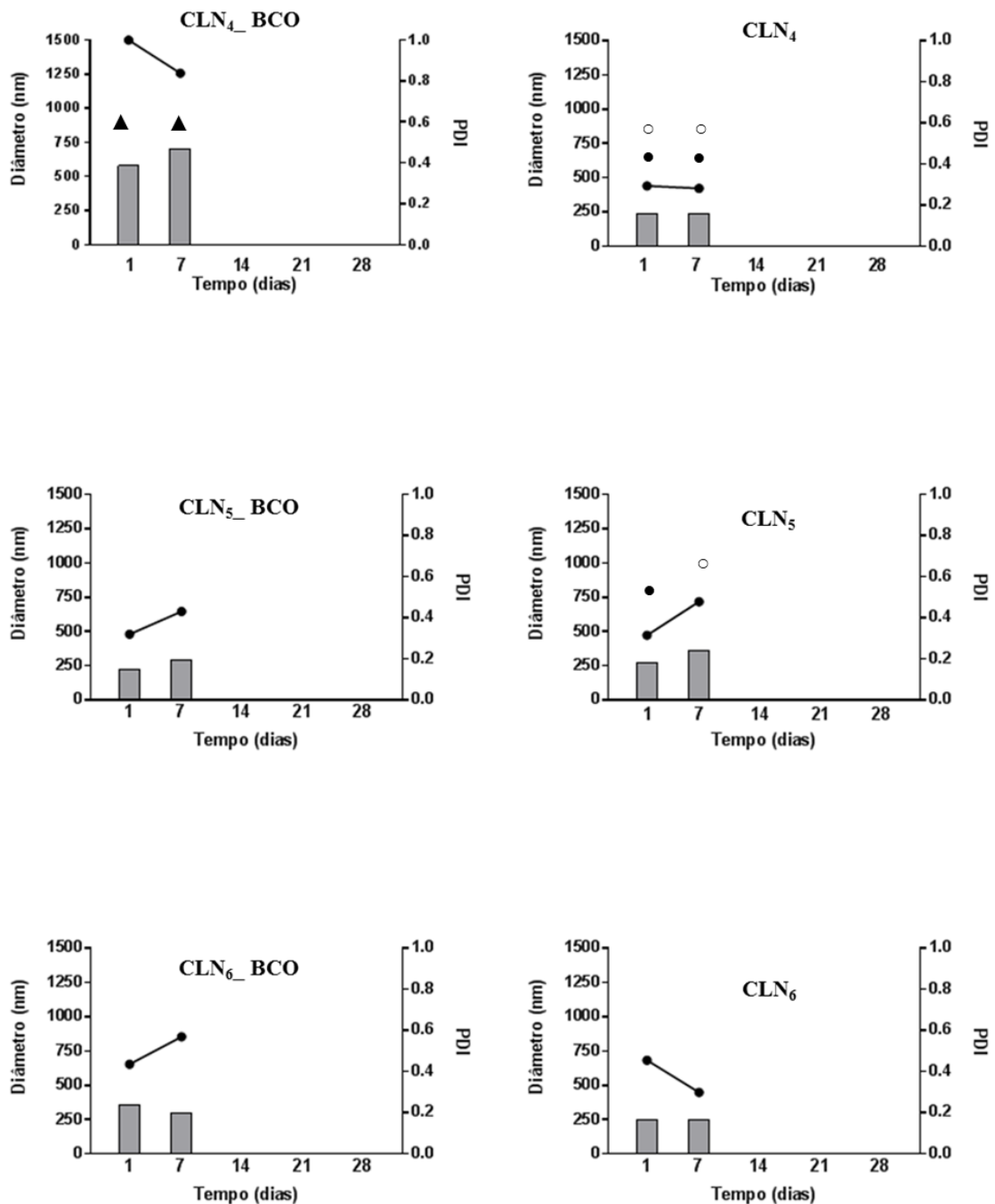
O PZ também foi avaliado neste estudo, uma vez que a carga superficial das partículas exerce grande influência na estabilidade da dispersão ou agregação dos carreadores, principalmente quando estes são estabilizados por carga (LI et al., 2014). Frente a isto, as faixas encontradas para CLN controles-branco e com LTU-Si correspondentes à combinação lipídica MI:MG foram, respectivamente, -27,0 mV a -31,1 mV e -23,0 mV a 31,5 mV. De fato, estas oscilações observadas durante o tempo de avaliação são justificadas pelo efeito significativo da variável tempo ($p < 0,05$, Tabela 15). Conforme dados da literatura, para que

as dispersões coloidais, estabilizadas apenas por carga, possam apresentar-se estáveis, é necessário que os valores modulares de PZ sejam iguais ou maiores que 30 mV. Como já abordado durante a análise macroscópica (Tabela 14), esta combinação lipídica mostrou-se a mais estável, fato que pode ser justificado pelos valores de PZ mais próximos a 30 mV para estas em relação às demais combinações lipídicas, como será visto.

A figura 29 apresenta a variação de TP e PDI médios ao longo do tempo para a composição lipídica MI:COMP. São notórios os elevados valores de TP e PDI para o CLN₄_BCO, que também são significativamente diferentes ($p < 0,05$), além de mais altos que todos os demais valores obtidos no presente estudo. Adicionalmente, constata-se uma similaridade entre os valores de TP das demais proporções dessa combinação lipídica com apenas diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos valores de PDI dos CLN₄ e CLN₆. Vale ressaltar que todas as proporções testadas com essa combinação lipídica apresentaram perfil de distribuição de TP bimodal.

Apesar de os valores de PZ apresentarem-se próximos a -30mV (controles-branco: -20mV a -28,1mV; LTU-Si: -22,9mV a -29,3mV) os sistemas não apresentaram longos períodos de estabilidade, conforme evidenciado pelas precipitações já no 7º dia (Figura 29). Esta combinação, portanto, não se mostrou promissora aos propósitos deste estudo, indicando que o uso do COMP como lipídio sólido na matriz de CLN provavelmente compromete a estabilidade físico-química destes.

Nesses casos, em que ocorreu rápida destabilização do sistema, a avaliação dos parâmetros TP, PDI e PZ foi realizada por um curto período de tempo, o que inviabilizou a observação mais prolongada de variáveis como tempo e percentual de lipídio sólido na formulação (Tabela 16). Contudo, ainda foi possível constatar que a presença de LTU-Si ($p < 0,05$) exerceu influência significativa sobre o parâmetro PDI. Este efeito apontado pela regressão linear pode ser devido à elevada diferença destacada entre o CLN₄_BCO e o CLN₄, como observado na Figura 29.



Alterações verificadas pelo teste ANOVA seguido de Tukey ($p < 0,05$): para os demais tempos de uma mesma composição em lipídios e em LTU-Si (TP, * e PDI, +); de seus respectivos controles-branco no mesmo tempo de leitura (TP, ● e PDI, ○); das demais concentrações de lipídio sólido (%) para o mesmo tempo e mesmo conteúdo de LTU-Si (TP, ▲ e PDI, △).

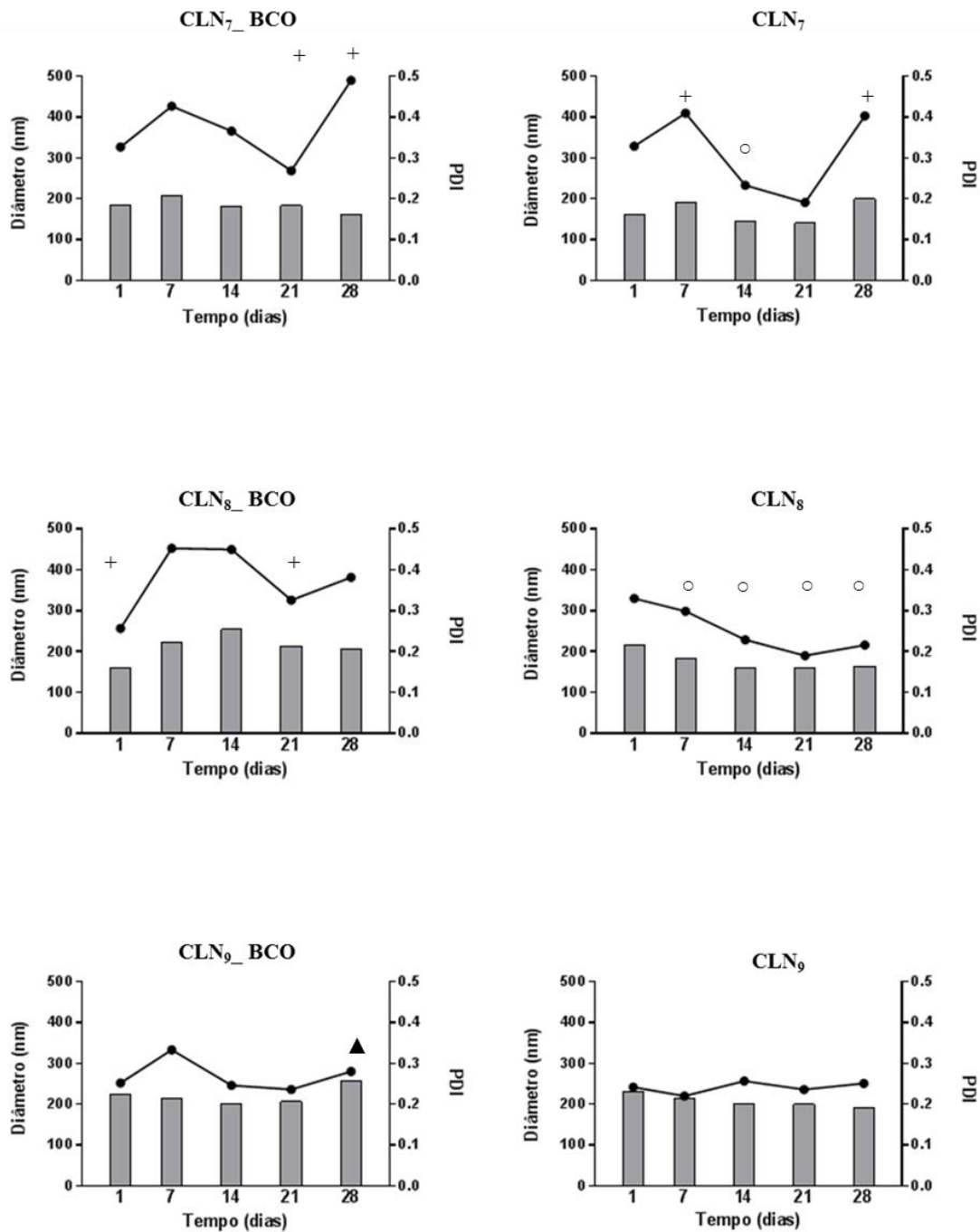
Figura 29: Acompanhamento do Tamanho de Partícula (nm) e Índice de Polidispersão (PDI) médios dos CLN preparados com a fase lipídica MI:COMP em diferentes proporções ao longo de 28 dias (CLN5- CLN6).

Tabela 16: Coeficientes angulares da regressão e significância relacionados às variáveis estudadas para a combinação lipídica MI:COMP.

Variável	Tamanho de Partícula		Índice de Polidispersão		Potencial Zeta	
	Coeficiente	p	Coeficiente	p	Coeficiente	P
	angular		angular		angular	
Tempo (dias)	5,5795	0,6720	0,0089	0,6224	-0,0944	0,5910
Concentração de Lipídio Sólido (%)	7,4607	0,14847	0,0066	0,3347	-0,3707	0,0077
LTU-Si	-0,0944	0,5910	-0,0950	0,1640	-0,0333	0,9745

A figura 30 apresenta o TP e PDI médios ao longo do tempo para a composição lipídica AO:MG. Nos CNL_{7 a 9}_BCO, TP encontra-se na faixa de 160,1 nm - 256,9 nm, e os CNL contendo LTU-Si na faixa de 149,8 - 230,6 nm. Entretanto, não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) dos valores de TP entre as proporções testadas com esta combinação lipídica, exceto para CLN₉_BCO no período de 28 dias, o que a difere de todas as demais preparações. Além disso, o perfil de distribuição de TP nas proporções lipídicas testadas apresentou-se monodal, exceto para o CLN₉_BCO, sendo este bimodal. Estes resultados são semelhantes aos observados em experimentos em nossos laboratórios em que o uso de fase lipídica AO:MG e tensoativos TW:COMP produziu CLN, para um extrato padronizado em ácido ursólico, com TP médio de aproximadamente 250 nm e PDI na faixa de 0,2 - 0,4 para os controles-branco e formulações contendo o ativo, quando se avaliou a estabilidade temporal do sistema (VAUCHER, 2017). Além disso, outros estudos empregando o COMP produziram partículas com tamanho compreendido nessa mesma faixa (MÜHLEN; SCHWARZ; MEHNERT, 1998; MÜLLER et al., 1997).

No presente estudo para os CNL_{7 a 9}_BCO, a amplitude de PZ variou entre -35 e -44,1 mV. Para os CNL_{7 a 9} contendo LTU-Si, a variação foi de -35,3 a -43,5 mV. Este resultado não corresponde ao observado nos experimentos realizados anteriormente em nosso laboratório envolvendo CLN com a mesma composição lipídica e de tensoativos, onde encontrou valores próximos a -25 mV para este parâmetro (VAUCHER, 2017). Isto provavelmente deve-se ao fato de a autora ter empregado proporções diferentes dos lipídios líquidos:sólidos (1:3) e tensoativos (1:1), além da natureza ácida dos triterpenos encapsulados. Ressalte-se que os CLN contendo MI:AO / TW:COMP apresentaram estabilidade mais prolongada em relação àqueles desenvolvidos no referido estudo, o que é corroborado pelo maior valor de PZ obtido no presente estudo.



Alterações verificadas pelo teste ANOVA seguido de Tukey ($p < 0,05$): para os demais tempos de uma mesma composição em lipídios e em LTU-Si (TP, * e PDI, +); de seus respectivos controles-branco no mesmo tempo de leitura (TP, ● e PDI, ○); das demais concentrações de lipídio sólido (%) para o mesmo tempo e mesmo conteúdo de LTU-Si (TP, ▲ e PDI, △). Os dados de 28 dias para os CLN₇, CLN₈ e CLN₉ constam na figura, pois as precipitações foram discretas.

Figura 30: Acompanhamento do Tamanho de Partícula (nm) e Índice de Polidispersão (PDI) médios dos CLN preparados com a fase lipídica AO:MG em diferentes proporções ao longo de 28 dias (CLN7- CLN9).

A Tabela 17 apresenta os coeficientes angulares da regressão e as significâncias relacionados às variáveis estudadas: TP, PDI e PZ para a combinação lipídica AO:MG. A variação do parâmetro TP ao longo do tempo resultou num valor médio de coeficiente angular (todavia não significativo, $p > 0,05$), quando avaliado por regressão linear, igual a -0,3295. Ainda, seria esperado que a regressão linear revelasse uma influência negativa e significativa ($p < 0,05$) sobre este parâmetro, quando aplicado ao percentual de lipídio sólido e presença de LTU-Si na formulação. No entanto, isso não se observou neste estudo, já que não foi possível perceber diferenças estatísticas nos valores de TP por ANOVA. Ou seja, este parâmetro manteve-se dentro de uma faixa de constância, apesar das variações impostas.

Tabela 17: Coeficientes angulares da regressão e significância relacionados às variáveis estudadas para a combinação lipídica AO:MG.

Variável	Tamanho de Partícula		Índice de Polidispersão		Potencial Zeta	
	Coeficiente angular	p	Coeficiente angular	p	Coeficiente angular	P
Tempo (dias)	-0,3295	0,4667	-0,0003	0,7994	-0,03405	0,4997
Concentração de Lipídio Sólido (%)	-1,9170	0,0001	0,0045	0,0090	0,0378	0,5242
LTU-Si	-20,6356	0,0236	-0,0705	0,0111	0,6222	0,5214

Com base nos resultados previamente discutidos, selecionou-se as formulações CLN₃_BCO e CLN₃ para a realização das análises de DSC e TGA, visando investigar o comportamento térmico dos insumos presentes nessas matrizes. Esta escolha foi motivada pelo fato de este sistema ter apresentado maior tempo de estabilidade relativa no conjunto das preparações estudadas. Entretanto, é preciso ressaltar que devido a desestabilização ao final do período de acompanhamento (28 dias) não foi possível realizar a secagem das formulações selecionadas primariamente. Assim, foram realizadas análises térmicas somente das misturas físicas contendo os excipientes presente em CLN₃_BCO e CLN₃.

6.9 ANÁLISE TÉRMICA

Pelas técnicas de termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial foi possível investigar o comportamento térmico dos insumos LTU-Se, LTU-Si, COMP, MG e das misturas físicas dos excipientes que constituíram o CLN₃_BCO (MI + MG + COMP + TW) e o CLN₃ (MI + MG + COMP + TW + LTU-Si). Essas técnicas foram escolhidas visando extrair informações sobre a estrutura cristalina dos materiais lipídicos e dos ativos estudados, além de verificar possíveis interações entre eles. Tratam-se de recursos instrumentais largamente empregados para avaliar a incorporação de fármacos em nanopartículas lipídicas (MEHNERT; MÄDER, 2001; MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000).

A Figura 31 apresenta as curvas de DSC obtidas para o LTU-Se e para o LTU-Si. Com base na análise dessa figura, é possível perceber que o LTU-Se apresentou um único pico alargado endotérmico na faixa de 70-86 °C, que pode estar relacionado à fusão de outros triterpenos existentes nessa matriz complexa que não as amirinas. Já o LTU-Si resultou num pico endotérmico na faixa de 150-161°C, demonstrando estar bem mais próximo da fusão dos isômeros α -amirina (184-186 °C) e β -amirina (189-191 °C), como esperado, já que há maior concentração (e de forma mais purificada) destes isômeros em LTU-Si.

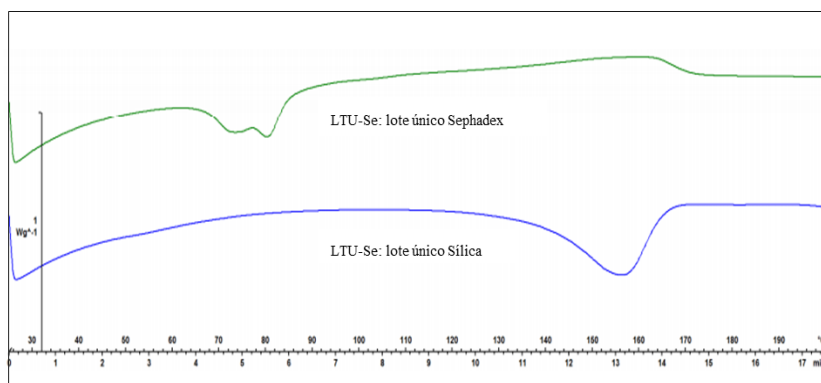


Figura 31: Curvas de DSC do lote único gel de sílica (LTU-Si) e lote único Sephadex (LTU-Se).

A Figura 32 apresenta as curvas de TGA obtidas para o LTU-Se e para o LTU-Si. Ambas as amostras apresentaram o mesmo perfil termogravimétrico, com perda de massa por volta de 400 °C, provavelmente consequente da degradação dos triterpenos presentes nos dois lotes. Este resultado reforça o fato de os picos endotérmicos, identificados nas curvas de DSC (Figura 31), estarem relacionados à fusão dos triterpenos nas matrizes estudadas, uma vez que

não foram evidenciadas perdas de massa nas faixas de temperatura referentes aos eventos endotérmicos previamente discutidos (70-86 °C para o LTU-Se e 150-161 °C para o LTU-Si).

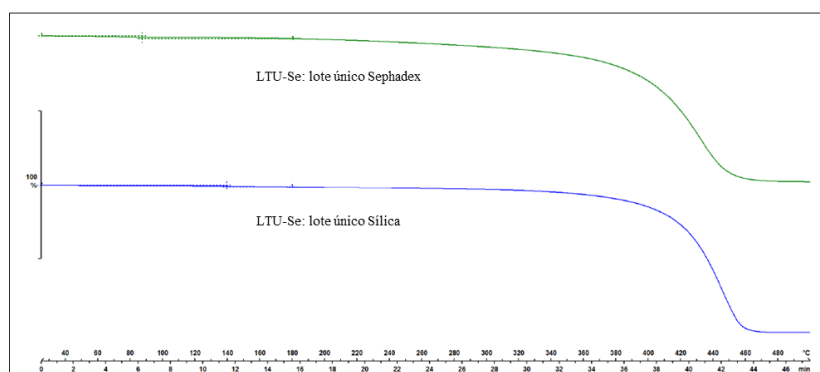


Figura 32: Curvas de TGA do lote único gel de sílica (LTU-Si) e lote único Sephadex (LTU-Se).

Os resultados obtidos para o LTU-Si está de acordo com o que foi discutido no item 6.6, em relação à determinação de ponto de fusão. Entretanto, no caso do LTU-Se nota-se uma discrepância nos valores obtidos para o seu ponto de fusão (85-114 °C). Em princípio, este fato pode ser atribuído à complexidade e falta de homogeneidade dessa matriz, exigindo experimentos adicionais para esclarecimento.

A Figura 33 mostra as temperaturas e as entalpias de fusão dos lipídios, que resultam, respectivamente, 60,94 °C e 150,48 J/g para MG e 72,32 °C e 106,67 J/g para COMP. Os valores obtidos para as temperaturas de fusão dos lipídios corroboram com as faixas encontradas na literatura, que para MG é de 54-64 °C (ABDELBARAY; FAHMY, 2009; MÜLLER et al., 2008; SILVA et al., 2012) e 63-77 °C para COMP (ABDELBARAY; FAHMY, 2009; BRUBACH et al., 2007; FREITAS; MÜLLER, 1999; HU; TANG; CUI, 2004; SARMENTO et al., 2011; ZHUANG et al., 2010).

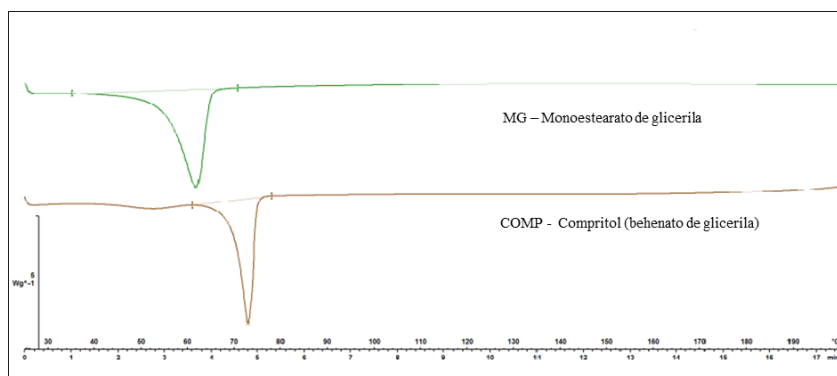


Figura 33: Curvas de DSC dos lipídios monoestearato de glicerila (MG) e Compritol (COMP).

Na Figura 34, onde são demonstradas as curvas de TGA obtidas para o MG e para o COMP é possível notar apenas perda de massa em torno de 400 °C, que é característica da degradação desses insumos (ABDELBARAY; FAHMY, 2009). Este fato reafirma as correlações discutidas anteriormente para as curvas de DSC desses excipientes.

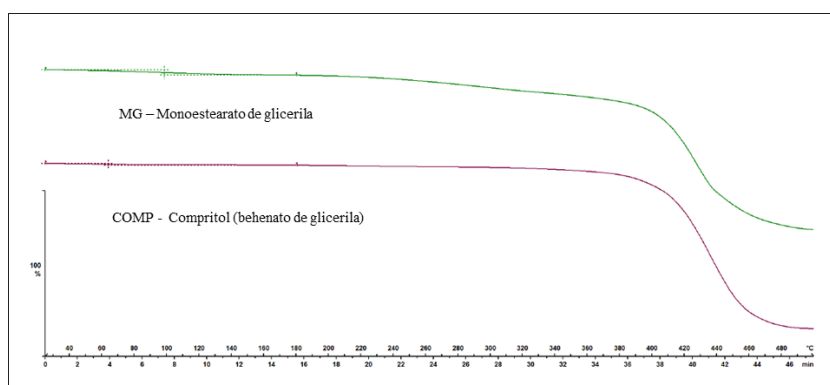


Figura 34: Curvas de TGA dos lipídios monoestearato de glicerila (MG) e Compritol (COMP).

No caso das misturas físicas dos insumos do CLN₃_BCO e CLN₃ (Figura 35), observou-se um pico endotérmico na faixa de 45-55 °C para ambos. Provavelmente, trata-se do pico endotérmico de fusão característico da presença majoritária do lipídio MG na formulação, porém é notória uma ligeira diminuição neste valor consequente da presença do MI e surfactantes na formulação. A ausência de perdas de massas na análise por TGA confirma esse fato (Figura 36).

Adicionalmente, nota-se que o pico endotérmico característico da fusão de LTU-Si não apareceu na curva de DSC referente ao CLN₃. Um efeito similar foi descrito por Fang e

colaboradores (2012), durante a encapsulação de curcuminóides em CLN, fato que os autores relacionaram com a baixa quantidade do composto na formulação. Este efeito também tem sido observado por outros autores (MU; FENG, 2001; ZHUANG et al., 2010). Entretanto, há ainda estudos que sugerem que a supressão do pico endotérmico do ativo é um indicativo de que ele se encontra dissolvido e molecularmente disperso na matriz lipídica, evidenciando, por outro lado, o potencial do sistema em foco para a incorporação dos triterpenos-alvo (GOMES; MARTINS, 2014; SUN et al., 2014; ZIMMERMANN; SOUTO; MU, 2005). Vale ressaltar, porém, que estes resultados são inconclusivos e devem obrigatoriamente ser aprofundados em estudos subsequentes nos quais avalie-se o CNL estável após secagem, e não apenas as misturas físicas dos excipientes nele presentes.

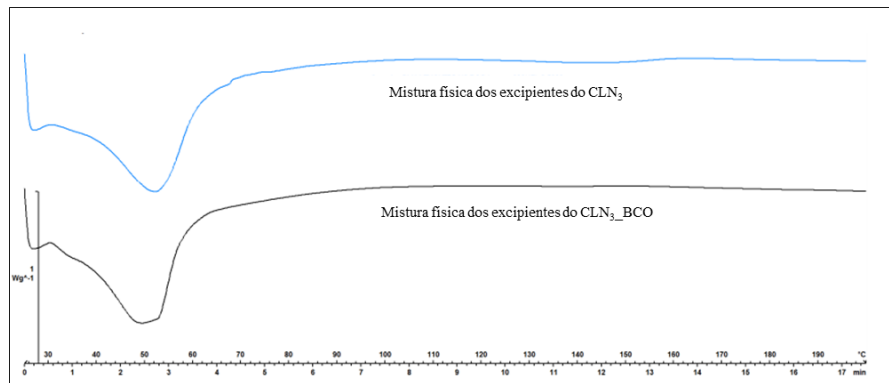


Figura 35: Curvas de DSC das misturas físicas dos excipientes no preparo dos CLN₃ e CLN₃_BCO.

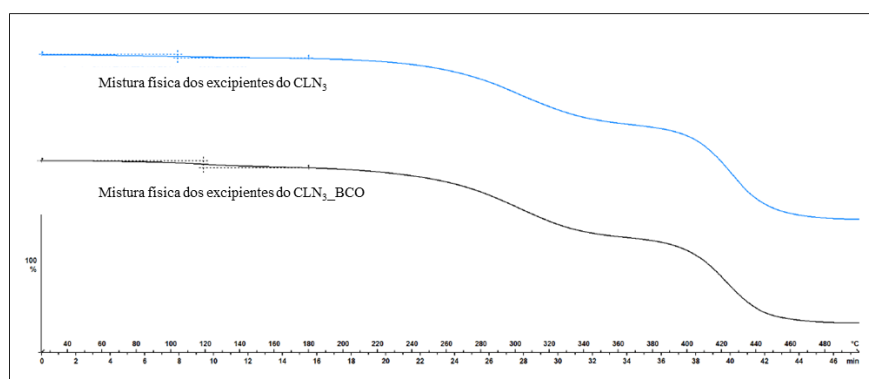


Figura 36: Curvas de DSC das misturas físicas dos excipientes empregados no preparo dos CLN₃ e CLN₃_BCO.

7 CONCLUSÃO

A oleoresina comercial de *Protium*, como é adquirida nos mercados locais da Amazônia, é um material heterogêneo, comumente utilizada para finalidades de baixo valor agregado. Assim, o processamento primário realizado neste estudo apresenta a primeira contribuição para a valorização desta matéria-prima, por intermédio de um processo tecnológico relativamente simples (obtenção de OBP).

As etapas de fracionamento e purificação de OBP, empregando cromatografia em coluna com gel de sílica e Sephadex LH-20, viabilizaram a obtenção de frações com perfis químicos diferentes, contendo os triterpenos pentacíclicos como α -amirina e β -amirina, que são as substâncias majoritárias em breu. A transposição de ambos os processos para maior escala ocorreu satisfatoriamente, mantendo-se o perfil químico das frações eleitas para compor cada lote único (LTU-Si e LTU-Se). Diante do exposto, é possível notar que o processo proposto de fracionamento e purificação foi reprodutível e consiste em uma alternativa promissora com vistas ao desenvolvimento de IFA de origem vegetal.

A otimização do método cromatográfico a ser estabelecido para analisar a constituição de OBP e dos lotes preparados demonstrou que a coluna de CG DB-17HT produziu a melhor separação dos triterpenos pentacíclicos, entre as colunas testadas. Entretanto, este método ainda pode ser aperfeiçoado para detecção mais precisa dos componentes minoritários. As análises cromatográficas por CG-EM e CG-FID permitiram a identificação de 12 substâncias majoritárias presente na matriz estudada, entre as quais se destaca o lupeol. Este triterpeno comumente coelui com a α -amirina em colunas pouco polares, muito possivelmente mascarando sua presença nas composições descritas até agora para o breu, uma vez que as análises têm sido usualmente baseadas no emprego das colunas cromatográficas DB-1 ou DB-5. Assim, a coluna DB-17HT torna-se mais adequada para a análise desta matéria-prima por CG.

O estudo dos parâmetros de validação do método em CG demonstrou linearidade, especificidade e seletividade suficientes para a quantificação dos triterpenos-alvo nas diferentes matrizes estudadas. Este desenvolvimento estabeleceu uma base para análises futuras de breu e seus derivados e para avaliação da eficiência de encapsulamento em CLN contendo este material. Esta é uma novidade neste estudo, pois, para os CLN em especial, até o momento o método de avaliação dos teores incorporados tem sido realizado exclusivamente por CLAE.

O uso do colesterol como padrão externo para desenvolver o método cromatográfico foi considerado apropriado, desde que viabilizou a quantificação relativa dos triterpenos-alvo; ainda que haja necessidade de uma correção adicional dos teores obtidos, considerando-se possíveis diferenças no fator-resposta entre este esteroide e as moléculas de amirinas (ainda que muito similares).

Os lotes obtidos em gel de sílica e Sephadex resultaram em 57,60 g (α -amirina = 41,37% \pm 1,00 e β - amirina = 16,46% \pm 0,29) e 60,60 g (α -amirina = 22,73% \pm 0,49 e β -amirina = 8,74% \pm 0,15), respectivamente. Neste estudo, apenas o LTU-Si foi utilizado nos ensaios de desenvolvimento dos CLN.

Os cálculos preditivos de PSH para os isômeros de amirina e lipídios resultaram na seguinte ordem para a solubilidade das primeiras nos segundos: MG \gg AO $>$ COMP $>$ MI. Já os ensaios experimentais correspondentes, por análise semiquantitativa por densitometria, resultaram na seguinte ordem: MG = MI $>$ AO $>$ COMP. As disparidades observadas foram atribuídas ao fato do método *in silico* estimar os PSH a 25 °C, enquanto o experimental foi realizado a 80 °C (condição de preparo dos CLN). No entanto, ambas as abordagens mostraram-se custo-efetivas e aplicáveis nos passos iniciais do desenvolvimento de CLN voltado para produtos fitofarmacêuticos contendo álcoois triterpênicos.

Durante o período de 28 dias de acompanhamento dos CLN desenvolvidos, foi notório que aqueles que continham LTU-Si desestabilizaram mais rapidamente do que os respectivos controles-branco. Em especial, nas preparações contendo MI:COMP, as precipitações foram intensas e começaram a ocorrer em apenas 7 dias após a preparação. Logo, esta composição de fase lipídica não se mostra como uma alternativa viável/promissora para a encapsulação do LTU-Si.

Considerando todos os CLN preparados neste estudo, a faixa de pH variou entre 5,81 e 7,65, com os menores valores para as combinações que continham AO. Fato este esperado, uma vez que o AO é o único excipiente de caráter ácido presente nas composições de fases lipídicas investigadas.

Os valores de PZ em todos os CLN apresentaram carga negativa e os maiores valores modulares obtidos foram para os CLN com fase lipídica MI:MG e AO:MG, que se apresentaram estáveis por maior período de tempo. Dessa forma, o presente estudo corrobora as descrições da literatura que afirmam que os CLN com maiores valores modulares de PZ apresentam períodos mais prolongados de estabilidade. Além disso, uma vez que ambas as composições estudadas utilizaram como lipídio sólido o MG, possivelmente este contribui de forma positiva para a manutenção da estabilidade destes sistemas.

A combinação MI:MG (3:2), com tensoativos TW:COMP (1:1) (NCL₃) apresentou a maior estabilidade físico-química, com os seguintes parâmetros: TP de 250 nm, PDI de 0,3 e PZ de -30 mV. Estas CLN mantiveram-se estáveis por maior período de tempo, sem demonstrar alterações destes parâmetros avaliados, ou no aspecto macroscópico e pH até o 28^o dia.

As análises por DSC corroboraram o fato de a combinação MI:MG (3:2) empregada no CLN₃ ser aquela que resultou na alternativa mais promissora dentre as estudadas, sugerindo ser a mais favorável, até o momento, para atingir a eficiência desejável na encapsulação do LTU-Si. No entanto, como até o presente momento somente as meras misturas físicas dos excipientes foram avaliadas, não foi possível verificar picos endotérmicos referentes aos triterpenos-alvo. Isto requer um aprofundamento na investigação dos CLN por esta técnica, após otimização de sua composição, visando sistemas que se mantenham estáveis, mesmo após a secagem da formulação.

8 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Quanto à etapa química, a continuidade das atividades sugere caracterizar melhor os constituintes do breu, particularmente aqueles minoritários. Para realizar esta meta, é recomendável avançar na otimização do método cromatográfico de fase gasosa, principalmente visando adequar ao máximo a resolução dos sinais.

Ainda dentro do escopo analítico, sugere-se avançar no método de quantificação das amirinas, utilizando estas mesmas substâncias de referência (α -amirina e/ou β -amirina) em vez do colesterol. Ainda que os resultados com este último como padrão externo tenham sido satisfatórios, o uso de um padrão de amirina para corrigir os teores obtidos deve garantir a eliminação de eventuais discrepâncias, possivelmente oriundas de diferenças no fator-resposta dessas moléculas (colesterol e triterpenos) quando da detecção no método escolhido (CG).

Tendo em vista o alto valor comercial dos padrões de α -amirina e β -amirina e que o breu é uma fonte sustentável e rica nestes triterpenos, é possível estimar o valor que a tecnologia de purificação desses triterpenos pode agregar à matéria-prima florestal.

Do ponto de vista farmacotécnico, para a melhor compreensão das respostas e limitações das ferramentas *in silico* (PSH), e experimental (análise semiquantitativa por densitometria) é necessário realizar um estudo de solubilidade com um número ampliado de amostras de lipídios líquidos e sólidos, escolhendo inicialmente aqueles de usos mais convencionais, empregados no desenvolvimento de CLN.

A obtenção dos CLN contendo as amirinas deve merecer especial atenção e novos experimentos. Apesar da composição MI:MG resultar nos CLN mais estáveis dentre os avaliados no presente estudo, outras proporções e combinações precisam ser melhor investigadas, sempre no propósito de incrementar a estabilidade destes sistemas. Isso inclui etapas de secagem das partículas e caracterização destas em termos físico-químicos e morfológicos.

Por fim, o desenvolvimento e validação de um método de caracterização e quantificação do conteúdo triterpênico (e, portanto, da eficiência de encapsulação) deve ser desenvolvido também por CLAE. A depender das circunstâncias experimentais, esta técnica tem vantagens sobre a CG, podendo ser mais rápida e menos custosa.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELBARY, G.; FAHMY, R. H. Diazepam-Loaded Solid Lipid Nanoparticles: Design and Characterization. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 1, p. 211–219, 2009.

ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 9.Ed.: Artmed Editora, 2013.

ALMEIDA M. M., BOU-CHACRA N. A, CONTE J. D, KANEKO T. M, BABY A. R, VELASCO M. V. R. Evaluation of physical and chemical stability of nanostructured lipid carries containing ursolic acid in cosmetic formulation. **J Appl Pharm Science**, v. 3, n.1, p. 5-8, 2013.

ALMEIDA, P. D. O. Avaliação da Atividade Anti-Inflamatória de Triterpenos Isolados de Óleo-resina de *Protium paniculatum* Engler (Burseraceae). Universidade Federal do Amazonas 2013. 70 f. **Dissertação**, 2013.

ALVES G. P., MARTINS F., SANTANA M. H. A. Nanotecnologia aplicada ao desenvolvimento de produtos farmacêuticos. **Fármacos & Medicamentos**, v. 9, p. 44-50, 2008.

ANVISA, BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - **RDC N° 166, 24/07/2017 . Guia para validação de métodos analíticos** - Julho, 2017.

ARAGÃO, G. F.; CARNEIRO, L. M. V.; JUNIOR, A. P. F.; VIEIRA, L. C.; BANDEIRA, P.N.; LEMOS, T. L. G.; VIANA, G. S. B. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 85, n. 4, p. 827–834, 2006.

ARAGÃO, G. F.; VASCONCELOS, L. M.; ROTA-JUNIOR, A. P.; LEMOS, T. L. G.; VIANA, S. B. Alterations in brain amino acid metabolism and inhibitory effects on PKC are possibly correlated with anticonvulsant effects of the isomeric mixture of α - and β -amyrin from *Protium heptaphyllum*. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 3, p. 407–413, 2015.

ARAGÃO, G. FROTA. Efeitos dos triterpenos α - e β -amirina e de seus derivados acetilados no sistema nervoso central. Universidade Federal do Ceará. **Tese**. 2008. 196 p., 2008.

AREGULLIN, M.; GOMPPER, M. E.; RODRIGUEZ, E. Triterpenes and a sesquiterpene lactone in the resin of *Trattinnickia aspera* (Burseraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, n. 2, p. 187–188, 2002.

ATTAMM, A. A.; MOMOH, M. A.; BUILDERS, P. F. Lipid Nanoparticulate Drug Delivery Systems : A Revolution in Dosage Form Design and Development. *World's largest Science, Technology & Medicine Open*, n. Chapter 5, p. 107–140, 2012.

BANDEIRA, P. N.; LEMOS, T. L. G.; COSTA, S. M. O.; SANTOS, H. S. Obtenção de derivados da mistura triterpenoídica α - e β -amirina. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 2, p. 204–208, 2007.

BARBOZA, R. S.; MAZZEI, J. L.; VALENTE, L. M. M.; SIANI, A. C. Optimized Kaempferitrin Isolation from *Uncaria guianensis* Leaves by Solid-Phase Extraction by Solid-Phase Extraction. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**.v. 38, p. 532-542, 2015.

BATISTA, M. M. Determinação dos parâmetros de solubilidade de Hansen de ésteres graxos etílicos. **Dissertação**. Universidade estadual de Campinas. 118 p. 2010.

BHARALI, D. J.; SIDDQUI, I. A.; ADHAMI, V. M.; CHAMCHEU, J. C.; ALDAHMAH, A. M.; MUKTAR, H.; MOUSA, S. A. Nanoparticle Delivery of Natural Products in the Prevention and Treatment of Cancers: Current Status and Future Prospects. **Cancers**, v. 3, n. 4, p. 4024–4045, 2011.

BILLANY, M. Soluções. In: **Delineamento de formas farmacêuticas**. Editor Aulton M.E. Porto Alegre: Artmed, 2005, Cap. 8, p.318-329.

BISKUP, E. et al. Triterpenoid α -amyrin stimulates proliferation of human keratinocytes but does not protect them against UVB damage. **Acta Biochimica Polonica**. v. 59, n. 2, p. 255–260, 2012.

BOSE, S.; MICHNIAK-KOHN, B. European Journal of Pharmaceutical Sciences Preparation and characterization of lipid based nanosystems for topical delivery of quercetin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 3, p. 442–452, 2013.

BREITMAIER E. **Terpenes - Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones**. 1 ed. Weinheim: Wiley-VCH, 214 p., 2006.

BRUBACH, J. B.; MAHLER, B.; BOURGAUX, C.; LESSIEUR, P.; ROY, P.; OLLIVON, M. Estructural and thermal characterization of glyceryl behenate by X-ray diffraction coupled to differential calorimetry and infrared spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 336, n. 2, p. 248–256, 2007.

CAPEK, I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 107, n. 2, p. 125–155, 2004.

CARVALHO, M. K. MARTIS B.; FILHO, J. ND. B. M.; MELO, T. S.; ARAÚJO, A. J.; QUETZ, S. J.; CUNHA, M. P. S. S.; MELO, K. M.; SILVA, A. A. C. A. ; TOMÉ, A. R. ; HAVT, A.; FONSECA, S. G. C.; BRITO, G. A. C.; CHAVES, M. H.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. The Resin from *Protium heptaphyllum* Prevents High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice : Scientific Evidence and Potential Mechanisms. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2015, 13p. 2015.

CARVALHO, T. C. D. E. Screening of Filamentous Fungi to Identify Biocatalysts for Lupeol Biotransformation. **Molecules**. v. 15, p. 6140–6151, 2010.

CHAUDHARI, Y. Nanoparticles - A paradigm for topical drug delivery. **Chronicles of Young Scientists**, v. 3, n. 1, p. 82, 2012.

CLAY J. W., SAMPAIO P. T. B., CLEMENT C. R. Biodiversidade amazônica: exemplos e estratégias de utilização. **Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia**, Manaus, Amazonas 409 p., 1999;

DAS, S.; CHAUDHURY, A. Recent Advances in Lipid Nanoparticle Formulations with Solid Matrix for Oral Drug Delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 1, p. 62–76, 2011.

DIAS, M. O.; HAMERSKI, L.; PINTO, A. C. Semi-preparative separation of α and β -amyryn by high performance liquid chromatographic. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 704–706, 2011.

DOKTOROVOVA, S.; SOUTO, E. B.; SILVA, A. M. Hansen solubility parameters (HSP) for prescreening formulation of solid lipid nanoparticles (SLN): in vitro testing of curcumin-loaded SLN in MCF-7 and BT-474 cell lines. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 23, n. 1, p. 96–105, 2 jan. 2018.

DOMINGO, C.; SAURINA, J. An overview of the analytical characterization of nanostructured drug delivery systems: Towards green and sustainable pharmaceuticals: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 744, p. 8–22, 2012.

ECCLESTON, G. M. Functions of mixed emulsifiers and emulsifying waxes in dermatological lotions and creams. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 123–124, p. 169–182, 1997.

FANG, J.; FANG, C.; LIU, C.; SU, Y. Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: Solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 2008, p. 633–640, 2008.

FORGIARINI, A. et al. Formation and stability of nano-emulsions in mixed nonionic surfactant systems. (P. G. Koutsoukos, Ed.)Trends in **Colloid and Interface Science XV. Anais...**Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2001

FREITAS, C.; MÜLLER, R. H. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLNTM) and crystallinity of the lipid phase. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 47, n. 2, p. 125–132, 1999.

GARDOUH, A. R.; GAD, S.; GHONAIM M. H.; GHORAB, M. M. Design and Characterization of Glyceryl Monostearate Solid Lipid Nanoparticles Prepared by High Shear Homogenization. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 3, p. 326–346, 2013.

GOMES, M. J.; MARTINS, S. Lipid nanoparticles for topical and transdermal application for alopecia treatment: development, physicochemical characterization, and in vitro release and penetration studies. **International Journal of Nanomedicine**, p. 1231–1242, 2014.

GOULAS, V.; MANGANARIS, G. A. Towards an efficient protocol for the determination of triterpenic acids in olive fruit: A comparative study of drying and extraction methods. **Phytochemical Analysis**, v. 23, n. 5, p. 444–449, 2012.

GUPTA, U.; JAIN, N. K. Non-polymeric nano-carriers in HIV/AIDS drug delivery and targeting. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 4–5, p. 478–490, 2010.

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

Hansen, Charles M., **Hansen Solubility Parameters: A User's Handbook**, 2^a Ed., CRC PRESS, 2007

HASENCLEVER, L.; PARANHOS, J.; COSTA, C. R.; CUNHA, G.; VIEIRA, D. The Brazilian phytotherapies industry : challenges and opportunities. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 8, p. 2559–2570, 2017.

HU, F. Q.; JIANG, S. P.; DU, Y. Z.; YE, Y. Q.; ZENG, S. Preparation and characteristics of monostearin nanostructured lipid carriers. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 314, p. 83–89, 2006.

HU, F. Q.; JIANG, S. P.; DU, Y. Z.; YE, Y. Q.; ZENG, S. Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 45, n. 3–4, p. 167–173, 2005.

HU, L.; TANG, X.; CUI, F. Solid lipid nanoparticles (SLNs) to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 12, p. 1527–1535, 2004.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Quantidade e valor dos produtos da extração vegetal e da silvicultura, segundo os principais produtos - Brasil. 2009. [online] Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2009/tabelas_pdf/tab01.pdf>. Acesso em: 15 maio de 2016.

JENNING, V.; MA, K.; GOHLA, S. H. Solid lipid nanoparticles (SLN TM) based on binary mixtures of liquid and solid lipids : a ¹H-NMR study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 205, p. 15–21, 2000.

KAWABATA, Y. et al. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, n. 1, p. 1–10, 2011.

KHALID S. A. Chemistry of the Burseraceae. In: **Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales**. WATERMAN, P. G., GRUNDON, M. F. p. 281-297, 1983.

KOVAČEVIĆ, A. **Lipidne nanočestice stabilizovane nejonskim polihidroksilnim surfaktantima: postupak dobijanja, karakterizacija, stabilnost i inkorporiranje lekovite supstance**. p159-162, University of Belgrade, Belgrade, Serbia, 2014.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”?, **Scientia Chromatographica**, p. 35–61, 2009.

LANGENHEIM, J. H. **Plant resins: Chemistry, Evolution, Ecology, and Ethnobotany**. Timber Press, Portland , Oregon, USA, p. 1–2, 2003.

LI, Z.; WANG, Y.; SHEN, J.; LIU, W.; SUN, X. The measurement system of nanoparticle size distribution from dynamic light scattering data. **Optics and Lasers in Engineering**, v. 56, p. 94–98, 2014.

LIMA, E. M.; NASCIMENTO, A. M.; LENZ, D.; SCHERER, R.; MEYRELLES, S. S.; BOËCHAT, G. A. P.; ANDRADE, T. U.; ENDRINGER, D. C. Triterpenes from the protium

heptaphyllum resin??? Chemical composition and cytotoxicity. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 24, n. 4, p. 399–407, 2014.

LIMA, F. V.; MALHEIROS, A.; OTUKI, M. F.; CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A.; FILHO, V. C.; MONOCHE, F. D. Three New Triterpenes from the Resinous Bark of *Protium kleinii* and their Antinociceptive Activity. **Brazilian Journal Chemical Society**, v. 16, n. 3, p. 578–582, 2005.

LIMA, M. P.; BRAGA, P. A. C.; MACEDO, M. L.; DA SILVA, M. F. G. F. Phytochemistry of *Trattinnickia burserifolia*, *T. rhoifolia*, and *Dacryodes hopkinsii*: Chemosystematic Implications. **Brazilian Journal Chemical Society**, v. 15, n. 3, p. 385–394, 2004.

LIMA-JUNIOR, R. C. P.; SOUSA, D. I. M.; BRITO, G. A. C.; CUNHA, G. M.; CHAVES, M. H.; RAO, V. S. N.; SANTOS, F. A. Modulation of acute visceral nociception and bladder inflammation by plant triterpene, α , β -amyrin in a mouse model of cystitis: role of tachykinin NK1-receptors, and K⁺ ATP channels. **Inflammation Research**, v. 56, p. 487–494, 2007.

LIPPACHER, A.; MU, R. H. Liquid and semisolid SLN e dispersions for topical application: rheological characterization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 561–567, 2004.

LOPEZ-HUERTAS, E. Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies. **Pharmacological Research**, v. 61, n. 3, p. 200–207, 2010.

LUO, Y.; CHEN, D.; REN, L.; ZHAO, X.; QIN, J. Solid lipid nanoparticles for enhancing vinpocetine's oral bioavailability. **Journal of Controlled Release**, v. 114, p. 53–59, 2006.

MACHADO, M. D. S. Selective synthesis of glycerol monolaurate with zeolitic molecular sieves. **Applied Catalysis A: General**, v. 203, n. 2, p. 321–328, 2000.

MAIA, R. M.; BARBOSA, R. P.; CRUZ, F. G.; ROQUE, N. F.; FASCIO, M. Triterpenos da resina de *protium heptaphyllum* March (Bourseraceae): Caracterização em misturas binárias. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 623–626, 2000.

MARCATO, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. VI, n. 2, p. 1–37, 2009.

MARQUES, D. D. CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DA FLORA ACREANA: *Protium hebetatum* Daly, *Protium heptaphyllum* (Aublet) Marchand subsp. *ulei* (Swat) Daly e *Protium heptaphyllum* (Aublet) Marchand subsp. *heptaphyllum*. **TESE**, Universidade Federal do Ceará, 250p., 2010.

MARQUES, M. B. Pharmaceutical patents and the accessibility of drugs in Brazil. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 7, n. 1, p. 07–21, jun. 2000.

MCCARRON, P. A.; MAROUF, W. M.; QUINN, J. D.; FAY, F.; BURDEN, R. E.; OLWILL, S. A.; SCOTT, C. J. Antibody Targeting of Camptothecin-Loaded PLGA Nanoparticles to Tumor Cells. **Bioconjugate Chemical**, v. 19, p. 1561–1569, 2008.

MEDEIROS, R.; OTUKI, M. F.; AVELLAR, M. C. W.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene α -amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **European Journal of Pharmacology**, v. 559, n. 2, p. 227–235, 2007.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n. 2, p. 165–196, 2001.

MELO, C. M.; MORAIS, T. C.; TOMÉ, A. R.; BRITO, G. A. C.; CHAVES, M. H.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. Anti-inflammatory effect of α - and β -amyrin, a triterpene from *Protium heptaphyllum*, on cerulein-induced acute pancreatitis in mice. **Inflammation Research**, v. 60, n. 7, p. 673–681, jul. 2011.

MEYAGUSKU, V. M. Desenvolvimento E Caracterização De nanopartículas lipídicas sólidas contendo ciprofloxacino. **Dissertação**, 99 p., 2014.

VAN DER MOOTER, G. The use of amorphous solid dispersions: A formulation strategy to overcome poor solubility and dissolution rate. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 9, n. 2, p. e79–e85, 2012.

MU, L.; FENG, S. S. Fabrication, characterization and in vitro release of paclitaxel (Taxol[®]) loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres prepared by spray drying technique with lipid / cholesterol emulsifiers. **Journal of Controlled Release**, v. 76, p. 239–254, 2001.

MÜHLEN, A. ZUR; SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery--drug release and release mechanism. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 45, n. 2, p. 149–155, 1998.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): Drug-lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 3, p. 535–544, 2008.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Cytotoxicity of solid lipid nanoparticles as a function of the lipid matrix and the surfactant, **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 4, 1997.

MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery: a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 161–177, 2000.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, n. 1–2, p. 121–128, 2002.

NARAYANAN, S.; BINULAL, N. S.; MANZOOR, K.; NAIR, S.; MENON, D. Folate targeted polymeric “green” nanotherapy for cancer. **Nanotechnology**, v. 21, n. 28, 2010.

NORONHA, J. P. DA C. DE. Metabolitos secundários do fruto de *arbutus unedo* L. (Medronho). **Dissertação**, Universidade Nova de Lisboa, 274p. 2001.

OKOYE, F.; WILLFRED, O.; FELIX, O.; OGHENEOGAGA, O.; PEACE, O.; NGOZI, N.; JANE, A.; OKECHUKWU, N. Chemical composition and anti-inflammatory activity of

essential oils from the leaves of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae). **International of Phannacognosy**, v. 1, n. 1, p. 59–65, 2014.

OLIVEIRA, F. A.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C. ; FLORÊNCIO, M. G.; LIMA, R. C. P.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A., RAO, V. S. N. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. **Pharmacological Research**, v. 49, n. 2, p. 105–111, 2004a.

OLIVEIRA, F. A.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; SANTOS, K. A.; MARTINS, F. S.; SILVA, R. M. SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Gastroprotective effect of the mixture of α - and β -amyrin from *Protium heptaphyllum*: Role of capsaicin-sensitive primary afferent neurons. **Planta Medica**, v. 70, n. 8, p. 780–782, 2004b.

OLIVEIRA, F. A.; CHAVES, M.; ALMEIDA, F. R. C.; LIMA JR., R. C. P.; SILVA, R. M.; MAIA, J. L.; BRITO, G. A. A. C.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Protective effect of α - and β -amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, n. 1–2, p. 103–108, 2005.

OTUKI, M. F.; FERREIRA, J.; LIMA, F. V.; SILVA-MEYRE, C.; MALHEIROS, A.; MULLER, L. A.; SANTOS, A. R. S.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive Properties of Mixture of α -Amyrin and β -Amyrin Triterpenes: Evidence for Participation of Protein Kinase C and Protein Kinase A Pathways. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 313, n. 1, p. 310–318, 1 abr. 2005b.

OTUKI, M. F.; VIEIRA-LIMA, F.; MALHEIROS, A.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and α -amyrin pentacyclic triterpene. **European Journal of Pharmacology**, v. 507, n. 1–3, p. 253–259, 2005a.

PONGJANYAKUL, T.; PRAKONGPAN, S.; PRIPREM, A. Acrylic Matrix Type Nicotine Transdermal Patches: In Vitro Evaluations and Batch-to-Batch Uniformity. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 29, n. 8, p. 843–853, 1 jan. 2003.

RODRIGUES, I. V. Desenvolvimento e validação de um método bioanalítico para avaliação farmacocinética de uma mistura binária de triterpenos pentacíclicos e de seus metabólitos in vivo. **Tese**, Universidade de São Paulo, p. 122 p., 2014.

ROHIT, B.; PAL, K. I. A Method to Prepare Solid Lipid Nanoparticles with Improved Entrapment Efficiency of Hydrophilic Drugs. **Current Nanoscience**, v. 2, n. 9, 2013.

ROMERO-ESTRADA, A.; MALDONADO-MAGAÑA, A.; GONZÁLEZ-CHRISTEN, J.; BAHENA, S. M.; GARDUÑO-RAMÍREZ, M. L.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, V.; ALVAREZ, L. Anti-inflammatory and antioxidative effects of six pentacyclic triterpenes isolated from the Mexican copal resin of *Bursera copallifera*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, p. 1–10, 2016.

ROWE, R.; SHESKEY, P. J.; OWEN, S. C. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. Phamaceutical Press, 2006.

RÜDIGER, A. L.; SIANI, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F. The chemistry and pharmacology of the South America genus *Protium* Burm. f. (Bursaceae). **Pharmacognosy Reviews**, v. 1, n. 1, p. 93–104, 2007.

SANNA, V. IMTIAZ, A. S.; SECHI, M.; MUKHTAR, H. Nanoformulation of natural products for prevention and therapy of prostate cancer. **Cancer Letters**, v. 334, n. 1, p. 142–151, 2013.

SANTOS, F. A. FROTA, J. T.; ARRUDA, B. R.; MELO, T. S.; DA SILVA, A. A. C. A. BRITO, A. C.; CHAVES, M. H.; RAO, V. S. Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of α , β -amyirin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. **Lipids in Health and Diseases**, p. 1–8, 2012.

SARMENTO, B.; MAZZAGLIA, D.; BONFERONI, M. C.; NETO, A. P.; MONTEIRO, M. C.; SEABRA, V. Effect of chitosan coating in overcoming the phagocytosis of insulin loaded solid lipid nanoparticles by mononuclear phagocyte system. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 3, p. 919–925, 2011.

SCHÄFER-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 427–443, 2007.

SEYFODDIN, A.; SHAW, J.; AL-KASSAS, R. Solid lipid nanoparticles for ocular drug delivery. **Drug delivery**, v. 17, n. 7, p. 467–489, 2015.

SHAH, M. K.; MADAN, P.; LIN, S. Preparation, in vitro evaluation and statistical optimization of carvedilol-loaded solid lipid nanoparticles for lymphatic absorption via oral administration. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 19, n. 4, p. 475–485, 2014.

SHAH, M.; AGRAWAL, Y. High throughput screening: an in silico solubility parameter approach for lipids and solvents in SLN preparations, **Pharmaceutical Development and Technology**, 18 (2013) 582-590.

SHAH, M.K.; MADAN, P.; LIN, S., Preparation, in vitro evaluation and statistical optimization of carvedilol-loaded solid lipid nanoparticles for lymphatic absorption via oral administration, **Pharmaceutical Development and Technology**, 19 (2014) 475-485.

SHAH, R.; ELDRIDGE, D.; PALOMBO, E.; HARDING, I. Lipid Nanoparticles: Production, Characterization and Stability in **Pharmaceutical Science & Drug Development**, Editor SpringerBriefs, p. 11–23, 2015.

SHAMMA, R. N.; ABURAHMA, M. H. Follicular delivery of spironolactone via nanostructured lipid carriers for management of alopecia. **International Journal of Nanomedicine**, p. 5449–5460, 2014.

SHARMA, P.; GANTA, S.; DNNY, W. A.; GARG, S. Formulation and pharmacokinetics of lipid nanoparticles of a chemically sensitive nitrogen mustard derivative: Chlorambucil. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 367, p. 187–194, 2009.

SHIH, M. F.; CHERNG, J. Y. Reduction of Adhesion Molecule Production and Alteration of eNOS and Endothelin-1 mRNA Expression in Endothelium by *Euphorbia hirta* L. through Its Beneficial β -Amyrin Molecule. **Molecules**, p. 10534–10545, 2014.

SIANI, A. C.; NAKAMURA, M. J.; TAPPIN M. R. R.; MONTEIRO, S. S.; GUIMARÃES, A. C.; RAMOS, M. F. S. Chemical composition of South American burseraceae non-volatile oleoresins and preliminary solubility assessment of their commercial blend. **Phytochemical Analysis**, v. 23, n. 5, p. 529–539, 2012.

SIANI, A. C.; MONTEIRO, S. S.; RAMOS, M. F. S. Essential oils of the Oleoresins from *Protium Heptaphyllum* Growing in the Brazilian Southeastern and their Cytotoxicity to Neoplastic Cells Lines. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 14, n. 3, p. 373–378, 2011.

SIANI, A. C.; RAMOS, M. F. S.; MENEZES-DE-LIMA JR, O.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; FERNADEZ-FERREIRA, E.; SOARES, R. O.A.; ROSAS, E. C.; SUSUNAGA, G. S.; GUIMARÃES, A. C.; ZOGHBI, M. G.B.; HENRIQUES, M. G. M. O. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 1, p. 57–69, 1999.

SILVA, A. C.; AMARALA M. H.; GONZÁLEZ-MIRA, E.; SANTOS, D.; Ferreira D. Solid lipid nanoparticles (SLN) - based hydrogels as potential carriers for oral transmucosal delivery of Risperidone: Preparation and characterization studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 93, p. 241–248, 2012.

SILVA, A. M. D. A.; MEDEIROS, V.C.; LANGONE, A. A. P.; FREIRE, D. M. G. Synthesis of Monocaprin Catalyzed by Lipase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105, p. 757–768, 2003.

SILVA, A. S. Estudos dos óleos essenciais extraídos de resinas de espécies *Protium spp* . **Dissertação**, Universidade de são Paulo, 159p. , 2006.

SILVA-JUNIOR, W. F.; PINHEIRO, J. G. O.; MENEZES, D. L. B.; SILVA, N. E. S.; ALMEIDA, P. D. O.; LIMA, E. S.; VEIGA JÚNIOR, V. F.; AZEVEDO, E.; P.; LIMA, A. A. N. Development, Physicochemical Characterization and In Vitro Anti-Inflammatory Activity of Solid Dispersions of α , β Amyrin Isolated from *Protium* Oilresin. **Molecules**, v. 22, p. 1512–1514, 2017.

SOLDI, C. Derivados sintéticos dos triterpenos α E β -amirina e avaliação das propriedades analgésicas e antifúngicas. **Dissertação**, Universidade Federal de Santa Catarina, 103p, 2007.

SOUTO, E. B.; DOKTOROVOVA, S.; BOONME, P. Lipid-based colloidal systems (nanoparticles , microemulsions) for drug delivery to the skin : materials and end-product formulations. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 21, n. 1, p. 43–54, 2011.

SOUTO, E. B.; MÜLLER, R. H., Lipid Nanoparticles (SLN and NLC) for Drug Delivery, IN; **Nanoparticles for Pharmaceutical Applications**, Edited by A. J. Domb, Y. Tabata, M. N. V. Ravi Kumar, and S. Farber, January 2007, 500 pages, Hardcover

STEFANIS, E.; PANAYIOTOU, C. Prediction of Hansen Solubility Parameters with a New Group-Contribution Method. **Int J Thermophys**, p. 568–585, 2008.

SUN, L. M.; ZHANG, C. L.; LI, P. Characterization, antibiofilm, and mechanism of action of novel PEG-stabilized lipid nanoparticles loaded with terpinen-4-ol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 24, p. 6150–6156, 2012.

SUN, M.; MING, L.; ZHANG, C. L.; LI, P. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Quercetin-nanostructured lipid carriers: Characteristics and anti-breast cancer activities in vitro. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p. 15–24, 2014.

TAN, S. W. BILLA, N.; ROBERTS, C. R.; BURLEY, J. C. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects Surfactant effects on the physical characteristics of Amphotericin B-containing nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 372, n. 1–3, p. 73–79, 2010.

TAVEIRA, S. F. Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) como carreadores de fármacos para o tratamento tópico do câncer de pele. **Tese**, Universidade de São Paulo, 142p., 2009.

TEERANACHAIDEEKUL, V.; JUNYAPRASERT, V. B.; SOUTO, E. B.; MÜLLER, R. H. Development of ascorbyl palmitate nanocrystals applying the nanosuspension technology. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 354, p. 227–234, 2008.

The Plant List (2010). Version 1. [online]; Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/>> Acesso em 30 de setembro de 2016.

TICKTIN, T. The ecological implications of harvesting non-timber forest products. **Journal of Applied Ecology**, v. 41, n. 1, p. 11–21, 2004.

UNDP (2012). Equator Initiative Case Studies: Green Life Association of Amazonia (AVIVE), Brazil. <https://pt.scribd.com/document/180224601/Case-Studies-UNDP-GREEN-LIFE-ASSOCIATION-OF-AMAZONIA-AVIVE-Brazil>

VARGAS M. R. W.; RAFFIN F. N.; MOURA T. F. A. L. Strategies used for to improve aqueous solubility of simvastatin: a systematic review. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 33, n. 4, p. 497-507, 2012.

VARGHESE, A.; TICKTIN, T. Regional variation in non-timber forest product harvest strategies, trade, and ecological impacts: The case of Black Dammar (*Canarium strictum* Roxb.) use and conservation in the Nilgiri Biosphere Reserve, **India**. **Ecology and Society**, v. 13, n. 2, 2008.

VAUCHER, A. C. DOS S. Desenvolvimento e avaliação da atividade cicatrizante de sistemas nanoestruturados contendo triterpenos obtidos de *Malus domestica* Borkh. **Dissertação**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 128p., 2017.

VERHOFF, M.; SEITZ, S.; PAUL, M.; NOHA, S. M.; JAUCH, J.; SCHUSTER, D.; WERZ, O. Tetra- and Pentacyclic Triterpene Acids from the Ancient Anti-inflammatory Remedy Frankincense as Inhibitors of Microsomal Prostaglandin E₂ Synthase - 1. **Journal of Natural Products**, v. 77, p. 1445-151, 2014.

VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; SOUZA, C. M. L. DE; CHAVES, M. H. The Protium heptaphyllum resin: isolation, structural characterization and evaluation of thermal properties. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 183–187, mar. 2005.

VILLAS BÔAS, G. D. K.; GADELHA, C. A. G. Oportunidades na indústria de medicamentos e a lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros: bases para a discussão de uma política nacional. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 6, p. 1463–1471, 2007.

VILLASEÑOR, I. M.; CANLAS, A. P.; FAUSTINO, K. M.; PLANA, K. G. Evaluation of the bioactivity of triterpene mixture isolated from *Carmona retusa* (Vahl.) Masam leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 53–56, 2004.

VOSTI S. A., BRAZ, E. M., CARPENTIER C. L., D'OLIVEIRA, M. V., WITCOVER J. Rights to Forest Products, Deforestation and Smallholder Income: Evidence from the Western Brazilian Amazon. **World Development**. v. 31, n. 11, p. 1889-1901, 2003.

VRIGNAUD, S.; BENOIT, J.; SAULNIER, P. Biomaterials Strategies for the nanoencapsulation of hydrophilic molecules in polymer-based nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 33, p. 8593–8604, 2011.

WISSING, S. A.; KAYSER, O.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 9, p. 1257–1272, 2004.

WONG H, LI Y, BENDAYAN R, RAUTH M, W. X. Solid lipid nanoparticles for anti-tumor drug delivery. In: **Nanotechnology for cancer therapy**. Hoboken: Taylor and Francis, 2007. p. 741–776.

XIA, Q.; HAO, X.; LU, Y.; XU, W.; WEI, H.; MA, Q.; GU, N. Production of drug-loaded lipid nanoparticles based on phase behaviors of special hot microemulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**. v. 314, p. 27–30, 2008.

YUAN, T.; QIN, L.; WANG, Z.; NIE, J.; GUO, Z.; LI, G.; WU, C. Solid lipid dispersion of calcitriol with enhanced dissolution and stability. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 8, p. 0–8, 2013.

ZHUANG, C. Y.; LI, N.; WANG, M.; ZHANG, X. N.; PAN, W.S.; PENG, J. J.; PAN, Y. S.; TANG, X. Preparation and characterization of vinpocetine loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for improved oral bioavailability. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 394, n. 1–2, p. 179–185, 2010.

ZIMMERMANN, E.; SOUTO, E. B.; MU, R. H. Physicochemical investigations on the structure of drug-free and drug- loaded solid lipid nanoparticles (SLNTM) by means of DSC and ¹H NMR. **Pharmazie**.v. 60, p. 1–6, 2005.