



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

PAULO ADOLFO BARBOZA FREITAS

**DESENVOLVIMENTO DE LIPOSSOMAS COM A SUPERFÍCIE MODIFICADA POR
ÁCIDO HIALURÔNICO PARA APLICAÇÃO TÓPICA DO EXTRATO DE
PTERODON pubescens BENTH.**

CAMPINAS

2019

PAULO ADOLFO BARBOZA FREITAS

**DESENVOLVIMENTO DE LIPOSSOMAS COM A SUPERFÍCIE MODIFICADA POR
ÁCIDO HIALURÔNICO PARA APLICAÇÃO TÓPICA DO EXTRATO DE
PTERODON pubescens BENTH.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia Química da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do
título de Mestre em Engenharia Química.

ORIENTADORA: Maria Helena Andrade Santana

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO PAULO ADOLFO
BARBOZA FREITAS, E ORIENTADO PELA PROF(A). DR(A).
MARIA HELENA ANDRADE SANTANA.

CAMPINAS

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

F884d Freitas, Paulo Adolfo Barboza, 1992-
Desenvolvimento de lipossomas convencionais e com a superfície modificada por ácido hialurônico para aplicação tópica do extrato de *Pterodon pubescens* Benth / Paulo Adolfo Barboza Freitas. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Maria Helena Andrade Santana.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Lipossomas. 2. Ácido hialurônico. 3. Fosfolipídios. 4. *Pterodon pubescens* Benth. I. Santana, Maria Helena Andrade, 1951-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development of conventional and surface modified liposomes by hyaluronic acid for topical application of *Pterodon pubescens* Benth. extract

Palavras-chave em inglês:

Liposomes

Hyaluronic acid

Phospholipids

Pterodon pubescens Benth

Área de concentração: Engenharia Química

Títuloção: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora:

Maria Helena Andrade Santana [Orientador]

Mary Ann Foglio

Denise Gradella Villalva

Data de defesa: 30-07-2019

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: 0000-0003-3912-9066

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1849684381688477>

Folha de Aprovação da Dissertação defendida por Paulo Adolfo Barboza Freitas e aprovada em 30 de julho de 2019 pela banca examinadora constituída pelos seguintes doutores:

Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana
Presidente da Comissão Examinadora
FEQ/UNICAMP

Profa. Dra. Mary Ann Foglio
FCF/UNICAMP

Dra. Denise Gradella Villalva
Consiglio Nazionale delle Ricerche

ATA da Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Para

Emanuell K. F. de Lacerda

...com quem, “diante da vastidão do tempo e da imensidão do universo, é um imenso prazer dividir um planeta e uma época”.

Carl Sagan

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, a Prof. Dra. Maria Helena Andrade Santana, pelo companheirismo durante este percurso, pela paciência nas adversidades, pelo incentivo e fundamentalmente por acreditar na minha capacidade. Obrigado também pelas críticas que contribuíram para o meu crescimento como pessoa e principalmente como pesquisador.

À Prof. Dra. Mary Ann Foglio, pela cooperação e suporte, providenciando peças-chave para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Gilson Júnior, pelo auxílio e zelo prestados, sendo o meu alicerce no laboratório.

À Denise Villalva, Mariana Cecchetto e André Delano, por terem sido, em muitos momentos, meus olhos e minhas mãos no laboratório, muitíssimo obrigado pela cooperação.

Aos meus pais, Josefa Gonçalves Barboza de Freitas e João Bosco de Freitas, pelo amor incondicional, incentivo e apoio.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Unicamp, A Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da Unicamp e a Faculdade de Engenharia (FEQ) da Unicamp por todo apoio, direto ou indireto, prestado a este trabalho.

“Às vezes ouço passar o vento, e só de ouvir o
vento passar, vale a pena ter nascido.”

Fernando Pessoa

RESUMO

A osteoartrite, uma doença caracterizada por inflamação localizada da articulação e destruição da cartilagem, tem sido uma das principais causas de morbidade entre os idosos. O extrato da fruta de *Pterodon pubescens* Bent. (PpB), comumente conhecida como sucupira, tem proporcionado atividades anti-inflamatória, analgésica e anti-reumática em modelos animais de osteoartrite induzida. Seus principais compostos ativos são os vouacapanos e os diterpenos não furânicos de cadeia linear, como o éster metílico de 6 α , 7 β -dihidroxivouacapan-17 β -oate e geranilgeraniol, que são pouco solúveis em água e propensos à agregação, restringindo suas atividades. Portanto, formulações adequadas devem melhorar suas propriedades e atividade físico-químicas. Aqui, o extracto de PpB foi carregado em lipossomas elásticos convencionais e com superfície modificada, compostos por L- α -Fosfatidilcolina (EPC) e 1,2-dimiristoil fosfatidiletanolamina (DMPE) (razão molar 80:20 EPC/DMPE). A modificação da superfície foi realizada por acoplado do hialurônico (HA) a DMPE via ativação com 4- (4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il) -4-metilmorfolio (DMTMM) numa via alternativa. Ambos os lipossomas foram preparados por gotejamento num processo escalável de alto cisalhamento. As medidas de espalhamento dinâmico de luz e potencial *zeta* indicaram interações favoráveis entre os lipídios e compostos bioativos, produzindo alta eficiência de encapsulação (aprox. 90%) e vesículas eletrostaticamente estáveis. A elasticidade foi comprovada para lipossomas vazios (aprox. 150 nm) e carregados (aproximadamente 250 nm) pela sua capacidade de extrusão em duas membranas de policarbonato sobrepostas (30 nm) que imitam a porosidade da pele e pela recuperação das suas propriedades após a extrusão. O AH beneficiou a recuperação dos lipossomas após a permeação. Estes resultados fornecem bases científicas para produção de lipossomas elásticos para entregar PpB à pele. Além disso, eles sinalizam o potencial destes lipossomas para o tratamento tópico da osteoartrite.

Palavras-chaves: lipossomas, ácido hialurônico, fosfolipídios, *Pterodon pubescens* Benth., sucupira.

ABSTRACT

Osteoarthritis, a disease characterized by localized inflammation of the joint and destruction of cartilage, has been a major cause of morbidity among older people. The fruit extract of *Pterodon pubescens* Benth. (PpB), commonly known as sucupira, has provided anti-inflammatory, analgesic, and antirheumatic activities in animal models of induced osteoarthritis. Its main active compounds are vouacapanes, non-furan linear chain diterpenes such as 6α , 7β -dihydroxyvouacapan- 17β -oate methyl ester, and geranylgeraniol, which are poorly soluble in water and prone to aggregation, that restricts their activities. Therefore, adequate formulations should improve their physicochemical properties and activity. Herein, the PpB extract was loaded in conventional and surface modified elastic liposomes composed by L- α -phosphatidylcholine (EPC) and 1,2-dimyristoyl phosphatidylethanolamine (DMPE) (80:20 EPC/DMPE molar ratio). Surface modification was performed by coupling hyaluronic acid (HA) to DMPE via activation with 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium (DMTMM) in an alternative route. Both liposomes were prepared by dripping in a high shear scalable process. Dynamic light scattering and zeta potential measurements indicated favorable interactions among the lipids and bioactive compounds, yielding high encapsulation efficiency (90% approx.) and electrostatically stable vesicles. Elasticity was proved for empty (150 nm approx.) and loaded liposomes (250nm approx.) by their capability for extrusion in two stacked (30nm) polycarbonate membranes mimicking skin porosity and recovery of their properties. HA benefited liposome recovery after permeation. These results provide scientific foundations to produce elastic liposomes to deliver PpB to the skin. Besides, they signalize to the potential of these liposomes to the topical treatment of osteoarthritis.

Keywords: liposomes, hialuronic acid, phospholipids, *Pterodon pubescens* Benth, sucupira.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Frutas a) no habitat e b) coletadas.....	20
Figura 2. Estruturas básicas dos diterpenos a) furânicos de esqueleto vouacapano e b) lineares.....	21
Figura 3. Compostos a) éster metílico de 6 α ,7 β -di-hudroxivouacapan-17 β -oato, b) geranilgeraniol e os isômeros c) éster metílico de 6 α -acetoxi-7 β -hidroxi-vouacapan-17 β -oato e d) éster metílico 6 α -hidroxi-7 β -acetoxi-vouacapan-17 β -oato.	22
Figura 4. Estrutura molecular de um fosfolipídio, neste caso a fosfatotidilcolina.....	30
Figura 5. a) estrutura padrão dos fosfolipídios, b) bicamada lipídica e c) vesículas ou lipossomas.	30
Figura 6. A pele e suas camadas.	32
Figura 7. Estrutura molecular do ácido hialurônico.	33
Figura 8. Estrutura molecular do cloreto cianúrico.	34
Figura 9. Estrutura molecular do 2-cloro-4,6-dissubstituído-1,3,5-triazina, sendo R e R ¹ = OCH ₃ , OC ₆ H ₅ respectivamente.	35
Figura 10. Estruturas moleculares do a) 2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina (CDMT) e b) N-metilmorfolina (NMM).	35
Figura 11. a) Reação entre CDMT e uma amina terciária e b) reação entre o sal de amônio quartenário de triazina e o grupo carboxílico formando o éster ativo.	36
Figura 12. Estrutura molecular do DMTMM.....	36
Figura 13. Passo 01: Formação do éster ativo.....	37
Figura 14. Passo 02: Formação da ligação amida.	37
Figura 15. Esquema utilizado para realização das reações de derivatização do DMPE com AH.....	43
Figura 16. Sistema utilizado para obtenção dos lipossomas contendo ou não extrato de PpB.	49
Figura 17. Sistema utilizado para obtenção dos lipossomas contendo ou não extrato de PpB.	53
Figura 18. Espectro de FTIR do AH precipitado utilizado na síntese do DMPE-AH..	54
Figura 19. Espectro de FTIR do DMPE utilizado na síntese do DMPE-AH.....	55
Figura 20. Espectro obtido por FTIR do DMPE-AH purificado.	56
Figura 21. Termogramas dos materiais de partida DMPE, AH e do DMPE-AH sintetizados.	57

Figura 22. Soluções lipossomais a $2,00 \text{ mmolL}^{-1}$ obtidas com (da direita para esquerda), 10, 20, 30, 40 e 50% de extrato de PpB.....	59
Figura 23. Distribuições populacionais em intensidade (lateral esquerda) e número (lateral direita) para os lipossomos com a) 0%, b) 10%, c) 20%, d) 30%, e) 40% e f) 50% de extrato de PpB.	62
Figura 24. Gráficos de evolução do a) diâmetro médio das partículas (expresso em z-average) e b) potencial zeta ao longo dos 233 dias de acompanhamento de estabilidade.	65
Figura 25. Distribuições populacionais em intensidade (lateral esquerda) e número (lateral direita) para os lipossomos com a) 0%, b) 10%, c) 20%, d) 30%, e) 40% e c) 50% de extrato de PpB pós 233 dias de estabilidade.	66
Figura 26. Perfil das partículas de DMPE-AH em a) intensidade e b) número.....	67
Figura 27. Aspecto visual das soluções lipossomais com percentuais de AH-DMPE maiores que 10% verificando-se a presença de a) precipitados e b) esquema ilustrativo das forças de atração e repulsão presentes na estrutura do lipossoma com recobrimento de superfície.....	68
Figura 28. Distribuições populacionais em intensidade (lateral esquerda) e número (lateral direita) para os lipossomos com a) 5% de DMPE-AH, b) 10% de DMPE-AH, c) 5% de DMPE-AH + 50% de extrato e d) 10% de DMPE-AH + 50% de extrato de PpB.	70
Figura 29. Gráficos de evolução do a) diâmetro médio das partículas (expresso em z-average) e b) potencial zeta ao longo dos 203 dias de acompanhamento de estabilidade.	73
Figura 30. Distribuições populacionais em intensidade (lateral esquerda) e número (lateral direita) para os lipossomos com a) 5% de DMPE-AH, b) 10% de DMPE-AH, c) 5% de DMPE-AH + 50% de extrato e d) 10% de DMPE-AH + 50% de extrato de PpB. após 203 dias de estabilidade.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Percentuais dos componentes cariofiline, humuleno, geranilgeraniol e dos compostos com estrutura de vouacapanos presentes no extrato de PpB.....	47
Tabela 2. Tamanho média (expresso em <i>z-average</i>), PDI e potencial zeta dos lipossomas controle antes e após a o ensaio de estabilidade no meio de diálise	60
Tabela 3. Eficiência e capacidade de encapsulação dos lipossomas convencionais obtidos com até 50% de extrato de sucupira.....	60
Tabela 4. Tamanho médio (expresso em <i>z-average</i>), PDI e potencial zeta dos lipossomas obtidos.....	61
Tabela 5. Diâmetro médio (expressos em <i>z-average</i>), PDI e potencial zeta dos lipossomas antes de serem submetidos ao ensaio de permeação in vitro.....	63
Tabela 6. Diâmetro médio (expressos em <i>z-average</i>), PDI, potencial zeta e percentual de fósforo passante pela membrana para os lipossomas após terem sido submetidos ao ensaio de permeação in vitro	63
Tabela 7. Eficiência e capacidade de encapsulação dos lipossomas com superfície modificada por DMPE-AH obtidos com 50% de extrato de PpB	68
Tabela 8. Resultados da análise por método de DLS do diâmetro das partículas (expresso em valores de <i>z-average</i>), PDI e potencial zeta	69
Tabela 9. Soluções lipossomais utilizadas nos testes de permeação antes do ensaio, expressas em valores de <i>z-average</i> , PDI e Potencial zeta.....	71
Tabela 10. Resultados para os lipossomas com superfície modifica após ensaio de permeação in vitro expressos em <i>z-average</i> , PDI, potencial zeta e percentual de fósforo passante em relação ao fósforo inicial	71

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVO E METAS.....	19
2.1. OBJETIVO	19
2.2. METAS.....	19
3. Revisão da Literatura	20
3.1. <i>PTERODON PUBESCENS</i> BENTH.	20
3.1.1. Ação antinociceptiva do extrato de <i>Pterodon pubescens</i> Benth.	21
3.1.2. Extrato de <i>Pterodon pubescens</i> Benth. no tratamento da Artrite Reumatóide	25
3.1.3. Obtenção do extrato de <i>Pterodon pubescens</i> Benth.	26
3.1.4. Formas alternativas de veiculação e administração do extrato de <i>Pterodon pubescens</i> Benth.	27
3.2. LIPOSSOMAS	29
3.3. ÁCIDO HIALURÔNICO	32
3.3.1. Reagentes baseados em triazina	34
4. MATERIAL E METODOLOGIAS	39
4.1. PRECIPITAÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO	40
4.1.1. Material	40
4.1.2. Procedimento de precipitação do AH	40
4.2. SÍNTESE DO 1,2-DIMIRISTOIL FOSFATIDETANOLAMINA DERIVATIZADO COM ÁCIDO HIALURÔNICO	41
4.2.1. Material	41
4.2.2. Procedimento de Síntese do DMPE-AH	41
4.2.2.1. Síntese do ativador 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio (DMTMM)	41
4.2.2.2. Síntese do DMPE derivatizado com AH (DMPE-AH)	42
4.2.3. Purificação do DMPE-AH	43
4.2.3.1. Material.....	43
4.2.3.2. Purificação do DMPE-AH	44
4.2.3.3. Caracterizações do DMPE-AH purificado.....	44
4.2.3.4. Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	44
4.2.3.5. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	44
4.2.3.6. Determinação do Percentual de Fósforo	45

4.3. PRODUÇÃO DOS LIPOSSOMAS CONVENCIONAIS CONTENDO EXTRATO DE <i>PTERODON PUBESCENS</i> BENTH.	47
4.3.1. Material	47
4.3.1.1. Identificação do extrato de <i>Pterodon pubescens</i> Benth.	47
4.3.2. Preparação dos lipossomas convencionais	48
4.3.2.1. Preparação dos lipossomas vazios	48
4.3.2.2. Preparação dos lipossomas contendo extrato de <i>Pterodon pubescens</i> Benth.	48
4.3.3. Caracterizações dos lipossomas convencionais	49
4.3.3.1. Eficiente e capacidade de encapsulação	49
4.3.3.2. Diâmetro, polidispersividade e potencial zeta	50
4.3.3.3. Elasticidade dos lipossomas	51
4.3.3.4. Estabilidade de armazenamento	51
4.4. PRODUÇÃO DOS LIPOSSOMAS COM SUPERFÍCIE MODIFICADA CONTENDO EXTRATO DE <i>PTERODON PUBESCENS</i> BENTH.	52
4.4.1. Material	52
4.4.2. Preparação dos lipossomas com superfície modificada	52
4.4.2.1. Lipossomas EPC:DMPE:DMPE-AH	52
4.4.2.2. Lipossomas EPC:DMPE:DMPE-AH+ <i>Pterodon pubescens</i> Benth.	52
4.4.3. Caracterizações	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1. SÍNTESE DO 1,2-DIMIRISTOIL FOSFATIDETANOLAMINA DERIVATIZADO COM ÁCIDO HIALURÔNICO	54
5.1.1. Espectros na Região de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) do DMPE-AH	54
5.1.2. Termogramas de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) do DMPE-AH	57
5.1.2.1. Grau de derivatização	57
5.3. LIPOSSOMAS CONVENCIONAIS CONTENDO EXTRATO DE <i>PTERODON PUBESCENS</i> BENTH.	59
5.3.1. Eficiência e capacidade de encapsulação	59
5.3.2. Propriedades dos lipossomas convencionais	61
5.3.3. Elasticidade dos lipossomas	63
5.3.4. Estabilidade em armazenamento dos lipossomas convencionais	64
5.4. LIPOSSOMAS COM SUPERFÍCIE MODIFICADA CONTENDO EXTRATO DE <i>PTERODON PUBESCENS</i> BENTH.	67
5.4.1. Eficiência e capacidade de encapsulação	68

5.4.2.	Propriedades dos lipossomas com superfície modificada.....	69
5.4.3.	Elasticidade dos lipossomas.....	71
5.4.4.	Estabilidade dos lipossomas com superfície modificada	73
6.	CONCLUSÕES	75
7.	REFERÊNCIAS	76
8.	ANEXO I: Development of liposomes entrapping “sucupira” (<i>Pterodon pubescens</i> Bent.) extract for topical treatment of osteoarthritis	84

1. INTRODUÇÃO

Pterodon pubescens Benth. (PpB) comumente conhecida como sucupira, é uma árvore nativa da região central do Brasil, cujo extrato alcoólico dos seus frutos/sementes é utilizado na medicina popular por suas atividades anti-inflamatórias, analgésicas e antirreumáticas (PIO CORREA, 1975; LORENZI, 1998; COELHO et al., 2005; LIMA, 2012). Diversos estudos científicos têm comprovado a eficácia destas atividades do extrato em estudos *in vivo* em modelos animais, tornando ainda mais atrativa a sua utilização (SABINO et al., 1999¹; SILVA et al., 2004; COELHO et al., 2005; VIEIRA et al., 2008; SPINDOLA et al., 2009; SPINDOLA et al., 2010; SPINDOLA et al., 2011; SERVAT et al., 2012; NUCCI et al., 2012; NUCCI-MARTINS et al., 2015; SANTOS et al., 2016; LLORET et al., 2016; GRANDO et al., 2017). Além disto, nenhuma toxicidade aguda, atividade mutagênica ou citotoxicidade foi observada durante a sua administração intraperitoneal ou oral (SABINO et al., 1999²).

Umas das aplicações mais recorrentes na medicina popular do extrato de PpB é no tratamento da dor reumática (COELHO et al., 2005), oriunda principalmente da artrite reumatoide, uma das formas mais comuns de artrite inflamatória crônica (SHRIVASTAVA, PANDEY, 2013). Esta doença, denominada como distúrbio inflamatório sistêmico e autoimune, acomete principalmente as articulações, provocando rigidez, inchaço e risco de perda da função (MCLNNES, SCHETT, 2007; IMBODEN, 2009; COLMEGA, OHATA, MENARD, 2012; CHOY, 2012; SHRIVASTAVA, PANDEY, 2013). As atividades medicinais do extrato de PpB vem sendo cientificamente comprovadas e descritas na literatura, tais como a redução nos índices de artrite induzida em animais que receberam tratamento a base de extrato de PpB (SABINO et al., 1999¹; SPINDOLA et al., 2011; SERVAT et al., 2012; NUCCI-MARTINS et al., 2015; GRANDO et al., 2017).

A forma de produção do extrato, sua manutenção e veiculação são variáveis importantes para a eficácia do tratamento com PpB. Devido ao seu perfil hidrofóbico, o que o torna menos biodisponível, dá-se ênfase à sua encapsulação para tratamentos farmacoterapêuticos (PANDIT, AGIL, SULTANA, 2016).

Portanto, a encapsulação é uma alternativa para administração do extrato de PpB, possibilitando, além de uma melhor absorção, estabilidade, seletividade e

liberação controlada (PANDIT, AGIL, SULTANA, 2016). Nestas vertentes, os lipossomas aparecem como veículos promissores para encapsulação do extrato.

Os lipossomas são compostos de fosfolipídios, moléculas de caráter anfifílico capazes de se auto agregarem quando em soluções aquosas, formando estruturas de bicamada contendo um núcleo aquoso. A presença da bicamada lipídica torna os lipossomas capazes de incorporar moléculas hidrofóbicas (LASIC, 1993; CROMMELIN, SCHREIER, 1994; SHOMOMURA, SAWADAISHI, 2001; PATTNI, CHUPIN, TORCHILIN, 2015). Além da veiculação, a via de administração é um fator de importância para a proteção e liberação do composto ativo encapsulado.

Lipossomas vêm sendo utilizados para administração transdérmica por serem capazes de atravessar as barreiras físicas da pele, principalmente a camada mais externa da epiderme, o extrato córneo, camada esta limitante da taxa da absorção percutânea (VERMA et al., 2003).

A associação do ácido hialurônico (AH) com lipossomas, vem sendo estudada como promotora do aumento da permeação cutânea. Devido à sua alta hidrofiliabilidade, o AH é capaz de hidratar e dilatar o extrato córneo auxiliando na penetração dos lipossomas por via intercelular (HAHN et al., 2014).

O AH é um polissacarídeo de ocorrência natural, biodegradável, e biocompatível com características favoráveis para aplicações biomédicas (SCHANTE, ZUBER, HERLIN, 2011). A presença de grupos acetamida, carboxílicos e hidroxílicos na sua estrutura molecular, permite reações químicas de reticulação ou conjugação, dando origem a uma ampla gama de compostos derivatizados e/ou com propriedades físico-químicas modificadas (PALUMBO et al., 2006; PITARRESI et al., 2006; SCHANTE, ZUBER, HERLIN, 2011; PITARRESI et al., 2007).

Baseado no exposto, neste trabalho foram desenvolvidos lipossomas com a superfície modificada por AH, para administração tópica do extrato de PpB. Para isso, a 1,2-dimiristoil fosfatidietanolamina foi previamente derivatizada com AH, para em conjunto com a fosfatidilcolina, compor a estrutura dos lipossomas.

Tanto quanto é do nosso conhecimento, não há trabalhos na literatura com o extrato de PpB encapsulado em lipossomas convencionais ou com a superfície modificada com AH. Além disso, este trabalho utiliza a ligação do AH mediada por reagente baseado em triazina, até então não descrita na literatura para derivatização de fosfatidiletanolaminas.

Este trabalho contribuirá para o desenvolvimento de novos produtos à base de lipossomas e AH para administração tópica, visando o tratamento de inflamações das articulações.

2. OBJETIVO E METAS

2.1. OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de lipossomas convencionais e com a superfície modificada por ácido hialurônico (AH) para encapsulação do extrato de *Pterodon pubescens* Benth. para aplicação tópica, visando o tratamento de inflamações das articulações.

2.2. METAS

- ❖ Precipitação do ácido hialurônico (AH) comercial com etanol;
- ❖ Síntese do ativador de grupos carboxílicos 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio (DMTMM) a partir da reação de 2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina (CDMT) e N-metilmorfolina (NMM);
- ❖ Derivatização da 1,2-dimiristoil fosfatidetanolamina (DMPE) com AH mediada por DMTMM, purificação e caracterização físico-química do conjugado DMPE-AH;
- ❖ Preparação e caracterização de lipossomas convencionais compostos de L- α -fosfatidilcolina de ovo (EPC) e DMPE, com e sem extrato de PpB;
- ❖ Preparação e caracterização de lipossomas com a superfície modificada com AH a partir da incorporação do conjugado DMPE-AH em lipossomas convencionais, com e sem extrato de PpB.

3. Revisão da Literatura

3.1. *PTERODON PUBESCENS* BENTH.

Pterodon pubescens Benth. (sinônimo de *Pterodon polygaeflorus* Benth. e *Pterodon emarginatus* Vogel) popularmente conhecida como sucupira, sucupira-branca, sucupira-lisa, fava-de-sucupira ou faveira, compreendida no gênero *Pterodon* (família *Leguminosae/Fabaceae*), é uma árvore nativa da região central do Brasil. O extrato alcoólico dos seus frutos/sementes (Figura 1) é utilizado na medicina popular por suas atividades anti-inflamatórias, analgésicas e antirreumáticas (PIO CORREA, 1975; LORENZI, 1998; COELHO et al., 2005; LIMA, 2012).

Figura 1. Frutas a) no habitat e b) coletadas.

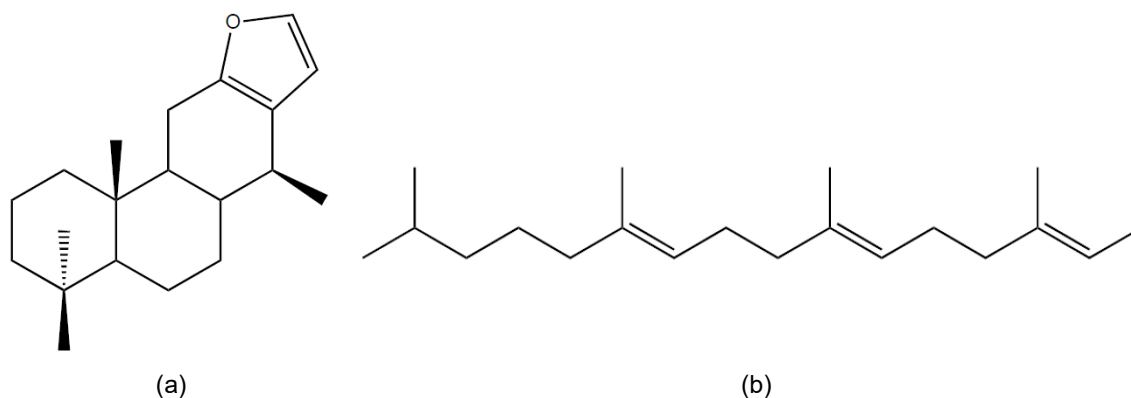


Fonte – Adaptado de Instituto Brasileiro de Aromatologia/Laszlo, acessado em 2017.

A literatura tem reportado que os vouacapanos presentes no extrato das sementes de PpB estão envolvidos na sua atividade anti-inflamatória, antinociceptiva antiproliferativa e antirreumática (SABINO et al., 1999¹; SILVA et al., 2003; COELHO et al., 2005; VIEIRA et al., 2008; SPINDOLA et al., 2009; SPINDOLA et al., 2010; SPINDOLA et al., 2011; SERVAT et al., 2012; NUCCI et al., 2012; NUCCI-MARTINS et al., 2015; SANTOS et al., 2016; LLORET et al., 2016; GRANDO et al., 2017). Com relação aos diterpenos não furânicos de cadeia linear, alguns autores reportaram suas atividades anti-inflamatória, antinociceptiva e antirreumática, tanto na sua forma isolada como quando constituintes do óleo bruto (Figura 2) (SPINDOLA et al., 2010; SPINDOLA et al., 2011; GRANDO et al., 2017). Além disto, nenhuma toxicidade

aguda, atividade mutagênica e citotoxicidade (ensaio *in vitro*) foi observada para doses de até 8 g/kg do extrato de PpB, dose esta superior a utilizada na medicina popular (5 – 50 ug/kg) (SABINO et al., 1999¹; SOUZA, 2017).

Figura 2. Estruturas básicas dos diterpenos a) furânicos de esqueleto vouacapano e b) lineares.



Fonte – Adaptado de Hoscheid; Cardoso, 2015.

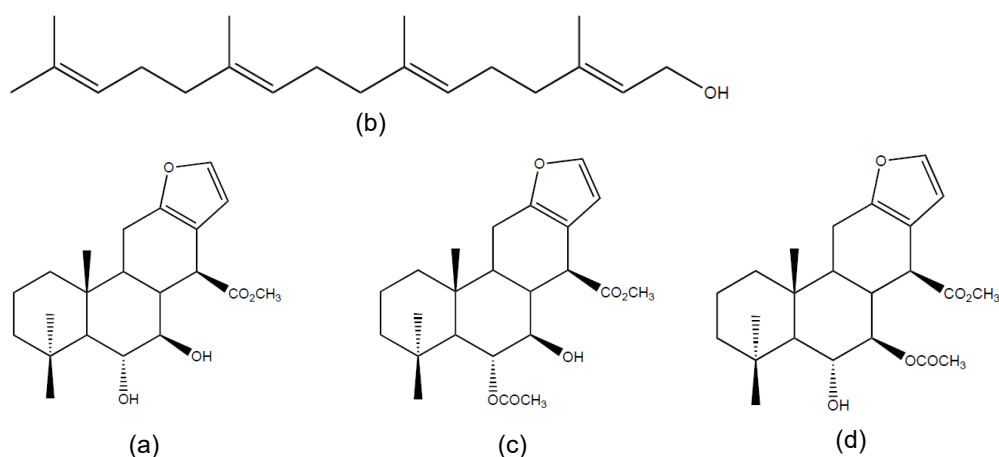
3.1.1. Ação antinociceptiva do extrato de *Pterodon pubescens* Benth.

Para elucidar se uma amostra a ser avaliada em modelos de nocicepção causaria possíveis alterações no comportamento motor, deve ser realizada previamente a avaliação da atividade locomotora através do teste de campo aberto (*open field*). Modificações no desempenho motor que o animal possa vir a sofrer são provenientes de uma ação miorelaxante ou sedativa, podendo induzir a um grande número de erros em estudos sobre drogas que atuam na nocicepção central e periférica (MILLAN, 2003). Nos modelos de nocicepção o fator comportamental está diretamente envolvido, portanto o estudo de extratos que interfiram na locomoção poderia produzir um resultado falso positivo. Esta ação não foi constatada para a dose de até 300 mg/kg dos extratos obtidos por extração alcoólica administrados via oral (NUCCI-MARTINS et al., 2015), diclorometânica por via intraperitoneal (SPINDOLA et al., 2010) e oral (GRANDO et al., 2017) e aquosa por via oral (GRANDO et al., 2017) em camundongos Swiss brancos, exceto que, Nucci-Martins et al. (2015) verificaram a redução de 71% da atividade locomotora após administração da dosagem de 600 mg/kg por via oral.

Para os compostos isolados, Spindola et al. (2010) realizaram o teste de campo aberto com o éster metílico de $6\alpha,7\beta$ -di-hidroxivouacapan-17 β -oato e geranilgeraniol

(Figura 03 a) e b) respectivamente) em dosagem de 300 mg/kg por via intraperitoneal, não observando ação sedativa a nível de junção neuromuscular; Servat et al. (2012) utilizaram uma dosagem de 30 mg/kg dos isômeros éster metílico de 6α -acetoxi- 7β -hidroxi-vouacapan- 17β -oato e 6α -hidroxi- 7β -acetoxi-vouacapan- 17β -oato (Figura 3 c) e d) respectivamente) por via intraperitoneal também não constatando esta ação. Estes resultados demonstraram a susceptibilidade do extrato de PpB, assim como de alguns de seus compostos isolados, para testes em modelos de nociceptividade.

Figura 3. Compostos a) éster metílico de $6\alpha,7\beta$ -di-hidroxivouacapan- 17β -oato, b) geranilgeraniol e os isômeros c) éster metílico de 6α -acetoxi- 7β -hidroxi-vouacapan- 17β -oato e d) éster metílico 6α -hidroxi- 7β -acetoxi-vouacapan- 17β -oato.



Fonte – Adaptado de Spindola et al. (2010) e Servat et al. (2012).

Em modelos de dor neurogênica estimulados por ácido acético (modelo de contorção abdominal), Spindola et al. (2010) e Grando et al. (2017) observaram uma redução 62% - 73%, respectivamente, na ação nociceptiva por administração de 300 mg/kg por via oral do extrato diclorometânico de PpB. Além da extração diclorometânica, Grando et al. 2017 realizaram extração aquosa, obtendo o extrato ausente de geranilgeraniol, o que, segundo os autores, pode estar relacionado a redução de 32% da ação antinociceptiva do extrato sobre a dor neurogênica empregada no modelo.

Com relação à ação antinociceptiva dos compostos isolados, geranilgeraniol e éster metílico de $6\alpha,7\beta$ -di-hidroxivouacapan- 17β -oato, Spindola et al. (2010) observaram semelhança com o resultado obtido para o extrato diclorometânico bruto, com resultados de redução da ação nociceptiva de 64% e 66% respectivamente (para

dose de 300 mg/kg por via oral), indicando uma ação sinérgica dos compostos no extrato onde suas concentrações são menores que as administradas na sua forma isolada (11,56% geranilgeraniol e 34,6% éster metílico de 6 α ,7 β -di-hidroxivouacapn-17 β -oato, ou seja, 4.7 mg/kg de ambos no extrato).

Nucci-Martins et al. (2015) avaliaram a ação antinociceptiva do extrato alcoólico em modelo de dor neurogênica por administração de *capsaicina*, visando verificar a ação do extrato de PpB nos receptores transiente potencial vaniloides tipo 1 (TRPV1). Foi observada diminuição na reação dos animais (o que indica nociceptividade) que receberam previamente uma dose de 300 mg/kg por via oral do extrato, em 61%. Spindola et al. (2010) observaram resultado semelhante para administração de geranilgeraniol e éster metílico de 6 α ,7 β -di-hidroxivouacapan-17 β -oate na dosagem de 300 mg/kg por via oral, obtendo redução na atividade nociceptiva de 67% e 69% respectivamente, indicando ação do extrato nos canais nociceptivos TRPV1. Nucci-Martins et al. (2015) também avaliaram a ação do extrato alcoólico sobre os receptores transiente potencial TRPA1 (*Transient Receptor Potential cation channel subfamily A member 1*) por administração de cinamaldeído, obtendo a redução de 100% na ação nociceptiva causada pela droga para as dosagens de 30 e 300 mg/kg por via oral, indicando a ação do extrato nos canais nociceptivos TRPA1.

Em modelos de nocicepção por administração de solução de formaldeído, Nucci et al. (2012) observaram a ação antinociceptiva do extrato alcoólico de PpB tanto na fase neurogênica (primeiros 5 min após a administração de solução de formaldeído) como na fase inflamatória (15 – 30 min após a administração da solução de formaldeído), reduzindo 63% e 65% da reação dos animais para as respectivas fases, via administração prévia de dose de 100 mg/kg de extrato bruto por via oral. Também foi verificada ação antiedematogênica, reduzindo em 52% o edema formado em relação ao grupo controle. Grando et al. (2017) observaram resultado semelhante quanto a administração dos extratos diclorometânicos e aquosos de PpB por via oral obtendo diminuição na ação nociceptiva de 58% e 30% para os respectivos extratos na dose de 300 mg/kg na fase neurogênica do teste, quanto a fase inflamatória o extrato diclorometânico apresentou redução de 99%, e o extrato aquoso de 86% para a dose de 300 mg/kg. Vale salientar que o extrato aquoso, em comparação com o extrato diclorometânico, não apresentava o geranilgeraniol em sua constituição, o que está relacionado com sua menor eficiência na redução da ação nociceptiva na fase neurogênica do modelo.

Servat et al. (2012) verificaram a ação antinociceptiva dos isômeros éster metílico de 6α -acetoxi- 7β -hidroxi-vouacapan- 17β -oato e 6α -hidroxi- 7β -acetoxi-vouacapan- 17β -oato para a dosagem de 100 mg/kg por via intraperitoneal nas duas etapas, neurogênica e inflamatória, do modelo de formaldeído, obtendo redução de aproximadamente 72% e 80% para a reação dos animais nas respectivas fases, entretanto, o efeito antinociceptivo na segunda fase do modelo só foi alcançado com a dose de 100 mg/kg, o que indica ação mais efetiva dos isômeros para a fase neurogênica.

A ação hipernociceptiva do extrato diclorometânico e aquoso de PpB foi avaliada por Grando et al. (2017) mediante modelo mecânico de hiperalgesia induzido por *carrageenina*, onde foi observado que ambos os extratos, para todas as doses testadas (30, 100 e 300 mg/kg por via oral) apresentaram efeitos significativos na diminuição da hipernociceptividade. Spindola et al. (2011) verificaram a ação dos compostos isolados geranilgeraniol e éster metílico de $6\alpha,7\beta$ -di-hidroxivouacapan- 17β -oato em modelo semelhante ao apresentado por Grando et al. (2017), verificando efeitos significativo do geranilgeraniol na redução da hipernociceptividade, entretanto, o éster metílico de $6\alpha,7\beta$ -di-hidroxivouacapan- 17β -oato não apresentou significante ação anti-hipernociceptiva em comparação com o veículo, ambos foram administrados na dose de 30 mg/kg por via intraperitoneal. Servat et al. (2012) não observaram ação anti-hipernociceptiva significativa dos isômeros éster metílico de 6α -acetoxi- 7β -hidroxi-vouacapan- 17β -oato e 6α -hidroxi- 7β -acetoxi-vouacapan- 17β -oato administrados por via intraperitoneal mediante modelo mecânico de hiperalgesia induzido por *carragenina*.

A atividade antinociceptiva do extrato alcoólico de PpB foi testada por Nucci-Martins et al. (2015) nos receptores glutamato e nas citocinas pro-inflamatórias TNF- α (Fator- α de Necrose Tumoral) e IL- 1β (Interleucina 1 Tipo β). Para a dose de 300 mg/kg do extrato por via oral, os autores verificaram inibição da nociceptividade dos receptores glutamato, NMDA (receptor N-metil D-Aspartato), kainate e trans-ACPD (receptor *trans-1-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylic acid*) em 74%, 45%, 90% e 68% respectivamente. Quando as citocinas pro-inflamatórias, para a mesma dose, a inibição da ação nociceptiva para o TNF- α e IL- 1β foram de 65% e 87%, respectivamente, indicando assim o efeito antinociceptivo do extrato alcoólico de PpB sobre os receptores glutamato e nas citocinas pro-inflamatórias.

3.1.2. Extrato de *Pterodon pubescens* Benth. no tratamento da Artrite Reumatóide

O extrato das sementes de sucupira tem sido amplamente utilizado na cultura popular da região central do Brasil por suas propriedades antirreumáticas (COELHO et al., 2005). Fato este que é de relevância por gerar novas pistas para o desenvolvimento de tratamentos alternativos para a artrite reumatoide, uma vez que os caminhos atuais de terapêutica podem gerar um enorme número de efeitos colaterais nocivos aos pacientes (BULATOVÍČ et al., 2011; COLMEGNA et al., 2012; GRANDO et al., 2017).

Artrite pode ser definida como uma inflamação nas articulações que provoca dor, inchaço e rigidez. A ampla categoria de artrites (o termo artrite inclui mais de 100 tipos de condições que afetam as articulações e os tecidos circundantes) inclui doenças que podem ser categorizadas como inflamatórias, degenerativas, metabólicas ou infecciosas (SHRIVASTAVA, PANDEY, 2013). A artrite reumatoide (AR) é a forma mais comum de artrite inflamatória crônica. Comumente denominada como um distúrbio inflamatório sistêmico e autoimune, a AR visa principalmente as articulações, provocando rigidez e inchaço com risco de perda da função na articulação acometida (MCLNNES, SCHETT, 2007; IMBODEN, 2009; COLMEGA, OHATA, MENARD, 2012; CHOY, 2012 SHRIVASTAVA, PANDEY, 2013).

Para verificar a ação do extrato de PpB no tratamento da artrite, diversos autores utilizaram o modelo de índice de artrite induzida por CFA (*Complete Freund Adjuvant*) (SABINO et al., 1999¹; SPINDOLA et al., 2011; SERVAT et al., 2012; NUCCI-MARTINS et al., 2015; GRANDO et al., 2017).

A administração diária do extrato diclorometânico de PpB (300 mg/kg) por via oral após o sétimo dia de aplicação de CFA nos animais (camundongos *Swiss* e *Wistar* fêmeas) reduziu significativamente a formação do edema de pata em 42% com relação ao grupo controle. O extrato com ausência do geranilgeraniol não apresentou redução significativa na formação do edema (GRANDO et al., 2017).

O índice de alodinia (índice de alodinia = pressão suportada pela pata inflamada/pressão suportada pela pata não inflamada) via estímulo mecânico nos animais que receberam a injeção de CFA seguido de tratamento diário após o sétimo dia com extrato diclorometânico de PpB (300 mg/kg) por via oral, apresentou o valor de 90% após o 10º dia de tratamento. O extrato aquoso (300 mg/kg por via oral)

apresentou índice de 86% após o 14º dia de tratamento. O efeito significativo de ambos os extratos permaneceu até o último dia de tratamento (21º) (GRANDO et al., 2017). Em estudos com os isômeros éster metílico de 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapan-17 β -oato e 6 α -hidrox-7 β -acetoxi-vouacapan-17 β -oato na dose de 30 mg/kg administrados por via intraperitoneal, Servat et al. (2012) não observaram nenhuma redução significativa no índice de alodinia. Spindola et al. (2011) estudaram a ação do geranilgeraniol e 6 α ,7 β -di-hidroxivouacapan-17 β -oato de metila para dose de 30 mg/kg via intraperitoneal, verificando a ação anti-alodínica apenas nas primeiras 4 horas após a injeção de CFA, nas fases sub-crônica e crônica nenhum efeito significativo foi verificado.

As propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antirreumáticas apresentadas anteriormente estão ligadas aos compostos presentes no extrato, na sua forma isolada ou por ação sinérgica no óleo denominado extrato bruto. A presença ou ausência destes constituintes no extrato de PpB está ligada ao processo utilizado para sua obtenção a partir das frutas/sementes da espécie. Existem hoje na literatura diferentes formas de se obter o extrato de PpB.

3.1.3. Obtenção do extrato de *Pterodon pubescens* Benth.

A obtenção do extrato alcoólico é comumente realizada via maceração dos frutos/sementes triturados em etanol absoluto com razões que vão de 6,66 – 20,00:1 (etanol absoluto:frutas trituradas) por um período de 15 – 30 dias na ausência de luz. O solvente da extração é então filtrado e concentrado até *secura* em evaporador rotativo com auxílio do vácuo. O rendimento obtido no processo é de aproximadamente 47% (SANTOS et al., 1999; NUCCI et al., 2012; SILVA et al., 2013; NUCCI-MARTINS et al., 2015; SANTOS et al., 2016). As extrações mediante diclorometano (extrato diclorometânico) são geralmente obtidas via maceração das frutas/sementes trituradas em diclorometano na proporção de 3 – 5:1 (diclorometano:frutas/sementes trituradas) durante um período 1,5 – 2 horas cada extração (variam de 1 – 3 extrações), os procedimentos subsequentes são idênticos a da extração alcoólica. O rendimento do processo é de aproximadamente 35 $\pm$ 5% (SPINDOLA et al., 2009; SPINDOLA et al., 2010; SPINDOLA et al., 2011; SERVAT et al., 2012; LLORET et al., 2016; GRANDO et al., 2017).

Grando et al. (2017) apresentaram uma rota de extração utilizando água em refluxo na razão de 1:24 (frutas/sementes trituradas: água) por um período de 1 h. O solvente da extração foi concentrado e liofilizado para obtenção do extrato bruto. Uma das desvantagens observada pelos autores nesse processo é a ausência do constituinte geranilgeraniol no óleo obtido. Outro processo de extração é apresentado por Santos et al. (2016), onde o grupo de pesquisa utiliza de CO₂ supercrítico para extração do óleo, obtendo um extrato com maior teor de geranilgeraniol do que o obtido pelos outros métodos aqui mencionados. Oliveira et al. (2017) realizaram a extração do óleo de PpB na ausência de solventes utilizando a técnica de prensagem a frio, obtendo um extrato denominado pelo grupo como óleo-resina.

A hidro-distilação das sementes de PpB em aparato do tipo *Clevenger* é apresentado por Alvez et al. (2015) e por Dutra et al., (2008) para obtenção de óleos essenciais de sucupira ricos em componentes sesquiterpenos, entretanto, ausente dos constituintes diterpenos tanto de cadeia linear como os de estrutura de vouacapano.

Uma vez isolados, os extratos naturais são muito sensíveis ao ambiente e apresentam fácil degradação mediante exposição ao oxigênio, luz e/ou aquecimento. Possuem geralmente baixa solubilidade em água devido ao seu perfil hidrofóbico, o que reduz a sua biodisponibilidade, limitando a sua utilização como candidato para tratamentos farmacoterapêuticos (PANDIT, AGIL, SULTANA, 2016).

A técnica de encapsulação é uma alternativa para preservação e administração dos extratos naturais, possibilitando: estabilidade, aumento da dissolução, liberação controlada, permeabilidade e posterior distribuição preferencial nos tecidos de interesse diminuindo assim possíveis efeitos colaterais (PANDIT, AGIL, SULTANA, 2016).

3.1.4. Formas alternativas de veiculação e administração do extrato de *Pterodon pubescens* Benth.

Servat et al. (2012) desenvolveram microcápsulas com o extrato diclorometânico bruto de PpB e com os isômeros éster metílico de 6 α -acetoxi-7 β -hidroxi-vouacapan-17 β -oato e 6 α -hidroxi-7 β -acetoxi-vouacapan-17 β -oato, utilizando a técnica de *spray-dryer* em uma emulsão formada por PpB (ou os isômeros):maldodextrina:goma arábica (1:2:2) e Tween 80® como emulsificante. O

extrato de PpB microencapsulado apresentou dose efetiva aproximadamente 60% menor que a do extrato não encapsulado (microencapsulado ED_{50} = 12,8 mg/kg; não encapsulado ED_{50} = 32,3 mg/kg; via de administração intraperitoneal) para diminuição da nocicepção em modelos de contorção abdominal em camundongos. O extrato e os isômeros de PpB microencapsulados apresentaram-se estáveis até 180 dias (40 °C) de estudo. O extrato encapsulado apresentou ED_{50} de 32 mg/kg na diminuição da nocicepção em modelo de contorção abdominal no 180 ° dia, dose efetiva esta semelhante a do extrato bruto administrado no tempo 0 de estabilidade, indicando preservação das suas propriedades bioativas. O extrato não encapsulado não se apresentava viável para ensaio de nocicepção no 180 ° dia. Os isômeros, tanto encapsulados como não encapsulados, mantiveram suas propriedades bioativas significativamente iguais ao longo do ensaio de estabilidade (SERVAT et al., 2012).

Alves et al. (2014) também utilizaram maldodextrina e goma arábica para microencapsulação do óleo essencial de *Pterodon emarginatus* Vogel por técnica de *spray-dryer*, produzindo microcápsulas que apresentavam diâmetro majoritário entre 0-5 μ m, com superfícies lisas e homogêneas, eficiência de incorporação de 96,63% e estabilidade comprovada até o 45° dia.

O processo de encapsulação por coacervação complexa da fração extraída em hexano do extrato alcoólico de PpB foi proposta por Reinas et al. (2014). Coacervação complexa pode ser definida como a separação de uma solução macromolecular composta por dois macro-íons com cargas opostas em duas fases líquidas imiscíveis (JONG e KRUYT, 1929). As microcápsulas obtidas por este processo apresentaram eficiência de encapsulação de 61% e diâmetro médio de 0,6 μ m, com liberação de 53% do extrato (em ensaio *in vitro* de liberação) após 3 h, e 75% após 24 h (REINAS et al., 2014).

O desenvolvimento de nanoemulsões contendo o extrato de PpB foi apresentado por diversos autores (HOSCHEID et al., 2015; SANTOS et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016; HOSCHEID et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017). Nanoemulsões são sistemas coloidais cineticamente estáveis que apresentam gotículas de dimensões nanométricas (≤ 100 nm) (BURGUERA, BURGUERA, 2012).

Hoscheid et al. (2015) desenvolveram nanoemulsões da fração extraída em hexano do extrato alcoólico de PpB utilizando *Phospholipon 90 G* com PEG-40H ou PEG-40. As nanoemulsões obtidas apresentaram amostras estáveis com eficiência de encapsulação do extrato de 94,8% e 95,2%, potencial zeta de -26,7 mV e -17,82

mV e tamanho de gota de 199 nm e 210 nm, respectivamente para PEG-40H e PEG-40.

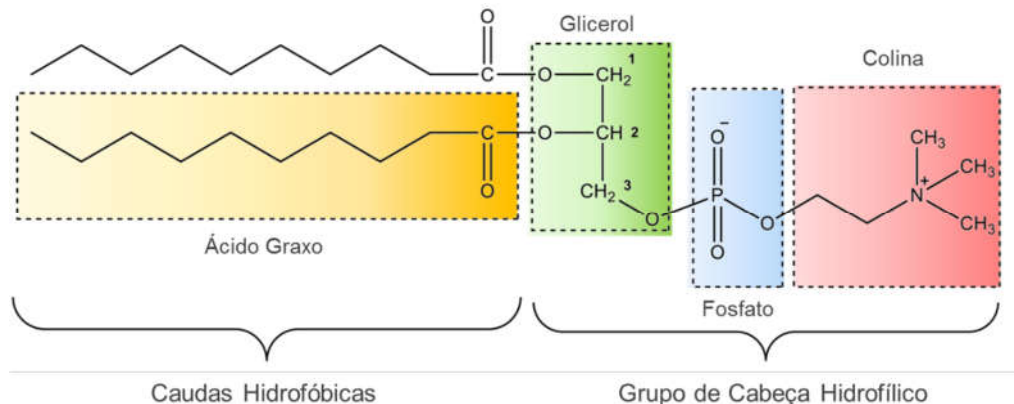
Oliveira et al. (2016) obtiveram nanoemulsões dos extratos obtidos por prensagem a frio dos frutos de PpB mediante emulsificação com os surfactantes monoelato de sorbitana e *polysorbate 80*. As emulsões desenvolvidas apresentaram tamanho de gotas de $135,8 \pm 0,2$ nm, PDI de $0,173 \pm 0,002$, potencial zeta de $-27,2 \pm 0,6$ mV e estabilidade destas condições por até 60 dias.

Tanto quanto é de nosso conhecimento, não se verifica na literatura corrente o desenvolvimento de sistemas lipossomais de entrega de sucupira, sistemas este proposto para desenvolvimento neste trabalho.

3.2. LIPOSSOMAS

Os lipossomas são compostos de fosfolipídios, moléculas de caráter anfifílico que compreendem um esqueleto de glicerol que é estereificado nas posições 1 e 2 com ácidos graxos e na posição 3 com fosfato (Figura 4), capazes de se auto agregarem quando em soluções aquosas formando estruturas de bicamada, contendo um núcleo aquoso circundado por uma ou várias lamelas concêntricas, estruturas estas denominadas de unilamelares e multilamelares respectivamente, com diâmetro da ordem de dezenas de nanômetros a dezenas de micrometros. Devido à presença de um núcleo aquoso e uma bicamada lipídica, os lipossomas possuem a capacidade de incorporar moléculas hidrofílicas e lipofílicas, além disto, a bicamada lipídica comporta-se como uma membrana semipermeável com relação ao material encapsulado em seu núcleo aquoso (LASIC, 1993; CROMMELIN, SCHREIER, 1994; SHOMOMURA, SAWADAISHI, 2001; PATTNI, CHUPIN, TORCHILIN, 2015).

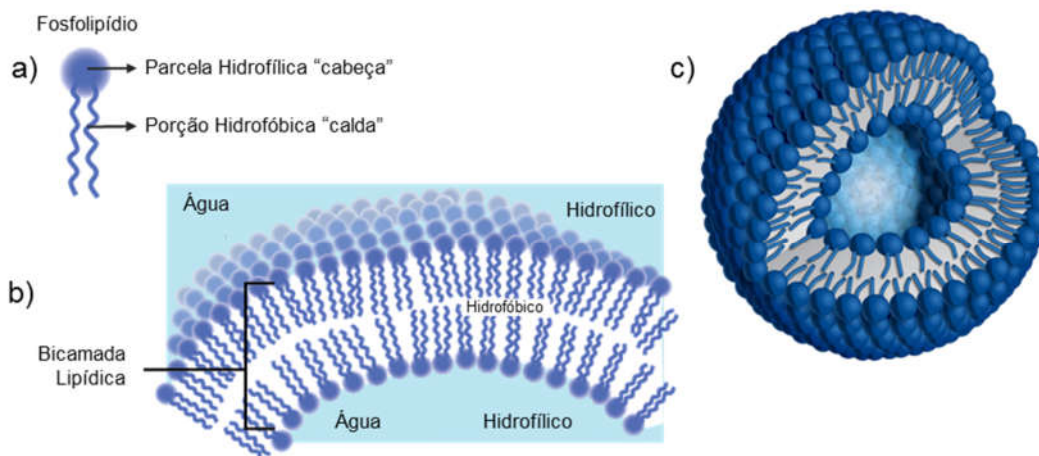
Figura 4. Estrutura molecular de um fosfolípido, neste caso a fosfatotidilcolina.



Fonte – Adaptado de Hoogevest, 2017.

O primeiro relato sobre lipossomas foi realizado por Bangham et al. em 1960, onde demonstraram que fosfolípidios suspensos em excesso de solução aquosa eram capazes de formar estruturas esféricas, semelhantes a pequenas células ou vesículas (Figura 5) (BANGHAM, STANDISHM, WATKINS, 1965). Esta descoberta levou a encapsulação de uma ampla categoria de drogas nas bicamadas de fosfolípidios com a finalidade de melhoria no desempenho terapêutico das mesmas (BANGHAM, STANDISHM, WATKINS, 1965).

Figura 5. a) estrutura padrão dos fosfolípidios, b) bicamada lipídica e c) vesículas ou lipossomas.



Fonte – Adaptado de Deleu et al., 2014.

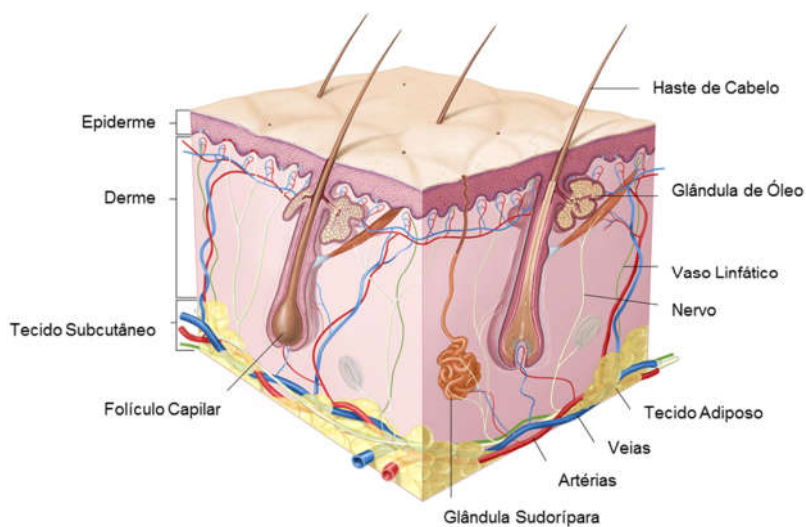
Os fosfolípidios utilizados para preparação dos lipossomas podem ser de origem natural e/ou sintética tais como a fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina

(PE), fosfatidilserina e fosfatidilglicerol (PATTNI, CHUPIN, TORCHILIN, 2015). Quando a via de interesse de administração da formulação lipossomal é cutânea, a utilização de fosfolípidos de origem natural para obtenção das vesículas se sobressai, uma vez que os lipossomas formados por fosfolípidos naturais apresentam uma permeação cutânea superior em relação as formulações lipossomais baseadas em lípidos sintéticos, este comportamento está atribuído a baixa temperatura de transição de fase dos lípidos naturais (abaixo de 0 °C) (KITAGAWA, KASAMAKI, ENHANCED, 2006).

A fosfatidilcolina é o principal componente dos lipossomas que atua como potencializador da entrega de drogas por via cutânea, entretanto, quando não associados a outros componentes, apresenta-se na sua forma líquida na temperatura corpórea (32 °C) levando a desnaturação da estrutura da vesícula e liberação prematura da droga encapsulada (BENNETT, MACCALLUM, TIELEMAN, 2009; JAIN, PATEL, MADAN, LIN, 2015). A adição de colesterol é geralmente realizada visando conferir rigidez e estabilidade a bicamada lipídica, uma vez que a sua presença aumenta a temperatura de transição da fase de gel para o estado de líquido cristalino (BENNETT, MACCALLUM, TIELEMAN, 2009). Entretanto, a adição do colesterol pode impactar na eficiência de encapsulação de drogas hidrofílicas devido a diminuição do volume do núcleo aquoso (GLAVAS-DODOV, FREDO-KUMBARADZI, GOROCINOVA, 2005), além disso, uma vez que a adição de colesterol aumenta a rigidez das vesículas, pode impactar negativamente na permeação dos lipossomas por via cutânea (JAIN, PATEL, MADAN, LIN, 2015).

A pele é uma barreira física, imunológica e sensorial ao nosso meio ambiente. É estruturada em três camadas, sendo elas a epiderme, a derme e a camada subcutânea (Figura 6). A camada externa da epiderme, o extrato córneo (EC), reveste toda a superfície externa do corpo. O EC, além de proteger o corpo contra influências do mundo exterior, é a limitante da taxa de absorção percutânea, regulando a água presente nos outros tecidos mais internos por evaporação ou absorção, e evitando que substâncias estranhas, como o caso dos medicamentos, adentrem ao organismo (VERMA et al., 2003).

Figura 6. A pele e suas camadas.



Fonte – Adaptado de Verma et al., 2003.

Diversos autores têm apresentado os efeitos das variáveis de formulação (por exemplo, a composição lipídica, o tipo de lipídio, a razão fármaco-lipídio, a concentração e/ou tipo de revestimento, dentre outros) sobre as propriedades físico-químicas e o comportamento de permeação cutânea dos lipossomas (BHATIA, KUMAR, KATARE, 2004; PUGLIA, BONINA, RIZZA, et al. 2010; RUOZI, RIVA, BELLETTI, et al. 2010, JAIN, PATEL, MADAN, LIN, 2015).

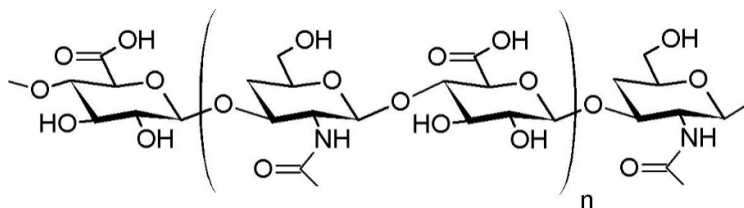
A associação do Ácido Hialurônico (AH) com nanocarreadores, como os lipossomas, vem sendo estudada como promotora do aumento da permeação cutânea destas nanopartículas. A alta hidrofiliabilidade e retenção de água deste polímero proporciona, quando em contato com o EC, a hidratação da região dilatando-a e facilitando a permeação intercelular, além disto, os receptores do AH são altamente expressos nos queratinócitos da epiderme e nos fibroblastos da derme, facilitando a penetração contínua dos derivados de AH através da internalização celular mediada por estes receptores (HAHN et al., 2014).

3.3. ÁCIDO HIALURÔNICO

O Ácido Hialurônico (AH) é um polissacárido de ocorrência natural constituído por unidades repetidas de N-acetil-D-glucosamina e ácido D-glucurônico com os monossacarídeos unidos entre si por ligações glicosídicas β -1,3 e β -1,4 em

alternância (Figura 7). Foi isolado pela primeira vez por Meyer e colaboradores em 1934 do vítreo de olhos bovinos (MEYER, PALMER, 1934).

Figura 7. Estrutura molecular do ácido hialurônico.



Fonte – Adaptado de Meyer, Palmer, 1934.

O AH apresenta uma ampla gama de massas molares, podendo variar de 20 kDa até 4000 kDa (TEIJEIRO et al, 2013; KARBOWNIK, NOWAK, 2013). Em condições fisiológicas (pH 7) todos os grupos carboxílicos do ácido D-glicurônico e da N-acetilglicosamina estão completamente ionizadas, tornando a molécula de AH altamente polar e, conseqüentemente, altamente solúvel em água. Esta alta solubilidade em água, em associação com as elevadas massas molares da cadeia de ácido hialurônico, proporcionam que as soluções deste polissacarídeo apresentem elevada viscosidade e elasticidade (SCHANTE, ZUBER, HERLIN, 2011).

Na natureza, o AH está presente em organismos vertebrados, bem como em bactérias. Sua maior ocorrência no corpo humano está na matriz extracelular dos tecidos conjuntivos, também e especialmente abundante no líquido sinovial das articulações, da derme da pele e do corpo vítreo do olho (FRASER, LAURENT, LAURENT, 1997; LAURENT, FRASER, 1992; ROBERT, ROBERT, RENARD, 2010). O AH, devido a sua alta massa molecular e capacidade de reter grandes quantidades de água, mantém um espaço extracelular aberto, hidratado e estável no qual as células e outros componentes da matriz extracelular, como fibras de colágeno e elastina, são firmemente mantidos, além de atuar como lubrificante e amortecedor, especialmente nas articulações (SCHANTÉ et al, 2011).

Do ponto de vista farmacêutico, o ácido hialurônico é um polímero biodegradável e biocompatível (SCHANTE, ZUBER, HERLIN, 2011). Estas características têm tornado favorável e ampla a sua utilização em aplicações biomédicas, como no tratamento da osteoartrite, na cirurgia plástica e ocular e na engenharia de tecidos, assim como em várias aplicações em sistemas de entrega de fármaco (TRIPODO et al., 2015). Este crescente uso em aplicações biomédicas atua

como propulsor para o desenvolvimento de uma ampla gama de derivados de AH, que apresentam propriedades melhoradas ou moduladas, mediante reações químicas de reticulação ou conjugação, explorando seus grupos acetamida, carboxílicos e hidroxílicos (PALUMBO et al., 2006; PITARRESI et al., 2006; PITARRESI et al., 2007; SCHANTE, ZUBER, HERLIN, 2011).

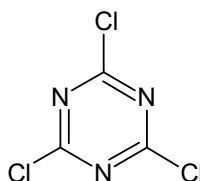
Os métodos mais comuns de modificação do grupo carboxilato são as reações mediadas por carbodiimida; a esterificação e amidação (PRICE, BERRY, NAVSARIA, 2007), em contra partida, Bergman et al. (2007) descreveram uma nova metodologia para a reação de amidação do AH utilizando um reagente de ativação a base de triazina.

As reações de amidação que utilizam reagente a base de triazina apresentam maior seletividade na obtenção do AH derivatizado, proporcionando maiores graus de derivatização (expresso em percentual de grupos carboxílicos substituídos) em comparação com a reação comumente mediada pela carbodiimida 1-etil-3-(3-(dimetilamino)propil)carbodiimide (EDC), sem que ocorra a formação do intermediário não reativo N-acilurea (D'ESTE, EGLIN, ALINI, 2014)

3.3.1. Reagentes baseados em triazina

Triazinas são anéis de benzeno que possuem três de seus carbonos substituídos por nitrogênio, comumente nas posições 1, 3 e 5. Outras substituições que também ocorrem nestes compostos estão nos carbonos de posição 2, 4 e 6, como é o caso do cloreto cianúrico (Figura 8), com substituições realizadas por átomos de cloro (RYDERGREN, 2013).

Figura 8. Estrutura molecular do cloreto cianúrico.

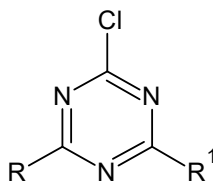


Fonte – Adaptado de Rydergren, 2013.

Kaminski (1985) apresentou o primeiro estudo tendo como base a utilização do cloreto cianúrico e seus derivados na síntese de amidas e ésteres, demonstrando que

a substituição parcial dos átomos de cloro do cloreto cianúrico por grupos metoxi ou fenoxi, como é o caso do 1,3,5-triazinas 2-cloro-4,6-substituídas (Figura 9), proporcionaram a formação de intermediários éster altamente reativos para ativação dos grupos carboxílicos, intermediários estes que quando tratados com álcoois ou aminas geraram seus respectivos ésteres e amidas correspondentes.

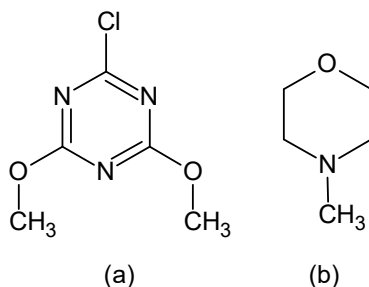
Figura 9. Estrutura molecular do 2-cloro-4,6-dissubstituído-1,3,5-triazina, sendo R e R¹ = OCH₃, OC₆H₅ respectivamente.



Fonte – Adaptado de Rydergren, 2013.

Dentre as triazinas, a 2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina (CDMT, ver Figura 10 a), que apresenta em sua estrutura dois átomos de cloro substituídos por grupos metoxi, possui maior eficiência de ativação de grupos carboxílicos e menor potencial de formação de subprodutos, como os cloretos de acilo (KAMINSKI, 1985). Este composto é utilizado em conjunto com uma amina terciária nestas reações, como exemplo a N-metilmorfolina (NMM, ver Figura 10 b) (KAMINSKI, PANETH, RUDZINSKI, 1998; KAMINSKI, 2000).

Figura 10. Estruturas moleculares do a) 2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazine (CDMT) e b) N-metilmorfolina (NMM).

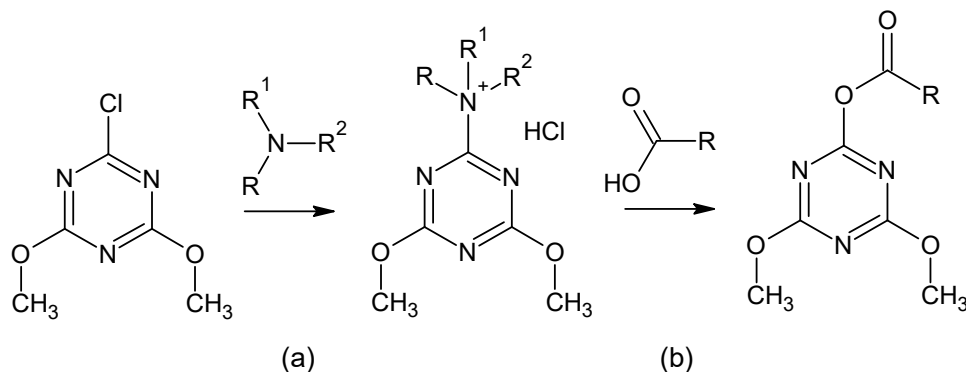


Fonte – Adaptado de Rydergren, 2013.

A ativação dos grupos carboxílicos por CDMT é realizada em dois passos, em um primeiro momento ocorre a formação de um sal de amônio quaternário por substituição do cloro presente no CDMT por uma amina terciária (Figura 11 a), o sal

de amônio formado substitui sua amina pelo íon carboxilato gerando assim um éster ativo intermediário de triazina (Figura 11 b) (KAMINSKI, 2000).

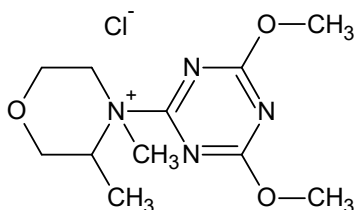
Figura 11. a) Reação entre CDMT e uma amina terciária e b) reação entre o sal de amônio quartenário de triazina e o grupo carboxílico formando o éster ativo.



Fonte – Adaptado de Rydergren, 2013.

O primeiro passo da reação de ativação dos grupos carboxílicos pode ser contornado partindo do 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfololol (DMTMM, ver Figura 12), reagente atóxico e solúvel em água originado da reação de um único passo de CDMT com NMM como apresentada por Kunishima e colabores (1999).

Figura 12. Estrutura molecular do DMTMM.



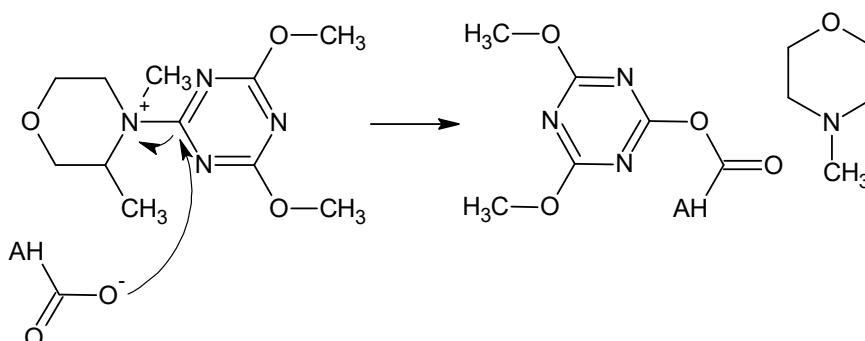
Fonte – Adaptado de Rydergren, 2013.

3.3.1.1. Mecanismo de reação de DMTMM

A amidação ativada por triazina em ácido hialurônico ocorre essencialmente em dois passos, o primeiro passo é a formação de um éster ativo (éster capaz de reagir de novo e formar amidas ou ésteres) por substituição aromática nucleofílica na triazina por um ácido carboxílico. O segundo passo é o ataque nucleofílico realizado pela amina (demonstrada aqui com o 1,2-dimiristoil fosfatidetanolamina de forma

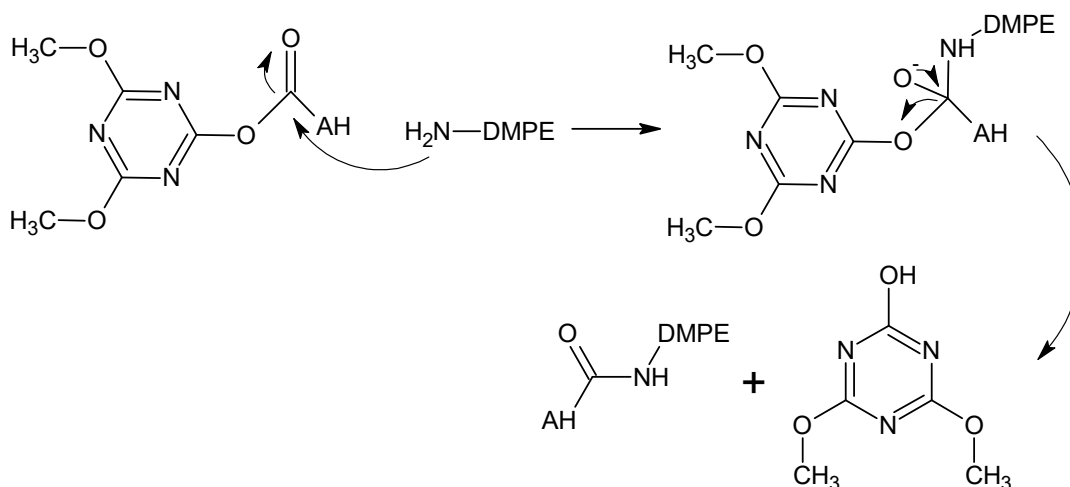
simplificada DMPE) sobre o carbono carboxílico ativado para formar uma ligação amida (MONTALBETTI, FALQUE, 2005; BONCEL, WALCZAK, 2009). Os passos mencionados estão apresentando na Figura 13 e 14 para o Passo 01 e 02 respectivamente.

Figura 13. Passo 01: Formação do éster ativo.



Fonte – Adaptado de Rydergren, 2013.

Figura 14. Passo 02: Formação da ligação amida.



Fonte – Adaptado de Rydergren, 2013.

Tanto quanto é do nosso conhecimento, não existem relatos na literatura de utilização da via de amidação com DMTMM em AH, utilizando fosfolipídios como amida, visando obter uma estrutura anfifílica, reação está que é proposta nesta dissertação. Trabalhos utilizando a rota convencional (EDC como ativadores carbodiimide) de amidação para derivatização do ácido hialurônico com 1,2-dimiristoil fosfatidetanolamina (DMPE) e 1,2-distearoil fosfatidetanolamina (DSPE) foram

realizados por Saadat et al. (2014^{1,2}), obtendo grau de derivatização de 10,2% e 8,1% respectivamente. Os AH derivatizados possibilitaram a incorporação de Paclitaxel na porção lipofílica das partículas obtidas por auto agregação do polímero derivatizado em meio aquoso.

4. MATERIAL E METODOLOGIAS

Este trabalho utilizou cinco etapas principais de processamento, com os seus respectivos materiais e metodologias descritos detalhadamente nos itens subsequentes:

4.1. PRECIPITAÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO

O Ácido Hialurônico (AH) comercial, utilizado como ponto de partida para este trabalho, apresentava-se na forma de solução 1% (m/v) com pureza de 83,78%, a etapa de precipitação com etanol foi aplicada com intuito de proporcionar incremento na pureza, uma vez que a metodologia empregada já apresenta resultados promissores descritos na literatura (CAVALCANTI et al., 2019).

4.1.1. Material

Solução 1% (m/v) de ácido hialurônico MM = 838 KDa e 83,78% de pureza obtido da Mapric Ltda. (Brasil), etanol absoluto (99.5%) obtido da Merck KGaA (Alemanha) e cloreto de sódio (NaCl) obtido da J.T. Baker® (Estados Unidos da América, EUA).

4.1.2. Procedimento de precipitação do AH

O processo de purificação do AH foi adaptado de Cavalcanti et al. (2019).

Em um reator com capacidade para 2 L, munido de agitação mecânica de 300 rpm e temperatura de 25 °C, foram adicionados 600 mL de solução 2,5 mg/mL de AH e 2,0 mol/L de NaCl em água MiliQ®. Com auxílio de um funil de adição foi adicionado etanol absoluto, de forma lenta para evitar formação de aglomerados, até concentração final de AH de 0,83 mg/mL, neste momento notou-se a turvação do meio. O meio reacional foi resfriado para 4 °C em 1 h, seguidos de agitação por 1 h a 4 °C. O precipitado foi então filtrado em membrana 0,45 µm com auxílio de vácuo em câmpula de N₂.

O AH resultante foi congelado a -60 °C, liofilizado e estocado em recipiente âmbar com atmosfera de N₂ a -5 °C até a sua utilização.

4.2. SÍNTESE DO 1,2-DIMIRISTOIL FOSFATIDETANOLAMINA DERIVATIZADO COM ÁCIDO HIALURÔNICO

O AH precipitado na etapa 4.1 deste trabalho foi utilizado como material de partida para síntese do DMPE-AH como apresentado a seguir.

4.2.1. Material

Ácido hialurônico precipitado na etapa 4.1 deste trabalho, 1,2-dimiristoil fosfatidetanolamina (DMPE) obtido da Lipoid (Alemanha), 2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina (CDMT), n-metilmorfolina (NMM), sal hemisódio de ácido 2-(N-Morfolino) etanossulfônico (MES sal hemisódio) obtidos da Sigma Aldrich (EUA), tetraidrofurano (THF) obtido da Merck (Alemanha) e etanol absoluto (99,5%) obtido da Merck KGaA (Alemanha).

4.2.2. Procedimento de Síntese do DMPE-AH

4.2.2.1. Síntese do ativador 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio (DMTMM)

A síntese do DMTMM foi realizada a partir de CDMT e NMM em THF por metodologia apresentada por Kunishima et al. (1999) com algumas modificações.

Em um reator com capacidade de 50 mL munido de agitação magnética, foram adicionadas 10 mL da solução 0,57 mol/L de CDMT em THF, a agitação e a temperatura do meio foram ajustadas para 500 rpm e 25 °C respectivamente. Com auxílio de um funil de adição foram adicionados lentamente ao meio reacional 0,89 mL de NMM (1 eq), notando-se a formação de um denso precipitado ainda durante a adição, precipitado este que é o DMTMM. A mistura reacional foi agitada por 30 min, seguidos de filtração em membrana 0,45 µm com auxílio de vácuo e lavagem do precipitado com 5 mL de THF. O sólido obtido foi macerado em 10 mL de THF, para retirada de possível material não reagido, em reator de 50 mL munido de agitação magnética de 500 rpm, temperatura de 25 °C por 30 min, seguidos de nova filtração

em membrana 0,45 μm com auxílio de vácuo e lavagem do precipitado com 5 mL de THF.

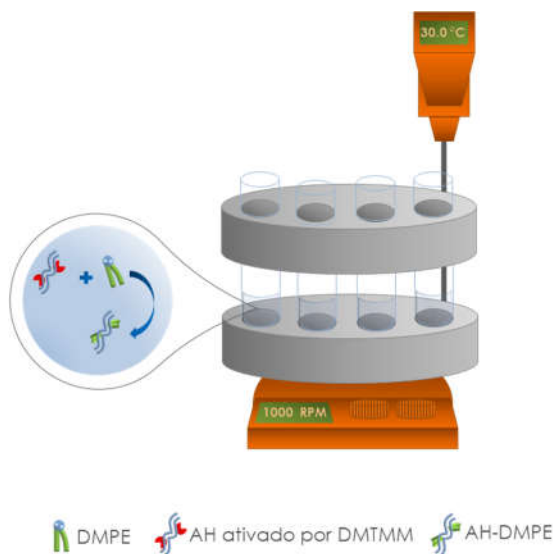
O DMTMM produzido foi seco em evaporador rotativo equipado com banho térmico a 25 °C até que o sólido apresentasse percentual de solvente menor que 0,5%, percentual este verificado em balança Termogravimétrica Mettler Toledo, Modelo HR83 Halogen com rampa de 25° até 105°C por 20 min. O DMTMM seco foi acondicionado em recipiente âmbar com atmosfera de N_2 a -5 °C até a sua utilização.

4.2.2.2. Síntese do DMPE derivatizado com AH (DMPE-AH)

Foi preparada solução de ácido hialurônico 0,2% (m/v) por dissolução do AH da etapa de Precipitação (4.1) em solução tampão de MES 100 mmolL^{-1} (pH = 7 ajustado com solução de 1 molL^{-1} de hidróxido de sódio, a solução foi filtrada em filtro 0,22 μm antes da utilização) em agitação magnética por 12 h a 20 °C na ausência de luz.

Inicialmente 10 mL de solução de AH (1 eq., 20 mg, 0,05 mM de grupos carboxílicos) foram adicionados a um reator de 20 mL munido de agitação magnética e sistema de aquecimento ajustados para 1000 rpm e 30 ± 2 °C respectivamente (Figura 15). Foram adicionadas 7,12 mg de DMTMM ao reator e o meio reacional foi mantido em agitação por 1 h para ativação dos grupos carboxílicos seguida de adição de solução de DMPE em etanol absoluto (16,989 mg de DMPE disperso em 1 mL de etanol absoluto, solubilizado a 65 °C em recipiente fechado para evitar evaporação do solvente e mantido em temperatura ambiente até a utilização em ultrassom marca UNIQUE 40 kHz), pH inicial do meio 7. O meio reacional foi mantido em agitação por 6 h (pH final = 7), seguidas de armazenamento em recipiente âmbar com atmosfera de N_2 a -60 °C e liofilização. As variáveis concentração de AH, pH e temperatura foram tomadas como 0,2%, 7 e 30 ± 2 °C respectivamente com base nos resultados apresentados por Rydergren (2013).

Figura 15. Esquema utilizado para realização das reações de derivatização do DMPE com AH.



O DMPE-AH obtido foi armazenado em recipiente âmbar com atmosfera de N_2 a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a sua utilização.

4.2.3. Purificação do DMPE-AH

A purificação do DMPE-AH obtido na etapa 4.2.2.2 foi realizada por diálise, visando eliminar materiais de partida que não reagiram, assim como o sal de MES utilizando como tampão e o subproduto da reação.

4.2.3.1. Material

DMPE-AH obtido na etapa 4.2.2.2, sacos de diálise cut-off de peso molecular de 12.000 – 16.000 Dalton e porosidade de 25 Å constituídos de celulose regenerada obtidos da INLAB (Brasil), etanol absoluto (99,5%) obtido da Merck KGaA (Alemanha), dióxido de hidrogênio ortofosfato de potássio obtido da J. T. Baker® (EUA), ácido sulfúrico, molibdato de amônio e peróxido de hidrogênio obtidos da Synth (Brasil) e ácido ascórbico obtido da Sigma Aldrich (EUA).

4.2.3.2. Purificação do DMPE-AH

O processo de diálise foi baseado no trabalho apresentado por Saadat et al. (2014) com algumas modificações.

Os pós liofilizados de DMPE-AH foram ressuspensos em 60 mL de água Mili Q® e acomodados em sacos de diálise mantidos em agitação constante em meio contendo 35 volumes de solução etanol absoluto/água ultrapura Mili Q® (30:70 v:v), (50:50 v:v), (70:30 v:v) e (0:100 v:v) respectivamente, sendo que permaneceram 24 h em cada solução a temperatura ambiente. O material dialisado foi então refrigerado a -60 °C e liofilizado para obtenção do DMPE-AH purificado.

4.2.3.3. Caracterizações do DMPE-AH purificado

O produto liofilizado após a purificação foi analisado por técnicas de Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier e Calorimetria Exploratória Diferencial e determinação do percentual de fósforo.

4.2.3.4. Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Visando identificar as alterações estruturais ocorridas no DMPE devido a reação de derivatização com ácido hialurônico a análise de FTIR foi efetuada. O sólido oriundo da liofilização foi analisado a temperatura ambiente na faixa de comprimento de onda de 650 – 4000 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} em equipamento Shimadzu IRAfinity-1S (Shimadzu Corporation, Japão).

4.2.3.5. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Aproximadamente 4 mg de amostra foram acondicionados em recipiente próprio de alumínio e aquecido até 250 °C com taxa de 5 °C/min e fluxo de nitrogênio de 80 mL/min em equipamento Mettler Toledo DSC (Mettler Toledo, EUA).

4.2.3.6. Determinação do Percentual de Fósforo

A determinação percentual de fósforo presente nas amostras foi realizada com o intuito de quantificar o percentual de DMPE acoplado por reação de amidação ao AH. A metodologia empregada foi baseada em Chen et al. (1956) com algumas modificações. Foi utilizada solução de dióxido de hidrogênio ortofosfato de potássio como padrão para construção da curva de calibração, solução de ácido hialurônico precipitado em água Mili Q® como branco (para evitar interferências de contaminantes de fósforo) e solução de DMPE-AH em água Mili Q® como solução amostra.

Inicialmente 0,45 mL de solução 4,5 molL⁻¹ de ácido sulfúrico em água foram adicionados em cada amostra seguidas de aquecimento até 200 – 215 °C por 15 min. As amostras foram retiradas do aquecimento, resfriadas por 5 min e em cada exemplar foram adicionados 0,15 mL de peróxido de hidrogênio livre de fósforo, retornando-os para aquecimento por 30 min (as soluções devem apresentar-se límpidas após os 30 min). Após aquecimento foram resfriadas até temperatura ambiente, adicionados 3,9 mL de água Mili Q® e 0,5 mL de solução 2.5% de molibdato de amônio em água Mili Q®, seguido de agitação em vortex para homogeneização do meio. Após homogeneização foram adicionados 0,5 mL de solução 10% de ácido ascórbico em água Mili Q® e a solução foi novamente homogeneizada em vortex. Os recipientes foram hermeticamente fechados e acondicionados em banho de água em ebulição por 7 min. Depois de resfriadas a temperatura ambiente foram realizadas leituras da absorbância das amostras no comprimento de onda de 820 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicada, excetuando-se as amostras de AH e DMPE que foram realizadas nove replicatas.

A quantificação do fósforo foi realizada por curva de calibração previamente construída ($R^2 = 0.99$, $n = 27$) (Eq. 1).

$$\text{Concentration of Phosphorous} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = 0.0013 \times \text{Abs}_{820\text{nm}} - 0.00005 \quad (\text{Eq. 1})$$

A diferença entre a quantidade de fósforo presente no DMPE-AH e AH precipitados foi comparada com a quantidade de fósforo teórica presente no AH caso todos os grupos carboxílicos (-COO-) fossem substituídos por moléculas de DMPE, esta proporção, em percentagem foi tomada como o grau de derivatização (GD%) do polímero. A Eq. 2 foi utilizada para esta finalidade.

$$GD\% = \frac{P(\text{DMPE-AH}) - P(\text{AH})}{P(\text{AH } 100\% \text{ Derivatizado})} \times 100\% \quad (\text{Eq. 2})$$

4.3. PRODUÇÃO DOS LIPOSSOMAS CONVENCIONAIS CONTENDO EXTRATO DE *PTERODON PUBESCENS* BENTH.

4.3.1. Material

Extrato padronizado de *Pterodon pubescens* Benth. doado pelo grupo de pesquisa da Prof. Dra. Mary Ann Foglio da FCF – Unicamp em associação com o CPQBA – UNICAMP, 1,2-dimiristoil fosfatidetanolamina (DMPE), L- α -fosfatidilcolina de ovo (EPC) obtidos da Lipoid (Alemanha), etanol absoluto (99,5%) obtido da Merck KGaA (Alemanha).

4.3.1.1. Identificação do extrato de *Pterodon pubescens* Benth.

A Tabela 1 apresenta os percentuais dos componentes cariofileno, humuleno, geranilgeraniol e dos compostos com estrutura de vouacapanos presentes no extrato de PpB. obtidos via cromatografia gasosa com detector por ionização de chama (CG-FID), coluna HP-5MS (30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m), temperatura do injetor de 240 °C, temperatura do detector de 300 °C, rampa de 100 °C, 5 °C/min, 175 °C, 10 °C/min.

Tabela 1. Percentuais dos componentes cariofileno, humuleno, geranilgeraniol e dos compostos com estrutura de vouacapanos presentes no extrato de PpB.

Compostos	Concentração %
Cariofileno	4,63 $\pm$ 0,15
Humuleno	1,00 $\pm$ 0,03
Geranilgeraniol	0,37 $\pm$ 0,06
Isômeros éster 6 α ,7 β oato de metila e acetoxi-7 β -hidroxivouacapano-17 β -oato de metila	14,61 $\pm$ 1,24
Éster 6 α ,7 β -dihidroxivouacapano-17 β -oato de metila	6,55 $\pm$ 0,81

4.3.2. Preparação dos lipossomas convencionais

4.3.2.1. Preparação dos lipossomas vazios

Os lipossomos foram preparados seguindo adaptação da metodologia de adição de solução lipídica em sistema com cisalhamento mecânico apresentada por Trevisan (2010) e Lopes et al. (2016) com algumas modificações.

Foi preparada solução estoque de lipídio EPC:DMPE (80:20 mol:mol) com concentração de 20 mmolL^{-1} em etanol absoluto por dissolução dos lipídios em etanol a $65 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (temperatura de transição de fase do DMPE $54 \text{ }^{\circ}\text{C}$) em sistema hermeticamente fechado para evitar perdas de solvente. A solução estoque foi mantida a $65 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e resfriada previamente a temperatura ambiente para utilização. Esta solução estoque foi adicionada lentamente por gotejamento em sistema contendo água Mili Q[®] mantida a $65 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ sob agitação por sistema UltraTurrax[®] de 24.000 rpm até concentração lipídica de 2 mmolL^{-1} , após adição o sistema foi mantida em agitação por 15 min, armazenado em tubo tipo Falcon e refrigerado a $8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 para conformação das estruturas. Estes lipossomos foram denominados “0% de extrato de PpB”.

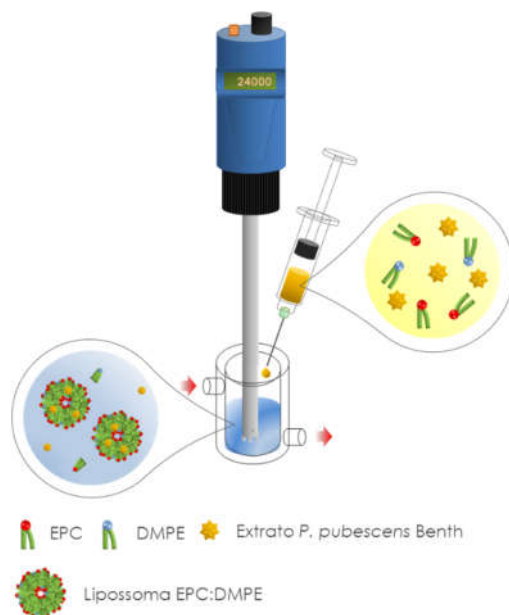
4.3.2.2. Preparação dos lipossomas contendo extrato de *Pteordon pubescens* Benth.

Foi utilizada a mesma solução estoque lipídica apresentada no tópico 4.3.2.1 (EPC:DMPE 80:20 mol:mol, 20 mmolL^{-1}). Uma suspensão alcoólica de extrato de PpB 40 mg/mL foi preparada por dispersão do extrato em etanol absoluto com auxílio do vortex, a suspensão obtida foi mantida em temperatura ambiente e previamente homogeneizada para o uso.

A solução estoque de lipídio foi dopada com a quantidade desejada de suspensão de PpB e homogeneizada em vortex até total solubilização, o procedimento subsequente de preparação dos lipossomas foi como descrito no item 4.3.2.1. Foram preparados lipossomas por adição de 10%, 20%, 30%, 40% e 50% (m/m) de extrato de PpB com relação a massa lipídica do meio.

O esquema da Figura 16 ilustra o sistema utilizado para obtenção dos lipossomas contendo ou não extrato de PpB.

Figura 16. Sistema utilizado para obtenção dos lipossomas contendo ou não extrato de PpB.



4.3.3. Caracterizações dos lipossomas convencionais

4.3.3.1. Eficiente e capacidade de encapsulação

Para determinação da eficiência (EE) e capacidade de encapsulação (CE) de extrato de PpB nos lipossomas, 20 mL da solução lipídica foram acondicionados em tubo de diálise *cut-off* de massa molecular de 3.500 Dalton constituído de celulose regenerada (Spectrum® – USA) e mantidos em homogeneização constante em meio contendo 20 volumes de solução 8:2 água:etanol (v:v) por 24 h. Após este período a solução dialisada foi congelada a -60 °C e liofilizada, o material liofilizado foi dissolvido em solução 7,05:2:0,05 água:etanol:Tween 80® (v:v) sob vigorosa agitação para clivagem das vesículas e filtrado em filtro seringa 0,22 µm. A quantificação do extrato de PpB foi realizada por técnica de espectroscopia UV/Vis a 220 nm em relação aos compostos vouacapanos 6 α ,7 β -diidroxivouacapano-17 β oato de metila (m/z 362), 6 α -hidroxi-7 β -acetoxivouacapano-17 β -oato de metila e 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapano-17 β oato de metila (isômeros de posição m/z 404), utilizando como referência curva de calibração previamente obtida para diferentes concentrações de extrato de sucupira, tendo como diluente solução 7,05:2:0,05 água:etanol:Tween 80® (v:v) ($R^2 = 0,98$, $n = 3$) (Eq. 3).

$$\text{Concentration of Sucupira extract} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = 0.7637 \times \text{Abs}_{219\text{nm}} - 2.2439 \quad (\text{Eq. 3})$$

A EE foi calculada como o percentual de extrato de PpB presente nos lipossomas após a diálise em relação ao percentual inicial adicionado utilizando a Equação 4.

$$EE(\%) = 100 \times (C_f/C_i) \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde C_f é a concentração de extrato de PpB presente nos lipossomas após a diálise e C_i a concentração de extrato inicial.

A CE foi calculada como o percentual de extrato de PpB presente nos lipossomas após a diálise em relação a concentração de lipídios presente na solução utilizando a Equação 5.

$$CE(\%) = 100 \times (C_f/C_l) \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde C_l é a concentração de lipídeos presentes na solução.

4.3.3.2. Diâmetro, polidispersividade e potencial *zeta*

O diâmetro hidrodinâmico médio (expresso em valores de *z-average*), o índice de polidispersividade (PDI) e o potencial *zeta* dos lipossomas contendo ou não extrato de PpB foi analisado por método de dispersão de luz dinâmica DLS (*Dynamic Light Scattering*) em equipamento Zetasizer ZS (Malvern – Reino Unido) com detector em ângulo fixo de 90 ° em temperatura de 25 °C. O potencial *zeta* foi medido ajustando a condutividade para 50 µS/cm. As análises foram realizadas pelo software incluído no equipamento que utiliza a equação de Stokes-Einstein para diâmetro hidrodinâmico e a equação de Helmholtz-Smoluchowski para o cálculo da mobilidade eletroforética. Os resultados foram expressos em valores médio (*Z-average*), índice de polidispersividade (PDI) e potencial *zeta*. Todas as amostras foram analisadas em no mínimo triplicata e sem necessidade de diluições prévias.

4.3.3.3. Elasticidade dos lipossomas

O procedimento utilizado para avaliar a capacidade de permeação dos lipossomas produzidos foi adaptado de Trotta et al. (2003), Oliveira (2007) e Zanchetta (2009).

As soluções lipossomais foram extrudadas em extrusora de aço inox aquecida a 37 °C por circulação de água (modelo T.001, Lipex Biomembranes Inc.), para simular a temperatura corpórea, e equipada com duas membranas de policarbonato (Poretic Products, USA) sobrepostas (para simular as tortuosidades da pele) com diâmetro de poro de 30 nm (aproximadamente a porosidade da pele) a uma pressão de 2,5 atm (pressão transepidermal). A elasticidade foi avaliada pela capacidade dos lipossomas de regressar à estrutura original após uma única passagem pelo sistema. Medida do diâmetro hidrodinâmico médio, polidispersividade, potencial *zeta* e concentração de fosfato foram realizadas antes e depois da permeação através das membranas.

4.3.3.4. Estabilidade de armazenamento

A estabilidade dos lipossomas desenvolvidos foi avaliada pela manutenção do tamanho médio das partículas (em valores de z-average), o PDI e potencial *zeta* armazenados em sistemas fechados a 8 °C, valores estes que foram analisados em diferentes períodos de tempo após a obtenção.

4.4. PRODUÇÃO DOS LIPOSSOMAS COM SUPERFÍCIE MODIFICADA CONTENDO EXTRATO DE *PTERODON PUBESCENS* BENTH.

4.4.1. Material

DMPE-AH, extrato padronizado de *Pterodon pubescens* Benth (CPQBA – UNICAMP), 1,2-dimiristoil fosfatidetanolamina (DMPE), L- α -fosfatidilcolina de ovo (EPC) obtidos da Lipoid (Alemanha), etanol absoluto (99.5%) obtido da Merck KGaA (Alemanha).

4.4.2. Preparação dos lipossomas com superfície modificada

4.4.2.1. Lipossomas EPC:DMPE:DMPE-AH

Foi preparada solução estoque de lipídio EPC:DMPE (80:20 mol:mol, 20 mmolL⁻¹) em etanol absoluto conforme apresentado no tópico 4.3.2.1. Para a preparação da solução estoque de AH-DMPE 6 mg/mL o sólido liofilizado foi disperso em solução água Mili Q[®]:etanol absoluto 1:0,1 com auxílio do UltraTurrax[®] 24.000 rpm por 15 min a temperatura de 65 $\pm$ 2 °C. A solução estoque de lipídio foi adicionada lentamente por gotejamento em sistema contendo água Mili Q[®] e a quantidade desejada de solução estoque DMPE-AH mantida a 65 $\pm$ 2 °C sob agitação por sistema UltraTurrax[®] de 24.000 rpm até concentração lipídica de 2 mmolL⁻¹, após adição o sistema foi mantido em agitação por 15 min, armazenado em tubo tipo Falcon e refrigerado a 8 °C por 24 para conformação das estrutura. Inicialmente foram obtidos lipossomas com concentrações de 5%, 10%, 15%, 20% e 25% (m/m) de DMPE-AH em relação a massa de lipídio total do meio.

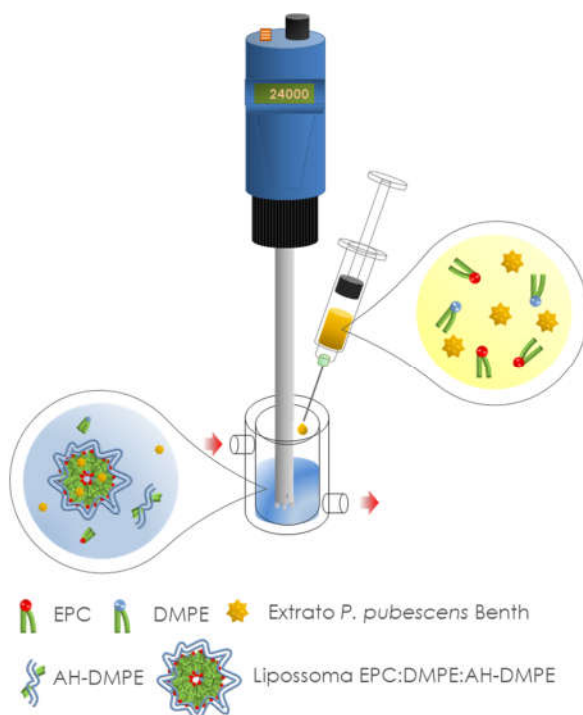
4.4.2.2. Lipossomas EPC:DMPE:DMPE-AH+*Pterodon pubescens* Benth.

Foi utilizada a mesma solução estoque lipídica apresentada no tópico 4.3.2.1 (EPC:DMPE 80:20 mol:mol, 20 mmolL⁻¹) assim como a solução estoque de DMPE-AH (6 mg/mL) e de extrato de PpB apresentada no tópico 4.4.2.1.

A solução estoque de lipídio foi dopada com a quantidade desejada de suspensão estoque de PpB, homogeneizada em vortex até total solubilização, o procedimento subsequente de preparação dos lipossomas foi como descrito no item 4.4.2.1. Inicialmente foram obtidos lipossomas com concentrações de 5%, 10%, 15%, 20% e 25% (m/m) de DMPE-AH em relação a massa de lipídio do meio, contendo 50% (m/m) de extrato de PpB com relação a massa total de material anfifílico (EPC:DMPE:DMPE-AH).

O esquema da Figura 17 apresenta o sistema utilizado para obtenção dos lipossomas com e sem extrato de PpB.

Figura 17. Sistema utilizado para obtenção dos lipossomas contendo ou não extrato de PpB.



4.4.3. Caracterizações

Os lipossomas foram avaliados quanto a eficiência e capacidade de encapsulação, as características da partícula, elasticidade e estabilidade de armazenamento tal qual metodologia de análise apresentada nos tópicos 4.3.3.1, 4.3.3.2, 4.3.3.3 e 4.3.3.4 respectivamente.

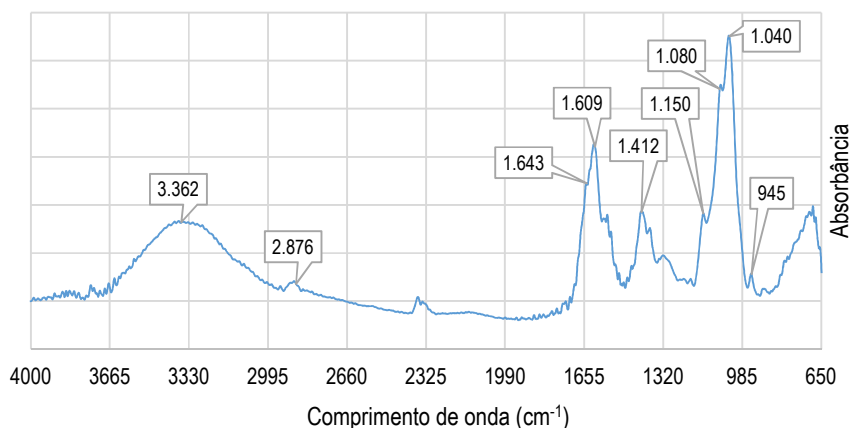
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. SÍNTESE DO 1,2-DIMIRISTOIL FOSFATIDETANOLAMINA DERIVATIZADO COM ÁCIDO HIALURÔNICO

5.1.1. Espectros na Região de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) do DMPE-AH

Na Figura 18 observa-se o espectro do AH precipitado utilizado na síntese do DMPE-AH.

Figura 18. Espectro de FTIR do AH precipitado utilizado na síntese do DMPE-AH.



O espectro de AH obtido está de acordo com os apresentados por Shimojo, (2011) e Reddy, Karunakaran, (2013), onde foram observadas bandas vibracionais nos comprimentos de onda de:

945 – 1150 cm^{-1} : vibrações de estiramentos dos grupos C-OH dos álcoois; em 1150 cm^{-1} (ombro) relativa as vibrações das ligações C-O-C antissimétricas dos grupos glicosídicos;

1412 cm^{-1} : vibrações correspondentes as ligações C=O e C-O⁻ do grupo carboxilato simétrico COO⁻;

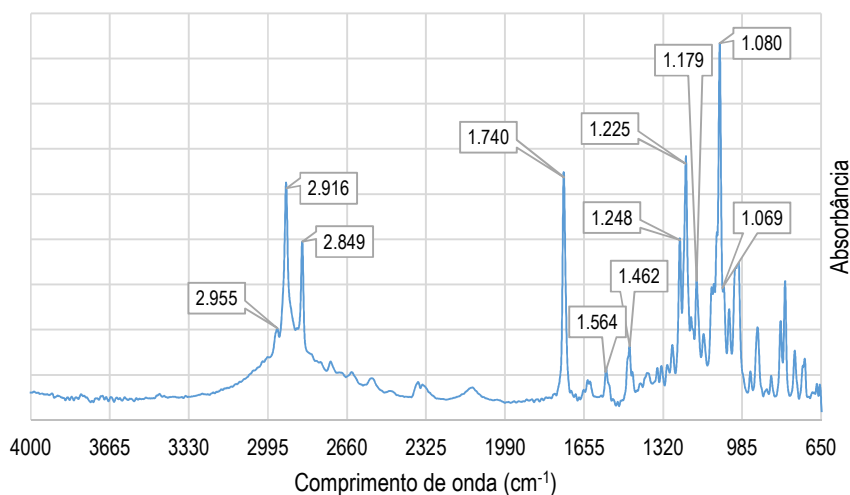
1500 – 1700 cm^{-1} : vibrações dos grupos amina I e II, assim como dos grupos carbonila e carboxila (C=O);

2876 cm^{-1} : estiramentos das ligações CH;

2500 – 3600 cm^{-1} : estiramentos dos grupos NH e OH .

A Figura 19 apresenta o espectro vibracional do DMPE puro.

Figura 19. Espectro de FTIR do DMPE utilizado na síntese do DMPE-AH.



A amostra analisada condiz com as bandas vibracionais apresentadas por Deleu et al., (2014) para um fosfolipídio, sendo elas:

1069 cm^{-1} : ligações do tipo O-P-O ;

1080 cm^{-1} : estiramento simétrico do grupo PO_2^- ;

1179 cm^{-1} : estiramento da ligação C-O .

1225 – 1248 cm^{-1} : estiramento assimétrico do grupo PO_2^- ;

1462 cm^{-1} : vibração das ligações CH_2 ;

1564 cm^{-1} : vibração do grupo amina I;

1742 cm^{-1} : estiramento do grupo C=O do éster;

2849 – 2916 – 2955 cm^{-1} : estiramento dos grupos CH_2 simétrico e assimétrico e CH_3 assimétrico respectivamente.

Na Figura 20 encontra-se o espectro obtido por FTIR do DMPE-AH purificado.

Figura 20. Espectro obtido por FTIR do DMPE-AH purificado.



Observam-se vibrações nos comprimentos de onda de:

945 – 1150 cm⁻¹: vibrações de estiramentos dos grupos C-OH dos álcoois; em 1053 cm⁻¹ ligações do tipo O-P-O, 1101 cm⁻¹, estiramento simétrico do grupo PO₂- e 1142 cm⁻¹ (ombro) relativa as vibrações das ligações C-O-C antissimétricas dos grupos glicosídicos;

1263 cm⁻¹: estiramento assimétrico do grupo PO₂-;

1412 cm⁻¹: vibrações correspondentes as ligações C=O e C-O- do grupo carboxilato simétrico COO⁻;

1500 – 1700 cm⁻¹: vibrações dos grupos amina I e II, assim como dos grupos carbonila e carboxila (C=O);

2876 cm⁻¹: estiramentos das ligações CH₂;

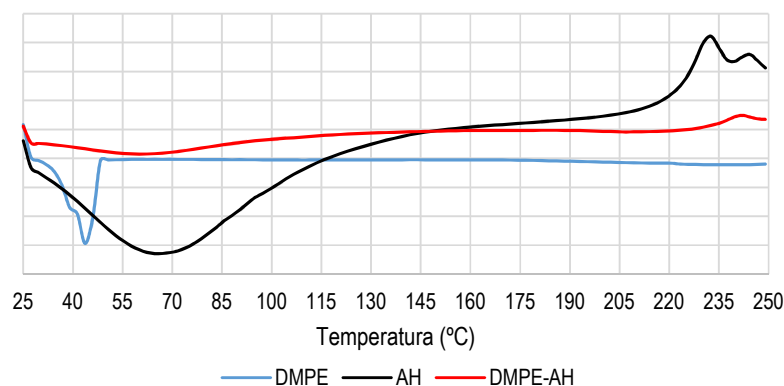
2500 – 3600 cm⁻¹: estiramentos dos grupos NH e OH.

As novas vibrações presentes no esqueleto de ácido hialurônico em 1053, 1101 e 1263 cm⁻¹, que evidenciam vibrações correspondentes a ligações do tipo P-O, são decorrentes da derivatização, uma vez que estas ligações são características do DMPE e ausentes no AH, comprovando a formação do DMPE-AH.

5.1.2. Termogramas de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) do DMPE-AH

A Figura 21 apresenta os termogramas ácido hialurônico, DMPE e do DMPE-AH sintetizado.

Figura 21. Termogramas dos materiais de partida DMPE, AH e do DMPE-AH sintetizados.



Observa-se para o termograma do AH a presença de um pico endotérmico em 65 °C relacionado a perda de água da amostra e dois picos exotérmicos em 230 °C e 240 °C relacionados a degradação térmica do polímero. A amostra de DMPE apresentou um pico endotérmico 44,76 °C relacionado a sua temperatura de transição de fase.

Observa-se no termograma de DMPE-AH a presença de um pico endotérmico em 60 °C, correspondente a perda de água pelo material, seguido de pico exotérmico, em 242 °C correspondente a sua degradação. A ausência do pico endotérmico característico do DMPE em 44,76 °C e do pico exotérmico presente no AH puro em 230 °C, no DMPE-AH, evidenciam uma diferenciação térmica entre o mesmo e seus materiais de partida, que em conjunto com os dados obtidos por FTIR, confirmam a ocorrência de derivatização.

5.1.2.1. Grau de derivatização

O grau de derivatização obtido foi de $41,29 \pm 0,02\%$ dos grupos carboxílicos presentes no AH substituídos por DMPE, vale salientar que o experimento desenvolvido para derivatização do DMPE tinha interesse a derivatização de 50.00%

dos grupos carboxílicos do AH, desta forma, foi possível derivatizar 82,64% do total teórico previsto.

Saadat et al. (2014) apresentaram pela primeira vez a obtenção de DMPE-AH via reação mediada pela carbodiimida EDC na presença de NHS, partindo de um meio com excesso molar de dois para o EDC e NHS e cinco para o DMPE a uma temperatura de 50 °C, obtendo um GD% de 10,2% do total teórico ideal. Este valor de GD% é aproximadamente 8,00 vezes menor que o obtido neste trabalho utilizando o DMTMM como ativador dos grupos carboxílicos, além disto a reação mediada por DMTMM não necessitou da utilização de reagentes em excesso e temperaturas elevadas.

Mojarralli (2011) atribui a baixa derivatização do AH por ativação por carbodiimide EDC na presença de NHS a inespecificidade da reação na formação do DMPE-AH, que gera, de forma incontrollável, o intermediário não reativo N-acilurea, tornando esta rota de amidação não adequada para o acoplamento de aminas primária a estrutura do AH. D'Este et al. (2014) investigaram a reação de amidação via EDC/NHS e realizaram um comparativo com as ativadas por DMTMM na presença de diferentes aminas, observando a superioridade das reações carreadas com DMTMM em relação as por EDC/NHS no GD% final do AH, assim como em parâmetros de processo como por exemplo, a ausência de correção do pH do longo da reação (correção esta que é inevitável para as reação com EDC/NHS mesmo na presença de tampões), de excessos de ativadores e a reprodutibilidade da reação, fator este de importância por fornecer indicativos do possível escalonamento do processo.

O DMPE-AH purificado e caracterizado foi utilizado nas metodologias apresentadas no tópico 4.4.

5.3. LIPOSSOMAS CONVENCIONAIS CONTENDO EXTRATO DE *PTERODON PUBESCENS* BENTH.

As soluções lipossomais com $2,00 \text{ mmolL}^{-1}$ de EPC:DMPE (80:20) obtidas com 10%, 20%, 30%, 40% e 50% de extrato de *Pterodon pubescens* Benth. (percentual relacionado a massa de lipídio) apresentaram-se, após 12 h de fabricação estocadas a 8°C , sem a presença de segunda fase, indicando que a encapsulação do extrato nas condições descritas neste trabalho foi eficiente (Figura 22).

Figura 22. Soluções lipossomais a $2,00 \text{ mmolL}^{-1}$ obtidas com (da direita para esquerda), 10, 20, 30, 40 e 50% de extrato de PpB.



5.3.1. Eficiência e capacidade de encapsulação

A estabilidade dos lipossomas na solução de diálise foi avaliada de forma prévia, uma vez que neste ensaio tem-se como objetivo a retirada apenas do extrato de PpB não incorporado aos lipossomas sem que ocorra a lise das partículas. Para esta finalidade, a solução controle de lipossomas foi incubada no meio de diálise por 24 h, tendo suas propriedades mensuradas antes e após o ensaio. A Tabela 2 apresenta os valores de diâmetro médio (expresso em *z-average*), PDI e potencial zeta, para os lipossomas controle antes e após terem sido incubados no meio de diálise.

Tabela 2. Tamanho médio (expresso em *z-average*), PDI e potencial *zeta* dos lipossomas controle antes e após a o ensaio de estabilidade no meio de diálise.

	<i>Z-Average</i> (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
Inicial	115,5 ± 1,41	0,22 ± 0,01	-7,93 ± 0,14
Após diálise	115,2 ± 2,12	0,23 ± 0,01	-7,66 ± 0,06

Todas as propriedades avaliadas nos lipossomas, diâmetro médio, PDI e potencial *zeta*, apresentaram-se estatisticamente estáveis ($p > 0,05$) após 24 h de incubação, indicando assim que o meio de diálise é susceptível para realização do ensaio sem que ocorra lise das partículas.

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos para eficiência (EE) e capacidade (CE) de encapsulação dos lipossomas convencionais obtidos com até 50% de extrato de sucupira.

Tabela 3. Eficiência e capacidade de encapsulação dos lipossomas convencionais obtidos com até 50% de extrato de sucupira.

Razão % (Extrato/Lipídio)	EE (%)	CE (%)
10%*	81,23 ± 8,26	7,30 ± 1,35
20%	89,96 ± 3,80	17,99 ± 0,76
30%	92,41 ± 2,65	27,72 ± 0,79
40%	85,84 ± 2,32	34,33 ± 0,93
50%	71,26 ± 3,54	35,63 ± 1,77

*Os valores de EE e CE para os lipossomas com 10% de extrato de PpB. foram obtidos por dados de regressão, uma vez que o percentual de extrato encontra-se abaixo do limite de detecção do método empregado.

Observa-se na Tabela 3 a ocorrência de redução na EE após 30% de extrato de PpB., fato este que está relacionado com a estabilização na CE observada a partir deste mesmo ponto, indicando que a EE apresenta esta redução devido a carga limite de extrato de PpB suportada pela partícula, carga esta, de 34,98% (média das cargas obtidas para as soluções com 40 e 50% de extrato de PpB).

Em média, quando se está abaixo da carga máxima de encapsulação, apenas 2,33% do extrato de PpB. não é encapsulado nas partículas, indicando assim que não são necessários excessos de extrato de PpB superiores a 2,33% da carga limite para obtenção de soluções lipossomais carregadas com aproximadamente 35% de extrato.

5.3.2. Propriedades dos lipossomas convencionais

Após 24 h de preparo e estocagem a 8 °C, as medidas do diâmetro hidrodinâmico médio das partículas, polidispersividade assim como do potencial *zeta* foram realizadas nas soluções lipossomais. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Tamanho médio (expresso em *z-average*), PDI e potencial *zeta* dos lipossomas obtidos.

<i>Razão % (Extrato/Lipídio)</i>	<i>Z-Average (nm)</i>	<i>PDI</i>	<i>Potencial Zeta (mV)</i>
0%	114,43 ± 3,50	0,23 ± 0,01	-7,93 ± 0,34
10%	137,33 ± 2,74	0,21 ± 0,01	-10,37 ± 0,54
20%	160,27 ± 3,60	0,20 ± 0,00	-9,59 ± 0,36
30%	214,73 ± 1,36	0,25 ± 0,01	-20,97 ± 0,28
40%	205,87 ± 5,20	0,21 ± 0,01	-22,17 ± 0,28
50%	209,80 ± 2,39	0,24 ± 0,02	-20,47 ± 0,21

Fonte – Próprio autor.

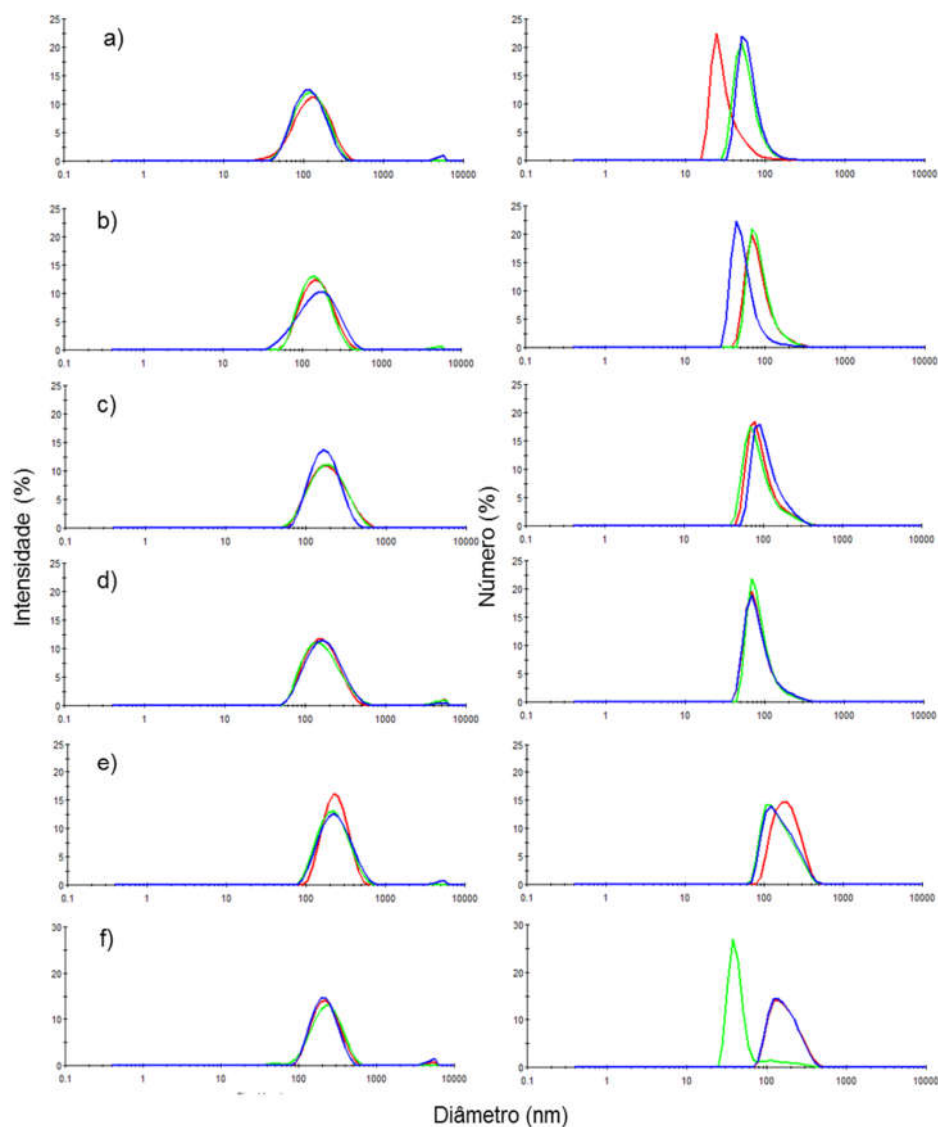
Observa-se na Tabela 4 que os lipossomas obtidos sem adição de extrato de PpB apresentaram diâmetro médio de 114,43 ± 3,50 nm, diâmetro este que sofre incremento significativo (valor de $p < 0,05$) até adição de 30% de extrato de PpB. Após 30% de adição, o diâmetro médio torna-se estatisticamente constante (valor de $p > 0,05$) até o máximo valor de adição de extrato (50%). Comportamento semelhante é observado para o potencial *zeta*, em escala inversa, onde os valores decrescem até 20% de carga de extrato, e mantem-se visualmente constantes, porém não estatisticamente ($p < 0,05$), entre 30 e 50% de carga. Os valores de PDI demonstram que as partículas obtidas são moderadamente polidispersas (MALVERN, 2014), e estatisticamente diferentes quanto ao percentual do extrato incorporado ($p < 0,05$), porém sempre menores 0,25.

A existência do patamar de crescimento dos lipossomas (entre 30% e 50% de extrato) está relacionado a saturação da sua porção lipofílica por extrato de PpB, corroborando com os resultados obtidos para capacidade de encapsulação, onde a CE limite observada foi de 34,98%.

A Figura 23 apresenta os espectros de DLS em termos das distribuições populacionais para o diâmetro (d) em termos de intensidade (I), $I \times d^6$, e número (N), $N \times d$. Como observado, ambas as distribuições são predominantemente unimodais,

apresentando PDI inferior a 0,25. As distribuições de intensidade apresentam deslocamento para diâmetros superiores relacionados ao aumento da carga do extrato. As distribuições numéricas apresentam diâmetros predominantemente em torno de 100 nm. Diâmetros inferiores podem ser observados para os lipossomas vazios, enquanto diâmetros mais altos são vistos para as amostras com 50% de extrato/lipídio, o que podem indicar a presença de outros agregados.

Figura 23. Distribuições populacionais em intensidade (lateral esquerda) e número (lateral direita) para os lipossomas com a) 0%, b) 10%, c) 20%, d) 30%, e) 40% e f) 50% de extrato de PpB.



5.3.3. Elasticidade dos lipossomas

O ensaio de elasticidade dos lipossomas teve como finalidade verificar se os lipossomas desenvolvidos são capazes de transpassar barreiras que mimetizam a estrutura do extrato córneo.

A Tabela 5 apresenta os lipossomas utilizados no ensaio antes de serem submetidos a extrusão.

Tabela 5. Diâmetro médio (expressos em z-avarege), PDI e potencial *zeta* dos lipossomas antes de serem submetidos ao ensaio de permeação in vitro.

Razão % (Extrato/Lipídio+AH-DMPE)	Z-Avarege (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
0%	102,7 ± 1,31	0,28 ± 0,01	-21,03 ± 0,66
10%	137,77 ± 1,17	0,29 ± 0,02	-24,07 ± 0,79
20%	156,53 ± 0,82	0,19 ± 0,01	-28,13 ± 1,16
30%	230,27 ± 4,30	0,31 ± 0,01	-18,37 ± 0,69
40%	208,9 ± 1,10	0,26 ± 0,02	-25,50 ± 0,35
50%	210,2 ± 1,46	0,25 ± 0,01	-20,60 ± 1,37

Todas as formulações lipossomais desenvolvidas foram submetidas ao ensaio de permeação. A manutenção do diâmetro médio, polidispersividade e potencial *zeta*, em conjunto com o percentual de fósforo passante pela membrana, foram utilizados como parâmetros que identifiquem a capacidade do lipossoma de sofrer deformação sem que ocorra a sua desestruturação.

A Tabela 6 apresenta os resultados do diâmetro médio, polidispersividade, potencial *zeta* e percentual de fósforo passante pela membrana das amostras após serem submetidas ao ensaio de permeação.

Tabela 6. Diâmetro médio (expressos em z-avarege), PDI, potencial *zeta* e percentual de fósforo passante pela membrana para os lipossomas após terem sido submetidos ao ensaio de permeação in vitro.

Razão % (Extrato/Lipídio+AH-DMPE)	Z-Avarege (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Fósforo %
0%	95,04 ± 1,29	0,31 ± 0,03	-19,77 ± 0,33	71,57 ± 1,50
10%	137,45 ± 0,96	0,28 ± 0,02	-22,93 ± 1,19	83,12 ± 1,75
20%	164,83 ± 3,22	0,16 ± 0,02	-20,20 ± 0,42	81,62 ± 1,01
30%	219,17 ± 3,22	0,26 ± 0,02	-17,43 ± 0,56	86,90 ± 2,05
40%	210,5 ± 1,01	0,22 ± 0,02	-26,45 ± 0,37	85,2 ± 1,62
50%	205,2 ± 1,06	0,23 ± 0,01	-23,80 ± 0,47	86,35 ± 2,13

Apenas os lipossomas controle (EPC:DMPE 80:20) apresentaram variação significativa quanto ao diâmetro das partículas (valor de $p < 0,05$), para as formulações com extrato de PpB o maior desvio observado foi de 5,3% que ocorreu na amostra com 20% de extrato de PpB, entretanto, este desvio não é estatisticamente significativo. Quanto aos valores de potencial *zeta*, as amostras com 20% e 50% de carga apresentaram variações significativa, tendo a formulação com 20% de extrato apresentando aumento no valor do potencial *zeta* de 28,19% e a formulação com 50% de extrato diminuição de 15,53%, indicando uma reestruturação da membrana, as demais soluções não apresentaram variação significativa para esta propriedade (valor de $p > 0,05$). Para o PDI, verificou-se que a amostra controle foi a única que apresentou aumento estatisticamente significativo (valor de $p < 0,05$), aumento este de 10,71% em relação as amostras antes do ensaio. Este aumento, associado a variação significativa do diâmetro médio, nos leva a crer que as amostras controle sofreram certa desestruturaram ao passarem pelos poros da membrana. As demais soluções, excetuando-se a com 10% de extrato de PpB. apresentaram variação significativa para o valor de PDI, porém estas variações atuaram na diminuição deste valor em até 16,13%.

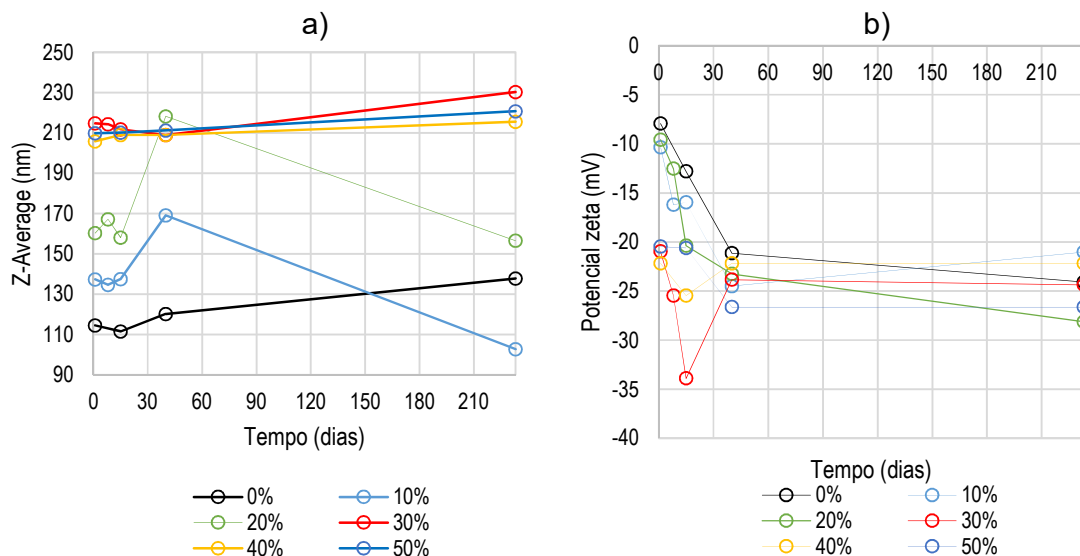
Com relação ao percentual de fósforo passante, verifica-se que, em média, os lipossomas contendo extrato de PpB, em quaisquer proporções, apresentam percentual de fósforo passante 13,1% maior que as amostras controle (vale salientar que as amostras a partir de 30% de extrato de PpB apresentam diâmetro médio 2,1x maior que os lipossomas controle), levando-nos a crer que a presença do extrato no interior da bicamada lipídica torna as partículas mais deformáveis, o que proporciona menores desestruturações na sua estrutura quando extrudada pelos poros da membrana, aumentando assim sua susceptibilidade para aplicação transdérmica.

5.3.4. Estabilidade em armazenamento dos lipossomas convencionais

A estabilidade dos lipossomas convencionais foi avaliada por até 233 dias de estocagem a 8 °C em recipiente fechado, tendo as amostras preservado sua aparência ausente de precipitados.

Na Figura 24 observam-se os gráficos de evolução ao longo das medições do diâmetro médio das partículas (expresso em *z-average*, ver Figura 24 a) e potencial *zeta* (Figura 24 b) até 233 dias de acompanhamento.

Figura 24. Gráficos de evolução do a) diâmetro médio das partículas (expresso em *z-average*) e b) potencial zeta ao longo dos 233 dias de acompanhamento de estabilidade.



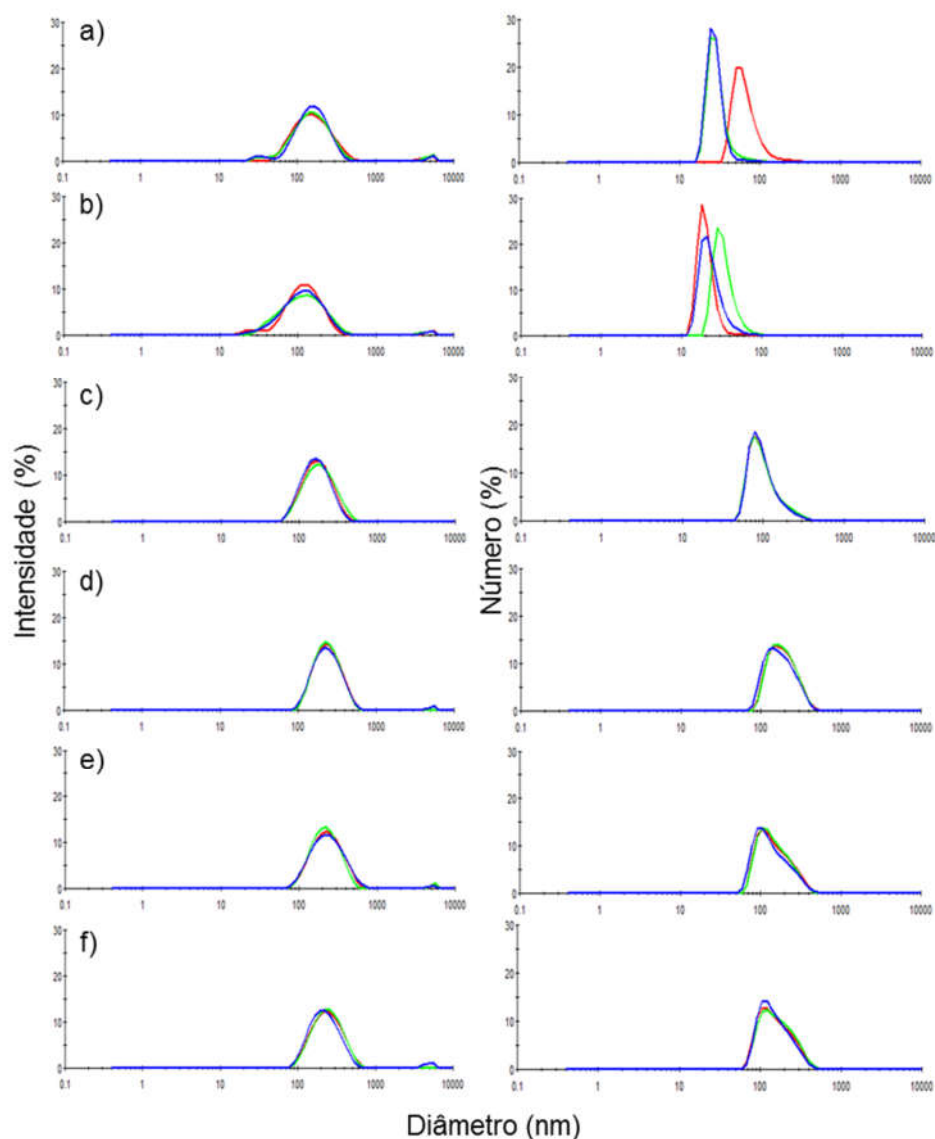
Para os primeiros 40 dias de estabilidade, as amostras controle (0% de extrato de PpB), 30%, 40% e 50% mantiveram seu diâmetro médio estatisticamente semelhante durante o período de estocagem (valor de $p > 0,05$), já as amostras com 10% e 20% apresentaram desvio estatisticamente significativo no seu diâmetro médio (valor de $p < 0,05$), desvio este menor que 6% do *z-average*. Os valores de potencial zeta apresentaram variação estatística significativa para todas as amostras estudadas, tendo as mesmas apresentado diminuição do potencial em até 62% do seu valor inicial (valores de $p < 0,05$), indicando um aumento da estabilidade das amostras neste período. O PDI das amostras não apresentou variação estatística significativa.

Após 233 dias de estabilidade, em comparação com as amostras iniciais, os lipossomas das formulações com 20% e 40% de extrato de PpB mantiveram seu diâmetro médio estatisticamente semelhantes (valor de $p > 0,05$), já as amostras controle, 10%, 30% e 50% apresentaram desvio estatisticamente significativo em seu diâmetro médio (valor de $p < 0,05$), desvio este inferior a 6% (do *z-average*) para as amostras 30% e 50% e de até 25,22% (do *z-average*) para as amostras controle e 10%. As amostras 30% e 40% apresentaram variação não significativa quando ao valor de potencial zeta medido (valor de $p > 0,05$), já as demais amostras, controle, 10%, 20% e 50% apresentaram variação significativa quanto ao potencial zeta (valor de $p < 0,05$). Para os valores de PDI, apenas as amostras controle e 10% apresentaram variações significativas (valor de $p < 0,05$), variações estas de até

33,33%, as demais amostras, 20%, 30%, 40% e 50% não apresentaram variações significativas (valor de $p > 0,05$) indicando que estas amostras mantiveram sua homogeneidade de tamanho de partículas ao longo do tempo de estocagem estatisticamente semelhante a apresentada no 1º dia.

A Figura 25 apresenta os resultados de diâmetro médio em gráficos de distribuições populacionais em intensidade (ver Figura 25, lateral esquerda) e número (ver Figura 25, lateral direita) para as amostras após 233 dias de estabilidade.

Figura 25. Distribuições populacionais em intensidade (lateral esquerda) e número (lateral direita) para os lipossomos com a) 0%, b) 10%, c) 20%, d) 30%, e) 40% e c) 50% de extrato de PpB pós 233 dias de estabilidade.



As distribuições, tanto em intensidade como em número, do diâmetro médio dos lipossomas apresentados na Figura 25 são majoritariamente unimodais, para todas as proporções de lípido:extrato desenvolvidas, e semelhantes aos apresentados para os lipossomas 24 h após o preparo, evidenciando assim a estabilidade da solução lipossomal até 233 dias.

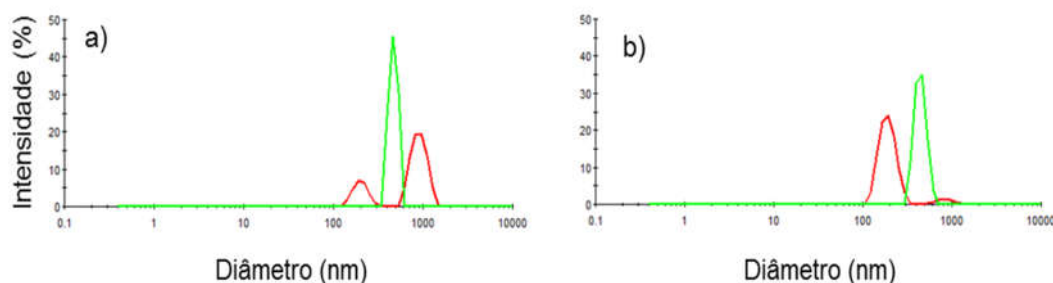
O ponto extremo de carga de extrato (50%) foi escolhido para teste no desenvolvimento dos lipossomas com superfície modificada.

5.4. LIPOSSOMAS COM SUPERFÍCIE MODIFICADA CONTENDO EXTRATO DE *PTERODON PUBESCENS* BENTH.

Como amostra “branco” a solução estoque de DMPE-AH 6 mg/mL, após estocagem a 8 °C por 24 h, foi diluída para 10 volumes em água MiliQ® e analisada por técnica de DLS com a finalidade de verificar a possível formação de partículas, uma vez que o DMPE-AH apresenta perfil anfifílico. A análise apresentou partículas de DMPE-AH com diâmetro médio (expresso por *z-average*) de $1090,00 \pm 29,50$ nm e potencial *zeta* de $47,00 \pm 1,69$ mV, a formação destas partículas comprova que a reação de amidação ativada por DMTMM foi eficiente na ligação covalente de moléculas de DMPE ao esqueleto polimérico do AH. Saadat et al (2014^{1,2}) também obtiveram partículas por dispersão do DMPE derivativizado com AH em meio aquoso sem a necessidade de adição de outras moléculas anfifílicas. O índice de polidispersividade das partículas obtidas indicam alta polidispersividade ($PDI = 0,75 \pm 0,69$).

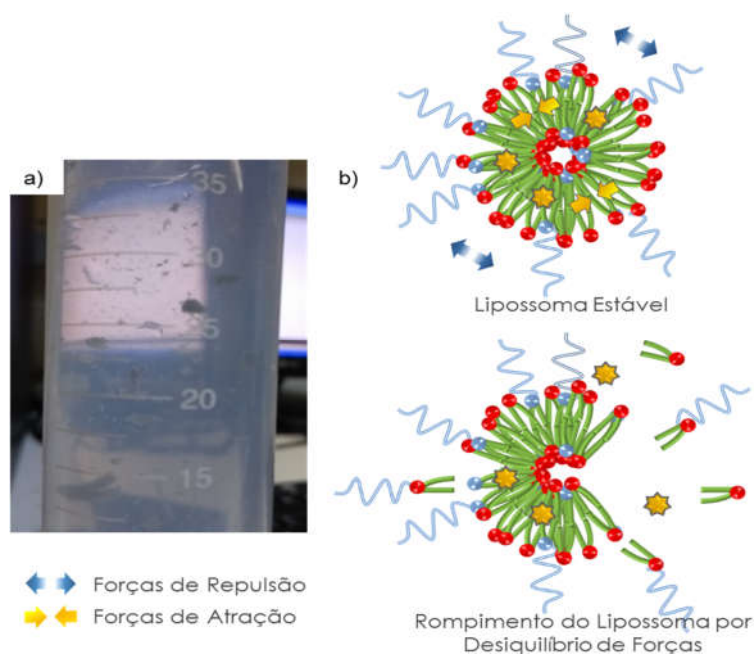
A Figura 26 apresenta o resultado das distribuições populacionais em intensidade (Figura 26 a) e número (Figura 26 b) para as partículas de DMPE-AH.

Figura 26. Perfil das partículas de DMPE-AH em a) intensidade e b) número.



Os lipossomas com superfície modificada com até 10% de DMPE-AH (com relação a massa de lipídio) foram caracterizados, os demais formaram densos precipitados (Figura 27 a) indicando que o aumento do percentual de DMPE-AH gerou o desequilíbrio entre as forças de atração da parcela lipofílica dos lipossomas e repulsão entre as cadeias de polímero no recobrimento, levando ao rompimento das estruturas (Figura 27 b).

Figura 27. Aspecto visual das soluções lipossomais com percentuais de AH-DMPE maiores que 10% verificando-se a presença de a) precipitados e b) esquema ilustrativo das forças de atração e repulsão presentes na estrutura do lipossoma com recobrimento de superfície.



5.4.1. Eficiência e capacidade de encapsulação

A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos para eficiência (EE) e capacidade (CE) de encapsulação dos lipossomas com superfície modificada obtidos com 50% de extrato de PpB.

Tabela 7. Eficiência e capacidade de encapsulação dos lipossomas com superfície modificada por DMPE-AH obtidos com 50% de extrato de PpB.

Razão % (DMPE-AH/Lipídio)	Razão % (Extrato/Lipídio+DMPE-AH)	EE (%)	CE (%)
5%	50%	72,08 ± 1,88	36,04 ± 0,94
10%	50%	69,46 ± 0,67	34,73 ± 0,34

Observa-se na Tabela 7 que a eficiência de encapsulação foi inferior a 73%, entretanto, este valor pode estar associado a carga limite de extrato suportado pelo lipossoma, uma vez que a capacidade de encapsulação (EC) obtida para ambas as formulações (5 e 10% de DMPE-AH) apresenta valor médio estatisticamente semelhante (valor de $p > 0,05$) a CE dos lipossomas convencionais, indicando que a modificação de superfície dos lipossomas não proporciona maior ou menor encapsulação de extrato de PpB., permanecendo assim, a CE do extrato de aproximadamente 35% tanto para os lipossomas convencionais como para os lipossomas com superfície modificada.

5.4.2. Propriedades dos lipossomas com superfície modificada

A Tabela 8 apresenta os resultados para diâmetro de partículas, PDI e potencial zeta das partículas com superfície modificada com DMPE-AH contendo ou não extrato de PpB, os valores da amostra sem DMPE-AH, com e sem incorporação do extrato, estão apresentadas como dados comparativos.

Tabela 8. Resultados da análise por método de DLS do diâmetro das partículas (expresso em valores de *z-average*), PDI e potencial zeta.

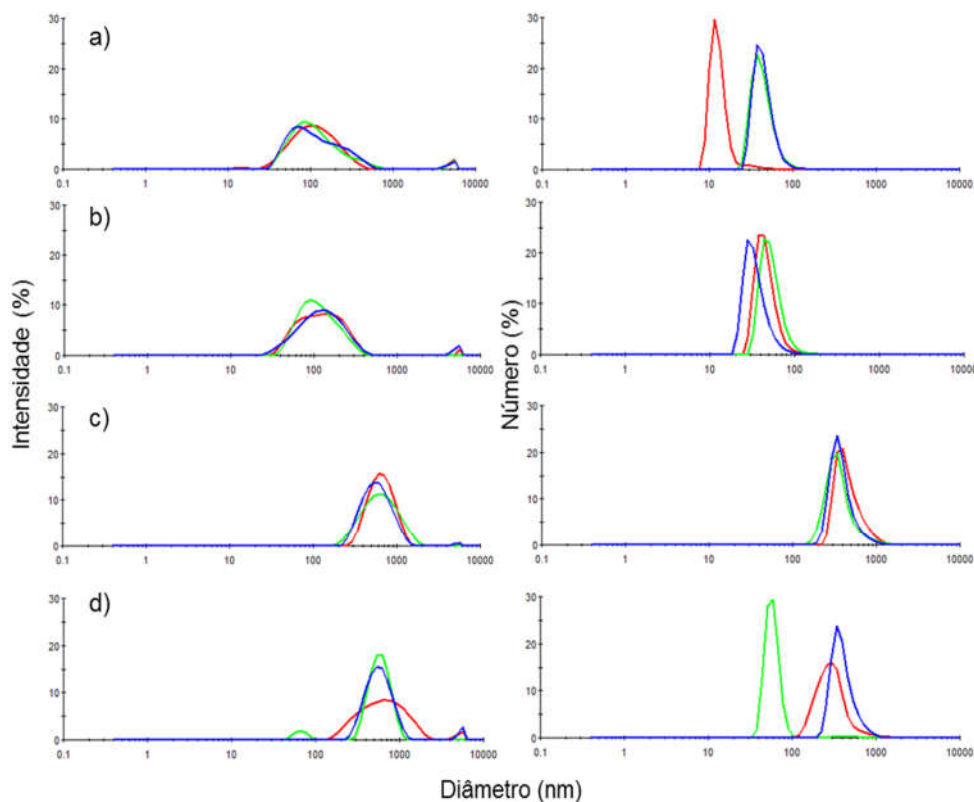
Razão % (DMPE-AH/Lipídio)	Razão % (Extrato/Lipídio+DMPE-AH)	Z-Average (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
0%	0%	114,43 ± 3,50	0,23 ± 0,01	-7,93 ± 0,34
5%	0%	104,23 ± 1,31	0,36 ± 0,01	-11,03 ± 0,97
10%	0%	122,80 ± 5,30	0,35 ± 0,03	-9,55 ± 0,68
0%	50%	209,80 ± 2,39	0,24 ± 0,02	-20,47 ± 0,21
5%	50%	501,53 ± 5,92	0,28 ± 0,04	-19,53 ± 0,34
10%	50%	531,57 ± 14,00	0,47 ± 0,09	-23,80 ± 0,88

Na Tabela 8 observa-se que os lipossomas com superfície modificada com 5% e 10% de DMPE-AH (ausentes de extrato de PpB) apresentaram diâmetro das partículas, PDI e potencial zeta semelhantes, porém estatisticamente diferentes (valor de $p < 0,05$). Os valores de PDI para as partículas com DMPE-AH foram menores que 0,4, o que indica que os sistemas se apresentam moderadamente polidispersos. Quanto a adição da carga de extrato, verifica-se a variação estatística de todos os resultados estudados (valores de $p < 0,05$). O diâmetro médio das partículas com extrato de PpB com superfície modificada (tanto 5% quanto 10% de DMPE-AH) diferiu

aproximadamente 140% em relação aos lipossomas convencionais, entretanto não foi verificada alteração na capacidade de encapsulação. Portanto, os efeitos no tamanho podem ser atribuídos à conformação das cadeias de AH (mais esticadas ou mais deitadas na superfície) como consequência do equilíbrio de forças entre a dupla camada e o recobrimento de AH.

A Figura 28 apresenta os resultados de diâmetro médio em gráficos de distribuições populacionais em intensidade (ver Figura 38, lateral esquerda) e número (ver Figura 38, lateral direita) para os lipossomas como superfície modificada. Não foram observadas diferenças substanciais nas distribuições da Figura 28 a) e b), bem como em comparação com os lipossomas convencionais (Figura 23 a). No entanto, para lipossomas carregados com 50% PpB e 10% de carga de DMPE-AH (Figura 28 d), as distribuições são mais dispersas que as observadas nos lipossomas convencionais (Figura 23 f), evidenciando o desequilíbrio de forças na bicamada devido à incorporação de 10% de DMPE-AH.

Figura 28. Distribuições populacionais em intensidade (lateral esquerda) e número (lateral direita) para os lipossomas com a) 5% de DMPE-AH, b) 10% de DMPE-AH, c) 5% de DMPE-AH + 50% de extrato e d) 10% de DMPE-AH + 50% de extrato de PpB.



5.4.3. Elasticidade dos lipossomas

A Tabela 9 apresenta as propriedades dos lipossomas com superfície modificada antes de serem submetidos ao ensaio de elasticidade.

Tabela 9. Soluções lipossomais utilizadas nos testes de permeação antes do ensaio, expressas em valores de z-avarege, PDI e Potencial zeta.

Razão % (DMPE-AH/Lipídio)	Razão % (Extrato/Lipídio+DMPE-AH)	Z-Avarege (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
5%	0%	140,0 ± 0,30	0,36 ± 0,05	-19,67 ± 1,14
5%	50%	246,43 ± 12,36	0,41 ± 0,08	-23,27 ± 0,31
10%	0%	165,12 ± 3,12	0,52 ± 0,01	-22,75 ± 0,42
10%	50%	448,23 ± 34,27	0,47 ± 0,01	-31,93 ± 1,16

Assim como para os lipossomas convencionais, manutenção do diâmetro médio, polidispersividade e potencial *zeta*, em conjunto com o percentual de fósforo passante pela membrana, foram utilizados como parâmetros que identifiquem a capacidade do lipossoma de sofrer deformação sem que ocorra a sua desestruturação.

A Tabela 10 apresenta os resultados do diâmetro médio, polidispersividade, potencial *zeta* e percentual de fósforo passante pela membrana das amostras após serem submetidas ao ensaio de permeação.

Tabela 10. Resultados para os lipossomas com superfície modifica após ensaio de permeação *in vitro* expressos em z-avarege, PDI, potencial *zeta* e percentual de fósforo passante em relação ao fósforo inicial.

Razão % (DMPE-AH/Lipídio)	Razão % (Extrato/Lipídio+DMPE-AH)	Z-Avarege (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Fósforo %
5%	0%	110,17 ± 1,93	0,32 ± 0,03	-18,90 ± 0,78	97,49 ± 1,12
5%	50%	240,56 ± 2,42	0,40 ± 0,08	-22,37 ± 0,41	90,17 ± 1,35
10%	0%	153,01 ± 6,64	0,40 ± 0,01	-20,50 ± 0,62	97,12 ± 0,13
10%	50%	350,60 ± 9,80	0,40 ± 0,02	-31,77 ± 0,65	91,52 ± 2,13

Os lipossomas recobertos com 5% de DMPE-AH, sem carga de extrato e com 50% de PpB, e os recobertos com 10% de DMPE-AH contendo 50% de carga apresentaram variação significativa quanto ao diâmetro médio (valor de $p < 0,05$), variações estas de até 21,79%, os lipossomas com 5% de recobrimento e 50% de carga não apresentaram variação significativa para do diâmetro médio. Quanto ao

potencial *zeta*, as amostras com 10% de DMPE-AH apresentaram desvio significativo de até 17,42% (valor de p de $< 0,05$), as demais amostras não apresentaram desvio significativo para esta propriedade. As amostras com 5% e 10% de DMPE-AH apresentaram variação significativa na polidispersidade, variação esta, de até 23,08%, para as demais amostras o PDI apresentou-se estatisticamente semelhante ao inicial.

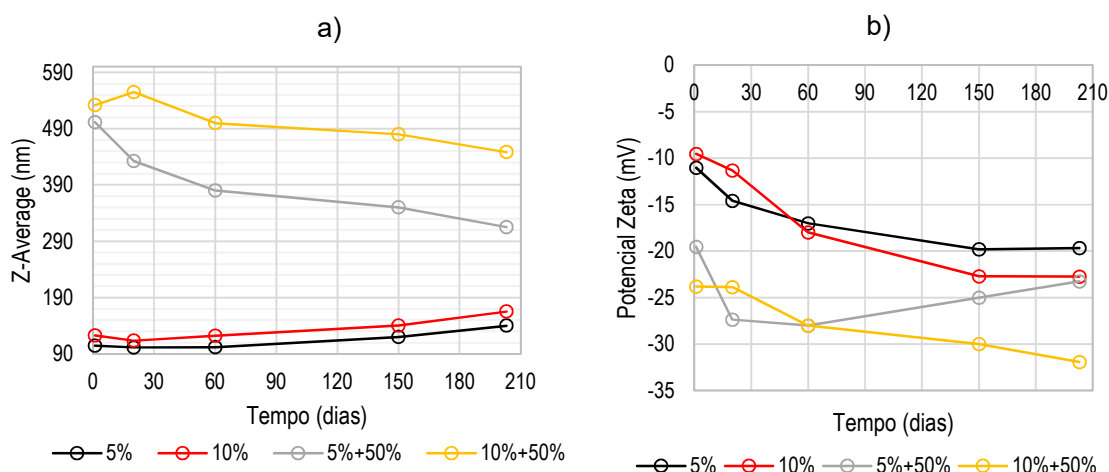
Com relação ao percentual de fósforo passante, as amostras controle (com 5 e 10% de DMPE-AH ausentes de extrato de PpB.) apresentaram resultados estatisticamente semelhante de, expresso em média, 97,3%, assim como as amostras contendo extrato de PpB. (independente do percentual de recobrimento) apresentaram percentual estatisticamente semelhante, expresso em média, de 90,84%, valor este que é 6,46% menor que o percentual do controle. Este menor percentual de fósforo passante para as amostras com 50% de extrato de PpB. pode estar relacionado ao tamanho superior destas partículas (entre 240 – 350 nm, aproximadamente 2x maiores que seus respectivos controles) em relação aos seus respectivos controles, tamanho este que não está associado ao percentual de extrato encapsulado, mas pode estar relacionado a uma nova estruturação do DMPE-AH na superfície da partícula devido a interação do recobrimento com o extrato de PpB presente na bicamada lipídica.

Em comparação com os lipossomas convencionais, as amostras controle com superfície modifica apresentaram percentual de fósforo passante 25,73% maior, mesmo apresentando partículas com diâmetro médio superior (1,5x maiores), o que nos indica o aumento da capacidade de deformação das partículas sem que ocorra desestruturação do lipossoma por incorporação do DMPE-AH. Quanto as partículas com extrato de PpB, os lipossomas com superfície modificada apresentaram percentual de fósforo passante 6,21% maior que os lipossomas convencionais, além deste maior percentual, é importante ressaltar que as partículas com superfície modificada apresentam diâmetro médio de até 2,1x maior que os lipossomas convencionais na sua capacidade máxima de encapsulação, indicando que a incorporação do DMPE-AH nas partículas, com ou sem extrato de PpB, amplifica a capacidade de deformação dos lipossomas, permitindo que os mesmos atravessem as tortuosidades dos poros das membranas com o mínimo de desestruturação.

5.4.4. Estabilidade dos lipossomas com superfície modificada

Os lipossomas com superfície modificada foram submetidos a estudo de estabilidade durante 203 dias. Na Figura 29 observam-se os gráficos de evolução ao longo das medições do diâmetro médio das partículas (expresso em *z-average*, ver Figura 29 a) e potencial *zeta* (Figura 29 b) até 203 dias de acompanhamento.

Figura 29. Gráficos de evolução do a) diâmetro médio das partículas (expresso em *z-average*) e b) potencial *zeta* ao longo dos 203 dias de acompanhamento de estabilidade.



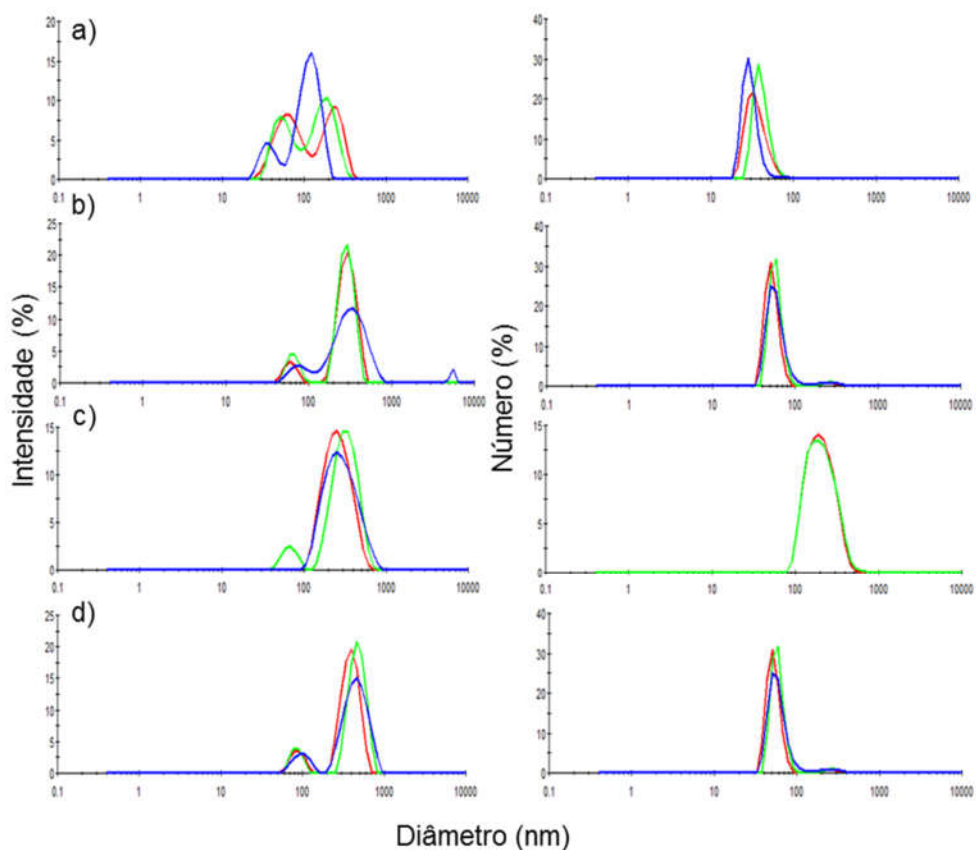
Nos primeiros 20 dias do estudo os lipossomas ausentes de extrato de PpB apresentaram estabilidade quanto a manutenção do diâmetro médio, PDI (valor de $p > 0,05$) e potencial *zeta* (valor de $p > 0,05$) excetuando-se o potencial *zeta* para amostra com 5% DMPE-AH). Os lipossomas com superfície modificada com 5% de DMPE-AH e carregados com 50% de extrato de PpB apresentaram variação quanto ao diâmetro médio estatisticamente significativa (valor de $p < 0,05$), variação esta, de 13,80%, o valor do índice de polidispersividade permaneceu constante (valor $p > 0,05$), já o potencial *zeta* sofreu alterações de 40,14% (estatisticamente significativa, valor de $p < 0,05$) indicando aumento na estabilidade coloidal da amostra. Os lipossomas com superfície modificada com 10% de DMPE-AH e carregados com 50% de extrato de PpB apresentaram-se estatisticamente estáveis nos 20 dias de estocagem para todas as variáveis de resposta, diâmetro médio, PDI e potencial *zeta* (valor de $p > 0,05$).

No 203º de estabilidade, apenas os lipossomas com superfície modificada com 10% de DMPE-AH e 50% de extrato de PpB não apresentaram variação significativa para o diâmetro médio expresso em valores de *z-average* (valor de $p > 0,05$), os

lipossomas com superfície modificada com 5% de DMPE, com e sem extrato de PpB e os lipossomas com recobrimento de 10% apresentaram desvios de até 37,17% em relação ao primeiro dia (valor de $p < 0,05$). Quanto ao potencial zeta todos os lipossomas apresentaram variação significativa (valor de $p < 0,05$), variações estas de até 138,22%. Apenas os lipossomas com superfície modificada com 10% de DMPE-AH, sem extrato, e 5% de DMPE-AH com 50% de extrato de PpB, apresentaram variação significativa para o PDI (valor de $p < 0,05$), variação esta, de 48,57% em relação ao primeiro dia, indicando um aumento significativo na polidispersividade destas formulações.

A Figura 30 apresenta os perfis das partículas após 203 dias de estabilidade, onde observa-se, para intensidade, a prevalência de distribuições multimodais, corroborando com os resultados de aumento de PDI e variações significativas de diâmetro médio apresentados anteriormente.

Figura 30. Distribuições populacionais em intensidade (lateral esquerda) e número (lateral direita) para os lipossomas com a) 5% de DMPE-AH, b) 10% de DMPE-AH, c) 5% de DMPE-AH + 50% de extrato e d) 10% de DMPE-AH + 50% de extrato de PpB. após 203 dias de estabilidade.



6. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que a técnica de adição de lipídios em etanol sob alto cisalhamento é uma tecnologia eficiente e escalonável para a preparação de lipossomas contendo o extrato de PpB. A derivatização do AH com DMPE via DMTMM proporcionou acoplamento eficiente e reprodutível, sem a geração de subprodutos tóxicos. O extrato foi eficientemente encapsulado em lipossomas convencionais e com superfície modificada, os quais apresentaram elasticidade que assegurou a recuperação de suas propriedades físico-químicas após a extrusão através de membranas nanoporosas. Em conjunto, as propriedades medicinais do extrato para o tratamento da osteoartrite e sua incorporação eficiente em formulações lipossomais, devem melhorar sua atividade e possibilitar sua aplicação tópica. Estas descobertas abrem caminho para a produção escalonável de extrato de PpB lipossomal. Pesquisas futuras devem ser realizadas para determinar os benefícios destas formulações em modelos in vivo.

7. REFERÊNCIAS

- ALVEZ, S. F.; BORGES, L. L.; PAULA, J. A. M. de; VIEIRA, R. F.; FERRI, P. H.; COUTO, R. O. do; PAULA, J. R. de; BARA, M. T. F. (2013) *Chemical variability of the essential oils from fruits of Pterodon emarginatus in the Brazilian Cerrado*, Revista Brasileira de Farmacognosia, vol. 23, nº 2.
- ALVES, S. F.; BORGES, L. L.; SANTOS, T. O. dos; PAULA, J. R. de; CONCEIÇÃO, E. C.; BARA, M. T. F. (2014) *Microencapsulation of Essential Oil from Fruits of Pterodon emarginatus Using Gum Arabic and Maltodextrin as Wall Material: Composition and Stability*, Drying Technology, vol. 32, pag. 96 – 105.
- BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. (1965) *Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids*, Journal of Molecular Biology, vol. 13, pag. 238 – 252.
- BANGHAM, A. D. (1993) *Liposomes: the Babraham connection*, Chemistry and Physics of Lipids, vol. 64, pag. 275 – 285.
- BENNETT W.F.D.; MACCALLUM J.L.; TIELEMAN D.P. (2009) *Thermodynamic analysis of the effect of cholesterol on dipalmitoylphosphatidylcholine lipid membranes*, J. Am. Chem. Soc., vol. 131, pag. 1972 – 1978.
- BERGMAN, K.; ELVINGSON, C.; HILBORN, J.; SVENSK, G.; BOWDEN, T. (2007) *Hyaluronic Acid Derivatives Prepared in Aqueous Media by Triazine-activated Amidation*, Biomacrom., vol. 8, pag. 2190 – 2195.
- BHATIA, S.; KUMAR, R.; KATARE, O. P. (2004) *Tamoxifen in topical liposomes: development, characterization and in-vitro evaluation*, J. Pharm. Pharm. Sci., vol. 7, pag. 9 – 252.
- BONCEL, S.; WALEZAK, K. (2009) *Novel Acyclic Amide-Conjugated Nucleosides and Their Analogues*, Nucleos. Nucleot. Nucl., vol. 28, pag. 103 – 117.
- BULATOVIĆ, M.; HEIJSTEK, M. W.; VERKAAIK, M.; VAN DIJKHUIZEN, E. H. P.; ARMBRUST, W.; HOPPENREIJIS, E. P. A.; et al. (2011) *High prevalence of methotrexate intolerance in juvenile idiopathic arthritis: development and validation of methotrexate intolerance severity score*, Arthritis Rheum, vol. 63, nº 7.
- BURGUERA, J. L.; BUGUERA, M. (2012) *Analytical applications of emulsions and microemulsions*, Talanta, vol. 96, pag. 11 – 20.
- CAVALCANTI, A. D. D.; MELO, B. A. G.; FERREIRA, B. A. M.; SANTANA, M. H. A. (2019) *Performance of the Main Downstream Operations on Hyaluronic Acid Purification*, Development of Biotechnological/Microbial Processes Laboratory.
- CHEN, P. S., Jr.; TORIBARA, T. Y.; WARNER H. (1956) *Microdetermination of Phosphorus*, Analytical Chemistry.

CHEN, Y.; WANG, Q. (2009) *Establishment of CTAB Turbidimetric method to determine hyaluronic acid content in fermentation broth*, Carbohydrate Polymers, vol. 78, pag. 178 – 181.

CHEN, Y.; SU, W.; YANG, S.; GEFEN, A.; LIN, F. (2013) *In situ forming hydrogels composed of oxidized high molecular weight hyaluronic acid and gelatin for nucleus pulposus regeneration*, Acta Biomaterialia, vol. 9, pag. 5181 – 5193.

CHOY, E. (2012) *Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*, Rheumatology, vol. 51.

COELHO, L. P.; REIS, P. A.; CASTRO, F. L. de; GAYER, C. R. M.; LOPES, C. da S.; SILVA, M. C. da C. e; SABINO, K. C. de C.; TODESCHINI, A. R.; COELHO, M. G. P. (2005) *Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of Pterodon pubescens Benth. Seeds*, Journal of Ethnopharmacology, vol. 98, pag. 109 – 116.

COLMEGNA, I.; OHATA, B. R.; MENARD, H. A. (2012) *Current understanding of rheumatoid arthritis therapy*, Clin. Pharmacol. Ther., vol. 91, nº 4.

CROMMELIN, D. J. A.; SCHREIER, H. (1994) *Liposomes*. In: Kreuter J, ed. Colloidal drug delivery systems. New York: Marcel Dekker, 73 – 190.

DELEU, M.; CROWET, J.; NASIR, M. N.; LINS, L. (2014) *Complementary biophysical tools to investigate lipid specificity in the interaction between bioactive molecules and the plasma membrane: A review*, vol. 1838, pag. 3171 – 3190.

FRASER, J. R.; LAURENT, T. C.; LAURENT, U. B. (1992) *Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover*, J. Intern. Med., vol. 242, pag. 27 – 33.

GLAVAS-DODOV, M.; FREDRO-KUMBARADZI, E.; GORACINOVA, K.; SIMONOSKA, M.; CALIS, S.; TRAIKOVIC-JOLEVSKA, S.; HINCAL, A. A. (2005) *The effects of lyophilization on the stability of liposomes containing 5-FU*, Int. J. Pharm., vol. 291, pag. 79 – 86.

GRANDO, R.; SOUZA, V. H.; MONTEIRO, K. M.; SOUSA, I. M. O.; QUEIROZ, N. C. A.; CARVALHO, J. E.; SPINDOLA, H. M.; FOGGIO, M. A. (2017) *Comparison of Standardized Dichloromethane with Aqueous Pterodon pubescens Benth. Fruit Extracts on Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activity*, J. Braz. Chem. Soc., vol. 28, nº 3, pag. 455 – 464.

HAHN, S. W.; JUNG, H. S.; KIM, K. S.; YUN, S. H. (2014) *Enhancing the transdermal penetration of nanoconstructs: could hyaluronic acid be the key*, Nanomedicine, vol. 9, pag. 743 – 745.

HOOGEVEST, P. V. (2017) *Review – An update on the use of phospholipid excipients*, European Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 108, pag. 1 – 12.

HOSCHIED, J.; CARDOSO, M. L. C. (2015) *Sucupira as a Potential Planta for Arthritis Treatment and Other Diseases*, Hindawi Publishing Corporation.

HOSCHEID, J.; OUTUKI, P. M.; KLEINUBING, S. A.; SILVA, M. F.; BRUSCHI, M. L.; CARDOSO, M. L. C. (2015) *Development and characterization of Pterodon pubescens oil nanoemulsions as a possible delivery system for treatment of rheumatoid arthritis*, Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, vol. 484, pag. 19 – 27.

HOSCHEID, J.; OUTUKI, P. M.; KLEINUBING, S. A.; GOES, P. R. N. de; LIMA, M. M. S.; CUMAN, R. K. N.; CARDOSO, M. L. C. (2017) *Pterodon pubescens oil nanoemulsions: physicochemical and microbiological characterization and in vivo anti-inflammatory efficacy studies*, Revista Brasileira de Farmacognosia..

IMBODEN, J. B. (2009) *The Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis*, Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis., vol. 4, pag. 417 – 434.

JAIN, S.; PATEL, N.; MADAN, P.; LIN, S. (2005) *Quality by design approach for formulation, evaluation and statistical optimization of diclofenac-loaded ethosomes via transdermal route*, Pharm. Dev. Technol., vol. 20, pag. 89 - 473

JONG, H. G. B. de; KRUYT, H. R. (1929) *P K Akad Wet-Amsterd*, vol. 32, pag. 849.

KAMINSKI, Z. J. (1985) *2-Chloro-4,6-disubstituted-1,3,5-triazines: A Novel Group of Condensing Reagents*, Tetrahedron Lett., vol. 26, n° 24, pag. 2901 – 2904.

KAMINSKI, Z. J.; PANETH, P.; RUDZINSKI, J. (1998) *A Study on the Activation of Carboxylic Acids by Means of 2-Chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine and 2-Chloro-4,6-diphenoxy-1,4,5-triazine*, J. Org. Chem., vol. 63, pag. 4248 – 4255.

KAMINSKI, Z. J. (2000) *Triazine-Based Condensing Reagents*, Biopoly., vol. 55, pag. 140 – 164.

KARBOWNIK, M. S.; NOWAK, J. Z. (2013) *Hyaluronan: towards novel anti-cancer therapeutics*, Pharmacol. Rep., vol. 65, pag. 1056 – 1074.

KITAGAWA, S.; KASAMAKI, M. (2006) *Enhanced delivery of retinoic acid to skin by cationic liposomes*, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), vol. 54, pag. 4 – 242.

KUNISHIMA, M.; KAWACHI, C.; MORITA, J.; TERAOKA, K.; IWASAKI, F.; TANI, S. (1999) *4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium: An Efficient Condensing Agent*, Tetrahedron, vol. 55, pag. 13159 – 13170.

KUNISHIMA, M.; KAWACHI, C.; IWASAKI, F.; TERAOKA, K.; TANI, S. (1999) *Synthesis and Characterization of 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,4-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium Chloride*, Tetrahedron Letters, vol. 40, pag. 5327 – 5330.

KUNISHIMA, M.; KAWACHI, C.; HIOKI, K.; TERAOKA, K.; TANI, S. (2001) *Formation of carboxamides by direct condensation of carboxylic acids and amines in alcohols using a new alcohol-and water soluble condensing agent: DMTMM*, Tetrahedron, vol. 57, pag. 1551 – 1558.

LASIC, D. D. (1993) *Liposomes: from physics to applications*, 1^a ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V., cap.3, pag. 63 – 90.

LASZLO, F. (2017) *Óleo essencial de Sucupira-Branca, Instituto Brasileiro de Aromatologia/Laszlo*.

LAURENT, T.C.; FRASER, J.R. (1992) *Hyaluronan*, FASEB Journal, vol. 6, pag. 2397 – 2404.

LIMA, H. C. (2012) “*Pterodon*”, em *Lista de Espécies da Flora do Brasil*, FORZZA, R. C.; STEHMANN, J. R.; NADRUZ, M., Eds. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

LLORET, F. C.; SANTOS, C. C. J.; MEDINA, L. S.; QUEIROZ, N. C. A.; SOUSA, I. M. O., RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; FOGLIO, M. A. (2016) *6 α -acetoxy-7 β -hydroxy-vouacapan Isolated from Pterodon pubescens Benth. Fruit's with Selective Activity against Prostate Cancer Cell Line: Artifact or Natural Product?*, Medicinal & Aromatic Plants, vol. 5, nº 2.

LOPES, J. F. M.; SANTANA, M. H. A.; ROSALES, M. A. B.; ALONSO, A. B. (2016) *Composição e formulação farmacêutica para tratamento ocular não invasivo e seus usos*, Patente WO2016205908 A1, Universidade Estadual de Campinas – Unicamp.

LORENZI, H. (1998) *Árvores Brasileiras, Manual de Identificação e Plantas Arbóreas Nativas do Brasil*, vol. 1, pag. 227.

MALVERN, *Polidispersity – what does it mean for DLS and chromatography*, 2014, disponível em <http://www.materials-talks.com/blog/2014/10/23/polydispersity-what-does-it-mean-for-dls-and-chromatography/>, acessado em 10/2017.

MEYER, K.; PALMER, J. W. (1934) *The polysaccharide of the vitreous humor*, J. Biol. Chem., vol. 107, pag. 629 – 634.

MCLNNES, I. B.; SCHETT, G. (2007) *Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*, Immunology, vol. 7, pag. 429 – 442.

MILLAN, M. J.; BROCCO, M. (2003) *The Vogel conflict test: procedural aspects, gamma-aminobutyric acid, glutamate and monoamines*, Eur J Pharmacol., vol. 463, pag. 67 – 96.

MOJARRALI, H. (2011) *Coupling of substances containing a primary amine to hyaluronan via carbodiimide-mediated amidation*.

MONTALBETTI, C. A. G. N.; FALQUE, V. (2005) *Amide Bond Formation*, Tetrahedron, vol. 61, pag. 10827 – 10852.

NUCCI, C.; MAZZARDO-MARTINS, L.; STRAMOSK, J.; BRETHANHA, L. C.; PIZZOLATTI, M. G.; SANTOS, A. R. S.; MARTINS, D. F. (2012) *Oleaginous extract from the fruits Pterodon pubescens Benth induces antinociception in animal models of acute and chronic pain*, Journal of Ethnopharmacology, vol. 143, pag. 170 – 178.

NUCCI-MARTINS, C.; MARTINS, D. F.; NASCIMENTO, L. F.; VENZKE, D.; OLIVEIRA, A. S.; FREDERICO, M. J. S.; SILVA, F. R. M. B.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G.; SANTOS, A. R. S. (2015) *Ameliorative potential of standardized fruit extract of Pterodon pubescens Benth on neuropathic pain in mice: Evidence for the mechanism of action*, Journal of Ethnopharmacology, vol. 175, pag. 273 – 286.

OLIVEIRA, A. E. M. F. M.; DUARTE, J. L.; AMADO, J. R. R.; CRUZ, R. A. S.; ROCHA, C. F.; SOUTO, R. N. P.; FERREIRA, R. M. A.; SANTOS, K.; CONCEIÇÃO, E. C. da; OLIVEIRA, L. A. R. de; KELECOM, A.; FERNANDES, C. P.; CARVALHO, J. C. T. (2016) *Development of a Larvicidal Nanoemulsion with Pterodon emarginatus Vogel Oil*, PLOS ONE, vol. 11, nº 1.

OLIVEIRA, A. E. M. F. M.; DUARTE, J. L.; CRUZ, R. A. S.; SOUTO, R. N. P.; FERREIRA, R. M. A.; PENICHE, T.; CONCEIÇÃO, E. C. da; OLIVEIRA, L. A. R. de; FAUSTINO, S. M. M.; FLORENTINO, A. C.; CARVALHO, J. C. T.; FERNANDES, C. P. (2017) *Pterodon emarginatus oleoresin-based nanoemulsion as a promising tool for Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) control*, Journal Nanobiotechnol, vol. 15, nº 2.

OLIVEIRA, L. L. (2007) *Preparação, Reologia e Transição de Formas de Lipossomas Elásticos em Membranas de nanoporos*.

OLIVEIRA, R. de C. (2014) *Estudo da produção de ácido hialurônico utilizando peptonas de soja*, Universidade Estadual de Campinas.

PALUMBO, F. S.; PITARRESI, G.; MANDRACCHIA, D.; TRIPODO, G.; GIAMMONA, G. (2006) *New copolymers of hyaluronic acid and polylactic acid: synthesis and characterization*, Carbohydr. Polym., vol. 66, pag. 379 – 385.

PANDIT, J.; AGIL, M.; SULTANA, Y. (2016) *Nanoencapsulation Technology To Control Release and Enhance Bioactivity of Essential oils*, Nanotechnology in the Agri-Food Industry, vol. 2, pag. 597 – 640.

PATTNI, B. S.; CHUPIN, V. V.; TORCHILIN, V. P. (2015) *New Developments in Liposomal Drug Delivery*, Chemical Reviews, vol. 115, pag. 10938 – 10966.

PIO CORREA, M. (1975) *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*, Instituto Brasileiro do Desenvolvimento Florestal, vol. 1, pag. 153.

PITARRESI, G.; PIERRO, P.; PALUMBO, F. S.; TRIPODO, G.; GIAMMONA, G. (2006) *Photo-cross-linked hydrogels with polysaccharide-poly(amino acid) structure: new biomaterials for pharmaceutical applications*, Biomacromolecules, vol. 7, pag. 1302 – 1310.

PITARRESI, G.; PALUMBO, F. S.; TRIPODO, G.; CAVALLARO, G.; GIAMMONA, G. (2007) *Preparation and characterization of new hydrogels based on hyaluronic acid and α,β -polyaspartylhydrazide*, Eur. Polym. J., vol. 43, pag. 3953 – 3962.

PRICE, R. D.; BERRY, M. G.; NAVSARIA, H. A. (2007) *Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence*, Plastic. Reconstructive Aesthetic Surgery, vol. 60, pag. 1110 – 1119.

PUGLIA, C.; BONINA, F.; RIZZA, L.; et al. (2010) *Evaluation of percutaneous absorption of naproxen from different liposomal formulations*, J. Pharm. Sci., vol. 99, pag. 29 – 2819.

REDDY, J.; KARUNAKARAN (2013) *Purification and characterization of hyaluronic acid produced by Streptococcus zooepidemicus strain 3523-7*, J. BioSci. Biotech., vol. 2, pag. 173 – 179.

REINAS, A. E.; HOSCHIED, J.; OUTUKI, P. M.; CARDOSO, M. L. C. (2014) *Preparation and characterization of microcapsules of Pterodon pubescens Benth. By using natural polymers*, Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 5, nº 4.

ROBERT, L.; ROBERT, A. M.; RENARD, G. (2010) *Biological effects of hyaluronan in connective tissues, eye, skin, venous wall. Role in aging*, Pathol. Biol. (Paris), vol. 58, pag. 98 – 187.

RUOZI, B.; RIVA, G.; BELLETI, D.; TOSI, G.; FORNI, F.; MUCCI, A.; BAROZZI, P.; LUPPI, N.; VANDELLI, M. A. (2010) *Cidofovir-liades liposomes: An intro-study using BCBL-1 cell line as a model for primary effusion lymphoma*, European journal of pharmaceutical sciences, vol. 41, pag. 64 – 254.

RYDERGREN, S. (2013) *Chemical Modifications of Hyalurona using DMTMM-Activated Amidation*.

SAADAT, E.; AMINI, M.; KHOSHAVAND, M. R.; DINARVAND, R.; DORKOOSH, F. A. (2014) *Synthesis and optmization of novel polymeric micelle based on hyaluronic acid and phospjolipids for delivery of paclitaxel, in vitro and in-vivo evaluation*, Int. J. Pharma., vol. 475, pag. 73 – 163.

SABINO, K. C. C.; CASTRO, F. A.; OLIVEIRA, J. C. R.; DALMAU, S. R. A.; COELHO, M. G. P. (1999¹) *Successful Treatment of Collagen-induced Arthritis in Mice with a Hydroalcohol Extract of Seeds of Pterodon pubescens*, Phytotherapy Research, vol. 13, pag. 613 – 615.

SABINO, K. C. C.; GAYER, C. R. M.; VAZ, L. C. A.; SANTOS, L. R. L.; FELZENSZWALB, I.; COELHO, M. G. P. (1999²) *In vitro and in vivo toxicological study of the Pterodon pubescens seed oil*, Toxicology Letters, vol. 108, pag. 27 – 35.

SANTOS, É. da S.; GARCIA, F. P.; OUTUKI, P. M.; HOSCHIED, J.; GOES, P. R. N. de; CARDOZO-FILHO, L.; NAKAMURA, C. V.; CARDOSO, M. L. C. (2016) *Optimization of extraction method and evaluation of antileishmanial activity of oil and nanoemulsions of Pterodon pubescens benth. fruit extracts*, Experimental Parasitology, vol. 170, pag. 252 – 260.

SCHANTE, C.E.; ZUBER, G.; HERLIN, C., VANDAMME T. F. (2011) *Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications*, Carbohydr. Polym., vol. 85, pag. 469 – 489.

SERVAT, L.; SPINDOLA, H. M.; RODRIGUES, R. A. F.; SOUSA, I. M. O.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E. de; FOGLIO, M. A. (2012) *Pterodon pubescens Benth: Stability Study of Microencapsulated Extract and Isolated Compounds Monitored by Antinociceptive Assays*, J. Braz. Chem. Soc., vol. 23, nº 7, pag. 1244 – 1253.

SHIMOMURA, M.; SAWADAISHI, T. (2001) *Bottom-up strategy of materials fabrication: A new trend in nanotechnology of soft materials*, Current Opinion in Colloid & Interface Science, vol. 6, pag. 11 – 16.

SHIMOJO, A. A. M. (2011) *Modificações Química do Ácido Hialurônico para a Produção de Géis Reticulados e de Fosfolipídios Derivatizados*.

SHRIVASTAVA, A.; PANDEY, A. (2013) *Inflammation and rheumatoid arthritis*, J. Physiol. Biochem., vol. 69. Pag. 335 – 347.

SILVA, M. C. C.; GAYER, C. R. M.; LOPES, C. S.; CALIXTO, N. O.; REIS, P. A.; PASSAES, C. P. B.; PAES, M. C.; DALMAU, S. R.; SABINO, K. C. C.; TODESCHINI, A. R.; COELHO, M. G. P. (2004) *Acute and topic anti-endematogenic fractions isolated from the seeds of Pterodon pubescens*, Journal of Pharmacy and Pharmacology, vol. 55, pag. 135 – 141.

SOUZA, V. H. S. (2017) *Avaliação da toxicidade não clínica de extrato e vouacapanos oriundos dos frutos da espécie Pterodon pubescens Benth.*, Tese de Doutorado, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Unicamp.

SPINDOLA, H. M.; CARVALHO, J. E. de; RUIZ, A. L. T. G.; RODRIGUES, R. A. F.; DENNY, C.; SOUSA, I. M. de O.; TAMASHIRO, J. Y.; FOGLIO, M. A. (2009) *Furanoditerpenes from Pterodon pubescens Benth with Selective in vitro Anticancer Activity for Prostate Cell line*, J. Braz. Chem. Soc., vol. 20, nº 3, pag. 569 – 575.

SPINDOLA, H. M.; SERVAT, L.; DENNY, C.; RODRIGUES, R. A. F.; EBERLIN, M. N.; CABRAL, E.; SOUSA, I. M. O.; TAMASHIRO, J. Y.; CARVALHO, J. E.; FOGLIO, M. A. (2010) *Antinociceptive effect of geranylgeraniol and 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oate methyl ester isolated from Pterodon pubescens Benth*, BMC Pharmacology, vol. 10, nº 1.

SPINDOLA, H. M.; SERVAT, L.; RODRIGUES, R. A. F.; SOUSA, I. M. O.; CARVALHO, J. E.; FOGLIO, M. A. (2011) *Geranylgeraniol and 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oate methyl ester isolated from Pterodon pubescens Benth: Further investigation on the antinociceptive mechanism of action*, European Journal of Pharmacology, vol. 656, pag. 45 – 51.

TEIJEIRO, C.; MCGLONE, A.; CSABA, N.; GARCIA-FUENTES, M.; ALONSO, M. J. (2013) *Polysaccharide-based nanocarriers for drug delivery*, V. Torchilin (Ed.), Handbook of Nanobiomedical Research, Fundamentals, Applications and Recent Developments, World Scientific, pag. 235 – 278.

TREVISAN, J. E.; CAVALCANTI, L. P.; OLIVEIRA, C. L. P.; TORRE, L. G. L.; SANTANA, M. H. A. (2010) *Technological Aspects of Scalable Processes for the Production of Functional Liposomes for Gene Therapy*, Non-Viral Gene Therapy, pag. 267 – 294.

TRIPODO G.; TRAPANI A.; TORRE M.L.; GIAMMONA G.; TRAPANI G.; MANDRACCHIA D. (2015) *Hyaluronic acid and its derivatives in drug delivery and imaging: Recent advances and challenges*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, pag. 97.

TROTTA, M.; PEIRA, E.; CARLOTTI, M. E.; GALLARATE, M. (2004) *Deformable liposomes for dermal administration of methotrexate*, Internation Journal of Pharmaceutics, vol. 270, pag. 119 – 125.

VERMA, D. D.; VERMA, S.; BLUME, G.; FAHR, A. (2003) *Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin*, International Journal of Pharmaceutics, vol. 258, pag. 141 – 151.

VIEIRA, C. R.; MARQUES, M. F.; SOARES, P. R.; MATUDA, L.; OLIVEIRA, C. M. A. de; KATO, L.; SILVA, C. C. da; GUILLO, L. A. (2008) *Antiproliferative activity of Pterodon pubescens Benth. seed oil and its principle on human melanoma cells*, Phytomedicine, vol. 15, pag. 528 – 532.

ZANCHETTA, B. (2009) *Desenvolvimento de Sistema Nanoestruturado CH8/EPC/PEG para o tratamento de Leishmaniose cutânea*.

PETTA, D. (2018) *Development of hyaluronic acid derivaties for application in biomedical engineering*, PhD Thesis, University of Twente, The Netherlands.

8. ANEXO I: Development of liposomes entrapping “sucupira” (*Pterodon pubescens* Bent.) extract for topical treatment of osteoarthritis

Development of liposomes entrapping a ‘sucupira’ (*Pterodon pubescens* Bent.) extract for topical treatment of osteoarthritis

Paulo Adolfo Barboza Freitas¹. Nubia de Cássia Almeida². Ilza Maria de Oliveira². Mary Ann Foglio². Maria Helena Andrade Santana¹

¹ Department of Engineering of Materials and of Bioprocesses, School of Chemical Engineering – University of Campinas (UNICAMP), Av. Albert Einstein, 500 CEP 13083-852 Campinas, SP, Brazil

² School of Pharmaceutical Sciences – University of Campinas (UNICAMP), Rua Cândido Portinari, 200 CEP 13083-852 Campinas, SP, Brazil

Corresponding author: Maria Helena Andrade Santana, Tel +55 19 35213921, e-mail: lana@feq.unicamp.br

Artigo submetido a Applied Nanoscience (APNA) 22/06/2019

Abstract Osteoarthritis, a disease characterized by localized inflammation of the joint and destruction of cartilage, has been a major cause of morbidity among older people. The plant of the genus *Pterodon*, commonly known as 'sucupira,' has been used in popular medicine for its antirheumatic, analgesic, and anti-inflammatory properties. The fruit extract of *Pterodon pubescens* Benth. (PpB), provided antirheumatic activities in animal models of induced osteoarthritis. Its main active compounds are vouacapanes, non-furan linear chain diterpenes such as 6 α , 7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oate methyl ester, and geranylgeraniol, which are poorly soluble in water, thus restricting their activities. Therefore, adequate formulations should improve its physicochemical properties and activity. Herein, the PpB extract was loaded in conventional and surface modified elastic liposomes composed by L- α -phosphatidylcholine (EPC) and 1,2-dimyristoyl phosphatidylethanolamine (DMPE) (80:20 EPC/DMPE molar ratio). Surface modification was performed by coupling hyaluronic acid (HA) to DMPE via activation with 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium (DMTMM) in an alternative route. Both liposomes were prepared by dripping in a high shear scalable process. Dynamic light scattering and zeta potential measurements indicated favorable interactions among the lipids and bioactive compounds, yielding high encapsulation efficiency (90% approx.) and electrostatically stable vesicles. Elasticity was proved for empty (150 nm approx.) and loaded liposomes (250nm approx.) by their capability for permeation in two stacked (30nm) polycarbonate membranes mimicking skin porosity. HA coverage benefited liposome recovery after permeation. These results provide scientific foundations to produce elastic liposomes to deliver PpB to the skin. Besides, they signalize to the potential of these liposomes to the topical treatment of osteoarthritis.

Keywords: liposomes, phospholipids, *Pterodon pubescens* Benth, 'sucupira'

Introduction

Osteoarthritis (OA) is a common degenerative disease that leads to cartilage degradation and joint inflammation. Clinical manifestations of OA are marked by joint pain, tenderness, stiffness, impaired movement, crepitus, and effusion^{3,5,9,14,25}. The knee and hip are common forms of osteoarthritis worldwide, especially among older people. In general, osteoarthritis is one of the most significant causes of global disability, with relevant direct and indirect medical costs per patient.

The *Pterodon pubescens* Benth. (PpB) commonly known as 'sucupira', is a tree native to central Brazil. PpB fruit extract is used in folk medicine for anti-inflammatory, and antirheumatic activities^{10,13,20}. One of the most recurring applications of the PpB extract is for pain relief⁴.

The medicinal properties of PpB extract have been previously described, such as the reduction of inflammation produced by osteoarthritis induced in animals^{7,11,16,17,21,24,27,28,29}. Moreover, no acute toxicity, mutagenic activity, or cytotoxicity was observed during intraperitoneal or oral administration^{21,22}.

The extract production, stability, and delivery are essential parameters to be considered to attain efficacy on treatments with PpB.¹⁸ Due to its hydrophobicity, entrapment in hydrophilic supports is a promising strategy to improve its solubility, bioavailability, and promote controlled release of its compounds in biological environments.

The literature reports promising results for microcapsule systems composed of maltodextrin and gum arabic, on preserving the bioactive properties of the PpB brute extract^{24,1}. Also, the microencapsulation enhanced the nociceptive action of the main active compounds of the extract in abdominal contortion animal models. As a consequence, the effective dose decreased by 60% (ED50 = 12.8 mg/kg) compared to the non-encapsulated extract (ED50 = 32.3 mg/kg) when administered by intraperitoneal²⁴. This frame prompted to studies on incorporation of the PpB extract in conventional and hyaluronic acid (HA) surface modified elastic liposomes, which were developed in the present work. Furthermore, the characterization and evaluation of physical properties and elasticity of the liposomes were used to determine their potential for use in the topical treatment of osteoarthritis. Topical administration is an alternative to the enteral and parenteral routes commonly used for the PpB extract in other vehicles, which presented undesirable systemic effects.

Liposomes are composed of phospholipids, amphiphilic molecules capable of self-aggregation when in aqueous solutions, forming bilayer structures containing an aqueous core¹⁸.

Elastic liposomes contain phase-transition low-temperature phospholipids such as egg phosphatidylcholine (EPC), which makes them fluid and flexible at body temperature. Thus, they can cross the physical barriers of the skin, especially the corneum extract, that limits the percutaneous absorption³¹.

Herein, the liposomes were composed by L- α -phosphatidylcholine (EPC), 1,2-dimyristoyl phosphatidylethanolamine (DMPE) (80:20 EPC/DMPE molar ratio). The low phase transition temperature of EPC provides fluidity and elasticity to the liposome structure at body temperature. DMPE contains amine groups which enable covalent attachment with polymers and other compounds, thereby modifying the surface of the liposomes. Polyethylene glycol (PEG) has been widely used for steric protection of liposome surface and to evade the immunological system. However, due to side effects on long-term use, its substitution for non-toxic polymers has been claimed in the literature. Hyaluronic acid is a promising substitute because it is a highly hydrated natural polymer and the main component of human joints. Despite their properties, studies on the surface modification of liposomes by HA are still scarce.

In this article, DMPE-HA coupling was performed via amidation reaction using a triazine base, 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium (DMTMM) for coupling. DMTMM is a promising alternative because it is cheaper, less toxic, more reactive and does not generate N-acyl urea by-product¹⁹ when compared to 1-ethyl-3-(3-(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), currently used for this chemical route.

To the best of our knowledge, this work is the first to attempt entrapping of PpB extract in elastic liposomes, as well as on coupling of HA to phospholipids by amidation using DMTMM as an activator agent.

Material and Methods

The standardized extract of *Pterodon pubescens* Benth. (PpB) was donated by CPQBA – UNICAMP; The lipids L- α -phosphatidylcholine, (EPC) and 2-dimyristoyl phosphatidylethanolamine

(DMPE) were supplied by Lipoid, Germany. Absolute ethanol (99.5%) (Merck KGaA, Germany), and used for preparation of the liposomes. Hydrogen peroxide, potassium orthophosphate (JT Baker®, USA), sulfuric acid (Synth, Brazil), ammonium molybdate (Synth, Brazil), hydrogen peroxide (Synth, Brazil), and ascorbic acid (Sigma Aldrich, USA), used for characterization of the liposomes were analytic grade. Hyaluronic acid (HA), with a molar mass 8.38×10^5 Da was purchased from Mapric (Brazil). The reagents 6-chloro-2,4-dimethoxy-s-triazene (CDMT) (Sigma Aldrich, USA), N-methylmorpholine (NMM), 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid sodium salt (MES) (Sigma Aldrich, USA), Tetrahydrofuran (THF) (Merck, GER), ethanol absolute 99.5% (Merck, GER), and dialysis tube (3,500 Da cut-off), composed of regenerated cellulose from Spectrum® - USA, were used for HA-DMPE coupling.

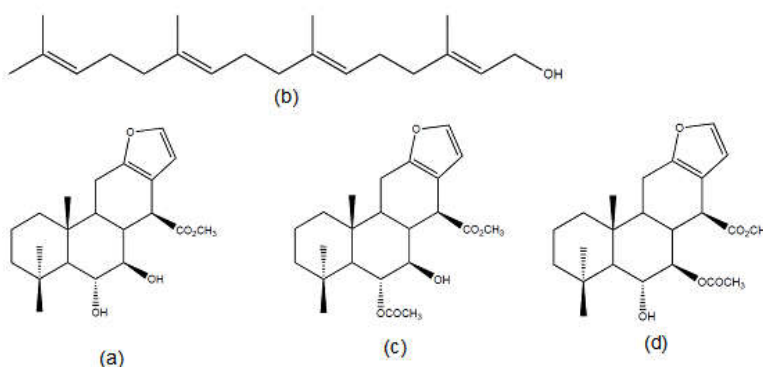
Identification of *Pterodon pubescens* Benth. extract

Table 1 presents the compounds that identify the standardized extract of PpB used in this work, also described in terms of percentual composition of geranylgeraniol, humulene, caryophyllene and the isomers methyl $6\alpha,7\beta$ -oate and methyl acetoxo- 7β -hydroxyivouacapan- 17β -oate ester and the methyl $6\alpha,7\beta$ -dihydroxyivouacapan- 17β -oate ester in a higher proportion.

Table 1. Composition of the compounds that identify the standardized extract of *Pterodon pubescens* Benth.

Compounds	Concentration %
Cariofilene	4.63 ± 0.15
Humulene	1.00 ± 0.03
Geranylgeraniol	0.37 ± 0.06
isomers methyl $6\alpha,7\beta$ -oate and methyl acetoxo- 7β -hydroxyivouacapan- 17β -oate ester	14.61 ± 1.24
methyl $6\alpha,7\beta$ -dihydroxyivouacapan- 17β -oate ester	6.55 ± 0.81

Figure 1. Molecular structures of the main compounds of the PpB extract a) $6\alpha, 7\beta$ -dihydroxyivouacapan- 17β -oate methyl ester, b) geranylgeraniol and the isomers c) $6\alpha, 7\beta$ -oate methyl ester and d) acetoxo- 7β -hydroxyivouacapan- 17β -oate methyl ester. (Adapted from Spindola et al. (2010) and Servat et al. (2012)).



Emphasis is given to methyl 6 α ,7 β -dihydroxyivouacapan-17 β -oate ester (Figure 1a), geranylgeraniol (Figure 1b) and isomers methyl 6 α ,7 β -oate and acetoxy-7 β -hydroxyivouacapan-17 β ester (Fig. 1c) which are responsible for the anti-inflammatory, antinociceptive antiproliferative and antirheumatic activities of the PpB extract as previously reported^{21,22,26,4,32,27,28,29,24,15,16,2,23,11,7}.

Synthesis of DMTMM coupling reagent

Synthesis of DMTMM was performed from CDMT and NMM in THF using the methodology described by Kunishima et al. (1999) with some modifications. Firstly, 10 mL of a CDMT solution (0,57 mol/L) in THF was warmed at 25 °C under stirring (~500 rpm) followed by addition of NMM (0,89 mL) and maintaining the stirring of the resulting suspension for further 30 minutes. The reaction mixture was then filtered in a membrane (0.45 μ m pore diameter) and washed with 5 mL of THF. The obtained solid was macerated with 10 mL of THF for 30 min, filtered and washed with 5 mL of THF. The obtained DMTMM was dried at 25 °C under vacuum.

Derivation DMPE-HA

Initially, 10 mL of HA solution (1 eq., 20 mg, 0.05 mM carboxylic groups) were heated at 30 °C under stirring. Then, 7.12 mg of DMTMM was added, and the system was kept under stirring for 1h for carboxylic groups activation, followed by addition of DMPE solution (16.99 mg dispersed in 1 mL of absolute ethanol and solubilized at 65 °C in a hermetically sealed system). The reaction medium was kept under stirring for 6 h. The resulting mixture was frozen at -60 °C and lyophilized. The lyophilized powder of DMPE-AH was dialyzed in a 3.200 Da. bag, to remove the uncoupled DMPE, in medium containing 35 volumes of absolute ethanol/ultrapure water solution in the proportions 30:70, 50:50, 70:30 and 0:100 (v/v), along 24 h each solution at room temperature. The purified DMPE-AH was frozen at -60 °C and lyophilized to storage.

Liposome preparation

Conventional liposomes were prepared by dripping in a mechanical high shear scalable process as described by Lopes et al. (2016) with slight modifications. Briefly, a stock solution 20 mmol/L of EPC and DMPE lipids at 80:20 EPC: DMPE molar ratio was prepared by dissolving the lipids in absolute ethanol at 65 $\pm$ 2 °C, in a hermetically sealed system to avoid losses of solvent. A stock suspension of 40 mg/mL PpB extract was also prepared in absolute ethanol with the aid of vortex. The lipid stock solution was mixed with the desired amount of PpB extract and vortexed to complete solubilization. Afterward, the resulting solution was slowly added by dripping to Mili Q® water at 65 $\pm$ 2 °C (temperature above DMPE phase transition) under stirring of 24,000 rpm provided by an UltraTurrax® system. The final concentration of total lipids was 2 mmol/L. After addition, the system was kept under stirring for further 15 min, stored in Falcon tubes and refrigerated at 8 °C for 24 for conformation of the colloidal structures.

Liposomes containing 10, 20, 40, and 50% (m/m) of PpB extract related to the lipids were prepared and characterized. Empty liposomes (without the addition of PpB extract) were used as a control.

Surface modified liposomes were prepared from the stock solutions of EPC: DMPE (80:20) (20mmol/L) and DMPE-HA (6mg/mL). Concentrations were adjusted for 5,10,15,20 and 25% m/m DMPE-HA, related to the total lipid, and PpB 50% m/m related to the total mass of EPC:DMPE:DMPE-HA.

Encapsulation efficiency and capacity

Initially, the prepared liposomal dispersion containing PpB (20 mL) was dialyzed under constant homogenization, in a medium containing 20 volumes of 8:2 water: ethanol (v:v) solution during 24 h, for separation of non-incorporated PpB. Afterward, the dispersion was frozen at -60 °C and lyophilized. The solid material was dissolved in 7.05:2:0.05 water:ethanol: Tween 80® (v:v) solution under vigorous stirring for rupture of the vesicles and delivery of the incorporated PpB, which was filtered in a 0.22 µm membrane coupled to a syringe. The collected extract was analyzed by UV/Vis spectroscopy (Malvern, IS-MAM 5005; UK) at 220 nm wavelength and quantified using a calibration curve relating absorbance measurements vs. concentration, previously constructed (Eq. 1). A solution containing 7.05:2:0.05 water:ethanol: Tween 80 (v:v) was used for dilution of the samples. The measurements were performed in triplicate.

$$\text{Concentration} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = 0.7637 \times \text{Abs} - 2.2439 \quad (R^2 = 0.98) \quad (\text{Eq. 1})$$

The PpB encapsulation efficiency (EE) was calculated by the ratio between the concentrations of the PpB extract incorporated to the liposomes and its initial concentration (Eq. 2).

$$EE(\%) = 100 \times \left(\frac{C_f}{C_i} \right) \quad (\text{Eq. 2})$$

Where C_f is the concentration of PpB extract incorporated to the liposomes and C_i is the initial extract concentration.

The capacity of the liposomes to PpB encapsulation (CE) was calculated by the ratio between the PpB extract incorporated in the liposomes and its total lipid concentration (Eq. 3).

$$CE(\%) = 100 \times \left(\frac{C_f}{C_l} \right) \quad (\text{Eq. 3})$$

Where C_f is the concentration of PpB extract incorporated to the liposomes and C_l is the total concentration of lipids.

The same procedure was used for convention and surface modified liposomes.

Particle size, polydispersity and zeta potential

The average hydrodynamic diameter and size distribution of liposomes were determined at 25 °C by dynamic light scattering method in a Zetasizer Nano NS, Malvern, UK equipment with a fixed detector angle of 90 °. The samples were diluted with Mili Q® water to weaken the opalescence before size measurements. Zeta potential was measured by adjusting conductivity to 50 µS/cm. The analyses

were performed by the software included in the equipment which uses the Stokes-Einstein equation for the hydrodynamic diameter and the Helmholtz–Smoluchowski equation for calculation of the electrophoretic mobility⁶. The results were expressed in terms of Z-average values, polydispersity index (PDI), and the zeta potential. The measurements were done at least in triplicate, for empty and PpB loading liposomes, without prior dilution.

Phospholipid concentration

The phospholipid concentration was quantified by mean of phosphate dosage based on Chen et al. (1956) methodology with modifications. Initially, 0.45 mL of 4.5 mol/L solution of sulfuric acid in water was added in each sample, followed by heating to 200-215 ° C for 15 min. The samples were removed from the heating, cooled for 5 min, and 0.15 ml of phosphorus-free hydrogen peroxide were added to each sample, returning them to heating for 30 min (solutions must be clear after 30 min). After heating they were cooled to room temperature, 3.9 mL of Mili Q® water and 0.5 mL of 2.5% solution of ammonium molybdate in Mili Q® water were added, followed by vortexing to homogenize the medium. After homogenization 0.5 ml of 10%, ascorbic acid solution was added in Mili Q® water, and the solution was vortexed again. The containers were hermetically sealed and conditioned in a boiling water bath for 7 min. After cooling to room temperature, absorbance readings of the samples were taken at the wavelength of 820 nm. All analyses were performed in triplicate. Potassium hydrogen orthophosphate solutions were used for the construction of the calibration curve (Eq. 4), using Mili Q® water as a blank. The correlation coefficient $R^2 = 0.99$ for $n = 27$.

$$\text{Phosphorous} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = 0.0013 \times \text{Abs} \quad (R^2 = 0.99) \quad (\text{Eq. 4})$$

The degree of derivatization (DD) of the HA was obtained by Eq. 5.

$$DD(\%) = \frac{P_{\text{DMPE-HA}} - P_{\text{HA}}}{P_{\text{HA100\%}}} \times 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

Where $P_{\text{DMPE-HA}}$ is the concentration of phosphorus in the derivatized material, P_{HA} is the phosphorous in the non-derivatized DMPE and $P_{\text{HA100\%}}$ is the maximum phosphorous for theoretical 100% derivatized HA.

Liposome elasticity

The elasticity of empty and PpB loaded liposomes was evaluated according to a protocol adapted from Trotta et al. (2003), Oliveira (2007) and Zanchetta (2009). Briefly, the liposomal formulations were extruded through two stacked 30 nm polycarbonate membranes (Poretic Products, USA), simulating the pore size and tortuosity of the human skin. A single passage was performed at 37 °C and 2.5 atm simulating the transepidermal gradient. The experiments were done in an extruder working with nitrogen pressure and at controlled temperature (model T.001, Lipex Biomembranes Inc.). The elasticity was evaluated by the ability of liposomes to return to the original structure after a single forced passage. Measures of mean hydrodynamic diameter, polydispersity, zeta potential, and phosphate concentration were performed before and after permeation through the membranes.

Storage stability

The stability of liposomes was evaluated by the maintenance of their structural properties (average hydrodynamic diameter, PDI and zeta potential) along storage in closed flasks at 8 °C.

Results and discussion

Conventional liposomes

Physicochemical properties

Table 2 shows the influence of the PpB extract on the physicochemical properties of the elastic liposomes, such as the average hydrodynamic diameter, polydispersity index, and zeta potential. The measurements were performed after 24 hours of preparation and storage at 8 °C.

Table 2. Influence of extract/lipid ratio on the average hydrodynamic diameter (Z-average), polydispersity index (PDI) and zeta potential of liposomes.

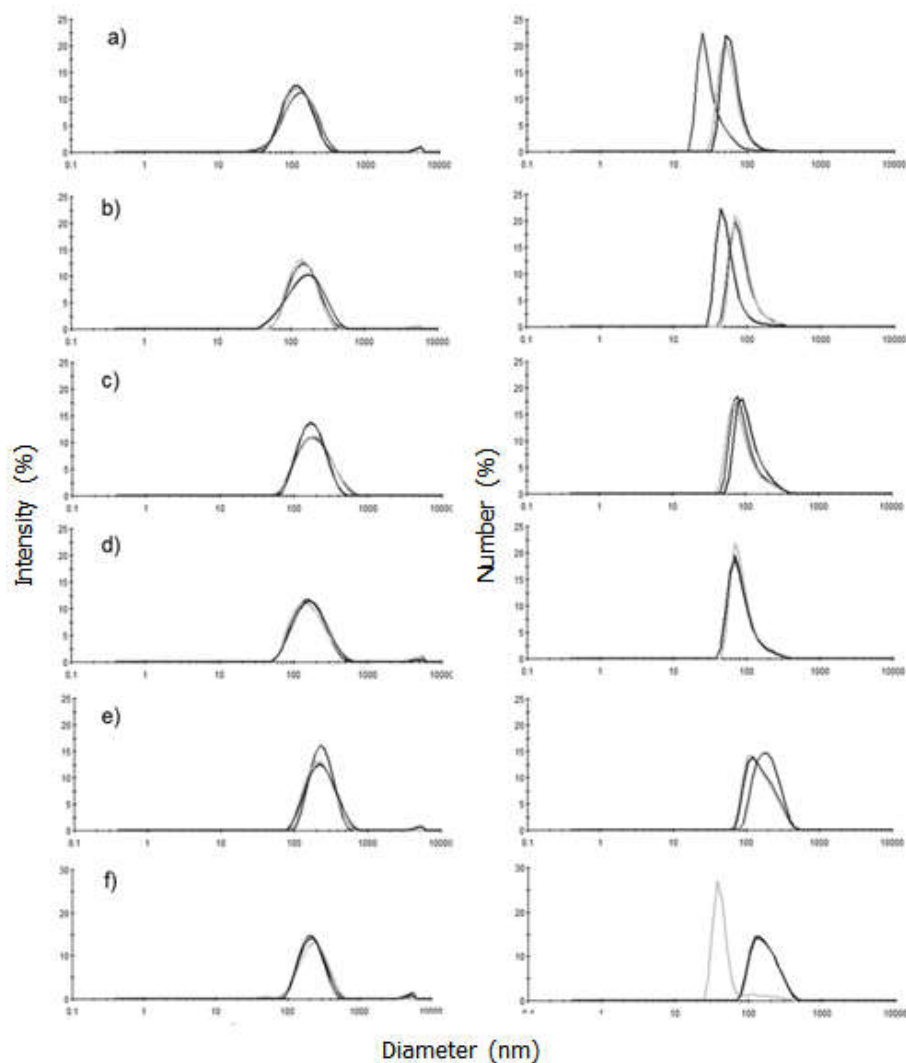
(Extract/Lipid) (%)	Z-Average (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)
0	114.43 ± 3.50	0.23 ± 0.01	-7.93 ± 0.34
10	137.33 ± 2.74	0.21 ± 0.01	-10.37 ± 0.54
20	160.27 ± 3.60	0.20 ± 0.00	-9.59 ± 0.36
30	214.73 ± 1.36	0.25 ± 0.01	-20.97 ± 0.28
40	205.87 ± 5.20	0.21 ± 0.01	-22.17 ± 0.28
50	209.80 ± 2.39	0.24 ± 0.02	-20.47 ± 0.21

$$Z\text{-average} \approx \sum D_i^6 / \sum D_i^6$$

The data indicate the extract was incorporated preferentially in the lipid bilayer as expected. Saturation of the membrane was 30% extract/lipid approx., according to Z-average values. Low PDI (0.25 or lower) was observed for all formulations, even for empty liposomes, indicating the extract stabilized the membrane. It should be noted that these values were obtained after preparation, without none further homogenization of sizes. Similar behavior was observed for zeta potential. The extract loading increased the zeta potential of liposomes, in absolute values, yielding more stable vesicles.

Figure 2 shows DLS spectra in terms of the populational distributions for diameter (d) in terms of Intensity (I), $I \propto d^6$, and Number (N), $N \propto d$. As observed, both distributions are predominantly unimodal, supporting PDI lower than 0.25. The Intensity distributions show $50 <d> 1000$ nm with displacement to the higher diameters with the extract loading. Number distributions show the prevalent diameters around 100 nm close the saturation (10 - 20% extract/lipid). Lower diameters can be observed for empty liposomes, while the highest diameters for 50% extract/lipid indicate the presence of other aggregates.

Figure 2. Diameter distributions in Intensity (left side) and Number (right side) for liposomes with a) 0%, b) 10%, c) 20%, d) 30%, e) 40% and f) 50% extract/lipid.



Efficiency and entrapment capacity

Table 3. Shows the results obtained for encapsulation efficiency (EE) and encapsulation capacity (CE) of conventional liposomes containing 10 - 50% PpB extract.

(Extract/Lipid) (%)	EE (%)	CE (%)
10	81.23 ± 8.26	7.30 ± 1.35
20	89.96 ± 3.80	17.99 ± 0.76
30	92.41 ± 2.65	27.72 ± 0.79
40	85.84 ± 2.32	34.33 ± 0.93
50	71.26 ± 3.54	35.63 ± 1.77

$$EE (\%) = 100 \times (C_t/C_i); CE (\%) = 100 \times (C_t/C_i)$$

As could be observed, a high encapsulation efficiency was obtained for the extract ($EE=92,41 \pm 2,65$). The maximal encapsulation capacity of the lipid membrane, $CE = 27.72 \pm 0.79$ extract/lipid approx., at the end of the process, that corresponds to the saturation of lipid bilayer, following the behavior of the average hydrodynamic diameter and zeta potential showed in Table 2.

Elasticity

The recovery of the mean diameter, PDI and zeta potential, together with the percentage of phosphorus after passage through the two stacked membranes, were used as parameters to identify the capacity of the liposome to undergo deformation or elasticity. Table 4 shows the percentage of changes in the parameters after and before permeation.

Table 4 Percentage of changes in average hydrodynamic diameter (Z-average), PDI, zeta potential and phosphorous of conventional liposomes after undergoing extrusion through two stacked membranes (30 nm pores).

(PpB/Lipid) (%)	Z-Average (%)	PDI (%)	Zeta potential (%)	Phosphorous (%)
0	-7.46	10.71	5.99	71.57 ± 1.50
10	-0.23	-3.45	4.74	83.12 ± 1.75
20	5.3	-15.79	28.19	81.62 ± 1.01
30	-4.82	-16.13	5.12	86.90 ± 2.05
40	0.77	-15.38	-3.73	85.2 ± 1.62
50	-2.38	-8	-15.53	86.35 ± 2.13

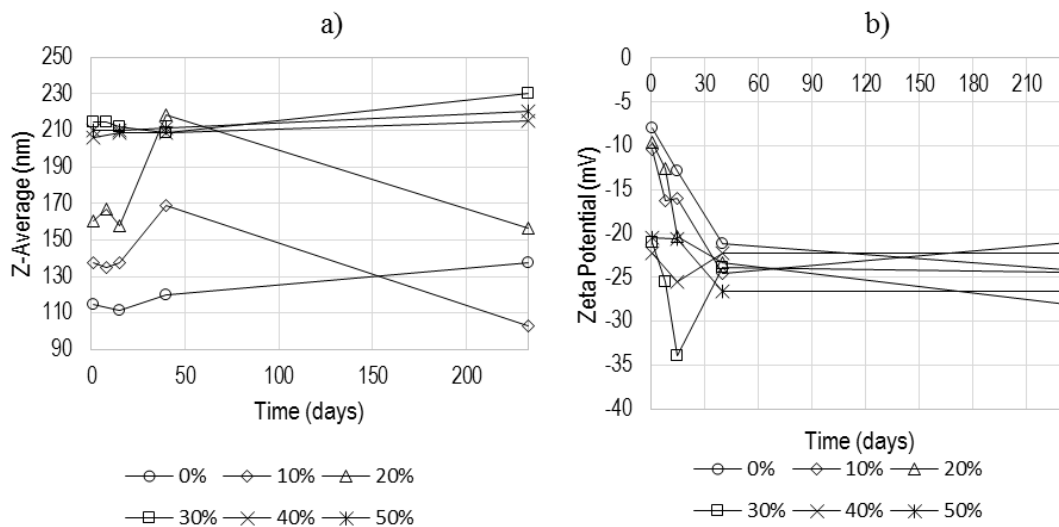
The control liposomes (EPC: DMPE 80:20) were the only ones that showed a significant variation of the average diameter (p -value < 0.05). For the formulations with PpB extract, the highest observed deviation of 5.30% (not significant $p > 0.05$) was observed to 20% PpB extract. The highest zeta potential changes around 20% PpB indicates re-structuration close to saturation of the membrane. Except for the empty liposomes, 80% approx. of the original phosphorous content was recovered after passage through the nanoporous membranes. Although the changes in PDI, it is reasonable to consider the conventional liposomes have an elastic behavior due to their ability for undergoing deformation from their original size ~ 200 nm to 30 nm pores and recovery most of their sizes and phosphorous content. Moreover, the PpB extract stabilized the liposomal membrane.

Storage stability

The conventional liposomes stored along 233 days at 8 °C in a closed container show precipitate-free appearance. The evolutions of average hydrodynamic diameter (Figure 3a) and zeta potential (Figure3b) showed the most extensive changes occurred for the empty liposomes and loaded with 10 and 20% PbB along the first 40 days. For PpB loading corresponding to membrane saturation

(>20%), the liposomes remained stable throughout the storage time. The size-distributions in terms of Intensity and Number were mostly unimodal (data not shown) confirming the results of Figure 3.

Figure 3. Evolution of the average hydrodynamic diameter (a) and zeta potential (b) along with 233-days follow-up.



Surface Modified Liposomes

Derivatization DMPE-HA

Figure 4 a) Shows DSC thermograms for the pure components HA and DMPE before and DMPE-HA after purification, and b) shows FTIR spectra for A – the pure HA, B – pure DMPE and C – DMPE-HA after purification.

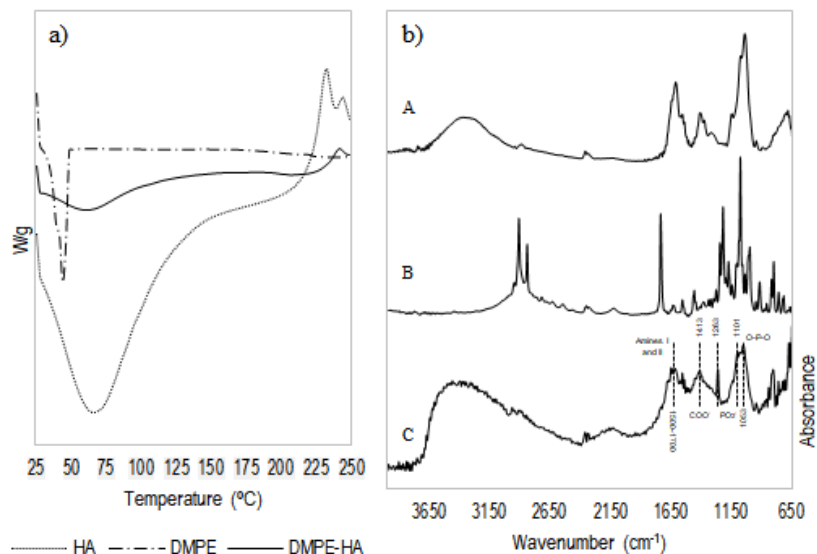


Figure 4 (a,b) show DSC thermograms and FTIR spectra for the pure components HA, DMPE, and also for DMPE-HA coupling via DMTMM. Comparing the thermograms, the coupling can be identified by the highlighted novel peaks at 1053, 1101 e 1263 cm⁻¹ correspondent to P-O type links in DMPE-HA, which are absent in HA spectrum, evidence the coupling DMPE-HA. The covalent coupling in DMPE-HA thermogram (Figure 4) are evidenced by the appearance of a new exothermic peak at approximately 242 ° C which is absent in the pure HA thermogram.

Derivatization degree was 41.29% approx. of the carboxyl groups of HA, as calculated by Eq. 5. This degree corresponds to 82.64% of the theoretical calculations for 50% derivatization of the total groups. Comparing with DMPE-HA derivatization mediated by EDC carbodiimide and in the presence of NHS, described by Saadat et al. (2014,1,2), the yield was eight times higher with DMTMM as carboxyl group activator used in this work. It should be highlighted that the reaction route mediated by DMTMM is advantageous because it does not require an excess of the reagents or high temperatures. D'Este et al. (2014) compared amination reaction via EDC/NHS or DMTMM, adding the advantages of higher reproducibility and no requirements of pH control for DMTMM route, besides higher specificity, derivatization degree, and absence of the N-acyl urea by-product.

Physicochemical properties

The data in Table 5 show the consequences on the physicochemical properties due to the presence of 5 or 10% DMPE-HA in liposome composition. Higher percentages of DMPE-HA destabilized liposomal structures and formed dense precipitates. These results clearly show the role of the balance of attraction forces of the lipophilic moieties and repulsion between the HA chains on the surface of the liposomes.

Table 5. Influence of DMPE-HA /Lipid ratio on the average hydrodynamic diameter (Z-average), polydispersity index (PDI) and zeta potential for empty and 50% PbB loaded surface-modified liposomes

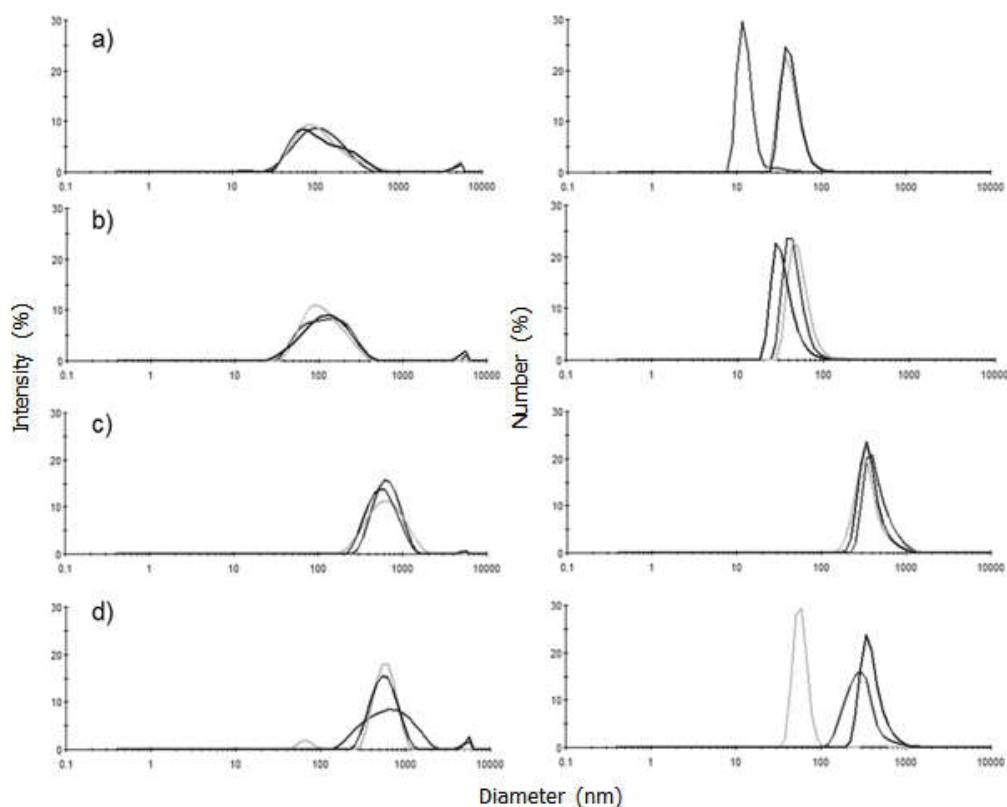
(DMPE-HA/Lipid) (%)	(PbB/EPC:DMPE-HA) (%)	Z-Average (nm)	PDI	Zeta potential (mV)
0%	0%	114.43 ± 3.50	0.23 ± 0.01	-7.93 ± 0.34
5%	0%	104.23 ± 1.31	0.36 ± 0.01	-11.03 ± 0.97
10%	0%	122.80 ± 5.30	0.35 ± 0.03	-9.55 ± 0.68
0%	50%	209.80 ± 2.39	0.24 ± 0.02	-20.47 ± 0.21
5%	50%	501.53 ± 5.92	0.28 ± 0.04	-19.53 ± 0.34
10%	50%	531.57 ± 14.00	0.47 ± 0.09	-23.80 ± 0.88

The main effects were observed on hydrodynamic diameter for the liposomes loaded with PbB, which had their Z-average doubled in the presence of 5 and 10% DMPE-HA. PDI values were lower than 0.4, indicating moderate polydispersity for all compositions. Although statistically different at $p < 0.05$, no substantial changes were observed for zeta potential among the compositions and, in comparison with the conventional liposomes. Therefore, the effects on size can be attributed to the

conformation of the HA chains (more stretched or lying on the surface) as a consequence of the equilibrium of forces between the bilayer and the HA coverage.

Figure 5 shows diameter distributions in Intensity and Number for the surface-modified liposomes. No substantial differences could be observed in the distributions of Figure 5 a, b and c, as well as compared to conventional liposomes (Figure 2 a,b and c). However, for 50% PpB loaded liposomes (Figure 5d), distributions were more disperse than for conventional liposomes (Figure 2d), evidencing the imbalance of forces in the bilayer due to the incorporation of 10% DMPE-HA.

Figure 5. Diameter distributions in Intensity (left side) and Number (right side) for the empty liposomes with a) 5%, b) 10% DMPE-HA and c) loaded with 50% PpB and 5%DMPE-HA and d) loaded with 50% PpB and 10%DMPE-HA.



Encapsulation efficiency and capacity

The results show no substantial differences in EE and CE for the non-modified or surface-modified liposomes. Therefore, EE and CE are controlled by the interactions between PpB and the lipids in the bilayer, which do not appear to be disturbed by incorporation of 5-10% DMPE-HA.

Table 6. Influence of DMPE-HA content on efficiency (EE) and encapsulation capacity (EC) of the HA surface-modified liposomes loaded with 50% PbB extract.

(DMPE-AH/Lipid)	(PpB/(Lipid +DMPE-AH))	EE (%)	CE (%)
0%	50%	71.26 ± 3.54	35.63 ± 1.77
5%	50%	72.08 ± 1.88	36.04 ± 0.94
10%	50%	69.46 ± 0.67	34.73 ± 0.34

Elasticity

Table 7 shows percentage changes in the physicochemical properties and phosphorous recovery of the surface-modified liposomes after undergoing extrusion through two stacked membranes (30 nm pores).

Table 7. Percentage of changes in average hydrodynamic diameter (Z-average), PDI, Zeta potential and phosphorous for the surface-modified liposomes after undergoing extrusion through two stacked membranes (30 nm pores).

(DMPE-HA/Lipid) (%)	(PpB/Lipid) (%)	Z-Average (%)	PDI (%)	Zeta Potential (%)	Phosphorous (%)
5	0	110.17 ± 1.93	0.32 ± 0.03	-18.90 ± 0.78	97.49 ± 1.12
5	50	240.56 ± 2.42	0.40 ± 0.08	-22.37 ± 0.41	90.17 ± 1.35
10	0	153.01 ± 6.64	0.40 ± 0.01	-20.50 ± 0.62	97.12 ± 0.13
10	50	350.60 ± 9.80	0.40 ± 0.02	-31.77 ± 0.65	91.52 ± 2.13

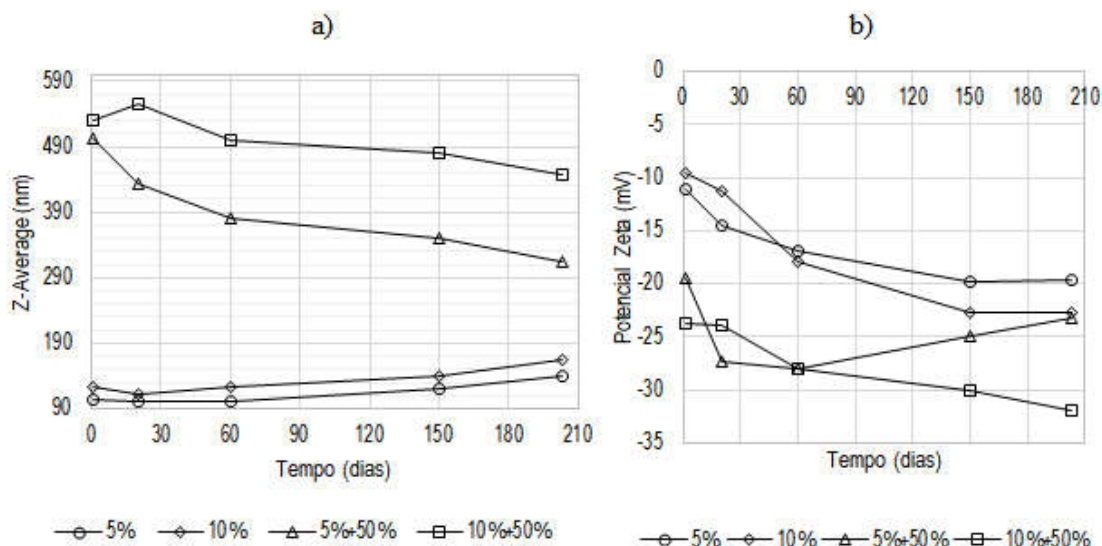
As for the conventional liposomes, the elasticity of the surface-modified liposomes was evaluated for their ability to recover the mean diameter, polydispersity and zeta potential, together with the percentage of phosphorus after extrusion in nanopore membranes. Table 7 shows the obtained results in terms of percentage changes for the evaluated properties.

The incorporation of 5-10% DMPE-HA did not change the extrusion behavior substantially compared to the conventional liposomes for Z-average, PDI, and zeta potential. However, the major difference could be observed for phosphorous recovery after extrusion. The percentages increased to 96% for the empty liposomes and were around 90% for the PpB loaded liposomes. These changes are in consequence of the protection of the surface due to hydration provided by the HA coverage.

Storage stability

The changes in average diameter and zeta-potential during storage of the surface-modified liposomes along 203 days at 8 °C in a closed container are shown in Figure 6.

Figure 6. Evolution of average diameter and zeta-potential of the HA surface-modified liposomes along storage at 8 °C in closed flasks.



It could be observed that Z-average did not change significantly along with storage for the empty 5 and 10% DMPE-HA liposomes and also for 50% loaded PpB liposomes containing 10 % DMPE-HA. The changes were similar to those of conventional liposomes. For the same compositions, zeta potential decreased along with storage, being more smoothly than for the conventional liposomes. The major changes were observed for 50% loading PpB and 5% DMPE-HA both for average diameter and zeta potential, with a tendency for aggregation (increment in zeta-potential). Therefore, about 50 days storage minimal changes can be assured for the surface-modified liposomes.

Conclusions

The development of liposomes entrapping a 'sucupira' or PpB extract, shows the preparation of liposomes by dripping of lipids in ethanol under high shearing proved to be an efficient and scalable technology for preparation of liposomes containing the vegetable extract. Derivatization of DMPE with HA via DMTMM provided efficient and reproducible coupling without generation of toxic by-products. The extract was efficiently entrapped in both conventional and surface-modified liposomes, which showed elasticity that assured recovery of their physicochemical properties after extrusion through nanoporous membranes. Taken together, the medicinal properties of the extract for the treatment of osteoarthritis and its efficient incorporation in elastic liposomes should improve activity for topical application. This study paves the way for a for scalable production of liposomal PpB extract as well as for more in-depth in vitro and in vivo investigations on its benefits on the treatment of osteoarthritis.

Acknowledgments

This study was supported by the National Council for Scientific and Technological Development CNPq- Brazil (grant number 423787/2016-0).

References

1. Alvez SF, Borges LL, Santos TO, Paula JR, Conceição EC, Bara MT (2014) Microencapsulation of Essential Oil from Fruits of *Pterodon emarginatus* Using Gum Arabic and Maltodextrin as Wall Material: Composition and Stability, *Drying Technology*, 32:96 – 105.
2. Chen PS, Toribara TY, Warner H (1956) Microdetermination of Phosphorous, *Analytical Chemistry*.
3. Choy E (2012) Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, *Rheumatology* 51.
4. Coelho LP, Reis PA, Castro FL, Gayer CRM, Lopes CS, Silva MCC, Sabino KCC, Todeschini AR, Coelho MGP (2005) Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth. Seeds, *Journal of Ethnopharmacology* 98:109 – 116.
5. Colmegna I, Ohata BR, Menard HA (2012) Current understanding of rheumatoid arthritis therapy, *Clin. Pharmacol. Ther.* 91,4.
6. Deshiikan SR, Papadopoulos KD. Modified Booth equation for the calculation of zeta potential. *Colloid Polym Sci.* 1998;276(2):117-124.
7. Grando R, Souza V H, Monteiro KM, Sousa IMO, Queiroz NCA, Carvalho JE, Spindola HM, FOGLIO MA (2017) Comparison of Standardized Dichloromethane with Aqueous *Pterodon pubescens* Benth. Fruit Extracts on Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activity, *J. Braz. Chem. Soc.* 28, 3:455 – 464.
8. Kunushima M, Kawachi C, Iwasaki F, Terao K (1999) Synthesis and characterization of 4-(4-6-dimethoxy-1-3-4-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride, *Tetrahedron Letters* 40:5327 – 5330.
9. Imboden JB (2009) The Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis, *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 4:417 – 434.
10. Lima HC “*Pterodon*”, em *Lista de Espécies da Flora do Brasil*, forzza RC, stehmann JR, nadruz M (2012) Eds. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
11. Lloret FC, Santos CCJ, Medina LS, Queiroz NCA, Sousa IMO, Ruiz ALTG, Carvalho JE, Foglio MA (2016) 6 α -acetoxo-7 β -hydroxy-vouacapan Isolated from *Pterodon pubescens* Benth. Fruit's with Selective Activity against Prostate Cancer Cell Line: Artifact or Natural Product?, *Medicinal & Aromatic Plants* 5, 2.
12. Lopes JFM, Santana MHA, Rosales MAB, Alonso AB (2016) Composição e formulação farmacêutica para tratamento ocular não invasivo e seus usos, Patent WO2016205908 A1, Universidade Estadual de Campinas - Unicamp.
13. Lorenzi H (1998) *Árvores Brasileiras, Manual de Identificação e Plantas Arbóreas Nativas do Brasil* 1:227.
14. McInnes IB, Schett G, (2007) Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, *Immunology* 7:429 – 442.
15. Nucci C, Mazzardo-martins L, Tramosk, J, Brethanha LC, Pizzolatti MG, Santos ARS, Martins DF (2012) Oleaginous extract from the fruits *Pterodon pubescens* Benth induces antinociception in animal models of acute and chronic pain, *Journal of Ethnopharmacology* 143:170 – 178.
16. Nucci-martins C, Martins DF, Nascimento LF, VENZke D, Oliveira AS, Frederico MJS, Silva FRMB, Brighente IMC, Pizzolatti MG, Santos ARS (2015) Ameliorative potential of standardized fruit extract of *Pterodon pubescens* Benth on neuropathic pain in mice: Evidence for the mechanism of action, *Journal of Ethnopharmacology* 175:273 – 286.
17. Oliveira LL (2007) *Preparação, Reologia e Transição de Formas de Lipossomas Elásticos em Membranas de nanoporos*, Dissertation.
18. Pandit J, Agil M, Sultana Y (2016) Nanoencapsulation Technology To Control Release and Enhance Bioactivity of Essential oils, *Nanotechnology in the Agri-Food Industry* 2:597 – 640.
19. Petta D (2018) Development of hyaluronic acid derivatives for application in biomedical engineering, PhD Thesis, University of Twente, The Netherlands.
20. Pio Correa M (1975) *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*, Instituto Brasileiro do Desenvolvimento Florestal 1:153.
21. Sabino KCC, Castro FA, Oliveira JCR, Dalmau SRA, Coelho MGP (1999a) Successful Treatment of Collagen-induced Arthritis in Mice with a Hydroalcohol Extract of Seeds of *Pterodon pubescens*, *Phytotherapy Research* 13:613 – 615.

22. Sabino KCC, Gayer CRM, Vaz LCA, Santos LRL, Felzenszwalb I, Coelho MGP (1999b) In vitro and in vivo toxicological study of the *Pterodon pubescens* seed oil, *Toxicology Letters* 108:27 – 35.
23. Santos ÉS, Garcia FP, Outuki PM, Hoscheid J, Goes PRN, Cardozo-filho L, Nakamura CV, Cardoso MLC (2016) Optimization of extraction method and evaluation of antileishmanial activity of oil and nanoemulsions of *Pterodon pubescens* benth. fruit extracts, *Experimental Parasitology* 170:252 – 260.
24. Servat L, Spindola HM, Rodrigues RAF, Sousa IMO, Ruiz ALTG, Carvalho JE, Foglio MA (2012) *Pterodon pubescens* Benth: Stability Study of Microencapsulated Extract and Isolated Compounds Monitored by Antinociceptive Assays, *J. Braz. Chem. Soc.* 23, 7:1244 – 1253.
25. Shrivastava A, Sandey A (2013) Inflammation and rheumatoid arthritis, *J. Physiol. Biochem.* 69:335 – 347.
26. Silva MCC, Gayer CRM, Lopes CS, Calixto NO, Reis PA, Passaes CPB, Paes MC, Dalmau SR, Sabino KCC, Todeschini AR, Coelho MGP (2004) Acute and topic anti-endematogenic fractions isolated from the seeds of *Pterodon pubescens*, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 55:135 – 141.
27. Spindola HM, Carvalho JE, Ruiz ALTG, Rodrigues RAF, Denny C, Sousa IMO, Tamashiro JY, Foglio MA (2009) Furanoditerpenes from *Pterodon pubescens* Benth with Selective in vitro Anticancer Activity for Prostate Cell line, *J. Braz. Chem. Soc.* 20, 3:569 – 575.
28. Spindola HM, Servat L, Denny C, Rodrigues RAF, eberlin MN, Cabral E, Sousa IMO, Tamashiro JY, Carvalho JE, Foglio MA (2010) Antinociceptive effect of geranylgeraniol and 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oate methyl ester isolated from *Pterodon pubescens* Benthm *BMC Pharmacology* 10, 1.
29. Spindola H, Mservat L, Rodrigues RAF, Sousa IMO, Carvalho JE, Foglio MA (2011) Geranylgeraniol and 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oate methyl ester isolated from *Pterodon pubescens* Benth: Further investigation on the antinociceptive mechanism of action, *European Journal of Pharmacology* 656:45 – 51.
30. Trotta M, Peira E, Carlotti ME, Gallarate M (2004) Deformable liposomes for dermal administration of methotrexate, *International Journal of Pharmaceutics* 207:119 – 125.
31. Verma DD, Verma S, Blume G, Fahr A (2003) Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin, *International Journal of Pharmaceutics* 258:141 – 151.
32. Vieira CR, Marques MF, Soares PR, Matuda L, Oliveira CMA, Kato L, Silva CC, Guillo LA (2008) Antiproliferative activity of *Pterodon pubescens* Benth. seed oil and its principle on human melanoma cells, *Phytomedicine* 15:528 – 532.
33. Bartira Rossi-Bergmann, Camila A.B. Falcão, Beatriz Zanchetta, Maria Vitoria L. Badra Bentley, Maria Helena Andrade Santana, Performance of Elastic Liposomes for Topical Treatment of Cutaneous Leishmaniasis, p. 181, in Ruy Beck, Silvia Guterres, and Adriana Pohlmann (Eds.) *Nanocosmetics and Nanomedicines New Approaches for Skin Care*, 2011 Springer-Verlag Berlin Heidelberg, DOI 10.1007/978-3-642-19792-5.